

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6949728号  
(P6949728)

(45) 発行日 令和3年10月13日(2021.10.13)

(24) 登録日 令和3年9月27日(2021.9.27)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/09	(2006.01)
A 61 K 35/17	(2015.01)
A 61 K 35/76	(2015.01)
A 61 K 35/761	(2015.01)
A 61 K 48/00	(2006.01)
C 12 N	15/09
A 61 K	35/17
A 61 K	35/76
A 61 K	35/761
A 61 K	48/00

請求項の数 30 (全 100 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-561975 (P2017-561975)	(73) 特許権者	516316897 ジュノー セラピューティクス インコーポレイテッド アメリカ合衆国 98109 ワシントン 州 シアトル デクスター アベニュー ノース 400 スイート 1200
(86) (22) 出願日	平成28年5月27日 (2016.5.27)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(65) 公表番号	特表2018-516082 (P2018-516082A)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(43) 公表日	平成30年6月21日 (2018.6.21)	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(86) 國際出願番号	PCT/US2016/034873	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 國際公開番号	W02016/196388		
(87) 國際公開日	平成28年12月8日 (2016.12.8)		
審査請求日	令和1年5月21日 (2019.5.21)		
(31) 優先権主張番号	62/168,721		
(32) 優先日	平成27年5月29日 (2015.5.29)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	62/244,132		
(32) 優先日	平成27年10月20日 (2015.10.20)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子操作された細胞における阻害相互作用を調節するための組成物および方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

遺伝子操作されたT細胞を生成する方法であって、該方法が、

(a) 抗原に特異的に結合する遺伝子操作された抗原受容体を、T細胞を含む細胞の集団に導入する工程であって、該遺伝子操作された抗原受容体が、前記抗原に特異的に結合する細胞外抗原認識ドメイン、ならびにCD3-ゼータ(CD3-)鎖および補助刺激シグナル伝達領域を含む細胞内領域を含む、キメラ抗原受容体(CAR)である、工程、ならびに

(b) 前記T細胞を含む細胞の集団にPD-L1をコードする遺伝子を破壊することができる作用物質を導入する工程

を含み、

前記導入が、1つまたは複数の条件下でのインキュベーション時の作用物質が導入されていない対応するT細胞を含む細胞の集団中のT細胞におけるPD-L1の発現および/またはアップレギュレーションと比較して、前記1つまたは複数の条件下でのインキュベーション時の前記T細胞を含む細胞の集団中のT細胞におけるPD-L1の発現を低減し、かつ/またはPD-L1のアップレギュレーションを阻害し、

前記破壊が、可逆的ではなく、かつ/または一過性でなく、

工程(a)および(b)を同時にまたは任意の順序で逐次的に実行することによって、前記T細胞を含む細胞の集団中のT細胞に前記遺伝子操作された抗原受容体および前記作用物質を導入し、かつ、

前記方法がエクスピボで行われる、

10

20

方法。

【請求項 2】

遺伝子操作されたT細胞におけるPD-L1の発現を調節する方法であって、該方法が、PD-L1をコードする遺伝子を破壊することができる作用物質を、T細胞を含む細胞の集団に導入する工程を含み、

前記導入が、1つまたは複数の条件下でのインキュベーション時の作用物質が導入されていない対応するT細胞を含む細胞の集団におけるPD-L1の発現および/またはアップレギュレーションと比較して、前記1つまたは複数の条件下でのインキュベーション時のT細胞を含む細胞の集団中のT細胞におけるPD-L1の発現を低減し、かつ/またはPD-L1のアップレギュレーションを阻害し、

10

前記T細胞が、抗原に特異的に結合する遺伝子操作された抗原受容体を含み、該遺伝子操作された抗原受容体が、前記抗原に特異的に結合する細胞外抗原認識ドメイン、ならびにCD3-ゼータ(CD3 $\zeta$ )鎖および補助刺激シグナル伝達領域を含む細胞内領域を含む、キメラ抗原受容体(CAR)であり、

前記破壊が、可逆的ではなく、かつ/または一過性でなく、かつ、

前記方法がエクスピボで行われる、

方法。

【請求項 3】

前記1つまたは複数の条件下でのインキュベーションが、前記抗原の存在を含み、かつ、前記作用物質が導入されていない対応するT細胞を含む細胞の集団において、PD-L1の発現および/またはアップレギュレーションを誘導する、請求項1または2記載の方法。

20

【請求項 4】

前記抗原の存在下でのインキュベーションが、前記細胞を前記抗原と共にインビトロでインキュベートすることを含む、請求項3記載の方法。

【請求項 5】

前記抗原の存在下でのインキュベーションが、それぞれ両端の値を含めて2時間~48時間、6時間~30時間、または12時間~24時間であるか、あるいは48時間未満、36時間未満、または24時間未満である、請求項4記載の方法。

【請求項 6】

前記抗原の存在下でのインキュベーションが、前記抗原の存在を含む条件下で前記T細胞を含む細胞の集団を対象に投与することを含み、それによって、前記操作された抗原受容体が、該インキュベーションの少なくとも一部にわたって前記抗原に特異的に結合する、請求項3記載の方法。

30

【請求項 7】

前記抗原の存在下でのインキュベーションが、前記対象への前記作用物質が導入されていない対応するT細胞を含む細胞の集団の投与後24時間、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日の期間内に、前記作用物質が導入されていない対応するT細胞を含む細胞の集団において、PD-L1の発現および/またはアップレギュレーションを誘導する、請求項6記載の方法。

【請求項 8】

40

前記T細胞を含む細胞の集団中のT細胞におけるPD-L1の発現の低減および/またはアップレギュレーションの阻害が、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%もしくはそれ以上である、請求項1~7のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9】

前記作用物質の発現が条件的であり、前記発現が、条件的なプロモーターまたはエンハンサーまたはトランスアクチベーターの制御下にある、請求項1~8のいずれか一項記載の方法。

【請求項 10】

前記プロモーターが、誘導性プロモーターまたは抑制性のプロモーターである、請求項9記載の方法。

50

**【請求項 1 1】**

前記作用物質が、前記T細胞を含む細胞の集団中のT細胞におけるPD-L1の発現の持続的な低減または妨害を引き起こすために前記T細胞を含む細胞の集団中のT細胞において安定に発現される、請求項1~8のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 1 2】**

前記破壊が、前記遺伝子をDNAレベルで破壊することを含む、請求項1~11のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 1 3】**

前記作用物質の導入が、PD-L1をコードする遺伝子を特異的に認識するDNA結合タンパク質またはDNA結合核酸を導入することを含む、請求項1~12のいずれか一項記載の方法。 10

**【請求項 1 4】**

前記作用物質が、前記遺伝子を特異的に認識する遺伝子編集ヌクレアーゼまたは遺伝子編集ヌクレアーゼ含有複合体を含む、請求項1~13のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 1 5】**

前記作用物質が、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、TALエフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、または、前記遺伝子に特異的なクラスター化して規則的な配置の短い回文配列核酸 (CRISPR) によってガイドされるCasタンパク質を含む、請求項1~14のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 1 6】**

前記作用物質が、前記遺伝子に特異的なCRISPR-Cas9の組み合わせである、請求項1~15のいずれか一項記載の方法。 20

**【請求項 1 7】**

前記遺伝子のエクソンおよび/または前記遺伝子のコードされるポリペプチドのN末端をコードしている部分が特異的に認識される、請求項13~16のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 1 8】**

前記作用物質の導入が、前記遺伝子におけるフレームシフト変異および/または前記遺伝子のコード領域内の早期停止コドンの挿入を引き起こす、請求項1~17のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 1 9】**

1つまたは複数の条件下でのインキュベーション時のさらなる作用物質が導入されていない対応するT細胞を含む細胞の集団におけるPD-1の発現および/またはアップレギュレーションと比較して、前記1つまたは複数の条件下でのインキュベーション時の前記集団中のT細胞におけるPD-1の発現の低減を引き起こすことができかつ/またはPD-1のアップレギュレーションを阻害することができる前記さらなる作用物質を、前記T細胞を含む細胞の集団に導入する工程 30

をさらに含み、前記PD-1の発現の低減および/またはアップレギュレーションの阻害が一時的または一過性である、請求項1~18のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 2 0】**

前記さらなる作用物質が、前記細胞におけるPD-1の発現の条件的な低減または妨害を引き起こすために前記T細胞を含む細胞の集団において誘導性に発現または抑制される、請求項19記載の方法。 40

**【請求項 2 1】**

前記さらなる作用物質が、前記細胞におけるPD-1の発現を低減する阻害性核酸分子である、請求項19または20記載の方法。

**【請求項 2 2】**

前記阻害性核酸分子がRNA干渉作用物質を含む、請求項21記載の方法。

**【請求項 2 3】**

前記阻害性核酸が、低分子干渉RNA (siRNA)、マイクロRNA適合shRNA、短鎖ヘアピンRNA (shRNA)、ヘアピンsiRNA、前駆体マイクロRNA (pre-miRNA) もしくはマイクロRNA (miRNA) であるか、またはそれを含むか、またはそれをコードする、請求項21または22記載 50

の方法。

【請求項 2 4】

前記阻害性核酸分子がPD-1コード核酸に相補的な配列を含む、請求項21～23のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 5】

前記阻害性核酸分子が、PD-1コード核酸に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、請求項21記載の方法。

【請求項 2 6】

前記T細胞が、CD4+T細胞またはCD8+T細胞である、請求項1～25のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項 2 7】

前記補助刺激シグナル伝達領域が、CD28または4-1BBのシグナル伝達ドメインを含む、請求項1～26のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 8】

前記T細胞がヒト細胞である、請求項1～27のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 9】

請求項1～28のいずれか一項記載の方法によって生成される細胞。

【請求項 3 0】

請求項29記載の細胞と薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2015年5月29日に出願された米国仮出願第62/168,721号、発明の名称「Composition and Methods for Regulating Inhibitory Interactions in Genetically Engineered Cells」、および2015年10月20日に出願された米国仮出願第62/244,132号、発明の名称「Composition and Methods for Regulating Inhibitory Interactions in Genetically Engineered Cells」に基づく優先権を主張し、各仮出願の内容は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0002】

30

参照による配列表の組み入れ

本願は電子形式の配列表と一緒に出願されている。配列表は、2016年5月27日に作成された、735042002440seqlist.txtという名称のファイルとして提供されており、そのサイズは41キロバイトである。配列表の電子形式での情報は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0003】

分野

本開示は、一部の局面において、T細胞を含む、養子療法のための操作された細胞に関する。一部の局面において、本開示はさらに、細胞を操作して生成するための方法および組成物、前記細胞を含有する組成物、ならびにそれらを対象に投与するための方法に関する。一部の態様において、T細胞などの細胞は、抗原に特異的に結合する遺伝子操作された抗原受容体、例えばキメラ抗原受容体(CAR)を含有する。一部の態様において、細胞、例えばCAR発現T細胞は、操作された細胞において、ある遺伝子、例えば免疫応答の阻害に関与する遺伝子を、抑制および/または破壊することによって、阻害効果を低減することができる作用物質を含有する。一部の態様において、本細胞および本方法の特徴は、活性、効力および/または持続性の増加または改善をもたらす。

40

【背景技術】

【0004】

背景

養子療法のために、操作された細胞を生成し、それを投与するには、さまざまな戦略を

50

利用することができる。例えば、遺伝子操作された抗原受容体、例えばCARを発現する免疫細胞を操作するための戦略、および前記細胞における遺伝子発現を抑制または抑制するための戦略を利用することができます。例えばエフェクター機能の抑制を回避することならびに対象への投与時の細胞の活性および/または生存を改良することなどによって細胞の効力を改良するには、改良された戦略が必要になる。そのようなニーズを満たす方法、細胞、組成物、キット、およびシステムが提供される。

#### 【発明の概要】

##### 【0005】

###### 概要

遺伝子操作された（組換え）細胞表面受容体を発現する細胞、例えば対象における疾患および/または状態を処置するために養子細胞療法において使用するための細胞などを生成または作製するための方法が提供される。そのような方法において使用するための細胞、組成物、および製造品も提供される。前記組成物および前記細胞は、一般に、PD-L1および/またはPD-1の発現を低減する作用物質、またはPD-L1および/もしくはPD-1の発現の低減を引き起こすことができる作用物質を含む。一部の態様において、前記作用物質は阻害性核酸分子、例えばPD-L1またはPD-1をコードする遺伝子または核酸に相補的であり、同遺伝子または核酸を標的とし、同遺伝子または核酸を阻害し、かつ/または同遺伝子もしくは核酸に結合する阻害性核酸分子であるか、同阻害性核酸分子を含む。一部の態様において、作用物質は、Cas9、例えば場合によっては酵素的に不活性なCas9と、PD-L1またはPD-1をコードする遺伝子を標的とするgRNAとを含むリボ核タンパク質（RNP）複合体を含む複合体であるか、同複合体を含む。対象における疾患および/または状態を処置するための養子細胞療法のために、遺伝子操作された（組換え）細胞表面受容体を発現する、ここに提供される細胞、例えば本方法によって生成される細胞を、対象に投与するための方法も提供される。

10

##### 【0006】

一部の態様では、遺伝子操作された抗原受容体、例えばキメラ抗原受容体（CAR）をコードする核酸分子と、PD-L1の発現を低減する作用物質もしくはPD-L1の発現の低減を引き起こすことができる作用物質である、または該作用物質を含む、または該作用物質をコードする核酸分子とを含有する細胞が提供される。一部の態様において、組換え受容体は遺伝子操作された抗原受容体、例えば機能的な非TCR抗原受容体、例えばキメラ抗原受容体（CAR）および他の組換え抗原受容体、例えばトランスジェニックT細胞受容体（TCR）である。受容体には、他の組換えキメラ受容体、例えばリガンドまたは受容体または他の結合パートナーに特異的に結合する細胞外部分と、細胞内シグナル伝達部分、例えばCARの細胞内シグナル伝達部分とを含有するものも含まれる。例えば対象における疾患および/または状態を処置するなどの目的で、養子細胞療法において、遺伝子操作された（組換え）細胞表面受容体を発現する細胞を対象に投与するための方法が提供される。

20

##### 【0007】

任意のそのような態様の一部において、操作されたT細胞は、抗原に特異的に結合する遺伝子操作された抗原受容体と、PD-L1の発現を低減する作用物質またはPD-L1の発現の低減を引き起こすことができる作用物質とを含有する。一部の態様において、作用物質は阻害性核酸分子、例えばPD-L1をコードする遺伝子または他の核酸および/またはPD-L1をコードする遺伝子または他の核酸（例えばCD274遺伝子）に相補的であり、同遺伝子または核酸を標的とし、同遺伝子または核酸を阻害し、かつ/または同遺伝子もしくは核酸に結合するものを含む。任意のそのような態様の一部において、前記阻害性核酸分子にはRNA干渉作用物質が含まれる。任意のそのような態様の一部において、阻害性核酸は、低分子干渉RNA（siRNA）、マイクロRNA適合（microRNA-adapted）shRNA、短鎖ヘアピンRNA（shRNA）、ヘアピンsiRNA、前駆体マイクロRNA（pre-miRNA）もしくはマイクロRNA（miRNA）であるか、またはそれを含有するか、またはそれをコードする。

30

##### 【0008】

任意のそのような態様の一部において、阻害性核酸分子は、PD-L1コード核酸に相補的

40

50

な配列を含有する。任意のそのような態様の一部において、阻害性核酸分子は、PD-L1コード核酸に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有する。

#### 【0009】

一部の態様において、前記作用物質は、遺伝子発現を低減または抑制するために、Cas9分子、例えば酵素的に不活性なCas9（例えばeCas9）と組み合わされた、PD-L1をコードする遺伝子の標的ドメインと相補的なgRNAを含む。一部の態様において、前記作用物質は、少なくとも1つの前記gRNAおよび/または前記Cas9分子をコードする核酸分子を含む。一部の態様において、前記作用物質は、前記Cas9分子と、PD-L1遺伝子の標的ドメインと相補的な標的化ドメインを有するgRNAとの、少なくとも1つの複合体を含む。

#### 【0010】

任意のそのような態様の一部において、遺伝子操作されたT細胞は、抗原に特異的に結合する遺伝子操作された抗原受容体と、破壊されたPD-L1コード遺伝子、PD-L1コード遺伝子を破壊するための作用物質、および/またはPD-L1コード遺伝子の破壊とを含有する。任意のそのような態様の一部において、前記遺伝子の破壊は、遺伝子編集ヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列核酸（clustered regularly interspaced short palindromic nucleic acid）（CRISPR）/Cas9、および/またはTALエフェクターヌクレアーゼ（TALEN）によって媒介される。任意のそのような態様の一部において、前記破壊は、前記遺伝子の少なくとも1つのエクソンの少なくとも一部分の欠失を含む。任意のそのような態様の一部において、前記破壊は、前記遺伝子における中途停止コドンの存在をもたらす前記遺伝子中の欠失、変異、および/または挿入を含み、かつ/または前記破壊は、前記遺伝子の第1または第2エクソン内での欠失、変異、および/または挿入を含む。任意のそのような態様の一部において、T細胞におけるPD-L1の発現は、前記阻害性核酸分子もしくは遺伝子破壊が存在しない前記T細胞またはその活性化を欠く前記T細胞における発現と比較して、少なくとも50、60、70、80、90、または95%低減される。

#### 【0011】

任意のそのような態様の一部において、遺伝子操作されたT細胞は、抗原に特異的に結合する遺伝子操作された抗原受容体と、前記細胞におけるPD-1またはPD-L1の発現を低減または妨害する分子をコードするポリヌクレオチドとを含有し、前記ポリヌクレオチドの発現または活性は条件的（conditional）である。任意のそのような態様の一部において、発現は、条件的なプロモーターまたはエンハンサーまたはトランスアクチベーターの制御下にある。任意のそのような態様の一部において、前記条件的なプロモーターまたはエンハンサーまたはトランスアクチベーターは、誘導性のプロモーター、エンハンサー、もしくはトランスアクチベーター、または抑制性のプロモーター、エンハンサー、もしくはトランスアクチベーターである。任意のそのような態様の一部において、PD-1またはPD-L1の発現を低減または妨害する分子は、当該遺伝子に特異的に結合する、当該遺伝子を特異的に認識する、もしくは当該遺伝子に特異的にハイブリダイズする、アンチセンス分子、siRNA、shRNA、miRNA、遺伝子編集ヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼタンパク質（ZFN）、TALエフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、もしくは、CRISPR-Cas9の組み合わせの1つもしくは複数の成分であるか、またはそれらを含むか、またはそれらをコードする。

#### 【0012】

任意のそのような態様の一部において、プロモーターは、RNA pol I、RNA pol IIまたはRNA pol IIIプロモーターの中から選択される。任意のそのような態様の一部において、プロモーターは、U6もしくはH1プロモーターであるpol IIIプロモーター、またはCMV、SV40初期領域もしくはアデノウイルス主要後期プロモーターであるpol IIプロモーターから選択される。任意のそのような態様の一部において、プロモーターは誘導性プロモーターである。任意のそのような態様の一部において、プロモーターは、Lacオペレーター配列、テトラサイクリンオペレーター配列、ガラクトースオペレーター配列もしくはドキシサイクリンオペレーター配列を含むか、またはその類似体である。

10

20

30

40

50

## 【0013】

任意のそのような態様の一部において、プロモーターは抑制性プロモーターである。任意のそのような態様の一部において、プロモーターは、Lac抑制性エレメントもしくはテトラサイクリン抑制性エレメントを含むか、またはその類似体である。

## 【0014】

任意のそのような態様の一部において、T細胞はCD4+T細胞またはCD8+T細胞である。任意のそのような態様の一部において、遺伝子操作された抗原受容体は機能的な非T細胞受容体である。

## 【0015】

任意のそのような態様の一部において、遺伝子操作された抗原受容体はキメラ抗原受容体（CAR）である。任意のそのような態様の一部において、CARは、抗原に特異的に結合する細胞外抗原認識ドメインと、ITAMを含む細胞内シグナル伝達ドメインとを含有する。任意のそのような態様の一部において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3-ゼータ（CD3）鎖の細胞内ドメインを含む。任意のそのような態様の一部において、CARは補助刺激シグナル伝達領域をさらに含有する。任意のそのような態様の一部において、補助刺激シグナル伝達領域は、CD28または4-1BBのシグナル伝達ドメインを含有する。任意のそのような態様の一部において、補助刺激ドメインはCD28である。

10

## 【0016】

任意のそのような態様の一部において、細胞はヒト細胞である。任意のそのような態様の一部において、細胞は単離された細胞である。

20

## 【0017】

一部の態様において、抗原受容体（CAR）をコードする、任意で第1の発現力セットである第1の核酸と、PD-1もしくはPD-L1をコードする遺伝子に対する阻害性核酸分子および/またはPD-1もしくはPD-L1をコードする遺伝子に相補的な核酸配列をコードする、任意で第2の発現力セットである第2の核酸とを含有する核酸分子も提供される。任意のそのような態様の一部において、阻害性核酸分子はRNA干渉作用物質を含有する。任意のそのような態様の一部において、阻害性核酸は、低分子干渉RNA（siRNA）、マイクロRNA適合shRNA、短鎖ヘアピンRNA（shRNA）、ヘアピンsiRNA、前駆体マイクロRNA（pre-miRNA）、pri-miRNA、もしくはマイクロRNA（miRNA）であるか、またはそれを含有するか、またはそれをコードする。任意のそのような態様の一部において、阻害性核酸は、PD-1コード核酸に相補的な配列を含有し、任意のそのような態様の一部において、それはPD-L1コード核酸に相補的な配列を含有する。任意のそのような態様の一部において、阻害性核酸分子はPD-1コード核酸に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを含み、任意のそのような態様の一部において、阻害性核酸分子はPD-L1コード核酸に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。一部の態様において、第2の核酸には、PD-1またはPD-L1をコードする遺伝子の標的ドメインと相補的な標的化ドメインを含むgRNA配列が含まれる。一部のそのような態様において、核酸分子は、場合によっては酵素的に不活性なCas9（eiCas9もしくはiCas9）またはeiCas9融合タンパク質を含む、Cas9分子をコードする第3の核酸を、さらに含むことができる。

30

## 【0018】

一部の態様では、前記1つまたは複数の核酸のそれぞれを、同じ転写産物からの複数遺伝子の翻訳を可能にするエレメントによって分離することができる。一部の態様において、核酸分子は、マルチシストロン性、例えばバイシストロン性である。一部の態様において、前記エレメントは配列内リボソーム進入部位（IRES）であるか、配列内リボソーム進入部位（IRES）を含むか、自己切断性2Aペプチド（例えばT2A、P2A、E2AまたはF2A）をコードする配列などのスキップ配列を含む。

40

## 【0019】

任意のそのような態様の一部において、核酸は、機能的な非T細胞受容体である抗原受容体をコードする。任意のそのような態様の一部において、遺伝子操作された抗原受容体はキメラ抗原受容体（CAR）である。任意のそのような態様の一部において、CARは、抗原

50

に特異的に結合する細胞外抗原認識ドメインと、ITAMを含有する細胞内シグナル伝達ドメインとを含有する。任意のそのような態様の一部において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3-ゼータ(CD3 $\zeta$ )鎖の細胞内ドメインを含有する。任意のそのような態様の一部において、CARは補助刺激シグナル伝達領域をさらに含む。任意のそのような態様の一部において、補助刺激シグナル伝達領域は、CD28または4-1BBのシグナル伝達ドメインを含む。任意のそのような態様の一部において、補助刺激ドメインはCD28である。

#### 【0020】

任意のそのような態様の一部において、第1および第2の核酸、任意で第1および第2の発現力セットは、同じまたは異なるプロモーターに、機能的に連結される。任意のそのような態様の一部において、第1の核酸、任意で第1の発現力セットは、誘導性プロモーターまたは抑制性プロモーターに機能的に連結され、第2の核酸、任意で第2の発現力セットは、構成的プロモーターに機能的に連結される。10

#### 【0021】

任意のそのような態様の一部において、核酸は単離されている。複数の態様において、一部の態様または任意の態様の核酸を含有するベクターも提供される。任意のそのような態様の一部において、ベクターは、プラスミド、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、またはアデノ隨伴ウイルスベクターである。任意のそのような態様の一部において、ベクターはインテグラーゼ欠損性である。

#### 【0022】

一部の態様において、前記核酸分子またはベクターを含有するT細胞も提供される。任意のそのような態様の一部において、T細胞はCD4+T細胞またはCD8+T細胞である。任意のそのような態様の一部において、T細胞はヒト細胞である。任意のそのような態様の一部において、T細胞は単離されている。20

#### 【0023】

一部の態様において、本明細書において記載する態様のいずれかの一部の細胞と、薬学的に許容される担体とを含有する、薬学的組成物も提供される。

#### 【0024】

一部の態様において、(a)抗原に特異的に結合する遺伝子操作された(組換え)抗原受容体を、T細胞を含む細胞の集団に、例えば前記抗原受容体をコードする核酸分子を前記細胞に導入することなどによって、導入する工程、ならびに(b)前記細胞の集団に、作用物質が導入されていない対応する細胞の集団中のT細胞における1つまたは複数の条件下でのインキュベーション時のPD-L1の発現および/またはアップレギュレーションと比較して前記集団中のT細胞におけるPD-L1の発現の低減をもたらすことができかつ/またはPD-L1のアップレギュレーションを阻害することができる前記作用物質を、前記1つまたは複数の条件下でのインキュベーション時に導入する工程を含み、工程(a)および(b)を同時にまたは任意の順序で逐次的に実行することによって、前記集団中のT細胞に前記遺伝子操作された抗原受容体および前記作用物質を導入する、遺伝子操作されたT細胞を生成するための方法も提供される。30

#### 【0025】

任意のそのような態様の一部において、遺伝子操作されたT細胞におけるPD-L1の発現を調節する方法は、T細胞に、作用物質が導入されていない対応するT細胞における1つまたは複数の条件下でのインキュベーション時のPD-L1の発現またはアップレギュレーションと比較して前記細胞におけるPD-L1の発現の低減をもたらすことができかつ/またはPD-L1のアップレギュレーションを阻害することができる前記作用物質を、前記1つまたは複数の条件下でのインキュベーション時に導入する工程を含み、該T細胞は抗原に特異的に結合する遺伝子操作された抗原受容体を含有する。任意のそのような態様の一部において、抗原の存在を含む条件下でのインキュベーションは、前記作用物質が導入されていないT細胞を含有する対応する集団において、PD-L1の発現またはアップレギュレーションを誘導する。40

#### 【0026】

50

任意のそのような態様の一部において、抗原の存在下でのインキュベーションは、細胞を抗原と共にインビトロでインキュベートすることを含む。任意のそのような態様の一部において、抗原の存在下でのインキュベーションは、それぞれ両端の値を含めて2時間～4時間、6時間～30時間、または12時間～24時間であるか、あるいは48時間未満、36時間未満、または24時間未満である。

#### 【0027】

任意のそのような態様の一部において、インキュベーションは、前記操作された抗原受容体がインキュベーションの少なくとも一部にわたって前記抗原に特異的に結合する条件下での、対象への前記細胞の投与を含む。任意のそのような態様の一部において、前記インキュベーションは、対象への細胞の投与後24時間、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日の期間内に、発現またはアップレギュレーションを誘導する。任意のそのような態様の一部において、PD-L1の発現の低減またはアップレギュレーションの阻害は、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%もしくはそれ以上、または少なくとも約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%もしくはそれ以上である。

10

#### 【0028】

任意のそのような態様の一部において、前記方法はエクスピボで行われる。任意のそのような態様の一部において、前記作用物質の導入は、前記作用物質をコードする配列を含有する核酸を導入することによって実行される。一部の態様において、作用物質の導入は、Cas9分子、例えば酵素的に不活性なCas9（例えばeICas9）またはその融合タンパク質と、PD-L1をコードする遺伝子の標的ドメインと相補的な標的化ドメインを有するgRNAとの少なくとも1つの複合体を導入する工程を含む。任意のそのような態様の一部において、前記導入には、細胞におけるPD-L1の発現の一時的な低減または妨害を引き起こすために前記T細胞において前記作用物質の一過性発現を誘導する工程が含まれ、かつ/または前記低減または妨害は永続的でない。

20

#### 【0029】

任意のそのような態様の一部において、作用物質の発現または活性は条件的である。任意のそのような態様の一部において、発現は、条件的なプロモーターまたはエンハンサーまたはトランスアクチベーターの制御下にある。任意のそのような態様の一部において、条件的なプロモーターまたはエンハンサーまたはトランスアクチベーターは、誘導性のプロモーター、エンハンサーもしくはトランスアクチベーター、または抑制性のプロモーター、エンハンサーもしくはトランスアクチベーターである。任意のそのような態様の一部において、プロモーターは、RNA pol I、RNA pol IIまたはRNA pol IIIプロモーターから選択される。任意のそのような態様の一部において、プロモーターは、U6もしくはH1プロモーターであるpol IIIプロモーター、またはCMV、SV40初期領域もしくはアデノウイルス主要後期プロモーターであるpol IIプロモーターから選択される。

30

#### 【0030】

任意のそのような態様の一部において、プロモーターは誘導性プロモーターである。任意のそのような態様の一部において、プロモーターは、Lacオペレーター配列、テトラサイクリンオペレーター配列、ガラクトースオペレーター配列またはドキシサイクリンオペレーター配列を含む。任意のそのような態様の一部において、プロモーターは抑制性プロモーターである。任意のそのような態様の一部において、プロモーターは、Lac抑制性エレメントまたはテトラサイクリン抑制性エレメントを含む。

40

#### 【0031】

任意のそのような態様の一部において、前記作用物質は、細胞におけるPD-L1の発現の継続的な低減または妨害を引き起こすためにT細胞中で安定に発現される。任意のそのような態様の一部において、作用物質は、ウイルスベクターに含まれている核酸分子である。任意のそのような態様の一部において、ウイルスベクターはアデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクターまたはアデノ隨伴ウイルスベクターである。任意のそのような態様の一部において、作用物質は、

50

細胞におけるPD-L1の発現を低減する阻害性核酸分子である。

【0032】

任意のそのような態様の一部において、阻害性核酸分子はRNA干渉作用物質を含む。任意のそのような態様の一部において、阻害性核酸は、低分子干渉RNA ( siRNA ) 、マイクロRNA適合shRNA、短鎖ヘアピンRNA ( shRNA ) 、ヘアピンsiRNA、前駆体マイクロRNA ( pre-miRNA ) 、pri-miRNA、もしくはマイクロRNA ( miRNA ) であるか、またはそれを含むか、またはそれをコードする。任意のそのような態様の一部において、阻害性核酸分子は、PD-L1コード核酸に相補的な配列を含有する。任意のそのような態様の一部において、阻害性核酸分子は、PD-L1コード核酸に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有する。一部の態様において、核酸は、PD-L1をコードする遺伝子の標的ドメインと相補的な標的化ドメインを含むgRNA配列を含む。一部のそのような態様において、核酸分子は、Cas9分子をコードする第3の核酸をさらに含むことができ、前記Cas9分子は、場合によっては、酵素的に不活性なCas9 ( eiCas9もしくはiCas9 ) またはeiCas9融合タンパク質を含む。

10

【0033】

任意のそのような態様の一部において、ここに提供される方法において低減を引き起こすことおよび/またはアップレギュレーションを阻害することは、PD-L1をコードする遺伝子を破壊することを含む。任意のそのような態様の一部において、破壊は、遺伝子をDNAレベルで破壊することを含み、かつ/または破壊は可逆的ではなく、かつ/または破壊は一過性でない。

20

【0034】

任意のそのような態様の一部において、破壊は、遺伝子に特異的に結合するまたはハイブリダイズするDNA結合タンパク質またはDNA結合核酸である作用物質を導入することを含む。任意のそのような態様の一部において、破壊は、( i ) DNA標的化タンパク質とヌクレアーゼとを含有する融合タンパク質、または( ii ) RNAガイド型ヌクレアーゼ ( RNA-guide d nuclease ) を導入することを含む。任意のそのような態様の一部において、DNA標的化タンパク質またはRNAガイド型ヌクレアーゼは、ジンクフィンガータンパク質 ( ZFP ) 、TALタンパク質、または前記遺伝子に特異的な、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列核酸 ( CRISPR ) によってガイドされる、Casタンパク質 ( 例えはCas9 ) ( CRISPR/Cas ) を含有する。任意のそのような態様の一部において、破壊は、前記遺伝子に特異的に結合する、前記遺伝子を特異的に認識する、または前記遺伝子に特異的にハイブリダイズする、ジンクフィンガーヌクレアーゼ ( ZFN ) 、TALエフェクターヌクレアーゼ ( TALEN ) 、または、CRISPR-Cas9の組み合わせを導入することを含む。任意のそのような態様の一部において、導入は、DNA結合タンパク質、DNA結合核酸、および/またはDNA結合タンパク質もしくはDNA結合核酸を含む複合体をコードする配列を含有する核酸を導入することによって実行される。

30

【0035】

任意のそのような態様の一部において、前記核酸はウイルスベクター中にある。任意のそのような態様の一部において、遺伝子への特異的結合は、該遺伝子のエクソンの内部、および/または、該遺伝子の、標的抗原のN末端をコードしている部分の内部である。任意のそのような態様の一部において、導入によって、遺伝子におけるフレームシフト変異および/または遺伝子のコード領域内の早期停止コドンの挿入が引き起こされる。

40

【0036】

任意のそのような態様の一部において、前記方法は、細胞に、作用物質が導入されていない対応する細胞における1つまたは複数の条件下でのインキュベーション時のPD-1の発現またはアップレギュレーションと比較して前記細胞におけるPD-1の発現の低減をもたらすことができかつ/またはPD-1のアップレギュレーションを阻害することができる前記作用物質を、前記1つまたは複数の条件下でのインキュベーション時に導入する工程を、さらに含み、ここで、前記発現の低減および/またはアップレギュレーションの阻害は一時的または一過性である。任意のそのような態様の一部において、前記作用物質は、前記細胞におけるPD-1の発現の条件的な低減または妨害を引き起こすために前記細胞において誘

50

導性に発現または抑制される。

【0037】

一部の態様において、(a)抗原に特異的に結合する遺伝子操作された抗原受容体を、T細胞を含有する細胞の集団に、例えば抗原受容体をコードする核酸分子を前記細胞に導入することなどによって導入する工程、および(b)前記細胞の集団に、作用物質が導入されていない対応する細胞の集団中のT細胞における1つまたは複数の条件下でのインキュベーション時のPD-1の発現および/またはアップレギュレーションと比較して前記集団中のT細胞におけるPD-1の発現を一過性に低減することができかつ/またはPD-1のアップレギュレーションを一過性に阻害することができる前記作用物質を、前記1つまたは複数の条件下でのインキュベーション時に導入する工程を含み、工程(a)および(b)を同時にまたは任意の順序で逐次的に実行することによって、前記集団中のT細胞に前記遺伝子操作された抗原受容体および前記作用物質を導入する、遺伝子操作されたT細胞を生成する方法も提供される。

【0038】

任意のそのような態様の一部において、遺伝子操作されたT細胞におけるPD-1の発現を調節する方法は、T細胞に、作用物質が導入されていない対応するT細胞における1つまたは複数の条件下でのインキュベーション時のPD-1の発現またはアップレギュレーションと比較して前記細胞におけるPD-1の発現を一過性に低減することができかつ/またはPD-1のアップレギュレーションを一過性に阻害することができる前記作用物質を、前記1つまたは複数の条件下でのインキュベーション時に導入する工程を含み、該T細胞は抗原に特異的に結合する抗原受容体を含有する。

【0039】

任意のそのような態様の一部において、一過性の低減は、細胞におけるPD-1の発現の可逆的な低減を含む。任意のそのような態様の一部において、抗原の存在を含む条件下でのインキュベーションは、前記作用物質が導入されていないT細胞を含有する対応する集団において、PD-1の発現またはアップレギュレーションを誘導する。任意のそのような態様の一部において、抗原の存在下でのインキュベーションは、細胞を前記抗原と共に、インビトロでインキュベートすることを含む。任意のそのような態様の一部において、抗原の存在下でのインキュベーションは、それぞれ両端の値を含めて2時間～48時間、6時間～30時間、または12時間～24時間であるか、あるいは48時間未満、36時間未満、または24時間未満である。任意のそのような態様の一部において、インキュベーションは、前記操作された抗原受容体がインキュベーションの少なくとも一部にわたって前記抗原に特異的に結合する条件下での、対象への前記細胞の投与を含む。任意のそのような態様の一部において、インキュベーションは、対象への細胞の投与後24時間、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日の期間内に、発現またはアップレギュレーションを誘導する。任意のそのような態様の一部において、PD-1の発現の低減またはアップレギュレーションの阻害は、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%もしくはそれ以上、または少なくとも約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%もしくはそれ以上である。任意のそのような態様の一部において、前記方法はエクスピボで行われる。

【0040】

任意のそのような態様の一部において、作用物質の導入は、作用物質をコードする配列を含有する核酸、例えばPD-1に対する阻害性核酸分子および/またはPD-1をコードする遺伝子に相補的なもしくはPD-1をコードする遺伝子に結合する核酸配列を、細胞に導入することによって実行される。一部の態様において、作用物質は、遺伝子発現を低減または抑制するための、Cas9分子、例えば酵素的に不活性なCas9(例えばeICas9)またはeICas9融合タンパク質と組み合わされた、PD-1をコードする遺伝子の標的ドメインと相補的な標的化ドメインを有するgRNAを含む。一部の態様において、作用物質は、前記少なくとも1つのgRNAおよび/または前記Cas9分子をコードする核酸分子を含む。一部の態様において、作用物質は、Cas9分子とPD-1遺伝子の標的ドメインに相補的な標的化ドメインを有するgR

10

20

30

40

50

NAとの、少なくとも1つの複合体を含む。

#### 【0041】

任意のそのような態様の一部において、作用物質は、T細胞におけるPD-1の発現の一時的な低減または妨害を引き起こすために細胞において一過性に発現される。任意のそのような態様の一部において、作用物質の発現または活性は条件的である。任意のそのような態様の一部において、発現は、条件的なプロモーターまたはエンハンサーまたはトランスアクチベーターの制御下にある。任意のそのような態様の一部において、条件的なプロモーターまたはエンハンサーまたはトランスアクチベーターは、誘導性のプロモーター、エンハンサーもしくはトランスアクチベーター、または抑制性のプロモーター、エンハンサーもしくはトランスアクチベーターである。

10

#### 【0042】

任意のそのような態様の一部において、プロモーターは、RNA pol I、RNA pol IIまたはRNA pol IIIプロモーターから選択される。任意のそのような態様の一部において、プロモーターは、U6もしくはH1プロモーターであるpol IIIプロモーターまたはCMV、SV40初期領域もしくはアデノウイルス主要後期プロモーターであるpol IIプロモーターから選択される。任意のそのような態様の一部において、プロモーターは誘導性プロモーターである。任意のそのような態様の一部において、プロモーターは、Lacオペレーター配列、テトラサイクリンオペレーター配列、ガラクトースオペレーター配列またはドキシサイクリンオペレーター配列を含む。任意のそのような態様の一部において、プロモーターは抑制性プロモーターである。任意のそのような態様の一部において、プロモーターは、Lac抑制性エレメントまたはテトラサイクリン抑制性エレメントを含む。

20

#### 【0043】

任意のそのような態様の一部において、作用物質は、細胞におけるPD-1の発現を低減する阻害性核酸分子である。任意のそのような態様の一部において、阻害性核酸分子はRNA干渉作用物質を含む。任意のそのような態様の一部において、阻害性核酸は、低分子干渉RNA ( siRNA ) 、マイクロRNA適合shRNA、短鎖ヘアピンRNA ( shRNA ) 、ヘアピンsiRNA、前駆体マイクロRNA ( pre-miRNA ) もしくはマイクロRNA ( miRNA ) であるか、またはそれを含むか、またはそれをコードする。任意のそのような態様の一部において、前記阻害性核酸分子は、PD-L1コード核酸に相補的な配列を含む。任意のそのような態様の一部において、阻害性核酸分子は、PD-L1コード核酸に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有する。

30

#### 【0044】

ここに提供される方法の任意のそのような態様の一部において、T細胞はCD4+T細胞またはCD8+T細胞である。任意のそのような態様の一部において、遺伝子操作された抗原受容体は機能的な非T細胞受容体である。任意のそのような態様の一部において、遺伝子操作された抗原受容体はキメラ抗原受容体 ( CAR ) である。任意のそのような態様の一部において、CARは、抗原に特異的に結合する細胞外抗原認識ドメインと、ITAMを含む細胞内シグナル伝達ドメインとを含む。任意のそのような態様の一部において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3-ゼータ ( CD3 ) 鎖の細胞内ドメインを含む。任意のそのような態様の一部において、CARは補助刺激シグナル伝達領域をさらに含有する。任意のそのような態様の一部において、補助刺激シグナル伝達領域は、CD28または4-1BBのシグナル伝達ドメインを含む。任意のそのような態様の一部において、補助刺激ドメインはCD28である。

40

#### 【0045】

任意のそのような態様の一部において、遺伝子操作された ( 組換え ) 抗原受容体および前記作用物質を導入する工程は同時に行われ、該工程は、抗原受容体をコードする、任意で第1の発現力セットである第1の核酸と、PD-1またはPD-L1の発現の低減を引き起こすための作用物質をコードする、任意で第2の発現力セットである第2の核酸とを含有する核酸分子を導入する工程を含む。

#### 【0046】

50

任意のそのような態様の一部において、ここに提供される方法はいずれも、前記細胞の集団に、同じまたは異なる抗原に特異的に結合する第2の遺伝子操作された抗原受容体を導入する工程をさらに含み、該第2の抗原受容体はCD28以外の補助刺激分子を含有する。

【0047】

一部の態様において、(a) 第1の抗原に特異的に結合する第1の遺伝子操作された抗原受容体を、T細胞を含有する細胞の集団に導入する工程であって、該第1の抗原受容体はCD28補助刺激分子を含み、前記第1の遺伝子操作された抗原受容体の導入は、前記第1の抗原受容体をコードする核酸分子を前記細胞に導入することによって行われる工程、(b) 前記T細胞を含有する細胞の集団に、同じまたは異なる抗原に特異的に結合する第2の遺伝子操作された抗原受容体を、例えば前記第2の抗原受容体をコードする核酸分子を導入することなどによって導入する工程、および(c) 前記T細胞を含む細胞の集団に、作用物質が導入されていない対応する細胞の集団中のT細胞における1つまたは複数の条件下でのインキュベーション時のPD-1および/またはPD-L1の発現またはアップレギュレーションと比較して前記集団中のT細胞においてPD-1もしくはPD-L1の発現の低減をもたらすことができかつ/またはPD-1もしくはPD-L1のアップレギュレーションを阻害することができる前記作用物質を、前記1つまたは複数の条件下でのインキュベーション時に導入する工程であって、それによって、前記第1の抗原受容体、前記第2の抗原受容体および前記作用物質を、前記集団中のT細胞に導入する、工程

を含む、遺伝子操作されたT細胞を生成する方法も提供される。

【0048】

任意のそのような態様の一部において、抗原の存在を含む条件下でのインキュベーションは、前記作用物質が導入されていないT細胞を含有する対応する集団において、PD-1および/またはPD-L1の発現またはアップレギュレーションを誘導する。

【0049】

任意のそのような態様の一部において、抗原の存在下でのインキュベーションは、前記細胞を前記抗原と共にインビトロでインキュベートすることを含む。任意のそのような態様の一部において、抗原の存在下でのインキュベーションは、それぞれ両端の値を含めて2時間～48時間、6時間～30時間、または12時間～24時間であるか、あるいは48時間未満、36時間未満、または24時間未満である。任意のそのような態様の一部において、インキュベーションは、前記操作された抗原受容体がインキュベーションの少なくとも一部にわたって前記抗原に特異的に結合する条件下での、対象への前記細胞の投与を含む。任意のそのような態様の一部において、インキュベーションは、対象への細胞の投与後24時間、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日の期間内に、発現またはアップレギュレーションを誘導する。任意のそのような態様の一部において、細胞におけるPD-1および/またはPD-L1の発現またはアップレギュレーションは、前記作用物質の導入を行わずに前記方法によって生成された操作された細胞と比較して、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%もしくはそれ以上、または少なくとも約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%もしくはそれ以上、阻害または低減される。

【0050】

任意のそのような態様の一部において、第1および第2の遺伝子操作された抗原受容体は、同じ抗原に結合する。任意のそのような態様の一部において、第2の抗原受容体は、CD28以外の補助刺激分子を含む。任意のそのような態様の一部において、前記CD28以外の補助刺激分子は4-1BBである。任意のそのような態様の一部において、前記作用物質は、PD-L1の発現の低減および/またはアップレギュレーションの阻害を引き起こす。

【0051】

任意のそのような態様の一部において、第1の抗原受容体、第2の抗原受容体および/または作用物質を導入する工程は同時に行われ、該工程は、第1の抗原受容体をコードする、任意で第1の発現カセットである第1の核酸と、第2の抗原受容体をコードする、任意で第2の発現カセットである第2の核酸と、PD-1またはPD-L1の発現の低減を引き起こすため

10

20

30

40

50

の作用物質をコードする、任意で第3の発現力セットである第3の核酸とを含有する核酸分子を導入する工程を含む。任意のそのような態様の一部において、第1、第2および/または第3の核酸、任意で第1、第2および/または第3発現力セットは、同じまたは異なるプロモーターに機能的に連結される。任意のそのような態様の一部において、第1および/または第2の核酸、任意で第1および/または第2の発現力セットは、誘導性プロモーターまたは抑制性プロモーターに機能的に連結され、第3の核酸、任意で第3の発現力セットは、構成的プロモーターに機能的に連結される。

【 0 0 5 2 】

任意のそのような態様の一部において、前記方法は、ヒト細胞に、そのような分子または作用物質を導入する工程を伴う。

10

【 0 0 5 3 】

一部の態様において、(a) T細胞を含有する初代細胞の集団を得る工程、(b) 前記集団中の、標的抗原を発現しない細胞を濃縮する工程、および(c) 前記細胞の集団に、前記標的抗原に特異的に結合する遺伝子操作された抗原受容体を導入する工程であって、それによって、遺伝子操作されたT細胞を生成する、工程を含む、遺伝子操作されたT細胞を生成する方法が提供される。

【 0 0 5 4 】

任意のそのような態様の一部において、前記方法は、前記細胞の増殖を引き起こすために前記細胞を刺激条件下で培養および/またはインキュベートする工程をさらに含み、細胞の増殖および/または拡大は、前記標的抗原を発現しない細胞を濃縮する工程を欠く前記方法において生成された細胞においてよりも大きい。任意のそのような態様の一部において、細胞の増殖および/または拡大は、少なくとも1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍もしくはそれ以上、または少なくとも約1.5倍、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍もしくはそれ以上である。任意のそのような態様の一部において、標的抗原を発現しない細胞の濃縮は、前記標的抗原を発現する細胞を枯渇させるための負の選択、または前記集団中の細胞における前記標的抗原をコードする遺伝子の破壊を含む。

