

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-513906

(P2024-513906A)

(43)公表日 令和6年3月27日(2024.3.27)

| (51)国際特許分類 | F I | テーマコード(参考) |
|-----------------------------------|---------------|-----------------|
| C 1 2 N 5/10 (2006.01) | C 1 2 N 5/10 | Z N A 4 B 0 6 5 |
| C 1 2 N 15/12 (2006.01) | C 1 2 N 15/12 | 4 C 0 8 4 |
| C 1 2 N 15/62 (2006.01) | C 1 2 N 15/62 | Z 4 C 0 8 5 |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/09 | 1 1 0 4 C 0 8 6 |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01) | A 6 1 P 35/00 | 4 C 0 8 7 |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全88頁) 最終頁に続く | | |

| | |
|--|---|
| (21)出願番号 特願2023-561609(P2023-561609) | (71)出願人 523207478 センチュリー 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 ペンシルベニア州 1 9 1 0 4, フィラデルフィア, マーケット ストリート 3 6 7 5 |
| (86)(22)出願日 令和4年4月4日(2022.4.4) | |
| (85)翻訳文提出日 令和5年12月5日(2023.12.5) | |
| (86)国際出願番号 PCT/US2022/023347 | |
| (87)国際公開番号 WO2022/216624 | |
| (87)国際公開日 令和4年10月13日(2022.10.13) | |
| (31)優先権主張番号 63/171,650 | (74)代理人 100092783 弁理士 小林 浩 |
| (32)優先日 令和3年4月7日(2021.4.7) | (74)代理人 100120134 弁理士 大森 規雄 |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US) | (74)代理人 100153693 弁理士 岩田 耕一 |
| (81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR, GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く | (72)発明者 ウォレット, マーク アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 1 0 4, フィラデルフィア, マーケット 最終頁に続く |

(54)【発明の名称】 人工多能性幹細胞からアルファ - ベータ T細胞を生成するための組成物および方法

(57)【要約】

人工多能性幹細胞から T細胞を生成するための方法が提供される。また、遺伝子操作された iPSC、T細胞、CAR - T細胞、およびそれを使用する方法も提供される。

【選択図】 図 1 - 1

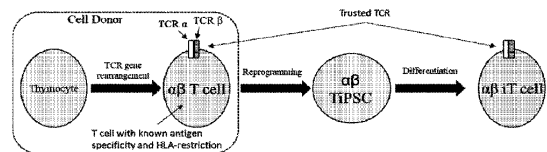


FIG. 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

人工多能性幹細胞 (iPSC) であって、

(i) 組換え再構成 T 細胞受容体 (TCR) をコードする 1 つまたは複数のポリヌクレオチド; および

(ii) キメラ抗原受容体 (CAR) をコードするポリヌクレオチドを含み、

前記再構成された TCR が、特異的 HLA クラス I (HLA - I) アレルのコンテキストにおいて非ヒト抗原を特異的に認識するパブリック TCR であり、前記再構成された TCR が、前記 iPSC の T 細胞への分化を支援する、人工多能性幹細胞 (iPSC) 。

10

【請求項 2】

前記再構成 TCR が、細胞分裂刺激後に前記 iPSC から分化した T 細胞の拡大を可能にする、請求項 1 に記載の iPSC 。

【請求項 3】

組換え再構成 TCR をコードする前記 1 つまたは複数のポリヌクレオチドが、TRAV27 および TRAV13 - 1 からなる群から選択される TCR 可変遺伝子; TRAJ41 および TRAJ37 からなる群から選択される TCR 連結遺伝子; ならびに TCR 定常遺伝子 TRAC を含む、請求項 1 に記載の iPSC 。

【請求項 4】

組換え再構成 TCR をコードする前記 1 つまたは複数のポリヌクレオチドが、鎖可変遺伝子 TRBV19; TRBJ2 - 7、TRBJ2 - 5、および TRBJ2 - 6 からなる群から選択される鎖可変遺伝子; TRBC1 および TRBC2 からなる群から選択される鎖定常遺伝子を含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の iPSC 。

20

【請求項 5】

前記組換え再構成 TCR が、インフルエンザ - A、エプスタイン・バーウイルス (EBV)、およびサイトメガロウイルス (CMV) からなる群から選択されるウイルスに由来する抗原に結合する、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の iPSC 。

【請求項 6】

前記 iPSC が、末梢血単核細胞 (PBMC)、好ましくは、CD34 + 造血幹細胞 (HSC)、または T 細胞から再プログラミングされている、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の iPSC 。

30

【請求項 7】

請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の iPSC に由来する T 細胞。

【請求項 8】

特定の HLA クラス I アレル (HLA - I) のコンテキストにおいて非ヒト抗原を特異的に認識するパブリック TCR であり iPSC の T 細胞への分化を支援する再構成された T 細胞受容体 (TCR) をコードする 1 つまたは複数のポリヌクレオチド、およびキメラ抗原受容体 (CAR) をコードする外因性ポリヌクレオチド; ならびに以下のさらなる特徴:

40

(a) 人工細胞死ポリペプチドをコードする外因性ポリヌクレオチド;

(b) B2M、TAP1、TAP2、タパシン、RFXANK、CIITA、RFX5 および RFXAP 遺伝子のうちの 1 つもしくは複数の欠失もしくは発現低下;

(c) RAG1 および RAG2 遺伝子の欠失もしくは発現低下;

(d) Fc RII (CD16) の天然に存在しないバリエーションをコードする外因性ポリヌクレオチド;

(e) インターロイキン 15 (IL - 15) および / もしくは IL - 15 受容体またはそのバリエーションもしくはトランシェーションをコードする外因性ポリヌクレオチド;

(f) 構成的に活性なインターロイキン 7 (IL - 7) 受容体もしくはそのバリエーションをコードする外因性ポリヌクレオチド;

50

(g) インターロイキン 12 (I L - 12) もしくはインターロイキン 21 (I L - 21) またはそのバリエーションをコードする外因性ポリヌクレオチド ;
 (h) ヒト白血球抗原 E (H L A - E) および / もしくはヒト白血球抗原 G (H L A - G) をコードする外因性ポリヌクレオチド ;
 (i) 白血球表面分化抗原群 C D 47 (C D 47) および / もしくは C D 24 をコードする外因性ポリヌクレオチド ; または
 (j) P S M A もしくは H S V - t k などの、1つもしくは複数のイメージングもしくはリポータータンパク質をコードする外因性ポリヌクレオチド
 のうちの1つまたは複数を含む人工多能性幹細胞 (i P S C) またはそれに由来する T 細胞。

10

【請求項 9】

前記再構成された T C R が、再構成された T C R を有しない T 細胞よりも、細胞分裂刺激後に前記 i P S C から分化した前記 T 細胞の拡大の増加を可能にする、請求項 8 に記載の i P S C または T 細胞。

【請求項 10】

前記 i P S C が、T 細胞から再プログラミングされており、前記再構成された T C R が、前記 T 細胞に対して内因性である、請求項 8 に記載の i P S C または T 細胞。

【請求項 11】

前記再構成された T C R が組換え体である、請求項 8 に記載の i P S C または T 細胞。

20

【請求項 12】

前記 i P S C が、末梢血単核細胞 (P B M C)、好ましくは、C D 34 + 造血幹細胞 (H S C) T 細胞または T 細胞から再プログラミングされている、請求項 11 に記載の i P S C または T 細胞。

【請求項 13】

前記再構成された T C R が、インフルエンザ - A、エプスタイン・バーウイルス (E B V)、およびサイトメガロウイルス (C M V) からなる群から選択されるウイルスに由来する抗原に結合する、請求項 8 から 12 のいずれか一項に記載の i P S C または T 細胞。

30

【請求項 14】

ヒト白血球抗原 E (H L A - E) および / またはヒト白血球抗原 G (H L A - G) をコードする外因性ポリヌクレオチドを含む、請求項 8 から 13 のいずれか一項に記載の i P S C または T 細胞。

【請求項 15】

少なくとも1つの前記外因性ポリヌクレオチドが、B2M、TAP1、TAP2、タバシン、RFXANK、CIITA、RFX5 および RFXAP 遺伝子からなる群から選択される遺伝子の遺伝子座に組み込まれていることによって、遺伝子の欠失または発現低下をもたらすという条件で、1つまたは複数の前記外因性ポリヌクレオチドが、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、HLI1、GAPDH、RUNX1、B2M、TAP1、TAP2、タバシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、CIITA、RFX5、RFXAP、TRAC、TRBC1、TRBC2、RAG1、RAG2、NKG2A、NKG2D、CD38、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、またはTIGIT 遺伝子からなる群から選択される細胞の染色体上の1つまたは複数の遺伝子座に組み込まれている、請求項 8 から 14 のいずれか一項に記載の i P S C または T 細胞。

40

【請求項 16】

1つまたは複数の前記外因性ポリヌクレオチドが、CIITA、AAVS1 および B2M 遺伝子の遺伝子座に組み込まれている、請求項 15 に記載の i P S C または T 細胞。

【請求項 17】

50

B 2 M または C I I T A 遺伝子のうちの 1 つまたは複数の欠失または発現低下を有する、請求項 16 に記載の i P S C または T 細胞。

【請求項 18】

前記再構成された T C R が、配列番号 84 のアミノ酸配列の C D R 3 を有する T C R 鎖、および配列番号 85 のアミノ酸配列の C D R 3 を有する T C R 鎖を含む、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の i P S C または T 細胞。

【請求項 19】

前記 T C R が、T R A V 27 および T R A J 41 遺伝子によってコードされるアミノ酸配列を含み、配列番号 84 のアミノ酸配列の C D R 3 を有する T C R 鎖、ならびに T R B V 19 および T R B J 2 - 7 遺伝子によってコードされるアミノ酸配列を含み、配列番号 85 のアミノ酸配列の C D R 3 を有する T C R 鎖を含む、請求項 18 のいずれか一項に記載の i P S C または T 細胞。

【請求項 20】

前記 C A R が、
 (i) シグナルペプチドを含むシグナルペプチド；
 (i i) 標的細胞上の抗原に特異的に結合する結合ドメインを含む細胞外ドメイン；
 (i i i) ヒンジ領域；
 (i v) 膜貫通ドメイン；
 (v) 細胞内シグナル伝達ドメイン；および
 (v i) 共刺激ドメイン

を含む、請求項 1 から 19 のいずれか一項に記載の i P S C または T 細胞。

【請求項 21】

前記シグナルペプチドが、G M C S F シグナルペプチドである、請求項 20 に記載の i P S C または T 細胞。

【請求項 22】

前記細胞外ドメインが、がん細胞上に発現される抗原に特異的に結合する抗体に由来する s c F v または V_HH を含む、請求項 20 に記載の i P S C または T 細胞。

【請求項 23】

前記ヒンジ領域が、C D 28 ヒンジ領域、C D 8 ヒンジ領域、または I g G ヒンジ領域を含む、請求項 20 に記載の i P S C または T 細胞。

【請求項 24】

前記膜貫通ドメインが、C D 28 膜貫通ドメインまたは C D 8 膜貫通ドメインを含む、請求項 20 に記載の i P S C または T 細胞。

【請求項 25】

前記細胞内シグナル伝達ドメインが、D A P 10、D A P 12、F c イプシロン受容体 I 鎖 (F C E R 1 G)、F c R、N K G 2 D、C D 3、C D 3、C D 3、C D 3、C D 5、C D 22、C D 226、C D 66d、C D 79A、または C D 79B に由来する、請求項 20 に記載の i P S C または T 細胞。

【請求項 26】

前記共刺激ドメインが、C D 28、41BB、I L 2 R b、C D 40、O X 40 (C D 134)、C D 80、C D 86、C D 27、I C O S、N K G 2 D、D A P 10、D A P 12、または 2B4 (C D 244) に由来する共刺激シグナル伝達ドメインである、請求項 20 に記載の i P S C または T 細胞。

【請求項 27】

前記 C A R が、
 (i) 配列番号 1 に対する少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むシグナルペプチド；
 (i i) 配列番号 7 に対する少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列

を含む細胞外ドメイン；

(i i i) 配列番号 22 に対する少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むヒンジ領域；

(i v) 配列番号 24 に対する少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む膜貫通ドメイン；

(v) 配列番号 6 に対する少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む細胞内シグナル伝達ドメイン；および

(v i) 配列番号 20 に対する少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む共刺激ドメイン

を含む、請求項 20 に記載の i P S C または T 細胞。

【請求項 28】

前記 C A R が、

(i) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含むシグナルペプチド；

(i i) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む細胞外ドメイン；

(i i i) 配列番号 22 のアミノ酸配列を含むヒンジ領域；

(i v) 配列番号 24 のアミノ酸配列を含む膜貫通ドメイン；

(v) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む細胞内シグナル伝達ドメイン；および

(v i) 配列番号 20 のアミノ酸配列を含む共刺激ドメイン

を含む、請求項 20 に記載の i P S C または T 細胞。

【請求項 29】

人工細胞死ペプチドの作用機構が、代謝性、二量体化誘導性または治療的モノクローナル抗体媒介性である、請求項 8 から 28 のいずれか一項に記載の i P S C または T 細胞。

【請求項 30】

前記治療的モノクローナル抗体媒介性人工細胞死ポリペプチドが、イブリツモマブ、チウキセタン、ムロモナブ - C D 3、トシツモマブ、アブシキシマブ、バシリキシマブ、ブレツキシマブベドチン、セツキシマブ、インフリキシマブ、リツキシマブ、アレムツズマブ、ベバシズマブ、セルトリズマブペゴール、ダクリズマブ、エクリズマブ、エファリズマブ、ゲムツズマブ、ナタリズマブ、オマリズマブ、パリビズマブ、ポラツズマブベドチン、ラニビズマブ、トシリズマブ、トラスツズマブ、ベドリズマブ、アダリムマブ、ベリムマブ、カナキヌマブ、デノスマブ、ゴリムマブ、イピリムマブ、オフアツムマブ、パニツムマブ、またはウステキヌマブによって特異的に認識されるエピトープから選択されるモノクローナル抗体特異的エピトープの群から選択される不活化された細胞表面タンパク質である、請求項 29 に記載の i P S C または T 細胞。

【請求項 31】

前記不活化された細胞表面タンパク質が、トランケートされた上皮増殖因子 (t E G F R) バリエーションである、請求項 30 に記載の i P S C または T 細胞。

【請求項 32】

前記 t E G F R バリエーションが、配列番号 71 に対する少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる、請求項 31 に記載の i P S C または T 細胞。

【請求項 33】

前記 H L A - E が、配列番号 66 に対する少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % もしくは 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、または前記 H L A - G が、配列番号 69 に対する少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % もしくは 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 14 に記載の i P S C

10

20

30

40

50

または T 細胞。

【請求項 34】

(i) 前記キメラ抗原受容体 (CAR) をコードする外因性ポリヌクレオチドが AAVS1 遺伝子の遺伝子座に組み込まれ;

(ii) 前記人工細胞死ポリペプチドをコードする外因性ポリヌクレオチドが CIITA 遺伝子の遺伝子座に組み込まれ; および

(iii) 前記ヒト白血球抗原 E (HLA-E) および/またはヒト白血球抗原 G (HLA-G) をコードする外因性ポリヌクレオチドが B2M 遺伝子の遺伝子座に組み込まれており;

前記外因性ポリヌクレオチドの組み込みが、CIITA および B2M を欠失させるか、またはその発現を低下させる、請求項 14 から 33 のいずれか一項に記載の iPSC または T 細胞。 10

【請求項 35】

人工多能性幹細胞 (iPSC) または T 細胞であって、

(i) 配列番号 61 のアミノ酸配列を有するキメラ抗原受容体 (CAR) をコードする外因性ポリヌクレオチド;

(ii) 配列番号 71 のアミノ酸配列を有するアポトーシス誘導ドメインを含む人工細胞死ポリペプチドをコードする外因性ポリヌクレオチド;

(iii) 配列番号 86 のアミノ酸配列を有する TCR および配列番号 87 のアミノ酸配列を有する TCR を含む再構成された T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子座をコードするポリヌクレオチド; および 20

(iv) 必要に応じて、配列番号 66 のアミノ酸配列を有するヒト白血球抗原 E (HLA-E) をコードする外因性ポリヌクレオチドを含み、

1 つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドが AAVS1、CIITA および B2M 遺伝子の遺伝子座に組み込まれていることによって、CIITA および B2M を欠失させるか、またはその発現を低下させる、iPSC または T 細胞。

【請求項 36】

請求項 7 から 35 のいずれか一項に記載の T 細胞を含む組成物。

【請求項 37】 30

ペプチド、サイトカイン、チェックポイント阻害剤、ミトジェン、増殖因子、低分子 RNA、dsRNA (二本鎖 RNA)、siRNA、オリゴヌクレオチド、単核血液細胞、目的の 1 つもしくは複数のポリ核酸を含むベクター、抗体、化学療法剤もしくは放射性部分、または免疫調節薬 (IMiD) からなる群から選択される 1 つまたは複数の治療剤をさらに含むか、またはそれと共に使用される、請求項 36 に記載の組成物。

【請求項 38】

それを必要とする対象におけるがんを処置する方法であって、請求項 1 から 35 のいずれか一項に記載の細胞または請求項 36 および 37 のいずれか一項に記載の組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む方法。

【請求項 39】 40

前記がんが、非ホジキンリンパ腫 (NHL) ある、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

T 細胞を製造する方法であって、細胞分化のための条件下で請求項 1 から 35 のいずれか一項に記載の iPSC 細胞を分化させることによって、前記 T 細胞を得ることを含む方法。

【請求項 41】

前記 iPSC が、前記 iPSC のゲノム操作であって、標的化編集を含むゲノム操作によって得られる、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

前記標的化編集が、CRISPR、ZFN、TALEN、ホーミングヌクレアーゼ、相 50

同組換え、またはこれらの方法の任意の他の機能的変形によって実行される欠失、挿入、またはインデルを含む、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

特定の H L A クラス I (H L A - I) アレルのコンテキストにおいて非ヒト抗原を特異的に認識するパブリック T C R であり i P S C の T 細胞への分化を支援する再構成された