20

【 0 0 5 5 】

任意のそのような態様の一部において、前記刺激条件は、TCR複合体の1つまたは複数の成分の1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインを活性化することができる作用物質を含む。

30

【 0 0 5 6 】

一部の態様において、本明細書に記載する方法のいずれかによって生成される細胞が提供される。一部の態様において、前記細胞と薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物が提供される。

【 0 0 5 7 】

一部の態様において、ある疾患または状態を有する対象に前記細胞または前記薬学的組成物を投与する工程を含む、処置方法が提供される。任意のそのような態様の一部において、細胞は、(a) キメラ抗原受容体(CAR)を発現する細胞の第1の用量を前記対象に投与する工程と、(b) CAR発現細胞の連続用量を前記対象に投与する工程であって、該連続用量は、(a)において前記対象に投与された前記CAR発現細胞の表面においてPD-L1の発現が誘導またはアップレギュレートされた時点で前記対象に投与され、かつ/または該連続用量は、(a)における投与の開始から少なくとも5日後に前記対象に投与される、工程と、を含む投与計画で投与される。

40

【 0 0 5 8 】

一部の態様において、(a) キメラ抗原受容体(CAR)を発現する細胞の第1の用量を前記対象に投与する工程、および(b) CAR発現細胞の連続用量を前記対象に投与する工程を含み、該連続用量は、(a)において前記対象に投与された前記CAR発現細胞の表面においてPD-L1の発現が誘導またはアップレギュレートされた時点で前記対象に投与され、かつ/または該連続用量は、(a)における投与の開始から少なくとも5日後に前記対象に投与さ

50

れる方法が提供される。

【0059】

任意のそのような態様の一部において、前記方法は、(a)における該投与の開始から少なくとも約5日後または約5日よりも後かつ約12日後よりも前に投与される、細胞の連続用用量を含む。任意のそのような態様の一部において、前記第1および/または第2の用量で投与される細胞の数は、それぞれ両端の値を含めて約 $0.5 \times 10^6$ 個の細胞/kg対象体重～ $4 \times 10^6$ 個の細胞/kg、約 $0.75 \times 10^6$ 個の細胞/kg～ $3.0 \times 10^6$ 個の細胞/kg、または約 $1 \times 10^6$ 個の細胞/kg～ $2 \times 10^6$ 個の細胞/kgである。

【0060】

任意のそのような態様の一部において、遺伝子操作された抗原受容体は、前記疾患または状態と関連する抗原に特異的に結合する。任意のそのような態様の一部において、疾患または状態は、がんである。任意のそのような態様の一部において、疾患または状態は、白血病またはリンパ腫である。任意のそのような態様の一部において、疾患または状態は、急性リンパ芽球性白血病である。任意のそのような態様の一部において、疾患または状態は、非ホジキンリンパ腫(NHL)である。

【図面の簡単な説明】

【0061】

【図1A-1】実施例1に記載のように様々な条件(培地、K562-tCD19、K562-tROR1、aCD3/aCD28)下で24時間インキュベートした後の、フローサイトメトリーによって検出した時の、CD4および抗CD19キメラ抗原受容体(CAR)の陽性表面発現についてゲーティングしたT細胞集団上でのPD-1、PD-L1、およびPD-L2の表面発現を図示する(ゲーティング戦略を上パネルに示した)。

【図1A-2】図1A-1の説明を参照のこと。

【図1A-3】図1A-1の説明を参照のこと。

【図1A-4】図1A-1の説明を参照のこと。

【図1B-1】実施例1に記載のように様々な条件(培地、K562-tCD19、K562-tROR1、aCD3/aCD28)下で24時間インキュベートした後の、フローサイトメトリーによって検出した時の、CD4の陽性表面発現および抗CD19キメラ抗原受容体(CAR)の陰性表面発現についてゲーティングしたT細胞集団上でのPD-1、PD-L1、およびPD-L2の表面発現を図示する(ゲーティング戦略を上パネルに示した)。

【図1B-2】図1B-1の説明を参照のこと。

【図1B-3】図1B-1の説明を参照のこと。

【図1B-4】図1B-1の説明を参照のこと。

【図2A-1】実施例1に記載のように様々な条件(培地、K562-tCD19、K562-tROR1、aCD3/aCD28)下で24時間インキュベートした後の、フローサイトメトリーによって検出した時の、CD8および抗CD19キメラ抗原受容体(CAR)の陽性表面発現についてゲーティングしたT細胞集団上でのPD-1、PD-L1、およびPD-L2の表面発現を図示する(ゲーティング戦略を上パネルに示した)。

【図2A-2】図2A-1の説明を参照のこと。

【図2A-3】図2A-1の説明を参照のこと。

【図2A-4】図2A-1の説明を参照のこと。

【図2B-1】実施例1に記載のように様々な条件(培地、K562-tCD19、K562-tROR1、aCD3/aCD28)下で24時間インキュベートした後の、フローサイトメトリーによって検出した時の、CD8の陽性表面発現および抗CD19キメラ抗原受容体(CAR)の陰性表面発現についてゲーティングしたT細胞集団上でのPD-1、PD-L1、およびPD-L2の表面発現を図示する(ゲーティング戦略を上パネルに示した)。

【図2B-2】図2B-1の説明を参照のこと。

【図2B-3】図2B-1の説明を参照のこと。

【図2B-4】図2B-1の説明を参照のこと。

【発明を実施するための形態】

10

20

30

40

50

## 【0062】

詳細な説明

特に定義のない限り、本明細書において用いられる専門用語、注釈、ならびに他の技術用語および科学用語または専門語は全て、クレームされた対象が属する当業者に一般的に理解するものと同じ意味を有することが意図される。場合によっては、理解しやすいように、および/または容易に参照できるように、一般的に理解されている意味を有する用語が本明細書において定義される。本明細書における、このような定義の記載が、必ず、当技術分野において一般的に理解されているものと、かなり大きく異なると解釈することはしてはならない。

## 【0063】

10

本願において言及された、特許文書、科学文献、およびデータベースを含む刊行物は全て、それぞれ個々の刊行物が個々に参照により組み入れられるのと同じ程度に、全ての目的のためにその全体が参照により組み入れられる。本明細書において示された定義が、参照により本明細書に組み入れられる特許、出願、公開された出願、および他の刊行物に示された定義と相違するか、または他の点で一致しない場合、参照により本明細書に組み入れられる定義ではなく、本明細書において示された定義が優先される。

## 【0064】

本明細書において用いられるセクションの見出しあは、系統立ててまとめることだけを目的とし、説明された対象を限定すると解釈してはならない。

## 【0065】

20

I. 養子細胞療法における免疫抑制および阻害相互作用を低減するための組成物および方法

養子細胞療法、例えば養子免疫療法において使用するための、方法、細胞（例えばCARなどの遺伝子操作された受容体を発現するT細胞）、組成物、および核酸が提供される。一部の局面において、ここに提供される態様は、例えば免疫阻害性シグナルを発する固形腫瘍または腫瘍微小環境との関連において、養子細胞療法の効力または寿命を強化する。本方法は、一般に、本来であればがん療法との関連において一定の望ましいエフェクター機能を損ないかねない一定のT細胞阻害経路またはT細胞阻害シグナルの効果を妨害することを伴う。したがって養子細胞療法におけるT細胞機能を強化する組成物および方法が提供され、例えば、移入された細胞の持続性または移入された細胞への曝露をある期間にわたって維持しつつ、投与された遺伝子操作された（例えばCAR+）細胞の活性および力値を増加させることなどによって、改良された効力を与えるものが提供される。一部の態様において、CAR発現T細胞などの遺伝子操作された細胞は、対象にインビポ投与した場合に、利用可能な一定の方法と比較して、拡大および/または持続性の増加を呈する。

## 【0066】

30

ここに提供される方法、細胞および組成物は、抗原受容体で操作された細胞中で起きる阻害相互作用、例えばキメラ抗原受容体（CAR）を含有する細胞中で起きる阻害相互作用を、調節および/または調整、例えば阻害相互作用を低減または阻害する。一部の態様において、ここに提供される態様は、CAR発現細胞などの遺伝子操作されたT細胞におけるプログラム死（programmed death）-1（PD-1）とそのリガンドPD-L1との間の阻害相互作用（これは、これらの分子がT細胞上で共発現することによって起こりうる）を調節、例えば低減または阻害する。したがって、一部の態様において、ここに提供される態様は、他の方法および他の製品と比較して、阻害性分子が細胞に作用することによってCAR発現細胞などの遺伝子操作されたT細胞において起こりうる機能の喪失を低減または排除することにより、有利である。

## 【0067】

40

一部の態様において、本組成物および本方法は、免疫チェックポイント分子PD-1が発するシグナルの妨害、例えば養子移入された（例えばCAR+）T細胞における1つまたは複数のPD-1リガンドの発現を妨害することによる妨害を伴う。腫瘍細胞および/または腫瘍微小環境中の細胞は、しばしば、PD-1のリガンド（例えばPD-L1およびPD-L2）をアップレギ

50

ュレートし、それが次に、PD-1を発現する腫瘍特異的T細胞上のPD-1のライゲーションをもたらし、それが阻害性シグナルを発する。PD-1は、腫瘍微小環境中のT細胞上、例えば腫瘍浸潤T細胞上でも、しばしばアップレギュレートされ、それは、抗原受容体を介したシグナルまたは他の一定の活性化シグナルに続いて起こりうる。

#### 【0068】

腫瘍微小環境における、PD-1を発現するように誘導されたT細胞とPD-L1またはPD-L2発現細胞との相互作用は、抗腫瘍免疫および/または養子移入されたT細胞の機能もしくは効力を損ないうる。例えばT細胞上のPD-1分子によるシグナル伝達は、消耗またはアネルギーを促進し、かつ/または増殖またはエフェクター機能を阻害しうる。一定の方法では、がん療法との関連を含めて、T細胞におけるPD-1シグナル伝達を遮断すること、またはPD-1発現を妨害することが目指された。そのような遮断または妨害は、遮断抗体、小分子、もしくは阻害性ペプチドの投与によるか、またはT細胞における、例えば養子移入されたT細胞における、PD-1のノックアウトもしくはPD-1の発現の低減によることができる。しかし、移入されるT細胞におけるPD-1の妨害は、十分に満足できるものではないだろう。

#### 【0069】

ここに提供される細胞、組成物、および使用には、がん療法を促進するためにPD-1シグナルを標的とする他のアプローチと比較して、一定の利点を持つものが含まれる。例えば、一定のPD-1標的化アプローチに起因または付随しうる一定の負の影響を持ち込むことなく、腫瘍標的化T細胞における阻害性PD-1シグナルの有害な効果を阻害する、細胞、方法および組成物が提供される。

#### 【0070】

PD-1発現およびPD-1シグナル伝達はT細胞の一定のエフェクター機能および拡大を低減しうるが、これは、ある期間にわたるT細胞の寿命、分化およびメモリーT細胞の持続性（例えば長寿命および/またはセントラルメモリーT細胞）にも関連する。例えばPD-1シグナルは、長寿命細胞の生体エネルギー特性を誘導することが示されている。抗腫瘍T細胞におけるPD-1の妨害（例えばノックダウンまたはノックアウト）は、細胞拡大、サイトカインの分泌、および他のエフェクター機能を促進することにより、特にPD-1のリガンドが存在するかアップレギュレートされている腫瘍微小環境との関連において、目先の効力を改善することができる。しかしこれらの強化にもかかわらず、養子移入された細胞におけるPD-1の妨害は、時間が経過するとメモリー表現型またはセントラルメモリー表現型を持つこれらの細胞の数またはパーセンテージを低減しうる。T細胞におけるPD-1の妨害は、セントラルメモリーコンパートメント（例えば長寿命メモリーCD8+T細胞および/またはCD8+セントラルメモリーT細胞）などの、PD-1欠損T細胞集団の長寿命メモリーT細胞コンパートメントおよび/またはセントラルメモリーコンパートメントの低減につながる場合があり、かつ/またはこれらの細胞の長期間生存能を低減する。

#### 【0071】

このように、遺伝子操作されたT細胞におけるPD-1の（例えばノックダウンまたはノックアウトによる）妨害は、それらのエフェクター機能を促進することができる一方で、長期間曝露および抗腫瘍効力にとって重要でありうる、操作された細胞の、メモリーコンパートメントにおいて長期間持続する能力および/またはメモリー細胞サブセットに分化する能力が損なわれることにより、長期的には最適でないことがありうる。したがって、養子移入されたT細胞におけるPD-1機能の遮断は、腫瘍微小環境の阻害性シグナルに逆らって効力を促進するための機序として、いくつかの側面で魅力的であるが、長期的に見れば最適な選択ではないこともありうる。長期的には効力を損ないうる一定の負の帰結を伴わずに、腫瘍標的化T細胞に対するこの経路の負の効果を低減するための方法および組成物が提供される。

#### 【0072】

一部の局面において、ここに提供される組成物および方法は、一つには、PD-L1-これは、T細胞チェックポイント分子PD-1のリガンドであり、通常は非T細胞上に発現して、PD-L1を介してT細胞に負のシグナルを発する-が、CARが特異性を示す抗原を発現する細胞の存

10

20

30

40

50

在下で培養したCAR発現T細胞の表面では、迅速（例えば24時間以内）にアップレギュレートされうるという知見に基づいている。本明細書に提示する研究では、そのようなシグナルに応答して、PD-L1とPD-1の両方が迅速にアップレギュレートされたのに対し、どちらの分子も、古典的なT細胞受容体複合体および関連補助刺激シグナル（抗CD3/抗CD28刺激）を介してシグナルを模倣する条件に応答してこの時間枠内で対照試料に観察されるレベルを超えて実質的にアップレギュレートされることはなかった。したがって、一部の態様において、ここに提供される態様は、CAR発現T細胞を、当該CARに特異的な抗原の存在下でインキュベートすると、当該細胞におけるPD-1発現およびPD-L1発現を迅速にアップレギュレートすることができるという、ここでの知見に基づいている。予備的な結果は、一部の局面において、このアップレギュレーションが、抗原とのインピトロでのインキュベーションに続いて、急速に、24時間以内に起こることを示している。対照的に、古典的なT細胞抗原受容体複合体および関連補助刺激受容体（例えば抗CD3/抗CD28抗体）を介してシグナルを模倣するように設計された条件では、刺激後に、同じ期間では、PD-1またはPD-L1のアップレギュレーションはどちらも起こらなかった。

#### 【0073】

したがってそのような細胞は、標的抗原を発現する腫瘍と出会った時に、PD-1だけでなくPD-L1もアップレギュレートしうる。そしてそれは、腫瘍環境内で、他の移入された細胞または他のT細胞の移入されたT細胞による、負の自己調節または調節につながる。PD-1および/またはPD-L1は、一定の背景では、例えばより長い時間枠内では、TCR複合体による古典的なシグナルに応答してアップレギュレートされうる。

#### 【0074】

言い換えると、ここでの知見は、操作された人工的受容体を介した、その抗原による刺激は、共発現された阻害性分子ペア、例えばPD-1とPD-L1のアップレギュレーション、および/または2つの異なるT細胞のそれぞれに1つずつあるそのような阻害性ペアのアップレギュレーションをもたらし、それが、抗原の存在下または抗原との遭遇後のT細胞の活性、拡大、またはエフェクター機能の自己ダウンレギュレーションまたは阻害（またはトランクスにあるT細胞による阻害）の一因になりうることを示している。一部の局面において、この調節または負の影響は、CAR発現細胞では、一部の局面においてT細胞がその天然抗原受容体複合体によって刺激された場合に起こりうるものと比べて、より早い時点で、またはより強い度合で起こりうる。

#### 【0075】

場合によっては、そのような事象は、遺伝子操作された（例えばCAR+）T細胞が、抗原-抗原受容体結合後に、または抗原と既に出会っていてPD-L1がアップレギュレートされている他の細胞の近傍に存在する場合に、消耗表現型を獲得する一因になり、それは、次いで、機能性の低減につながりうる。T細胞の消耗は、細胞機能の進行性の喪失および/または細胞の枯渇につながりうる（Yi et al. (2010) *Immunology*, 129:474-481）。T細胞消耗および/またはT細胞持続性の欠如は、養子細胞療法の効力および治療アウトカムにとっての障壁であり、臨床治験により、抗原受容体（例えばCAR）発現細胞へのより強いおよび/またはより長い曝露と処置アウトカムとの間の相関が明らかになっている。

#### 【0076】

一部の態様において、本方法および本組成物は、養子移入されたT細胞（例えばCARまたはトランクスジェニックTCRを発現するように操作された細胞）におけるPD-L1の発現の欠失、ノックアウト、妨害、または低減をもたらし、一部の局面では、それが、養子移入されるそのような細胞におけるPD-1の発現または機能を妨害することも他の形で損なうことも伴わざになされる。したがって、移入された細胞は、PD-1をアップレギュレートすることおよび他の移入されたT細胞以外の細胞を介したシグナルを受け取ることができ、それはメモリーコンパートメントのものを含めて、移入された細胞の寿命を改善しうるであろう。このように、ここに提供される方法は、一部の局面において、これらの細胞におけるPD-1のノックダウンまたはノックアウトとの関連において本来であれば起こりうる長寿命メモリーCAR+T細胞の長期的な減損を回避しつつ、この自己調節の負の効果を低減すること

10

20

30

40

50

ができる。一部の態様において、PD-1またはPD-L1をコードする遺伝子または他の核酸もしくは生体分子、あるいはPD-1分子またはPD-L1分子の欠失、ノックアウト、破壊、発現の低減、発現の妨害、アップレギュレーションの阻害および/または機能の阻害は、ゲノムレベル(例えばノックアウト、遺伝子編集、ノックイン、ゲノム欠失)、転写レベル(例えば転写抑制、転写ノックダウン)、転写後レベル、翻訳レベル、翻訳後レベル、細胞輸送のレベル、表面発現のレベル、または機能的活性のレベルで引き起こされる。

#### 【 0 0 7 7 】

操作された細胞の1つまたは複数の連続用量が投与される方法も提供される。本明細書に記載するように、操作された受容体、例えばCARによって認識される抗原と出会って細胞中のPD-1またはPD-L1がアップレギュレートされると、細胞の第1の用量は、消耗された状態および/または効力が低下した状態になりうる。ここに提供される方法は、これが起こった時点、または起こることが観測された時点、またはそのような事象が当該対象または疾患状態において典型的に起こる時点で、新鮮な細胞を提供することにより、消耗もアネルギー化もされておらず、PD-L1分子を介して負のシグナルを発しようともしていない細胞の新たな用量を提供して、曝露を増加させる。

10

#### 【 0 0 7 8 】

養子移入された細胞においてPD-1および/またはPD-L1の発現が一過性および/または誘導性に妨害される方法も提供される。例えば、一部の態様において、本方法は、移入後の細胞が、PD-1/PD-L1アップレギュレーションによる阻害または消耗のリスクを伴わずに、またはそのリスクが低減した状態で、抗原と出会い、拡大し、殺細胞または細胞傷害などのエフェクター機能を発揮することが可能となるように、PD-1またはPD-L1の発現を妨害または低減する作用物質の投与を伴うが、その妨害は永続的ではない。そのようなダウンレギュレーションは一過性であるから、長寿命メモリーの分化または持続性が損なわれるなどの、一定の長期的な負の影響が付随しないという点で有利でありうる。この一過性妨害の中止後に、細胞は、PD-1をアップレギュレートし、PD-1を介してシグナルを受け取って、長寿命メモリーの発生および持続性を促進することができる。一部の態様において、一過性の妨害は、例えば細胞に、投与後の限られた期間に遺伝子発現の標的妨害を引き起こす作用物質、例えば1つまたは複数の核酸および/もしくはポリペプチドまたはそれらの組み合わせもしくは複合体を投与することなどによる、発現のダウンレギュレーションによってもたらされる。一過性発現は、別のシグナルの送達後に、例えばそのような制御を活性化または遮断する化合物または他の作用物質の投与後に、その発現の誘導または低減を許す、プロモーターまたはエンハンサーまたは他の制御系の制御下に遺伝子を置く、遺伝子工学的技法によって引き起こされうる。一部の態様において、PD-1またはPD-L1の調節が何もない状態では、細胞はその効果を発揮することが許されるが、別の作用物質の投与後は、例えば移入された細胞の持続性が低下しつつあることまたは低下したことが観察された時には、その細胞におけるPD-1および/またはPD-L1発現を、一過性にまたは永続的に妨害することができるよう、発現の低減は誘導性である。

20

#### 【 0 0 7 9 】

養子細胞療法用の細胞を調製し操作するために使用されるエクスピボ培養物におけるチエックポイント分子とリガンド(例えばPD-1/PD-L1)の一方または両方のアップレギュレーション時に有害効果または減損効果を回避することを目指す方法も提供される。本明細書に記載する態様において、細胞は、例えばその細胞が発現するCARによって特異的に結合される抗原とのインキュベーション以外に、作用物質を使った刺激などによって、そのようなアップレギュレーションを促進しない条件下でインキュベートされる。そのような作用物質として、TCR/補助受容体シグナルを模倣するように設計されたもの、例えば抗CD3/抗CD28抗体および/またはサイトカインを挙げることができる。一部の態様において、培養条件は、PD-1またはPD-L1発現を促進するサイトカインまたは他の作用物質を含まず、かつ/または細胞寿命もしくは他の望ましい特徴を促進するサイトカインを含む。

30

#### 【 0 0 8 0 】

一部の態様において、補助刺激阻害性受容体またはそのリガンドの一方または両方のア

40

50

ップレギュレーションおよび/または発現は、T細胞活性化およびT細胞機能を負に制御することができる。PD-1は、B7:CD28補助刺激分子ファミリーに属する免疫阻害性受容体であり、そのリガンドPD-L1およびPD-L2と反応することで、T細胞機能を阻害する。例示的なPD-1アミノ酸配列およびPD-1コード核酸配列を、それぞれSEQ ID NO:9および10に示す。一部の態様において、PD-1コードヌクレオチドはPDCD1遺伝子である。PD-L1は概して、最初に、抗原提示細胞および/またはがん細胞上に発現していることが報告されており、そこで、T細胞が発現したPD-1と相互作用することで、例えばT細胞の活性化を阻害する。例示的なPD-L1アミノ酸配列およびPD-L1コード核酸配列を、それぞれSEQ ID NO:7および8に示す。GenBankアクセッション番号AF233516も参照されたい。一部の態様において、PD-L1コード核酸はCD274遺伝子である。場合によっては、PD-L1はT細胞上に発現するとも報告されている。場合によっては、PD-1とPD-L1の相互作用は細胞傷害性T細胞の活性を抑制し、一部の局面では、腫瘍免疫を阻害することで、腫瘍細胞の免疫エスケープをもたらしうる。一部の態様において、T細胞上および/または腫瘍微小環境におけるPD-1およびPD-L1の発現は、養子T細胞治療の力価および効力を低減しうる。

#### 【0081】

したがって一部の態様において、ここに提供される細胞には、PD-1またはPD-L1の一方または両方などの免疫阻害性分子をコードする分子を含む一定の遺伝子が、低減または破壊されている細胞が、含まれる。一部の態様において、1つまたは複数の阻害性分子の、例えばPD-1および/またはPD-L1のうちの1つまたは複数の、発現を低減、抑制または妨害する工程は、エクスピボで行われる。一部の局面において、そのような遺伝子操作されたT細胞を生成または作製する方法は、T細胞を含有する細胞の集団に、遺伝子操作された抗原受容体（例えばCAR）をコードする1つまたは複数の核酸と、PD-1またはPD-L1の一方または両方などといった免疫阻害性分子をコードする1つまたは複数の遺伝子を、低減しもしくは破壊する、または低減しもしくは破壊することができる、1つまたは複数の作用物質をコードする1つまたは複数の核酸分子、すなわち阻害性核酸分子とを、導入する工程を含む。

#### 【0082】

本明細書において用いられる場合、「導入する」という用語は、インビトロまたはインビボのいずれかで、DNAを細胞に導入するさまざまな方法を包含し、そのような方法には、形質転換、形質導入、トランスフェクション、および感染が含まれる。ベクターは、分子をコードするDNAを細胞に導入するのに役立つ。考えうるベクターには、プラスミドベクターおよびウイルスベクターが含まれる。ウイルスベクターには、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、または他のベクター、例えばアデノウイルスベクターもしくはアデノ随伴ベクターが含まれる。

#### 【0083】

T細胞を含有する細胞の集団は、対象から得られた細胞、例えば末梢血単核球（PBMC）試料、未分画T細胞試料、リンパ球試料、白血球試料、アフェレーシス産物、または白血球アフェレーシス産物から得られた細胞であることができる。一部の態様では、正の選択または負の選択および濃縮方法を使って集団中のT細胞を濃縮するために、T細胞を分離または選択することができる。一部の態様において、集団は、CD4+T細胞、CD8+T細胞またはCD4+およびCD8+T細胞を含有する。一部の態様において、遺伝子操作された抗原受容体をコードする核酸を導入する工程、および前記作用物質を導入する工程は、同時にまたは任意の順序で逐次的に行うことができる。一部の態様では、遺伝子操作された抗原受容体（例えばCAR）と1つまたは複数の作用物質の導入に続いて、細胞の拡大および/または増殖を刺激するための条件下で、細胞を培養またはインキュベートする。

#### 【0084】

一部の態様において、ここに提供されるT細胞、例えばここに提供される方法によって生成される細胞は、本来であれば1つまたは複数の阻害性分子の発現および/またはアップレギュレーションにつながりうるまたはつながる可能性が高い条件下でT細胞をインキュベートした場合に、1つもしくは複数の阻害性分子（例えばPD-1またはPD-L1）の発現の低

10

20

30

40

50

減および/または1つもしくは複数の阻害性分子（例えばPD-1またはPD-L1）のアップレギュレーションの阻害を呈する。一部の態様において、発現の低減および/またはアップレギュレーションの阻害は、前記1つまたは複数の阻害性分子の発現および/またはアップレギュレーションにつながる条件下でインキュベートした場合の、前記作用物質の導入を含まない対応するT細胞における同じ阻害性分子の発現またはアップレギュレーションと比較して、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%またはそれ以上である。

#### 【 0 0 8 5 】

本明細書において用いられる場合、「対応するT細胞」または「T細胞を含有する対応する細胞の集団」への言及は、T細胞またはT細胞の集団に作用物質が導入されていない点を除けば、同じ条件下または実質的に同じ条件下で得られた、単離された、作製された、生成した、および/またはインキュベートされたT細胞または細胞を指す。一部の局面において、作用物質の導入を含まないことを除けば、そのような細胞またはT細胞は、阻害性分子のアップレギュレーションまたは発現を含む細胞の活性または性質に影響を及ぼしうる任意の1つまたは複数の条件が、作用物質の導入以外には細胞間で変動しないまたは実質的に変動しないように、作用物質が導入されたT細胞または細胞と同一のまたは実質的に同一の処理を受ける。例えば、1つまたは複数の阻害性分子（例えばPD-1およびPD-L1）の発現の低減および/またはアップレギュレーションの阻害を評価するために、作用物質の導入を含むT細胞と、作用物質の導入を含まないT細胞とを、T細胞における前記1つまたは複数の阻害性分子の発現および/またはアップレギュレーションにつながることが知られている同じ条件下でインキュベートする。

#### 【 0 0 8 6 】

例えば、一部の態様において、本明細書に記載するように、導入された作用物質を含まない細胞において1つまたは複数の阻害性分子（例えばPD-1またはPD-L1）の発現またはアップレギュレーションを迅速に誘導する、抗原の存在を含む条件下で、T細胞をインキュベートした場合に、1つまたは複数の阻害性分子（例えばPD-1またはPD-L1）の発現および/または1つもしくは複数の阻害性分子（例えばPD-1またはPD-L1）のアップレギュレーションは、作用物質の導入を含まない対応するT細胞と比較して低減または阻害される。一部の態様において、抗原の存在下でのインキュベーションは、細胞を抗原と共に、例えばそれぞれ両端の値を含めて2時間～48時間、6時間～30時間もしくは12時間～24時間にわたって、または48時間未満、36時間未満、もしくは24時間未満にわたって、インビトロでインキュベートすることを含む。一部の態様において、抗原の存在下でのインキュベーションは、対象への細胞の投与後にインビトロで起こり、それは、インキュベーションの少なくとも一部にわたって特異的抗原への細胞の曝露をもたらし、細胞への抗原の特異的結合につながる。一部の態様において、作用物質を含まないT細胞では、阻害性分子（例えばPD-1またはPD-L1）の発現および/またはアップレギュレーションが、対象への細胞の投与後、少なくとも24時間、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日以内、あるいは約24時間、約2日、約3日、約4日、約5日、約6日、約7日、約8日、約9日または約10日以内に誘導される。一部の態様では、導入された作用物質を含有する、ここに提供される細胞の対象への投与後、同じ期間中に、1つまたは複数の阻害性分子の発現またはアップレギュレーションが低減または阻害される。

#### 【 0 0 8 7 】

PD-1またはPD-L1などの阻害性分子を含むT細胞マーカーの発現および/またはレベルを評価するための方法および技法は、当技術分野において公知である。そのようなマーカーを検出するための抗体および試薬は当技術分野において周知であり、すぐに入手できる。そのようなマーカーを検出するためのアッセイおよび方法には、細胞内フローサイトメトリーを含むフローサイトメトリー、ELISA、ELISPOT、サイトメトリービーズアレイまたは他のマルチプレックス法、ウェスタンプロットおよび他のイムノアフィニティーベースの方法などがあるが、それらに限定されるわけではない。一部の態様において、T細胞におけるマーカーの表面発現の評価には、投与された抗原受容体（例えばCAR）発現細胞を投

10

20

30

40

50

与後に対象において検出する工程が含まれる。対象において抗原受容体（例えばCAR）発現細胞を検出し、表面マーカーのレベルを評価することは、当業者の水準内にある。一部の態様において、抗原受容体（例えばCAR）発現細胞、例えば対象の末梢血から得られた細胞は、そのような細胞にユニークなマーカーの発現に関するフローサイトメトリーまたは他のイムノアフィニティーベースの方法によって検出することができ、次にそのような細胞を、別の1つまたは複数のT細胞表面マーカー、例えば阻害性分子（例えばPD-1またはPD-L1）について、共染色することができる。一部の態様において、抗原受容体（例えばCAR）を発現するT細胞は、非免疫原性選択エピトープとして切断型EGFR（EGFR<sub>t</sub>）を含有するように作製することができ、その場合はそれをそのような細胞を検出するためのマーカーとして使用することができる（例えば米国特許第8,802,374号参照）。 10

#### 【 0 0 8 8 】

一部の態様において、1つまたは複数の阻害性分子、例えばPD-1および/またはPD-L1は、T細胞において、例えばここに提供される方法によって生成されるT細胞において、細胞がエクスピボで維持または培養される時間よりも長い期間にわたって、低減され、抑制され、または妨害される。一部の局面において、そのような細胞を生成するための方法は、対象への細胞の投与時に、および/または対象への細胞の投与に続くある期間にわたって、前記1つまたは複数の阻害性分子、例えばPD-1またはPD-L1が、低減され、抑制され、または妨害されるように行われる。一部の態様では、エクスピボで培養された細胞に、対象への細胞の投与に先立つこと2時間以内、6時間以内、12時間以内、24時間以内、2日以内、3日以内または4日以内に、作用物質が導入される。 20

#### 【 0 0 8 9 】

一部の態様において、細胞への作用物質の導入は、細胞における、1つまたは複数の阻害性分子、例えばPD-1またはPD-L1の、発現の一過性のまたは一時的な低減を達成するために設けられる。一部の態様において、発現またはアップレギュレーションの一過性のまたは一時的な低減または阻害は、少なくとも6時間、12時間、24時間、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日またはそれ以上である。 30

#### 【 0 0 9 0 】

一部の態様において、細胞への作用物質の導入は、細胞における、1つまたは複数の阻害性分子、例えばPD-1またはPD-L1の、条件的な、発現の低減および/またはアップレギュレーションの阻害を達成するために、設けられる。一部の態様において、条件的な低減または阻害は、誘導性プロモーターなどの誘導性エレメントに特異的な誘導物質が存在する場合にのみ前記作用物質が細胞中で生産されるように、誘導性であることができる。一部の態様において、条件的な低減または阻害は、抑制性プロモーターなどの抑制性エレメントに特異的なリプレッサーの存在下では細胞中で前記作用物質がダウンレギュレートされるように、抑制性であることができる。一部の態様において、作用物質は、作用物質をコードするDNAの転写を誘導または抑制するために、それぞれ、誘導性プロモーターまたは抑制性プロモーターに機能的に連結される。本明細書にいう「機能的に連結される」または「機能的に関連する」とは、少なくとも2つの配列の機能的な連結への言及を包含する。例えば、機能的に連結されるとは、プロモーターと第2の配列との間の連結であって、プロモーター配列が第2の配列に対応するDNA配列の転写を開始し媒介するものを包含する。機能的に関連するとは、誘導性または抑制性のエレメントとプロモーターとの間の連結であって、誘導エレメントまたは抑制エレメントがプロモーターの転写アクチベーターとして作用する連結を包含する。 40

#### 【 0 0 9 1 】

一部の態様において、細胞への作用物質の導入は、細胞における、1つまたは複数の阻害性分子の発現の永続的なまたは非一過性の低減を、例えば細胞における遺伝子の破壊および/または1つもしくは複数の作用物質の安定な導入などによって達成するために設けられる。

#### 【 0 0 9 2 】

一部の態様において、ここで提供される細胞には、細胞内でPD-L1の発現が、例えばPD- 50

L1をコードするCD274などの遺伝子の発現を低減すること、またはPD-L1をコードするCD274などの遺伝子を破壊することができる作用物質を細胞に導入することなどによって、低減または妨害される細胞が含まれる。一部の態様において、PD-L1の発現の低減および/またはアップレギュレーションの阻害は、PD-L1の発現および/またはアップレギュレーションにつながる条件下でインキュベートした場合の、前記作用物質の導入を含まない対応するT細胞におけるPD-L1の発現またはアップレギュレーションと比較して、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%またはそれ以上である。一部の態様において、細胞におけるPD-L1発現の低減または妨害は永続的または非一過性である。一部の態様において、細胞におけるPD-L1発現の低減または妨害は一過性または条件的である。

## 【0093】

10

一部の態様において、ここで提供される細胞は、細胞内でPD-1の発現が、一過性にまたは条件的に、場合によっては非永続的に低減される細胞を包含する。一部の態様において、PD-1はメモリー表現型T細胞の分化の一因になるので、その遺伝子の永続的な低減または破壊は、時間が経過するとCD8メモリー分化に有害な効果を有しうる。一部の態様において、PD-1の、一過性の、例えば条件的な、発現の低減および/またはアップレギュレーションの阻害は、前記一過性効果の期間、同じ条件下でインキュベートした場合の、前記作用物質の導入を含まない対応するT細胞におけるPD-1の発現またはアップレギュレーションと比較して、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%またはそれ以上である。

## 【0094】

20

一部の態様では、アンチセンス、RNAiまたは他のRNA干渉作用物質を使った遺伝子ノックダウンなどの、一過性または可逆的抑制戦略が使用される。本明細書において用いられる場合、「RNA干渉作用物質」という用語は、例えばRNA干渉または遺伝子サイレンシングを配列特異的に媒介することなどによって遺伝子発現を阻害またはダウンレギュレートすることができる一群のポリヌクレオチドを指す。例として、RNA干渉作用物質には、siRNAを含むdsRNA、ならびにshRNA、miRNAを含めることができるが、それらに限定されるわけではない。発現を「阻害する」、「ダウンレギュレートする」または「低減する」とは、遺伝子産物の発現または対応する標的mRNA分子のレベルおよび/または標的mRNAによってコードされる1つもしくは複数の遺伝子産物の活性のレベルが、RNA干渉作用物質の非存在下で観察されるレベル、すなわちベースラインレベルまたは対象レベル未満に低減されることを意味する。一部の態様において、阻害パーセントまたはダウンレギュレーションパーセントは、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、もしくはそれ以上、またはその前後である。したがって一部の態様において、「阻害された」または「低減された」または「ダウンレギュレートされた」標的のmRNAレベル、遺伝子産物レベル、または遺伝子産物活性は、ベースラインレベルまたはベースライン活性の10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、もしくは90%に等しいか、それ以上であることができる。

## 【0095】

30

一部の態様において、遺伝子操作されたT細胞を生成または作製する方法は、T細胞を含有する細胞の集団に、遺伝子操作された抗原受容体（例えばCAR）をコードする1つまたは複数の核酸と、作用物質、例えばPD-1またはPD-L1などの阻害性免疫分子に対して特異的なアンチセンス、RNAiもしくは他の干渉作用物質である1つまたは複数の作用物質であるか、またはそれらを含むか、またはそれらをコードする1つまたは複数の核酸分子とを導入する工程を含む。一部の態様において、核酸分子は、低分子干渉RNA（siRNA）、マイクロRNA適合shRNA、短鎖ヘアピンRNA（shRNA）、ヘアピンsiRNA、前駆体マイクロRNA（pre-miRNA）、pri-miRNA、もしくはマイクロRNA（miRNA）である1つまたは複数の作用物質であるか、またはそれらを含むか、またはそれらをコードする。

## 【0096】

40

一部の態様において、細胞に導入される前記1つまたは複数の作用物質は、PD-L1などの阻害性分子をコードする遺伝子を破壊することができる。一部の態様において、破壊は、

50

遺伝子内での、典型的には遺伝子のエクソン内での、欠失、例えば遺伝子全体、エクソン、もしくは領域の欠損、および/または外来配列による置き換え、および/または変異、例えばフレームシフト変異もしくはミスセンス変異による。一部の態様において、破壊は、阻害性分子（例えばPD-1またはPD-L1）が発現しないか、細胞表面に発現できる形態および/または細胞シグナル伝達を媒介できる形態では発現しないように、遺伝子への中途停止コドンの組込みをもたらす。破壊は一般的にはDNAレベルで実行される。破壊は、一般的には、永続的であり、非可逆的であり、または一過性でない。

#### 【 0 0 9 7 】

一部の局面において、破壊は、遺伝子編集により、例えば破壊の標的とした領域で遺伝子に特異的に結合またはハイブリダイズするDNA結合タンパク質またはDNA結合核酸を使って、実行される。一部の局面では、前記タンパク質または核酸が、例えばキメラタンパク質または融合タンパク質などとして、ヌクレアーゼにカップリングされるか、ヌクレアーゼと複合体化される。例えば一部の態様において、破壊は、破壊される遺伝子に特異的な、DNA標的化タンパク質およびヌクレアーゼ、例えばジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）もしくはTALエフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、またはRNAガイド型ヌクレアーゼ、例えばクラスター化して規則的な配置の短い回文配列核酸（CRISPR）-Cas系、例えばCRISPR-Cas9系を含む融合物を使って引き起こされる。一部の態様において、遺伝子操作されたT細胞を生成または作製する方法は、T細胞を含有する細胞の集団に、遺伝子操作された抗原受容体（例えばCAR）をコードする1つまたは複数の核酸と、PD-L1に特異的な遺伝子編集ヌクレアーゼ、例えばDNA標的化タンパク質とヌクレアーゼとの融合物、例えばZFNもしくはTALEN、または例えばCRISPR-Cas9系のRNAガイド型ヌクレアーゼである、PD-L1を標的とする作用物質をコードする1つまたは複数の核酸とを導入する工程を含む。

#### 【 0 0 9 8 】

一部の態様において、遺伝子操作された細胞、例えばCAR発現細胞における阻害相互作用を低減または阻害する、ここに提供される方法は、細胞の第1の用量の投与に次いで、細胞の1つまたは複数の反復用量または連続用量を投与する工程を伴う。場合により、投与された細胞の第1の用量または事前用量は、標的抗原受容体または他のT細胞活性化刺激と出会った後に、最終的には、例えば細胞表面上のPD-1および/またはPD-L1などの1つまたは複数の阻害性分子をアップレギュレートしうる。そのような分子のアップレギュレーションはT細胞の機能喪失および/または消耗の一因になり、例えば細胞への長期曝露を損ないうる。細胞の反復用量または連続用量を使って、PD-1および/またはPD-L1などの阻害性分子を発現しない細胞、または対象中に存在する細胞と比較してそれらを低レベルに発現する細胞を送達することができる。一部の態様において、連続用量では、阻害性分子は、その中の細胞には（またはその中の細胞のうちの50、40、30、20、10、または5%以上には）発現しないか、実質的に発現しない（または参照細胞集団と同じ程度に発現する）。例えば投与された細胞上に低レベルでしか、例えば、分子の発現を誘導する条件下で刺激した場合の、および/またはCARによって認識される抗原への曝露によって刺激した場合の、細胞における阻害性分子の発現の最大レベルの70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%未満もしくはそれ以下またはその前後であるレベルでしか、発現しない。一部の態様において、PD-1およびPD-L1などの阻害性分子を発現しないまたは実質的に発現しない細胞の反復投与により、機能的なCAR発現T細胞またはロバストな機能を持つCAR発現T細胞が対象に存在する時間を延長することができる。一部の態様において、1つまたは複数の連続用量を投与することによる多くの遺伝子操作されたT細胞の補充は、抗原受容体（例えばCAR）発現細胞へのより強いおよび/またはより長い曝露につながり、処置アウトカムを改善しうる。一部の態様では、PD-L1またはPD-1が、参照レベルまたは参照集団と比較して、例えば対象への投与の直前の第1の用量の組成物中の細胞と比較してアップレギュレートされた時点で、例えば参照集団と比較して少なくとも10、20、30、40、50、60、70、または80%高い表面発現である程度までアップレギュレートされた時点で、連続用量が投与される。

#### 【 0 0 9 9 】

10

20

30

40

50

細胞の連続用量によって発現される受容体、例えばCARは、一般に、第1の用量のCARと同じ抗原に特異的に結合し、多くの場合、細胞の第1の用量にある受容体と同じ受容体であるか、またはそれと極めて似ている。一部の態様において、連続用量における細胞上の受容体は細胞の第1の用量における受容体と同じであるか、またはそれと高度な同一性を有する。

#### 【0100】

一部の態様において、細胞の連続用量によって発現されるCARは、細胞の第1の用量によって発現されるCARと同じscFv、同じシグナル伝達ドメイン、および/または同じ接合部を含有する。またそれは、一部の態様において、第1の用量のものと同じ補助刺激ドメイン、刺激ドメイン、膜貫通ドメイン、および/または他のドメインをさらに含有する。一部の態様では、連続用量のCARの1つまたは複数の成分は、第1の用量のCARとは全く異なる。

10

#### 【0101】

ここに提供される方法のいずれかの一部の局面において、遺伝子操作された細胞は、PD-1および/またはPD-L1などの1つまたは複数の阻害性分子が誘導もアップレギュレートもされないか、実質的に誘導もアップレギュレートもされないか、または他の条件と比較してアップレギュレートまたは誘導される程度が低い条件において、エクスピボ法で、生成または作製される。一部の態様では、遺伝子操作されたT細胞上のPD-1および/またはPD-L1の発現のレベルを、対象への投与に先だって決定またはモニタリングして、そのような細胞が前記1つまたは複数の阻害性分子を発現していないことまたは実質的に発現していないことを確認することができる。例えば細胞表面タンパク質との関連において、アフィニティーベースの方法、例えばイムノアフィニティーベースの方法による検出、例えばフローサイトメトリーによる検出など、組換え分子の発現レベルを評価するための数ある周知の方法を、使用することができる。場合によっては、発現レベルを、当該分子の発現を誘導することが公知である条件下で刺激された細胞における発現レベルと比較することができる。例えば、本明細書に記載するように、当該分子の発現を誘導する条件は、場合によっては、CARなどの操作された抗原受容体を介した抗原刺激を含みうる。また、天然TCR/CD28シグナル伝達経路を介した刺激など、T細胞活性化を誘導する他の条件も、T細胞上の阻害性分子、例えばPD-1およびPD-L1の発現を誘導することができる。一部の態様では、PD-1はアップレギュレートされるか、または参照条件と同じ程度もしくは類似する程度にアップレギュレートされるが、PD-L1の発現またはアップレギュレーションは遮断されるか、アップレギュレートされないか、実質的にアップレギュレートされないか、または参照条件ほどにはアップレギュレートされない条件が使用される。

20

#### 【0102】

一部の態様において、遺伝子操作された抗原受容体細胞、例えばCAR発現細胞を含有する、ここに提供される組成物は、対象にインビボ投与された場合に、増加した持続性を呈する。一部の態様において、投与後の、対象における、CAR発現T細胞などの遺伝子操作された細胞の持続性は、代替的方法、例えばPD-1および/またはPD-L1などの免疫応答の阻害に関与する遺伝子を低減または破壊する作用物質がT細胞に導入されない方法によって遺伝子操作された細胞の投与を伴う方法によって達成されるであろうものと比較して大きい。一部の局面において、ここに提供される細胞、例えばここに提供される方法によって生成される細胞の持続性は、CAR発現細胞などの遺伝子操作された抗原受容体を含有する細胞の集団であって、組成物中の細胞が、操作された人工受容体を介した特異的抗原による刺激に応答して、阻害性リガンドPD-L1を発現することまたはアップレギュレートすることができる細胞の集団の投与によって達成されるであろうものと比較して大きい。

30

#### 【0103】

一部の態様において、持続性は、少なくとも1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍もしくはそれ以上、または少なくとも約1.5倍、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍、約20倍、約30倍、約50倍、約60倍、約70倍、約80倍、約90倍、約100倍もしくはそれ以上、増加する。

40

50

**【0104】**

一部の態様では、投与された細胞の持続性の度合または程度を、対象への投与後に、検出し、定量することができる。例えば一部の局面では、対象の血液もしくは血清または器官または組織（例えば患部）における組換え受容体を発現する細胞（例えばCAR発現細胞）の量を評価するために、定量PCR（qPCR）が使用される。一部の局面では、持続性が、DNA 1マイクログラムあたりの、受容体、例えばCARをコードするDNAまたはプラスミドのコピー数として、または試料、例えば血液または血清の試料1マイクロリットルあたりの、または試料1マイクロリットルあたりの末梢血単核球（PBMC）または白血球またはT細胞の総数あたりの、受容体発現細胞、例えばCAR発現細胞の数として、定量される。一部の態様では、受容体を発現する細胞を、一般に、その受容体に特異的な抗体を使って検出するフローサイトメトリー・アッセイも、行うことができる。機能的細胞の数またはパーセンテージ、例えば疾患もしくは状態の細胞または受容体によって認識される抗原を発現する細胞に結合し、かつ/またはそれらの細胞を中和し、かつ/またはそれらの細胞に対する応答、例えば細胞傷害性応答を誘発することができる細胞の数またはパーセンテージを検出するために、細胞ベースのアッセイも使用することができる。そのような態様のいずれにおいても、対象中の投与された細胞と内在性細胞とを識別するために、組換え受容体（例えばCAR発現細胞）と関連する別のマーカーの程度またはレベルを使用することができる。10

**【0105】**

がんの処置での養子療法などにおける方法および細胞の使用も提供される。細胞を操作し、調製し、生成するための方法、前記細胞を含有する組成物、前記細胞を含有するキットおよびデバイス、前記細胞を使用し、生成し、投与するためのキットおよびデバイスも提供される。操作された細胞を生成するための方法、化合物、および組成物も提供される。細胞単離、遺伝子操作および遺伝子低減または遺伝子破壊のための方法が提供される。遺伝子操作された抗原受容体をコードし、かつ/または低減もしくは破壊を引き起こすための作用物質をコードする核酸、例えばコンストラクト、例えばウイルスベクター、および細胞に、そのような核酸を、形質導入などによって導入するための方法が提供される。操作された細胞を含有する組成物、ならびに前記細胞および組成物を例えば養子細胞療法のために対象に投与するための方法、キット、およびデバイスも提供される。一部の局面では、細胞が、対象から単離され、操作され、同じ対象に投与される。別の局面では、細胞が、ある対象から単離され、操作され、別の対象に投与される。20

**【0106】****II. 遺伝子操作された細胞およびT細胞**

養子細胞療法、例えば養子免疫療法のための細胞、および前記細胞を生成または作製するための方法が提供される。前記細胞には、T細胞などの免疫細胞が含まれる。細胞は、一般に、1つまたは複数の遺伝子操作された核酸またはその産物を導入することによって操作される。そのような産物には、遺伝子操作された抗原受容体、例えば操作されたT細胞受容体（TCR）および機能的非TCR抗原受容体、例えばキメラ抗原受容体（CAR）、例えば活性化CAR、刺激CAR、および補助刺激CAR、ならびにそれらの組み合わせが含まれる。一部の態様において、細胞には、遺伝子操作された抗原受容体をコードする核酸と同時に、もしくは逐次的に、細胞においてPD-1もしくはPD-L1などの免疫阻害性分子を低減し、抑制し、もしくは破壊することができる作用物質であるか、またはそれを含むか、またはそれをコードする核酸も導入される。30

**【0107】****A. 細胞**

一部の態様において、細胞、例えば操作された細胞は、真核細胞、例えば哺乳動物細胞、例えばヒト細胞である。一部の態様において、細胞は、血液、骨髓、リンパ、またはリンパ器官に由来し、免疫系の細胞、例えば自然免疫または適応免疫の細胞、例えば骨髓系細胞またはリンパ系細胞、例えばリンパ球、典型的にはT細胞および/またはNK細胞である。他の例示的な細胞として、幹細胞、例えば多分化能性幹細胞、および誘導多能性幹細胞（iPSC）を含む多能性幹細胞が挙げられる。一部の局面において、細胞はヒト細胞である40

。細胞は、典型的には初代細胞、例えば対象から直接単離されたもの、および/または対象から単離され凍結されたものである。一部の態様において、細胞には、例えば全T細胞集団、CD4<sup>+</sup>細胞、CD8<sup>+</sup>細胞、およびそれらの部分母集団、例えば機能、活性化状態、成熟度、分化能、拡大、再循環、局在化、および/もしくは持続能力、抗原特異性、抗原受容体のタイプ、特定の器官もしくは区画における存在、マーカーもしくはサイトカイン分泌プロファイル、ならびに/または分化の程度によって規定されるものなど、T細胞または他の細胞タイプの1つまたは複数のサブタイプが含まれる。処置しようとする対象に関して、前記細胞は、同種異系および/または自己由来でありうる。前記方法の中には既製の方法が含まれる。一部の局面において、例えば、既製の技術の場合、前記細胞は多能性および/または多分化能性であり、例えば幹細胞、例えば人工多能性幹細胞(iPSC)である。一部の態様において、前記方法は、対象から細胞を単離する工程、それらを本明細書に記載するように調製、加工、培養、および/または操作する工程、ならびに凍結保存前または凍結保存後にそれらを同じ対象に再導入する工程を含む。

#### 【0108】

T細胞ならびに/またはCD4<sup>+</sup>T細胞および/もしくはCD8<sup>+</sup>T細胞のサブタイプおよび部分母集団の中には、ナイーブT( $T_N$ )細胞、エフェクターT細胞( $T_{EFF}$ )、メモリーT細胞およびそれらのサブタイプ、例えば幹細胞メモリーT( $T_{SCM}$ )、セントラルメモリーT( $T_{CM}$ )、エフェクターメモリーT( $T_{EM}$ )、または最終分化エフェクターメモリーT細胞、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)、未成熟T細胞、成熟T細胞、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、粘膜関連インバリアントT(MAIT)細胞、天然のおよび適応性の調節性T(Treg)細胞、ヘルパーT細胞、例えば、TH1細胞、TH2細胞、TH3細胞、TH17細胞、TH9細胞、TH22細胞、濾胞ヘルパーT細胞、アルファ/ベータT細胞、ならびにデルタ/ガンマT細胞がある。

#### 【0109】

一部の態様において、T細胞集団のうちの1つまたは複数は、1つまたは複数の特定マーカー、例えば表面マーカーについて陽性である(マーカー<sup>+</sup>)か、それらを高レベルに発現する(マーカー<sup>high</sup>)細胞、または1つもしくは複数のマーカーについて陰性である(マーカー<sup>-</sup>)か、それらを比較的低レベルに発現する(マーカー<sup>low</sup>)細胞について濃縮されるか、またはT細胞集団のうちの1つまたは複数からそれらを枯渇させる。場合によっては、そのようなマーカーは、T細胞の一定の集団(例えば非メモリー細胞)には存在しないか比較的低レベルに発現しているが、T細胞の他の一定の集団(例えばメモリー細胞)には存在し、または比較的高レベルに発現しているものである。一態様において、細胞(例えばCD8<sup>+</sup>細胞、またはT細胞、例えばCD3<sup>+</sup>細胞)は、CD45RO、CCR7、CD28、CD27、CD44、CD127、および/またはCD62Lについて陽性であるか、それらを高い表面レベルで発現する細胞について濃縮され(すなわち正に選択され)、かつ/または細胞から、CD45RAについて陽性であるかそれを高い表面レベルで発現する細胞を枯渇させる(例えば負に選択される)。一部の態様において、細胞は、CD122、CD95、CD25、CD27、および/またはIL7-R(CD127)について陽性であるか、それらを高い表面レベルで発現する細胞について濃縮されるか、または細胞からそれらを枯渇させる。一部の例において、CD8<sup>+</sup>T細胞は、CD45RO陽性(またはCD45RA陰性)およびCD62L陽性の細胞について濃縮される。

#### 【0110】

一部の態様において、CD4<sup>+</sup>T細胞集団およびCD8<sup>+</sup>T細胞部分母集団、例えばセントラルメモリー( $T_{CM}$ )細胞について濃縮された部分母集団。

#### 【0111】

一部の態様において、前記細胞はナチュラルキラー(NK)細胞である。一部の態様において、前記細胞は、単球または顆粒球、例えば、骨髓系細胞、マクロファージ、好中球、樹状細胞、マスト細胞、好酸球、および/または好塩基球である。

#### 【0112】

#### B. 遺伝子操作された抗原受容体

一部の態様において、前記細胞は、遺伝子操作を介して導入された1種または複数種の核酸を含み、このような核酸の遺伝子操作された産物を含む。一部の態様において、前記

10

20

30

40

50

核酸は異種である、すなわち、細胞または細胞から得られた試料に通常は存在せず、例えば、別の生物または細胞から得られたもの、例えば、操作されている細胞、および/またはこのような細胞が得られた生物に普通は見られないものである。一部の態様において、前記核酸は非天然であり、例えば、複数の異なる細胞タイプに由来する様々なドメインをコードする核酸のキメラ組み合わせを含む核酸を含む、天然に見られない核酸である。

#### 【0113】

##### 1. キメラ抗原受容体 (CAR)

前記細胞は通常、抗原受容体、例えば、機能的な非TCR抗原受容体、例えば、キメラ抗原受容体(CAR)、および他の抗原結合受容体、例えば、トランスジェニックT細胞受容体(TCR)を含む組換え受容体を発現する。前記受容体の中には他のキメラ受容体もある。

10

#### 【0114】

CARを含む例示的な抗原受容体ならびにこのような受容体を操作するための方法およびこのような受容体を細胞に導入するための方法には、例えば、国際特許出願公開番号WO200014257、WO2013126726、WO2012/129514、WO2014031687、WO2013/166321、WO2013/071154、WO2013/123061、米国特許出願公開第US2002131960号、US2013287748、US20130149337、米国特許第6,451,995号、同第7,446,190号、同第8,252,592号、同第8,339,645号、同第8,398,282号、同第7,446,179号、同第6,410,319号、同第7,070,995号、同第7,265,209号、同第7,354,762号、同第7,446,191号、同第8,324,353号、および同第8,479,118号、ならびに欧州特許出願第EP2537416号に記載のもの、ならびに/またはSadelain et al., Cancer Discov. 2013 April; 3(4): 388-398; Davila et al. (2013) PLoS ONE 8(4): e61338; Turtur et al., Curr. Opin. Immunol., 2012 October; 24(5): 633-39; Wu et al., Cancer, 2012 March 18(2): 160-75に記載のものが含まれる。一部の局面において、前記抗原受容体には、米国特許第7,446,190号に記載のCARおよび国際特許出願公開番号WO/2014055668A1に記載のCARが含まれる。CARの例には、上述の任意の刊行物、例えば、WO2014031687、US8,339,645、US7,446,179、US2013/0149337、米国特許第7,446,190号、米国特許第8,389,282号、Kochenderfer et al., 2013, Nature Reviews Clinical Oncology, 10, 267-276 (2013); Wang et al. (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701、およびBrentjens et al., Sci Transl Med. 2013 5(177)に開示されるCARが含まれる。WO2014031687、US8,339,645、US7,446,179、US2013/0149337、米国特許第7,446,190号、および米国特許第8,389,282号も参照されたい。キメラ受容体、例えば、CARは、一般的に、細胞外抗原結合ドメイン、例えば、抗体分子の一部、一般的に、抗体の可変重( $V_H$ )鎖領域および/または可変軽( $V_L$ )鎖領域、例えば、scFv抗体断片を含む。

20

#### 【0115】

一部の態様において、受容体が標的とする抗原はポリペプチドである。一部の態様において、それは糖質または他の分子である。一部の態様において、抗原は、前記疾患または状態の細胞上に、例えば腫瘍細胞または病原性細胞上に、正常なまたは標的でない細胞または組織と比較して、選択的に発現または過剰発現する。別の態様において、抗原は、正常細胞上に発現し、かつ/または操作された細胞上に発現する。

30

#### 【0116】

一部の態様において受容体が標的とする抗原としては、オーファンチロシンキナーゼ受容体ROR1、tEGFR、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、メソテリン、CEA、およびB型肝炎表面抗原、抗葉酸受容体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3、もしくは4、FBP、胎児アセチルコリン受容体 (fetal acetylcholine receptor)、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R-アルファ、IL-13R-アルファ2、kdr、カッパ軽鎖、ルイスY、L1細胞接着分子、MAGE-A1、メソテリン、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、MART-1、gp100、腫瘍胎児性抗原 (oncofetal antigen)、ROR1、TAG72、VEGF-R2、がん胎児性抗原 (carcinoembryonic antigen) (CEA)、前立腺特異抗原、PSMA、Her2/neu、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、エフリンB2、CD123、c-Met、GD-2、およびMAGE A3、CE7、ウィルムス腫瘍1 (WT-1)、サイクリン、例えばサイクリンA1 (CCNA1)、および/またはビオチン化分子、および/またはHIV、HCV、HBVもしくは他の

40

50

病原体によって発現される分子が挙げられる。

【0117】

一部の態様において、CARは病原体特異的抗原に結合する。一部の態様において、CARはウイルス抗原（例えばHIV、HCV、HBVなど）、細菌抗原、および/または寄生虫抗原に特異的である。

【0118】

一部の態様において、組換え受容体、例えば、CARの抗体部分は、免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部、例えば、ヒンジ領域、例えば、IgG4ヒンジ領域、および/もしくはCH1/CLおよび/もしくはFc領域をさらに含む。一部の態様において、定常領域または一部はヒトIgG、例えば、IgG4またはIgG1の定常領域または一部である。一部の局面において、定常領域の一部は、抗原認識成分、例えば、scFvと、膜貫通ドメインとの間にあるスペーサー領域として役立つ。スペーサーは、スペーサーが存在しない場合と比較して抗原結合後の前記細胞の応答性を高める長さのスペーサーでよい。例示的なスペーサー、例えば、ヒンジ領域には、国際特許出願公開番号WO2014031687に記載のスペーサーが含まれる。一部の例では、スペーサーは長さが12アミノ酸もしくは約12アミノ酸であるか、または長さが12アミノ酸以下である。例示的なスペーサーには、少なくとも約10～229アミノ酸、約10～200アミノ酸、約10～175アミノ酸、約10～150アミノ酸、約10～125アミノ酸、約10～100アミノ酸、約10～75アミノ酸、約10～50アミノ酸、約10～40アミノ酸、約10～30アミノ酸、約10～20アミノ酸、または約10～15アミノ酸を有し、列挙された任意の範囲の端点間の任意の整数を含むスペーサーが含まれる。一部の態様において、スペーサー領域には、約12アミノ酸もしくはこれより少ないアミノ酸、約119アミノ酸もしくはこれより少ないアミノ酸、または約229アミノ酸もしくはこれより少ないアミノ酸がある。例示的なスペーサーには、IgG4ヒンジのみ、CH2およびCH3ドメインと連結したIgG4ヒンジ、またはCH3ドメインと連結したIgG4ヒンジが含まれる。

10

20

30

【0119】

この抗原認識ドメインは、一般的に、1つまたは複数の細胞内シグナル伝達成分、例えば、CARの場合は抗原受容体複合体、例えばTCR複合体、および任意で関連する補助刺激シグナルを通じた活性化、ならびに/または別の細胞表面受容体を介したシグナルを模倣するシグナル伝達成分に、連結される。従って、一部の態様において、抗原結合成分（例えば、抗体）は1つまたは複数の膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインに連結される。一部の態様において、膜貫通ドメインは細胞外ドメインに融合される。一態様において、前記受容体、例えば、CARにおいて前記ドメインの1つと天然で結合している天然膜貫通ドメインが用いられる。場合によっては、膜貫通ドメインは、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小にするために、このようなドメインと、同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインとの結合を避けるように選択されるか、またはアミノ酸置換によって改変される。

【0120】

膜貫通ドメインは、一部の態様では、天然供給源または合成供給源のいずれかに由来する。供給源が天然の場合、前記ドメインは、一部の局面では、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する。膜貫通領域は、T細胞受容体の鎖、鎖、もしくは鎖、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154に由来する膜貫通領域を含む（すなわち、少なくとも、その膜貫通領域を含む）。または、膜貫通ドメインは一部の態様では合成である。一部の局面において、合成膜貫通ドメインは、主に疎水性の残基、例えば、ロイシンおよびバリンを含む。一部の局面において、フェニルアラニン、トリプトファン、およびバリンのトリプレットが合成膜貫通ドメインの各末端に見られる。一部の態様において、連結は、リンカー、スペーサー、および/または膜貫通ドメインによるものである。

40

【0121】

細胞内シグナル伝達ドメインの中には、天然抗原受容体を介したシグナル（例えばCD3シグナル）、このような受容体と補助刺激受容体の組み合わせを介したシグナル（例えば

50

CD3/CD28シグナル)、および/または補助刺激受容体だけを介したシグナルを模倣するか、またはこれに似せる細胞内シグナル伝達ドメインがある。一部の態様において、短いオリゴペプチドリンカーまたはポリペプチドリンカー、例えば、長さが2~10アミノ酸のリンカー、例えば、グリシンおよびセリン、例えば、グリシン-セリンダブルレット(doublet)を含有するリンカーが、CARの膜貫通ドメインと細胞質シグナル伝達ドメインとの間に存在し、連結を形成する。

#### 【0122】

前記受容体、例えば、CARは、一般的には、少なくとも1種類の細胞内シグナル伝達成分を含む。一部の態様において、前記受容体は、TCR複合体の細胞内成分、例えば、T細胞活性化および細胞傷害性を媒介するTCR CD3鎖、例えば、CD3鎖を含む。従って、一部の局面において、抗原結合部分は1つまたは複数の細胞シグナル伝達モジュールに連結される。一部の態様において、細胞シグナル伝達モジュールには、CD3膜貫通ドメイン、CD3細胞内シグナル伝達ドメイン、および/または他のCD膜貫通ドメインが含まれる。一部の態様において、前記受容体、例えば、CARは、1種または複数種のさらなる分子、例えば、Fc受容体、CD8、CD4、CD25、またはCD16の一部をさらに含む。例えば、一部の局面において、CARまたは他のキメラ受容体には、CD3-ゼータ(CD3-)またはFc受容体と、CD8、CD4、CD25、またはCD16とのキメラ分子が含まれる。

#### 【0123】

一部の態様において、CARまたは他のキメラ受容体がライゲーションされると、前記受容体の細胞質ドメインまたは細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫細胞、例えば、CARを発現するように操作されたT細胞の正常なエフェクター機能または応答の少なくとも1つを活性化する。例えば、ある状況では、CARは、T細胞の機能、例えば、細胞溶解活性またはTヘルパー活性、例えば、サイトカインまたは他の因子の分泌を誘導する。一部の態様において、抗原受容体成分または補助刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメインの切断部分は、例えば、エフェクター機能シグナルを伝達するのであれば、インタクトな免疫賦活性鎖の代わりに用いられる。一部の態様において、細胞内シグナル伝達ドメインはT細胞受容体(TCR)の細胞質配列を含み、一部の局面では、天然の状況では、このような受容体と協調して、抗原受容体結合後にシグナル伝達を開始するように働く補助受容体の細胞質配列も含む。

#### 【0124】

天然TCRの状況では、完全活性化には、一般的に、TCRを介したシグナル伝達だけでなく補助刺激シグナルも必要とされる。従って、一部の態様において、完全活性化を促進するには、二次シグナルまたは補助刺激シグナルを発生させるための成分もCARに含まれる。他の態様において、CARは、補助刺激シグナルを発生させるための成分を含まない。一部の局面において、さらなるCARが同じ細胞において発現され、二次シグナルまたは補助刺激シグナルを発生させるための成分を提供する。

#### 【0125】

T細胞活性化は、一部の局面では、2種類の細胞質シグナル伝達配列:TCRを介して抗原依存的一次活性化を開始する細胞質シグナル伝達配列(一次細胞質シグナル伝達配列)、および抗原非依存的に二次シグナルまたは補助刺激シグナルを供給するように働く細胞質シグナル伝達配列(二次細胞質シグナル伝達配列)によって媒介されると説明される。一部の局面において、CARは、このようなシグナル伝達成分の一方または両方を含む。

#### 【0126】

一部の局面において、CARは、TCR複合体の一次活性化を調節する一次細胞質シグナル伝達配列を含む。刺激するように働く一次細胞質シグナル伝達配列は、免疫受容活性化チロシンモチーフまたはITAMとして知られるシグナル伝達モチーフを含有してもよい。ITAMを含有する一次細胞質シグナル伝達配列の例には、TCR、FcR、FcR、CD3、CD3、CD3、CD3、CD22、CD79a、CD79b、およびCD66dに由来する一次細胞質シグナル伝達配列が含まれる。一部の態様において、CARにある細胞質シグナル伝達分子は、CD3に由来する細胞質シグナル伝達ドメイン、その一部、または配列を含有する。

10

20

30

40

50

## 【0127】

一部の態様において、CARは、補助刺激受容体、例えば、CD28、4-1BB、OX40、DAP10、およびICOSのシグナル伝達ドメインおよび/または膜貫通部分を含む。一部の局面において、同じCARが活性化成分と補助刺激成分を両方とも含む。

## 【0128】

一部の態様において、あるCARには活性化ドメインが含まれるのに対して、別の抗原を認識する別のCARによって補助刺激成分が提供される。一部の態様において、CARは活性化CARまたは刺激CAR、補助刺激CARを含み、両方とも同じ細胞上に発現される(WO2014/055668を参照されたい)。一部の局面において、前記細胞は、1種または複数種の刺激CARもしくは活性化CARおよび/または補助刺激CARを含む。一部の態様において、前記細胞は、阻害CAR(iCAR、Fedorov et al., Sci. Transl. Medicine, 5(215) (December, 2013)を参照されたい)、例えば、疾患もしくは状態に関連するおよび/または疾患もしくは状態に特異的な抗原以外の抗原を認識するCARをさらに含み、ここで、疾患標的化CARを通じて送達された活性化シグナルは、例えば、オフターゲット効果を小さくするための阻害性CARとそのリガンドとの結合によって、減弱または阻害される。

## 【0129】

ある特定の態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3(例えば、CD3-)細胞内ドメインと連結した、CD28膜貫通ドメインおよびシグナル伝達ドメインを含む。一部の態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3 細胞内ドメインと連結した、キメラCD28およびCD137(4-1BB、TNFRSF9)補助刺激ドメインを含む。

## 【0130】

一部の態様において、CARは、細胞質部分に、1種または複数種の、例えば、2種類以上の補助刺激ドメインおよび活性化ドメイン、例えば、一次活性化ドメインを含む。例示的なCARには、CD3-、CD28、および4-1BBの細胞内成分が含まれる。

## 【0131】

一部の態様において、CARまたは他の抗原受容体は、受容体、例えば、切断型バージョンの細胞表面受容体、例えば、切断型EGFR(tEGFR)を発現させるための細胞の形質導入または操作を確認するために用いられ得るマーカー、例えば、細胞表面マーカーをさらに含む。一部の局面において、マーカーは、CD34、NGFR、または上皮増殖因子受容体の全てまたは一部(例えば、切断型)(例えば、tEGFR)を含む。一部の態様において、マーカーをコードする核酸は、リンカー配列、例えば、切断可能なリンカー配列、例えば、T2Aをコードするポリヌクレオチドに機能的に連結される。WO2014031687を参照されたい。

## 【0132】

一部の態様において、マーカーは、T細胞上に天然で見出されないか、もしくはT細胞の表面に天然で見出されない分子、例えば、細胞表面タンパク質、またはその一部である。

## 【0133】

一部の態様において、前記分子は、非自己分子、例えば、非自己タンパク質、すなわち、前記細胞が養子移入される宿主の免疫系が「自己」と認識しない分子である。

## 【0134】

一部の態様において、マーカーは治療機能を果たさない、および/または遺伝子操作するための、例えば、首尾良く操作された細胞を選択するためのマーカーとして使用する以外の効果を生じない。他の態様において、マーカーは治療用分子でもよく、何らかの望ましい効果を別の方法で発揮する分子、例えば、細胞がインビボで遭遇するリガンド、例えば、養子移入時に前記細胞の応答を強める、および/または弱めるための、ならびにリガンドに遭遇するための補助刺激分子または免疫チェックポイント分子でもよい。

## 【0135】

場合によっては、CARは、第一世代CAR、第二世代CAR、および/または第三世代CARと呼ばれる。一部の局面において、第一世代CARは、抗原が結合した時に、CD3鎖によって誘導されるシグナルしか生じないCARである。一部の局面において、第二世代CARは、このようなシグナルと補助刺激シグナルを生じるCAR、例えば、CD28またはCD137などの補助刺激受

10

20

30

40

50

容体に由来する細胞内シグナル伝達ドメインを含むCARである。一部の局面において、第三世代CARは、異なる補助刺激受容体の複数の補助刺激ドメインを含むCARである。

#### 【0136】

一部の態様において、キメラ抗原受容体は、抗体または抗体断片を含有する細胞外部分を含む。一部の局面において、キメラ抗原受容体は、抗体または断片を含有する細胞外部分と、細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一部の態様において、抗体または断片はscFvを含み、細胞内ドメインはITAMを含有する。一部の局面において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3-ゼータ(CD3 $\zeta$ )鎖の $\zeta$ 鎖のシグナル伝達ドメインを含む。一部の態様において、キメラ抗原受容体は、細胞外ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインを連結する膜貫通ドメインを含む。一部の局面において、膜貫通ドメインはCD28の膜貫通部分を含有する。一部の態様において、キメラ抗原受容体はT細胞補助刺激分子の細胞内ドメインを含有する。一部の局面において、T細胞補助刺激分子はCD28または41BBである。

10

#### 【0137】

「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指すために同義に用いられ、最小の長さに限定されない。提供される受容体を含むポリペプチドおよび他のポリペプチド、例えば、リンカーまたはペプチドは、天然および/または非天然アミノ酸残基を含むアミノ酸残基を含んでもよい。この用語はまた、ポリペプチドの発現後修飾、例えば、グリコシリ化、シアリル化、アセチル化、およびリン酸化も含む。一部の局面において、ポリペプチドは、タンパク質が望ましい活性を維持する限り、自然または天然の配列に対して修飾を含有してもよい。これらの修飾は、部位特異的変異誘発を介した修飾のように意図的なものでもよく、タンパク質を産生する宿主の変異またはPCR增幅によるエラーを介した修飾のように偶発的なものでもよい。

20

#### 【0138】

##### 2. TCR

一部の態様において、遺伝子操作された抗原受容体には、組換えT細胞受容体( TCR )および/または天然のT細胞からクローニングされたTCRが含まれる。一部の態様では、標的抗原( 例えばがん抗原 )に対する高アフィニティーT細胞クローンを同定し、患者から単離し、細胞に導入する。一部の態様において、標的抗原に対するTCRクローンは、ヒト免疫系遺伝子( 例えばヒト白血球抗原系、すなわちHLA )で操作されたトランスジェニックマウスにおいて作製された。例えば腫瘍抗原参照( 例えばParkhurst et al. ( 2009 ) Clin Cancer Res. 15:169-180およびCohen et al. ( 2005 ) J Immunol. 175:5799-5808参照 )。一部の態様では、標的抗原に対するTCRを単離するために、ファージディスプレイが使用される( 例えばVarela-Rohena et al. ( 2008 ) Nat Med. 14:1390-1395およびLi ( 2005 ) Nat Biotechnol. 23:349-354参照 )。

30

#### 【0139】

一部の態様では、T細胞クローンを得た後に、TCRアルファ鎖およびTCRベータ鎖が単離され、遺伝子発現ベクターにクローニングされる。一部の態様において、TCRアルファ遺伝子とTCRベータ遺伝子は、両鎖が共発現するように、ピコルナウイルス2Aリボソームスキップペプチドを介して連結される。一部の態様において、TCRの遺伝子移入は、レトロウイルスベクターもしくはレンチウイルスベクターによって、またはトランスポゾンによって果たされる( 例えばBaum et al. ( 2006 ) Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy. 13:1050-1063、Frecha et al. ( 2010 ) Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy. 18:1748-1757、およびHackett et al. ( 2010 ) Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy. 18:674-683参照 )。

40

#### 【0140】

##### 3. 多重標的化

一部の態様において、本細胞および方法は、例えばそれぞれが同じまたは異なる抗原を認識し、典型的にはそれぞれが異なる細胞内シグナル伝達成分を含む、2つ以上の遺伝子操作された受容体の、細胞での発現などといった、多重標的化戦略を含む。そのような多

50

重標的化戦略は、例えば、国際特許出願公開番号WO 2014055668 A1（例えばオフターゲット、例えば正常細胞上では個別に存在するが、処置しようとする疾患または状態の細胞上にのみ一緒に存在する2つの異なる抗原を標的とする、活性化CARと補助刺激CARの組み合わせが記載されている）およびFedorov et al., Sci. Transl. Medicine, 5 (215) (December, 2013)（活性化CARと阻害性CARとを発現する細胞、例えば活性化CARは、正常細胞または非疾患細胞と処置しようとする疾患または状態の細胞との両方に発現する1つの抗原に結合し、阻害性CARは、正常細胞または処置することが望まれていない細胞だけに発現する別の抗原に結合するものが記載されている）に記載されている。

#### 【0141】

例えば一部の態様において、細胞は、一般に、第1の受容体によって認識される抗原、例えば第1の抗原への特異的結合時に、細胞への活性化シグナルを誘導することができる、第1の遺伝子操作された抗原受容体（例えばCARまたはTCR）を発現する受容体を含む。一部の態様において、細胞は、第2の遺伝子操作された抗原受容体（例えばCARまたはTCR）、例えば一般に第2の受容体によって認識される第2の抗原への特異的結合時に、免疫細胞への補助シグナルを誘導することができるキメラ補助刺激受容体をさらに含む。一部の態様では、第1の抗原と第2の抗原とが同じである。一部の態様では、第1の抗原と第2の抗原とが異なる。

#### 【0142】

一部の態様において、第1および/または第2の遺伝子操作された抗原受容体（例えばCARまたはTCR）は、細胞への活性化シグナルを誘導することができる。一部の態様において、受容体は、ITAMまたはITAM様モチーフを含有する細胞内シグナル伝達成分を含む。一部の態様において、第1の受容体によって誘導される活性化は、細胞におけるシグナル伝達およびタンパク質発現の変化を伴い、ITAMリン酸化および/またはITAM媒介シグナル伝達カスケードの開始、結合した受容体の近傍での免疫シナプスの形成および/または分子（例えばCD4またはCD8など）のクラスタリング、NF- $\kappa$ Bおよび/またはAP-1などの1つまたは複数の転写因子の活性化、および/またはサイトカインなどの因子の遺伝子発現の誘導、増殖、および/または生存などといった、免疫応答の開始をもたらす。

#### 【0143】

一部の態様において、第1および/または第2の受容体は、CD28、CD137 (4-1BB)、OX40、および/またはICOSなどの補助刺激受容体の細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一部の態様において、第1および第2の受容体は異なる補助刺激受容体の細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一態様では、第1の受容体がCD28補助刺激シグナル伝達領域を含有し、かつ第2の受容体が4-1BB補助刺激シグナル伝達領域を含有するか、またはその逆である。

#### 【0144】

一部の態様において、第1および/または第2の受容体は、ITAMまたはITAM様モチーフを含有する細胞内シグナル伝達ドメインと補助刺激受容体の細胞内シグナル伝達ドメインをどちらも含む。

#### 【0145】

一部の態様において、第1の受容体はITAMまたはITAM様モチーフを含有する細胞内シグナル伝達ドメインを含有し、第2の受容体は補助刺激受容体の細胞内シグナルを含有する。同じ細胞内で誘導された活性化シグナルと組み合わされた補助刺激シグナルは、免疫応答、例えばロバストで持続的な免疫応答、例えば遺伝子発現の増加、サイトカインおよび他の因子の分泌、ならびに殺細胞などのT細胞媒介エフェクター機能をもたらすシグナルである。

#### 【0146】

一部の態様では、第1の受容体のライゲーションだけでも、第2の受容体のライゲーションだけでも、ロバストな免疫応答は誘導されない。一部の局面では、一方の受容体だけがライゲーションされると、細胞は、抗原に対して寛容化されるか、非応答性になり、または阻害され、かつ/または増殖し、もしくは因子類を分泌し、またはエフェクター機能を実行するように誘導されることがない。しかし、一部のそのような態様において、例えば

10

20

30

40

50

第1および第2の抗原を発現する細胞との遭遇時などに、複数の受容体がライゲーションされると、例えば1つまたは複数のサイトカインの分泌、増殖、持続性、および/または標的細胞の細胞毒性殺滅などの免疫エフェクター機能の実行によって示される完全な免疫活性化または刺激などといった、望ましい応答が達成される。

【0147】

一部の態様において、2つの受容体は、一方の受容体によるその抗原への結合は細胞を活性化するかまたは応答を誘導するが、第2の阻害性抗体によるその抗原への結合はその応答を抑制するまたは弱めるシグナルを誘導するような形で、細胞への活性化シグナルおよび阻害性シグナルを、それぞれ誘導する。その例は、活性化CARと阻害性CAR、すなわちiCARとの組み合わせである。例えば活性化CARは、ある疾患または状態において発現するが正常細胞にも発現する抗原に結合し、阻害性受容体は、正常細胞には発現するが前記疾患または状態の細胞には発現しない別個の抗原に結合するような戦略を使用することができる。

10

【0148】

一部の態様では、ある特定の疾患または状態と関連する抗原が非疾患細胞上に発現しており、かつ/または操作された細胞自体にも一過性に（例えば遺伝子工学との関連での刺激時に）または永続的に発現する場合に、多重標的化戦略が使用される。そのような場合は、2つの別々の個別に特異的な抗原受容体のライゲーションを要求することにより、特異性、選択性、および/または効力が改良されうる。

【0149】

20

一部の態様では、複数の抗原、例えば第1および第2の抗原が、標的となる細胞、組織または疾患もしくは状態において、例えばがん細胞上に発現する。一部の局面において、前記細胞、組織、疾患または状態は、多発性骨髄腫または多発性骨髄腫細胞である。一部の態様では、前記複数の抗原のうちの1つまたは複数は、一般に、細胞治療の標的となることが望まれない細胞、例えば正常なまたは罹患していない細胞または組織、および/または操作された細胞自体にも発現する。そのような態様では、細胞の応答を達成するために複数の受容体のライゲーションを要求することによって、特異性および/または効力が達成される。

【0150】

4. 遺伝子操作のためのベクターおよび方法

30

遺伝子操作された細胞を生成するための方法、核酸、組成物、およびキットも提供される。一部の態様において、遺伝子操作は、遺伝子操作された成分をコードする核酸または細胞への導入用の他の成分、例えば、遺伝子破壊タンパク質または核酸をコードする成分を導入することを伴う。

【0151】

一部の態様において、遺伝子移入は、最初に、細胞成長、例えば、T細胞成長、増殖、および/または活性化を刺激し、その後に、活性化された細胞に形質導入し、臨床用途に十分な数まで培養で拡大させることによって成し遂げられる。

【0152】

ある状況では、刺激因子（例えば、リンホカインまたはサイトカイン）の過剰発現が対象に対して毒性をもつ場合がある。従って、ある状況では、操作された細胞は、例えば、養子免疫治療において投与された時に、インビオで細胞を負の選択に対して感受性にする遺伝子セグメントを含む。例えば、一部の局面において、前記細胞は、細胞が投与された患者のインビオ状態が変化した結果として排除可能になるように操作される。負の選択が可能な表現型は、投与された作用物質、例えば、化合物に対する感受性を付与する遺伝子の挿入に起因してもよい。負の選択が可能な遺伝子には、ガンシクロビル感受性を付与する単純ヘルペスウイルスI型チミジンキナーゼ(HSV-I TK)遺伝子(Wigler et al., Cell 2 :223, 1977); 細胞ヒポキサンチンホスフリボシリトランスフェラーゼ(phosphribosyl transferase)(HPRT)遺伝子、細胞アデニンホスホリボシリトランスフェラーゼ(APRT)遺伝子、または細菌シトシンデアミナーゼ、(Mullen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:33 (

40

50

1992))が含まれる。

#### 【0153】

一部の局面において、前記細胞は、サイトカインまたは他の因子の発現を促進するよう にさらに操作される。遺伝子操作された成分、例えば、抗原受容体、例えば、CARを導入するための様々な方法は周知であり、提供される方法および組成物と共に使用することができる。例示的な方法には、ウイルス、例えば、レトロウイルスまたはレンチウイルス、形質導入、トランスポゾン、およびエレクトロポレーションを介した方法を含む、受容体をコードする核酸を移入するための方法が含まれる。

#### 【0154】

一部の態様において、組換え核酸は、組換え感染性ウイルス粒子、例えば、シミアンウ 10 イルス40(SV40)、アデノウイルス、アデノ隨伴ウイルス(AAV)に由来するベクターを用いて細胞に移入される。一部の態様において、組換え核酸は、組換えレンチウイルスベクターまたはレトロウイルスベクター、例えば、-レトロウイルスベクターを用いてT細胞に移入される(例えば、Koste et al. (2014) Gene Therapy 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt. 2014.25; Carlens et al. (2000) Exp Hematol 28(10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) Mol Ther Nucl Acids 2, e93; Park et al., Trends Biotechnol. 2011 November; 29(11): 550-557を参照されたい)。

#### 【0155】

一部の態様において、レトロウイルスベクター、例えば、モロニーマウス白血病ウイルス(MoMLV)、骨髄増殖性肉腫ウイルス(myeloproliferative sarcoma virus)(MPSV)、マウス胚性幹細胞ウイルス(MESV)、マウス幹細胞ウイルス(MSCV)、脾フォーカス形成ウイルス(SFFV)、またはアデノ隨伴ウイルス(AAV)に由来するレトロウイルスベクターには末端反復配列LTR)がある。ほとんどのレトロウイルスベクターはマウスレトロウイルスに由来する。一部の態様において、レトロウイルスには、任意の鳥類細胞供給源または哺乳動物細胞供給源に由来するレトロウイルスが含まれる。レトロウイルスは典型的に両種指向性である。両種指向性とは、レトロウイルスが、ヒトを含む、いくつかの種の宿主細胞に感染できることを意味する。一態様において、発現させようとする遺伝子はレトロウイルスgag配列、pol配列、および/またはenv配列に取って代わる。多数の例示的なレトロウイルス系が述べられている(例えば、米国特許第5,219,740号;同第6,207,453号;同第5,219,740号; Miller and Rosman(1989) BioTechniques 7:980-990; Miller, A. D. (1990) Human 20 Gene Therapy 1:5-14; Scarpa et al. (1991) Virology 180:849-852; Burns et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-8037;およびBoris-Lawrie and Temin (1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3: 102-109)。

#### 【0156】

レンチウイルス形質導入法は公知である。例示的な方法は、例えば、Wang et al. (201 2) J. Immunother. 35(9): 689-701; Cooper et al. (2003) Blood. 101: 1637-1644; Ve rhoeyen et al. (2009) Methods Mol Biol. 506: 97-114;およびCavalieri et al. (2003) Blood. 102(2): 497-505に記載されている。

#### 【0157】

一部の態様において、組換え核酸はエレクトロポレーションを介してT細胞に移入され 40 る(例えば、Chicaybam et al., (2013) PLoS ONE 8(3): e60298およびVan Tedeloo et al. (2000) Gene Therapy 7(16): 1431-1437)を参照されたい)。一部の態様において、組換 え核酸は転位を介してT細胞に移入される(例えば、Manuri et al. (2010) Hum Gene Ther 21(4): 427-437; Sharma et al. (2013) Molec Ther Nucl Acids 2, e74およびHuang et al. (2009) Methods Mol Biol 506: 115-126を参照されたい)。免疫細胞において遺伝物質を導入および発現する他の方法には、リン酸カルシウムトランスフェクション(例えば、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y.に記載)、プロトプラスト融合、カチオン性リポソームを介したトランスフェクション;タンゲステン粒子によって促進されるマイクロパーティクルボンバードメント(microparticle bombardment)(Johnston, Nature, 346: 776-777 (1990));およびリン酸ストロンチウムDNA 50

共沈殿(Brash et al., Mol. Cell Biol., 7: 2031-2034 (1987))が含まれる。

#### 【0158】

遺伝子操作された産物をコードする遺伝子操作された核酸を移入するための他のアプローチおよびベクターは、例えば、国際特許出願公開番号WO2014055668および米国特許第7,446,190号に記載のものである。

#### 【0159】

さらなる核酸、例えば、導入用の遺伝子の中には、Lupton S. D. et al., Mol. and Cell Biol., 11:6 (1991); およびRiddell et al., Human Gene Therapy 3:319-338 (1992)に記載のように、療法の効力を改善するための、例えば、移入された細胞の生存および/または機能を促進することによって療法の効力を改善するための遺伝子; 細胞を選択および/または評価するための、例えば、インビオ生存または局在化を評価するための遺伝子マーカーを提供するための遺伝子; 安全性を改善する、例えば、細胞をインビオで負の選択に対して感受性にすることによって安全性を改善する遺伝子がある。ドミナントポジティブ選択マーカーと負の選択マーカーとの融合から得られた二機能性の選択可能な融合遺伝子の使用について説明している、LuptonらによるPCT/US91/08442およびPCT/US94/05601の公報も参照されたい。例えば、Riddell et al., 米国特許第6,040,177号の縦列14~17を参照されたい。

10

#### 【0160】

さらなる核酸の中にはまた、阻害核酸分子をコードするもの、例えば後述のものもある。

20

#### 【0161】

#### 5. 操作のための細胞の調製

一部の態様において、操作された細胞の調製は、1つまたは複数の培養工程および/または調製工程を含む。トランスジェニック受容体、例えば、CARをコードする核酸を導入するための細胞は、試料、例えば、生物学的試料、例えば、対象から得られた、または対象に由来する生物学的試料から単離されてもよい。一部の態様において、細胞が単離される対象は、疾患もしくは状態を有する対象、または細胞療法を必要とするか、もしくは細胞療法が投与される対象である。対象は、一部の態様では、特定の治療介入、例えば、細胞が単離、処理、および/または操作される養子細胞療法を必要とするヒトである。

30

#### 【0162】

従って、前記細胞は、一部の態様では、初代細胞、例えば、初代ヒト細胞である。前記試料には、対象から直接採取した組織、液体、および他の試料、ならびに1つまたは複数の処理工程、例えば、分離、遠心分離、遺伝子操作(例えば、ウイルスベクターを用いた形質導入)、洗浄、および/またはインキュベーションに起因する試料が含まれる。生物学的試料は、生物学的供給源から直接得られた試料でもよく、処理された試料でもよい。生物学的試料には、体液、例えば、血液、血漿、血清、脳脊髄液、滑液、尿および汗、組織および臓器試料が、これらから得られた処理済み試料を含めて含まれるが、これに限定されない。

#### 【0163】

一部の局面において、前記細胞が得られる、または単離される試料は血液もしくは血液由来試料であるか、アフェレーシスもしくは白血球搬出法による生成物であるか、またはこれから得られる。例示的な試料には、全血、末梢血単核球(PBMC)、白血球、骨髄、胸腺、組織生検材料、腫瘍、白血病、リンパ腫、リンパ節、消化管に関連するリンパ系組織、粘膜に関連するリンパ系組織、脾臓、他のリンパ系組織、肝臓、肺、胃、腸、結腸、腎臓、胰臓、乳房、骨、前立腺、子宮頸部、精巣、卵巣、扁桃腺、もしくは他の臓器、および/またはこれらに由来する細胞が含まれる。試料には、細胞療法、例えば、養子細胞療法の状況では、自己供給源および同種異系供給源に由来する試料が含まれる。

40

#### 【0164】

一部の態様において、前記細胞は細胞株、例えば、T細胞株に由来する。前記細胞は、一部の態様では、異種供給源から、例えば、マウス、ラット、非ヒト靈長類、およびブタ

50

から得られる。

【0165】

一部の態様において、前記細胞の単離には、1つまたは複数の調製工程および/または親和性に基づかない細胞分離工程が含まれる。一部の例では、例えば、望ましくない成分を除去するために、望ましい成分を濃縮するために、細胞を溶解するか、または特定の試薬に対して感受性のある細胞を除去するために、1種または複数種の試薬の存在下で細胞が洗浄、遠心分離、および/またはインキュベートされる。一部の例では、細胞は、密度、粘着性、サイズ、特定の成分に対する感受性および/または耐性などの1つまたは複数の特性に基づいて分離される。

【0166】

一部の例では、対象の循環血に由来する細胞は、例えば、アフェレーシスまたは白血球搬出法によって得られる。試料は、一部の局面では、T細胞、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球を含むリンパ球、赤血球、および/または血小板を含有し、一部の局面では、赤血球および血小板以外の細胞を含有する。

【0167】

一部の態様において、例えば、血漿画分を除去するために、および後の処理工程のために前記細胞を適切な緩衝液または培地に入れるために、対象から収集した血球は洗浄される。一部の態様において、前記細胞はリン酸緩衝食塩水 (PBS) で洗浄される。一部の態様において、洗浄溶液には、カルシウムおよび/もしくはマグネシウムならびに/または多くの、もしくは全ての二価カチオンが無い。一部の局面において、洗浄工程は半自動「フロースル」遠心機 (例えば、Cobe 2991 cell processor, Baxter) によって製造業者の説明書に従って成し遂げられる。一部の局面において、洗浄工程はタングジェント流 (tangential flow) 濾過 (TFF) によって製造業者の説明書に従って成し遂げられる。一部の態様において、洗浄後に、前記細胞は、様々な生体適合性緩衝液、例えば、 $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ を含まないPBSで再懸濁される。ある特定の態様において、血球試料の成分は除去され、前記細胞は培養培地に直接、再懸濁される。

【0168】

一部の態様において、前記方法には、密度に基づく細胞分離方法、例えば、赤血球溶解による末梢血からの白血球の調製、およびPercoll勾配またはFicoll勾配による遠心分離が含まれる。

【0169】

一部の態様において、単離方法には、細胞における、1種または複数種の特定の分子、例えば、表面マーカー、例えば、表面タンパク質、細胞内マーカー、または核酸の発現または存在に基づく様々な細胞タイプの分離が含まれる。一部の態様において、このようなマーカーに基づいて分離するための任意の公知の方法を使用することができる。一部の態様において、分離は親和性または免疫親和性に基づく分離である。例えば、単離は、一部の局面では、例えば、このようなマーカーに特異的に結合する抗体または結合パートナーとインキュベートし、その後に、一般的に洗浄工程を行い、抗体または結合パートナーに結合している細胞を、抗体または結合パートナーに結合していない細胞から分離することによって、1種または複数種のマーカー、典型的には細胞表面マーカーの細胞発現または発現レベルに基づいて細胞および細胞集団を分離することを含む。

【0170】

このような分離工程は、さらに使用するために、試薬に結合した細胞が保持される正の選択に基づいてもよく、および/または抗体または結合パートナーに結合していない細胞が保持される負の選択に基づいてもよい。一部の例では、さらに使用するために両画分とも保持される。一部の局面において、不均質な集団の中にある細胞タイプを特異的に特定する抗体が利用できない場合、望ましい集団以外の細胞によって発現されるマーカーに基づいて分離が最も良く行われるように、負の選択が特に有用な場合がある。

【0171】

分離によって、特定のマーカーを発現する特定の細胞集団または細胞が100%濃縮また

10

20

30

40

50

は除去される必要はない。例えば、特定のタイプの細胞、例えば、マーカーを発現する細胞の正の選択または濃縮とは、このような細胞の数またはパーセントが増加することを指すが、このマーカーを発現しない細胞が完全に無くなる必要はない。同様に、特定のタイプの細胞、例えば、マーカーを発現する細胞の負の選択、除去、または枯渇とは、このような細胞の数またはパーセントが減少することを指すが、このような細胞が全て完全に取り除かれる必要はない。