T 細胞受容体 (T C R) をコードする 1 つまたは複数のポリヌクレオチド、およびキメラ抗原受容体 (C A R) をコードする外因性ポリヌクレオチド；ならびに以下のさらなる特徴：

- (a) 人工細胞死ポリペプチドをコードする外因性ポリヌクレオチド；
 - (b) B 2 M、T A P 1、T A P 2、タパシン、R F X A N K、C I I T A、R F X 5 および R F X A P 遺伝子のうちの 1 つもしくは複数の欠失もしくは発現低下；
 - (c) R A G 1 および R A G 2 遺伝子の欠失もしくは発現低下；
 - (d) F c R I I I (C D 1 6) の天然に存在しないバリエーションをコードする外因性ポリヌクレオチド；
 - (e) インターロイキン 1 5 (I L - 1 5) および / もしくはインターロイキン (I L - 1 5) 受容体またはそのバリエーションもしくはトランケーションをコードする外因性ポリヌクレオチド；
 - (f) 構成的に活性なインターロイキン 7 (I L - 7) 受容体もしくはそのバリエーションをコードする外因性ポリヌクレオチド；
 - (g) インターロイキン 1 2 (I L - 1 2) もしくはインターロイキン 2 1 (I L - 2 1) またはそのバリエーションをコードする外因性ポリヌクレオチド；
 - (h) ヒト白血球抗原 E (H L A - E) および / もしくはヒト白血球抗原 G (H L A - G) をコードする外因性ポリヌクレオチド；
 - (i) 白血球表面分化抗原群 C D 4 7 (C D 4 7) および / もしくは C D 2 4 をコードする外因性ポリヌクレオチド；または
 - (j) P S M A もしくは H S V - t k などの、1 つもしくは複数のイメージングもしくはリポータータンパク質をコードする外因性ポリヌクレオチド
- のうちの 1 つまたは複数を含む、人工多能性幹細胞 (i P S C) に由来する C D 3 4 + 造血前駆細胞 (H P C) 。

【請求項 4 4】

前記 i P S C が、全末梢血単核細胞 (P B M C) から再プログラミングされている、請求項 4 3 に記載の C D 3 4 + H P C 。

【請求項 4 5】

前記再構成された T C R が、前記再構成された T C R を有しない T 細胞よりも、細胞分裂刺激後に前記 i P S C から分化した前記 T 細胞の拡大の増加を可能にする、請求項 4 4 に記載の C D 3 4 + H P C 。

【請求項 4 6】

前記 i P S C が、T 細胞から再プログラミングされており、前記再構成された T C R が、前記 T 細胞に対して内因性である、請求項 4 3 に記載の C D 3 4 + H P C 。

【請求項 4 7】

前記再構成された T C R が組換え体である、請求項 4 3 に記載の C D 3 4 + H P C 。

【請求項 4 8】

前記再構成された T C R が、インフルエンザ - A、エプスタイン・バーウイルス (E B V)、およびサイトメガロウイルス (C M V) からなる群から選択されるウイルスに由来する抗原に結合する、請求項 4 3 から 4 7 のいずれか一項に記載の C D 3 4 + H P C 。

【請求項 4 9】

人工多能性幹細胞 (i P S C) 由来 C D 3 4 + H P C などの、再構成された T C R をコ

ードするポリヌクレオチドを含むCD34+造血前駆細胞（HPC）をT細胞に分化させる方法であって、デルタ様タンパク質4（DLL4）およびJagged2（JAG2）を含み、必要に応じて、フィブロネクチンタンパク質またはその断片、SCF、人工多能性幹細胞（iPSC）由来FLT3L、TPO、および/またはIL-7をさらに含む培地中でCD34+HPCを培養することを含む方法。

【請求項50】

前記DLL4およびJAG2タンパク質が、プロテインGコーティングの存在下または非存在下でポリドーパミンを使用することなどによって、細胞培養プレート上に固定される、請求項49に記載の方法。

【請求項51】

前記細胞が、約21～約35日間にわたってDLL4およびJAG2を含む培地中で培養される、請求項49または50に記載の方法。

【請求項52】

インターロイキン-2（IL-2）、IL-7、およびIL-15からなる群から選択される1つまたは複数のサイトカインを含む培地中で細胞を培養することをさらに含む、請求項49から51のいずれか一項に記載の方法。

【請求項53】

抗CD3抗体、好ましくは、OKT3またはUCHT1である抗CD3抗体を含む培地中で細胞を培養することをさらに含む、請求項49から52のいずれか一項に記載の方法。

【請求項54】

再構成されたTCRをコードするポリヌクレオチドを含む人工多能性幹細胞（iPSC）由来CD34+造血前駆細胞（HPC）をT細胞に分化させる方法であって、

(a) 組換えデルタ様タンパク質4（DLL4）および組換えJagged2（JAG2）を含み、必要に応じて、フィブロネクチンタンパク質またはその断片、SCF、FLT3L、TPO、および/またはIL-7をさらに含む培地中で前記細胞を培養すること；
(b) インターロイキン-2（IL-2）、IL-7、およびIL-15を含む培地中で前記細胞を培養すること；ならびに

(c) 抗CD3抗体、好ましくは、OKT3またはUCHT1を含む培地中で前記細胞を培養すること

を含む方法。

【請求項55】

前記細胞が、分化の0日目から約21日目まで組換えDLL4およびJAG2を含む培地中で培養される、請求項49から54のいずれか一項に記載の方法。

【請求項56】

前記細胞が、分化の21日目から約28日目までIL-2、IL-7、およびIL-15を含む培地中で培養される、請求項54または55に記載の方法。

【請求項57】

前記細胞が、分化の21日目から約28日目まで抗CD3抗体を含む培地中で培養される、請求項54から56のいずれか一項に記載の方法。

【請求項58】

配列番号90に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むアミノ酸を有する組換えデルタ様タンパク質4（DLL4）バリエーションポリペプチド。

【請求項59】

再構成されたTCRをコードするポリヌクレオチドを含む人工多能性幹細胞（iPSC）由来CD34+造血前駆細胞（HPC）をT細胞に分化させる方法であって、請求項58に記載の組換えDLL4バリエーションを含む培地中でCD34+HPCを培養することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2021年4月7日に出願された米国仮特許出願第63/171,650号明細書の利益を請求し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本出願は、再構成された T細胞受容体 (TCR) を発現する遺伝子操作された人工多能性幹細胞 (iPSC) およびその誘導体細胞を提供する。また、同種異系細胞療法のためのキメラ抗原受容体を発現させるための iPSC またはその誘導体細胞の使用も提供される。さらに、関連ベクター、ポリヌクレオチド、および医薬組成物が提供される。

10

【0003】

電子的に提出された配列表の参照

本出願は、ファイル名「Sequence Listing ST25」および2022年3月29日の作成日および158kbのサイズを有する、ASCII形式の配列表として EFS - Web により電子的に提出される配列表を含有する。EFS - Web により提出される配列表は、本明細書の一部であり、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0004】

キメラ抗原受容体 (CAR) T (CART) 細胞は、抗原特異的様式で悪性細胞を除去するための新しい手法を提供することによってがん療法に大変革をもたらした。現在認可されている型の CART は、CAR 分子がレンチウイルスベクターを使用して導入遺伝子として送達される自己生成物である。この方法は有効であるが、その大きな制限としては、製造期間、製造コスト、細胞生成物を劣ったものにする多くのがん患者における T細胞の健康不良、および反復処置のための複数用量を生成することができないことが挙げられる。これらの制限の一部は、健康なドナーに由来する末梢血 T細胞を使用して、容易に入手可能な製品として複数用量の CART を製造する同種異系方法の開発によって対処されている。しかしながら、このプラットフォームに関しては新しい課題が浮上している。第1に、1人の健康なドナーは、白血球除去輸血製品からの限られた数の新しい用量を支援することしかできず、ドナーに応じて有意なロット間変動性をもたらす。この手法は、非効率的で不必要に高価であるいくつかの同時製造キャンペーンを必要とする。第2に、ヒト白血球抗原 (HLA) の変動性は、そのような同種異系生成物を、レシピエントによる免疫拒絶の影響を受けやすくする。第3に、ドナー T細胞によって発現される T細胞受容体 (TCR) は、レシピエントのミスマッチした HLA 分子にとって不適合であり、かくして、T細胞同種移植片の潜在的に生命を脅かす合併症である移植片対宿主疾患に関与し得る。

20

30

【0005】

かくして、移植片対宿主疾患のリスクをも軽減しながら、大量に製造することができる同種異系 CART 療法が当業界で必要である。

【0006】

トラステッド TCR は、移植片対宿主疾患を引き起こす可能性が低減された特異的 T細胞受容体である。TCR は、T細胞発生の間の胸腺選択のプロセス中に生じる多様なヘテロ二量体細胞表面受容体である。TCR 再構成の無作為な性質は、HLA 媒介性抗原提示のコンテキストにおいて抗原を認識することができる成熟 TCR タンパク質複合体をもたらす。そのような TCR が、自己 HLA のコンテキストにおいて自己抗原を認識することを防止するために、T細胞発生の特定の段階が、そのような「自己反応性」T細胞の除去に特化している。このプロセスは、陰性選択と呼ばれる。胸腺において、自己反応性プレ T細胞 (胸腺細胞) が、その TCR を介して自己 HLA のコンテキストにおいて自己抗原を認識する場合、そのプレ T細胞は、プログラム細胞死応答によって除去される。かくして、多様な T細胞プールから、潜在的な有害な自己反応性 T細胞は一掃される。しかしな

40

50

がら、このプロセスは個体にとって非常に特異的なものであるため、陰性選択は、別の個体における抗原 / H L A と反応し得る T 細胞を除去しない。これが、同種異系 T 細胞移植片が、レシピエントの抗原 / H L A 複合体を認識した後、レシピエント細胞を攻撃し得るいくらかの細胞を含む移植片対宿主疾患の基本的原理である。

【 0 0 0 7 】

いくつかの研究は、人々の集団における T C R 配列の多様性を記載している。大多数の T C R 配列はいわゆる「プライベート」配列（異なる人々では稀にしか生じない）であるが、ヒトにおいて見出される T C R の一部はパブリック（共通の H L A または共通の感染性因子を有する人々の間で頻繁に生じる）である（DeWitt et al., *Elife*. 2018 Aug 28;7:e38358）。公知のパブリック T C R 内には、特定の H L A アレルを有する人々に
10
おいて特定のウイルスを認識する、よく特徴付けられた受容体が存在する。これらの 1 つは、H L A - A * 0 2 : 0 1 のコンテキストにおいてインフルエンザ A エピトープを認識する T R B V 1 9 遺伝子を使用する T C R である（DeWitt et al., *Elife*. 2018 Aug 28;7:e38358）。そのような T R B V 1 9 T C R は、アルファ T C R 鎖 T R A V 2 7 と対形成することが多く、インフルエンザペプチド G I L G F V F T L を認識する（Choo et al., *J Virol*. 2014 Sep;88(18):10613-23 ; Chen et al., *Cell Rep*. 2017 Apr 18;19(3):569-583）。

【 0 0 0 8 】

人工多能性幹細胞（i P S C）に由来するトラステッド T C R を発現する C A R T 細胞を生成するための方法が、本明細書に記載される。
20

【 発明の概要 】

【 0 0 0 9 】

1 つの一般的な態様では、遺伝子操作された人工多能性幹細胞またはその誘導体細胞が提供される。細胞は、(i) 組換え再構成 T 細胞受容体（T C R）をコードする 1 つまたは複数のポリヌクレオチド；および (i i) キメラ抗原受容体（C A R）をコードするポリヌクレオチドを含み、ここで、再構成された T C R は、特定の H L A クラス I（H L A - I）アレルのコンテキストにおいて非ヒト抗原を特異的に認識するパブリック T C R であり、再構成された T C R は i P S C の T 細胞への分化を支援する。

【 0 0 1 0 】

ある特定の実施形態では、再構成された T C R は、細胞分裂刺激後に i P S C から
30
分化した T 細胞の拡大を可能にする。

【 0 0 1 1 】

ある特定の実施形態では、組換え再構成 T C R をコードする 1 つまたは複数のポリヌクレオチドは、T R A V 2 7 および T R A V 1 3 - 1 からなる群から選択される T C R 可変遺伝子；T R A J 4 1 および T R A J 3 7 からなる群から選択される T C R 連結遺伝子；ならびに T C R 定常遺伝子 T R A C を含む。

【 0 0 1 2 】

ある特定の実施形態では、組換え再構成 T C R をコードする 1 つまたは複数のポリヌクレオチドは、鎖可変遺伝子 T R B V 1 9 ；T R B J 2 - 7、T R B J 2 - 5、および T R B J 2 - 6 からなる群から選択される鎖可変遺伝子；T R B C 1 および T R B C
40
2 からなる群から選択される鎖定常遺伝子を含む。

【 0 0 1 3 】

ある特定の実施形態では、組換え再構成 T C R は、インフルエンザ - A、エプスタイン・バーウイルス（E B V）、およびサイトメガロウイルス（C M V）からなる群から選択されるウイルスに由来する抗原に結合する。

【 0 0 1 4 】

ある特定の実施形態では、i P S C は、末梢血単核細胞（P B M C）、好ましくは、C D 3 4 + 造血幹細胞（H S C）または T 細胞から再プログラミングされる。

【 0 0 1 5 】

また、本出願による i P S C 細胞に由来する T 細胞も提供される。
50

【0016】

また、特定のHLAクラスI（HLA-I）アレルのコンテキストにおいて非ヒト抗原を特異的に認識するパブリックTCRでありiPSCのT細胞への分化を支援する再構成されたT細胞受容体（TCR）をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチド、およびキメラ抗原受容体（CAR）をコードする外因性ポリヌクレオチド；ならびに以下のさらなる特徴：

- (a) 人工細胞死ポリペプチドをコードする外因性ポリヌクレオチド；
 - (b) B2M、TAP1、TAP2、タパシン、RFXANK、CIITA、RFX5およびRFXAP遺伝子のうちの1つもしくは複数の欠失もしくは発現低下；
 - (c) RAG1およびRAG2遺伝子の欠失もしくは発現低下；
 - (d) FcRIII（CD16）の天然に存在しないバリエーションをコードする外因性ポリヌクレオチド；
 - (e) インターロイキン15（IL-15）および/もしくはIL-15受容体またはそのバリエーションもしくはトランシェーションをコードする外因性ポリヌクレオチド；
 - (f) 構成的に活性なインターロイキン7（IL-7）受容体もしくはそのバリエーションをコードする外因性ポリヌクレオチド；
 - (g) インターロイキン12（IL-12）もしくはインターロイキン21（IL-21）またはそのバリエーションをコードする外因性ポリヌクレオチド；
 - (h) ヒト白血球抗原E（HLA-E）および/もしくはヒト白血球抗原G（HLA-G）をコードする外因性ポリヌクレオチド；
 - (i) 白血球表面分化抗原群CD47（CD47）および/もしくはCD24をコードする外因性ポリヌクレオチド；または
 - (j) PSMaもしくはHSV-tkなどの、1つもしくは複数のイメージングもしくはリポータータンパク質をコードする外因性ポリヌクレオチド
- のうちの1つまたは複数を含む人工多能性幹細胞（iPSC）またはそれに由来するT細胞も提供される。

【0017】

ある特定の実施形態では、再構成されたTCRは、組換え体である。

【0018】

ある特定の実施形態では、iPSCは、末梢血単核細胞（PBMC）、好ましくは、CD34+造血幹細胞（HSC）またはT細胞から再プログラミングされる。

【0019】

ある特定の実施形態では、再構成されたTCRは、インフルエンザ-A、エプスタイン・バーウイルス（EBV）、およびサイトメガロウイルス（CMV）からなる群から選択されるウイルスに由来する抗原に結合する。

【0020】

ある特定の実施形態では、iPSCまたはT細胞は、ヒト白血球抗原E（HLA-E）および/またはヒト白血球抗原G（HLA-G）をコードする外因性ポリヌクレオチドを含む。

【0021】

ある特定の実施形態では、少なくとも1つの外因性ポリヌクレオチドが、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、RFXANK、CIITA、RFX5およびRFXAP遺伝子からなる群から選択される遺伝子の遺伝子座に組み込まれることによって、遺伝子の欠失または発現低下をもたらすという条件で、1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドは、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H1L、GAPDH、RUNX1、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、CIITA、RFX5、RFXAP、TRAC、TRBC1、TRBC2、RAG1、RAG2、NKG2A、NKG2D、CD38、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、またはTIGIT遺伝子からなる群から選択される細胞の染色体上の1つまたは複数の遺伝子座に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【0022】

ある特定の実施形態では、1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドは、C I I T A、A A V S 1 および B 2 M 遺伝子の遺伝子座に組み込まれる。

【0023】

ある特定の実施形態では、i P S C または T 細胞は、B 2 M または C I I T A 遺伝子のうちの1つまたは複数の欠失または発現低下を有する。

【0024】

ある特定の実施形態では、再構成された T C R は、配列番号 8 4 のアミノ酸配列の C D R 3 を有する T C R 鎖、および配列番号 8 5 のアミノ酸配列の C D R 3 を有する T C R 鎖を含む。

10

【0025】

ある特定の実施形態では、T C R は、T R A V 2 7 および T R A J 4 1 遺伝子によってコードされるアミノ酸配列を含み、配列番号 8 4 のアミノ酸配列の C D R 3 を有する T C R 鎖、ならびに T R B V 1 9 および T R B J 2 - 7 遺伝子によってコードされるアミノ酸配列を含み、配列番号 8 5 のアミノ酸配列の C D R 3 を有する T C R 鎖を含む。

【0026】

ある特定の実施形態では、C A R は、
 (i) シグナルペプチドを含むシグナルペプチド；
 (i i) 標的細胞上の抗原に特異的に結合する結合ドメインを含む細胞外ドメイン；
 (i i i) ヒンジ領域；
 (i v) 膜貫通ドメイン；
 (v) 細胞内シグナル伝達ドメイン；および
 (v i) 共刺激ドメインを含む。