【0172】

一部の例では、複数回の分離工程が行われ、この場合、ある工程に由来する正に選択された画分または負に選択された画分は別の分離工程、例えば、後の正の選択または負の選択に供される。一部の例では、1回の分離工程で、例えば、それぞれが負の選択のために標的化されたマーカーに特異的な複数種の抗体または結合パートナーと細胞をインキュベートすることによって、同時に、複数種のマーカーを発現する細胞を枯渇させることができる。同様に、様々な細胞タイプの表面に発現している複数種の抗体または結合パートナーと細胞をインキュベートすることによって、複数の細胞タイプを同時に正に選択することができる。

【0173】

例えば、一部の局面において、特定のT細胞部分母集団、例えば、1種類もしくは複数種の表面マーカーが陽性の細胞または高レベルの1種類もしくは複数種の表面マーカーを発現する細胞、例えば、CD28<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>、CCR7<sup>+</sup>、CD27<sup>+</sup>、CD127<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD45RA<sup>+</sup>、および/またはCD45RO<sup>+</sup>T細胞が正の選択法または負の選択法によって単離される。

【0174】

例えば、CD3<sup>+</sup>、CD28<sup>+</sup>T細胞は、抗CD3/抗CD28結合磁気ビーズ（例えば、DYNABEADS（登録商標）M-450 CD3/CD28 T Cell Expander）を用いて正に選択することができる。

【0175】

一部の態様において、単離は、特定の細胞集団を正の選択によって濃縮することによって、または特定の細胞集団を負の選択によって枯渇させることによって行われる。一部の態様において、正の選択または負の選択は、それぞれ、正に選択された細胞または負に選択された細胞の表面に発現している1種類もしくは複数種の表面マーカー（マーカー<sup>+</sup>）または比較的高いレベルで発現している1種類もしくは複数種の表面マーカー（マーカー<sup>high</sup>）に特異的に結合する1種または複数種の抗体または他の結合作用物質と細胞をインキュベートすることによって成し遂げられる。

【0176】

一部の態様において、T細胞は、非T細胞、例えば、B細胞、单球、または他の白血球の表面に発現しているマーカー、例えば、CD14の負の選択によってPBMC試料から分離される。一部の局面において、CD4<sup>+</sup>ヘルパーおよびCD8<sup>+</sup>細胞傷害性T細胞を分離するために、CD4<sup>+</sup>選択工程またはCD8<sup>+</sup>選択工程が用いられる。このようなCD4<sup>+</sup>集団およびCD8<sup>+</sup>集団は、1つまたは複数のナイーブ、メモリー、および/またはエフェクターT細胞部分母集団の表面において発現しているか、または比較的多量に発現しているマーカーを対象にした正の選択または負の選択によって部分母集団にさらに選別することができる。

【0177】

一部の態様において、さらに、CD8<sup>+</sup>細胞は、ナイーブ、セントラルメモリー、エフェクターメモリー、および/またはセントラルメモリー幹細胞について、例えば、それぞれの部分母集団に関連する表面抗原に基づいた正の選択または負の選択によって濃縮または枯渇される。一部の態様において、効力を高めるために、例えば、長期生存、拡大、および/または投与後の生着を改善するために、セントラルメモリーティー（T<sub>CM</sub>）細胞の濃縮が行われる。一部の局面において、この効力は、このような部分母集団において特にロバストである。Terakura et al. (2012) Blood.1:72-82; Wang et al. (2012) J Immunother. 35 (9):689-701を参照されたい。一部の態様において、T<sub>CM</sub>が濃縮されたCD8<sup>+</sup>T細胞およびCD4<sup>+</sup>T細胞を組み合わせると効力がさらに高まる。

【0178】

10

20

30

40

50

態様において、メモリーT細胞は、CD8<sup>+</sup>末梢血リンパ球のCD62L<sup>+</sup>サブセットおよびCD62L-サブセットの両方に存在する。PBMCを、例えば、抗CD8抗体および抗CD62L抗体を用いて、CD62L-CD8<sup>+</sup>画分および/またはCD62L<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>画分について濃縮または枯渇させることができる。

#### 【0179】

一部の態様において、セントラルメモリーT(T<sub>CM</sub>)細胞の濃縮は、CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3、および/またはCD127の正の、または多量の表面発現に基づいている。一部の局面において、セントラルメモリーT(T<sub>CM</sub>)細胞の濃縮は、CD45RAおよび/またはグランザイムBを発現するか、または多量に発現する細胞を対象にした負の選択に基づいている。一部の局面において、T<sub>CM</sub>細胞が濃縮されたCD8<sup>+</sup>集団の単離は、CD4、CD14、CD45RAを発現する細胞の枯渇と、CD62Lを発現する細胞を対象にした正の選択または濃縮によって行われる。一局面において、セントラルメモリーT(T<sub>CM</sub>)細胞の濃縮は、CD4発現に基づいて選択された細胞の負の画分から開始して行われ、この画分は、CD14およびCD45RAの発現に基づく負の選択と、CD62Lに基づく正の選択に供される。このような選択は一部の局面では同時に行われ、他の局面では連続して、どちらの順序でも行われる。一部の局面において、CD4に基づく分離から正の画分および負の画分が両方とも保持され、この方法の後の工程において、任意で、1つまたは複数のさらなる正の選択工程または負の選択工程の後に用いられるように、CD8<sup>+</sup>細胞集団または部分母集団の調製において用いられた同じCD4発現に基づく選択工程が、CD4<sup>+</sup>細胞集団または部分母集団を作製するのにも用いられる。

10

20

#### 【0180】

特定の例では、PBMC試料または他の白血球試料はCD4<sup>+</sup>細胞の選択に供される。この場合、負の画分および正の画分が両方とも保持される。次いで、負の画分は、CD14およびCD45RAまたはCD19の発現に基づく負の選択と、セントラルメモリーT細胞に特徴的なマーカー、例えば、CD62LまたはCCR7に基づく正の選択に供される。この場合、正の選択および負の選択はどちらの順序でも行われる。

#### 【0181】

CD4<sup>+</sup>Tヘルパー細胞は、細胞表面抗原を有する細胞集団を特定することによってナイーブ細胞、セントラルメモリー細胞、およびエフェクター細胞に選別される。CD4<sup>+</sup>リンパ球は標準的な方法によって得ることができる。一部の態様において、ナイーブCD4<sup>+</sup>Tリンパ球は、CD45RO<sup>-</sup>、CD45RA<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>T細胞である。一部の態様において、セントラルメモリーCD4<sup>+</sup>細胞はCD62L<sup>+</sup>およびCD45RO<sup>+</sup>である。一部の態様において、エフェクターCD4<sup>+</sup>細胞はCD62L<sup>-</sup>およびCD45RO<sup>-</sup>である。

30

#### 【0182】

一例では、負の選択によってCD4<sup>+</sup>細胞を濃縮するために、モノクローナル抗体カクテルは、典型的には、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、およびCD8に対する抗体を含む。一部の態様において、正の選択および/または負の選択のために細胞の分離を可能にするために、抗体または結合パートナーは固体支持体またはマトリックス、例えば、磁気ビーズまたは常磁性ビーズに結合される。例えば、一部の態様において、前記細胞および細胞集団は、免疫磁気（または親和性磁気（affinitymagnetic））分離法を用いて分離または単離される（Methods in Molecular Medicine, vol. 58: Metastasis Research Protocols, Vol.2: Cell Behavior In Vitro and In Vivo, p 17-25 Edited by: S. A. Brooks and U. Schumacher（著作権）Humana Press Inc., Totowa, NJにおいて概説される）。

40

#### 【0183】

一部の局面において、分離しようとする細胞の試料または組成物は、小さな、磁化可能な、または磁気に反応する材料、例えば、磁気に反応する粒子または微粒子、例えば、常磁性ビーズ（例えば、DynalbeadsまたはMACSビーズ）とインキュベートされる。磁気に反応する材料、例えば、粒子は、一般的に、分離することが望ましい細胞または細胞集団、例えば、負に選択する、または正に選択することが望ましい細胞または細胞集団の表面に存在する分子、例えば、表面マーカーに特異的に結合する結合パートナー、例えば、抗体

50

に直接的または間接的に取り付けられる。

【0184】

一部の態様において、磁性粒子または磁気ビーズは、抗体または他の結合パートナーなどの特異的結合メンバーに結合される、磁気に反応する材料を含む。磁気分離方法において用いられる多くの周知の磁気に反応する材料がある。適切な磁性粒子には、参照により本明細書に組み入れられる、Molday, 米国特許第4,452,773号、および欧州特許明細書EP452342Bに記載の磁性粒子が含まれる。コロイドサイズの粒子、例えば、Owen 米国特許第4,795,698号およびLiberti et al., 米国特許第5,200,084号に記載のコロイドサイズの粒子が他の例である。

【0185】

インキュベーションは、一般的に、磁性粒子または磁気ビーズに取り付けられている、抗体または結合パートナーまたはこのような抗体もしくは結合パートナーに特異的に結合する分子、例えば、二次抗体もしくは他の試薬が、もし細胞表面分子が試料中の細胞の表面に存在すれば細胞表面分子に特異的に結合する条件下で行われる。

【0186】

一部の局面において、試料は磁場の中に置かれ、磁気に反応する粒子または磁化可能な粒子が取り付けられている細胞は磁石に引き付けられるか、非標識細胞から分離される。正の選択の場合、磁石に引き付けられた細胞が保持される。負の選択の場合、引き付けられなかった細胞（非標識細胞）が保持される。一部の局面において、同じ選択工程の間に正の選択と負の選択の組み合わせが行われ、正の画分および負の画分が保持され、さらに処理されるか、またはさらなる分離工程を受ける。

【0187】

ある特定の態様において、磁気に反応する粒子は一次抗体または他の結合パートナー、二次抗体、レクチン、酵素、もしくはストレプトアビジンでコーティングされる。ある特定の態様において、磁性粒子は、1種または複数種のマーカーに特異的な一次抗体のコーティングを介して細胞に取り付けられる。ある特定の態様において、前記細胞はビーズではなく、一次抗体または結合パートナーで標識され、次いで、細胞タイプ特異的な二次抗体または他の結合パートナー（例えば、ストレプトアビジン）でコーティングされた磁性粒子が添加される。ある特定の態様において、ストレプトアビジンでコーティングされた磁性粒子が、ビオチン化した一次抗体または二次抗体と一緒に用いられる。

【0188】

一部の態様において、後でインキュベート、培養、および/または操作される細胞に、磁気に反応する粒子を取り付けたままにしておく。一部の局面において、患者に投与するために、前記粒子を細胞に取り付けたままにしておく。一部の態様において、磁化可能な粒子または磁気に反応する粒子は細胞から取り除かれる。磁化可能な粒子を細胞から取り除くための方法は公知であり、例えば、競合する非標識競合抗体、磁化可能な粒子、または切断可能なリンカーと結合体化した抗体などの使用を含む。一部の態様において、磁化可能な粒子は生分解性である。

【0189】

一部の態様において、親和性に基づく選択は、磁気活性化細胞選別 (MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) を介した選択である。磁気活性化細胞選別 (MACS) システムは、磁化粒子が取り付けられている細胞を高純度で選択することができる。ある特定の態様において、MACSは、外部磁場が印加された後に、非標的種および標的種が連続して溶出されるモードで動作する。すなわち、取り付けられなかつた種が溶出される間に、磁化粒子に取り付けられた細胞は所定の位置に保たれる。次いで、この第1の溶出工程が完了した後に、磁場に閉じ込められ、溶出しないようにされていた種は、このような種が溶出および回収が可能なように何らかのやり方で遊離される。ある特定の態様において、非標的細胞は標識され、不均質な集団細胞から枯渇される。

【0190】

ある特定の態様において、単離または分離は、前記方法の単離工程、細胞調製工程、分

10

20

30

40

50

離工程、処理工程、インキュベーション工程、培養工程、および/または製剤化工程の1つまたは複数を行うシステム、装置、または器具を用いて行われる。一部の局面において、前記システムは、例えば、誤り、使用者の操作、および/または汚染を最小限にするために、これらの各工程を閉じた、または無菌の環境において行うのに用いられる。一例では、システムは、国際特許出願公開番号WO2009/072003またはUS20110003380A1に記載のシステムである。

#### 【0191】

一部の態様において、システムまたは器具は、統合システム型もしくは自立型システムにおいて、および/または自動的に、もしくはプログラム可能なやり方で、単離工程、処理工程、操作工程、および製剤化工程の1つまたは複数、例えば、全てを行う。一部の局面において、システムまたは器具は、使用者が、処理工程、単離工程、操作工程、および製剤化工程の様々な局面をプログラムする、制御する、そのアウトカムを評価する、および/または調整するのを可能にする、システムまたは器具と通信するコンピュータおよび/またはコンピュータプログラムを備える。

10

#### 【0192】

一部の局面において、例えば、閉じた無菌のシステムにおいて細胞を臨床規模レベルで自動分離するために、分離工程および/または他の工程はCliniMACSシステム (Miltenyi Biotec) を用いて行われる。構成要素には、内蔵型マイクロコンピュータ、磁気分離ユニット、蠕動ポンプ、および様々なピンチ弁が含まれる場合がある。内蔵型コンピュータは一部の局面では機器の全構成要素を制御し、反復手順を統一された順序で行うようにシステムを命令する。磁気分離ユニットは、一部の局面では、可動性の永久磁石および選択カラム用のホルダを備える。蠕動ポンプはチューブセット全体にわたる流速を制御し、ピンチ弁と一緒に、緩衝液がシステムを制御されて流れ、細胞が絶え間なく懸濁されるのを確かなものにする。

20

#### 【0193】

CliniMACSシステムは、一部の局面では、滅菌した非発熱性の溶液に溶解して供給される、抗体に結合した磁化可能な粒子を使用する。一部の態様において、細胞は磁性粒子で標識された後に、余分な粒子を除去するために洗浄される。次いで、細胞調製バッグがチューブセットに接続され、そして次にチューブセットは緩衝液含有バックおよび細胞収集バッグに接続される。チューブセットは、プレカラムおよび分離カラムを含む予め組み立てられた滅菌チューブからなり、使い捨て専用である。分離プログラムが開始した後に、システムは分離カラムに細胞試料を自動的にアプライする。標識された細胞はカラム内に保持されるのに対して、標識されなかった細胞は一連の洗浄工程によって除去される。一部の態様において、本明細書に記載の方法と共に使用するための細胞集団は標識されず、カラム内に保持されない。一部の態様において、本明細書に記載の方法と共に使用するための細胞集団は標識され、カラム内に保持される。一部の態様において、磁場が取り除かれた後に、本明細書に記載の方法と共に使用するための細胞集団はカラムから溶出され、細胞収集バッグ内に収集される。

30

#### 【0194】

ある特定の態様において、分離工程および/または他の工程はCliniMACS Prodigyシステム (Miltenyi Biotec) を用いて行われる。CliniMACS Prodigyシステムには、一部の局面では、細胞を自動洗浄し、遠心分離によって分画する細胞処理ユニット (cell processing unity) が付いている。CliniMACS Prodigyシステムはまた、内蔵カメラと、供給源の細胞産物の巨視的な層を識別することによって最適な細胞分画エンドポイントを決定する画像認識ソフトウェアも備えている場合がある。例えば、末梢血は赤血球、白血球、および血漿の層に自動的に分離される。CliniMACS Prodigyシステムはまた、細胞培養プロトコール、例えば、細胞分化および拡大、抗原添加、ならびに長期細胞培養を行う内臓型細胞発育チャンバーも備えている場合がある。インプットポートを用いると、培地を無菌的に取り出し、補充することができる。細胞は、内臓型顕微鏡を用いてモニタリングすることができる。例えば、Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35 (9) : 651-660, Terak

40

50

ura et al. (2012) Blood.1:72-82、およびWang et al. (2012) J Immunother. 35 (9) :689-701を参照されたい。

#### 【0195】

一部の態様において、本明細書に記載の細胞集団はフローサイトメトリーを介して収集および濃縮（または枯渇）される。フローサイトメトリーでは、複数種の細胞表面マーカーについて染色された細胞は流体の流れに入って運ばれる。一部の態様において、本明細書に記載の細胞集団は、分取スケール（preparative scale）（FACS）選別を介して収集および濃縮（または枯渇）される。ある特定の態様において、本明細書に記載の細胞集団は、FACSに基づく検出系と組み合わせて微小電気機械システム（MEMS）チップを用いることによって収集および濃縮（または枯渇）される（例えば、WO2010/033140, Cho et al. (2010) Lab Chip 10, 1567-1573; および Godin et al. (2008) J Biophoton. 1 (5) : 355-376を参照されたい）。どちらの場合でも、細胞は複数種のマーカーで標識することができ、それによって、詳細に明らかにされたT細胞サブセットを高純度で単離することが可能になる。

#### 【0196】

一部の態様において、正の選択および/または負の選択のために分離を容易にするために、抗体または結合パートナーは1種または複数種の検出可能なマーカーで標識される。例えば、分離は蛍光標識抗体との結合に基づいてもよい。一部の例では、1種または複数種の細胞表面マーカーに特異的な抗体または他の結合パートナーの結合に基づく細胞の分離は、流体の流れの中で、例えば、分取スケールFACSおよび/または微小電気機械システム（MEMS）チップを備える蛍光標識細胞分取（FACS）によって、例えば、フローサイトメトリー検出系と組み合わせて行われる。このような方法を用いると、複数種のマーカーに基づいて正の選択および負の選択を同時にを行うことができる。

#### 【0197】

一部の態様において、調製方法は、単離、インキュベーション、および/または操作の前または後に細胞を凍結、例えば、凍結保存するための工程を含む。一部の態様において、凍結工程およびその後の解凍工程によって、細胞集団の中にある顆粒球が取り除かれ、単球がある程度まで取り除かれる。一部の態様において、例えば、血漿および血小板を取り除く洗浄工程の後に、前記細胞は凍結溶液に懸濁される。様々な任意の公知の凍結溶液およびパラメータを一部の局面で使用することができる。一例は、20%DMSOおよび8%ヒト血清アルブミン（HSA）を含有するPBS、または他の適切な細胞凍結培地を使用することを伴う。次いで、DMSOおよびHSAの最終濃度がそれぞれ10%および4%になるように、これを培地で1:1に希釈する。次いで、細胞は通常、1分につき1°の速度で-80まで凍結され、液体窒素貯蔵タンクの気相の中で保管される。

#### 【0198】

一部の態様において、提供される方法は、発育工程、インキュベーション工程、培養工程、および/または遺伝子操作工程を含む。インキュベーションおよび/または操作は、培養容器、例えば、ユニット、チャンバー、ウェル、カラム、チューブ、チューブセット、弁、バイアル、培養皿、バック、または細胞を培養もしくは発育するための他の容器の中で行われてもよい。一部の態様において、前記細胞は遺伝子操作の前に、または遺伝子操作に関連してインキュベートおよび/または培養される。インキュベーション工程は、培養、発育、刺激、活性化、および/または増殖を含んでもよい。一部の態様において、前記組成物または細胞は刺激条件または刺激作用物質の存在下でインキュベートされる。このような条件は、遺伝子操作のために、例えば、組換え抗原受容体を導入するために、集団内の細胞の増殖、拡大、活性化、および/もしくは生存を誘導するように、（補助刺激有りまたは無しで）抗原曝露を模倣するように、ならびに/または細胞を初回刺激（prime）するように設計された条件を含む。

#### 【0199】

条件は、特定の培地、温度、酸素含有量、二酸化炭素含有量、時間、作用物質、例えば、栄養分、アミノ酸、抗生物質、イオン、および/または刺激因子、例えば、サイトカイ

10

20

30

40

50

ン、ケモカイン、抗原、結合パートナー、融合タンパク質、組換え可溶性受容体、ならびに細胞を活性化するように設計された他の任意の作用物質のうち1つまたは複数を含んでもよい。

#### 【0200】

一部の態様において、刺激条件または刺激作用物質には、TCR複合体の細胞内シグナル伝達ドメインを活性化することができる1種または複数種の作用物質、例えば、リガンドが含まれる。一部の局面において、この作用物質は、T細胞におけるTCR/CD3細胞内シグナル伝達カスケードをオンにするか、または開始する。このような作用物質には、例えば、ビーズなどの固体支持体に結合した、抗体、例えば、TCR成分および/もしくは補助刺激受容体に特異的な抗体、例えば、抗CD3、抗CD28、ならびに/または1種類もしくは複数種のサイトカインが含まれ得る。任意で、拡大方法は、抗CD3および/または抗CD28の抗体を(例えば、少なくとも約0.5ng/mlの濃度で)培養培地に添加する工程をさらに含んでもよい。一部の態様において、刺激作用物質には、IL-2および/またはIL-15、例えば、少なくとも約10単位/mLの濃度のIL-2が含まれる。

10

#### 【0201】

一部の局面において、インキュベーションは、Ridellらへの米国特許第6,040,177号、Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35 (9) : 651-660、Terakura et al. (2012) Blood. 1:72-82、および/またはWang et al. (2012) J Immunother. 35 (9) :689-701に記載の技法などの技法に従って行われる。

20

#### 【0202】

一部の態様において、T細胞は、(例えば、結果として生じた細胞集団が、拡大させようとする初期集団内でTリンパ球1個につき少なくとも約5個、10個、20個、もしくは40個またはそれより多いPBMCフィーダー細胞を含有するように)フィーダー細胞、例えば、非分裂末梢血単核球(PBMC)を培養開始組成物に添加し、培養物を(例えば、T細胞の数を増やすのに十分な時間にわたって)インキュベートすることによって拡大される。一部の局面において、非分裂フィーダー細胞は、線を照射したPBMCフィーダー細胞を含んでもよい。一部の態様において、細胞分裂を阻止するために、PBMCに約3000~3600ラドの範囲の線が照射される。一部の局面において、フィーダー細胞が培養培地に添加された後に、T細胞の集団が添加される。

30

#### 【0203】

一部の態様において、刺激条件は、ヒトTリンパ球の成長に適した温度、例えば、少なくとも約25°、一般的には少なくとも約30度、および一般的には37°または約37°を含む。任意で、インキュベーションは、フィーダー細胞として非分裂性のEBV形質転換リンパ芽球様細胞(LCL)を添加する工程をさらに含んでもよい。LCLに、約6000~10,000ラドの範囲の線を照射することができる。LCLフィーダー細胞は、一部の局面では、LCLフィーダー細胞と初回Tリンパ球との比が少なくとも約10:1などの任意の適切な量で提供される。

#### 【0204】

III. 遺伝子操作されたT細胞および操作された細胞が関与するPD-1およびPD-L1相互作用を調整するために、遺伝子発現を抑制するための方法

40

一部の態様において、遺伝子操作された細胞を調製する方法は、細胞における免疫阻害性分子(例えばPD-1またはPD-L1)の発現を低減するまたは低減することができる作用物質を導入する工程を含み、その導入は、CARなどのトランスジェニック受容体をコードする核酸の導入と同時にまたは逐次的に行うことができる。一部の態様では、前記作用物質を含むか、前記作用物質内に包含されるか、前記作用物質をコードする核酸分子が、細胞に導入される。遺伝子操作された(組換え)細胞表面受容体を含み、PD-1またはPD-L1などの免疫阻害性分子の発現が低減されているか、PD-1またはPD-L1などの免疫阻害性分子をコードする遺伝子が破壊されている細胞も提供される。一部の態様において、細胞は、免疫阻害性分子の発現を低減または抑制する作用物質、例えば阻害性核酸分子を含む。

#### 【0205】

50

一部の態様では、細胞内で、1つまたは複数の遺伝子の発現、活性、および/または機能が、抑制される。ここに提供される方法は、T細胞などの細胞において、例えばCAR発現T細胞において、遺伝子抑制をもたらす。一部の態様では、操作された細胞において遺伝子、例えば前記細胞による免疫応答を阻害する過程に関与する遺伝子を抑制および/または破壊することによって阻害効果を低減することができる作用物質を含有する、T細胞などの細胞、例えばCAR発現T細胞も提供される。一部の態様において、前記1つまたは複数の遺伝子は、PD-1および/またはPD-L1をコードする遺伝子を抑制した。一部の態様において、抑制される1つまたは複数の遺伝子は、PDCD1および/またはCD274である。

#### 【0206】

一部の態様において、遺伝子抑制は、遺伝子の破壊、例えばノックアウト、挿入、ミスセンス変異もしくはフレームシフト変異、例えば両アレルフレームシフト変異、遺伝子の全部または一部の欠失、例えば1つまたは複数のエクソンもしくはその部分の欠失、および/またはノックインなどを引き起こすことによって実行される。そのような破壊は、一部の態様において、ある遺伝子の配列またはその一部分の配列を標的とするように特別に設計された、配列特異的ヌクレアーゼまたは標的ヌクレアーゼ、例えばジンクフィンガヌクレアーゼ (ZFN) および転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) などのDNA結合標的ヌクレアーゼおよび遺伝子編集ヌクレアーゼ、ならびにCRISPR関連ヌクレアーゼ (Cas) などのRNAガイド型ヌクレアーゼを含む作用物質によって引き起こすことができる。一部の態様において、そのような配列特異的ヌクレアーゼまたは標的ヌクレアーゼは、阻害性核酸分子によってコードされる。一部の態様において、そのようなヌクレアーゼは、ガイドRNA (gRNA) などのDNA結合核酸分子によってガイドされ、またはターゲティングされうる。

#### 【0207】

一部の態様において、遺伝子抑制は、PD-1またはPD-L1などの免疫阻害性分子の発現の低減を引き起こすことによって実行される。一部の態様において、そのような遺伝子抑制は、前記遺伝子の発現を選択的に抑制または抑制するために使用することができる阻害性核酸分子を使って、例えばRNA干渉 (RNAi) 、短鎖干渉RNA (siRNA) 、短鎖ヘアピン (shRNA) 、マイクロRNA (miRNA) 、アンチセンスRNA、および/またはリボザイムによって、達成される。siRNA技術には、遺伝子から転写されるmRNAのヌクレオチド配列に相同な配列と前記ヌクレオチド配列に相補的な配列とを有する二本鎖RNA分子を利用するRNAiに基づくものが含まれる。siRNAは、一般に、遺伝子から転写されるmRNAの一領域に相同/相補的であるか、または異なる領域に相同/相補的である複数のRNA分子を含むsiRNAでありうる。一部の態様では、遺伝子抑制が、DNA結合核酸分子、例えばガイドRNA (gRNA) と、RNAガイド型ヌクレアーゼの変異体、例えば酵素的に不活性なCas9 (eCas9) タンパク質またはeCas9を含有する融合タンパク質とを使って達成される。一部の態様では、遺伝子抑制が、DNA結合標的タンパク質、例えばジンクフィンガタンパク質 (ZFP) またはZFPを含有する融合タンパク質によって達成される。

#### 【0208】

##### A. PD-1またはPD-L1発現の低減

一部の態様において、ここに提供される方法および細胞は、細胞におけるPD-1またはPD-L1の発現のノックダウン、例えば低減または抑制をもたらす。一部の態様において、前記ノックダウンは、一過性であることができ、例えば条件的である。一部の態様において、前記ノックダウンは非一過性、すなわち永続的である。

#### 【0209】

一部の態様において、PD-1またはPD-L1の発現のノックダウン、抑制または低減は、RNA干渉 (RNAi) によって達成する。一部の態様において、RNAiは、その標的核酸配列に対して配列特異的ホモロジーを有する二本鎖RNA (dsRNA) 分子によって媒介されうる (Caplen, N. J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:9742-9747 (2001) )。ショウジョウバエ (Drosophila) 無細胞溶解物における生化学的研究は、一部の態様において、RNA依存的遺伝子サイレンシングのメディエーターが21~25ヌクレオチドの「低分子干渉」RNA

10

20

20

30

30

40

50

二重鎖 ( siRNA ) であることを示している。 siRNA は、ダイサーとして公知の RNase 酵素による dsRNA のプロセシングに由来しうる ( Bernstein, E., et al., Nature 409:363-366 ( 2001 ) ) 。 siRNA 二重鎖産物は、 RNA 誘導サイレンシング複合体 ( RISC ) と呼ばれる多タンパク質 siRNA 複合体に動員されうる。一部の態様では、次に、 RISC は標的核酸 ( 好適には mRNA ) へのガイドを受けることができ、そこでは siRNA 二重鎖が配列特異的に相互作用することで開裂を触媒的に媒介する ( Bernstein, E., et al., Nature 409: 363-366 ( 2001 ) 、 Boutla, A., et al., Curr. Biol. 11:1776-1780 ( 2001 ) ) 。低分子干渉 RNA は、当技術分野において周知であり当業者であれば精通しているであろう手順に従って、合成し、使用することができる。低分子干渉 RNA は約 0 ~ 約 50 ヌクレオチド ( nt ) を含む。非限定的態様の例として、 siRNA は、約 5 ~ 約 40nt 、約 5 ~ 約 30nt 、約 10 ~ 約 30nt 、約 15 ~ 約 25nt 、または約 20 ~ 25 ヌクレオチドを含みうる。 10

#### 【 0210 】

一部の態様において、 RNA 干渉作用物質は、 RNAi 機序によって遺伝子発現の阻害を媒介することが当技術分野において公知である分子に特有の構造、または互いにハイブリダイズしてそのような構造を形成する少なくとも部分的に相補的な部分を含む RNA 鎖を有する、少なくとも部分的に二本鎖の RNA である。 RNA が互いにハイブリダイズする相補的領域を含む場合、その RNA は自己ハイブリダイズすると言われるであろう。一部の態様において、阻害性核酸、例えば RNA 干渉作用物質は、標的遺伝子に対して実質的に相補的な部分を含む。一部の態様において、 RNA 干渉作用物質は、任意で、 1 つまたは複数のヌクレオチド類似体またはヌクレオチド修飾を含む。 RNAi 作用物質がリボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、修飾ヌクレオチドまたは修飾バックボーンなどを含みうることは、当業者にはわかるであろう。一部の態様において、 RNA 干渉作用物質は、転写後に修飾されうる。一部の態様において、 RNA 干渉作用物質は、ハイブリダイズまたは自己ハイブリダイズすることにより、約 15 ~ 29 ヌクレオチド長の二重鎖部分を含み、任意で、二重鎖内に 1 つまたは複数のミスマッチまたは不対合ヌクレオチドを有する構造を形成する、 1 つまたは複数の鎖を含む。一部の態様において、 RNA 干渉作用物質は、短鎖干渉 RNA ( siRNA ) 、短鎖ヘアピン RNA ( shRNA ) 、および細胞内でプロセシングされて shRNA を生成しうる他の RNA 種、例えば限定するわけではないが、天然の miRNA 前駆体と同一な RNA 種、または設計された miRNA 様 RNA の前駆体を含む。 20

#### 【 0211 】

一部の態様において、「短鎖干渉 RNA 」 ( siRNA ) という用語は、約 15 ~ 29 ヌクレオチド長の二本鎖部分を含み、任意で、どちらか一方の鎖または両方の鎖に一本鎖オーバーハング ( 例えば 1 ~ 6 ヌクレオチド長 ) をさらに含む、核酸を指す。一部の態様において、二本鎖部分は 17 ~ 21 ヌクレオチド長、例えば 19 ヌクレオチド長でありうる。一部の態様において、オーバーハングは各鎖の 3' 端に存在し、 2 ヌクレオチド長であることができ、 DNA またはヌクレオチド類似体で構成されうる。 siRNA は、互いにハイブリダイズする 2 本の RNA 鎖から形成されうるか、あるいはより長い二本鎖 RNA から、または自己ハイブリダイズ部分を含む一本の RNA 鎖、例えば短鎖ヘアピン RNA から、作製されうる。 1 つまたは複数のミスマッチまたは不対合ヌクレオチドが 2 本の siRNA 鎖によって形成される二重鎖中に存在しうることは、当業者には理解されるであろう。一部の態様において、 siRNA の一方の鎖 ( 「アンチセンス」 鎖または「ガイド」 鎖 ) は、標的核酸、例えば mRNA 転写産物とハイブリダイズする部分を含む。一部の態様において、アンチセンス鎖は、標的に対して、約 15 ~ 29 ヌクレオチド、時には 17 ~ 21 ヌクレオチド、例えば 19 ヌクレオチドにわたって完全に相補的である、つまり、 siRNA はこの長さにわたって、ただ一つのミスマッチもなく標的転写産物にハイブリダイズする。ただし、 siRNA 鎖と標的転写産物との間に形成される二重鎖中に、 1 つまたは複数のミスマッチまたは不対合ヌクレオチドが存在しうることは、当業者には理解されるであろう。 40

#### 【 0212 】

一部の態様において、 PD-L1 および / または PD-1 発現は、 PD-L1 または PD-1 をコードする核酸を標的とする低分子ヘアピン RNA ( shRNA ) を使って、低減または抑制される。一部の 50

態様において、短鎖ヘアピンRNA（shRNA）は、RNAiを媒介するのに十分な長さ（典型的には15～29ヌクレオチド長）の二重鎖構造を形成するようにハイブリダイズしているか、そのようにハイブリダイズすることができる、少なくとも2つの相補的部分と、二重鎖を形成する前記2つの配列の端をつなぐループを形成する典型的には約1～10ヌクレオチド長の少なくとも1つの一本鎖部分とを含む核酸分子である。一部の態様において、前記構造はオーバーハンギングをさらに含みうる。所与の標的遺伝子をノックダウンするための適切なshRNA配列は、当技術分野において周知であるか、当業者によってすぐに決定されうる。

#### 【0213】

一部の態様において、shRNAの自己相補的部分のハイブリダイゼーションによって形成される二重鎖は、siRNAのそれと類似する性質を有することができ、後述のように、shRNAは、保存された細胞RNAi機構によってsiRNAにプロセシングされうる。したがってshRNAはsiRNAの前駆体であることができ、標的転写産物の発現を同様に阻害することができうる。一部の態様において、shRNAは、標的核酸、例えばmRNA転写産物とハイブリダイズする部分を含み、標的に対し、約15～29ヌクレオチド、時には17～21ヌクレオチド、例えば19ヌクレオチドにわたって、完全に相補的でありうる。しかし、shRNA鎖と標的転写産物との間に形成される二重鎖中に1つまたは複数のミスマッチまたは不対合ヌクレオチドが存在しうることは、当業者には理解されるであろう。

#### 【0214】

一部の態様において、shRNAは、A-B-CまたはC-B-Aという構造のヌクレオチド（例えばDNA）配列を含む。一部の態様において、このカセットは、少なくとも2つのDNAセグメントAおよびCまたはCおよびAを含み、ここでは該少なくとも2つのセグメントのそれぞれが上に定義した別個のプロモーター（例えば誘導性U6、H1などを含むPol IIIプロモーター）の制御下にある。上記のセグメントにおいて、Aは、ノックダウンしようとする遺伝子（例えばPD-L1またはPD-1）に対して少なくとも90%相補的、または100%相補的である15～35bpまたは19～29bpのDNA配列であることができ、Bは、発現したRNAヘアピン分子のループを形成する5～9bpを有するスペーサーDNA配列であることができ、Cは、配列Aに対して少なくとも85%相補的な15～35または19～29bpのDNA配列であることができる。

#### 【0215】

一部の態様において、RNA干渉作用物質は、（1）そのRNAi作用物質が、転写産物に対して、約15～29ヌクレオチド長の領域、例えば少なくとも約15、約17、約18、または約19ヌクレオチド長の領域にわたって、少なくとも約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または約100%相補的である部分、例えば鎖を含み、かつ/または（2）RNAi作用物質の一方の鎖の一続きの15ヌクレオチドと転写産物の15ヌクレオチド部分とによって形成される二重鎖のTmが、哺乳動物細胞の細胞質内または核内に通例見いだされる条件（温度を除く）下で、RNA干渉作用物質の同じ15ヌクレオチドとその正確な相補体とによって形成されるであろう二重鎖のTmを、約15を超えて下回らず、または約10を超えて下回らず、かつ/または（3）転写産物の安定性が当該RNA干渉作用物質の存在下でそれが存在しない場合と比較して低減されるのであれば、転写産物およびその転写産物をコードする遺伝子に「標的化」されているとみなされる。一部の態様において、転写産物に標的化されたRNA干渉作用物質は、その転写産物をコードし、その合成を指示する遺伝子に標的化されているとみなすこともできる。一部の態様において、標的領域は、標的転写産物のうち、RNA干渉作用物質のアンチセンス鎖とハイブリダイズする領域であることができる。一部の態様において、標的転写産物は、RNA干渉による阻害の標的である任意のRNAであることができる。

#### 【0216】

一部の態様において、siRNAは、PD-L1および/またはPD-1の発現を選択的に抑制する。加えて、siRNAのヌクレオチド配列のすべてがPD-L1および/またはPD-1のmRNAのヌクレオチド配列に由来するか、またはその一部が前記ヌクレオチド配列に由来しうる。

#### 【0217】

一部の態様において、siRNAはリボヌクレオチドから構成されうる。そして、その一部

10

20

30

40

50

は、リボヌクレオチド以外のヌクレオチド、例えばデオキシリボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドの誘導体、リボヌクレオチドの誘導体などを含みうる。siRNAは、公知の化学合成法によって合成することができるが、その方法は特には制限されない。一部の態様では、適切なテンプレート核酸を使って、siRNAを酵素的に（例えばRNAポリメラーゼを使って）調製しうる。一部の態様において、siRNAは、分子中に二重鎖を形成することができる一本鎖RNA、およびシステムとしてのsiRNA部分とループとしての任意配列とを有するシステム-ループ構造（短鎖ヘアピン構造：sh構造）を持つ一本鎖RNA（shRNA）の形態をとりうる。一部の態様では、1~30ヌクレオチド、1~25ヌクレオチド、または5~22ヌクレオチドの配列を前記任意配列として使用することができる。

#### 【0218】

10

siRNAの配列は、発現を抑制することが望まれる遺伝子配列に基づいて、適当に設計することができる。多くのsiRNA設計アルゴリズムが報告されており（例えばWO 2004/04555 43およびWO 2004/048566参照）、市販のソフトウェアを使用することもできる。加えて、発現を抑制することが望まれる遺伝子配列の情報からsiRNAを設計し、そのsiRNAを合成し、提供する会社が数多くある。それゆえに、当業者は、発現を抑制することが望まれる遺伝子配列に基づいて、容易にsiRNAを得ることができる。一部の態様では、PD-L1および/またはPD-1の発現を選択的に抑制する任意のsiRNAを、作製または使用することができる。例えば、PD-L1には、SEQ ID NO:1~5のいずれかのヌクレオチド配列を含むsiRNAを使用することができ、PD-1にはSEQ ID NO:6のヌクレオチド配列を含むsiRNAを使用することができる。PD-L1に対する例示的siRNA配列は他にも、参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第20140148497号に見いだすことができる。

#### 【0219】

20

一部の態様において、shRNAおよびsiRNAセグメントは、停止および/またはポリアデニル化配列をさらに含みうる。

#### 【0220】

30

一部の態様では、PD-L1および/またはPD-1の発現を抑制するために、アンチセンスヌクレオチドを使用することができる。一部の態様では、タンパク質の発現を、例えばPD-L1および/またはPD-1PD-1のmRNA分子の翻訳に直接干渉することによって、またはRNA分解酵素HによるmRNAの分解によって、またはmRNAの5'キャッピングに干渉することによって、または5'キャップをマスキングすることによって、または翻訳因子とmRNAとの結合を妨げることによって、またはmRNAのポリアデニル化を阻害することによって抑制するために、アンチセンスヌクレオチドを使用することができる。一部の態様において、タンパク質の発現の抑制は、アンチセンスヌクレオチドとPD-L1および/またはPD-1のmRNAとの間のハイブリダイゼーションによって起こりうる。一部の態様では、mRNAの安定性を低減するためまたはmRNAを分解するために、mRNA上の特異的標的部位が、アンチセンスヌクレオチドの標的として選択される。一部の態様において、1つまたは複数の標的部位が同定されたら、それら標的部位と十分に相補的な（すなわち、生理的条件下で十分な特異性で十分にハイブリダイズする）ヌクレオチド配列を有するヌクレオチドを設計することができる。一部の態様において、アンチセンスヌクレオチドは、例えば8~100ヌクレオチド、10~80ヌクレオチド、または14~35ヌクレオチドの鎖長を有することができる。

#### 【0221】

40

一部の態様において、細胞への導入または送達方法は、遺伝子操作された抗原受容体をコードする核酸の細胞への導入に関して上述した方法と同じ方法または類似する方法であることができる。一部の態様において、細胞、例えばT細胞における、shRNAまたはsiRNAなどの阻害性核酸の発現は、従来の任意の発現系、例えばレンチウイルス発現系を使って達成することができる。一部の態様において、RNAはウイルスベクターの一成分であることができる。一部の態様において、ウイルスベクターは、PD-1またはPD-L1の発現を阻害するオリゴヌクレオチドを含むか、そのような能力を有するshRNAまたは他の阻害性核酸をコードする。一部の態様において、ウイルスベクターはレンチウイルスベクターである。一部の態様において、レンチウイルスベクターは組込み型レンチウイルスベクターであ

50

る。

#### 【0222】

一部の態様において、適切なプロモーターには、例えば、限定するわけではないが、(ヒトおよびマウス)U6プロモーター、(ヒトおよびマウス)H1プロモーター、ならびに(ヒトおよびマウス)7SKプロモーターを含む、RNAポリメラーゼ(pol)IIIプロモーターがある。一部の態様において、例えば相異なるタイプのRNAポリメラーゼ(pol)IIIプロモーターに由来するエレメントを含有するハイブリッドプロモーターも調製することができる。一部の態様において、所望の一組の条件下でまたは特異的背景において転写を引き起こすために、当業者は、2つ以上の天然プロモーター配列に由来する配列エレメントを含有する修飾プロモーターを組み合わせることができる。例えばヒトおよびマウスU6 RNAポリメラーゼ(pol)IIIおよびH1 RNA pol IIIプロモーターは、詳しく特徴づけられている。当業者は、1つまたは複数の遺伝子の発現の調整が最適化されるように、所望の応用および細胞タイプにとって最も有効なプロモーターを選択し、かつ/または修飾することができるであろう。一部の態様において、プロモーター配列は、それが真核細胞において、例えば哺乳動物細胞などにおいて機能する限り、自然界に存在しないものであることができる。10

#### 【0223】

一部の態様において、例示的な送達媒体はナノ粒子、例えばリポソーム、または他の適切なサブミクロンサイズの送達系である。一部の態様では、細胞に核酸を導入するために、脂質製剤を使用することが考えられる。脂質粒子は、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、および任意で、粒子の凝集を防止する複合脂質から形成されうる核酸-脂質粒子であることができる。核酸は粒子の脂質部分に封入されることができ、それにより、核酸は酵素分解から保護される。安定な核酸-脂質粒子は、脂質(例えばカチオン性脂質、非カチオン性脂質、および任意で、粒子の凝集を防止する複合脂質)でできていて、核酸が脂質内に完全に封入されている粒子であることができる。20

#### 【0224】

一部の態様において、脂質粒子は、約30nm～約150nm、約40nm～約150nm、約50nm～約150nm、約60nm～約130nm、約70nm～約110nm、約70nm～約100nm、約80nm～約100nm、約90nm～約100nm、約70～約90nm、約80nm～約90nm、約70nm～約80nm、または約30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm、120nm、125nm、130nm、135nm、140nm、145nm、もしくは150nmの平均直径を有する。一部の態様において、脂質粒子は実質的に非毒性である。一部の態様において、核酸は、本発明の脂質粒子中に存在する場合には、水溶液状態で、ヌクレアーゼによる分解に対して耐性であることができる。30

#### 【0225】

一部の態様において、脂質粒子は、完全に封入された、もしくは部分的に封入された、またはその両者である核酸を提供する。一部の態様では、核酸が、脂質粒子中に完全に封入されて、核酸-脂質粒子を形成する。

#### 【0226】

一部の態様において、ポリエチレングリコール(PEG)-脂質コンジュゲート、例えばジアルキルオキシプロピルにカップリングされたPEG(例えばPEG-DAAコンジュゲート)、ジアシルグリセロールにカップリングされたPEG(例えばPEG-DAGコンジュゲート)、コレステロールにカップリングされたPEG、ホスファチジルエタノールアミンにカップリングされたPEG、およびセラミドにコンジュゲートされたPEG、カチオン性PEG脂質、ポリオキサゾリン(POZ)-脂質コンジュゲート(例えばPOZ-DAAコンジュゲート、ポリアミドオリゴマー(例えばATTA-脂質コンジュゲート)、およびそれらの混合物などの複合脂質は、脂質粒子の凝集を阻害する。一部の態様では、PEGまたはPOZを脂質に直接コンジュゲートするか、リンカー部分を介して脂質に連結することができる。例えば非エステル含有リンカー部分およびエステル含有リンカー部分など、PEGまたはPOZを脂質にカップリングするのに適した任意のリンカー部分を使用することができる。一部の態様では、アミドまたは力4050

ルバメートなどの非エステル含有リンカー部分が使用される。

【0227】

一部の態様において、両親媒性脂質は、疎水相に配向する疎水性部分と、水相に向かって配向する親水性部分とを有することができる。一部の態様において、親水性特徴は、糖質、リン酸基、カルボキシル基、硫酸基、アミノ基、スルフィドリル基、ニトロ基、ヒドロキシル基などの極性基または荷電基の存在に由来する。一部の態様において、疎水性は、限定するわけではないが長鎖飽和および不飽和脂肪族炭化水素基ならびに1つまたは複数の芳香族、シクロ脂肪族、または複素環式基によって置換されたそのような基を含む無極性基の組み入れによって付与されうる。両親媒性化合物の例としては、リン脂質、アミノ脂質、およびスフィンゴリピドが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

10

【0228】

リン脂質の代表例には、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸、パルミトイールオレオイルホスファチジルコリン、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイールホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、およびジリノレオイルホスファチジルコリンなどがあるが、それらに限定されるわけではない。リンを欠く他の化合物、例えばスフィンゴリピド、グリコスフィンゴリピドファミリー、ジアシルグリセロール、および(3-アシルオキシ酸も、両親媒性脂質と呼ばれるグループに含まれる。加えて、上述の両親媒性脂質を、トリグリセリドおよびステロールを含む他の脂質と混合することもできる。

20

【0229】

一部の態様において、中性脂質は、選択したpHにおいて、非荷電または中性の両性イオン型で存在する。一部の態様では、生理的pHにおいて、そのような脂質には、例えばジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、セラミド、スフィンゴミエリン、セファリン、コレステロール、セレブロシド、およびジアシルグリセロールがある。

【0230】

一部の態様において、非カチオン性脂質は、任意の両親媒性脂質ならびに他の任意の中性脂質またはアニオン性脂質でありうる。

【0231】

30

一部の態様において、アニオン性脂質は生理的pHにおいて負に荷電している。これらの脂質には、ホスファチジルグリセロール、カルジオリピン、ジアシルホスファチジルセリン、ジアシルホスファチジン酸、N-ドデカノイルホスファチジルエタノールアミン、N-スクシニルホスファチジルエタノールアミン、N-グルタリルホスファチジルエタノールアミン、リジルホスファチジルグリセロール、パルミトイールオレオイルホスファチジルグリセロール(POPG)、および中性脂質に取り付けられた他のアニオン性修飾基があるが、それらに限定されるわけではない。