20

【0027】

ある特定の実施形態では、シグナルペプチドは、G M C S F シグナルペプチドである。

【0028】

ある特定の実施形態では、細胞外ドメインは、がん細胞上で発現される抗原に特異的に結合する抗体に由来する s c F v または V H H を含む。

【0029】

ある特定の実施形態では、ヒンジ領域は、C D 2 8 ヒンジ領域、C D 8 ヒンジ領域、または I g G ヒンジ領域を含む。

30

【0030】

ある特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、C D 2 8 膜貫通ドメインまたは C D 8 膜貫通ドメインを含む。

【0031】

ある特定の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、D A P 1 0、D A P 1 2、F c イプシロン受容体 I 鎖 (F C E R 1 G)、F c R、N K G 2 D、C D 3、C D 3、C D 3、C D 5、C D 2 2、C D 2 2 6、C D 6 6 d、C D 7 9 A、または C D 7 9 B に由来する。

【0032】

ある特定の実施形態では、共刺激ドメインは、C D 2 8、4 1 B B、I L 2 R b、C D 4 0、O X 4 0 (C D 1 3 4)、C D 8 0、C D 8 6、C D 2 7、I C O S、N K G 2 D、D A P 1 0、D A P 1 2、または 2 B 4 (C D 2 4 4) に由来する共刺激シグナル伝達ドメインである。

40

【0033】

ある特定の実施形態では、C A R は、
 (i) 配列番号 1 に対する少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むシグナルペプチド；

(i i) 配列番号 7 に対する少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9

50

5%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む細胞外ドメイン；

(iii) 配列番号22に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むヒンジ領域；

(iv) 配列番号24に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む膜貫通ドメイン；

(v) 配列番号6に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む細胞内シグナル伝達ドメイン；および

(vi) 配列番号20に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む共刺激ドメインを含む。

【0034】

ある特定の実施形態では、人工細胞死ポリペプチドの作用機構は、代謝性、二量体化誘導性または治療的モノクローナル抗体媒介性である。

【0035】

ある特定の実施形態では、治療的モノクローナル抗体媒介性人工細胞死ポリペプチドは、イブリツモマブ、チウキセタン、ムロモナブ - CD3、トシツモマブ、アブシキシマブ、バシリキシマブ、ブレンツキシマブベドチン、セツキシマブ、インフリキシマブ、リツキシマブ、アレムツズマブ、ベバシズマブ、セルトリズマブペゴール、ダクリズマブ、エクリズマブ、エファリズマブ、ゲムツズマブ、ナタリズマブ、オマリズマブ、パリピズマブ、ボラツズマブベドチン、ラニビズマブ、トシリズマブ、トラスツズマブ、ベドリズマブ、アダリムマブ、ベリムマブ、カナキヌマブ、デノスマブ、ゴリムマブ、イピリムマブ、オフアツムマブ、パニツムマブ、またはウステキヌマブによって特異的に認識されるエピトープから選択されるモノクローナル抗体特異的エピトープの群から選択される不活化された細胞表面タンパク質である。

【0036】

ある特定の実施形態では、不活化された細胞表面タンパク質は、トランケートされた上皮増殖因子 (tEGFR) バリエントである。

【0037】

ある特定の実施形態では、tEGFRバリエントは、配列番号71に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる。

【0038】

ある特定の実施形態では、HLA-Eは、配列番号66に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、またはHLA-Gは、配列番号69に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0039】

ある特定の実施形態では、(i) キメラ抗原受容体 (CAR) をコードする外因性ポリヌクレオチドは、AAVS1遺伝子の遺伝子座に組み込まれる；(ii) 人工細胞死ポリペプチドをコードする外因性ポリペプチドは、CIITA遺伝子の遺伝子座に組み込まれる；ならびに(iii) ヒト白血球抗原E (HLA-E) および/またはヒト白血球抗原G (HLA-G) をコードする外因性ポリペプチドは、B2M遺伝子の遺伝子座に組み込まれる；ここで、外因性ポリヌクレオチドの組み込みは、CIITAおよびB2Mを欠失させるか、またはその発現を低下させる。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 0 】

また、人工多能性幹細胞 (i P S C) または T 細胞であって、
 (i) 配列番号 6 1 のアミノ酸配列を有するキメラ抗原受容体 (C A R) をコードする外
 因性ポリヌクレオチド ;
 (i i) 配列番号 7 1 のアミノ酸配列を有するアポトーシス誘導ドメインを含む人工細胞
 死ポリペプチドをコードする外因性ポリヌクレオチド ;
 (i i i) 配列番号 8 6 のアミノ酸配列を有する T C R 、 および配列番号 8 7 のアミノ
 酸配列を有する T C R を含む再構成された T 細胞受容体 (T C R) 遺伝子座をコードす
 るポリヌクレオチド ; ならびに
 (i v) 必要に応じて、配列番号 6 6 のアミノ酸配列を有するヒト白血球抗原 E (H L A
 - E) をコードする外因性ポリヌクレオチド
 を含み、
 1 つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドが A A V S 1 、 C I I T A および B 2 M 遺伝子
 の遺伝子座に組み込まれていることによって、C I I T A および B 2 M を欠失させるか、
 またはその発現を低下させる、i P S C または T 細胞も提供される。

【 0 0 4 1 】

また、本出願の実施形態による T 細胞を含む組成物も提供される。

【 0 0 4 2 】

ある特定の実施形態では、組成物は、ペプチド、サイトカイン、チェックポイント阻害
 剤、マイトジェン、増殖因子、低分子 R N A 、 d s R N A (二本鎖 R N A) 、 s i R N A
 、オリゴヌクレオチド、単核血液細胞、目的の 1 つもしくは複数のポリ核酸を含むベクタ
 ー、抗体、化学療法剤もしくは放射性部分、または免疫調節薬 (I M i D) からなる群か
 ら選択される 1 つまたは複数の治療剤をさらに含むか、またはそれと共に提供もしくは使
 用される。

【 0 0 4 3 】

また、それを必要とする対象におけるがんを処置する方法であって、本出願の実施形態
 による細胞または本出願の実施形態による組成物を、それを必要とする対象に投与するこ
 とを含む方法も提供される。

【 0 0 4 4 】

また、本出願の T 細胞を製造する方法であって、細胞分化のための条件下で本出願の i
 P S C 細胞を分化させることによって、T 細胞を得ることを含む方法も提供される。ある
 特定の実施形態では、i P S C は、i P S C のゲノム操作であって、標的化編集を含むゲ
 ノム操作によって得られる。標的化編集の例としては、限定されるものではないが、C R
 I S P R 、 Z F N 、 T A L E N 、 ホーミングヌクレアーゼ、相同組換え、またはこれらの
 方法の任意の他の機能的変形によって実行される欠失、挿入、またはインデルが挙げられ
 る。

【 0 0 4 5 】

また、特定の H L A クラス I (H L A - I) アレルのコンテキストにおいて非ヒト抗原
 を特異的に認識するパブリック T C R であり i P S C の T 細胞への分化を支援する再構成
 された T 細胞受容体 (T C R) をコードする 1 つまたは複数のポリヌクレオチド、お
 よびキメラ抗原受容体 (C A R) をコードする外因性ポリヌクレオチド ; ならびに以下の
 さらなる特徴 :

- (a) 人工細胞死ポリペプチドをコードする外因性ポリヌクレオチド ;
- (b) B 2 M 、 T A P 1 、 T A P 2 、 タパシン 、 R F X A N K 、 C I I T A 、 R F X 5 お
 よび R F X A P 遺伝子のうちの 1 つもしくは複数の欠失もしくは発現低下 ;
- (c) R A G 1 および R A G 2 遺伝子の欠失もしくは発現低下 ;
- (d) F c R I I I (C D 1 6) の天然に存在しないバリエーションをコードする外因性ポ
 リヌクレオチド ;
- (e) インターロイキン 1 5 (I L - 1 5) および / もしくはインターロイキン (I L -
 1 5) 受容体またはそのバリエーションもしくはトランケーションをコードする外因性ポリヌ

クレオチド；

(f) 構成的に活性なインターロイキン7 (IL-7) 受容体もしくはそのバリエーションをコードする外因性ポリヌクレオチド；

(g) インターロイキン12 (IL-12) もしくはインターロイキン21 (IL-21) またはそのバリエーションをコードする外因性ポリヌクレオチド；

(h) ヒト白血球抗原E (HLA-E) および/もしくはヒト白血球抗原G (HLA-G) をコードする外因性ポリヌクレオチド；

(i) 白血球表面分化抗原群CD47 (CD47) および/もしくはCD24をコードする外因性ポリヌクレオチド；または

(j) PSMAもしくはHSV-tkなどの、1つもしくは複数のイメージングもしくはリポータータンパク質をコードする外因性ポリヌクレオチド 10

のうちの1つまたは複数を含む人工多能性幹細胞 (iPSC) に由来するCD34+造血前駆細胞 (HPC) も提供される。

【0046】

また、再構成されたTCRをコードするポリヌクレオチドを含む人工多能性幹細胞 (iPSC) 由来CD34+HPCなどの、再構成されたTCRをコードするポリヌクレオチドを含むCD34+造血前駆細胞 (HPC) をT細胞に分化させる方法であって、デルタ様タンパク質4 (DLL4) およびJagged2 (JAG2) を含み、必要に応じて、フィブロネクチンタンパク質またはその断片、SCF、FLT3L、TPO、および/またはIL-7をさらに含む培地中でCD34+HPCを培養することを含む方法も提供される。 20

【0047】

また、再構成されたTCRをコードするポリヌクレオチドを含む人工多能性幹細胞 (iPSC) 由来CD34+造血前駆細胞 (HPC) を分化させる方法であって、

(a) 組換えデルタ様タンパク質4 (DLL4) および組換えJagged2 (JAG2) を含み、必要に応じて、フィブロネクチンタンパク質またはその断片をさらに含む培地中で細胞を培養すること；

(b) インターロイキン-2 (IL-2)、IL-7、およびIL-15を含む培地中で細胞を培養すること；ならびに

(c) 抗CD3抗体、好ましくは、OKT3またはUCHL1を含む培地中で細胞を培養すること 30

を含む方法も提供される。

【0048】

ある特定の実施形態では、DLL4およびJAG2タンパク質は、プロテインGコーティングの存在下または非存在下でポリドーパミンを使用することなどによって、細胞培養プレート上に固定される。

【0049】

また、配列番号90に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むアミノ酸を有する組換えデルタ様タンパク質4 (DLL4) バリエーションポリペプチドも提供される。 40

【0050】

また、再構成されたTCRをコードするポリヌクレオチドを含む人工多能性幹細胞 (iPSC) 由来CD34+造血前駆細胞 (HPC) をT細胞に分化させる方法であって、本出願の実施形態による組換えDLL4バリエーションを含む培地中でCD34+HPCを培養することを含む方法も提供される。

【0051】

前記概要、ならびに本出願の好ましい実施形態の以下の詳細な説明は、添付の図面と共に読んだ場合により良く理解されるであろう。しかしながら、以下のことが理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1-1】図1A~Cは、供給源として人工多能性幹細胞(iPSC)を使用してiT細胞を生成する方法の略図を示す。図1Aは、血液試料から収集された、既知の抗原特異性およびHLA拘束性を有する成熟T細胞に由来するiPSCを使用してiT細胞を生成する方法を示す。図1Bは、血液試料から収集されたCD34+造血幹細胞(HSC)に由来するiPSCを使用してiT細胞を生成する方法を示す。図1Cは、トラステッドTCRによって置き換えられた未知の抗原特異性のTCRを有する血液試料から収集された成熟T細胞に由来するiPSCを使用してiT細胞を生成する方法を示す。

10

【図1-2】(上記の通り。)

【図1-3】(上記の通り。)

【図2】図2は、造血前駆細胞(HPC)をDLL4またはDLL4およびJAG2中で分化させた場合のiPSC由来T(iT)の収量を示す。

【図3】図3は、インターロイキン-15(IL-15)を含む、および含まない造血前駆細胞(HPC)培養物から分化させたiT細胞のiPSC由来T(iT)細胞収量および生存能力パーセントを示す。

【図4】図4は、CD19を発現するように操作されたiPSC由来T(iT)の生存能力パーセントならびにDLL4またはDLL4およびJAG2中で分化させたiT細胞中でCD19標的化キメラ抗原受容体(CAR)を発現するように操作されたiPSC由来T(iT)による標的細胞の溶解パーセントを示す。

20

【図5】図5は、iPSC由来T(iT)細胞の収量および抗CD3抗体OKT3またはUCHT1中で分化させたiT細胞中でCD19を発現するように操作されたiPSC由来T(iT)による標的細胞の溶解パーセントを示す。

【図6】図6は、造血前駆細胞(HPC)をiPSC由来T(iT)細胞に分化させるための方法の略図である。

【図7-1】図7は、分化の28日後のiPSC由来T(iT)細胞によって発現される細胞マーカーを示す代表的なFACSの結果のグラフを示す。

【図7-2】(上記の通り。)

【図7-3】(上記の通り。)

30

【図8】図8は、iT細胞上でのFMC63(CD19特異的)CARの発現を示す。CAR-iT細胞を、未染色のままにしたか(上)、または抗FMC63CAR抗体で染色した(下)。

【図9-1】図9A~Bは、CAR-iT細胞によるB細胞リンパ腫細胞の抗原特異的殺滅を示す。図9Aは、CAR-iT細胞(黒色の四角)またはPBMC由来CAR-T細胞(灰色の丸)による抗原陽性Rehリンパ腫細胞(CD19発現リンパ腫系)の殺滅を示す。図9Bは、CAR-iT細胞(黒色の四角)またはPBMC由来CAR-T細胞(灰色の丸)による抗原陰性Rehリンパ腫細胞(CD19抗原が遺伝子欠失によって除去された)を示す。

【図9-2】(上記の通り。)

40

【図10】図10は、パブリックTCRのアルファTCR鎖およびベータTCR鎖の略図を示す。

【図11】図11は、例示的なHLA拘束性TCRの組合せを示す。

【図12】図12は、1:1または5:1のエフェクター:標的比でインフルエンザペプチドを標的とするトラステッドTCRを発現するように操作されたiT細胞と共に培養した陰性対照またはインフルエンザペプチド(GILGFVFTL)を発現するNALM6細胞の生存能力パーセントを示す。

【発明を実施するための形態】

【0053】

様々な刊行物、論文および特許が、背景技術に、また、明細書を通して引用または記載

50

されている；これらの参考文献はそれぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に含まれた文献、行為、材料、デバイス、論文などの考察は、本発明に関する文脈を提供するためのものである。そのような考察は、これらの事柄が、開示または特許請求される任意の発明に関して先行技術の一部を形成することの承認ではない。

【0054】

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本出願が属する技術分野の当業者が一般に理解するのと同じ意味を有する。その他、本明細書で使用されるある特定の用語は、本明細書に記載される意味を有する。

【0055】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」および「the」は、本文が別途明確に記述しない限り、複数の指示対象を含むことに留意する必要がある。

10

【0056】

別途記述されない限り、本明細書に記載される濃度または濃度範囲などの、任意の数値は、あらゆる場合において、用語「約」によって修飾されると理解されるべきである。かくして、数値は、典型的には、記載される値の $\pm 10\%$ を含む。例えば、 1 mg/mL の濃度は、 $0.9\text{ mg/mL} \sim 1.1\text{ mg/mL}$ を含む。同様に、 $1\% \sim 10\%$ (w/v)の濃度範囲は、 $0.9\% \text{ (w/v)} \sim 11\% \text{ (w/v)}$ を含む。本明細書で使用される場合、数値範囲の使用は、本文が別途明確に指摘しない限り、値のそのような範囲および画分内の整数を含む、あらゆる可能なサブ範囲、その範囲内のあらゆる個々の数値を明示的に含む。

20

【0057】

別途指摘しない限り、一連の要素に先行する用語「少なくとも」は、その一連の中の全ての要素を指すと理解されるべきである。当業者であれば、規定を超えない実験を使用して、本明細書に記載される本出願の特定の実施形態の多くの均等物を認識するか、または確認することが可能であろう。そのような均等物は、本出願に包含されることが意図される。

【0058】

本明細書で使用される場合、用語「含む (comprises)」、「含む (comprising)」、「含む (includes)」、「含む (including)」、「有する (has)」、「有する (having)」、「含有する (contains)」もしくは「含有する (containing)」またはその任意の他の変形は、任意の他の整数または整数群の排除ではなく、記述される整数または整数群の含有を意味すると理解され、包括的または非限定であることが意図される。例えば、要素の一覧を含む組成物、混合物、プロセス、方法、論文、または装置は、これらの要素だけに必ずしも限定されないが、明示的に列挙されていないか、またはそのような組成物、混合物、プロセス、方法、論文、もしくは装置に固有の他の要素を含んでもよい。さらに、それとは反対に明示的に記述されない限り、「または」は、包括的論理和を指し、排他的論理和を指さない。例えば、条件AまたはBは、以下のいずれか1つによって満たされる：Aが真（または存在する）であり、Bが偽（または存在しない）である、Aが偽（または存在しない）であり、Bが真（または存在する）である、およびAとBとが両方とも真（または存在する）である。

30

40

【0059】

本明細書で使用される場合、複数の記載される要素の間の接続用語「および/または」は、個々の選択肢と、組み合わせた選択肢との両方を包含すると理解される。例えば、2つの要素が「および/または」によって接続される場合、第1の選択肢は、第2の要素を含まない第1の要素の適用可能性を指す。第2の選択肢は、第1の要素を含まない第2の要素の適用可能性を指す。第3の選択肢は、第1および第2の要素の一緒の適用可能性を指す。これらの選択肢のいずれか1つは、その意味の中にあり、したがって、本明細書で使用される用語「および/または」の要件を満たすと理解される。1より多い選択肢の同

50

時的適用可能性も、その意味の中にあり、したがって、用語「および/または」の要件を満たすと理解される。

【0060】

本明細書で使用される場合、明細書および特許請求の範囲を通じて使用される用語「からなる (consists of)」または「からなる (consist of)」もしくは「からなる (consisting of)」などの変形は、任意の記載される整数または整数群の含有を示すが、追加の整数または整数群を、特定された方法、構造、または組成物に追加することができないことを示す。

【0061】

本明細書で使用される場合、明細書および特許請求の範囲を通じて使用される用語「本質的にからなる (consists essentially of)」または「本質的にからなる (consist essentially of)」もしくは「本質的にからなる (consisting essentially of)」などの変形は、任意の記載される整数または整数群の含有、および特定された方法、構造または組成物の基本的な、または新規の特性を実質的に変化させない、任意の記載される整数または整数群の任意選択による含有を示す。M.P.E.P. § 2111.03を参照されたい。

【0062】

本明細書で使用される場合、「対象」は、任意の動物、好ましくは、哺乳動物、最も好ましくは、ヒトを意味する。本明細書で使用される場合、用語「哺乳動物」は、任意の哺乳動物を包含する。哺乳動物の例としては、限定されるものではないが、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、サル、ヒトなどが挙げられ、より好ましくは、ヒトである。

【0063】

また、好ましい発明の構成要素の次元または特徴に関して言う場合に本明細書で使用される用語「約」、「およそ」、「一般的に」、「実質的に」などは、当業者であれば理解できるように、記載される次元/特徴が厳密な境界またはパラメータではなく、機能的に同じか、または類似する、それからのわずかな変化を排除しないことを示すことも理解されるべきである。少なくとも、数値パラメータを含むそのような参照は、当業界で受け入れられている数学的および工業的原理（例えば、丸み付け、測定または他の系統的誤差、製造公差など）を使用して、最下位の数字を変化させない変動を含む。

【0064】

2つ以上の核酸またはポリペプチド配列（例えば、CARポリペプチドおよびそれらをコードするCARポリヌクレオチド）の文脈における用語「同一」または「同一性」パーセントは、以下の配列比較アルゴリズムの1つを使用して、または目視検査によって測定した場合、比較し、最大一致のために整列させた場合、同じであるか、または同じであるアミノ酸残基もしくはヌクレオチドの特定のパーセンテージを有する2つ以上の配列またはサブ配列を指す。

【0065】

配列比較のために、典型的には、1つの配列は、試験配列と比較される参照配列として働く。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験および参照配列を、コンピュータに入力し、必要に応じて、サブ配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。次いで、配列比較アルゴリズムは、指定されたプログラムパラメータに基づいて、参照配列と比較した試験配列の配列同一性パーセントを算出する。

【0066】

比較のための最適なアラインメントを、例えば、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)の部分相同性アルゴリズムによって、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)の相同性アラインメントアルゴリズムによって、Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)の類似性検索方法によって、これらのアルゴリズム (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575

10

20

30

40

50

Science Dr., Madison, WIにおけるGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA)のコンピュータ化された実装によって、または目視検査によって(例えば、一般的には、Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)を参照されたい)行うことができる。

【0067】

配列同一性および配列類似性パーセントを決定するための好適なアルゴリズムの例は、それぞれ、Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410およびAltschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402に記載されている、BLAST 10
TおよびBLAST 2.0アルゴリズムである。BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationを介して公共的に利用可能である。このアルゴリズムは、データベース配列中の同じ長さのワードと整列させた場合に、一部の正の値の閾値スコアと一致するか、またはそれを満たす、クエリー配列中の長さWの短いワードを同定することによって、高スコア配列ペア(HSP)を最初に同定することを含む。Tは、近隣ワードスコア閾値と称される(Altschulら、上掲)。これらの初期の近隣ワードヒットは、それら
20
を含有するより長いHSPを発見するための検索を開始するためのシードとして作用する。次いで、ワードヒットは、累積アラインメントスコアを増大させることができる限り、それぞれの配列に沿って両方の向きに伸長される。

【0068】

ヌクレオチド配列については、パラメータM(一对のマッチする残基に関するリワードスコア; 常に0を超える)およびN(ミスマッチ残基に関するペナルティスコア; 常に0未満)を使用して、累積スコアを算出する。アミノ酸配列については、スコアリングマトリックスを使用して、累積スコアを算出する。それぞれの方向へのワードヒットの伸長は、累積アラインメントスコアがその最大達成値から量X下落する; 累積スコアが、1つもしくは複数の負のスコアの残基アラインメントの累積のため、ゼロもしくはそれ未満になる; またはいずれかの配列の末端に達する場合に停止される。BLASTアルゴリズムパラメータW、T、およびXは、アラインメントの感度および速度を決定付ける。BLASTNプログラム(ヌクレオチド配列に関する)は、デフォルトとして、11のワード長(W)、10の期待値(E)、M=5、N=-4、および両鎖の比較を使用する。アミノ酸配列に関しては、BLASTPプログラムは、デフォルトとして、3のワード長(W)、10の期待値(E)、およびBLOSUM62スコアリングマトリックスを使用する(Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)を参照されたい)。
30

【0069】

配列同一性パーセントの算出に加えて、BLASTアルゴリズムは、2つの配列間の類似性の統計分析も実施する(例えば、Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)を参照されたい)。BLASTアルゴリズムによって提供される類似性の1つの尺度は、2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間の一致が偶然生じる確率の指示を提供する、最小和確率(P(N))である。例えば、核酸は、試験核酸と参照核酸との比較における最小和確率が約0.1未満、より好ましくは、約0.01未満、最も好ましくは、約0.001未満である場合、参照配列と類似すると考えられる。
40

【0070】

2つの核酸配列またはポリペプチドが実質的に同一であることのさらなる指示は、第1の核酸によってコードされるポリペプチドが、以下に記載されるように、第2の核酸によってコードされるポリペプチドと免疫学的に交差反応することである。かくして、ポリペプチドは、典型的には、例えば、2つのペプチドが保存的置換によってのみ異なる場合、第2のポリペプチドと実質的に同一である。2つの核酸配列が実質的に同一であることの
50

別の指示は、2つの分子がストリンジェントな条件下で互いにハイブリダイズすることである。

【0071】

本明細書で使用される場合、用語「単離された」は、生物学的成分（核酸、ペプチド、タンパク質、または細胞など）が、その成分が天然に存在する生物の他の生物学的成分、すなわち、他の染色体および染色体外DNAおよびRNA、タンパク質、細胞、および組織から実質的に分離されている、から離れて生産されている、またはから精製されていることを意味する。かくして、「単離された」核酸、ペプチド、タンパク質、および細胞は、標準的な精製方法および本明細書に記載の精製方法によって精製された核酸、ペプチド、タンパク質、および細胞を含む。「単離された」核酸、ペプチド、タンパク質、および細胞は、組成物の一部であってよく、組成物が核酸、ペプチド、タンパク質、または細胞の天然環境の一部ではない場合、依然として単離されたものであってよい。この用語はまた、宿主細胞中での組換え発現によって調製された核酸、ペプチドおよびタンパク質ならびに化学的に合成された核酸も包含する。

10

【0072】

用語「組換え」とは、(1)その天然に存在する環境から取り出されている、(2)生体分子が天然に見出される別の生体分子の全部もしくは一部と結合していない、(3)それが天然では連結されていない別の生体分子に作動可能に連結されている、または(4)天然には存在しない生体分子を指す。生体分子の例としては、例えば、核酸またはポリペプチドが挙げられる。用語「組換え」を、クローニングされたDNA単離物、化学的に合成されたポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはそのアナログ、または異種系によって生物学的に合成されるポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはそのアナログ、ならびにそのような組換え核酸によってコードされるタンパク質および/またはmRNAを参照して使用することができる。

20

【0073】

「核酸分子」、「ヌクレオチド」または「核酸」と同義的に称される、本明細書で使用される用語「ポリヌクレオチド」は、非改変RNAもしくはDNAまたは改変RNAもしくはDNAであってもよい、任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドを指す。「ポリヌクレオチド」としては、限定されるものではないが、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖および二本鎖領域の混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖RNA、ならびに一本鎖および二本鎖領域の混合物であるRNA、一本鎖、もしくはより典型的には、二本鎖、または一本鎖および二本鎖領域の混合物であってもよい、DNAおよびRNAを含むハイブリッド分子が挙げられる。さらに、「ポリヌクレオチド」は、RNAまたはDNAまたはRNAとDNAとの両方を含む三本鎖領域を指す。ポリヌクレオチドという用語は、1つまたは複数の改変塩基を含有するDNAまたはRNAおよび安定性のため、もしくは他の理由から改変された骨格を有するDNAまたはRNAも含む。「改変」塩基としては、例えば、トリチル化塩基およびイノシンなどの非通常の塩基が挙げられる。様々な改変を、DNAおよびRNAに対して作製することができる；かくして、「ポリヌクレオチド」は、典型的には、天然に見出されるような、化学的、酵素的または代謝的に改変された形態のポリヌクレオチド、ならびにウイルスおよび細胞に特徴的な化学的形態のDNAおよびRNAを包含する。「ポリヌクレオチド」はまた、オリゴヌクレオチドと称されることが多い、比較的短い核酸鎖も包含する。

30

40

【0074】

「構築物」とは、*in vitro*または*in vivo*で宿主細胞に送達されるポリヌクレオチドを含む高分子または分子の複合体を指す。本明細書で使用される場合、「ベクター」とは、外来遺伝物質の、それを複製および/または発現させることができる標的細胞への送達または移動を指令することができる任意の核酸構築物を指す。本明細書で使用される場合、用語「ベクター」は、送達される構築物を含む。ベクターは、線状または環状分子であってもよい。ベクターは、組込み型または非組込み型であってもよい。主要型のベクターとしては、限定されるものではないが、プラスミド、エピソームベクター、

50

ウイルスベクター、コスミド、および人工染色体が挙げられる。ウイルスベクターとしては、限定されるものではないが、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、センダイウイルスベクターなどが挙げられる。

【0075】

「組込み」とは、構築物の1つまたは複数のヌクレオチドが、細胞ゲノム中に安定に挿入される、すなわち、細胞の染色体DNA内の核酸配列に共有結合的に連結されることを意味する。「標的化組込み」とは、構築物のヌクレオチドが、予め選択された部位または「組込み部位」で細胞の染色体またはミトコンドリアDNA中に挿入されることを意味する。本明細書で使用される場合、用語「組込み」はさらに、組込み部位での内因性配列またはヌクレオチドの欠失あり、またはなしでの、構築物の1つまたは複数の外因性配列またはヌクレオチドの挿入を含むプロセスを指す。挿入部位に欠失がある場合、「組込み」は、欠失された内因性配列またはヌクレオチドの、1つまたは複数の挿入されたヌクレオチドによる置き換えをさらに含んでもよい。

10

【0076】

本明細書で使用される場合、用語「外因性」は、参照された分子または参照された活性が宿主細胞中に導入されるか、または宿主細胞にとって非天然であることを意味することが意図される。分子を、例えば、宿主染色体への組込みなどによる、宿主遺伝物質へのコード核酸の導入によって、またはプラスミドなどの非染色体遺伝物質として導入することができる。したがって、この用語は、それがコード核酸の発現を参照して使用される場合、発現可能な形態のコード核酸の細胞中への導入を指す。用語「内因性」とは、宿主細胞中にその天然形態で存在する参照された分子または活性を指す。同様に、この用語は、コード核酸の発現を参照して使用される場合、細胞内に天然に含有され、外因的に導入されていないコード核酸の発現を指す。

20

【0077】

本明細書で使用される場合、「目的の遺伝子」または「目的のポリヌクレオチド配列」は、適切な調節配列の制御下に置かれた場合、*in vivo*でRNAに転写され、一部の場合、ポリペプチドに翻訳されるDNA配列である。目的の遺伝子またはポリヌクレオチドは、限定されるものではないが、原核生物の配列、真核生物のmRNAに由来するcDNA、真核生物（例えば、哺乳動物）のDNAに由来するゲノムDNA配列、および合成DNA配列を含んでもよい。例えば、目的の遺伝子は、miRNA、shRNA、天然ポリペプチド（すなわち、天然に見出されるポリペプチド）またはその断片；バリエーションポリペプチド（すなわち、天然ポリペプチドとの100%未満の配列同一性を有する天然ポリペプチドの突然変異体）またはその断片；操作されたポリペプチドまたはペプチド断片、治療ペプチドまたはポリペプチド、イメージングマーカー、選択マーカーなどをコードしてもよい。

30

【0078】

「作動可能に連結された」とは、一方の機能が他方によって影響されるような、単一の核酸断片上での核酸配列の結合を指す。例えば、プロモーターは、それがコード配列または機能的RNAの発現に影響することができる場合（すなわち、コード配列または機能的RNAがプロモーターの転写制御下にある場合）、そのコード配列または機能的RNAと作動可能に連結されている。コード配列を、センスまたはアンチセンスの配向で調節配列に作動可能に連結することができる。

40

【0079】

本明細書で使用される場合、用語「発現」とは、遺伝子産物の生合成を指す。この用語は、遺伝子のRNAへの転写を包含する。この用語は、RNAの1つまたは複数のポリペプチドへの翻訳も包含し、さらに、全ての天然に存在する転写後および翻訳後改変を包含する。発現されるCARは、宿主細胞の細胞質内であってもよい、細胞培養の増殖培地などの細胞外環境中であってもよい、または細胞膜に固定されていてもよい。

【0080】

50

本明細書で使用される場合、用語「ペプチド」、「ポリペプチド」または「タンパク質」は、アミノ酸を含む分子を指してもよく、当業者であれば、タンパク質と認識することができる。アミノ酸残基に関する従来の一文字または三文字コードが本明細書で使用される。用語「ペプチド」、「ポリペプチド」、および「タンパク質」は、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指すために本明細書で互換的に使用することができる。ポリマーは、直鎖状であっても分枝状であってもよく、改変アミノ酸を含んでもよく、非アミノ酸によって中断されていてもよい。この用語はまた、天然に、または介入、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、または標識成分とのコンジュゲーションなどの任意の他の操作もしくは改変によって改変されたアミノ酸ポリマーも包含する。例えば、アミノ酸の1つまたは複数のアナログ（例えば、非天然アミノ酸などを含む）、ならびに当業界で公知の他の改変を含有するポリペプチドもこの定義の中に含まれる。

10

【0081】

本明細書に記載のペプチド配列は、ペプチドのN末端領域が左側にあり、C末端領域が右側にある通常の慣例に従って書かれる。アミノ酸の異性形態は公知であるが、別途明示的に示されない限り、表示されるのはL型のアミノ酸である。

【0082】

本明細書で使用される場合、用語「操作された免疫細胞」は、DNAまたはRNAの形態の外因性遺伝物質の、細胞の全遺伝物質への付加によって遺伝的に改変された、免疫エフェクター細胞とも称される、免疫細胞を指す。

20

【0083】

人工多能性幹細胞（iPSC）および免疫エフェクター細胞

iPSCは、無制限の自己再生能力を有する。iPSCの使用は、大量の均一な同種異系治療生成物を供給する所望の免疫エフェクター細胞に拡大および分化させることができる改変細胞の制御された細胞バンクを生産するための細胞操作を可能にする。

【0084】

遺伝子操作されたiPSCおよびその誘導体細胞が、本明細書で提供される。本明細書で提供される選択されたゲノム改変は、誘導体細胞の治療特性を増強する。誘導体細胞は、選択的モダリティの組合せをゲノム操作によってiPSCのレベルで細胞に導入した後に、機能的に改善されており、同種異系の市販の細胞療法にとって好適である。この手法は、CRS/GVHDによって媒介される副作用を低減させ、優れた有効性を提供しながら長期の自己免疫を防止するのに役立つ。

30

【0085】

本発明によれば、これに関して操作されたiPSCは、アルファベータT細胞免疫エフェクター細胞に分化させることができる。本明細書で使用される場合、用語「分化」は、特殊化されていない（「コミットされていない」）か、またはあまり特殊化されていない細胞が、特殊化された細胞の特徴を獲得するプロセスである。特殊化された細胞としては、例えば、血液細胞または筋肉細胞が挙げられる。分化した、または分化誘導された細胞は、細胞の系列内のより特殊化された（「コミットされた」）位置を獲得したものである。用語「コミットされた」は、分化のプロセスに適用される場合、通常的环境下で、それが特定の細胞型または細胞型のサブセットに分化し続け、通常的环境下で、異なる細胞型に分化することも、あまり分化していない細胞型に復帰することもできない点まで分化経路において進行した細胞を指す。本明細書で使用される場合、用語「多能性」とは、身体もしくは体細胞または胚の全ての系列を適切に形成する細胞の能力を指す。例えば、胚性幹細胞は、3つの胚葉、外胚葉、中胚葉、および内胚葉のそれぞれに由来する細胞を形成することができる多能性幹細胞の型である。多能性は、完全な生物を生じることができない、不完全に、または部分的に多能性の細胞（例えば、エピプラスト幹細胞またはEpiSC）から、完全な生物を生じることができる、より原始的で、より多能性の細胞（例えば、胚性幹細胞）までの範囲の一連の発生能力である。

40

【0086】

50

本明細書で使用される場合、用語「人工多能性幹細胞」またはiPSCは、幹細胞が、3つ全ての胚葉または皮層：中胚葉、内胚葉、および外胚葉の組織に分化することができる細胞に誘導または変化または再プログラミングされた、分化した成人細胞、新生児細胞または胎児細胞から産生されることを意味する。産生されたiPSCは、天然に見出される細胞を指さない。

【0087】

本明細書で使用される場合、用語「再プログラミング」または「脱分化」とは、細胞の能力を増大させるか、または細胞を、あまり分化していない状態に脱分化させる方法を指す。例えば、増大した細胞能力を有する細胞は、再プログラミングされていない状態の同じ細胞と比較して、より高い発生可塑性を有する（すなわち、より多くの細胞型に分化することができる）。換言すれば、再プログラミングされた細胞は、再プログラミングされていない状態の同じ細胞よりも、あまり分化していない状態にあるものである。