【0232】

一部の態様において、疎水性脂質は、限定するわけではないが、長鎖飽和および不飽和脂肪族炭化水素基、ならびに1つまたは複数の芳香族、シクロ脂肪族、または複素環式基で置換されていてもよいそのような基を含む、無極性基を有する。適切な例には、ジアシルグリセロール、ジアルキルグリセロール、N,N-ジアルキルアミノ、1,2-ジアシルオキシ-3-アミノプロパン、および1,2-ジアルキル-3-アミノプロパンがあるが、それらに限定されるわけではない。一部の態様において、核酸-脂質粒子は、(a)核酸(例えば干渉RNA)、(b)粒子中に存在する全脂質の約50モル%～約65モル%を占めるカチオン性脂質、(c)粒子中に存在する全脂質の約25モル%～約45モル%を占める非カチオン性脂質、および(d)粒子中に存在する全脂質の約5モル%～約10モル%を占める、粒子の凝集を阻害する複合脂質を含む。

40

【0233】

一部の態様において、核酸-脂質粒子は、(a)核酸(例えば干渉RNA)、(b)粒子中に

50

存在する全脂質の約50モル%～約60モル%を占めるカチオン性脂質、(c)粒子中に存在する全脂質の約35モル%～約45モル%を占める、リン脂質とコレステロールまたはその誘導体との混合物、および(d)粒子中に存在する全脂質の約5モル%～約10モル%を占めるPEG-脂質コンジュゲートを含む。

#### 【0234】

一部の態様において、核酸-脂質粒子は、(a)核酸(例えば干渉RNA)、(b)粒子中に存在する全脂質の約55モル%～約65モル%を占めるカチオン性脂質、(c)粒子中に存在する全脂質の約30モル%～約40モル%を占めるコレステロールまたはその誘導体、および(d)粒子中に存在する全脂質の約5モル%～約10モル%を占めるPEG-脂質コンジュゲートを含む。一部の態様では、PD-L1および/またはPD-1の発現をノックダウンする、例えば低減または抑制するために、CRISPR/Cas系を使用することができる(例えばW02015/161276参照)。CRISPR/Cas系の例示的特徴を以下に説明するが、これは、ある分子をコードする遺伝子を破壊するのでも欠失させるのでもなく、酵素的に不活性なスクレアーゼを使用することによって、ある分子の発現の低減または抑制における使用に適合させることができる。一部の態様では、PD-L1もしくはPD-1をコードする遺伝子、例えばCD274もしくはPDCD1遺伝子、またはプロモーター、エンハンサーもしくは他のシス作用性もしくはトランス作用性調節領域を標的とするガイドRNA(gRNA)を、前記遺伝子の発現を抑制するために、例えば前記遺伝子をノックダウンするために、修飾Cas9タンパク質または修飾Cas9タンパク質を含有する融合タンパク質と組み合わせて導入することができる。一部の態様において、Cas9分子は、Cas9分子を不活性にする変異、例えば点変異、例えばCas9分子の開裂活性を排除するか実質的に低減する変異を含む、酵素的に不活性なCas9(eiCas9)分子である。一部の態様では、eiCas9分子が、転写アクチベーターまたはリプレッサータンパク質に直接または間接的に融合される。

#### 【0235】

一部の態様では、PDCD1またはCD274の発現をノックダウンするために、PDCD1遺伝子またはCD274遺伝子のプロモーター領域を標的とする。標的ノックダウンアプローチは、機能的なPDCD1遺伝子産物またはCD274遺伝子産物の発現を低減または排除する。一部の態様において、標的ノックダウンは、転写を改変するために、例えばPDCD1および/またはCD274遺伝子の転写を遮断、低減、干渉、または減少させるために、酵素的に不活性なCas9(eiCas9)、または転写リプレッサードメインもしくはクロマチン修飾タンパク質に融合されたeiCas9をターゲティングすることによって媒介される。PDCD1遺伝子またはCD274遺伝子またはその近くにある標的配列を標的とするgRNAは、eiCas9またはeiCas9融合タンパク質の標的となるのであれば、PD-1またはPD-L1などの機能的なPDCD1遺伝子産物またはCD274遺伝子産物の発現の低減または排除をもたらす。一部の態様では転写が低減または排除される。

#### 【0236】

一部の態様において、gRNA分子の標的化ドメインは、酵素的に不活性なCas9(eiCas9)またはeiCas9融合タンパク質(例えば転写リプレッサードメインに融合されたeiCas9)を、ゲノム中の標的配列の十分近くにターゲティングして、PDCD1遺伝子またはCD274遺伝子の発現を低減し、減少させ、または抑制するように構成される。一部の態様では、PDCD1遺伝子またはCD274遺伝子の転写を改変するために、例えばPDCD1遺伝子またはCD274遺伝子の転写を遮断、低減、干渉、または減少させるために、eiCas9が転写リプレッサードメインまたはクロマチン修飾タンパク質に融合される。一部の態様において、1つまたは複数の内在性転写因子の結合を遮断するために、1つまたは複数のeiCas9を使用することができる。別の一態様では、eiCas9をクロマチン修飾タンパク質に融合することができる。クロマチン状態の改変は標的遺伝子の発現の減少をもたらし、1つまたは複数のクロマチン修飾タンパク質に融合された1つまたは複数のeiCas9を使って、クロマチン状態を改変することができる。

#### 【0237】

一部の態様において、標的化ドメインは、転写開始、1つまたは複数の転写エンハンサ

10

20

30

40

50

ーもしくはアクチベーターの結合、および/またはRNAポリメラーゼを遮断するために、PD CD1遺伝子またはCD274遺伝子のプロモーター領域を標的とするように構成される。1つまたは複数のgRNAを使って、eICas9をPDCD1遺伝子および/またはCD274遺伝子のプロモーター領域にターゲティングすることができる。一部の態様では、PDCD1および/またはCD274の1つまたは複数の領域を標的とすることができます。

#### 【0238】

一部の態様において、PD-L1またはPD-1標的化CRISPR gRNAと酵素的に不活性なヌクレアーゼ、例えばiCas9またはeICas9融合タンパク質との複合体は、CRISPR/Cas系に関連して後述するものを含む当業者に公知の方法によって、細胞に導入することができる。一部の態様では、CRISPR gRNAおよび酵素的に不活性なヌクレアーゼ、例えばiCas9またはeICas9融合タンパク質が、例えはリボ核タンパク質複合体（RNP）複合体の一過性の導入などによって、細胞に一過性に導入される。一部の態様では、gRNAおよび/またはeICas9をコードする核酸分子が、従来の任意の発現系、例えはレンチウイルス発現系を使って、細胞に導入される。一部の態様において、細胞への導入または送達方法は、細胞へのリボ核タンパク質（RNP）複合体などの核酸-タンパク質複合体の導入について後述する方法と同じ方法または類似する方法でありうる。

#### 【0239】

一部の態様において、遺伝子ノックダウンは、PD-L1またはPD-1をコードする遺伝子を標的とするDNA結合標的タンパク質、例えはジンクフィンガータンパク質（ZFP）またはZFPを含有する融合タンパク質によって達成される。一部の態様において、ZFPなどのDNA結合タンパク質は、標的遺伝子の発現に干渉することまたは標的遺伝子の発現を阻害することによって、標的遺伝子抑制を引き起こすことができる。ZFPなどのDNA結合タンパク質の例示的特徴を以下に説明するが、これは、ある分子をコードする遺伝子を破壊するのでも欠失させるのでもなく、エフェクタータンパク質（例えはジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）などのエンドヌクレアーゼ）なしでの導入によって、ある分子の発現の低減または抑制における使用に適合させることができる。

#### 【0240】

##### B. PD-1発現またはPD-L1発現のノックアウト

一部の局面では、PD-1および/またはPD-L1をコードする遺伝子、例えはPDCD1および/またはCD274のノックアウト、例えは破壊が、遺伝子編集により、例えは破壊の標的となる領域で遺伝子に特異的に結合またはハイブリダイズするDNA結合タンパク質またはDNA結合核酸を使って、実行される。一部の局面では、タンパク質または核酸が、例えはキメラタンパク質または融合タンパク質として、遺伝子編集ヌクレアーゼとカップリングまたは複合体化される。例えは一部の態様において、破壊は、破壊される遺伝子に特異的な、DNA標的化タンパク質とヌクレアーゼとを含む融合物、例えはジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）もしくはTALエフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、またはRNAガイド型ヌクレアーゼ、例えはクラスター化して規則的な配置の短い回文配列核酸（CRISPR）-Cas系、例えはCRISPR-Cas9系を使って達成される。一部の態様において、遺伝子編集は、PD-1および/またはPD-L1をコードする遺伝子、例えはPDCD1および/またはCD274の、ゲノム破壊またはノックアウトをもたらす。

#### 【0241】

一部の態様において、抑制は、前記遺伝子に特異的に結合またはハイブリダイズする、DNA標的化分子、例えはDNA結合タンパク質もしくはDNA結合核酸、またはそれを含有する複合体、化合物、もしくは組成物を使って達成される。一部の態様において、DNA標的化分子は、DNA結合ドメイン、例えはジンクフィンガータンパク質（ZFP）DNA結合ドメイン、転写アクチベーター様タンパク質（TAL）もしくはTALエフェクター（TALE）DNA結合ドメイン、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（CRISPR）DNA結合ドメイン、またはメガヌクレアーゼ由来のDNA結合ドメインを含む。

#### 【0242】

ジンクフィンガー、TALE、およびCRISPR系の結合ドメインは、例えは天然のジンクフィ

10

20

30

40

50

ンガータンパク質またはTALEタンパク質の認識ヘリックス領域の操作（1つまたは複数のアミノ酸の改変）によって、予め決定されたヌクレオチド配列に結合するように操作することができる。操作されたDNA結合タンパク質（ジンクフィンガーまたはTALE）は、非天然のタンパク質である。設計のための合理的基準には、置換規則、ならびに既存のZFPおよび/またはTALE設計の情報と結合データとが格納されているデータベース中の情報を処理するためのコンピュータアルゴリズムの応用が含まれる。例えば米国特許第6,140,081号、同第6,453,242号、および同第6,534,261号を参照されたい。また、WO 98/53058、WO 98/53059、WO 98/53060、WO 02/016536およびWO 03/016496、ならびに米国公開第20110301073号およびUS20140120622も参照されたい。

## 【0243】

10

一部の態様において、前記DNA標的化分子、複合体、または組み合わせは、DNA結合分子と、1つまたは複数の追加ドメイン、例えば遺伝子の抑制または破壊を容易にするためのエフェクタードメインとを含有する。例えば一部の態様において、遺伝子破壊または遺伝子抑制は、DNA結合タンパク質と異種調節ドメインまたはその機能的フラグメントとを含む融合タンパク質によって実行される。一部の局面において、ドメインは、例えば転写因子ドメイン、例えばアクチベーター、リプレッサー、コアクチベーター、コリプレッサー、サイレンサー、がん遺伝子、DNA修復酵素ならびにそれらの関連因子および修飾因子、DNA再編成酵素ならびにそれらの関連因子および修飾因子、クロマチン関連タンパク質およびそれらの修飾因子、例えばキナーゼ、アセチラーゼおよびデアセチラーゼ、ならびにDNA修飾酵素、例えばメチルトランスフェラーゼ、トポイソメラーゼ、ヘリカーゼ、リガーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、ポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼ、ならびにそれらの関連因子および修飾因子を含む。DNA結合ドメインとヌクレアーゼ開裂ドメインとの融合物に関する詳細については、例えば参考によりその全体が本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第20050064474号、同第20060188987号および同第2007/0218528号を参照されたい。一部の局面において、追加ドメインはヌクレアーゼドメインである。したがって一部の態様において、遺伝子破壊は、遺伝子編集またはゲノム編集により、操作されたタンパク質、例えば遺伝子編集ヌクレアーゼ、およびヌクレアーゼなどの非特異的DNA開裂分子に融合されたまたは非特異的DNA開裂分子との複合体を形成している配列特異的DNA結合ドメインから構成される遺伝子編集ヌクレアーゼ含有複合体または遺伝子編集ヌクレアーゼ含有融合タンパク質を使って促進される。

20

## 【0244】

30

一部の局面において、これらの標的キメラヌクレアーゼまたはヌクレアーゼ含有複合体は、標的二本鎖切断または一本鎖切断を誘発し、エラーブローン非相同末端結合（NHEJ）および相同組換え修復（HDR）を含む細胞DNA修復機構を刺激することによって、精密な遺伝子修飾を行う。一部の態様において、ヌクレアーゼはエンドヌクレアーゼ、例えばジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、TALEヌクレアーゼ（TALEN）、RNAガイド型エンドヌクレアーゼ（RGEN）、例えばCRISPR関連（Cas）タンパク質、またはメガヌクレアーゼである。

## 【0245】

40

一部の態様では、ドナー核酸、例えばドナープラスミドまたは遺伝子操作された抗原受容体をコードする核酸が用意され、DSBの導入後に遺伝子編集の部位にHDRによって挿入される。したがって一部の態様において、遺伝子の破壊と、抗原受容体、例えばCARの導入は、同時に実行され、それにより、遺伝子は、一つには、CARコード核酸のノックインまたは挿入によって破壊される。

## 【0246】

一部の態様では、ドナー核酸が用意されない。一部の局面では、DSBの導入に続くNHEJ媒介修復が、例えばミスセンス変異の作出またはフレームシフトなどによる遺伝子破壊の原因となりうる挿入変異または欠失変異をもたらす。

## 【0247】

1. ZFPおよびZFN、TAL、TALE、およびTALEN

50

一部の態様において、DNA標的化分子は、エンドヌクレアーゼなどのエフェクタータンパク質に融合されたDNA結合タンパク質、例えば1つまたは複数のジンクフィンガータンパク質（ZFP）または転写アクチベーター様タンパク質（TAL）を含む。例として、ZFN、TAL E、およびTALENが挙げられる。Lloyd et al., *Frontiers in Immunology*, 4 (221), 1-7 (2013) 参照。

#### 【0248】

一部の態様において、DNA標的化分子は、DNAに配列特異的に結合する1つまたは複数のジンクフィンガータンパク質（ZFP）またはそのドメインを含む。ZFPまたはそのドメインは、1つまたは複数のジンクフィンガー、すなわち亜鉛イオンの配位によって安定化される構造を有する結合ドメイン内のアミノ酸配列の領域を介して配列特異的にDNAに結合する、タンパク質またはより大きなタンパク質内のドメインである。ジンクフィンガ-DNA結合タンパク質という用語は、ジンクフィンガータンパク質またはZFPと略記されることが多い。

10

#### 【0249】

ZFPには、個々のフィンガーを組み立てることによって作製される、典型的には9~18ヌクレオチド長の特異的DNA配列を標的とする人工的ZFPドメインが含まれる。ZFPには、1つのフィンガードメインが約30アミノ酸長であり、亜鉛を介して1つのベータターンの2つのシステインとコーディネートされた2つの不变ヒスチジン残基を含有するアルファ・ヘリックスを含有するものが含まれ、2、3、4、5、または6個のフィンガーを有する。一般に、ZFPの配列特異性は、ジンクフィンガー認識ヘリックス上の4つのヘリックス位置（-1、2、3および6）にアミノ酸置換を施すことによって改変することができる。したがって、一部の態様において、ZFPまたはZFP含有分子は非天然物であり、例えば選ばれた標的部位に結合する様に操作されている。例えばBeerli et al. (2002) *Nature Biotechnol.* 20:135-141、Pabo et al. (2001) *Ann. Rev. Biochem.* 70:313-340、Isalan et al. (2001) *Nature Biotechnol.* 19:656-660、Segal et al. (2001) *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:632-637、Choo et al. (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10:411-416、米国特許第6,453,242号、同第6,534,261号、同第6,599,692号、同第6,503,717号、同第6,689,558号、同第7,030,215号、同第6,794,136号、同第7,067,317号、同第7,262,054号、同第7,070,934号、同第7,361,635号、同第7,253,273号、および米国特許出願公開第2005/0064474; 2007/0218528号、同第2005/0267061号を参照されたい。これらはいずれも参考によりその全体が本明細書に組み入れられる。

20

#### 【0250】

一部の局面において、遺伝子の抑制は、遺伝子中の第1の標的部位を第1のZFPと接触させ、それによって遺伝子を抑制することによって実行される。一部の態様では、遺伝子中の標的部位を、6つのフィンガーと調節ドメインとを含む融合ZFPと接触させ、それによって遺伝子の発現を阻害する。

30

#### 【0251】

一部の態様において、接触させる工程は、遺伝子中の第2の標的部位を第2のZFPと接触させる工程をさらに含む。一部の局面において、第1および第2の標的部位は隣接している。一部の態様において、第1および第2のZFPは共有結合で連結されている。一部の局面において、第1のZFPは、1つの調節ドメインまたは少なくとも2つの調節ドメインを含む融合タンパク質である。一部の態様において、第1および第2のZFPは、それぞれが1つの調節ドメインを含むか、それぞれが少なくとも2つの調節ドメインを含む、融合タンパク質である。一部の態様において、調節ドメインは、転写リプレッサー、転写アクチベーター、エンドヌクレアーゼ、メチルトランスフェラーゼ、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ、またはヒストンデアセチラーゼである。

40

#### 【0252】

一部の態様において、ZFPは、プロモーターに機能的に連結されたZFP核酸によってコードされる。一部の局面において、本方法は、まず前記核酸を、脂質:核酸複合体として、または裸の核酸として、細胞に投与する工程をさらに含む。一部の態様において、ZFPは

50

、プロモーターに機能的に連結されたZFP核酸を含む発現ベクターによってコードされる。一部の態様において、ZFPは、誘導性プロモーターに機能的に連結された核酸によってコードされる。一部の局面において、ZFPは、弱いプロモーターに機能的に連結された核酸によってコードされる。

【0253】

一部の態様において、標的部位は遺伝子の転写開始部位の上流にある。一部の局面において、標的部位は遺伝子の転写開始部位に隣接している。一部の局面において、標的部位は、遺伝子の転写開始部位の下流にあるRNAポリメラーゼ停止部位に隣接している。

【0254】

一部の態様において、DNA標的化分子は、DNA開裂ドメインに融合されてジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) を形成しているジンクフィンガー-DNA結合ドメインであるか、それを含む。一部の態様において、融合タンパク質は、少なくとも1つのIIS型制限酵素に由来する開裂ドメイン (または開裂ハーフドメイン) と、操作されていても操作されていなくてもよい1つまたは複数のジンクフィンガー結合ドメインとを含む。一部の態様において、開裂ドメインはIIS型制限エンドヌクレアーゼFok Iに由来する。Fok Iは、一般に、一方の鎖ではその認識部位から9ヌクレオチドの位置で、また他方の鎖ではその認識部位から13ヌクレオチドの位置で、DNAの二本鎖開裂を触媒する。例えば米国特許第5,356,802号、同第5,436,150号、および同第5,487,994号、ならびにLi et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4275-4279、Li et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2764-2768、Kim et al. (1994a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:883-887、Kim et al. (1994b) J. Biol. Chem. 269:31,978-31,982を参照されたい。10

【0255】

一部の態様において、ZFNは、免疫阻害性分子をコードする遺伝子、例えばPD-1および/またはPD-L1をコードする遺伝子を標的とする。特定態様において、ZFNは、PD-L1をコードする遺伝子を標的とする。一部の局面において、ZFNは、例えば遺伝子のコード領域中の予め決定された部位に、二本鎖切断 (DSB) を効率よく生じさせる。標的となる典型的領域には、エクソン、N末端領域をコードする領域、第1エクソン、第2エクソン、およびプロモーターまたはエンハンサー領域が含まれる。一部の態様では、ZFNの一過性発現が、操作された細胞における標的遺伝子の、効率の高い永続的な破壊を促進する。具体的には、一部の態様において、ZFNの送達は、50%を上回る効率で遺伝子の永続的な破壊をもたらす。20

【0256】

遺伝子特異的な操作されたジンクフィンガーは数多く市販されている。例えばSangamo Biosciences (米国カリフォルニア州リッチモンド) は、Sigma-Aldrich (米国ミズーリ州セントルイス) と共同して、ジンクフィンガー構築のためのプラットフォーム (CompoZr) を開発することで、研究者がジンクフィンガーの構築と検証を完全に回避することを可能にし、何千ものタンパク質を特異的標的とするジンクフィンガーを提供している。Gaj et al., Trends in Biotechnology, 2013, 31 (7), 397-405。一部の態様では、市販のジンクフィンガーが使用または特別設計される (例えばSigma-Aldrichカタログ番号CSTZFN、CSTZFN、CT1-1KT、およびPZD0020を参照されたい)。30

【0257】

## 2. TALEおよびTALEN

一部の態様において、DNA標的化分子は、転写アクチベーター様タンパク質エフェクター (TALE) タンパク質に見られるような、天然のまたは操作された (非天然の) 転写アクチベーター様タンパク質 (TAL) DNA結合ドメインを含む。例えば参照によりその全体が本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第20110301073号を参照されたい。

【0258】

TALE DNA結合ドメインまたはTALEは、1つまたは複数のTALEリピートドメイン/ユニットを含むポリペプチドである。リピートドメインは、TALEの、そのコグネイト標的DNA配列への結合に関与する。単一の「リピートユニット」 (「リピート」ともいう) は、典型的40

には、33～35アミノ酸長であり、天然TALEタンパク質内の他のTALEリピート配列に対して少なくとも多少の配列ホモロジーを呈する。各TALEリピートユニットは、典型的にはリピートの12番目および/または13番目に、リピート可変二残基（RVD）を構成する1つまたは2つのDNA結合残基を含む。これらのTALEのDNA認識のための天然（カノニカル）コードは、12番目および13番目にあるHD配列がシトシン（C）への結合につながり、NGがTに結合し、NIがAに、NNがGまたはAに結合し、NGがTに結合すると決定されており、非カノニカル（非定型）RVDも公知である。米国特許公開第20110301073号を参照されたい。一部の態様では、標的DNA配列に対して特異性を持つTALアレイの設計により、任意の遺伝子をTALEの標的にすることができる。標的配列は一般にチミジンで始まる。

#### 【0259】

10

一部の態様では、分子が、TALE-ヌクレアーゼ（TALEN）などのDNA結合エンドヌクレアーゼである。一部の局面において、TALENは、TALEに由来するDNA結合ドメインと核酸標的配列を開裂するためのヌクレアーゼ触媒ドメインとを含む融合タンパク質である。一部の態様では、TALE DNA結合ドメインが、標的抗原および/または免疫抑制分子をコードする遺伝子内の標的配列に結合するように操作されている。例えば一部の局面において、TALE DNA結合ドメインは、免疫阻害性分子をコードする遺伝子、例えばPD-1および/またはPD-L1をコードする遺伝子を標的としうる。特定態様において、TALE DNA結合ドメインは、PD-L1をコードする遺伝子、例えばCD274を標的とする。

#### 【0260】

20

一部の態様では、TALENが、遺伝子中の標的配列を認識し、開裂する。一部の局面において、DNAの開裂は二本鎖切断をもたらす。一部の局面において、切断は相同組換えまたは非相同末端結合（NHEJ）の速度を増加させる。一般に、NHEJは、不完全な修復プロセスであり、しばしば、開裂部位のDNA配列を変化させる。一部の局面において、修復機構は、2つのDNA端に残っているものの、直接再連結による（Critchlow and Jackson, Trends Biochem Sci. 1998 Oct;23 (10) :394-8）、またはいわゆるマイクロホモロジー媒介末端結合による、再接合を伴う。一部の態様において、NHEJによる修復は小さな挿入または欠失をもたらし、これをを利用して遺伝子を破壊し、それによって遺伝子を抑制することができる。一部の態様において、修飾は、少なくとも1つのヌクレオチドの置換、欠失、または付加でありうる。一部の局面において、開裂が誘発する変異導入事象、すなわちNHEJ事象に引き続いて変異導入が起こった細胞は、当技術分野において周知の方法によって同定および/または選択することができる。

30

#### 【0261】

一部の態様において、TALEリピートは、ある遺伝子を特異的に標的とするように組み立てられる（Gaj et al., Trends in Biotechnology, 2013, 31 (7), 397-405）。18,740のヒトタンパク質コード遺伝子を標的とするTALENのライブラリーが構築されている（Kim et al., Nature Biotechnology. 31, 251-258 (2013)）。特別設計されたTALEアレイは、Collectis Bioresearch（フランス国パリ）、Transposagen Biopharmaceuticals（米国ケンタッキー州レキシントン）、およびLife Technologies（米国ニューヨーク州グランドアイランド）によって市販されている。具体的には、PD-1を標的とするTALENが市販されている（ワールドワイドウェブのwww.genecopoeia.com/product/search/detail.php?product\_id=26&cid=&key=HTN212662で入手できるGenecopoeiaカタログ番号HTN212662-1、HTN212662-2、およびHTN212662-3参照）。例示的分子は、例えば米国特許出願公開第2014/0120622号および同第2013/0315884号に記載されている）。<http://www.e-talen.org/E-TALEN/>およびHeigwer et al., Nucleic Acids Res. 41 (20) :e190 (2013)も参照されたい。

40

#### 【0262】

一部の態様において、TALENは、1つまたは複数のプラスミドベクターによってコードされたトランスジーンとして導入される。一部の局面において、プラスミドベクターは、該ベクターを受け取った細胞の同定および/または選択を可能にする選択マーカーを含有することができる。

#### 【0263】

50

### 3. RGEN ( CRISPR/Cas系 )

一部の態様において、抑制は、RNAガイド型エンドヌクレアーゼ ( RGEN ) による破壊、または別のRNAガイド型エフェクター分子による他の形態の抑制など、1つまたは複数のDNA結合核酸を使って実行される。例えば、一部の態様において、抑制は、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート ( CRISPR ) およびCRISPR関連 ( Cas ) タンパク質を使って実行される。Sander and Joung, *Nature Biotechnology*, 32 ( 4 ) : 347-355参照。

#### 【 0 2 6 4 】

一般に、「CRISPR系」とは、CRISPR関連 ( 「Cas」 ) 遺伝子の発現に関与するかまたはその活性を指揮する転写産物および他のエレメント、例えばCas遺伝子をコードする配列、tracr ( トランス活性化CRISPR ) 配列 ( 例えばtracrRNAまたは活性な部分tracrRNA ) 、tracr-mate配列 ( 内在性CRISPR系との関連では「ダイレクトリピート」およびtracrRNAプロセスド ( tracrRNA-processed ) 部分ダイレクトリピートを包含する ) 、ガイド配列 ( 内在性CRISPR系との関連では「スペーサー」ともいい、あるいは「標的化配列」ともいう ) 、および/またはCRISPR遺伝子座由来の他の配列および転写産物などの総称である。

#### 【 0 2 6 5 】

一部の態様において、CRISPR/CasヌクレアーゼまたはCRISPR/Casヌクレアーゼ系は、DNAに配列特異的に結合する非コードRNA分子 ( ガイド ) RNA ( gRNA ) と、ヌクレアーゼ機能 ( 例えば2つのヌクレアーゼドメイン ) を持つCasタンパク質 ( 例えばCas9 ) 、またはその変異体とを含む。

#### 【 0 2 6 6 】

一部の態様において、CRISPR系の1つまたは複数のエレメントは、I型、II型、またはIII型CRISPR系に由来する。一部の態様において、CRISPR系の1つまたは複数のエレメントは、内在性CRISPR系を含む特定生物、例えば化膿性レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) または黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) に由来する。一部の態様では、Cas9ヌクレアーゼ ( 例えば黄色ブドウ球菌由来または化膿性レンサ球菌由来のmRNAがコードするもの、例えばpCW-Cas9、Addgene #50661、Wang et al. ( 2014 ) *Science*, 3:343-80-4、またはApplied Biological Materials ( ABM; カナダ ) からカタログ番号K002、K003、K005またはK006として入手できるヌクレアーゼもしくはニッカーゼレンチウイルスベクター ) と、標的遺伝子 ( 例えばPD-1をコードするPDCD1遺伝子、またはPD-L1をコードするCD274遺伝子 ) に特異的なガイドRNAとが、細胞に導入される。

#### 【 0 2 6 7 】

一般に、CRISPR系は、標的配列の部位でCRISPR複合体の形成を促進するエレメントを特徴とする。一部の態様において、標的配列または標的部位は免疫阻害性分子をコードする遺伝子、例えばPD-1またはPD-L1をコードする遺伝子である。例えば標的配列は、PD-1をコードするPDCD1遺伝子またはPD-L1をコードするCD274遺伝子の中またはその近くにある。特定態様において、標的配列または標的部位はPD-L1をコードする遺伝子、例えばCD274である。典型的には、CRISPR複合体の形成との関連において「標的配列」とは、一般に、配列、例えば遺伝子配列またはゲノム配列であって、ガイド配列がその配列に対して相補性を有するように設計されており、標的配列とガイド配列との間のハイブリダイゼーションがCRISPR複合体の形成を促進するような配列を指す。ハイブリダイゼーションの原因となってCRISPR複合体の形成を促進するのに十分な相補性があるのであれば、完全な相補性は必ずしも必要でない。一部の態様において、ガイド配列は、ガイド配列内の二次構造の度合を低減するように選択される。二次構造は、任意の適切なポリヌクレオチドフォールディングアルゴリズムによって決定することができる。

#### 【 0 2 6 8 】

一般に、ガイド配列は、標的配列とハイブリダイズして標的配列へのCRISPR複合体の配列特異的結合を指示するのに十分な標的ポリヌクレオチドとの相補性を有する、ポリヌクレオチド配列を含む標的化ドメインを含む。一部の態様において、ガイド配列とその対応標的配列との間の相補性の度合は、適切なアライメントアルゴリズムを使って最適アライ

10

20

30

40

50

メントした場合に、約50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%またはそれ以上である。一部の例において、gRNAの標的化ドメインは、標的核酸上の標的配列、例えばCD274遺伝子またはPDCD1遺伝子中の標的配列に対して相補的、例えば少なくとも80、85、90、95、98または99%相補的、例えば完全に相補的である。

#### 【0269】

最適アライメントは、配列をアライメントするための任意の適切なアルゴリズムを利用して決定することができ、それらアルゴリズムの非限定的な例には、Smith-Watermanアルゴリズム、Needleman-Wunschアルゴリズム、Burrows-Wheeler変換に基づくアルゴリズム（例えばBurrows Wheeler Aligner）、ClustalW、Clustal X、BLAT、Novoalign ( Novocraft Technologies、ELAND ( Illumina、カリフォルニア州サンディエゴ ) 、SOAP ( soap.genomics.org.cnにおいて入手可能 ) 、およびMaq ( maq.sourceforge.netにおいて入手可能 ) ）がある。一部の態様において、ガイド配列は、長さが約5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、75ヌクレオチドまたはそれ以上である。一部の態様において、ガイド配列は、長さが約75、50、45、40、35、30、25、20、15、12ヌクレオチド未満であるか、またはそれより短い。標的配列へのCRISPR/Cas複合体の配列特異的結合を指示するガイド配列の能力は、任意の適切なアッセイによって評価しうる。例えば、CRISPR/Cas複合体を形成するのに十分なCRISPR/Cas系の成分は、試験しようとするガイド配列を含めて、例えばCRISPR/Cas複合体の成分をコードするベクターによるトランスフェクションなどによって、対応標的配列を有する細胞に提供することができ、続いて標的配列内での優先的開裂の評価を、例えば本明細書に記載のSurveyorアッセイによって行う。同様に、標的ポリヌクレオチド配列の開裂は、標的配列、試験しようとするガイド配列および試験ガイド配列とは異なる対照ガイド配列を含むCRISPR/Cas複合体の成分を用意し、試験ガイド配列反応と対照ガイド配列反応との間で、標的配列における結合または開裂速度を比較することによって、試験管内で評価することができる。

#### 【0270】

一部の態様では、CasヌクレアーゼとgRNA（例えば標的配列に特異的なcrRNAと固定されたtracrRNAとの融合物を含む）とが細胞に導入される。一般に、gRNAの5'端にある標的部位は、相補的塩基対合を使って、Casヌクレアーゼを標的部位、例えば遺伝子へとターゲティングする。一部の態様において、標的部位は、典型的にはNGGまたはNAGなどのプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）配列のすぐ5'側のその位置に基づいて選択される。この点において、gRNAは、標的DNA配列に対応するようにガイドRNAの最初の20ヌクレオチドを修飾することによって、所望の配列にターゲティングされる。

#### 【0271】

一部の態様において、標的配列は、PD-L1またはPD-1をコードする遺伝子、例えばCD274遺伝子またはPDCD1遺伝子、またはその近くにある。一部の態様において、標的化ドメインに相補的な標的核酸は、CD274またはPDCD1などといった関心対象の遺伝子の初期コード領域に位置する。初期コード領域の標的化は、関心対象の遺伝子をノックアウト（すなわち、その発現を排除）するために使用することができる。一部の態様において、関心対象の遺伝子の初期コード領域は、開始コドン（例えばAUG）直後の配列、または開始コドンから500bp以内（例えば500bp未満、450bp未満、400bp未満、350bp未満、300bp未満、250bp未満、200bp未満、150bp未満、100bp未満または50bp未満）の配列を含む。一部の態様において、標的配列は、CD274またはPDCD1の開始コドンから200bp以内、150bp以内、または100bp以内にある。プロモーター領域または転写開始部位近くの領域の標的化は、関心対象の遺伝子をノックダウン（すなわちその発現を低減）するために使用することができる。例えば、転写開始部位近くの領域は、転写開始部位の上流500bp以内（例えば500bp未満、450bp未満、400bp未満、350bp未満、300bp未満、250bp未満、200bp未満、150bp未満、100bp未満または50bp未満）の領域を含みうる。一部の態様において、標的配列は、プロモーター、エンハンサー、または他のシス作用性もしくはトランス作用性調節領域内にあることができる。

10

20

30

40

50

## 【0272】

CD274またはPDCD1、例えばエクソン配列、および調節領域、例えばプロモーターおよびアクチベーターの配列を標的とする配列であるか、それらの配列を含む、gRNA配列を設計し、または同定することは、当業者の水準内にある。CRISPRゲノム編集用のゲノムワイドなgRNAデータベースを公的に利用することができ、これにはヒトゲノムまたはマウスゲノム中の遺伝子の構成的エクソン中の例示的シングルガイドRNA(sgRNA)標的配列が含まれている(例えばgenescrypt.com/gRNA-database.htmlを参照されたい。また、Sanjana et al. (2014) Nat. Methods, 11:783-4、<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/>、<http://crisp.r.mit.edu/>、<https://www.dna20.com/eCommerce/cas9/input>も参照されたい)。一部の態様において、gRNA配列は、非標的遺伝子へのオフターゲット結合がごくわずかな配列であるか、そのような配列を含む。10

## 【0273】

gRNA標的化ドメイン配列に相補的なPDCD1中の例示的標的配列をSEQ ID NO:13~18に示す。gRNA標的化ドメイン配列に相補的なCD274中の例示的標的配列をSEQ ID NO:19~24に示す。一部の態様において、PDCD1遺伝子に対する標的化ドメインは、例えば国際特許出願公開番号WO2015/161276などに記載されているgRNA配列の例示的標的化ドメインのいずれかと同じであるか、それとの相違が1、2、3、4、または5ヌクレオチド以下である配列を含みうる。

## 【0274】

一部の態様において、CRISPR系は、本明細書で論じるように、標的部位における二本鎖切断(DSB)を誘発し、それに続いて破壊が起こる。別の態様では、標的部位において一本の鎖にニックを入れるために、「ニックカーゼ」とみなされるCas9変異体が使用される。一部の局面では、例えば特異性を改良するために、ニックが同時に導入された時に5'オーバーハングが導入されるように、それぞれが1対の異なるgRNA標的化配列によって指示される、対になったニックカーゼが使用される。別の態様では、遺伝子発現に影響を及ぼすために、触媒的に不活性なCas9が、転写リプレッサーまたはアクチベーターなどの異種エフェクタードメインに融合される。20

## 【0275】

一部の態様において、破壊には、遺伝子への配列の挿入が含まれる。一般に、標的配列を含む標的遺伝子座への組換えに使用することができる配列またはテンプレートを、「編集テンプレート」または「編集ポリヌクレオチド」または「編集配列」という。一部の局面において、外因性テンプレートポリヌクレオチドを編集テンプレートという場合もある。一部の局面において、組換えは相同組換えである。30

## 【0276】

典型的には、内在性CRISPR系との関連において、CRISPR複合体(標的配列にハイブリダイズし、1つまたは複数のCasタンパク質との複合体を形成したガイド配列を含む)の形成は、標的配列中、または標的配列の近く(例えば標的配列から1塩基対以内、2塩基対以内、3塩基対以内、4塩基対以内、5塩基対以内、6塩基対以内、7塩基対以内、8塩基対以内、9塩基対以内、10塩基対以内、20塩基対以内、50塩基対以内またはそれ以上)で、一方または両方の鎖の開裂をもたらす。40

## 【0277】

一部の態様では、野生型tracr配列の全部または一部(例えば野生型tracr配列のうちの約20、26、32、45、48、54、63、67、85ヌクレオチドまたはそれ以上)を含むかそれからなりうるtracr配列も含まれていてよく、例えばtracr配列の少なくとも一部分に沿った、ガイド配列に機能的に連結されたtracr mate配列の全部または一部分へのハイブリダイゼーションなどによって、CRISPR複合体の一部を形成しうる。一部の態様において、tracr配列は、tracr mate配列に対して、ハイブリダイズしてCRISPR複合体の形成に参加するのに十分な相補性を有する。標的配列と同様に、一部の態様において、完全な相補性は必ずしも必要ない。一部の態様において、tracr配列は、最適アライメントした場合にtracr mate配列の長さに沿って少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%の配50

列相補性を有する。

#### 【0278】

一般に、tracr mate配列は、(1)対応するtracr配列を含有する細胞における、tracr mate配列が隣接するガイド配列の切出し、および(2)標的配列における、tracr配列にハイブリダイズしたtracr mate配列を含むCRISPR複合体の形成、のうちの1つまたは複数を促進するのに十分な相補性を、tracr配列との間に有する任意の配列を含む。一般に、相補性の度合は、2つの配列のうちの短い方の長さに沿った、tracr mate配列とtracr配列の最適なアライメントに関する。

#### 【0279】

最適アライメントは任意の適切なアライメントアルゴリズムによって決定することができる、さらに、tracr配列内またはtracr mate配列内の自己相補性などの二次構造を考慮することができる。一部の態様において、tracr配列とtracr mate配列との間の、それら2つのうちの短い方の長さに沿った相補性の度合は、約25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97.5%、99%またはそれ以上である。一部の態様において、tracr配列は、長さが約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50ヌクレオチドまたはそれ以上である。一部の態様において、tracr配列およびtracr mate配列は、それら二つの間のハイブリダイゼーションがヘアピンなどの二次構造を有する転写産物を生成するような形で、単一の転写産物内に含まれる。一部の局面において、ヘアピン構造に使用するためのループ形成配列は、4ヌクレオチド長であって、配列G AAAを有する。しかし、より長いまたはより短いループ配列も使用することができ、代替配列も同様である。一部の態様において、配列は、ヌクレオチドトリプレット(例えばAA A)および追加ヌクレオチド(例えばCまたはG)を含む。ループ形成配列の例にはCAAAおよびAAAGがある。一部の態様において、転写産物、すなわち転写されたポリヌクレオチド配列は、少なくとも2つ以上のヘアピンを有する。一部の態様において、転写産物は2、3、4、または5つのヘアピンを有する。さらなる一態様において、転写産物は多くて5つのヘアピンを有する。一部の態様において、前記単一の転写産物は、ポリT配列などの転写終結配列、例えば6Tヌクレオチドをさらに含む。

#### 【0280】

一部の態様において、CRISPR系の1つまたは複数のエレメントの発現を駆動する1つまたは複数のベクターは、CRISPR系のエレメントの発現が1つまたは複数の標的部位におけるCRISPR複合体の形成を指示することになるように、細胞に導入される。例えば、Cas酵素、tracr-mate配列に連結されたガイド配列、およびtracr配列をそれぞれ、別個のベクター上の別個の調節エレメントに機能的に連結することができるだろう。あるいは、同じ調節エレメントまたは異なる調節エレメントから発現されるエレメントのうちの2つまたはそれ以上を単一のベクターにおいて組み合わせてもよく、その場合、第1のベクターに含まれていないCRISPR系の成分は、いずれも1つまたは複数の追加ベクターが提供する。一部の態様において、単一ベクターにおいて組み合わされるCRISPR系エレメントは、1つのエレメントが第2のエレメントに対して5'側(「上流」)または3'側(「下流」)に位置するなど、任意の適切な配向で配置されうる。1つのエレメントのコード配列は、第2のエレメントのコード配列と同じ鎖上または反対の鎖上に位置して、同じ向きまたは反対の向きに配向されうる。一部の態様では、単一のプロモーターが、CRISPR酵素をコードする転写産物、ならびにガイド配列、tracr mate配列(ガイド配列に機能的に連結されていてもよい)、および1つまたは複数のイントロン配列内に(例えば、それぞれが異なるイントロン中に、または少なくとも1つのイントロン中に2つもしくはそれ以上が、または単一のイントロン中にすべてが)埋め込まれたtracr配列のうちの1つまたは複数の発現を駆動する。一部の態様において、CRISPR酵素、ガイド配列、tracr mate配列、およびtracr配列は、同じプロモーターに機能的に連結され、同じプロモーターから発現される。

#### 【0281】

一部の態様において、ベクターは、1つまたは複数の挿入部位、例えば制限エンドヌクレアーゼ認識配列(「クローニング部位」ともいう)を含む。一部の態様において、1つ

10

20

30

40

50

または複数の挿入部位（例えば約1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10個またはそれ以上の挿入部位）が、1つまたは複数のベクターの1つまたは複数の配列エレメントの上流および/または下流に位置する。一部の態様において、挿入部位へのガイド配列の挿入に続いて、発現時に、ガイド配列が真核細胞中の標的配列へのCRISPR複合体の配列特異的結合を指示するように、ベクターはtracr mate配列の上流、および任意でtracr mate配列に機能的に連結される調節エレメントの下流に、挿入部位を含む。一部の態様において、ベクターは2つ以上の挿入部位を含み、各挿入部位は、各部位におけるガイド配列の挿入が可能になるように、2つのtracr mate配列の間に位置する。そのような配置では、それら2つ以上のガイド配列が、2コピー以上の単一ガイド配列、2つ以上の異なるガイド配列、またはそれらの組み合わせを含みうる。複数の異なるガイド配列を使用する場合は、単一の発現コンストラクトを使って、細胞内の複数の異なる対応標的配列にCRISPR活性をターゲティングすることができる。例えば単一のベクターは、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、もしくは20個、またはそれ以上のガイド配列を含みうる。一部の態様において、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10個、またはそれ以上のそのようなガイド配列含有ベクターを用意して、任意で細胞に送達することができる。10

#### 【0282】

一部の態様において、ベクターは、Casタンパク質などのCRISPR酵素をコードする酵素コード配列に機能的に連結された調節エレメントを含む。Casタンパク質の非限定的な例には、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9（Csn1およびCsn12としても公知である）、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4、それらのホモログ、またはそれらの修飾型がある。これらの酵素は公知であり、例えば化膿レンサ球菌（*S. pyogenes*）Cas9タンパク質のアミノ酸配列は、SwissProtデータベースに、アクセション番号Q99ZW2として見いだすことができる。一部の態様において、Cas9などの無修飾CRISPR酵素はDNA開裂活性を有する。一部の態様において、CRISPR酵素はCas9であり、化膿レンサ球菌、黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）または肺炎レンサ球菌（*S. pneumoniae*）由来のCas9であることができる。一部の態様において、CRISPR酵素は、標的配列の位置で、例えば標的配列内および/または標的配列の相補鎖内で、一方または両方の鎖の開裂を指示する。一部の態様において、CRISPR酵素は、標的配列の最初または最後のヌクレオチドから約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50、100、200、もしくは500塩基対以内、またはそれ以上の位置で、一方または両方の鎖の開裂を指示する。20

#### 【0283】

一部の態様において、ベクターは、対応野生型酵素と比較して、変異型CRISPR酵素が標的配列を含有する標的ポリヌクレオチドの一方または両方の鎖を開裂する能力を欠くように変異している、CRISPR酵素をコードする。例えば、化膿レンサ球菌由来のCas9のRuvC I触媒ドメインにおけるアスパラギン酸からアラニンへの置換（D10A；SEQ ID NO:12）は、Cas9を、両方の鎖を開裂するヌクレアーゼから、ニッカーゼ（一本の鎖を開裂する）へと変換する。一部の態様において、Cas9ニッカーゼは、ガイド配列と組み合わせて、例えばDNA標的のそれぞれセンス鎖およびアンチセンス鎖を標的とする2つのガイド配列と組み合わせて、使用することができる。この組み合わせにより、両方の鎖にニックを入れて、NH EJを誘発するために使用することができる。30

#### 【0284】

一部の態様において、Cas9またはスプリットCas9は、エンドヌクレアーゼ活性を欠く。一部の態様において、結果として生じるCas9またはスプリットCas9を、標的核酸配列、例えばPD-L1またはPD-1をコードする遺伝子の相補配列を含むように設計されたガイドRNAと共に発現させる。一部の態様において、エンドヌクレアーゼ活性を欠くCas9の発現は、関心対象の遺伝子の特異的サイレンシングまたは低減をもたらす。この系はCRISPR干渉（CRISPRi）と呼ばれている（Qi, Larson et al. 2013）。一部の態様において、サイレンシングは転写工程または翻訳工程で起こりうる。一部の態様において、サイレンシングは、転40

写を直接遮断することによって、例えば転写伸長を遮断することによって、または任意のプロモーター内の重要なシス作用モチーフを標的とすることで、それぞれのコグネイトトランス活性化転写因子の会合を立体的に遮断することによって起こりうる。一部の態様において、エンドヌクレアーゼ活性を欠くCas9は、どちらも非機能的なHNHドメインとRuvCドメインとを含む。一部の態様において、Cas9またはスプリットCas9ポリペプチドは、RuvC様ドメインとHNHドメインの両方の触媒残基に不活性化変異を含む。例えば、開裂Cas9活性に必要な触媒残基は、化膿レンサ球菌のCas9のD10、D31、H840、H865、H868、N882およびN891 ( COG3513-SEQ ID NO:11 )、またはCasファミリーメンバーのホモログ上で、CLU STALW法を使ってアライメントされる位置であることができる。一部の態様において、HNHまたはRuvCモチーフに含まれる残基は、上記のパラグラフに記載したものであることができる。  
10 またRuvCモチーフに含まれる残基は、上記のパラグラフに記載したものであることができる。一部の態様において、これらの残基のいずれかを、他のアミノ酸のいずれか一つで、例えばアラニン残基で、置き換えることができる。一部の態様において、触媒残基における変異とは、Cas9の触媒ドメインの少なくとも1つの不活性化の原因となる、別のアミノ酸による置換、またはアミノ酸の欠失もしくは付加を意味する。

#### 【 0 2 8 5 】

Cas9タンパク質中の変異の非限定的な例は、当技術分野において公知であり（例えばWO 2015/161276参照）、それらはいずれも、ここに提供される方法によるCRISPR/Cas9系に含めることができる。

#### 【 0 2 8 6 】

一部の態様において、CRISPR酵素をコードする酵素コード配列は、特定の細胞、例えば真核細胞における発現に、コドン最適化される。真核細胞は、特定の生物、例えば、限定するわけではないがヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、または非ヒト霊長類を含む哺乳動物の真核細胞であるか、それら特定の生物に由来しうる。一般に、コドン最適化とは、関心対象の宿主細胞における発現が強化されるように、ネイティブアミノ酸配列を維持しつつ、ネイティブ配列のうちの少なくとも1つのコドン（例えば約1、2、3、4、5、10、15、20、25、もしくは50個、またはそれ以上のコドン）を当該宿主細胞の遺伝子においてより高頻度にまたは最も高頻度に使用されているコドンで置き換えることによって、核酸配列を修飾するプロセスをいう。さまざまな種が、特定アミノ酸の一定のコドンに対して、特定のバイアスを呈する。コドンバイアス（生物間でのコドン使用頻度の相違）は、多くの場合、メッセンジャーRNA ( mRNA ) の翻訳の効率と相関し、そしてそれは、なかんずく、翻訳されるコドンの性質および特定トランスマーカーRNA ( tRNA ) 分子の利用可能性に依存すると考えられている。細胞における選択されたtRNAの優位性は、一般に、ペプチド合成において最も高頻度に使用されるコドンの反映である。したがって遺伝子は、所与の生物における最適な遺伝子発現のために、コドン最適化に基づいて適応させることができる。一部の態様では、CRISPR酵素をコードする配列中の1つまたは複数のコドン（例えば1、2、3、4、5、10、15、20、25、50個、もしくはそれ以上のコドン、またはすべてのコドン）が、特定アミノ酸に対して最も高頻度に使用されるコドンに対応する。  
20 30

#### 【 0 2 8 7 】

一部の態様において、CRISPR酵素は、1つまたは複数の異種タンパク質ドメイン（CRISPR酵素に加えて例えば約1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10個、またはそれ以上のドメイン）を含む融合タンパク質の一部である。CRISPR酵素融合タンパク質は、任意の追加タンパク質配列、および任意で、いずれか2つのドメイン間のリンカー配列を含みうる。CRISPR酵素に融合しうるタンパク質ドメインの例には、エピトープタグ、レポーター遺伝子配列、ならびにメチラーゼ活性、デメチラーゼ活性、転写活性化活性、転写抑制活性、転写終結因子活性、ヒストン修飾活性、RNA開裂活性および核酸結合活性うちの1つまたは複数を有するタンパク質ドメインがあるが、それらに限定されるわけではない。エピトープタグの非限定的な例には、ヒスチジン ( His ) タグ、V5タグ、FLAGタグ、インフルエンザヘマグロビン ( HA ) タグ、Mycタグ、VSV-Gタグ、およびチオレドキシン ( Trx ) タグがある。レポーター遺伝子の例には、グルタチオン-5-トランスフェラーゼ ( GST ) 、セイヨウウサギペルオキシダーゼ ( HRP ) 、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラー<sup>40</sup>  
50

ゼ (CAT)、ベータ-ガラクトシダーゼ、ベータ-グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、HcRed、DsRed、シアン蛍光タンパク質 (CFP)、黄色蛍光タンパク質 (YFP)、および青色蛍光タンパク質 (BFP) を含む自家蛍光タンパク質があるが、それらに限定されるわけではない。CRISPR酵素は、DNA分子に結合するタンパク質もしくは他の細胞分子に結合するタンパク質またはそのようなタンパク質のフラグメント、例えば限定するわけではないがマルトース結合タンパク質 (MBP)、S-タグ、Lex A DNA結合ドメイン (DBD) 融合物、GAL4A DNA結合ドメイン融合物、および単純ヘルペスウイルス (HSV) VP16タンパク質融合物などをコードする遺伝子配列に融合することができる。CRISPR酵素を含む融合タンパク質の一部を形成しうる追加ドメインは、参照により本明細書に組み入れられるUS20110059502に記載されている。一部の態様では、標的配列の場所を特定するためにタグ付きCRISPR酵素が使用される。10

#### 【 0 2 8 8 】

一部の態様では、ガイド配列と組み合わされた（そして任意でガイド配列との複合体を形成した）CRISPR酵素が細胞に送達される。一部の態様において、本開示によるタンパク質成分（例えばCas9/gRNA RNP）を細胞に導入するための方法は、物理的送達方法（例えばエレクトロポレーション、粒子銃、リン酸カルシウムトランスフェクション、細胞圧縮または細胞スクイージング）、リポソームまたはナノ粒子によることができる。

#### 【 0 2 8 9 】

CRISPRによるPD-1のノックアウトのための市販キット、gRNAベクターおよびドナーベクターは、例えばOrigeneから入手できる。[www.origene.com/CRISPR-CAS9/Product.aspx?SKU=KN210364](http://www.origene.com/CRISPR-CAS9/Product.aspx?SKU=KN210364)、カタログ番号KN210364G1、KN210364G2、KN210364Dを参照されたい。同様に、CRISPRによるPD-L1のノックアウトのための市販キット、gRNAベクターおよびドナーベクターも、例えばOrigeneから入手できる。[www.origene.com/CRISPR-CAS9/Product.aspx?SKU=KN213071](http://www.origene.com/CRISPR-CAS9/Product.aspx?SKU=KN213071)、カタログ番号KN213071G1、KN213071G2、KN213071Dを参照されたい。20

#### 【 0 2 9 0 】

一部の局面において、PD-1またはPD-L1をコードする遺伝子などの標的ポリヌクレオチドは、CRISPR複合体が導入された細胞中で修飾される。一部の態様において、本方法は、CRISPR複合体を標的ポリヌクレオチドに結合させることで該標的ポリヌクレオチドの開裂を引き起こし、それによって標的ポリヌクレオチドを修飾する工程を含み、ここで、CRISPR複合体は、該標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズするガイド配列と複合体を形成したCRISPR酵素を含み、該ガイド配列はtracr mate配列に連結されており、そのtracr mate配列はtracr配列にハイブリダイズする。30

#### 【 0 2 9 1 】

一部の態様において、本方法は、結合がポリヌクレオチドの発現の増加または減少をもたらすように、CRISPR複合体を該ポリヌクレオチドに結合させる工程を含む。ここで、CRISPR複合体は、該ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズするガイド配列と複合体を形成したCRISPR酵素を含み、該ガイド配列はtracr mate配列に連結されていて、そのtracr mate配列はtracr配列にハイブリダイズする。

#### 【 0 2 9 2 】

##### D. 条件的な遺伝子抑制系

一部の態様において、PD-1もしくはPD-L1をコードする遺伝子またはPD-1もしくはPD-L1分子の欠失、ノックアウト、破壊、発現の低減、発現の妨害、アップレギュレーションの阻害および/またはその機能の阻害は、条件的である。一部の態様において、PD-1および/またはPD-L1をコードする遺伝子などの遺伝子の条件的な抑制は、投与された、抗原受容体（例えばCAR）で操作された細胞の持続性の低下時に、および/またはそのような細胞が消耗表現型を呈した時に、開始または誘導されうる。一部の態様において、条件的な抑制は、曝露の持続時間の増加を呈する細胞をもたらすことによって、かつ/または処置の時間および/または投与量の制御を可能にすることによって、治療的応用を容易にしうる。40

#### 【 0 2 9 3 】

##### 1. 条件的調整物質

10

20

30

40

50

一部の態様において、本明細書に記載のペプチドまたは核酸のいずれかの発現は、ドキシサイクリン、テトラサイクリンまたはその類似体などの調整因子で細胞を処理することによって、外的に制御されうる。テトラサイクリンの類似体は、例えばクロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、デメチルクロロ-テトラサイクリン、メタサイクリン、ドキシサイクリンおよびミノサイクリンである。

#### 【0294】

一部の態様において、可逆的遺伝子サイレンシングは、トランスアクチベーター誘導型プロモーターを、該トランスアクチベーターと共に使用することによって実施されうる。一部の態様において、そのようなトランスアクチベーター誘導型プロモーターは、関心対象のトランスジーンまたは核酸の転写を強化または抑制するための制御エレメントを含む。制御エレメントには、オペレーター、エンハンサーおよびプロモーターがあるが、それらに限定されるわけではない。一部の態様において、トランスアクチベーター誘導性プロモーターは、トランスアクチベーターに結合した場合に転写活性となり、そのトランスアクチベーターは、特別な一組の条件下で、例えば化学的シグナルの特定の組み合わせの存在下または非存在下で、例えば前記の一覧から選択される調整因子によって、活性化される。

10

#### 【0295】

トランスアクチベーター誘導型プロモーターは、トランスアクチベーター結合配列、例えばいくつかのtetオペレーター配列、例えば3、4、5、6、7、8、9、または10個のtetオペレーター配列が組み入れられるように修飾された、本明細書において言及する任意のプロモーターでありうる。一部の態様において、tetオペレーター配列はタンデムである。一部の態様において、プロモーターはテトラサイクリン応答エレメント(TRE)である。そのような配列は、例えばヒトU6プロモーターを含むU6プロモーターの遠位配列エレメント(DSE)におけるStafおよびOct-1の機能的認識部位を置き換えることができる。

20

#### 【0296】

調整因子の存在下で発現を誘導する転写調整物質ドメインの具体例には、以下の転写調整物質に見いだされる転写調整物質ドメインがあるが、それらに限定されるわけではない: Tet-On転写調整物質、ならびにTet-On Advanced転写調整物質およびTet-On 3G転写調整物質(これらはいずれもClontech Laboratories(カリフォルニア州マウンテンビュー)から入手できる)。調整因子の非存在下で発現を誘導する転写調整物質ドメインの具体例には、以下の転写調整物質に見いだされる転写調整物質ドメインがあるが、それらに限定されるわけではない: Tet-off転写調整物質およびTet-Off Advanced転写調整物質(これらはどちらもClontech Laboratories(カリフォルニア州マウンテンビュー)から入手できる)。これらの系は、当技術分野において周知の、当業者が熟知する手法に従って、適合させ、使用することができる。

30

#### 【0297】

一部の態様において、トランスアクチベーター誘導型プロモーターは、阻害性核酸分子に機能的に連結された複数のトランスアクチベーター結合配列を含む。

#### 【0298】

トランスアクチベーターは、トランスアクチベーターをコードする配列に機能的に連結された調整因子依存的プロモーターを含む、同じ発現ベクター中または異なる発現ベクター中の核酸配列によって提供されうる。「異なる発現ベクター」という用語は、例えばウイルス、プラスミド、コスミドまたはトランスポゾンなど、核酸を送達するための任意の媒体を包含するものとする。該核酸配列における使用に適したプロモーターには、例えば構成的、調節型、組織特異的、または遍在性プロモーターが含まれ、それらは、CMV、RSV、PGK、EF1、NSE、シナプシン、-アクチン、GFAPなど、細胞由来、ウイルス由来または合成由来であることができる。

40

#### 【0299】

いくつかの態様による例示的トランスアクチベーターは、rtTA2-M2のDNA結合ドメインおよびOct-2Q(Q-A)活性化ドメインで構成されるrtTA-Oct2トランスアクチベーターで

50

ある。いくつかの態様によれば、もう一つの例示的トランスアクチベーターは、Tetリブレッサータンパク質（大腸菌）のDNA結合ドメインおよびOct-2Q（Q A）活性化ドメインで構成されるrtTA-Oct3トランスアクチベーターである。どちらも特許出願公開WO2007/004062に記載されている。

#### 【0300】

一部の態様は、調節融合タンパク質（RPR）をコードする単離されたヌクレオチド配列を含み、ここで、前記融合タンパク質は（1）関心対象のヌクレオチド配列の発現を阻害することができる転写遮断ドメインと（2）リガンド結合ドメインとを含有し、ここで、リガンド結合ドメインに結合することができるコグネイトリガンドの存在下では、融合タンパク質が安定化される。

10

#### 【0301】

一部の態様において、転写遮断ドメインは、細菌、バクテリオファージ、真核生物、または酵母リブレッサータンパク質に由来する。一部の態様において、転写遮断ドメインは、細菌またはバクテリオファージリブレッサータンパク質、例えばTetR、LexA、LacI、TrpR、Arc、およびLambdaCIなどに由来する。一部の態様において、転写遮断ドメインは、真核生物リブレッサータンパク質、例えばGAL4などに由来する。一部の態様において、転写遮断ドメインは、DNAに結合することはできるがDNAを開裂することはできない変異型制限酵素であり、オペレーターはその制限酵素の認識部位である。一部の態様において、例えば転写遮断ドメインは、変異型NotIである。

#### 【0302】

20

一部の態様において、リガンド結合ドメインは、ステロイド、甲状腺、またはレチノイド受容体に由来する。一部の態様において、リガンド結合ドメインは、エストロゲン受容体に由来し、コグネイトリガンドはエストロゲンである。一部の態様において、エストロゲン受容体は1つまたは複数の変異、例えばT2変異を含有し、コグネイトリガンドはタモキシフェンである。これらの系は、当技術分野において周知の、当業者が熟知する手法に従って、適合させ、使用することができる。

#### 【0303】

一部の態様では、転写を調整するために、RheoSwitch系を使用することができる。一部の態様において、RheoSwitch系はRheo受容体およびRheoアクチベータタンパク質を含み、それらはRSL1リガンドの存在によって活性化されうる。一部の態様において、この受容体およびアクチベーターは、RSL1リガンドの存在下で安定に二量化し、応答エレメントに結合して転写をオンにする（例えば「RheoSwitch（登録商標）Mammalian Inducible Expression System」の使用説明書（New England BioLabs（登録商標）Inc.）バージョン1.3、2007年11月）、Karzenowski, D. et al., BioTechniques 39:191-196 (2005)、Dai, X. et al., Protein Expr. Purif 42:236-245 (2005)、Palli, S. R. et al., Eur. J. Biochem. 270:1308-1515 (2003)、Dhadialla, T. S. et al., Annual Rev. Entomol. 43:545-569 (1998)、Kumar, M. B. et al., J. Biol. Chem. 279:27211-27218 (2004)、Verhaegen, M. and Christopoulos, T. K., Annal. Chem. 74:4378-4385 (2002)、Katalam, A. K., et al., Molecular Therapy 13:S103 (2006)、およびKarzenowski, D. et al., Molecular Therapy 13:S194 (2006)を参照されたい）。

30

#### 【0304】

40

一部の態様では、例えば参照により本明細書に組み入れられるWO 2014/018423に記載の系および方法など、電磁エネルギーを使って転写を調整することができる。

#### 【0305】

一部の態様では、哺乳動物用に修飾されたlacリブレッサー/オペレーター系由来のものなどのリブレッサー結合領域を含めることによって、RNA転写の制御可能な調節を達成することができる。Hu and Davidson, 1987、ならびにKozak, 1986参照。

#### 【0306】

## 2. 部位特異的組換えによる条件的活性

一部の態様において、阻害性作用物質であるまたは阻害性作用物質をコードする、導入

50

された核酸は、宿主ゲノムへのその組込み後の時点で、例えば部位特異的組換え法を使用することなどによって、除去することができる。一部の態様では、阻害性作用物質、例えばCRISPR、gRNA、Cas、ZFP、ZFN、TALE、TALEN、RNAi、siRNA、shRNA、miRNA、アンチセンスRNAおよび/またはリボザイムであるか、それらをコードする核酸を、loxPなどの組換え部位配列の間に置く。一部の態様では、前記核酸が、部位特異的リコンビナーゼによって媒介される組換えのために、少なくとも1つ（典型的には2つ）の部位を含む。一部の態様において、部位特異的リコンビナーゼは、より長いDNA分子からのDNAフラグメントの導入または切出しを触媒する。一部の態様において、これらの酵素は、認識と組換えの両方に役立つ比較的短いユニークな核酸配列を認識する。一部の態様において、組換え部位は短い逆方向反復（6、7、または8塩基対長）を含有し、DNA結合エレメントの長さは約11～約13bp長でありうる。

10

#### 【0307】

一部の態様において、ベクターは、多種多様な部位特異的リコンビナーゼのいずれかのための1つまたは複数の組換え部位を含みうる。部位特異的リコンビナーゼのための標的部位は、ウイルスゲノム、例えばレンチウイルスゲノムの組込みに必要な任意の部位に加えて追加されるものであると理解される。一部の態様において、核酸は、Cre、XerD、HP1およびFlpからなる群より選択されるリコンビナーゼ酵素のための1つまたは複数の部位を含む。これらの酵素および組換え部位は当技術分野において周知である（例えばSauer et al., 1989, Nucleic Acids Res., 17:147、Gorman et al., 2000, Curr. Op. Biotechnol., 11:455、O'Gorman et al., 1991, Science, 251:1351、Kolb, 2002, Cloning Stem Cells, 4:65、Kuhn et al., 2002, Methods Mol. Biol., 180:175を参照されたい）。

20

#### 【0308】

一部の態様において、これらのリコンビナーゼは、2つの34bp認識部位（それぞれloxPおよびFRT）の間の保存型DNA組換え事象を触媒する。一部の態様では、2つのloxP部位の間にプロモーターエレメントに機能的に連結された異種核酸配列を置くことによって（この場合、前記配列は「floxed」される）、阻害性作用物質をコードする導入された核酸、例えば本明細書に記載するもののいずれかの、細胞への移入後の、制御された発現が可能になる。細胞内でCreの発現を誘導することにより、異種核酸配列は切り出され、よってさらなる転写を防止し、かつ/または前記配列の発現を効果的に排除する。一部の態様は、例えば阻害性エレメントまたはポリアデニル化部位の除去などによって異種遺伝子または内在性遺伝子が活性化されうる、Cre媒介遺伝子活性化を含む。

30

#### 【0309】

上述のように、異種核酸配列をloxP部位間に配置することにより、異種配列の、細胞への移入後の、制御された発現が可能になる。細胞内でのCre発現を誘導することにより、異種核酸配列は切り出され、よってさらなる転写を防止し、かつ/または前記配列の発現を効果的に排除することができる。Cre発現は、さまざまな方法のいずれでも誘導することができる。例えばCreは誘導性プロモーターの制御下に存在することができ、そのプロモーターを活性化することによってCre発現を誘導することができる。これに代えて、またはこれに加えて、Creの発現を指示する発現ベクターを細胞に導入することによって、Cre発現を誘導することもできる。例えば限定するわけではないがウイルスベクター、例えばレンチウイルスベクターまたはアデノウイルスベクターなど、任意の適切な発現ベクターを使用することができる。「Cre発現を誘導する」という語句は、本明細書において使用する場合、細胞内でのCreレベルの増加をもたらす任意のプロセスを指す。

40

#### 【0310】

2つのloxP部位を含むレンチウイルス移入プラスミドは、2つのloxP部位を含む標準的ベクターを使用することができる任意の応用において有用である。例えばloxP部位の間に選択可能マーカーを置くことができる。これにより、単一の細胞（またはその子孫）への複数遺伝子の逐次的および反復ターゲティングが可能になる。細胞へのfloxed選択可能マーカーを含む移入プラスミドの導入後に、安定トランスフェクタントを選択することができる。安定トランスフェクタントの単離後に、Creの誘導によってマーカーを切り出すこと

50

ができる。次に、そのマーカーを使って、前記細胞またはその子孫に第2の遺伝子をターゲティングすることができる。移入プラスミドに由来するレンチウイルスゲノムを含むレンチウイルス粒子と同じ方法で使用することができる。

#### 【0311】

一部の態様では、移入プラスミドおよびレンチウイルス粒子を使って、細胞、組織または生物における、構成的な、条件的な、可逆的な、または組織特異的な発現を達成することができる。一部の態様は、(i) 部位特異的リコンビナーゼのための部位の間に位置する異種核酸を含むレンチウイルスベクターを、細胞に送達する工程、および(ii) 前記細胞内で前記部位特異的リコンビナーゼの発現を誘導することにより、これらの細胞内での転写産物の合成を防止する工程を含む、細胞において転写産物を可逆的に発現させる方法を包含する。一部の態様によれば、部位特異的リコンビナーゼをコードする核酸は誘導性プロモーターに機能的に連結され、誘導工程は上述のように前記プロモーターを誘導することを含む。

#### 【0312】

##### E. 作用物質、遺伝子破壊分子および遺伝子破壊複合体をコードする核酸の送達

一部の局面では、RNA干渉分子、DNA標的化分子、その複合体（例えばCas9/gRNA RNP）、もしくは組み合わせなどの核酸阻害性分子であるか、または核酸阻害性分子を含むか、または核酸阻害性分子をコードする、核酸分子をコードする核酸が、細胞に投与または導入される。一部の態様において、そのような核酸分子またはその複合体は、当技術分野において周知の方法によって、T細胞などの細胞に導入することができる。そのような方法には、組換えウイルスベクター（例えばレトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス）、リポソームまたはナノ粒子の形態での導入があるが、それらに限定されるわけではない。一部の態様において、方法は、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、パーティクルボンバードメント、リン酸カルシウムトランスフェクション、細胞圧縮、スクイージングを含みうる。一部の態様では、細胞中で発現させることを考慮して、ポリヌクレオチドをベクター、より具体的にはプラスミドまたはウイルスに含めることができる。

#### 【0313】

一部の態様では、ウイルスベースおよび非ウイルスベースの遺伝子移入法を使って、T細胞などの細胞に、核酸を導入することができる。そのような方法は、培養細胞または宿主生物中の細胞に成分をコードする核酸を投与するために使用することができる。非ウイルスベクター送達系には、DNAプラスミド、RNA（例えば本明細書に記載するベクターの転写産物）、裸の核酸、およびリポソームなどの送達媒体との複合体を形成した核酸がある。核酸の非ウイルス送達の方法には、リポフェクション、ヌクレオフェクション、マイクロインジェクション、バイオリストイック法、ビロゾーム、リポソーム、イムノリポソーム、ポリカチオンまたは脂質：核酸コンジュゲート、裸のDNA、人工ビリオン、およびDNAの作用物質強化型取り込み（agent-enhanced uptake）がある。リポフェクションは、例えば米国特許第5,049,386号、同第4,946,787号、および同第4,897,355号に記載されており、リポフェクション試薬は市販されている（例えばTransfectam（商標）およびLipofectin（商標））。効率のよいポリヌクレオチドの受容体認識リポフェクションに適した力チオン性脂質および中性脂質には、FelgnerのWO 91/17424、WO 91/16024のものがある。送達は細胞への送達（例えばインピトロ投与またはエクスピボ投与）または標的組織への送達（例えばインピボ投与）であることができる。

#### 【0314】

一部の態様において、送達は、RNAまたはDNAウイルスベースの核酸送達系の使用による。ウイルスベクター送達系には、細胞への送達後にエピソームゲノムまたは組み込まれたゲノムを有するDNAウイルスおよびRNAウイルスがある。遺伝子治療の手法を概観するには、Anderson, Science 256:808-813 (1992)、Nabel & Felgner, TIBTECH 11:211-217 (1993)、Mitani & Caskey, TIBTECH 11:162-166 (1993)、Dillon, TIBTECH 11:167-175 (1993)、Miller, Nature 357:455-460 (1992)、Van Brunt, Biotechnology 6 (10) :1149

10

20

30

40

50

-1154 ( 1988 ) 、 Vigne, Restorative Neurology and Neuroscience 8:35-36 ( 1995 ) 、 Kremer & Perricaudet, British Medical Bulletin 51 ( 1 ) :31-44 ( 1995 ) 、 Haddada et al., in Current Topics in Microbiology and Immunology Doerfler and Bohm ( eds ) ( 1995 ) 、 および Yu et al., Gene Therapy 1:13-26 ( 1994 ) を参照されたい。ウイルスベースの系には、一部の態様において、遺伝子移入のための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、アデノ隨伴ウイルスベクター、および単純ヘルペスウイルスベクターが含まれる。

#### 【 0 3 1 5 】

一部の態様において、核酸は、ウイルス発現ベクターなどの発現ベクターの形態で投与される。一部の局面において、発現ベクターはレトロウイルス発現ベクター、アデノウイルス発現ベクター、DNAプラスミド発現ベクター、またはAAV発現ベクターである。一部の態様において、ウイルスベクターなどの導入されるベクターは、CARなどの遺伝子操作された抗原受容体をコードする核酸も含む。一部の態様において、核酸は、独立した発現力セットからの独立した発現を制御するためのプロモーターに機能的に連結された独立した発現力セットに載せて提供することができる。

#### 【 0 3 1 6 】

一部の局面では、遺伝子産物の発現の改変または修飾を測定するためのマーカーとして役立つ遺伝子産物をコードするために、レポーター遺伝子、例えば限定するわけではないが、グルタチオン-5-トランスフェラーゼ ( GST ) 、セイヨウワサビペルオキシダーゼ ( HRP ) 、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ ( CAT ) 、ベータ-ガラクトシダーゼ、ベータ-グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質 ( GFP ) 、HcRed、DsRed、シアノ蛍光タンパク質 ( CFP ) 、黄色蛍光タンパク質 ( YFP ) 、および青色蛍光タンパク質 ( BFP ) を含む自家蛍光タンパク質を、細胞に導入することができる。さらなる一態様では、遺伝子産物をコードするDNA分子を、ベクターによって細胞に導入することができる。一部の態様において、遺伝子産物はルシフェラーゼである。さらなる一態様では、遺伝子産物の発現を減少させる。

#### 【 0 3 1 7 】

一部の態様において、PDCD1および/またはCD274などのPD-1および/またはPD-L1をコードする遺伝子のノックダウンまたはノックアウトなどの遺伝子破壊を誘導することができる作用物質は、リボ核タンパク質 ( RNP ) 複合体などの複合体として導入される。RNP複合体は、RNA分子またはgRNA分子などのリボヌクレオチドの配列と、Cas9タンパク質またはその変異体などのポリペプチドとを含む。一部の態様において、Cas9タンパク質は、Cas9タンパク質とgRNA分子、例えばPDCD1またはCD274を標的とするgRNAとを含むRNP複合体として送達される。一部の態様において、PDCD1またはCD274を標的とする1つまたは複数のgRNA分子とCas9酵素またはその変異体とを含むRNPは、物理的送達 ( 例えばエレクトロポレーション、粒子銃、リン酸カルシウムトランスフェクション、細胞圧縮または細胞スクリーニング ) 、リポソームまたはナノ粒子によって、細胞に直接導入される。特定の態様では、PDCD1またはCD274を標的とする1つまたは複数のgRNA分子とCas9酵素またはその変異体とを含むRNPがエレクトロポレーションによって導入される。

#### 【 0 3 1 8 】

一部の態様において、さまざまな時点における、例えば作用物質の導入後24~72時間の時点における、遺伝子 ( 例えばPDCD1またはCD274 ) のノックアウトの度合は、細胞における遺伝子破壊を評価するためのいくつかの周知のアッセイをどれでも使って評価することができる。さまざまな時点における、例えば作用物質の導入後24~72時間の時点における、遺伝子 ( 例えばPDCD1またはCD274 ) のノックダウンの度合は、転写またはタンパク質発現または細胞表面発現のレベルを決定するためのアッセイなど、細胞における遺伝子発現を評価するためのいくつかの周知のアッセイをどれでも使って評価することができる。

#### 【 0 3 1 9 】

#### IV. 組成物、製剤および投与の方法

細胞および集団、ならびに細胞および集団を含有する、例えばここに提供される方法に

10

20

30

40

50

よって生成される細胞および集団を含有する、組成物（薬学的組成物および治療組成物を含む）も提供される。対象、例えば患者に前記細胞および組成物を投与するための方法、例えば治療方法も提供される。

【0320】

A. 組成物および製剤

投与するための細胞を含む組成物も、薬学的組成物および製剤、例えば、ある特定の用量で投与するための、またはある特定の用量を分けて投与するための数の細胞を含む単位剤形組成物を含めて提供される。薬学的組成物および製剤は、一般的に、1つまたは複数の任意の薬学的に許容される担体または賦形剤を含む。一部の態様において、前記組成物は、少なくとも1種類のさらなる治療剤を含む。

10

【0321】

「薬学的製剤」という用語とは、「薬学的製剤」に含まれる活性成分の生物学的活性が有効になるような形をとり、製剤が投与される対象に対して容認できないほどの毒性がある、さらなる成分を含有しない調製物を指す。

【0322】

「薬学的に許容される担体」とは、対象に無毒な、活性成分以外の、薬学的製剤中にある成分を指す。薬学的に許容される担体には、緩衝液、賦形剤、安定剤、または防腐剤が含まれるが、これに限定されない。

【0323】

一部の局面において、担体の選択は、一つには、特定の細胞および/または投与方法によって決定される。従って、様々な適切な製剤がある。例えば、薬学的組成物は防腐剤を含有してもよい。適切な防腐剤には、例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸ナトリウム、および塩化ベンザルコニウムが含まれ得る。一部の局面において、2種類以上の防腐剤の混合物が用いられる。防腐剤またはその混合物は典型的には全組成物の重量に対して約0.0001%～約2%の量で存在する。担体は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に記載されている。薬学的に許容される担体は、一般的に、使用される投与量および濃度でレシピエントに無毒であり、緩衝液、例えば、リン酸、クエン酸、および他の有機酸；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化物質；防腐剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルアルコールもしくはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えば、メチルパラベンもしくはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリジン；单糖、二糖、およびグルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む他の炭水化物；キレート剤、例えば、EDTA；糖、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロース、もしくはソルビトール；塩を形成する対イオン、例えば、ナトリウム；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；ならびに/または非イオン界面活性剤、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)を含むが、これに限定されない。

20

30

【0324】

一部の局面では、緩衝剤が前記組成物に含まれる。適切な緩衝剤には、例えば、クエン酸、クエン酸ナトリウム、リン酸、リン酸カリウム、ならびに様々な他の酸および塩が含まれる。一部の局面において、2種類以上の緩衝剤の混合物が用いられる。緩衝剤またはその混合物は典型的には全組成物の重量に対して約0.001～約4重量%の量で存在する。投与可能な薬学的組成物を調製するための方法は公知である。例示的な方法は、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005)において、さらに詳細に説明されている。

40

【0325】

前記製剤は水溶液を含んでもよい。前記製剤または組成物はまた、前記細胞で処置され

50

ている特定の適応症、疾患、または状態に有用な複数種の活性成分、好ましくは、前記細胞を補う活性を有する活性成分も含有してよく、この場合、それぞれの活性は互いに悪影響を及ぼさない。このような活性成分は、所期の目的に有効な量で組み合わせられて適切に存在する。従って、一部の態様において、薬学的組成物は、他の薬学的に活性な作用物質または薬物、例えば、化学療法剤、例えば、アスパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチニン、シスプラチニン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、フルオロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、メトトレキセート、パクリタキセル、リツキシマブ、ビンブラスチン、および/またはビンクリスチンをさらに含む。

#### 【0326】

薬学的組成物は、一部の態様では、疾患または状態を処置または予防するのに有効な量、例えば、治療的有効量または予防的有効量の細胞を含む。治療効力または予防効力は、一部の態様では、処置される対象を定期的に評価することによってモニタリングされる。望ましい投与量は細胞の単回大量瞬時投与によって送達されてもよく、細胞の複数回大量瞬時投与によって送達されてもよく、細胞の連続注入投与によって送達されてもよい。

10

#### 【0327】

前記の細胞および組成物は、標準的な投与技法、製剤、および/または装置を用いて投与され得る。前記細胞の投与は自家投与でもよく、または異種投与でもよい。例えば、ある対象から免疫応答性細胞または前駆細胞を入手し、同じ対象または異なる適合性の対象に投与することができる。末梢血に由来する免疫応答性細胞またはその子孫(例えば、インビボ、エクスピボ、またはインビトロで得られる)を、カテーテル投与を含む局所注射、全身注射、局所注射、静脈内注射、または非経口投与を介して投与することができる。治療用組成物(例えば、遺伝子組換えされた免疫応答性細胞を含有する薬学的組成物)が投与される時に、一般的に、注射用単位剤形(溶液、懸濁液、エマルジョン)の形で製剤化される。

20

#### 【0328】

製剤には、経口投与、静脈内投与、腹腔内投与、皮下投与、肺投与、経皮投与、筋肉内投与、鼻腔内投与、頬投与、舌下投与、または坐剤投与のための製剤が含まれる。一部の態様において、前記細胞集団は非経口投与される。本明細書で使用する「非経口」という用語は、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、直腸投与、腔投与、および腹腔内投与を含む。一部の態様において、前記細胞は、静脈内注射、腹腔内注射、または皮下注射による末梢全身送達を用いて対象に投与される。

30

#### 【0329】

組成物は、一部の態様では、滅菌した液体調製物、例えば、等張性水溶液、懸濁液、エマルジョン、分散液として提供されるか、または粘性のある組成物として提供され、これらは、一部の局面では、選択されたpHまで緩衝化されてもよい。液体調製物は、通常、ゲル、他の粘性のある組成物、および固体組成物より調製しやすい。さらに、液体組成物の方が、投与するのに、特に、注射によって投与するのに若干便利である。他方で、粘性のある組成物は、特定の組織との長い接触期間をもたらすように適切な粘性の範囲内で製剤化することができる。液体組成物または粘性のある組成物は、例えば、水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール)およびその適切な混合物を含有する、溶媒または分散媒でもよい担体を含んでもよい。

40

#### 【0330】

滅菌注射液は、細胞を溶媒の中に取り入れて、例えば、適切な担体、希釈剤、または賦形剤、例えば、滅菌水、生理食塩水、グルコース、デキストロースなどと混合して調製することができる。前記組成物は、望ましい投与経路および調製物に応じて、補助物質、例えば、湿潤剤、分散剤、または乳化剤(例えば、メチルセルロース)、pH緩衝剤、ゲル化または粘性を高める添加物、防腐剤、着色剤、および/または染料を含有することができる。一部の局面では、適切な調製物を調製するために標準的な教科書が調べられる場合がある。

50

## 【0331】

抗菌性防腐剤、抗酸化物質、キレート剤、および緩衝液を含む、前記組成物の安定性および無菌性を向上させる様々な添加物を添加することができる。微生物の作用は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸によって防止することができる。注射用薬学的剤形の長期吸収は、吸収を遅延させる作用物質、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを使用することによって引き起こすことができる。

## 【0332】

インビオ投与のために使用しようとする製剤は一般的に無菌である。無菌性は、例えば、滅菌濾過膜で濾過することによって、容易に成し遂げられ得る。

10

## 【0333】

## B. 養子細胞療法における細胞の投与方法および使用

細胞、集団、および組成物を投与する方法、ならびにがんを含む疾患、状態、および障害を処置または防止するためのそのような細胞、集団、および組成物の使用が提供される。一部の態様において、細胞、集団、および組成物は、処置されるべき特定の疾患または状態を有する対象または患者に、例えば養子細胞療法によって、例えば養子T細胞療法によって投与される。一部の態様において、ここに提供される方法によって調製される細胞および組成物、例えば操作された組成物ならびにインキュベーションおよび/または他の処理工程後の生産完了 (end-of-production) 組成物は、対象に、例えば前記疾患または状態を有するか、そのリスクがある対象に、投与される。一部の局面において、本方法は、それにより、操作されたT細胞が認識する抗原を発現するがんにおいて腫瘍量を低下させることなどによって、前記疾患または状態を処置、例えば前記疾患または状態の1つまたは複数の症状を改善する。

20

## 【0334】

養子細胞療法のための細胞の投与方法は公知であり、ここに提供される方法および組成物に関連して使用することができる。例えば養子T細胞治療方法は、Gruenbergらの米国特許出願公開第2003/0170238号、Rosenbergの米国特許第4,690,915号、Rosenberg (2011) *Nat Rev Clin Oncol.* 8 (10) :577-85などに記載されている。例えばThemeli et al. (2013) *Nat Biotechnol.* 31 (10) :928-933、Tsukahara et al. (2013) *Biochem Biophys Res Commun* 438 (1) :84-9、Davila et al. (2013) *PLoS ONE* 8 (4) :e61338を参照されたい。

30

## 【0335】

本明細書において用いられる場合、「対象」とは哺乳動物、例えばヒトまたは他の動物であり、典型的にはヒトである。一部の態様において、細胞、細胞集団、組成物が投与される対象、例えば患者は、哺乳動物、典型的には靈長類、例えばヒトである。一部の態様において、靈長類はサルまたは類人猿である。対象は雄または雌であることができ、乳児期、若年期、青年期、成年期、および老年期の対象を含む任意の適切な齢ができる。一部の態様において、対象は非靈長類哺乳動物、例えば齧歯類である。

## 【0336】

本明細書で使用する「処置」(およびその文法上の語尾変化、例えば、「処置する(treat)」または「処置する(treating)」)とは、疾患もしくは状態もしくは障害、あるいはこれらに関連する症状、副作用もしくはアウトカム、または表現型の完全または部分的な寛解または低減を指す。処置の望ましい治療効果には、疾患の発生または再発の阻止、症状の緩和、疾患のあらゆる直接的または間接的な病理学的結果の減少、転移の阻止、疾患進行速度の減少、疾患状態の寛解または軽減、および寛解または予後の改善が含まれるが、これに限定されない。この用語は、疾患の完治、またはあらゆる症状の完全な除去、または全ての症状もしくはアウトカムに及ぼす影響を意味しない。

40

## 【0337】

本明細書で使用する「疾患の発症を遅らせる」とは、疾患(例えば、癌)の発症を延ばす、邪魔する、遅くする、減速する、安定化する、抑制する、および/または延期すること

50

を意味する。この遅れは、病歴および/または処置されている個体に応じて様々な長さの時間でよい。当業者に明らかなように、十分な、または大きな遅れは、実際には、個体が疾患を発症しない点では予防を含む。例えば、転移の発症などの末期癌を遅らせることができる。

【0338】

本明細書で使用する「予防する」は、疾患の素因がある可能性があるがまだ疾患と診断されていない対象における疾患の発生または再発に関する予防を提供することを含む。一部の態様において、提供される細胞および組成物は、疾患の発症を遅らせるのに、または疾患の進行を遅くするのに用いられる。

【0339】

本明細書で使用する、機能または活性を「抑制する」ということは、関心対象の条件もしくはパラメータ以外は同じ条件と比較した時に、または別の条件と比較した時に機能または活性を低減することである。例えば、腫瘍成長を抑制する細胞は、前記細胞の非存在下での腫瘍成長の速度と比較して腫瘍成長の速度を低減する。

【0340】

投与の文脈において、作用物質、例えば、薬学的製剤、細胞、または組成物の「有効量」とは、望ましい結果、例えば、治療結果または予防結果を成し遂げるのに、必要な投与量/量で、かつ期間にわたって、有効な量を指す。

【0341】

作用物質、例えば、薬学的製剤または細胞の「治療的有効量」とは、望ましい治療結果、例えば、疾患、状態、もしくは障害を処置するための望ましい治療結果、および/または処置の薬物動態学的效果もしくは薬力学的效果を成し遂げるのに、必要な投与量で、かつ期間にわたって、有効な量を指す。治療的有効量は、対象の疾患状態、年齢、性別、および体重、ならびに投与される細胞集団などの要因に応じて変化する場合がある。一部の態様において、提供される方法は、有効量、例えば、治療的有効量の前記細胞および/または組成物を投与する工程を伴う。

【0342】

「予防的有効量」とは、望ましい予防結果を成し遂げるのに、必要な投与量で、かつ期間にわたって、有効な量を指す。典型的には、疾患の前に、または疾患の初期段階に対象において予防用量が用いられるので、予防的有効量は治療的有効量より少ないが、必ず治療的有効量より少ないと限らない。少ない腫瘍負荷の状況では、予防的有効量は一部の局面では治療的有効量より多い。

【0343】

一部の態様において、細胞療法、例えば、養子T細胞療法は、細胞療法を受けようとする対象から、またはこのようないくつかの対象に由来する試料から細胞が単離される、および/または別の方法で調製される自家移入によって行われる。従って、一部の局面において、前記細胞は、対象、例えば、処置および細胞を必要とする患者に由来し、単離および処理された後に同じ対象に投与される。

【0344】

一部の態様において、細胞療法、例えば、養子T細胞療法は、細胞療法を受けようとする対象、または細胞療法を最終的に受ける対象、例えば、第1の対象以外の対象から細胞が単離される、および/または別の方法で調製される同種異系移入によって行われる。このような態様では、次いで、前記細胞は、同じ種の異なる対象、例えば、第2の対象に投与される。一部の態様において、第1の対象および第2の対象は遺伝的に同一である。一部の態様において、第1の対象および第2の対象は遺伝的に似ている。一部の態様において、第2の対象は第1の対象と同じHLAクラスまたはスーパー・タイプを発現する。

【0345】

一部の態様において、対象は、細胞または細胞を含む組成物の投与前に、疾患または状態、例えば、腫瘍を標的とする治療剤で処置されたことがある。一部の局面において、対象は他の治療剤に対して抵抗性または非応答性である。一部の態様において、例えば、化

10

20

30

40

50

学療法、放射線、および/または造血幹細胞移植(HSCT)、例えば、同種異系HSCTを含む別の治療介入による処置後に、対象が持続性の疾患または再発した疾患を有する。一部の態様において、対象が別の療法に対して耐性になったのにもかかわらず、前記投与によって対象は効果的に処置される。

#### 【0346】

一部の態様において、対象は他の治療剤に対して応答性であり、この治療剤による処置は疾患負荷を低減する。一部の局面において、対象は、最初、治療剤に対して応答性であるが、時間が経つにつれて疾患または状態の再発を示す。一部の態様において、対象は再発していない。このような一部の態様では、対象は、再発のリスクがある、例えば、再発のリスクが高いと決定され、従って、前記細胞は、予防的に、例えば、再発の可能性を小さくするために、または再発を阻止するために投与される。

10

#### 【0347】

一部の局面において、対象は、別の治療剤による前処置を受けたことがない。

#### 【0348】

提供される組成物、細胞、方法、および使用を伴う処置に関する疾患、状態、および障害の中には、 固形腫瘍、 血液悪性腫瘍、 およびメラノーマを含む腫瘍、 ならびに感染症、 例えば、 ウィルスまたは他の病原体、 例えば、 HIV、 HCV、 HBV、 CMVによる感染、 ならびに寄生生物疾患がある。一部の態様において、 疾患または状態は、 腫瘍、 癌、 悪性腫瘍、 新生物、 または他の増殖性の疾患もしくは障害である。このような疾患には、 白血病、 リンパ腫、 例えば、 慢性リンパ性白血病(CLL)、 急性リンパ芽球性白血病(ALL)、 非ホジキンリンパ腫、 急性骨髓性白血病、 多発性骨髄腫、 難治性濾胞性リンパ腫、 マントル細胞リンパ腫、 無痛性B細胞リンパ腫、 B細胞悪性腫瘍、 結腸癌、 肺癌、 肝臓癌、 乳癌、 前立腺癌、 卵巣癌、 皮膚癌、 メラノーマ、 骨癌、 および脳癌、 卵巣癌、 上皮癌、 腎細胞癌、 脾臓腺癌、 ホジキンリンパ腫、 子宮頸癌、 結腸直腸癌、 グリア芽細胞腫、 神経芽細胞腫、 ユーアイング肉腫、 髄芽腫、 骨肉腫、 滑膜肉腫、 ならびに/または中皮腫が含まれるが、 これに限定されない。

20

#### 【0349】

一部の態様において、 疾患または状態は、 ウィルス感染、 レトロウィルス感染、 細菌感染、 および原生動物感染、 免疫不全症、 サイトメガロウイルス(CMV)、 エブスタイン-バー ウィルス(EBV)、 アデノウイルス、 BKポリオーマウイルスなどがあるが、 これに限定されない感染性の疾患または状態である。一部の態様において、 疾患または状態は自己免疫性または炎症性の疾患または状態、 例えば、 関節炎、 例えば、 慢性関節リウマチ(RA)、 I型糖尿病、 全身性エリテマトーデス(SLE)、 炎症性腸疾患、 乾癬、 硬皮症、 自己免疫性甲状腺疾患、 グレーブス病、 クローン病、 多発性硬化症、 喘息、 および/または移植に関連する疾患もしくは状態である。

30

#### 【0350】

一部の態様において、 疾患または障害に関連する抗原は、 オーファンチロシンキナーゼ受容体ROR1、 tEGFR、 Her2、 LI-CAM、 CD19、 CD20、 CD22、 メソテリン、 CEA、 およびB型肝炎表面抗原、 抗葉酸受容体、 CD23、 CD24、 CD30、 CD33、 CD38、 CD44、 EGFR、 EGP-2、 EGP-4、 EPHa2、 ErbB2、 3、 もしくは4、 FBP、 胎児アセチコリンe(acetylcholine e)受容体、 GD2、 GD3、 HMW-MAA、 IL-22R-、 IL-13R- 2、 kdr、 軽鎖、 ルイス(Lewis)Y、 L1-細胞接着分子、 MAGE-A1、 メソテリン、 MUC1、 MUC16、 PSCA、 NKG2Dリガンド、 NY-ESO-1、 MART-1、 gp100、 癌胎児性抗原、 ROR1、 TAG72、 VEGF-R2、 癌胎児抗原(CEA)、 前立腺特異的抗原、 PSM A、 Her2/neu、 エストロゲン受容体、 プログステロン受容体、 エフリンB2、 CD123、 CS-1、 c-Met、 GD-2、 およびMAGE A3、 ならびに/またはビオチン化分子、 ならびに/またはHIV、 HCV、 HBV、 もしくは他の病原体が発現する分子からなる群より選択される。

40

#### 【0351】

一部の態様において、 細胞は望ましい投与量で投与される。望ましい投与量には、 一部の局面において、 細胞もしくは細胞タイプの望ましい用量もしくは数および/または細胞タイプの望ましい比が含まれる。したがって、 細胞の投与量は、 一部の態様において、 細

50

胞の総数（または体重1kgあたりの数）および個々の集団またはサブタイプの望ましい比、例えばCD4+対CD8+比に基づく。一部の態様において、細胞の投与量は、個々の集団中の細胞または個々の細胞タイプの細胞の望ましい総数（または体重1kgあたりの数）に基づく。一部の態様において、投与量は、そのような特徴の組み合わせ、例えば望ましい全細胞の数、望ましい比、および個々の集団中の細胞の望ましい総数に基づく。