10

【0088】

用語「造血幹細胞および前駆細胞」、「造血幹細胞」、「造血前駆体細胞」、または「造血前駆細胞」または「HPC」は、造血系列にコミットされるが、さらに造血分化を行うことができる細胞を指す。造血幹細胞としては、例えば、万能性造血幹細胞（血球母細胞）、骨髓前駆細胞、巨核球前駆細胞、赤血球前駆細胞、およびリンパ球前駆細胞が挙げられる。造血幹細胞および前駆細胞（HSC）は、骨髓系列（単球およびマクロファージ、好中球、好塩基球、好酸球、赤血球、巨核球/血小板、樹状細胞）およびリンパ系列（T細胞、B細胞、NK細胞）を含む、全ての血液細胞型を生じる万能性幹細胞である。本明細書で使用される場合、「CD34+造血前駆細胞」とは、その表面上にCD34を発現するHPCを指す。

20

【0089】

本明細書で使用される場合、用語「免疫細胞」または「免疫エフェクター細胞」とは、免疫応答に関与する細胞を指す。免疫応答は、例えば、免疫エフェクター応答の促進を含む。免疫細胞の例としては、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、肥満細胞、および骨髓由来食細胞が挙げられる。

【0090】

本明細書で使用される場合、用語「Tリンパ球」および「T細胞」は、互換的に使用され、胸腺での成熟を完了し、免疫系において様々な役割を有する白血球の種類を指す。T細胞は、例えば、体内の特異的外来抗原の同定ならびに他の免疫細胞の活性化および脱活性化を含む役割を有してもよい。T細胞は、培養されたT細胞、例えば、一次T細胞、または培養されたT細胞系、例えば、Jurkat、SupT1などに由来するT細胞、または哺乳動物から得られたT細胞などの、任意のT細胞であってもよい。T細胞は、CD3+細胞であってもよい。T細胞は、任意の型のT細胞であってもよく、限定されるものではないが、CD4+/CD8+二重陽性T細胞、CD4+ヘルパーT細胞（例えば、Th1およびTh2細胞）、CD8+T細胞（例えば、細胞傷害性T細胞）、末梢血単核細胞（PBMC）、末梢血白血球（PBL）、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）、メモリーT細胞、ナイーブT細胞、調節性T細胞、ガンマデルタT細胞（ $\gamma\delta$ T細胞）などを含む、任意の発生段階のものであってもよい。さらなる型のヘルパーT細胞としては、Th3（Treg）、Th17、Th9、またはTfh細胞などの細胞が挙げられる。さらなる型のメモリーT細胞としては、セントラルメモリーT細胞（Tcm細胞）、エフェクターメモリーT細胞（Termin細胞およびTEMRA細胞）などの細胞が挙げられる。T細胞はまた、T細胞受容体（TCR）および/またはキメラ抗原受容体（CAR）を発現するように改変されたT細胞などの、遺伝子操作されたT細胞を指してもよい。T細胞は、幹細胞または前駆細胞から分化させることもできる。

30

40

【0091】

「CD4+T細胞」とは、その表面上にCD4を発現し、細胞媒介性免疫応答と関連するT細胞のサブセットを指す。それらは、IFN- γ 、TNF- α 、IL2、IL4およびIL10などのサイトカインの分泌を含むことができる、刺激後の分泌プロ

50

ファイルによって特徴付けられる。「CD4」は、Tリンパ球上の分化抗原として元々定義された55kDの糖タンパク質であるが、単球/マクロファージを含む他の細胞上にも見出される。CD4抗原は、免疫グロブリンスーパー遺伝子ファミリーのメンバーであり、MHC（主要組織適合性複合体）クラスII拘束性免疫応答における結合認識エレメントとして関与している。Tリンパ球上で、それらはヘルパー/インデューサーサブセットを定義する。

【0092】

「CD8+T細胞」とは、その表面上にCD8を発現し、MHCクラスI拘束性であり、細胞傷害性T細胞として機能するT細胞のサブセットを指す。「CD8」分子は、胸腺細胞ならびに細胞傷害性および抑制性Tリンパ球上に見出される分化抗原である。CD8抗原は、免疫グロブリンスーパー遺伝子ファミリーのメンバーであり、主要組織適合性複合体クラスI拘束性相互作用における結合認識エレメントである。

【0093】

当業界で公知の方法を使用して非多能性細胞に再プログラミング因子を導入するための任意の公知の方法を使用して、末梢血単核細胞(PBMC)またはT細胞から、人工多能性幹細胞(iPSC)親細胞系を生成することができる。例えば、全開示が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第8,183,038号明細書、第8,268,620号明細書、第8,440,461号明細書、第9,499,786号明細書、第10,865,381号明細書に記載された、いわゆる「トンプソン因子」、または米国特許第8,952,801号明細書に記載された山中因子を使用することができる。方法は、米国特許第8,546,140号明細書；第9,644,184号明細書；第9,328,332号明細書；および第8,765,470号明細書に記載されたエピソームプラスミドに基づくプロセス、ならびにMalik, et al Methods Mol Biol. 2013 ; 997: 23-33によって記載されたセンダイウイルスおよび他の方法を含み、それらの全開示は参照により本明細書に組み込まれる。再プログラミング因子は、ポリヌクレオチドの形態であってもよく、かくして、レトロウイルス、センダイウイルス、アデノウイルス、エピソーム、およびミニサークルなどのベクターによって非多能性細胞に導入される。特定の実施形態では、少なくとも1つの再プログラミング因子をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドは、レンチウイルスベクターによって導入される。一部の実施形態では、1つまたは複数のポリヌクレオチドは、エピソームベクターによって導入される。様々な他の実施形態では、1つまたは複数のポリヌクレオチドは、センダイウイルスベクターによって導入される。一部の実施形態では、iPSCは、クローン性iPSCであるか、またはiPSCのプールから得られ、ゲノム編集は、1つまたは複数の選択された部位に、1つまたは複数の標的化組込みおよび/またはインデルを作製することによって導入される。別の実施形態では、iPSCは、参照により本出願に組み込まれる米国特許第9,206,394号明細書および第10,787,642号明細書に記載された、抗原特異性および再構成されたTCR遺伝子を有するヒトT細胞(以後、「T-iPSC」細胞または「Ti-iPSC」とも称される)から得られる。図1A~Cは、本出願のiPSCを生成するための例示的方法の略図を示す。

【0094】

本明細書で使用される場合、用語「遺伝子刷り込み」とは、供給源細胞またはiPSC中の優先的治療属性に寄与し、供給源細胞由来iPSC中、および/またはiPSC由来造血系列細胞中で保持可能である、遺伝子情報または遺伝子外情報を指す。本明細書で使用される場合、「供給源細胞」は、再プログラミングによってiPSCを生成するために使用することができる非多能性細胞であり、供給源細胞由来iPSCを、任意の造血系列細胞を含む特定の細胞型にさらに分化させることができる。供給源細胞由来iPSC、およびそれに由来する分化した細胞は、文脈に応じて、「由来」または「誘導体」細胞と集合的に呼ばれることもある。例えば、本出願を通して使用される、誘導体工フェクター細胞または誘導体T細胞または「iT」細胞は、末梢血、臍帯血、または他のドナー組織などの自然/天然源から得られたその一次対応物と比較して、iPSCから分化した細胞で

10

20

30

40

50

ある。本明細書で使用される場合、優先的治療属性を付与する遺伝子刷り込みは、ドナー、疾患、もしくは処置応答特異的である選択された供給源細胞を再プログラミングすることによって、またはゲノム編集を使用して遺伝的に改変されたモダリティをiPSCに導入することによって、iPSC中に組み込まれる。

【0095】

1つの一般的な態様では、本出願は、再構成されたTCRをコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを含む人工多能性幹細胞(iPSC)であって、再構成されたTCRが、特定のHLAクラスI(HLA-I)アレルのコンテキストにおいて非ヒト抗原を特異的に認識するパブリックTCRであり、再構成されたTCRが、iPSCのT細胞への分化を支援する、人工多能性幹細胞(iPSC)を提供する。

10

【0096】

I. TCR発現

T細胞受容体(TCR)は、抗原を特異的に認識するT細胞の表面上に見出される膜複合体である。それは、アルファ()およびベータ()鎖またはガンマ()およびデルタ()鎖からなるヘテロ二量体である。TCRのアルファ、ベータ、ガンマおよびデルタ鎖はそれぞれ、糖タンパク質であってもよい。Ig様ドメインを有する、Igスーパーファミリーのメンバーとして、TCRは、例えば、体細胞V(D)J組換えによる個々の体細胞性T細胞中でのDNAにコードされたセグメントの遺伝子組換えに主に由来する、抗体のものと類似する様式でその多様性を生成する。単一の細胞中で、T細胞受容体遺伝子座は、再構成され、確率的に発現される。デルタとガンマとの両方の再構成が機能的なポリペプチドを産生する場合、細胞はデルタおよびガンマを発現する。そうでない場合、細胞は、ベータおよびアルファ遺伝子座を再構成するように進む。しかしながら、抗体と違って、TCR遺伝子は、体細胞超変異を受けない。TCR遺伝子座は、可変(V)および結合(J)遺伝子セグメント(VおよびJ)を含有するが、TCR遺伝子座は、VおよびJセグメントに加えて、D遺伝子セグメントを含有する。したがって、鎖はVJ組換えから生成され、鎖はVDJ組換えを含めて生成される。同様に、TCR鎖はVJ組換えを含めて生成され、TCR鎖はVDJ組換えを含めて生成される。TCRのための遺伝子セグメントは、Ig遺伝子セグメントである同じ組換えシグナル配列によって挟まれ、同じRAG-1およびRAG-2にコードされるリコンビナーゼならびにTdTが、体細胞組換えにとって必要とされる。

20

30

【0097】

本明細書で使用される場合、「再構成されたTCR」は、遠いサブ遺伝子が互いに融合される物理的再構成を受けた再構成されたTCR遺伝子によってコードされたTCRである。ヒトゲノムは、再構成されたTCR遺伝子によって、それぞれ、TCRアルファ、ベータ、ガンマおよびデルタ鎖をコードする、4個の独自のTCR遺伝子クラスター；アルファ()、ベータ()、ガンマ()、およびデルタ()を有する。TCRのそれぞれの鎖は、可変領域と定常領域とを有する。可変領域は、3個の超可変領域または相補性決定領域(CDR)およびフレームワーク残基を含有する。CDR3は、主にプロセッシングされた抗原を認識するのを担う。T細胞を活性化するために、TCRは、CD3ガンマ()鎖、CD3デルタ()鎖、2個のCD3イプシロン()鎖、および2個のCD3ゼータ()鎖を含有するCD3複合体と分子複合体を形成する。

40

【0098】

「アルファ-ベータT細胞受容体」または「TCR」は、免疫応答にとって必須の抗原特異的T細胞受容体であり、1個の(アルファ)鎖と1個の(ベータ)鎖とを有する。ペプチド-主要組織適合性複合体(pMHC)へのTCRの結合は、TCR-CD3細胞内活性化、いくつかのシグナル伝達分子の動員、ならびにシグナル伝達経路の分岐および統合を開始させ、遺伝子発現およびT細胞増殖および機能獲得にとって重要である転写因子の移動をもたらす。TCRを有するT細胞は、ヒト白血球抗原(HLA)系または複合体によって提示されるペプチドに対する特異的反応性を有する。HLAは、MHC遺伝子およびタンパク質に関するヒトの命名であり、互換的に使用することがで

50

きる（例えば、HLA-IはMHC-Iと同等（equivocal）である）。

【0099】

「HLA拘束性抗原認識」または「HLA拘束」とは、T細胞は、自己主要組織適合性複合体分子に結合した外来ペプチドを認識することができるが、それが特定のHLA分子（例えば、HLA-A*0201）に結合している場合にのみ抗原に应答するという事実を指す。T細胞発生中に、T細胞は、胸腺における選択プロセスを経由して、TCRが自己抗原を提示するHLA分子を認識しないことを確実にする。選択プロセスは、ある特定のHLA分子に対してのみ应答するが、他のもの（例えば、非拘束性MHC分子）には应答しない特異的TCRを有するT細胞の発生をもたらす。

【0100】

本明細書で使用される場合、「パブリックTCR」または「トラステッドTCR」は、ある特定のHLA型を有する複数の個体において存在する配列を含むTCRである。これらの配列は、拘束性HLAアレルを有する人々において頻繁に存在し、それらはHLA-Iアレルの膨大な多様性と適合することが天然で証明されている。かくして、これらのTCRは、非拘束性HLA分子を認識することができず、移植片対宿主疾患に関与する可能性が低い。パブリックTCRおよびそれらを同定する方法は、Choo et al., J Virol. 2014 Sep;88(18):10613-23; Valkenburg et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Apr 19;113(16):4440-5; Sant et al., Front Immunol. 2018 Jun 27; 9:1453; Chen et al., Cell Rep. 2017 Apr 18;19(3):569-583; J Biol Chem. 2016 Nov 18;291(47):24335-24351; および Song et al., Nat Struct Mol Biol. 2017 Apr;24(4):395-406によって記載されており、その関連する開示は、本明細書に組み込まれる。

【0101】

T細胞受容体アルファ遺伝子座（TRA）は、T細胞受容体アルファ鎖をコードする。ヒトTRA遺伝子座は、41個のサブグループに属する54個の可変遺伝子（TRAV）遺伝子、61個の連結セグメント（TRAJ）、および独自の定常領域（TRAC）遺伝子から構成される。アルファ遺伝子座のいくつかのV遺伝子は、タンパク質をコードすることができないことが知られており、偽遺伝子であると考えられる。TRAレパートリーは、33~35個のサブグループに属する45~47個の機能的なTRAV遺伝子、50個の機能的なTRAJセグメント、および独自のTRAC遺伝子を含む。T細胞発生中に、V遺伝子とJセグメントとを結合する組換え事象がDNAレベルで起こり、C遺伝子は後にRNAレベルでのスプライシングによって結合される。異なるV遺伝子セグメントと、いくつかのJセグメントとの組換えは、ある範囲の抗原認識を提供する。抗原認識におけるさらなる多様性は、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼによるヌクレオチドの無作為付加の結果生じる結合多様性によって獲得される。ある特定の形態では、TCR鎖をコードするポリヌクレオチドは、TRAV27およびTRAV13-1からなる群から選択されるTCR可変遺伝子；TRAJ41およびTRAJ37からなる群から選択されるTCR連結遺伝子；ならびにTCR定常遺伝子TRACを含む。

【0102】

T細胞受容体ベータ遺伝子座（TRB）は、T細胞受容体ベータ鎖をコードする。ヒトTRB遺伝子座は、21~23個のサブグループに属する39~46個の機能的なTRBV遺伝子、2個の多様性領域（TRBD）、13個の連結セグメント（TRBJ）、および2個の定常（TRBC）遺伝子から構成される。ある特定の形態では、TCR鎖をコードするポリヌクレオチドは、鎖可変遺伝子TRBV19；TRBJ2-7、TRBJ2-5、およびTRBJ2-6からなる群から選択される鎖可変遺伝子；TRBC1およびTRBC2からなる群から選択される鎖定常遺伝子を含む。

【0103】

ある特定の形態では、再構成されたTCRは、T細胞に対して内因性である。

【0104】

10

20

30

40

50

ある特定の実施形態では、再構成された TCR は、組換え体である。

【0105】

ある特定の実施形態では、再構成された TCR は、再構成された TCR を有しない T 細胞よりも、細胞分裂刺激後に分化した T 細胞の拡大の増加を可能にする。

【0106】

ある特定の実施形態では、再構成された TCR は、ウイルス、細菌、真菌または寄生虫に由来する抗原に結合する。ある特定の実施形態では、再構成された TCR は、インフルエンザ - A、エプスタイン・バーウイルス (EBV)、およびサイトメガロウイルス (CMV) からなる群から選択されるウイルスに由来する抗原に結合する。

【0107】

ある特定の実施形態では、再構成された TCR は、配列番号 83 のアミノ酸配列を含むインフルエンザペプチドに結合する。

【0108】

ある特定の実施形態では、再構成された TCR は、配列番号 84 のアミノ酸配列の CDR3 を有する TCR 鎖、および配列番号 85 のアミノ酸配列の CDR3 を有する TCR 鎖を含む。

【0109】

ある特定の実施形態では、TCR は、TRAV27 および TRAJ41 遺伝子によってコードされるアミノ酸配列を含み、配列番号 84 のアミノ酸配列の CDR3 を有する TCR 鎖、ならびに TRBV19 および TRBJ2-7 遺伝子によってコードされるアミノ酸配列を含み、配列番号 85 のアミノ酸配列の CDR3 を有する TCR 鎖を含む。

【0110】

II. キメラ抗原受容体 (CAR)

本出願の実施形態によれば、iPSC 細胞は、(i) 再構成 T 細胞受容体 (TCR) をコードする 1 つまたは複数のポリヌクレオチド；および (ii) 腫瘍抗原を標的とする CAR などのキメラ抗原受容体 (CAR) をコードするポリヌクレオチドを含む。

【0111】

本明細書で使用される場合、用語「キメラ抗原受容体」(CAR) とは、抗原または標的に特異的に結合する少なくとも細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含む組換えポリペプチドを指す。標的細胞の表面上での CAR の細胞外ドメインと、標的抗原との係合は、CAR のクラスター化をもたらし、CAR 含有細胞に活性化刺激を送達する。CAR は、免疫エフェクター細胞の特異性を向け直し、主要組織適合性 (MHC) 非依存的様式で、標的抗原を発現する細胞の増殖、サイトカイン産生、食作用および/またはその細胞の細胞死を媒介し得る分子の産生を誘発する。

【0112】

本明細書で使用される場合、用語「シグナルペプチド」とは、新生 CAR タンパク質のアミノ末端 (N 末端) のリーダー配列を指し、新生タンパク質を小胞体に翻訳同時的または翻訳後的に指向させ、次いで、表面発現を指令する。

【0113】

本明細書で使用される場合、用語「細胞外抗原結合ドメイン」、「細胞外ドメイン」または「細胞外リガンド結合ドメイン」とは、細胞膜の外部に位置し、抗原、標的またはリガンドに結合することができる、CAR の一部を指す。

【0114】

本明細書で使用される場合、用語「ヒンジ領域」または「ヒンジドメイン」とは、CAR タンパク質の 2 つの隣接ドメイン、すなわち、CAR タンパク質の細胞外ドメインおよび膜貫通ドメインを接続する CAR の一部を指す。

【0115】

本明細書で使用される場合、用語「膜貫通ドメイン」とは、細胞膜にわたって伸長し、CAR を細胞膜に固定する CAR の一部分を指す。

【0116】

10

20

30

40

50

本明細書で使用される場合、用語「細胞内シグナル伝達ドメイン」、「細胞質シグナル伝達ドメイン」または「細胞内シグナル伝達ドメイン」とは、細胞膜の内部に位置し、エフェクターシグナルを伝達することができる、CARの一部を指す。

【0117】

本明細書で使用される場合、用語「刺激分子」とは、免疫細胞シグナル伝達経路の少なくとも一部の態様について、刺激様式で受容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提供する免疫細胞（例えば、T細胞）によって発現される分子を指す。刺激分子は、2つの異なるクラスの細胞質シグナル伝達配列、抗原依存的な一次活性化を開始させるもの（「一次シグナル伝達ドメイン」と称される）、および第2の共刺激シグナルを提供する抗原非依存的様式で動作するもの（「共刺激シグナル伝達ドメイン」と称される）を含む。

10

【0118】

ある特定の実施形態では、細胞外ドメインは、抗原結合ドメインおよび/または抗原結合断片を含む。抗原結合断片は、例えば、腫瘍抗原に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片であってもよい。本出願の抗原結合断片は、限定されるものではないが、腫瘍抗原への高親和性結合などの望ましい機能特性を有する。

【0119】

本明細書で使用される場合、用語「抗体」は、広い意味で使用され、モノクローナルまたはポリクローナルである、ヒト、ヒト化、複合およびキメラ抗体ならびに抗体断片を含む、免疫グロブリンまたは抗体分子を含む。一般に、抗体は、特定の抗原に対する結合特異性を示すタンパク質またはペプチド鎖である。抗体構造は、周知である。免疫グロブリンに、重鎖定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、5つの主要なクラス（すなわち、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgM）を割り当てることができる。IgAおよびIgGは、アイソタイプIgA1、IgA2、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4としてさらに下位分類される。したがって、本出願の抗体は、5つの主要なクラスまたは対応するサブクラスのいずれかのものであってもよい。好ましくは、本出願の抗体は、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4である。脊椎動物種の抗体軽鎖に、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、2つの明確に異なる型、すなわち、カッパおよびラムダのうちの一つを割り当てることができる。したがって、本出願の抗体は、カッパまたはラムダ軽鎖定常ドメインを含有してもよい。特定の実施形態によれば、本出願の抗体は、ラットまたはヒト抗体に由来する重鎖および/または軽鎖定常領域を含む。重鎖および軽鎖定常ドメインに加えて、抗体は、軽鎖可変領域および重鎖可変領域から構成される抗原結合領域を含有し、それらはそれぞれ、3個のドメイン（すなわち、相補性決定領域1~3；CDR1、CDR2、およびCDR3）を含有する。軽鎖可変領域ドメインは、代替的に、LCDR1、LCDR2およびLCDR3と称され、重鎖可変領域ドメインは、代替的に、HCDR1、HCDR2およびHCDR3と称される。

20

30

【0120】

本明細書で使用される場合、用語「単離された抗体」とは、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を指す（例えば、特異的腫瘍抗原に特異的に結合する単離された抗体は、腫瘍抗原に結合しない抗体を実質的に含まない）。さらに、単離された抗体は、他の細胞材料および/または化学物質を実質的に含まない。

40

【0121】

本明細書で使用される場合、用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、集団を構成する個々の抗体は、軽微な量で存在し得る可能な天然に存在する突然変異を除いて同一である。本出願のモノクローナル抗体を、ハイブリドーマ法、ファージディスプレイ技術、単一リンパ球遺伝子クローニング技術、または組換えDNA法によって作製することができる。例えば、モノクローナル抗体を、ヒト重鎖導入遺伝子および軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する、トランスジェニックマウスまたはラットなどのトランスジェニック非ヒト動物から得られたB細胞を含むハイブリドーマによって生産することができる。

50

【0122】

本明細書で使用される場合、用語「抗原結合断片」とは、例えば、ダイアボディ、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v断片、ジスルフィド安定化されたF v断片(d s F v)、(d s F v)₂、二重特異性 d s F v (d s F v - d s F v')、ジスルフィド安定化されたダイアボディ(d s ダイアボディ)、単鎖抗体分子(s c F v)、単ドメイン抗体(s d A b)、s c F v二量体(二価ダイアボディ)、1つもしくは複数のC D Rを含む抗体の一部分から形成される多重特異性抗体、ラクダ化単ドメイン抗体、ミニボディ、ナノボディ、ドメイン抗体、二価ドメイン抗体、軽鎖可変ドメイン(V L)、ラクダ抗体の可変ドメイン(V_HH)、または抗原に結合するが、完全な抗体構造を含まない任意の他の抗体断片などの、抗体断片を指す。抗原結合断片は、親抗体または親抗体断片が結合するのと同じ抗原に結合することができる。

10

【0123】

本明細書で使用される場合、用語「単鎖抗体」とは、約15～約20個のアミノ酸の短いペプチド(例えば、リンカーペプチド)によって接続された重鎖可変領域と軽鎖可変領域とを含む、当業界における従来の単鎖抗体を指す。

【0124】

本明細書で使用される場合、用語「単ドメイン抗体」とは、重鎖可変領域と重鎖定常領域とを含むか、または重鎖可変領域のみを含む、当業界における従来の単ドメイン抗体を指す。

【0125】

本明細書で使用される場合、用語「ヒト抗体」とは、ヒトによって産生される抗体または当業界で公知の任意の技術を使用して作製されたヒトによって産生される抗体に対応するアミノ酸配列を有する抗体を指す。ヒト抗体のこの定義は、インタクトもしくは完全長抗体、その断片、および/または少なくとも1つのヒト重鎖および/もしくは軽鎖ポリペプチドを含む抗体を含む。

20

【0126】

本明細書で使用される場合、用語「ヒト化抗体」とは、抗体の抗原結合特性は保持されるが、ヒト体内でのその抗原性は低減されているような、ヒト抗体のものに対する配列相同性を増大させるように改変されている非ヒト抗体を指す。

【0127】

本明細書で使用される場合、用語「キメラ抗体」とは、免疫グロブリン分子のアミノ酸配列が2つ以上の種に由来する抗体を指す。軽鎖と重鎖との両方の可変領域は、所望の特異性、親和性、および能力を有するある種の哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウサギなど)に由来する抗体の可変領域に対応することが多いが、定常領域は、その種において免疫応答を惹起するのを避けるために、別の種の哺乳動物(例えば、ヒト)に由来する抗体の配列に対応する。

30

【0128】

本明細書で使用される場合、用語「多重特異性抗体」とは、複数の第1の免疫グロブリン可変ドメイン配列が第1のエピトープに対する結合特異性を有し、複数の第2の免疫グロブリン可変ドメイン配列が第2のエピトープに対する結合特異性を有する、複数の免疫グロブリン可変ドメイン配列を含む抗体を指す。ある実施形態では、第1および第2のエピトープは、同じ抗原、例えば、同じタンパク質(または多量体タンパク質のサブユニット)上にある。ある実施形態では、第1および第2のエピトープは、重複するか、または実質的に重複する。ある実施形態では、第1および第2のエピトープは、重複しないか、または実質的に重複しない。ある実施形態では、第1および第2のエピトープは、異なる抗原、例えば、異なるタンパク質(または多量体タンパク質の異なるサブユニット)上にある。ある実施形態では、多重特異性抗体は、第3、第4、または第5の免疫グロブリン可変ドメインを含む。ある実施形態では、多重特異性抗体は、二重特異性抗体分子、三重特異性抗体分子、または四重特異性抗体分子である。

40

【0129】

50

本明細書で使用される場合、用語「二重特異性抗体」とは、2つ以下のエピトープまたは2つの抗原に結合する多重特異性抗体を指す。二重特異性抗体は、第1のエピトープに対する結合特異性を有する第1の免疫グロブリン可変ドメイン配列および第2のエピトープに対する結合特異性を有する第2の免疫グロブリン可変ドメイン配列を特徴とする。ある実施形態では、第1および第2のエピトープは、同じ抗原、例えば、同じタンパク質（または多量体タンパク質のサブユニット）上にある。ある実施形態では、第1および第2のエピトープは、重複するか、または実質的に重複する。ある実施形態では、第1および第2のエピトープは、異なる抗原、例えば、異なるタンパク質（または多量体タンパク質の異なるサブユニット）上にある。ある実施形態では、二重特異性抗体は、第1のエピトープに対する結合特異性を有する重鎖可変ドメイン配列および軽鎖可変ドメイン配列と、第2のエピトープに対する結合特異性を有する重鎖可変ドメイン配列および軽鎖可変ドメイン配列とを含む。ある実施形態では、二重特異性抗体は、第1のエピトープに対する結合特異性を有する、ハーフ抗体、またはその断片および第2のエピトープに対する結合特異性を有するハーフ抗体、またはその断片を含む。ある実施形態では、二重特異性抗体は、第1のエピトープに対する結合特異性を有する、s c F v、またはその断片、および第2のエピトープに対する結合特異性を有するs c F v、またはその断片を含む。ある実施形態では、二重特異性抗体は、第1のエピトープに対する結合特異性を有するV_HHおよび第2のエピトープに対する結合特異性を有するV_HHを含む。

10

【0130】

本明細書で使用される場合、「腫瘍抗原に特異的に結合する」抗原結合ドメインまたは抗原結合断片とは、 1×10^{-7} M以下、好ましくは、 1×10^{-8} M以下、より好ましくは、 5×10^{-9} M以下、 1×10^{-9} M以下、 5×10^{-10} M以下、または 1×10^{-10} M以下のKDで、腫瘍抗原に結合する抗原結合ドメインまたは抗原結合断片を指す。用語「KD」は、K_dのK_aに対する比（すなわち、K_d/K_a）から得られ、モル濃度（M）として表される解離定数を指す。抗体のKD値は、本開示を考慮した当業界における方法を使用して決定することができる。例えば、抗原結合ドメインまたは抗原結合断片のKDを、バイオセンサーシステム、例えば、Biacore（登録商標）システムを使用することなどの表面プラズモン共鳴を使用することによって、またはOctet RED 96システムなどのバイオレイヤー干渉技術を使用することによって決定することができる。

20

30

【0131】

抗原結合ドメインまたは抗原結合断片のKDの値が小さいほど、抗原結合ドメインまたは抗原結合断片が標的抗原に結合する親和性が高い。

【0132】

種々の実施形態では、本開示のCARにおける使用にとって好適な抗体または抗体断片としては、限定されるものではないが、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、多重特異性抗体、キメラ抗体、ポリペプチド-Fc融合物、単鎖Fv（s c F v）、単鎖抗体、Fab断片、F（a b'）断片、ジスルフィド連結されたFv（s d F v）、マスクド抗体（例えば、Probodies（登録商標））、小型モジュール式免疫医薬品（「SMIP（商標）」）、イントラボディ、ミニボディ、単ドメイン抗体可変ドメイン、ナノボディ、V_HH、ダイアボディ、タンデムダイアボディ（TandAb（登録商標））、抗イデオタイプ（抗Id）抗体（例えば、抗原特異的TCRに対する抗Id抗体を含む）、および上記のいずれかのエピトープ結合断片が挙げられる。抗体および/または抗体断片は、マウス抗体、ウサギ抗体、ヒト抗体、完全ヒト化抗体、ラクダ抗体可変ドメインおよびヒト化バージョン、サメ抗体可変ドメインおよびヒト化バージョン、ならびにラクダ化抗体可変ドメインに由来してもよい。

40

【0133】

一部の実施形態では、抗原結合断片は、Fab断片、Fab'断片、F（a b'）₂断片、s c F v断片、Fv断片、d s F vダイアボディ、V_HH、VNAR、単ドメイン抗体（s d A b）もしくはナノボディ、d A b断片、F d'断片、F d断片、重鎖可変領域

50

、単離された相補性決定領域（CDR）、ダイアボディ、トリアボディ、またはデカボディである。一部の実施形態では、抗原結合断片は、scFv断片である。

【0134】

ある特定の実施形態では、CARの抗原結合ドメインは、ナノボディとしても知られる、単ドメイン抗体（sdAb）、ラクダにおいて見出される重鎖抗体を含む、単一モノマー可変抗体ドメインからなる抗体断片；いわゆるV_HH断片である（Hamers-Casterman et al., Nature, 363, 446448 (1993)；参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,759,808号明細書；米国特許第5,800,988号明細書；米国特許第5,840,526号明細書；および米国特許第5,874,541号明細書も参照されたい）。軟骨魚類も、重鎖抗体（IgNAR、「免疫グロブリン新抗原受容体」）を有し、そこから、VNAR断片と呼ばれる単ドメイン抗体を取得し、これらのものを本発明において使用することができる。代替的な手法は、ヒトまたはマウスに由来する共通の免疫グロブリンG（IgG）に由来する二量体可変ドメインを単量体に分割することである。単ドメイン抗体における多くの研究は現在、重鎖可変ドメインに基づいているが、軽鎖に由来するナノボディも、標的エピトープに特異的に結合することが示されており、これを用いることもできる。

【0135】

標的生体分子の高親和性および特異的結合などの、類似する機能特性を示す免疫グロブリンドメインに対する代替的な足場を、本開示のCARにおいて使用することもできる。そのような足場は、より高い安定性または低減された免疫原性などの、改善された特性を有する分子をもたらすことが示されている。本開示のCARにおいて使用することができる代替的な足場の非限定例としては、操作された、テナシン由来、テナシンIII型ドメイン（例えば、Centyrin（商標））；操作された、ガンマ-Bクリスタリン由来足場または操作された、ユビキチン由来足場（例えば、アフィリン）；操作された、フィブロネクチン由来、第10フィブロネクチンIII型（10Fn3）ドメイン（例えば、モノボディ、AdNectin（商標）、またはAdNexin（商標））；操作された、アンキリンリピートモチーフ含有ポリペプチド（例えば、DARPin（商標））；操作された、低密度リポタンパク質受容体由来Aドメイン（LDLR-A）（例えば、Avimer（商標））；リポカリン（例えば、アンチカリン）；操作された、プロテアーゼ阻害剤由来Kunitzドメイン（例えば、EETI-III/AGRP、BPTI/LACI-D1/ITI-D2）；操作された、プロテインA由来Zドメイン（Affibody（商標））；Sac7d由来ポリペプチド（例えば、Nanofitina（登録商標）またはアフィチン）；操作されたFyn由来SH2ドメイン（例えば、Fynomer（登録商標））；CTLD₃（例えば、テトラネクチン）；チオレドキシン（例えば、ペプチドアプタマー）；KALBITOR（登録商標）；-サンドイッチ（例えば、iMab）；ミニタンパク質；C型レクチン様ドメイン足場；操作された抗体模倣体；およびその結合機能を保持する上記のものの任意の遺伝子操作された対応物（それぞれ、その全体が参照により組み込まれる、Worn A, Pluckthun A, J Mol Biol 305: 989-1010 (2001)；Xu L et al., Chem Biol 9: 933-42 (2002)；Wikman M et al., Protein Eng Des Sel 17: 455-62 (2004)；Binz H et al., Nat Biotechnol 23: 1257-68 (2005)；Hey T et al., Trends Biotechnol 23:514-522 (2005)；Holliger P, Hudson P, Nat Biotechnol 23: 1126-36 (2005)；Gill D, Damlé N, Curr Opin Biotech 17: 653-8 (2006)；Koide A, Koide S, Methods Mol Biol 352: 95-109 (2007)；Skerra, Current Opin. in Biotech., 2007 18: 295-304；Byla P et al., J Biol Chem 285: 12096 (2010)；Zoller F et al., Molecules 16: 2467-85 (2011)）が挙げられる。

【0136】

一部の実施形態では、代替的な足場は、アフィリンまたはセンチリンである。

【0137】

一部の実施形態では、本開示のCARの第1のポリペプチドは、リーダー配列を含む。

リーダー配列は、細胞外結合ドメインのN末端に位置してもよい。必要に応じて、細胞プロセッシングおよびCARの細胞膜への局在化の間に、細胞外結合ドメインからリーダー配列を切断してもよい。当業者には公知の任意の種々のリーダー配列を、リーダー配列として使用することができる。リーダー配列を誘導することができるペプチドの非限定例としては、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子受容体(GMCSFR)、FcR、ヒト免疫グロブリン(IgG)重鎖(HC)可変領域、CD8、またはT細胞によって分泌される任意の種々の他のタンパク質が挙げられる。種々の実施形態では、リーダー配列は、T細胞の分泌経路と適合する。ある特定の実施形態では、リーダー配列は、ヒト免疫グロブリン重鎖(HC)に由来する。

【0138】

一部の実施形態では、リーダー配列は、GMCSFRに由来する。一実施形態では、GMCSFRリーダー配列は、配列番号1に記載のアミノ酸配列、または配列番号1との少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも95、少なくとも96、少なくとも97、少なくとも98もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するそのバリエーションを含む。

【0139】

一部の実施形態では、本開示のCARの第1のポリペプチドは、細胞外結合ドメインと、細胞質ドメインとの間でインフレームに融合された、膜貫通ドメインを含む。

【0140】

膜貫通ドメインは、細胞外結合ドメインに寄与するタンパク質、シグナル伝達もしくは共シグナル伝達ドメインに寄与するタンパク質、または完全に異なるタンパク質に由来してもよい。一部の例では、膜貫通ドメインを、アミノ酸置換、欠失、または挿入によって選択または改変して、CAR複合体の他のメンバーとの相互作用を最小化することができる。一部の例では、膜貫通ドメインを、アミノ酸置換、欠失、または挿入によって選択または改変して、膜貫通ドメインと天然に会合したタンパク質の結合を回避することができる。ある特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、膜貫通ドメインに接続されたドメイン間の可撓性および/または最適距離を可能にする追加のアミノ酸を含む。