#### 【0352】

一部の態様において、細胞の集団またはサブタイプ、例えばCD8+T細胞およびCD4+T細胞は、全細胞の望ましい用量、例えばT細胞の望ましい用量で、またはその許容差内で、投与される。一部の局面において、望ましい用量は、細胞の望ましい数、または細胞が投与される対象の単位体重あたりの細胞の望ましい数、例えば細胞数/kgである。一部の局面において、望ましい用量は、細胞の最小数もしくは単位体重あたりの細胞の最小数であるか、それを上回る。一部の局面において、望ましい用量で投与される全細胞の中には、個々の集団またはサブタイプが、望ましいアウトプット比（例えばCD4+対CD8+比）またはその近傍で、例えばそのような比の一定の許容差内または許容誤差内で、存在する。

10

#### 【0353】

一部の態様において、細胞は、細胞の個々の集団またはサブタイプのうちの1つまたは複数の望ましい用量、例えばCD4+細胞の望ましい用量および/またはCD8+細胞の望ましい用量で、またはその許容差内で、投与される。一部の局面において、望ましい用量は、当該サブタイプまたは集団の細胞の望ましい数、または細胞を投与される対象の単位体重あたりのそのような細胞の望ましい数、例えば細胞数/kgである。一部の局面において、望ましい用量は、集団もしくはサブタイプの細胞の最小数もしくは単位体重あたりの集団もしくはサブタイプの細胞の最小数であるか、それを上回る。

20

#### 【0354】

したがって、一部の態様において、投与量は、全細胞の望ましい固定用量および望ましい比に基づき、かつ/または個々のサブタイプまたは部分母集団のうちの1つまたは複数の、例えばそれぞれの、望ましい固定用量に基づく。したがって、一部の態様において、投与量は、T細胞の望ましい固定用量または最小用量およびCD4+細胞対CD8+細胞の望ましい比に基づき、かつ/またはCD4+細胞および/もしくはCD8+細胞の望ましい固定用量または最小用量に基づく。

30

#### 【0355】

一定の態様において、細胞、または細胞のサブタイプの個々の集団は、細胞約100万～約1000億個の範囲、例えば細胞100万～約500億個（例えば細胞約500万個、細胞約2500万個、細胞約5億個、細胞約10億個、細胞約50億個、細胞約200億個、細胞約300億個、細胞約400億個、または前記の値のいずれか2つによって画定される範囲）、例えば細胞約1000万～約1000億個（例えば細胞約2000万個、細胞約3000万個、細胞約4000万個、細胞約6000万個、細胞約7000万個、細胞約8000万個、細胞約9000万個、細胞約100億個、細胞約250億個、細胞約500億個、細胞約750億個、細胞約900億個、または前記の値のいずれか2つによって画定される範囲）、および場合によっては細胞約1億～細胞約500億個（例えば細胞約1億2000万個、細胞約2億5000万個、細胞約3億5000万個、細胞約4億5000万個、細胞約6億5000万個、細胞約8億個、細胞約9億個、細胞約30億個、細胞約300億個、細胞約450億個）、またはこれらの範囲内の任意値で、対象に投与される。

40

#### 【0356】

一部の態様において、全細胞の用量および/または細胞の個々の部分母集団の用量は、104～109個の細胞/キログラム（kg）体重またはその前後、例えば105～106個の細胞/kg体重の範囲内にあり、例えば少なくとも $1 \times 105$ 個の細胞/kg、 $1.5 \times 105$ 個の細胞/kg、 $2 \times 105$ 個の細胞/kg、もしくは $1 \times 106$ 個の細胞/kg体重、もしくはその前後、または少なくとも約 $1 \times 105$ 個の細胞/kg、約 $1.5 \times 105$ 個の細胞/kg、約 $2 \times 105$ 個の細胞/kg、もしくは約 $1 \times 106$ 個の細胞/kg体重、もしくはその前後、または $1 \times 105$ 個の細胞/kg、 $1.5 \times 105$ 個の細胞/kg、 $2 \times 105$ 個の細胞/kg、もしくは $1 \times 106$ 個の細胞/kg体重、もしくはその前後である。例えば一部の態様において、細胞は、104～109個のT細胞/キログラム（kg）体重もしくはその

50

前後で、またはその一定の誤差範囲内で、例えば105～106個のT細胞/kg体重で、例えば少なくとも $1 \times 105$ 個のT細胞/kg、 $1.5 \times 105$ 個のT細胞/kg、 $2 \times 105$ 個のT細胞/kg、もしくは $1 \times 106$ 個のT細胞/kg体重、もしくはその前後、または少なくとも約 $1 \times 105$ 個のT細胞/kg、約 $1.5 \times 105$ 個のT細胞/kg、約 $2 \times 105$ 個のT細胞/kg、もしくは約 $1 \times 106$ 個のT細胞/kg体重、もしくはその前後、または $1 \times 105$ 個のT細胞/kg、 $1.5 \times 105$ 個のT細胞/kg、 $2 \times 105$ 個のT細胞/kg、もしくは $1 \times 106$ 個のT細胞/kg体重、もしくはその前後で投与される。

#### 【0357】

一部の態様において、細胞は、104～約109個のCD4+細胞および/またはCD8+細胞/キログラム(kg)体重もしくはその前後、またはその一定の誤差範囲内で、例えば105～106個のCD4+細胞および/またはCD8+細胞/kg体重、例えば少なくとも $1 \times 105$ 個のCD4+細胞および/もしくはCD8+細胞/kg、 $1.5 \times 105$ 個のCD4+細胞および/もしくはCD8+細胞/kg、または $1 \times 106$ 個のCD4+細胞および/もしくはCD8+細胞/kg体重、またはその前後、あるいは少なくとも約 $1 \times 105$ 個のCD4+細胞および/もしくはCD8+細胞/kg、約 $1.5 \times 105$ 個のCD4+細胞および/もしくはCD8+細胞/kg、約 $2 \times 105$ 個のCD4+細胞および/もしくはCD8+細胞/kg、または約 $1 \times 106$ 個のCD4+細胞および/もしくはCD8+細胞/kg体重、またはその前後、あるいは $1 \times 105$ 個のCD4+細胞および/もしくはCD8+細胞/kg、 $1.5 \times 105$ 個のCD4+細胞および/もしくはCD8+細胞/kg、または約 $1 \times 106$ 個のCD4+細胞および/もしくはCD8+細胞/kg体重、またはその前後で、投与される。

#### 【0358】

一部の態様において、細胞は、少なくとも $1 \times 106$ 、約 $2.5 \times 106$ 、約 $5 \times 106$ 、約 $7.5 \times 106$ 、もしくは約 $9 \times 106$ 個のCD4+細胞、および/または少なくとも約 $1 \times 106$ 、約 $2.5 \times 106$ 、約 $5 \times 106$ 、約 $7.5 \times 106$ 、もしくは約 $9 \times 106$ 個のCD8+細胞、またはその一定の誤差範囲内、および/またはそれ以上、かつ/または少なくとも約 $1 \times 106$ 、約 $2.5 \times 106$ 、約 $5 \times 106$ 、約 $7.5 \times 106$ 個、もしくは約 $9 \times 106$ 個のT細胞で、投与される。一部の態様において、細胞は、約108～1012個もしくは約1010～1011個のT細胞、約108～1012個もしくは約1010～1011個のCD4+細胞、および/または約108～1012個もしくは約1010～1011個のCD8+細胞で、またはその一定の誤差範囲内で、投与される。

#### 【0359】

一部の態様において、細胞は、複数の細胞集団またはサブタイプ、例えばCD4+細胞およびCD8+細胞またはサブタイプの望ましいアウトプット比で、またはその許容範囲内、投与される。一部の局面において、望ましい比は、具体的な比であるか、ある範囲の比であることができ、例えば一部の態様において、望ましい比(例えばCD4+細胞対CD8+細胞)は、約5:1～約5:1またはその前後(または約1:5超かつ約5:1未満)、または約1:3～約3:1またはその前後(または約1:3超かつ約3:1未満)、例えば約2:1～約1:5またはその前後(または約1:5超かつ約2:1未満、例えば約5:1、4.5:1、4:1、3.5:1、3:1、2.5:1、2:1、1.9:1、1.8:1、1.7:1、1.6:1、1.5:1、1.4:1、1.3:1、1.2:1、1.1:1、1:1、1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.7、1:1.8、1:1.9、1:2、1:2.5、1:3、1:3.5、1:4、1:4.5、もしくは1:5またはその前後である。一部の局面において、許容差は、望ましい比の約1%、約2%、約3%、約4%、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%以内であり、これらの範囲の間の任意の値を含む。

#### 【0360】

疾患の予防または処置のために、適切な投与量は、治療される疾患のタイプ、細胞または組換え受容体のタイプ、疾患の重症度および経過、細胞が治療目的または予防目的で投与されるかどうか、以前の療法、患者の病歴、細胞に対応する応答、ならびに主治医の判断に左右されることがある。前記組成物および細胞は、一部の態様では、一度に、または一連の処置にわたって対象に適切に投与される。

#### 【0361】

前記細胞は、任意の適切な手段によって、例えば、大量瞬時注入によって、注射、例えば、静脈内注射または皮下注射、眼内注射、眼周囲注射、網膜下注射、硝子体内注射、経

10

20

30

40

50

中隔注射、強膜下注射、脈絡膜内注射、眼房内(intracamerai)注射、結膜下(subconjunctival)注射、結膜下(subconjunctival)注射、テノン囊下注射、眼球後注射、眼球周囲注射、または後強膜近傍(posterior juxtascleral)送達によって投与することができる。一部の態様において、前記細胞は、非経口投与、肺内投与、および鼻腔内投与によって、所望であれば、局所処置の場合、病巣内投与によって投与される。非経口注入には、筋肉内投与、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内投与、または皮下投与が含まれる。一部の態様において、ある特定の用量が前記細胞の単回大量瞬時投与によって投与される。一部の態様において、ある特定の用量が、前記細胞の複数回大量瞬時投与によって、例えば、3日以下の期間にわたって送達されるか、または前記細胞の連続注入投与によって送達される。

#### 【0362】

10

一部の態様において、前記細胞は、組み合わせ処置の一部として、例えば、別の治療介入、例えば、抗体または操作された細胞または受容体または作用物質、例えば、細胞傷害剤または治療剤とともに、または任意の順番で連続して投与される。前記細胞は、一部の態様では、1種類もしくは複数種のさらなる治療剤と一緒に、または別の治療介入と共に、同時に、または任意の順番で連続して同時投与される。ある状況では、前記細胞は、前記細胞集団が1種類もしくは複数種のさらなる治療剤の効果を強化するような十分に短い期間で別の療法と一緒に同時投与されるか、または逆もまた同じである。一部の態様において、前記細胞は、1種または複数種のさらなる治療剤の前に投与される。一部の態様において、前記細胞は、1種または複数種のさらなる治療剤の後に投与される。一部の態様において、1種または複数種のさらなる作用物質は、例えば、持続性を強化するために、サイトカイン、例えば、IL-2を含む。一部の態様において、前記方法は、化学療法剤を投与することを含む。

#### 【0363】

20

前記細胞が投与された後、一部の態様において、操作された細胞集団の生物学的活性は、例えば、多数の公知の方法のいずれかで測定される。評価するパラメータには、インビオでは、例えば、画像化による、またはエクスピオでは、例えば、ELISAもしくはフローサイトメトリーによる、操作された、もしくは天然のT細胞または他の免疫細胞と抗原との特異的結合が含まれる。ある特定の態様において、操作された細胞が標的細胞を破壊する能力は、当技術分野において公知の任意の適切な方法、例えば、細胞傷害アッセイ、例えば、Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009)およびHerman et al. J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004)に記載の細胞傷害アッセイを用いて測定することができる。ある特定の態様において、前記細胞の生物学的活性は、1つまたは複数のサイトカイン、例えば、CD107a、IFN、IL-2、およびTNFの発現および/または分泌をアッセイすることで測定される。一部の局面において、生物学的活性は、臨床アウトカム、例えば、腫瘍負荷(tumor burden)または腫瘍量(tumor load)の低減を評価することによって測定される。

#### 【0364】

30

ある特定の態様では、操作された細胞は、治療効力または予防効力が向上するように任意の数のやり方でさらに改変される。例えば、集団によって発現される操作されたCARまたはTCRは、リンカーを介して標的化部分と直接的または間接的に結合体化することができる。化合物、例えば、CARまたはTCRを標的化部分に結合体化する手法は当技術分野において公知である。例えば、Wadwa et al., J. Drug Targeting 3: 111 (1995)および米国特許第5,087,616号を参照されたい。

#### 【0365】

40

#### 投薬スケジュールまたは投薬計画

一部の態様において、細胞の第1の用量が与えられ、その後に1つまたは複数の第2の連続用量が与えられる、反復投与法が提供される。細胞の複数の用量のタイミングおよびサイズは一般的に、養子療法において対象に投与されたときに、抗原を発現するT細胞、例えばCAR発現T細胞の効力および/または活性および/または機能を増加させるように設計される。一部の態様において、反復投薬は、抗原発現T細胞、例えばCAR発現T細胞上で阻害

50

性免疫分子、例えばPD-1および/またはPD-L1がアップレギュレートされるときに起こりうる、ダウンレギュレーションまたは阻害活性を低下させる。前記方法は、第1の用量を投与し、一般的には、その後に1つまたは複数の連続用量を投与する工程を伴い、異なる用量の間には特定の時間枠がある。

#### 【0366】

養子細胞療法の状況では、所与の「用量」の投与とは、所与の量または数の細胞を、単回組成物投与および/またはとぎれない(uninterrupted)単回投与として、例えば単回注射または連続注入として投与することを包含し、かつまた、所与の量または数の細胞を、複数の個々の組成物または注入の形で提供される分割用量として3日以内の特定の期間にわたって投与することも包含する。従って、ある状況では、第1の用量または連続用量は、1つの時点で与えられるか、または開始する、特定の数の細胞の単回投与または連続投与である。しかしながら、ある状況では、第1の用量または連続用量は、3日以内の期間にわたる、例えば、3日もしくは2日にわたる1日1回の、複数回の注射もしくは注入の形で投与されるか、または1日にわたる複数回の注入によって投与される。

10

#### 【0367】

従って、一部の局面において、細胞の第1の用量は単一の薬学的組成物の状態で投与される。一部の態様において、細胞の連続用量は単一の薬学的組成物の状態で投与される。

#### 【0368】

一部の態様において、第1の用量の細胞は複数の組成物の状態で投与され、複数の組成物は、合計で第1の用量の細胞を含有する。一部の態様において、連続用量の細胞は複数の組成物の状態で投与され、複数の組成物は、合計で連続用量の細胞を含有する。一部の局面において、追加の連続用量は、3日以下の期間にわたって複数の組成物の状態で投与されてもよい。

20

#### 【0369】

「分割用量」という用語は、数日にわたって投与されるように分割された用量を指す。このタイプの投薬は本発明の方法に包含され、単一用量とみなされる。

#### 【0370】

従って、第1の用量および/または連続用量は一部の局面では分割用量として投与されてもよい。例えば、一部の態様において、用量は2日または3日にわたって対象に投与されてもよい。分割投薬のための例示的な方法は、初日に用量の25%を投与する工程と、2日目に用量の残りの75%を投与する工程を含む。他の態様において、初日に第1の用量の33%が投与されてもよく、2日目に残りの67%が投与されてもよい。一部の局面において、初日に用量の10%が投与され、2日目に用量の30%が投与され、3日目に用量の60%が投与される。一部の態様において、分割用量は3日を超えて広がらない。

30

#### 【0371】

事前用量、例えば第1の用量に関連して、「連続用量」という用語は、事前用量、例えば第1の用量の後に同じ対象に投与される用量であって、その合間にいかなる介在用量(intervening dose)も対象に投与されていない、用量を指す。しかしこの用語は、単一の分割用量の中に含まれる一連の注入または注射における第2の、第3の、またはそれ以降の注射または注入を包含しない。従って、他で特定しない限り、1日、2日、または3日の期間内での第2の注入は、本明細書で使用する「連続」用量とみなされない。同様に、分割用量に含まれる一連の複数の用量における2回目、3回目なども、「連続」用量の意味に関連しては、「介在」用量とみなされない。従って、他で特定しない限り、第1の用量または事前用量の開始後、3日を超える、ある特定の期間に投与される用量は、第1の用量の開始後に第2の、またはその後の細胞の注射または注入が対象に与えられたとしても、第2の、またはその後の注射または注入が第1の用量または事前用量の開始後、3日の期間内に行われている限り、「連続」用量とみなされる。

40

#### 【0372】

従って、他で特定しない限り、3日までの期間にわたって同じ細胞を複数回投与することは単一用量とみなされ、初回投与の3日以内に細胞を投与することは、第2の用量が第1

50

の用量と「連続」しているかどうかを決定する目的では連続用量とみなされず、介在用量とみなされない。

#### 【0373】

一部の態様では、複数の連続用量が、一部の局面では、第1の用量と第1の連続用量との間のタイミングに関するものと同じタイミングガイドラインを用いて、例えば、第1の用量と複数の連続用量を投与することによって与えられ、それぞれの連続用量は、投与された第1の用量から、対象中の細胞においてPD-1および/またはPD-L1などの阻害性免疫分子がアップレギュレートされている期間内に与えられる。連続用量を与えるべき時を、例えば末梢血または他の体液からのCAR発現細胞などの抗原発現細胞におけるPD-1および/PD-L1のレベルを評価することなどによって、実験的に決定することは、当業者の水準内にある。

10

#### 【0374】

一部の態様において、第1の用量と第1の連続用量との間、または第1の用量と複数の連続用量との間のタイミングは、各連続用量が約5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、もしくは28日より長い期間内に与えられるようなタイミングである。一部の態様において、連続用量は、第1の用量または直前の用量の投与の後、約28日より短い期間内に与えられる。さらなる複数の追加の連続用量は、後続用量またはその後の連続用量とも呼ばれる。

20

#### 【0375】

細胞の第1の用量および/または1つもしくは複数の連続用量のサイズは、一般的に、効力を改善し、かつ/または毒性のリスクを低減するように設計される。一部の局面において、第1の用量または任意の連続用量の投与量またはサイズは、上記の任意の投与量である。一部の局面において、第1の用量または任意の連続用量における細胞の数は、それぞれ両端の値を含めて約 $0.5 \times 10^6$ 個の細胞/kg対象体重～ $5 \times 10^6$ 個の細胞/kg、約 $0.75 \times 10^6$ 個の細胞/kg～ $3 \times 10^6$ 個の細胞/kg、または約 $1 \times 10^6$ 個の細胞/kg～ $2 \times 10^6$ 個の細胞/kgである。

20

#### 【0376】

本明細書で使用する「第1の用量」は、ある特定の用量のタイミングが、連続用量または後続用量の投与前に行われることを説明するのに用いられる。この用語は、対象に、ある用量の細胞療法が今までに与えられたことがないこと、あるいはさらに、対象に、ある用量の同じ細胞または同じ組換え受容体を発現する細胞もしくは同じ抗原を標的化する細胞が今までに与えられたことがないことを意味するとは限らない。

30

#### 【0377】

一部の態様において、連続用量において細胞によって発現される受容体、例えば、CARは、第1の用量の細胞によって発現される受容体、例えば、CARとして、少なくとも1つの免疫反応性エピトープを含有する。一部の局面において、連続用量で投与される細胞によって発現される受容体、例えば、CARは、第1の用量で投与される細胞によって発現される受容体、例えば、CARと同一であるか、または第1の用量で投与される細胞によって発現される受容体、例えば、CARと実質的に同一である。

40

#### 【0378】

様々な用量で対象に投与される細胞によって発現される組換え受容体、例えば、CARは、一般的に、処置されている疾患もしくは状態またはその細胞において発現している分子、それに関連する分子、および/またはそれに特異的な分子を認識するか、またはそれに特異的に結合する。この分子、例えば、抗原に特異的に結合すると、受容体は、一般的に、免疫賦活性シグナル、例えば、ITAMによって伝達されるシグナルを細胞に送達し、それによって、疾患または状態に標的化された免疫応答を促進する。例えば、一部の態様において、第1の用量の細胞は、疾患または状態の細胞もしくは組織によって発現される抗原または疾患もしくは状態に関連する抗原に特異的に結合するCARを発現する。

#### 【0379】

50

## V. 定義

本明細書で使用する「約」という用語は、この技術分野の当業者に容易に分かる、それぞれの値の通常の誤差範囲を指す。本明細書における「約」のついた値またはパラメータについての言及は、その値またはパラメータそのものに向けられた態様を含む(およびその態様について説明している)。

## 【0380】

本明細書で使用する単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、特に文脈によってはっきり示されていない限り複数の指示物を含む。例えば、「1つの(a)」または「1つの(an)」は「少なくとも1つの」または「1つまたは複数の」を意味する。

## 【0381】

本開示全体を通じて、クレームされた対象の様々な局面が範囲の形で示される。範囲の形での説明は単なる便宜および簡略のためであり、クレームされた対象の範囲に対する融通の利かない限定として解釈してはならないと理解されるはずである。従って、範囲の説明は、可能性のある全ての部分範囲(sub-range)ならびにその範囲内にある個々の数値を具体的に開示したとみなされるはずである。例えば、値の範囲が示された場合、その範囲の上限と下限との間の、間にあるそれぞれの値と、その述べられた範囲内にある他の任意の述べられた値または間にある値が、クレームされた対象に包含されると理解される。これらのさらに小さな範囲の上限および下限は、独立して、その小さな範囲に含まれてもよく、その述べられた範囲内にある、明確に除外されるあらゆる限界を条件としてクレームされた対象にも包含される。述べられた範囲が限界の一方または両方を含む場合、それらの含まれる限界のいずれかまたは両方を除外する範囲もまた、クレームされた対象に含まれる。このことは範囲の幅に関係なく適用される。

## 【0382】

本明細書にいう「アミノ酸配列同一性パーセント(%)」および「同一性パーセント」は、それがアミノ酸配列(参照ポリペプチド配列)に関して使用される場合には、保存的置換はいずれも配列同一性の一部であるとみなさずに最大のパーセント配列同一性が得られるように配列をアライメントし、必要であればギャップを導入した後に、参照ポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である候補配列(例えばストレプトアビジンムテイン)中のアミノ酸残基のパーセンテージと定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定するためのアライメントは、当技術分野における技量内のさまざまな方法で、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGNまたはMegalign(DNASTAR)ソフトウェアなどの公に利用可能なコンピュータソフトウェアを使って、達成することができる。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大アライメントを得るために必要な任意のアルゴリズムを含めて、配列をアライメントするための適当なパラメータを決定することができる。

## 【0383】

アミノ酸置換は、ポリペプチド中のあるアミノ酸の別のアミノ酸による置き換えを含みうる。アミノ酸は一般に以下に挙げる共通の側鎖特性に従ってグループ分けすることができる。

- (1) 疎水性: ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile;
- (2) 中性親水性: Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;
- (3) 酸性: Asp、Glu;
- (4) 塩基性: His、Lys、Arg;
- (5) 鎖の配向に影響を及ぼす残基: Gly、Pro;
- (6) 芳香族: Trp、Tyr、Phe。

## 【0384】

非保存的アミノ酸置換は、これらのクラスのうちの一つのメンバーを別のクラスと交換することを伴う。

## 【0385】

本明細書にいう対象は、任意の生きている生物、例えばヒトおよび他の哺乳動物を含む。哺乳動物には、ヒトおよびヒト以外の動物、例えば農用動物、競技用動物、齧歯類

10

20

30

30

40

50

およびペットが含まれるが、それらに限定されるわけではない。

【0386】

本明細書にいう組成物とは、細胞を含む2つ以上の生成物、物質、または化合物の任意の混合物を指す。これは、溶液、懸濁液、液体、粉末、ペースト、水性液、非水性液、またはそれらの任意の組み合わせでありうる。

【0387】

本明細書にいう「濃縮する」は、1つまたは複数の特定細胞タイプまたは細胞集団についていう場合、例えば組成物中の細胞の総数または組成物の体積と比較して、または他の細胞タイプとの比較において、当該細胞タイプまたは細胞集団の数またはパーセンテージを、例えば当該集団または細胞が発現するマーカーに基づく正の選択によって、または枯渇させるべき細胞集団または細胞上に存在しないマーカーに基づく負の選択によって、増加させることを指す。この用語は、組成物からの他の細胞、細胞タイプ、または集団の完全な除去を必要とせず、そうして濃縮された細胞が濃縮粗製物中に100%存在することも、さらには100%近く存在することも要求しない。

10

【0388】

本明細書で使用する、細胞または細胞集団が特定のマーカーについて「陽性」であるという記載は、特定のマーカー、典型的には表面マーカーが細胞の表面に、または細胞の中に検出可能に存在することを指す。表面マーカーを指している場合、この用語は、フローサイトメトリーによって、例えば、マーカーに特異的に結合する抗体で染色し、この抗体を検出することによって検出される時に表面発現が存在することを指す。ここで、染色は、フローサイトメトリーによって、他の点では同一の条件下で、アイソタイプが一致する対照またはfluorescence minus one (FMO) ゲーティング対照を用いた同じ手順を行って検出される染色をかなり上回るレベルで、および/またはマーカーが陽性であることが分かっている細胞のレベルと実質的に類似するレベルで、および/またはマーカーが陰性であることが分かっている細胞のレベルよりかなり高いレベルで検出することができる。

20

【0389】

本明細書で使用する、細胞または細胞集団が特定のマーカーについて「陰性」であるという記載は、特定のマーカー、典型的には表面マーカーが細胞の表面に、または細胞の中に実質的に検出可能に存在することが無いことを指す。表面マーカーを指している場合、この用語は、フローサイトメトリーによって、例えば、マーカーに特異的に結合する抗体で染色し、この抗体を検出することによって検出される時に表面発現が存在しないことを指す。ここで、染色は、フローサイトメトリーによって、他の点では同一の条件下で、アイソタイプが一致する対照またはfluorescence minus one (FMO) ゲーティング対照を用いた同じ手順を行って検出される染色をかなり上回るレベルで、および/またはマーカーが陽性であることが分かっている細胞のレベルよりかなり低いレベルで、および/またはマーカーが陰性であることが分かっている細胞のレベルと比較して実質的に類似するレベルで検出されない。

30

【0390】

本明細書で使用する「ベクター」という用語とは、連結されている別の核酸を増やすことができる核酸分子を指す。この用語は、自己複製核酸構造であるベクター、ならびに導入されている宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターを含む。ある特定のベクターは、機能的に連結されている核酸の発現を起こすことができる。このようなベクターは本明細書において「発現ベクター」と呼ばれる。

40

【0391】

## VI. 例示的な態様

例示的な態様の中には、以下のものがある：

1. (a) 抗原に特異的に結合する遺伝子操作された抗原受容体、および
    - (b) PD-L1の発現を低減する、またはPD-L1の発現の低減を引き起こすことができる、阻害性核酸分子
- を含む、操作されたT細胞。

50

2. 前記阻害性核酸分子がRNA干渉作用物質を含む、態様1の細胞。
3. 前記阻害性核酸が、低分子干渉RNA (siRNA)、マイクロRNA適合shRNA、短鎖ヘアピンRNA (shRNA)、ヘアピンsiRNA、前駆体マイクロRNA (pre-miRNA) もしくはマイクロRNA (miRNA) であるか、またはそれを含むか、またはそれをコードする、態様1または態様2の細胞。
4. 前記阻害性核酸分子がPD-L1コード核酸に相補的な配列を含む、態様1～3のいずれかの細胞。
5. 前記阻害性核酸分子がPD-L1コード核酸に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、態様1の細胞。
6. (a) 抗原に特異的に結合する遺伝子操作された抗原受容体、および  
(b) 破壊されたPD-L1遺伝子、PD-L1遺伝子を破壊するための作用物質、および/またはPD-L1コード遺伝子の破壊  
を含む、遺伝子操作されたT細胞。 10
7. 前記遺伝子の破壊が、遺伝子編集ヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列核酸 (CRISPR) /Cas9、および/またはTALエフェクターヌクレアーゼ (TALEN) によって媒介される、態様6の細胞。
8. 前記破壊が、前記遺伝子の少なくとも1つのエクソンの少なくとも一部分の欠失を含む、態様6または態様7の細胞。
9. 前記破壊が、前記遺伝子における中途停止コドンの存在をもたらす前記遺伝子中の欠失、変異、および/または挿入を含み、かつ/または  
前記破壊が、前記遺伝子の第1または第2エクソン内での欠失、変異、および/または挿入を含む、態様6～8のいずれかの細胞。 20
10. 前記T細胞におけるPD-L1の発現が、前記阻害性核酸分子もしくは遺伝子破壊が存在しない前記T細胞またはその活性化を欠く前記T細胞における発現と比較して、少なくとも50、60、70、80、90、または95%低減される、態様1～9のいずれかの細胞。
11. (a) 抗原に特異的に結合する遺伝子操作された抗原受容体、および  
(b) 細胞におけるPD-1またはPD-L1の発現を低減または妨害する分子をコードするポリヌクレオチド  
を含み、前記ポリヌクレオチドの発現または活性が条件的である、遺伝子操作されたT細胞。 30
12. 前記発現が、条件的なプロモーターまたはエンハンサーまたはトランスクレアーターの制御下にある、態様11の細胞。
13. 前記条件的なプロモーターまたはエンハンサーまたはトランスクレアーターが、誘導性のプロモーター、エンハンサー、もしくはトランスクレアーター、または抑制性のプロモーター、エンハンサー、またはトランスクレアーターである、態様12の細胞。
14. PD-1またはPD-L1の発現を低減または妨害する前記分子が、当該遺伝子に特異的に結合する、当該遺伝子を特異的に認識する、もしくは当該遺伝子に特異的にハイブリダイズするアンチセンス分子、siRNA、shRNA、miRNA、遺伝子編集ヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼタンパク質 (ZFN)、TALエフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、もしくは、CRISPR-Cas9の組み合わせであるか、またはそれを含むか、またはそれをコードする、態様13の遺伝子操作されたT細胞。 40
15. 前記プロモーターが、RNA pol I、RNA pol IIまたはRNA pol IIIプロモーターの中から選択される、態様12～14のいずれかの細胞。
16. 前記プロモーターが、  
U6もしくはH1プロモーターであるpol IIIプロモーター、または  
CMV、SV40初期領域もしくはアデノウイルス主要後期プロモーターであるpol IIプロモーター  
から選択される、態様15の細胞。
17. 前記プロモーターが誘導性プロモーターである、態様12～16のいずれかの細胞。
18. 前記プロモーターが、Lacオペレーター配列、テトラサイクリンオペレーター配列 50

、ガラクトースオペレーター配列もしくはドキシサイクリンオペレーター配列を含むか、またはその類似体である、態様17の細胞。

19. 前記プロモーターが抑制性プロモーターである、態様12～16のいずれかの細胞。

20. 前記プロモーターが、Lac抑制性エレメントもしくはテトラサイクリン抑制性エレメントを含むか、またはその類似体である、態様19の細胞。

21. 前記T細胞がCD4+T細胞またはCD8+T細胞である、態様1～20のいずれかの細胞。

22. 前記遺伝子操作された抗原受容体が機能的な非T細胞受容体である、態様1～21のいずれかの細胞。

23. 前記遺伝子操作された抗原受容体がキメラ抗原受容体（CAR）である、態様1～22のいずれかの細胞。 10

24. 前記CARが、前記抗原に特異的に結合する細胞外抗原認識ドメインと、ITAMを含む細胞内シグナル伝達ドメインとを含む、態様23の細胞。

25. 前記細胞内シグナル伝達ドメインが、CD3-ゼータ（CD3 $\zeta$ ）鎖の細胞内ドメインを含む、態様24の細胞。

26. 前記CARが補助刺激シグナル伝達領域をさらに含む、態様24または態様25の細胞。

27. 前記補助刺激シグナル伝達領域がCD28または4-1BBのシグナル伝達ドメインを含む、態様26の細胞。

28. 前記補助刺激ドメインがCD28である、態様26または態様27の細胞。

29. ヒト細胞である、態様1～28のいずれかの細胞。

30. 単離された細胞である、態様1～29のいずれかの細胞。 20

31. 抗原受容体（CAR）をコードする、任意で第1の発現力セットである第1の核酸と、PD-1またはPD-L1に対する阻害性核酸分子をコードする、任意で第2の発現力セットである第2の核酸とを含む、核酸分子。

32. 前記阻害性核酸分子がRNA干渉作用物質を含む、態様31の核酸分子。

33. 前記阻害性核酸が、低分子干渉RNA（siRNA）、マイクロRNA適合shRNA、短鎖ヘアピンRNA（shRNA）、ヘアピンsiRNA、前駆体マイクロRNA（pre-miRNA）もしくはマイクロRNA（miRNA）であるか、またはそれを含むか、またはそれをコードする、態様31または態様32の核酸分子。

34. 前記阻害性核酸がPD-L1コード核酸に相補的な配列を含む、態様31～33のいずれかの核酸分子。 30

35. 前記阻害性核酸分子がPD-L1コード核酸に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、態様31の核酸分子。

36. 前記抗原受容体が機能的な非T細胞受容体である、態様31～35のいずれかの核酸分子。

37. 前記遺伝子操作された抗原受容体がキメラ抗原受容体（CAR）である、態様31～36のいずれかの核酸分子。

38. 前記CARが、前記抗原に特異的に結合する細胞外抗原認識ドメインと、ITAMを含む細胞内シグナル伝達ドメインとを含む、態様37の核酸分子。

39. 前記細胞内シグナル伝達ドメインがCD3-ゼータ（CD3 $\zeta$ ）鎖の細胞内ドメインを含む、態様38の核酸分子。 40

40. 前記CARが補助刺激シグナル伝達領域をさらに含む、態様38または態様39の核酸分子。

41. 前記補助刺激シグナル伝達領域が、CD28または4-1BBのシグナル伝達ドメインを含む、態様40の核酸分子。

42. 前記補助刺激ドメインがCD28である、態様40または態様41の核酸分子。

43. 前記第1および第2の核酸、任意で前記第1および第2の発現力セットが、同じまたは異なるプロモーターに機能的に連結されている、態様31～42のいずれかの核酸分子。

44. 前記第1の核酸、任意で第1の発現力セットが、誘導性プロモーターまたは抑制性プロモーターに機能的に連結され、前記第2の核酸、任意で第2の発現力セットが、構成的プロモーターに機能的に連結されている、態様31～43のいずれかの核酸分子。 50

45. 単離されている、態様31～44のいずれかの核酸分子。

46. 態様31～45のいずれかの核酸分子を含むベクター。

47. プラスミド、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、またはアデノ隨伴ウイルスベクターである、態様46のベクター。

48. インテグラーゼ欠損性である、態様47のベクター。

49. 態様31～45のいずれかの核酸分子または態様46～48のいずれかのベクターを含むT細胞。

50. CD4+T細胞またはCD8+T細胞である、態様49のT細胞。

51. ヒト細胞である、態様49または態様50のT細胞。

52. 単離されている、態様49～51のいずれかのT細胞。

53. 態様1～30または態様49～52のいずれかの細胞と薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物。

54. (a) 抗原に特異的に結合する遺伝子操作された抗原受容体を、T細胞を含む細胞の集団に導入する工程、ならびに

(b) 前記細胞の集団に、作用物質が導入されていない対応する細胞の集団中のT細胞における1つまたは複数の条件下でのインキュベーション時のPD-L1の発現および/またはアップレギュレーションと比較して前記集団中のT細胞におけるPD-L1の発現の低減をもたらすことができかつ/またはPD-L1のアップレギュレーションを阻害することができる前記作用物質を、前記1つまたは複数の条件下でのインキュベーション時に導入する工程を含み、工程(a)および(b)を同時にまたは任意の順序で逐次的に実行することによって、前記集団中のT細胞に前記遺伝子操作された抗原受容体および前記作用物質を導入する、遺伝子操作されたT細胞を生成する方法。

55. T細胞に、作用物質が導入されていない対応するT細胞における1つまたは複数の条件下でのインキュベーション時のPD-L1の発現および/またはアップレギュレーションと比較して前記細胞におけるPD-L1の発現の低減をもたらすことができかつ/またはPD-L1のアップレギュレーションを阻害することができる前記作用物質を、前記1つまたは複数の条件下でのインキュベーション時に導入する工程

を含み、該T細胞が、抗原に特異的に結合する遺伝子操作された抗原受容体を含む、遺伝子操作されたT細胞におけるPD-L1の発現を調節する方法。

56. 抗原の存在を含む条件下でのインキュベーションが、前記作用物質が導入されていないT細胞を含む対応する集団において、PD-L1の発現またはアップレギュレーションを誘導する、態様54または態様55の方法。

57. 抗原の存在下でのインキュベーションが、前記細胞を前記抗原と共にインピトロでインキュベートすることを含む、態様56の方法。

58. 抗原の存在下でのインキュベーションが、それぞれ両端の値を含めて2時間～48時間、6時間～30時間、または12時間～24時間であるか、あるいは48時間未満、36時間未満、または24時間未満である、態様57の方法。

59. 前記インキュベーションが、前記操作された抗原受容体が該インキュベーションの少なくとも一部にわたって前記抗原に特異的に結合する条件下での、対象への前記細胞の投与を含む、態様56の方法。

60. 前記インキュベーションが、前記対象への細胞の投与後24時間、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日の期間内に、発現またはアップレギュレーションを誘導する、態様59の方法。

61. PD-L1の発現の低減またはアップレギュレーションの阻害が、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%もしくはそれ以上、または少なくとも約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%もしくはそれ以上である、態様54～60のいずれかの方法。

62. エクスピボで行われる、態様54～61のいずれかの方法。

63. (b) の導入する工程が、前記作用物質をコードする配列を含む核酸を導入することによって実行される、態様54～62のいずれかの方法。

10

20

30

40

50

6 4 . 前記導入する工程が、前記細胞におけるPD-L1の発現の一時的な低減または妨害を引き起こすために前記T細胞における前記作用物質の一過性の発現を誘導する工程を含み、かつ/または前記低減または妨害が永続的でない、態様54～63のいずれかの方法。

6 5 . 前記作用物質の発現または活性が条件的である、態様54～64のいずれかの方法。

6 6 . 前記発現が、条件的なプロモーターまたはエンハンサーまたはトランスアクチベーターの制御下にある、態様65の方法。

6 7 . 前記条件的なプロモーターまたはエンハンサーまたはトランスアクチベーターが、誘導性のプロモーター、エンハンサーもしくはトランスアクチベーター、または抑制性のプロモーター、エンハンサーもしくはトランスアクチベーターである、態様66の方法。

6 8 . 前記プロモーターが、RNA pol I、RNA pol IIまたはRNA pol IIIプロモーターから選択される、態様66または態様67の方法。 10

6 9 . 前記プロモーターが、

U6もしくはH1プロモーターであるpol IIIプロモーター、または CMV、SV40初期領域もしくはアデノウイルス主要後期プロモーターであるpol IIプロモーター

から選択される、態様68の方法。

7 0 . 前記プロモーターが誘導性プロモーターである、態様66～69のいずれかの方法。

7 1 . 前記プロモーターが、Lacオペレーター配列、テトラサイクリンオペレーター配列、ガラクトースオペレーター配列またはドキシサイクリンオペレーター配列を含む、態様70の方法。 20

7 2 . 前記プロモーターが抑制性プロモーターである、態様66～69のいずれかの方法。

7 3 . 前記プロモーターがLac抑制性エレメントまたはテトラサイクリン抑制性エレメントを含む、態様72の方法。

7 4 . 前記作用物質が、前記細胞におけるPD-L1の発現の継続的な低減または妨害を引き起こすために前記T細胞中で安定に発現される、態様54～63のいずれかの方法。

7 5 . 前記作用物質が、ウイルスベクターに含まれている核酸分子である、態様54～74のいずれかの方法。

7 6 . 前記ウイルスベクターが、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルスベクターである、態様75の方法。 30

7 7 . 前記作用物質が、前記細胞におけるPD-L1の発現を低減する阻害性核酸分子である、態様54～76のいずれかの方法。

7 8 . 前記阻害性核酸分子がRNA干渉作用物質を含む、態様77の方法。

7 9 . 前記阻害性核酸が、低分子干渉RNA ( siRNA ) 、マイクロRNA適合shRNA、短鎖ヘアピンRNA ( shRNA ) 、ヘアピンsiRNA、前駆体マイクロRNA ( pre-miRNA ) もしくはマイクロRNA ( miRNA ) であるか、またはそれを含むか、またはそれをコードする、態様77または態様78の方法。

8 0 . 前記阻害性核酸分子が、PD-L1コード核酸に相補的な配列を含む、態様78または態様79のいずれかの方法。

8 1 . 前記阻害性核酸分子が、PD-L1コード核酸に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、態様77の方法。 40

8 2 . 低減を引き起こすことおよび/またはアップレギュレーションを阻害することが、PD-L1をコードする遺伝子を破壊することを含む、態様54～81のいずれかの方法。

8 3 . 前記破壊が、前記遺伝子をDNAレベルで破壊することを含み、かつ/または前記破壊が可逆的ではなく、かつ/または前記破壊が一過性ではない、態様82の方法。

8 4 . 前記破壊が、工程 ( b ) で前記遺伝子に特異的に結合またはハイブリダイズするDNA結合タンパク質またはDNA結合核酸を導入することを含む、態様82または83の方法。

8 5 . 前記破壊が、( i ) DNA標的化タンパク質とヌクレアーゼとを含む融合タンパク質ま 50

たは (ii) RNAガイド型ヌクレアーゼを導入することを含む、態様84の方法。

86. 前記DNA標的化タンパク質またはRNAガイド型ヌクレアーゼが、前記遺伝子に特異的なジンクフィンガータンパク質 (ZFP)、TALタンパク質、または、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列核酸 (CRISPR) によってガイドされるCasタンパク質を含む、態様85の方法。

87. 前記破壊が、前記遺伝子に特異的に結合する、または前記遺伝子を特異的に認識する、または前記遺伝子に特異的にハイブリダイズする、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、TALエフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、またはおよび、CRISPR-Cas9の組み合わせを導入することを含む、態様82～86のいずれかの方法。

88. 前記導入が、前記DNA結合タンパク質をコードする配列を含む核酸、DNA結合核酸、および/または前記DNA結合タンパク質もしくはDNA結合核酸を含む複合体を導入することによって実行される、態様84～87のいずれかの方法。

89. 前記核酸がウイルスベクター中にある、態様88の方法。

90. 前記遺伝子への前記特異的結合が、前記遺伝子のエクソンの内部であり、かつ/または、前記遺伝子の、標的抗原のN末端をコードしている部分の内部である、態様84～89のいずれかの方法。

91. 前記導入によって、前記遺伝子におけるフレームシフト変異および/または前記遺伝子のコード領域内での早期停止コドンの挿入が引き起こされる、態様84～90のいずれかの方法。

92. (c) 前記細胞に、作用物質が導入されていない対応する細胞における1つまたは複数の条件下でのインキュベーション時のPD-1の発現またはアップレギュレーションと比較して前記細胞におけるPD-1の発現の低減をもたらすことができかつ/またはPD-1のアップレギュレーションを阻害することができる前記作用物質を、前記1つまたは複数の条件下でのインキュベーション時に導入する工程

をさらに含み、前記発現の低減および/またはアップレギュレーションの阻害が一時的または一過性である、態様54～91のいずれかの方法。

93. 前記作用物質が、前記細胞におけるPD-1の発現の条件的な低減または妨害を引き起こすために前記細胞中で誘導性に発現または抑制される、態様92の方法。

94. (a) 抗原に特異的に結合する遺伝子操作された抗原受容体を、T細胞を含む細胞の集団に導入する工程、ならびに

(b) 前記細胞の集団に、作用物質が導入されていない対応する細胞の集団中のT細胞における1つまたは複数の条件下でのインキュベーション時のPD-1の発現および/またはアップレギュレーションと比較して前記集団中のT細胞におけるPD-1の発現を一過性に低減することができかつ/またはPD-1のアップレギュレーションを一過性に阻害することができる前記作用物質を、前記1つまたは複数の条件下でのインキュベーション時に導入する工程

を含み、工程 (a) および (b) を同時にまたは任意の順序で逐次的に実行することによって、前記集団中のT細胞に前記遺伝子操作された抗原受容体および前記作用物質を導入する、遺伝子操作されたT細胞を生成する方法。

95. T細胞に、作用物質が導入されていない対応するT細胞における1つまたは複数の条件下でのインキュベーション時のPD-1の発現またはアップレギュレーションと比較して前記細胞におけるPD-1の発現を一過性に低減することができかつ/またはPD-1のアップレギュレーションを一過性に阻害することができる前記作用物質を、前記1つまたは複数の条件下でのインキュベーション時に導入する工程

を含み、該T細胞が、抗原に特異的に結合する抗原受容体を含む、遺伝子操作されたT細胞におけるPD-1の発現を調節する方法。

96. 一過性の低減が、前記細胞におけるPD-1の発現の可逆的な低減を含む、態様94または態様95の方法。

97. 抗原の存在を含む条件下でのインキュベーションが、前記作用物質が導入されていないT細胞を含む対応する集団において、PD-1の発現またはアップレギュレーションを誘

10

20

30

40

50

導する、態様94～96のいずれかの方法。

9 8 . 抗原の存在下でのインキュベーションが、前記細胞を前記抗原と共にインビトロでインキュベートすることを含む、態様97の方法。

9 9 . 抗原の存在下でのインキュベーションが、それぞれ両端の値を含めて2時間～48時間、6時間～30時間、または12時間～24時間であるか、あるいは48時間未満、36時間未満、または24時間未満である、態様98の方法。

1 0 0 . 前記インキュベーションが、前記操作された抗原受容体が該インキュベーションの少なくとも一部にわたって前記抗原に特異的に結合する条件下での、対象への前記細胞の投与を含む、態様97の方法。

1 0 1 . 前記インキュベーションが、前記対象への細胞の投与後24時間、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日の期間内に、発現またはアップレギュレーションを誘導する、態様100の方法。

1 0 2 . PD-1の発現の低減またはアップレギュレーションの阻害が、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%もしくはそれ以上、または少なくとも約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%もしくはそれ以上である、態様94～101のいずれかの方法。

1 0 3 . エクスピボで行われる、態様94～102のいずれかの方法。

1 0 4 . (b)における導入する工程が、前記細胞に、前記作用物質をコードする配列を含む核酸を導入することによって実行される、態様94～103のいずれかの方法。

1 0 5 . 前記作用物質が、前記T細胞におけるPD-1の発現の一時的な低減または妨害を引き起こすために前記細胞において一過性に発現される、態様94～104のいずれかの方法。

1 0 6 . 前記作用物質の発現または活性が条件的である、態様94～105のいずれかの方法。

1 0 7 . 前記発現が、条件的なプロモーターまたはエンハンサーまたはトランスアクチベーターの制御下にある、態様106の方法。

1 0 8 . 前記条件的なプロモーターまたはエンハンサーまたはトランスアクチベーターが、誘導性のプロモーター、エンハンサーもしくはトランスアクチベーター、または抑制性のプロモーター、エンハンサーもしくはトランスアクチベーターである、態様107の方法。