【0141】

膜貫通ドメインは、天然源または合成源に由来してもよい。供給源が天然である場合、ドメインは、任意の膜結合型タンパク質または膜貫通タンパク質に由来してもよい。本開示における特定の使用の膜貫通ドメインの非限定例は、T細胞受容体(TCR)の、または鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD40、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、またはCD154に由来してもよい(すなわち、それらの少なくとも膜貫通領域を含んでもよい)。あるいは、膜貫通ドメインは、合成であってもよく、その場合、それはロイシンおよびバリンなどの疎水性残基を主に含むであろう。例えば、フェニルアラニン、トリプトファンおよび/またはバリンのトリプレットを、合成膜貫通ドメインのそれぞれ末端に見出すことができる。

【0142】

一部の実施形態では、得られるキメラタンパク質が、それ自身と、または、もしくはFcR1鎖の非改変バージョンもしくは関連タンパク質と、ジスルフィド結合した二量体を形成することができるような、ジスルフィド結合を可能とするシステイン残基を含有する、またはFcR1鎖の膜貫通ドメインを利用することが望ましい。一部の例では、膜貫通ドメインを、アミノ酸置換によって選択または改変して、そのようなドメインの、同じか、または異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインの結合を回避して、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小化する。他の場合、受容体複合体の他の膜との物理的会合を保持するために、、またはFcR1および-、MB1(Ig)、B29またはCD3-、、もしくはの膜貫通ドメインを使用することが望ましいであろう。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 3 】

一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、C D 8 または C D 2 8 に由来する。一実施形態では、C D 8 膜貫通ドメインは、配列番号 2 3 に記載のアミノ酸配列、または配列番号 2 3 との少なくとも 5 0、少なくとも 5 5、少なくとも 6 0、少なくとも 6 5、少なくとも 7 0、少なくとも 7 5、少なくとも 8 0、少なくとも 8 5、少なくとも 9 0、少なくとも 9 5、少なくとも 9 6、少なくとも 9 7、少なくとも 9 8 もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するそのバリエーションを含む。一実施形態では、C D 2 8 膜貫通ドメインは、配列番号 2 4 に記載のアミノ酸配列、または配列番号 2 4 との少なくとも 5 0、少なくとも 5 5、少なくとも 6 0、少なくとも 6 5、少なくとも 7 0、少なくとも 7 5、少なくとも 8 0、少なくとも 8 5、少なくとも 9 0、少なくとも 9 5、少なくとも 9 6、少なくとも 9 7、少なくとも 9 8 もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するそのバリエーションを含む。

10

【 0 1 4 4 】

一部の実施形態では、本開示の C A R の第 1 のポリペプチドは、細胞外結合ドメインと膜貫通ドメインとの間にスペーサー領域を含み、結合ドメイン、リンカー、および膜貫通ドメインは、互いにインフレームである。

【 0 1 4 5 】

本明細書で使用される用語「スペーサー領域」は一般に、結合ドメインを膜貫通ドメインに連結するように機能する任意のオリゴまたはポリペプチドを意味する。スペーサー領域を使用して、結合ドメインに対するより高い可撓性および接近性を提供することができる。スペーサー領域は、最大で 3 0 0 個のアミノ酸、好ましくは、1 0 ~ 1 0 0 個のアミノ酸、最も好ましくは、2 5 ~ 5 0 個のアミノ酸を含んでもよい。スペーサー領域は、C D 8、C D 4 もしくは C D 2 8 の細胞外領域の全部もしくは一部、または抗体定常領域の全部もしくは一部などに由来する、天然に存在する分子の全部または一部に由来してもよい。あるいは、スペーサー領域は、天然に存在するスペーサー領域配列に対応する合成配列であってもよいが、または完全に合成のスペーサー領域配列であってもよい。本開示に従って使用することができるスペーサー領域の非限定例としては、ヒト C D 8 鎖の一部、C D 2 8 の部分的細胞外ドメイン、F c R I I I a 受容体、I g G、I g M、I g A、I g D、I g E、I g ヒンジ、またはその機能的断片が挙げられる。一部の実施形態では、追加の連結アミノ酸をスペーサー領域に付加して、抗原結合ドメインが膜貫通ドメインから最適な距離にあることを確保する。一部の実施形態では、スペーサーが I g に由来する場合、スペーサーを突然変異させて、F c 受容体結合を防止することができる。

20

30

【 0 1 4 6 】

一部の実施形態では、スペーサー領域は、ヒンジドメインを含む。ヒンジドメインは、C D 8、C D 2 8、または免疫グロブリン (I g G) に由来してもよい。例えば、I g G ヒンジは、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M 1、I g M 2、I g A 1、I g A 2、I g D、I g E、またはそのキメラに由来してもよい。

【 0 1 4 7 】

ある特定の実施形態では、ヒンジドメインは、免疫グロブリン I g G ヒンジまたはその機能的断片を含む。ある特定の実施形態では、I g G ヒンジは、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M 1、I g M 2、I g A 1、I g A 2、I g D、I g E、またはそのキメラに由来する。ある特定の実施形態では、ヒンジドメインは、免疫グロブリンの C H 1、C H 2、C H 3 および / またはヒンジ領域を含む。ある特定の実施形態では、ヒンジドメインは、免疫グロブリンのコアヒンジ領域を含む。用語「コアヒンジ」は、用語「ショートヒンジ」(「S H」としても知られる)と互換的に使用することができる。好適なヒンジドメインの非限定例は、コア免疫グロブリンヒンジ領域であり、I g G 1 に由来する E P K S C D K T H T C P P C P (配列番号 5 7)、I g G 2 に由来する E R K C C V E C P P C P (配列番号 5 8)、I g G 3 に由来する E L K T P L G D T T H T C P R C P (E P K S C D T P P P C P R C P)₃ (配列番号 5 9)、および I g G 4 に由来する E S K Y G P P C P S C P (配列番号 6 0) が挙げられる (あらゆる目的でその全体

40

50

が参照により本明細書に組み込まれる、Wypych et al., JBC 2008 283(23): 16194-16205も参照されたい)。ある特定の実施形態では、ヒンジドメインは、免疫グロブリンヒンジの断片である。

【0148】

一部の実施形態では、ヒンジドメインは、CD8またはCD28に由来する。一実施形態では、CD8ヒンジドメインは、配列番号21に記載のアミノ酸配列、または配列番号21との少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも95、少なくとも96、少なくとも97、少なくとも98もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するそのバリエーションを含む。一実施形態では、CD28ヒンジドメインは、配列番号22に記載のアミノ酸配列、または配列番号22との少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも95、少なくとも96、少なくとも97、少なくとも98もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するそのバリエーションを含む。

10

【0149】

一部の実施形態では、膜貫通ドメインおよび/またはヒンジドメインは、CD8またはCD28に由来する。一部の実施形態では、膜貫通ドメインとヒンジドメインとは両方とも、CD8に由来する。一部の実施形態では、膜貫通ドメインとヒンジドメインとは両方とも、CD28に由来する。

20

【0150】

ある特定の態様では、本開示のCARの第1のポリペプチドは、少なくとも1つの細胞内シグナル伝達ドメインを含む細胞質ドメインを含む。一部の実施形態では、細胞質ドメインは、1つまたは複数の共刺激シグナル伝達ドメインも含む。

【0151】

細胞質ドメインは、CARが入れられた宿主細胞（例えば、T細胞）の少なくとも1つの正常なエフェクター機能の活性化を担う。用語「エフェクター機能」とは、細胞の特殊化された機能を指す。T細胞のエフェクター機能は、例えば、サイトカインの分泌を含む、細胞溶解活性またはヘルパー活性であってもよい。かくして、用語「シグナル伝達ドメイン」は、エフェクター機能シグナルを変換し、特殊化された機能を実施するように細胞を指令するタンパク質の部分の部分を指す。通常はシグナル伝達ドメイン全体が存在するが、多くの場合、鎖全体を使用する必要はない。細胞内シグナル伝達ドメインのトランケートされた部分が使用される程度で、そのようなトランケートされた部分が、エフェクター機能シグナルを変換する限り、それをインタクトな鎖の代わりに使用することができる。細胞内シグナル伝達ドメインという用語は、かくして、エフェクター機能シグナルを変換するのに十分なシグナル伝達ドメインの任意のトランケートされた部分を含むことを意味する。

30

【0152】

本開示のCARにおいて使用することができるシグナル伝達ドメインの非限定例としては、例えば、DAP10、DAP12、Fcイプシロン受容体I鎖（FCER1G）、FcR、CD3、CD3、CD3、CD3、CD2、CD5、CD22、CD226、CD66d、CD79A、およびCD79Bに由来するシグナル伝達ドメインが挙げられる。

40

【0153】

一部の実施形態では、細胞質ドメインは、CD3シグナル伝達ドメインを含む。一実施形態では、CD3シグナル伝達ドメインは、配列番号6に記載のアミノ酸配列、または配列番号6との少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも95、少なくとも96、少なくとも97、少なくとも98もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するそのバリエーションを含む。

50

【0154】

一部の実施形態では、細胞質ドメインは、1つまたは複数の共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含む。一部の実施形態では、1つまたは複数の共刺激シグナル伝達ドメインは、CD28、41BB、IL2Rb、CD40、OX40(CD134)、CD80、CD86、CD27、ICOS、NKG2D、DAP10、DAP12、2B4(CD244)、BTLA、CD30、GITR、CD226、CD79A、およびHVEMに由来する。

【0155】

一実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、41BBに由来する。一実施形態では、41BB共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号8に記載のアミノ酸配列、または配列番号8との少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも95、少なくとも96、少なくとも97、少なくとも98もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するそのバリエーションを含む。

10

【0156】

一実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、IL2Rbに由来する。一実施形態では、IL2Rb共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号9に記載のアミノ酸配列、または配列番号9との少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも95、少なくとも96、少なくとも97、少なくとも98もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するそのバリエーションを含む。

20

【0157】

一実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、CD40に由来する。一実施形態では、CD40共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号10に記載のアミノ酸配列、または配列番号10との少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも95、少なくとも96、少なくとも97、少なくとも98もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するそのバリエーションを含む。

【0158】

一実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、OX40に由来する。一実施形態では、OX40共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号11に記載のアミノ酸配列、または配列番号11との少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも95、少なくとも96、少なくとも97、少なくとも98もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するそのバリエーションを含む。

30

【0159】

一実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、CD80に由来する。一実施形態では、CD80共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号12に記載のアミノ酸配列、または配列番号12との少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも95、少なくとも96、少なくとも97、少なくとも98もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するそのバリエーションを含む。

40

【0160】

一実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、CD86に由来する。一実施形態では、CD86共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号13に記載のアミノ酸配列、または配列番号13との少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも95、少なくとも96、少なくとも97、少なくとも98もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するそのバリエーションを含む。

【0161】

50

一実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、CD27に由来する。一実施形態では、CD27共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号14に記載のアミノ酸配列、または配列番号14との少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも95、少なくとも96、少なくとも97、少なくとも98もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するそのバリエーションを含む。

【0162】

一実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、ICOSに由来する。一実施形態では、ICOS共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号15に記載のアミノ酸配列、または配列番号15との少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも95、少なくとも96、少なくとも97、少なくとも98もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するそのバリエーションを含む。

10

【0163】

一実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、NKG2Dに由来する。一実施形態では、NKG2D共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号16に記載のアミノ酸配列、または配列番号16との少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも95、少なくとも96、少なくとも97、少なくとも98もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するそのバリエーションを含む。

20

【0164】

一実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、DAP10に由来する。一実施形態では、DAP10共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号17に記載のアミノ酸配列、または配列番号17との少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも95、少なくとも96、少なくとも97、少なくとも98もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するそのバリエーションを含む。

【0165】

一実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、DAP12に由来する。一実施形態では、DAP12共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号18に記載のアミノ酸配列、または配列番号18との少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも95、少なくとも96、少なくとも97、少なくとも98もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するそのバリエーションを含む。

30

【0166】

一実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、2B4(CD244)に由来する。一実施形態では、2B4(CD244)共刺激シグナル伝達ドメインは、配列番号19に記載のアミノ酸配列、または配列番号19との少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも95、少なくとも96、少なくとも97、少なくとも98もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するそのバリエーションを含む。

40

【0167】

一部の実施形態では、本開示のCARは、1つの共刺激シグナル伝達ドメインを含む。一部の実施形態では、本開示のCARは、2つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインを含む。ある特定の実施形態では、本開示のCARは、2、3、4、5、6つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインを含む。

【0168】

一部の実施形態では、シグナル伝達ドメインおよび共刺激シグナル伝達ドメインは、任意の順序に入れてもよい。一部の実施形態では、シグナル伝達ドメインは、共刺激シグナル伝達ドメインの上流にある。一部の実施形態では、シグナル伝達ドメインは、共刺激シ

50

グナル伝達ドメインの下流にある。2つ以上の共刺激ドメインが含まれる場合、共刺激シグナル伝達ドメインの順序を切り替えてもよい。

【0169】

CAR領域および配列の非限定例は、表1に提供される。

【0170】

【表1-1】

表1

| CAR 領域 | 配列 | UniProt Id | 配列 番号 |
|--------------------------|---|------------|----------|
| CD19 CAR: | | | |
| GMCSFR シグナル ペプチド | MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP | | 1 |
| FMC63 VH | EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGV VSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSR LTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS | | 2 |
| Whitlow リンカー | GSTSGSGKPGSGEGSTKG | | 3 |
| FMC63 VL | DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLN WYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGG GTKLEIT | | 4 |
| CD28 (AA 114- 220) | IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFP GPSKPFWLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAP PRDFAAYRS | P10747-1 | 5 |
| CD3-ε-η アイソフォーム3 | RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ | P20963-3 | 6 |

10

20

30

【0171】

40

50

【表 1 - 2】

| | | | |
|--|--|----------|----|
| (AA 52-163) | KDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPPR | | |
| FMC63 scFV | EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYG VSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKS RLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKH YYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSGSTSGSGKP GSGEGSTKGDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCR ASQDISK YLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQ GNTLPYTFGGGKLEIT | | 7 |
| シグナル伝達ドメイン: | | | |
| 41BB (AA 214- 255) | KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCEL | Q07011 | 8 |
| IL2Rb (AA 266- 551) | NCRNTGPWLKVKCNTDPDSKFFSLSSEHG GDVQKWLSSPFPSSSPGGLAPEISPLEVLERD KVTQLLPLNTDAYLSLQELQGQDPHTLV | P14784 | 9 |
| CD40 (AA 216- 277) | KKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFDDLPGSNTA APVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ | P25942 | 10 |
| OX40 (AA 236- 277) | ALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQA DAHSTLAKI | P43489 | 11 |
| CD80 (AA 264- 288) | TYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV | P33681 | 12 |
| CD86 (AA269-329) | KWKKKKRPRNSYKCGTNTMERESEQTKKRE KIHIPERSDEAQRVFKSSKTSKSDKSDTCF | P42081 | 13 |
| CD27 (AA 213- 260) | QRRKYRSNKGESPVPAEPCHYSCPREEEGSTIP IQEDYRKPEPACSP | P26842 | 14 |
| ICOS (AA 162- 199) | CWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKS RLTDVTL | Q9Y6W8 | 15 |
| NKG2D (AA 1-51) | MGWIRGRRSR HSWEMSEFHN YNLDLKK\$DF STRWQKQRCP VVKSKRENAS | P26718 | 16 |
| DAP10 (AA 70-93) | LCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRG | Q9UBK5 | 17 |
| DAP12 (AA 62-113) | YFLGRLVPRGRGAAEAATRKRITETESPYQEL QGQRSDVYSDLNTQRPYYK | O54885 | 18 |
| 2B4/CD244 (AA 251- 370) | WRRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTRRN HEQEQTTPGGGSTITYSMIQS\$SAPTSQEPAYTL YSLIQPSRKSGSRKRNHSPSNSTIYEVIGKSQP KAQNPARLSRKELENFDVYS | Q9BZW8 | 19 |
| CD3-ε ⁺ -ζ ⁺ 7177オーム3 | RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ | P20963-3 | 6 |

10

20

30

40

【 0 1 7 2 】

50

【表 1 - 3】

| | | | |
|---------------------------------|---|----------|----|
| (AA 52-163) | KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLS TATKDTYDALHMQUALPPR | | |
| CD28 (AA 180- 220) | RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAP PRDFAAYRS | P10747-1 | 20 |
| スパーサー/ヒンジ: | | | |
| CD8 (AA 136- 182) | TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIY | P01732 | 21 |
| CD28 (AA 114- 151) | IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFP GPSKP | P10747-1 | 22 |
| 膜貫通: | | | |
| CD8 (AA 183- 203) | IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT | P01732 | 23 |
| CD28 (AA 153- 179) | FWVLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWV | P10747-1 | 24 |
| リンカー: | | | |
| Whitlow リンカー | GSTSGSGKPGSGEGSTKG | | 3 |
| (G ₄ S) ₃ | GGGGSGGGSGGGGS | | 25 |
| リンカー 3 | GGSEKSSGSGSESKSTGGS | | 26 |
| リンカー 4 | GGGSGGGS | | 27 |
| リンカー 5 | GGGSGGGSGGGS | | 28 |
| リンカー 6 | GGGSGGGSGGGSGGGS | | 29 |
| リンカー 7 | GGGSGGGSGGGSGGGSGGGS | | 30 |
| リンカー 8 | GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGS | | 31 |
| リンカー 9 | GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGS | | 32 |
| リンカー 10 | IRPRAIGGSKPRVA | | 33 |
| リンカー 11 | GKGGSGKGGSGKGGGS | | 34 |
| リンカー 12 | GGKGGGKGGSGGKGS | | 35 |
| リンカー 13 | GGGKSGGKSGGGKS | | 36 |
| リンカー 14 | GKGKSGKSGKSGKGS | | 37 |
| リンカー 15 | GGGKSGGKSGKGGGS | | 38 |
| リンカー 16 | GKPGSGKPGSGKPGS | | 39 |
| リンカー 17 | GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS | | 40 |
| リンカー 18 | GKGKSGKSGKSGKSGKGS | | 41 |
| リンカー 19 | STAGDTHLGGEDFD | | 42 |
| リンカー 20 | GEGGSGEGGSGEGGS | | 43 |
| リンカー 21 | GGEGSGEGGSGEGGS | | 44 |
| リンカー 22 | GEGESGEGESGEGES | | 45 |
| リンカー 23 | GGGESGEGESGEGGS | | 46 |
| リンカー 24 | GEGESGEGESGEGESGEGES | | 47 |

【 0 1 7 3 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

| | | | |
|---------|-----------------------------------|--|----|
| リンカー 25 | GSTSGSGKPGSGEGSTKG | | 48 |
| リンカー 26 | PRGASKSGSASQTGSAPGS | | 49 |
| リンカー 27 | GTAAAGAGAAGGAAAGAAG | | 50 |
| リンカー 28 | GTSGSSGSGSGGSGSGGGG | | 51 |
| リンカー 29 | GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS | | 52 |
| リンカー 30 | GSGS | | 53 |
| リンカー 31 | APAPAPAPAP | | 54 |
| リンカー 32 | APAPAPAPAPAPAPAPAPAP | | 55 |
| リンカー 33 | AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA AA | | 56 |

10

【0174】

一部の実施形態では、第2のポリペプチドの抗原結合ドメインは、抗原に結合する。第2のポリペプチドの抗原結合ドメインは、1つより多い抗原または抗原中の1つより多いエピトープに結合することができる。例えば、第2のポリペプチドの抗原結合ドメインは、2、3、4、5、6、7、8個以上の抗原に結合することができる。別の例として、第2のポリペプチドの抗原結合ドメインは、同じ抗原中の2、3、4、5、6、7、8個以上のエピトープに結合することができる。

20

【0175】

抗原結合ドメインの選択は、標的細胞の表面を規定する抗原の種類および数に依存してもよい。例えば、抗原結合ドメインを、特定の疾患状態と関連する標的細胞上で細胞表面マーカーとして作用する抗原を認識するように選択することができる。ある特定の実施形態では、本開示のCARを遺伝的に改変して、抗原（例えば、腫瘍細胞上の）に特異的に結合する所望の抗原結合ドメインを操作することによって目的の腫瘍抗原を標的化することができる。本開示のCARにおける抗原結合ドメインのための標的として作用し得る細胞表面マーカーの非限定例としては、腫瘍細胞または自己免疫疾患と関連するものが挙げられる。

30

【0176】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、少なくとも1つの腫瘍抗原または自己免疫抗原に結合する。

【0177】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、少なくとも1つの腫瘍抗原に結合する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、2つ以上の腫瘍抗原に結合する。一部の実施形態では、2つ以上の腫瘍抗原は、同じ腫瘍と関連する。一部の実施形態では、2つ以上の腫瘍抗原は、異なる腫瘍と関連する。

【0178】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、少なくとも1つの自己免疫抗原に結合する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、2つ以上の自己免疫抗原に結合する。一部の実施形態では、2つ以上の自己免疫抗原は、同じ自己免疫疾患と関連する。一部の実施形態では、2つ以上の自己免疫抗原は、異なる自己免疫疾患と関連する。

40

【0179】

一部の実施形態では、腫瘍抗原は、グリア芽腫、卵巣がん、子宮頸がん、頭頸部がん、肝臓がん、前立腺がん、膵がん、腎細胞癌、膀胱がん、または血液悪性腫瘍と関連する。グリア芽腫と関連する腫瘍抗原の非限定例としては、HER2、EGFRvIII、EGFR、CD133、PDGFRA、FGFR1、FGFR3、MET、CD70、ROBO1およびIL13R₂が挙げられる。卵巣がんと関連する腫瘍抗原の非限定例としては、FOLR1、FSHR、MUC16、MUC1、メソテリン、CA125、EpCA

50

M、EGFR、PDGFR、ネクチン-4、およびB7H4が挙げられる。子宮頸がんまたは頭頸部がんに関連する腫瘍抗原の非限定例としては、GD2、MUC1、メソテリン、HER2、およびEGFRが挙げられる。肝臓がんに関連する腫瘍抗原の非限定例としては、クロードイン18.2、GPC-3、EpCAM、cMET、およびAFPが挙げられる。血液悪性腫瘍に関連する腫瘍抗原の非限定例としては、CD22、CD79(CD79aおよび/またはCD79b)、BCMA、GPC5D、SLAMF7、CD33、CLL1、CD123、およびCD70が挙げられる。膀胱がんに関連する腫瘍抗原の非限定例としては、ネクチン-4およびSLITRK6が挙げられる。

【0180】

抗原結合ドメインによって標的化することができる抗原のさらなる例としては、限定されるものではないが、アルファ-フェトタンパク質、A3、A33抗体に特異的な抗原、Ba733、Bre3抗原、カルボニックアンヒドラーゼEX、CD1、CD1a、CD3、CD5、CD15、CD16、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD30、CD33、CD38、CD45、CD74、CD79A、CD80、CD123、CD138、結腸特異的抗原-p(CSAP)、CEA(CEACA M5)、CEACAM6、CSAP、EGFR、EGP-I、EGP-2、Ep-CAM、EphA1、EphA2、EphA3、EphA4、EphA5、EphA6、EphA7、EphA8、EphA10、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB6、FIt-I、Flt-3、葉酸受容体、HLA-DR、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(HCG)およびそのサブユニット、低酸素誘導因子(HIF-I)、Ia、IL-2、IL-6、IL-8、インスリン増殖因子-1(IGF-I)、KC4抗原、KS-1抗原、KS1-4、Le-Y、マクロファージ阻害因子(MIF)、MAGE、MUC2、MUC3、MUC4、NCA66、NCA95、NCA90、PAM-4抗体に特異的な抗原、胎盤増殖因子、p53、前立腺酸ホスファターゼ、PSA、PSMA、RS5、S100、TAC、TAG-72、テナシン、TRAIL受容体、Tn抗原、Thomson-Friedenreich抗原、腫瘍壊死抗原、VEGF、ED-Bフィブロネクチン、17-1A抗原、血管新生マーカー、がん遺伝子マーカーまたはがん遺伝子産物が挙げられる。

【0181】

一実施形態では、抗原結合ドメインによって標的化される抗原は、CD19である。一実施形態では、抗原結合ドメインは、抗CD19scFvを含む。一実施形態では、抗CD19scFvは、配列番号2に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(VH)、または配列番号2との少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも95、少なくとも96、少なくとも97、少なくとも98もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するそのバリエーションを含む。一実施形態では、抗CD19scFvは、配列番号4に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(VL)、または配列番号4との少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも95、少なくとも96、少なくとも97、少なくとも98もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するそのバリエーションを含む。一実施形態では、抗CD19scFvは、配列番号7に記載のアミノ酸配列、または配列番号7との少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも95、少なくとも96、少なくとも97、少なくとも98もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するそのバリエーションを含む。

【0182】

一部の実施形態では、抗原は、自己免疫疾患または障害に関連する。そのような抗原は、細胞受容体および「自己」指向性抗体を産生する細胞に由来してもよい。一部の実施形態では、抗原は、関節リウマチ(RA)、多発性硬化症(MS)、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデス、サルコイドーシス、1型糖尿病、インスリン依存性糖尿病(I

10

20

30

40

50

DDM)、自己免疫性甲状腺炎、反応製関節炎、強直性脊椎炎、強皮症、多発性筋炎、皮膚筋炎、乾癬、血管炎、ウェゲナー肉芽腫症、重症筋無力症、橋本甲状腺炎、グレーブス病、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、ギラン・バレー症候群、クローン病または潰瘍性大腸炎などの自己免疫疾患または障害と関連する。

【0183】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるCARによって標的化することができる自己免疫抗原としては、限定されるものではないが、血小板抗原、ミエリタンパク質抗原、snRNPにおけるSm抗原、島細胞抗原、リウマチ因子、および抗シトルリン化タンパク質、シトルリン化タンパク質およびペプチド、例えば、CCP-1、CCP-2(環状シトルリン化ペプチド)、フィブリノゲン、フィブリン、ビメンチン、フィラグリ、コラーゲンIおよびIIペプチド、アルファ-エノラーゼ、翻訳開始因子4G1、核周囲因子、ケラチン、Sa(細胞骨格タンパク質ビメンチン)、関節軟骨の成分、例えば、コラーゲンII、IXおよびXI、循環血清タンパク質、例えば、RF(IgG、IgM)、フィブリノゲン、プラスミノゲン、フェリチン、核成分、例えば、RA33/hnRNPA2、Sm、真核翻訳伸長因子1アルファ1、ストレスタンパク質、例えば、HSP-65、70、90、BiP、炎症/免疫因子、例えば、B7-H1、IL-1アルファ、およびIL-8、酵素、例えば、カルパスタチン、アルファ-エノラーゼ、アルドラーゼ-A、ジペプチジルペプチダーゼ、オステオポンチン、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、受容体、例えば、リポコルチン1、好中球核タンパク質、例えば、ラクトフェリンおよび25~35kD核タンパク質、顆粒タンパク質、例えば、殺菌性透過性増加タンパク質(BPI)、エラスターゼ、カテプシンG、ミエロペルオキシダーゼ、プロテイナーゼ3、血小板抗原、ミエリタンパク質抗原、島細胞抗原、リウマチ因子、ヒストン、リボソームPタンパク質、カルジオリピン、ビメンチン、核酸、例えば、dsDNA、ssDNA、およびRNA、リボ核粒子およびタンパク質、例えば、Sm抗原(限定されるものではないが、SmD'およびSmB'/Bを含む)、U1RNP、A2/B1hnRNPA2、Ro(SSA)、およびLa(SSB)抗原が挙げられる。

【0184】

種々の実施形態では、本開示のCARにおいて使用されるscFv断片は、VHとVLドメインとの間にリンカーを含んでもよい。リンカーは、ペプチドリリンカーであってもよく、任意の天然に存在するアミノ酸を含んでもよい。リンカーに含有させることができる例示的なアミノ酸は、Gly、Ser、Pro、Thr、Glu、Lys、Arg、Ile、Leu、HisおよびTyrである。リンカーは、VHとVLとが、抗原への結合などの、所望の活性を保持するように互いに対して正確なコンフォメーションを形成するように、それらを連結するのに十分な長さを有するべきである。リンカーは、約5~50アミノ酸長であってもよい。一部の実施形態では、リンカーは、約10~40アミノ酸長である。一部の実施形態では、リンカーは、約10~35アミノ酸長である。一部の実施形態では、リンカーは、約10~30アミノ酸長である。一部の実施形態では、リンカーは、約10~25アミノ酸長である。一部の実施形態では、リンカーは、約10~20アミノ酸長である。一部の実施形態では、リンカーは、約15~20アミノ酸長である。使用することができる例示的なリンカーは、Glyリッチリンカー、GlyおよびSerを含有するリンカー、GlyおよびAlaを含有するリンカー、AlaおよびSerを含有するリンカー、ならびに他の可撓性リンカーである。

【0185】

一実施形態では、リンカーは、Whitlowリンカーである。一実施形態では、Whitlowリンカーは、配列番号3に記載のアミノ酸配列、または配列番号3との少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも95、少なくとも96、少なくとも97、少なくとも98もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するそのバリエーションを含む。別の実施形態では、リンカーは、(G4S)₃リンカーである。一実施形態では、(G4S)₃リンカーは、配列番号25に記載のアミノ酸配列、ま

たは配列番号 25 との少なくとも 50、少なくとも 55、少なくとも 60、少なくとも 65、少なくとも 70、少なくとも 75、少なくとも 80、少なくとも 85、少なくとも 90、少なくとも 95、少なくとも 96、少なくとも 97、少なくとも 98 もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するそのバリエーションを含む。

【0186】

他のリンカー配列は、任意の免疫グロブリン重鎖または軽鎖アイソタイプに由来する、免疫グロブリンヒンジ領域 C L または C H 1 の一部を含んでもよい。使用することができる例示的なリンカーとしては、表 1 中の配列番号 26 ~ 56 のいずれかが挙げられる。さらなるリンカーは、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる国際公開第 2019/060695 号パンフレットに記載されている。

【0187】

III. 人工細胞死ポリペプチド安全スイッチ

本出願のある特定の実施形態によれば、iPSC 細胞またはその誘導体細胞は、人工細胞死ポリペプチドをコードする外因性ポリヌクレオチドを含む。

【0188】

本明細書で使用される場合、用語「人工細胞死ポリペプチド」は、細胞療法の潜在的な毒性またはそうでなければ副作用を防止するために設計された操作されたタンパク質を指す。人工細胞死ポリペプチドは、アポトーシスの誘導、タンパク質合成の阻害、DNA 複製、増殖停止、転写および転写後遺伝子調節および/または抗体媒介性枯渇を媒介する。一部の例では、人工細胞死ポリペプチドは、外因性分子、例えば、抗体、抗ウイルス薬、または放射性同位体コンジュゲート薬によって活性化され、活性化された場合、治療細胞のアポトーシスおよび/または細胞死を誘発する。ある特定の実施形態では、人工細胞死ポリペプチドの作用機構は、代謝性、二量体化誘導または治療的モノクローナル抗体媒介性である。

【0189】

ある特定の実施形態では、人工細胞死ポリペプチドは、モノクローナル抗体特異的エピトープとも本明細書で称される、抗体、特に、モノクローナル抗体によって特異的に認識されるエピトープを含む不活化された細胞表面受容体である。iPSC またはその誘導体細胞によって発現された場合、不活化された細胞表面受容体は、シグナル伝達が不活性であるか、または大きく減少しているが、依然として抗体によって特異的に認識され得る。不活化された細胞表面受容体への抗体の特異的結合は、ADCC および/または ADCP 機構による iPSC またはその誘導体細胞の除去、ならびに毒素または放射性核種との抗体薬物コンジュゲートを用いた直接的殺滅を可能にする。

【0190】

ある特定の実施形態では、不活化された細胞表面受容体は、限定されるものではないが、イブリツモマブ、チウキセタン、ムロモナブ - CD3、トシツモマブ、アブシキシマブ、バシリキシマブ、ブレンツキシマブベドチン、セツキシマブ、インフリキシマブ、リツキシマブ、アレムツズマブ、ベバシズマブ、セルトリズマブペゴール、ダクリズマブ、エクリズマブ、エファリズマブ、ゲムツズマブ、ナタリズマブ、オマリズマブ、パリビズマブ、ボラツズマブベドチン、ラニビズマブ、トシリズマブ、トラスツズマブ、ベドリズマブ、アダリムマブ、ベリムマブ、カナキヌマブ、デノスマブ、ゴリムマブ、イピリムマブ、オフアツムマブ、パニツムマブ、またはウステキヌマブを含む抗体によって特異的に認識されるエピトープから選択されるエピトープを含む。

【0191】

EGFR、ErbB1 および HER1 としても知られる、上皮増殖因子受容体は、細胞外リガンドの上皮増殖因子ファミリーのメンバーのための細胞表面受容体である。本明細書で使用される場合、「トランケートされた EGFR」、「tEGFR」、「ショート EGFR」または「sEGFR」とは、EGFR の EGF 結合ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを欠く不活性 EGFR バリエーションを指す。例示的な tEGFR バリエーションは、セツキシマブ結合エピトープを含有する天然 EGFR 配列のドメイン 2 の残基 322

10

20

30

40

50

~ 333、ドメイン3および4および膜貫通ドメインの全部を含有する。細胞表面上での t E G F R バリエーションの発現は、必要に応じて、セツキシマブ (E r b i t u x (登録商標)) などの t E G F R に特異的に結合する抗体による細胞除去を可能にする。E G F 結合ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインの非存在に起因して、t E G F R は、i P S C またはその誘導体細胞によって発現された場合、不活性である。

【0192】

本出願の例示的な不活化された細胞表面受容体は、t E G F R バリエーションを含む。ある特定の実施形態では、キメラ抗原受容体 (C A R) を発現する操作された免疫細胞中での不活化された細胞表面受容体の発現は、細胞を抗 E G F R 抗体と接触させた場合、操作された免疫細胞の細胞自殺を誘導する。不活化された細胞表面受容体を使用する方法は、国際公開第 2019/070856 号パンフレット、同第 2019/023396 号パンフレット、同第 2018/058002 号パンフレットに記載されており、それらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。例えば、t E G F R バリエーションを含む不活化された細胞表面受容体をコードする異種ポリヌクレオチドを含む、本開示の操作された免疫細胞を以前に受けたことがある対象に、以前に投与された操作された免疫細胞を対象において除去するのに有効な量の抗 E G F R 抗体を投与することができる。

10

【0193】

ある特定の実施形態では、抗 E G F R 抗体は、セツキシマブ、マツズマブ、ネシツムマブまたはパニツムマブであり、好ましくは、抗 E G F R 抗体は、セツキシマブである。

【0194】

ある特定の実施形態では、t E G F R バリエーションは、配列番号 71 と少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% などの少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列、好ましくは、配列番号 71 のアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

20

【0195】

一部の実施形態では、不活化された細胞表面受容体は、ポラツズマブベドチンによって特異的に認識されるエピトープなどの、C D 7 9 b の 1 つまたは複数のエピトープを含む。ある特定の実施形態では、C D 7 9 b エピトープは、配列番号 78 と少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% などの少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列、好ましくは、配列番号 78 のアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

30

【0196】

一部の実施形態では、不活化された細胞表面受容体は、リツキシマブによって特異的に認識されるエピトープなどの、C D 2 0 の 1 つまたは複数のエピトープを含む。ある特定の実施形態では、C D 2 0 エピトープは、配列番号 80 と少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% などの少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列、好ましくは、配列番号 80 のアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

【0197】

一部の実施形態では、不活化された細胞表面受容体は、トラスツズマブによって特異的に認識されるエピトープなどの、H e r 2 受容体または E r b B の 1 つまたは複数のエピトープを含む。ある特定の実施形態では、モノクローナル抗体特異的エピトープは、配列番号 82 と少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% などの少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列、好ましくは、配列番号 82 のアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

40

【0198】

一部の実施形態では、不活化された細胞表面受容体は、サイトカインをさらに含む。

【0199】

一部の実施形態では、不活化された細