1 0 9 . 前記プロモーターが、RNA pol I、RNA pol IIまたはRNA pol IIIプロモーターから選択される、態様108の方法。

1 1 0 . 前記プロモーターが、

U6もしくはH1プロモーターであるpol IIIプロモーター、またはCMV、SV40初期領域もしくはアデノウイルス主要後期プロモーターであるpol IIプロモーター

から選択される、態様109の方法。

1 1 1 . 前記プロモーターが誘導性プロモーターである、態様108～110のいずれかの方法。

1 1 2 . 前記プロモーターが、Lacオペレーター配列、テトラサイクリンオペレーター配列、ガラクトースオペレーター配列またはドキシサイクリンオペレーター配列を含む、態様111の方法。

1 1 3 . 前記プロモーターが抑制性プロモーターである、態様108～112のいずれかの方法。

1 1 4 . 前記プロモーターがLac抑制性エレメントまたはテトラサイクリン抑制性エレメントを含む、態様113の方法。

1 1 5 . 前記作用物質が、前記細胞におけるPD-1の発現を低減する阻害性核酸分子である、態様92～114のいずれかの方法。

1 1 6 . 前記阻害性核酸分子がRNA干渉作用物質を含む、態様115の方法。

1 1 7 . 前記阻害性核酸が、低分子干渉RNA (siRNA)、マイクロRNA適合shRNA、短鎖ヘアピンRNA (shRNA)、ヘアピンsiRNA、前駆体マイクロRNA (pre-miRNA) もしくはマイクロR

10

20

30

40

50

NA (miRNA) であるか、またはそれを含むか、またはそれをコードする、態様115または態様116の方法。

118. 前記阻害性核酸分子がPD-L1コード核酸に相補的な配列を含む、態様115～117のいずれかの方法。

119. 前記阻害性核酸分子が、PD-L1コード核酸に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、態様115の方法。

120. 前記T細胞が、CD4+T細胞またはCD8+T細胞である、態様54～119のいずれかの方法。

121. 前記遺伝子操作された抗原受容体が機能的な非T細胞受容体である、態様54～120のいずれかの方法。 10

122. 前記遺伝子操作された抗原受容体がキメラ抗原受容体 (CAR) である、態様54～121のいずれかの方法。

123. 前記CARが、前記抗原に特異的に結合する細胞外抗原認識ドメインと、ITAMを含む細胞内シグナル伝達ドメインとを含む、態様122の方法。

124. 前記細胞内シグナル伝達ドメインがCD3-ゼータ (CD3 $\zeta$ ) 鎖の細胞内ドメインを含む、態様123の方法。

125. 前記CARが補助刺激シグナル伝達領域をさらに含む、態様123または態様124の方法。

126. 前記補助刺激シグナル伝達領域が、CD28または4-1BBのシグナル伝達ドメインを含む、態様125の方法。 20

127. 前記補助刺激ドメインがCD28である、態様125または態様126の方法。

128. 前記工程 (a) および (b) が同時に行われ、該工程が、前記抗原受容体をコードする、任意で第1発現力セットである第1の核酸と、PD-1またはPD-L1の発現の低減を引き起こすための前記作用物質をコードする、任意で第2の発現力セットである第2の核酸とを含む核酸分子を導入する工程を含む、態様127の方法。

129. 前記細胞の集団に、同じまたは異なる抗原に特異的に結合する第2の遺伝子操作された抗原受容体を導入する工程をさらに含み、該第2の抗原受容体がCD28以外の補助刺激分子を含む、態様127または態様128の方法。

130. (a) 第1の抗原に特異的に結合する第1の遺伝子操作された抗原受容体を、T細胞を含む細胞の集団に導入する工程であって、該第1の抗原受容体がCD28補助刺激分子を含む工程。 30

(b) 前記T細胞を含む細胞の集団に、同じまたは異なる抗原に特異的に結合する第2の遺伝子操作された抗原受容体を導入する工程、および

(c) 前記T細胞を含む細胞の集団に、作用物質が導入されていない対応する細胞の集団中のT細胞における1つまたは複数の条件下でのインキュベーション時のPD-1および/またはPD-L1の発現またはアップレギュレーションと比較して前記集団中のT細胞においてPD-1もしくはPD-L1の発現の低減をもたらすことができかつ/またはPD-1もしくはPD-L1のアップレギュレーションを阻害することができる前記作用物質を、前記1つまたは複数の条件下でのインキュベーション時に導入する工程であって、それによって、前記第1の抗原受容体、前記第2の抗原受容体および前記作用物質を、前記集団中のT細胞に導入する、工程を含む、遺伝子操作されたT細胞を生成する方法。 40

131. 抗原の存在を含む条件下でのインキュベーションが、前記作用物質が導入されていないT細胞を含む対応する集団において、PD-1および/またはPD-L1の発現またはアップレギュレーションを誘導する、態様130の方法。

132. 抗原の存在下でのインキュベーションが、前記細胞を前記抗原と共にインピトロでインキュベートすることを含む、態様131の方法。

133. 抗原の存在下でのインキュベーションが、それぞれ両端の値を含めて2時間～48時間、6時間～30時間、または12時間～24時間であるか、あるいは48時間未満、36時間未満、または24時間未満である、態様132の方法。

134. 前記インキュベーションが、前記操作された抗原受容体が該インキュベーション 50

の少なくとも一部にわたって前記抗原に特異的に結合する条件下での、対象への前記細胞の投与を含む、態様131の方法。

135. 前記インキュベーションが、前記対象への細胞の投与後24時間、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日の期間内に、発現またはアップレギュレーションを誘導する、態様134の方法。

136. 前記細胞におけるPD-1および/またはPD-L1の発現またはアップレギュレーションが、前記作用物質の導入を行わずに前記方法によって生成した操作された細胞と比較して、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%もしくはそれ以上、または少なくとも約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%もしくはそれ以上、阻害または低減される、態様130～135のいずれかの方法。 10

137. 前記第1および第2の遺伝子操作された抗原受容体が同じ抗原に結合する、態様129～136のいずれかの方法。

138. 前記第2の抗原受容体が、CD28以外の補助刺激分子を含む、態様130～137のいずれかの方法。

139. 前記CD28以外の補助刺激分子が、4-1BBである、態様129～138のいずれかの方法。

140. 前記作用物質が、PD-L1の発現の低減および/またはアップレギュレーションの阻害を引き起こす、態様130～139のいずれかの方法。

141. 工程(a)および(b)が同時に行われ、該工程が、前記抗原受容体をコードする、任意で第1の発現力セットである第1の核酸と、PD-1またはPD-L1の発現の低減を引き起こすための前記作用物質をコードする、任意で第2の発現力セットである第2の核酸とを含む核酸分子を導入する工程を含む、態様130～140のいずれかの方法。 20

142. 前記第1および第2の核酸、任意で前記第1および第2の発現力セットが、同じまたは異なるプロモーターに機能的に連結される、態様141の方法。

143. 前記第1の核酸、任意で第1の発現力セットが、誘導性プロモーターまたは抑制性プロモーターに機能的に連結され、前記第2の核酸、任意で第2の発現力セットが、構成的プロモーターに機能的に連結される、態様141または態様142の方法。

144. ヒト細胞である、態様54～143のいずれかの方法。

145. (a) T細胞を含有する初代細胞の集団を得る工程、

(b) 前記集団中の、標的抗原を発現しない細胞を濃縮する工程、および 30

(c) 前記細胞の集団に、前記標的抗原に特異的に結合する遺伝子操作された抗原受容体を導入する工程であって、それによって、遺伝子操作されたT細胞を生成する、工程を含む、遺伝子操作されたT細胞を生成する方法。

146. 前記細胞の増殖を引き起こすために前記細胞を刺激条件下で培養および/またはインキュベートすることをさらに含み、細胞の前記増殖および/または拡大が、前記標的抗原を発現しない細胞を濃縮する工程を欠く前記方法において生成された細胞においてよりも大きい、態様145の方法。

147. 細胞の増殖および/または拡大が、少なくとも1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍もしくはそれ以上、または少なくとも約1.5倍、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍もしくはそれ以上である、態様146の方法。 40

148. 標的抗原を発現しない細胞を濃縮する工程が、前記標的抗原を発現する細胞を枯渇させるための負の選択、または前記集団中の細胞における前記標的抗原をコードする遺伝子の破壊を含む、態様145～147のいずれかの方法。

149. 前記刺激条件が、TCR複合体の1つまたは複数の成分の1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインを活性化することができる作用物質を含む、態様146～148のいずれかの方法。

150. 態様54～149のいずれかの方法によって生成される細胞。

151. 態様150の細胞と薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物。

152. ある疾患または状態を有する対象に、態様1～30、態様49～52もしくは態様150の 50

いずれかの細胞、または態様46もしくは態様115の薬学的組成物を投与する工程を含む、処置方法。

153. 前記細胞が、

(a) キメラ抗原受容体(CAR)を発現する細胞の第1の用量を、前記対象に投与する工程と

(b) CAR発現細胞の連続用量を前記対象に投与する工程であって、該連続用量は、(a)において前記対象に投与された前記CAR発現細胞の表面においてPD-L1の発現が誘導またはアップレギュレートされた時点で前記対象に投与され、かつ/または該連続用量は、(a)における投与の開始から少なくとも5日後に前記対象に投与される、工程とを含む投与計画で投与される、態様152の処置方法。

10

154. (a) キメラ抗原受容体(CAR)を発現する細胞の第1の用量を対象に投与する工程と

(b) CAR発現細胞の連続用量を前記対象に投与する工程とを含み、該連続用量は、(a)において前記対象に投与された前記CAR発現細胞の表面においてPD-L1の発現が誘導またはアップレギュレートされた時点で前記対象に投与され、かつ/または該連続用量は、(a)における投与の開始から少なくとも5日後に前記対象に投与される、処置方法。

155. 前記細胞の連続用量が、(a)における該投与の開始から少なくとも約5日後または約5日よりも後かつ約12日後よりも前に投与される、態様153または態様154の方法。

156. 前記第1および/または第2の用量で投与される細胞の数が、それぞれ両端の値を含めて約 $0.5 \times 10^6$ 個の細胞/kg対象体重～ $4 \times 10^6$ 個の細胞/kg、約 $0.75 \times 10^6$ 個の細胞/kg～ $3.0 \times 10^6$ 個の細胞/kg、または約 $1 \times 10^6$ 個の細胞/kg～ $2 \times 10^6$ 個の細胞/kgである、態様153～155のいずれかの方法。

20

157. 前記遺伝子操作された抗原受容体が、前記疾患または状態と関連する抗原に特異的に結合する、態様152～156のいずれかの方法。

158. 前記疾患または状態ががんである、態様152～157のいずれかの処置方法。

159. 前記疾患または状態が白血病またはリンパ腫である、態様152～158のいずれかの方法。

160. 前記疾患または状態が急性リンパ芽球性白血病である、態様152～159のいずれかの方法。

30

161. 前記疾患または状態が非ホジキンリンパ腫(NHL)である、態様152～159のいずれかの方法。

### 【実施例】

#### 【0392】

以下の実施例は例示のためだけに含まれ、本発明の範囲を限定することを目的としない。

#### 【0393】

実施例1: キメラ抗原受容体(CAR)を通じて刺激されたT細胞におけるPD-1/PD-L1発現の評価

免疫親和性に基づく濃縮によって、ヒト対象に由来する白血球除去試料からT細胞を単離し、活性化し、ヒトCD28由来細胞内シグナル伝達ドメインおよびヒトCD3由来シグナル伝達ドメインを含有する抗CD19キメラ抗原受容体(CAR)をコードするウイルスベクターを形質導入した。組成物中にある、全T細胞の中でのCAR+細胞のパーセントおよびT細胞サブセットの中でのCAR+細胞のパーセントと、CD4+ T細胞とCD8+T細胞との比を求めるために、結果として生じた単離された組成物における(CARおよびある特定のT細胞マーカーの)表面発現をフローサイトメトリーによって評価した(表1を参照されたい)。

40

#### 【0394】

(表1)形質導入されたT細胞上での抗CD19 CAR発現

	CD3+CAR+	CD4+CAR+	CD8+CAR+	CD3+CD4+	CD3+CD8+
パーセント (平均)	49.91	23.60	28.73	40.03	53.66
標準偏差	2.97	1.18	2.38	1.10	1.22

## 【0395】

次いで、1)CARに特異的な抗原を発現するK562細胞(K562-tCD19細胞)とインキュベートすること(抗原特異的共培養); 2)無関係の抗原を発現するK562細胞(K562-ROR1細胞)とインキュベートすること(非特異的共培養対照); または、3)プレート結合抗CD3抗体および可溶性抗CD28抗体(TCR複合体を介した刺激のため)とインキュベートすること(最初にプレート結合抗CD3および可溶性抗CD28を使用し、適用可能である場合には、操作された細胞と3日目にインキュベートする)によって、前記組成物を様々な試料に細分した。(1)および(2)のために、それぞれ、CD19およびROR1を発現するようにK562(不死化骨髓性白血病株)細胞を操作し、CAR発現T細胞と1:1比でインキュベートした。それぞれの条件について、CAR発現T細胞を24時間刺激した。未刺激試料(K562細胞または刺激用抗体がない「培地」)を、さらなる陰性対照として使用した。10

## 【0396】

培養して24時間後に、各試料中の細胞上でのPD-1、PD-L1、PD-L2、T細胞マーカー、およびCAR(CARのマウス可変領域部分を検出するヤギ抗マウス(「GAM」)染色に基づく)の表面発現を評価するために、フローサイトメトリーを行った。分析のために、リンパ球と一致する前方散乱光プロファイルおよび側方散乱光プロファイルをもつ單一生細胞をゲーティングした。ゲーティングされた様々なT細胞集団(CD4<sup>+</sup>/CAR<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CAR<sup>-</sup>、CD8<sup>+</sup>/CAR<sup>+</sup>、およびCD8<sup>+</sup>/CAR<sup>-</sup>)上でのPD-1、PD-L1、およびPD-L2の発現を、様々なマーカーの表面発現に基づいて設定したゲートを用いて、適切なゲーティングを決定するために陰性対照(「培地」)試料用の値を用いて評価した。20

## 【0397】

図1Aおよび図2Aに示したように、CARに特異的な抗原を発現する細胞(K562-tCD19)と共に培養した時に、PD-1およびPD-L1発現はCD4<sup>+</sup>/CAR<sup>+</sup>T細胞およびCD8<sup>+</sup>/CAR<sup>+</sup>T細胞の両方で24(24)時間以内に増加した。このPD-1およびPD-L1の発現増加は、無関係の抗原を発現する同じタイプの細胞(K562-ROR1)とインキュベートしたCAR<sup>+</sup>細胞でも、TCR複合体(抗CD3抗体および抗CD28抗体)を介して刺激するように設計された条件下でインキュベートしたCD4<sup>+</sup>細胞集団またはCD8<sup>+</sup>細胞集団のいずれにおいても、この時間枠内で観察されなかった。PD-L2の発現は、試験したどの刺激条件下でも、この時間枠内でアップレギュレートされなかった。30

## 【0398】

図1Bおよび図2Bに示したように、CD19発現細胞とインキュベートした細胞におけるPD-1発現およびPD-L1発現の増加は、主に、抗CD19 CARの発現によるものであることが観察された。CARを発現しない(「CAR-」)CD4<sup>+</sup>ゲーティングT細胞もCD8<sup>+</sup>ゲーティングT細胞も、CD19発現細胞とインキュベートした後に、PD-1表面発現の大幅な増加を示さず、PD-L1表面発現の大幅な増加を示さなかった。40

## 【0399】

ヒト4-1BB由来細胞内シグナル伝達ドメインおよびヒトCD3由来シグナル伝達ドメインを含有する抗CD19キメラ抗原受容体(CAR)を用いて遺伝子操作されたT細胞の存在下で同様の結果が得られた。従って、これらの結果から、CD28または4-1BB補助刺激シグナル伝達ドメインのいずれかを含有するCAR構築物を形質導入したT細胞上ではPD-1およびPD-L1のアップレギュレーションが起こったことが分かった。これらのデータから、PD-1およびPD-L1の表面発現はキメラ抗原受容体を介した刺激後24時間以内にアップレギュレートされたが、古典的なT細胞抗原受容体複合体および関連する補助刺激受容体(抗CD3/抗CD28抗体)を介してシグナルを模倣するように設計された条件下の刺激後ではアップレギュレートされなかったことが証明される。50

## 【0400】

本発明は、提供された、例えば、本発明の様々な局面を例示するために提供された特定の開示された態様に範囲が限定されることが意図されない。本明細書の説明および開示から、説明された組成物および方法に対する様々な変更が明らかになる。このようなバリエーションは、本開示の真の範囲および精神から逸脱することなく実施される可能性があり、本開示の範囲内にあることが意図される。

## 【0401】

## 配列

SEQ ID NO:	種類	配列	説明
1	RNA	aaugcguuca gcaaaugcca guagg	PD-L1に特異的なsiRNA
2	RNA	cuaauugugu auugggaaa	PD-L1に特異的なsiRNA
3	RNA	cgacuacaaag cgaauuacu	PD-L1に特異的なsiRNA
4	RNA	CCUACUGGCAUUUGCUGAACGCAUU	PD-L1に特異的なsiRNA (センス配列)
5	RNA	AAUGCGUUCAGCAAAUGCAGUAGG	PD-L1に特異的なsiRNA (アンチセンス配列)
6	RNA	uuacgucucc uccaaaugug uauca	PD-L1に特異的なsiRNA
7	タンパク質	MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLVYVEYGSNMTIECKFPV EKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVKQHSSYRQRARLL KDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNA PYNKINQRILVVDPPVTSEHELTCAEGYPKAEEVWTSSDHQVLS GKTTTNSKREEKLFNVTSLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENH TAEELVIPELPLAHPPNERTHVLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKG RMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET	PD-L1 (ヒト)
8	DNA	ggcgcaacgc tgagcagctg gccgcgtcccg cgccggccca gttctgcgcga gcttcccgag gctccgcacc agccgcgcctt ctgtccgcct gcagggcatt ccagaaagat gaggatattt gctgtcttta tattcatgac ctactggcat ttgctgaacg catttactgt cacggttccc aaggacctat atgtggtaga gtatggtagc aatatgacaa ttgaatgcaa attcccgatg gaaaaacaat tagacctggc tgcaactaatt gtctattggg aaatggagga taagaacatt attcaatttg tgcatggaga ggaagacctg aaggttcagc atagtagcta cagacagagg gcccggtgt tgaaggacca gctctccctg gcaaattgtcg cacttcagat cacagatgtg aaattgcagg atgcagggt gtaccgctgc atgatcagct atgggtgtgc cgactacaag cgaattactg taaaatgcaaa tgccccatac aacaaaatca accaaagaat tttgggttg gatccagtca cctctgaaca tgaactgaca tgtcaggctg agggctaccc caaggccgaa gtcatctgga caagcagtga ccatcaagtc ctgagtggt agaccaccac caccaattcc aagagagagg agaagcttt caatgtgacc agcacactga gaatcaacac aacaactaat gagattttct actgcacttt taggagatta gatcctgagg aaaaccatac agctgaattt gtcattcccg aactacctct ggcacatctt ccaaattgaaa ggactcactt ggttaattctg ggagccatct tattatgcct tgggtgttagca ctgacattca tcttcggtt aagaaaaggg agaatgatgg atgtgaaaaaa atgtggcatc caagatacaa actcaaagaa gcaaagtgt acacatttgg aggagacgta atccagcattt ggaacttctg atcttcaagc agggattctc aacctgtggg ttaggggttc	PD-L1をコードする CD274 (ヒト)

10

20

30

40

		atcggggctg agcgtgacaa gaggaaggaa tggcccgta ggatgcaggg aatgtgggac ttaaaaggcc caagcactga aaatggaaacc tggcggaaagc agaggaggag aatgaagaaa gatggagtca aacaggggagc ctggagggag accttgatac tttcaaattgc ctgagggct catcgacgcc tgtgacaggg agaaaggata cttctgaaca aggagcctcc aagcaaattca tccattgctc atccttagaa gacgggttga gaatccctaa tttgagggtc agttctgca gaagtgcctt ttgcctccac tcaatgcctc aattttgtttt ctgcatgact gagagtctca gtgttggaaac gggacagttat ttatgtatga gttttccctaa tttattttga gtctgtgagg tcttcttgc atgtgagtgt ggttgtgaat gatttctttt gaagatataat tgttagtagat gttacaattt tgtgcctaaa ctaaacttgc tgcttaatga tttgctcaca tctagtaaaa catggagtat ttgtaaaggta cttggctcc tctataacta caagtataaca ttggaagcat aaagatcaaa ccgttgggttgcataggatgt caccttatt taacccattta atactctggt tgacctaattc ttatttctcag acctcaagtgc tctgtgcagt atctgttcca tttaaatatc agcttacaaat ttatgtggta gcctacacac ataatctcat ttcatcgctg taaccaccct gttgtgataa ccactattat tttacccatc gtacagctga ggaagcaaaac agattaagta acttgcctaa accagtaaat agcagaccc agactgccac ccactgtcct tttataatac aatttacagc tatattttac tttaagcaat tcttttatttcaaaaaccatt tattaagtgc ccttgcataa tcaatcgctg tgccaggcat tgaatctaca gatgtgagca agacaaagta cctgtcctca aggagctcat atgataatga ggagattaac aagaaaaatgtt attattacaa tttagtccag tgtcatagca taaggatgat gcgagggaa aacccgagca gtgttgcctaa gaggagggaa taggccaatg tggctggaa cgggtggata tacttaaaca tcttaataat cagagtaattt ttcatttaca aagagaggc ggtacttaaa ataaccctga aaaataaacac tgaatttcctt tttcttagcat tatattttt cctgatttgc ctttgcataa taatctaattg ctgtttata tagtgcctgg tattgtttaa cagttctgc ttttcttattt aaatgccact aaattttaaa ttcataccctt tccatgatttcaaa agatcccatttggagatgggtt ggaaaatctc cacttcatttcc tccaaggccat tcaagttcc tttccagaag caactgctac tgcccttcat tcatatgttc ttctaaagat agtctacatt tggaaatgtt tggtaaaaagc acgtatttttt aaatttttt tcctaaatag taacacattt tatgtctgct gtgtactttt ctatttttat ttattttagt gtttcttata tagcagatgg aatgaattttt aagttccctt ggctgaggat ccattgccttc ttgtttcttca agttatctt cccatagctt ttcattatct ttcataatgtt ccagtatatg ttaaatatgtt cctacatata cattttagaca accaccattt gttaagtattt tgctcttagga cagagtttgg atttggattt gtttgtcaaa aaggagaccc atgggccttc cagggcgcac tgagtcaatc tagtgcctaaa aagcaatctt attattaact ctgtatgaca gaatcatgtc tggaaactttt gttttctgct ttctgtcaag tataaacttc accttgcatttgc tggtaatttgc aaatcacattt ttctttctgg aaattccggc agtgcacattt gactgcttagc taccctgtgc cagaaaagcc tcattcggtt	10
			20
			30
			40

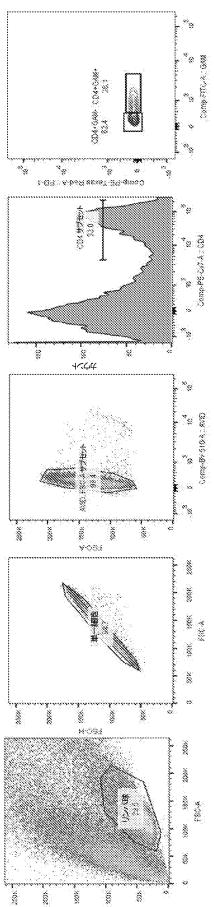
		tgcttgaacc cttgaatgcc accagctgtc atcaactacac agccctctta agaggcttcc tggagggttc gagattcaga tgcctggga gatcccagag ttcccttcc ctcttggcca tattctgggt tcaatgacaa ggagtacctt ggcttggcca catgtcaagg ctgaagaaac agtgtctcca acagagctcc ttgtgttatac tggttgatac tggtcattt tacagtaatt ggtgtgacag tggtctttgt gtgaattaca ggcaagaatt gtggctgagc aaggcacata gtctactcag tctattccta agtcttaact cctccttgc tggttggatt tgtaaggcac tttattccctt ttgtctcatg ttcatcgta aatggcatag gcagagatga tacctaattc tgcatgttgc tgcactttt tgtacctgca ttaatttaat aaaatattct tatttatttt gtacttggt acaccagcat gtccattttc ttgtttattt tggtttaat aaaatgttca gttaacatc ccagtggaga aagttaaaaa a		10
9	タンパク質	MQIPQAPWPV VWAVLQLGWR PGWFLDSPDR PWNPPTFSPA LLVVTEGDNA TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL	PD-1 (ヒト)	
10	DNA	agtttccctt ccgctcacct ccgcctgagc agtggagaag gccgcactct ggtggggctg ctccaggcat gcagatccca caggcgccct gcgcagtcgt ctggcggtg ctacaactgg gctggcgcc aggatggttc ttagactccc cagacaggcc ctggaaccccc cccaccttct ccccagccct gctcgtgggt accgaagggg acaacgccc ac cttcacctgc agtttctcca acacatcgga gagcttcgtg ctaaactggt accgcatgag ccccagcaac cagacggaca agctggccgc cttcccccag gaccgcagcc agcccgccca ggactgccgc ttccgtgtca cacaactgcc caacggcgt gacttccaca tgagcgtgg cagggcccgg cgcaatgaca gccgcaccta cctctgtggg gccatctccc tggcccccgg ggcgcagatc aaagagagcc tgccggcaga gctcagggtg acagagagaa gggcagaagt gcccacagcc caccggcgc cctcacccag gccagccggc cagttccaaa ccctgggtgt tgggtgtcgta ggcggcctgc tggcagcct ggtgtgtca gtctgggtcc tggccgtcat ctgctccgg gccgcacgag ggacaatagg agccaggcgc accggccagc ccctgaagga ggaccctca gccgtgcctg tggctctgt ggactatgg gagctggatt tccagtggcg agagaagacc ccggagcccc ccgtgcctg tgcctctgag cagacggagt atgcaccat tgcctttccct agcggaatgg gcacccatc ccccgccccgc aggggctcag ctgacggccc tggcgtgcc cagccactga ggcctgagga tggacactgc tcttggccccc tctgaccggc ttccctggcc accagtgttc tgcagaccct ccaccatgag cccgggtcag cgcatttcct caggagaagc aggcagggtg caggccatttgc caggccgtcc aggggctgag ctgcctgggg ggcacccggg ctccagcctg cacctgcacc aggcacagcc ccaccacagg actcatgtct	PD-1をコードするPDCDI (ヒト)	20 30 40

		caatgcccac agtgagccca ggcagcaggt gtcaccgtcc cctacaggga gggccagatg cagtcactgc ttcaggtct gccagcacag agctgcctgc gtccagctcc ctgaatctct gctgctgctg ctgctgctgc tgctgctgcc tgccggccgg ggctgaaggc gccgtggccc tgccgtacgc cccggagcct cctgcctgaa cttggggct ggttggagat ggccttggag cagccaaagggt gcccctggca gtggcatccc gaaacgcct ggacgcaggg cccaagactg ggcacaggag tgggaggtac atggggctgg ggactccccca ggagttatct gctccctgca ggcctagaga agttcaggg aaggtcagaa gagctcctgg ctgtggtggg cagggcagga aacccttcca ccttacaca tgcccaggca gcacccaggc cccttgtgg ggcagggaaag ctgaggcagt aagcgggcag gcagagctgg aggccttca ggcccgagcca gcactctggc ctccctggc cgcattccac cccagccccct cacaccactc gggagagggga catcctacgg tcccaaggtc aggaggcag ggctgggggt gactcaggcc cctcccaagct gtggccaccc ggggtttggg agggcagaag tgcaggeacc tagggccccc catgtgcccc ccctgggagc tctccttggaa acccattctt gaaattattt aaagggttg gccgggctcc caccaggcc tgggtggaa ggtacaggcg ttccccccggg gcctagtaacc cccggcgtgg cctatccact cctcacatcc acacactgca ccccccactcc tggggcaggg ccaccagcat ccaggccggcc agcaggcacc tgagtggctg ggacaaggga tcccccttcc ctgtggttct attatattat aattataatt aaatatgaga gcatgctaag gaaaa	10 20
11	タンパク質	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTRHSIK KNLIGALLFDGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEISN EMAKVDDSFTHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKY PTIYHLRKKLVDSTDKAIDLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNP DNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSR RLENLIAQLPGEKKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDAEDAKL QLSKDTYDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRV NTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFF DQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNRE DLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNRREKI EKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAMWTRKSEETITPWNFEEVVDK GASAQSFIERMNTFDKKNLPNEVKLPKHSLLYEEYFTVYNELTKVK YVTEGMRKPAFLSGEQQKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKI ECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDIL EDIVLTLLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRTGWG RLSRKLINGIRDQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTF KEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELV KVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELG SQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNQGRDMYVDQELDINRLSDY DVDHIVPQSKFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMK NYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRLVET RQITKHVAQILDSSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRK DFQFYKVREINNYHHAHDAYLNNAVGTALIKYPKLESEFVYGD YKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGE IRKRPLIETNGETGEIWWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEV QTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKYGGFDSPTVAYSVL	<i>S. Pyogenes</i> Cas9 Q99ZW2 30 40

		VVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYK EVKKDLIILKLPKYSLFLENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKY VNFLYLAshYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEF SKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLNLGA PAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLHQSiTGLYETRIDLSQ LGGD	
12	タンパク質	MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTRHSIK KNLIGALLFDGETAEATRLKRTARRRYTRRKRNRCYQLEIFSN EMAKVDDSFHRLLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKY PTIYHLRKKLVDSTDKAQRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNP DNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSR RLENLIAQLPGEKKNGLFGNLLIALSLGLTPNFKNFDLAEDAKL QLSKDTYDDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRV NTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFF DQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNRE DLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNRK EKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAMTRKSEETITPWNFEVV GASAQSFIERMTNFDKNEKLPNEKVLPKHSLLYEYFTVY YVTEGMRKPAFLSGEQQKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFK ECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLIKDKDFLDNEENEDIL EDIVLTTLFEDREMIEERLKYTAHLFDDKVMQQLKRRRTG RLSRKLINGIRDQSGKTILDPLKSDGFANRNFQMLIHDDSLTF KEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVV KVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEG SQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDY DVDHIVPQSKFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVP NYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIK RQITKHVAQILDQSRMNTKYDENDKLI DFQFYKVREINNYHAAH YKVYDVRK IRKRPLIETNG QTGGFSKES V VVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYK EVKKDLIILKLPKYSLFLENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKY VNFLYLAshYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEF SKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLNLGA PAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLHQSiTGLYETRIDLSQ LGGD	<i>S. Pyogenes</i> Cas9 D10A 10 20 30
13	DNA	TGACGTTACCTCGTGCAGGCC	PDCD1 CRISPRガイド RNA標的配列1
14	DNA	CACGAAGCTCTCCGATGTGT	PDCD1 CRISPRガイド RNA標的配列2
15	DNA	GCGTGACTTCCACATGAGCG	PDCD1 CRISPRガイド RNA標的配列3
16	DNA	TTGGAACTGGCCGGCTGGCC	PDCD1 CRISPRガイド RNA標的配列4
17	DNA	GTGGCATACTCCGTCTGCTC	PDCD1 CRISPRガイド RNA標的配列5
18	DNA	GATGAGGTGCCATTCCGCT	PDCD1 CRISPRガイド RNA標的配列6
19	DNA	TACCGCTGCATGATCAGCTA	CD274 CRISPRガイド RNA標的配列1

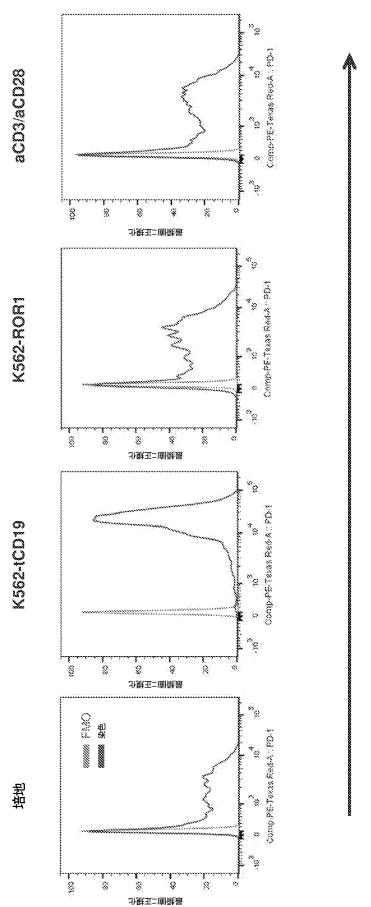
20	DNA	AGCTACTATGCTGAACCTTC	CD274 CRISPRガイドRNA標的配列2
21	DNA	GGATGACCAATTCACTGCTGA	CD274 CRISPRガイドRNA標的配列3
22	DNA	ACCCCAAGGCCGAAGTCATC	CD274 CRISPRガイドRNA標的配列4
23	DNA	TCTTTATATTCACTGACCTAC	CD274 CRISPRガイドRNA標的配列5
24	DNA	ACCGTTCAGCAAATGCCAGT	CD274 CRISPRガイドRNA標的配列6

### CD4+/CAR+



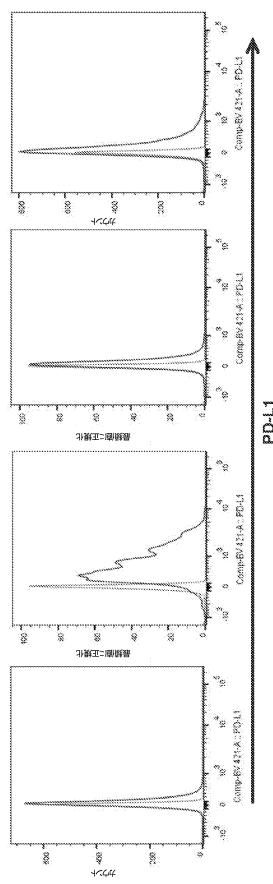
【図1A-1】

### CD4+/CAR+

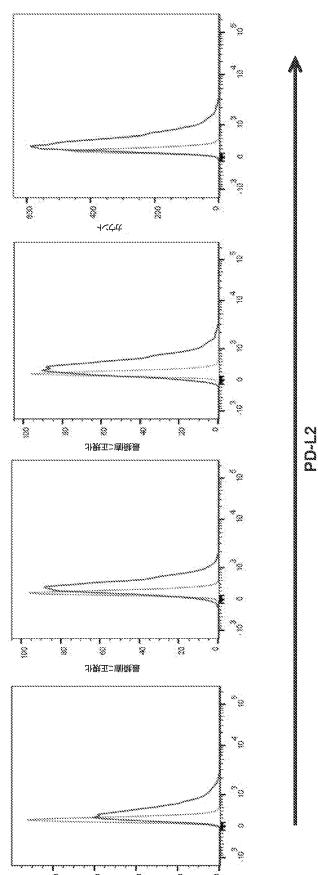


【図1A-2】

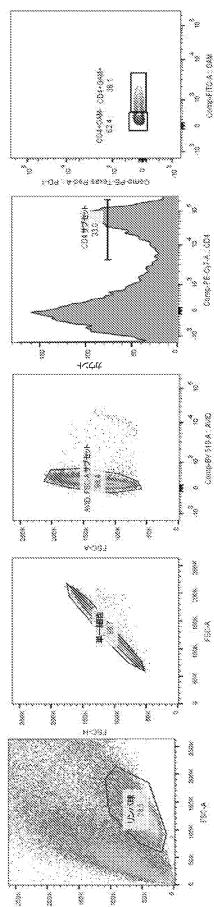
【図 1 A - 3】

**CD4+/CAR+**

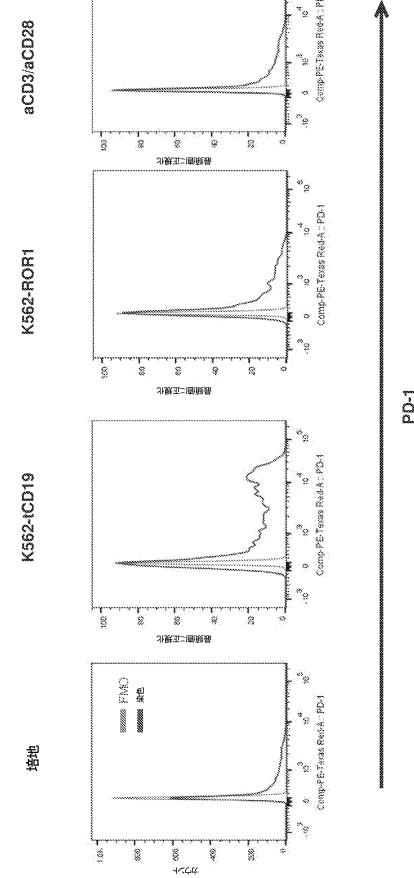
【図 1 A - 4】

**CD4+/CAR+**

【図 1 B - 1】

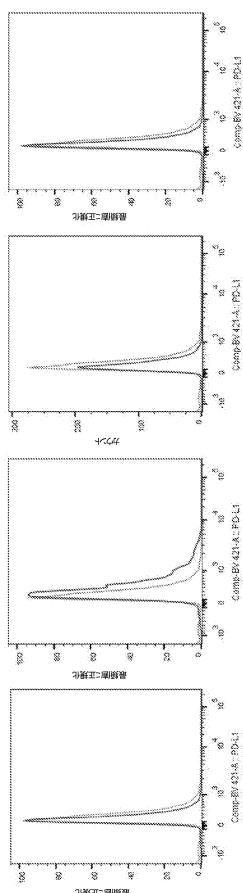
**CD4+/CAR-**

【図 1 B - 2】



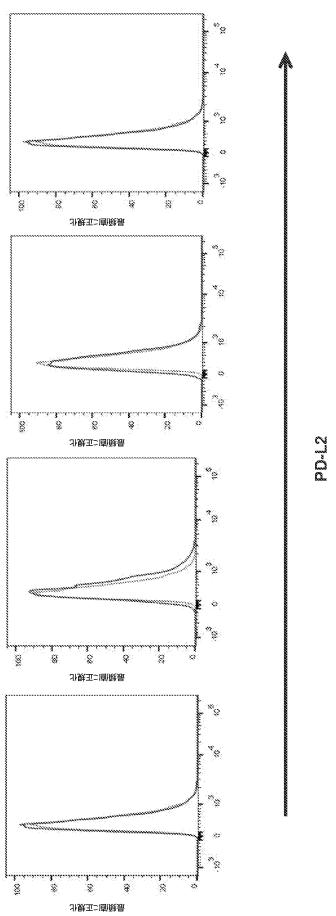
【図 1 B - 3】

CD4+/CAR-



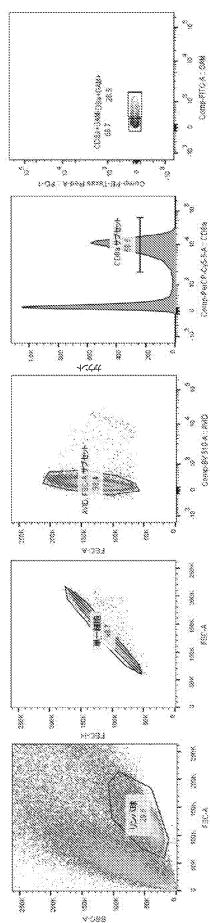
【図 1 B - 4】

CD4+/CAR-



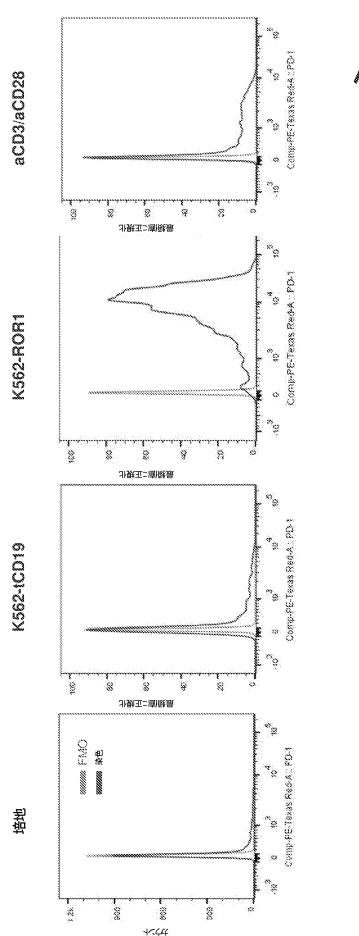
【図 2 A - 1】

CD8+/CAR+



【図 2 A - 2】

CD8+/CAR+



K562-ROR1

aCD3+CD28

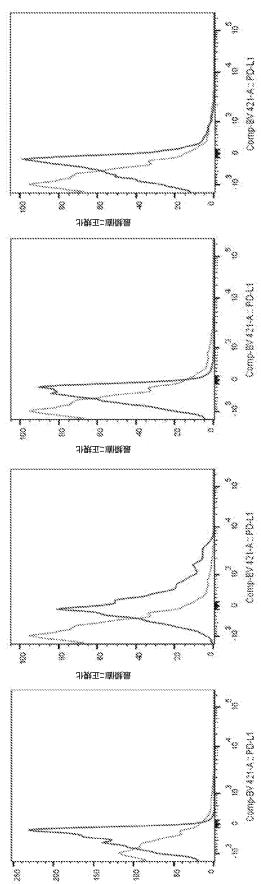
CD4+/CAR-

PD-L2

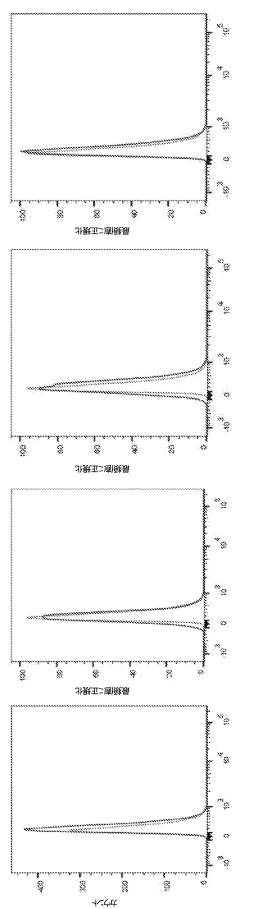
CD4+/CAR-

PD-1

【図 2 A - 3】

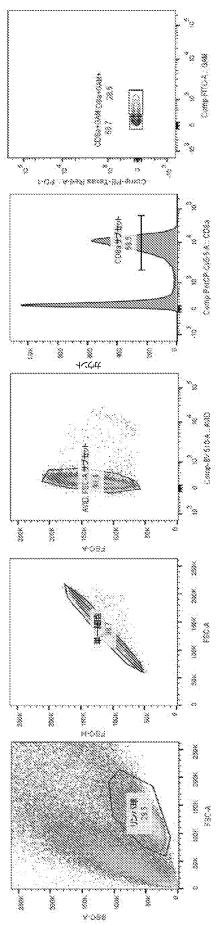
**CD8+/CAR+**

【図 2 A - 4】

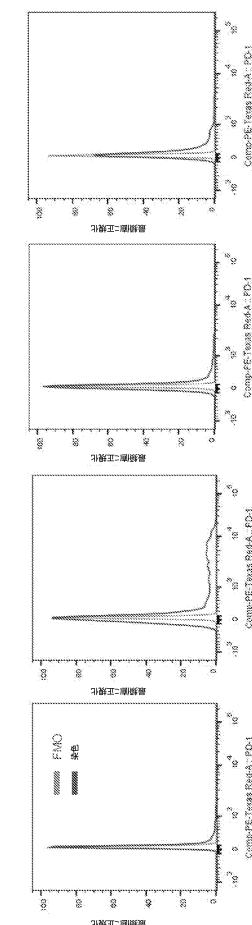
**CD8+/CAR+**

PD-L2

【図 2 B - 1】

**CD8+/CAR-**

【図 2 B - 2】

**CD8+/CAR-**

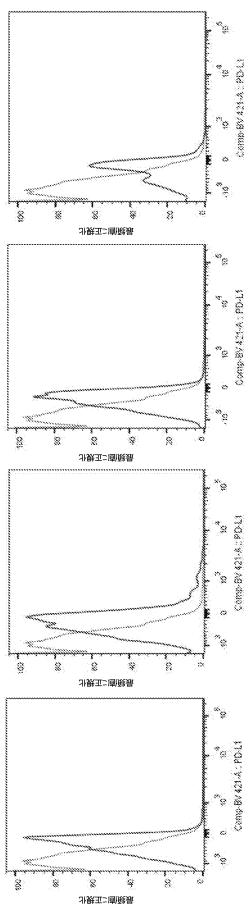
PD-1

↑

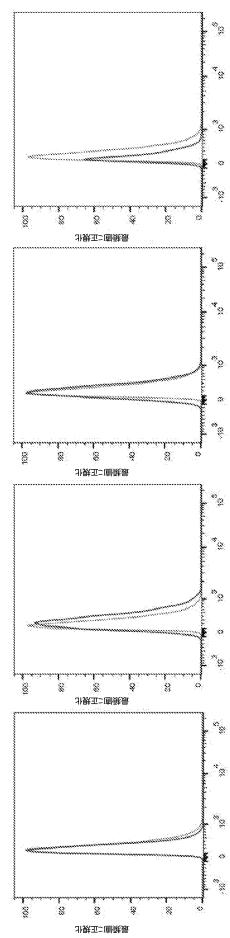
↑

↑

【図 2 B - 3】

**CD8+/CAR-**

【図 2 B - 4】

**CD8+/CAR-**

PD-L2

【配列表】

0006949728000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	31/7105	(2006.01)	A 6 1 K 31/7105
A 6 1 K	31/713	(2006.01)	A 6 1 K 31/713
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P 35/02
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/10 Z N A
C 1 2 N	5/0783	(2010.01)	C 1 2 N 5/0783
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	C 1 2 N 15/12
C 1 2 N	15/90	(2006.01)	C 1 2 N 15/90 1 0 4 Z
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N 15/63 1 0 0 Z
C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z
C 1 2 N	15/55	(2006.01)	C 1 2 N 15/55
C 1 2 N	15/113	(2010.01)	C 1 2 N 15/09 1 0 0
			C 1 2 N 15/113 1 4 0 Z

## 前置審査

(74)代理人 100142929  
弁理士 井上 隆一  
(74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光  
(74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一  
(74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦  
(74)代理人 100205707  
弁理士 小寺 秀紀  
(74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人  
(74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥  
(72)発明者 オデガード ヴァレリー  
アメリカ合衆国 9 8 1 0 9 ワシントン州 シアトル デクスター アベニュー ノース 4 0  
0 スイート 1 2 0 0

審査官 伊藤 良子

(56)参考文献 国際公開第2010/101249 (WO, A1)  
国際公開第2014/184741 (WO, A1)  
国際公開第2015/075469 (WO, A1)

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
A 6 1 K  
A 6 1 P  
C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )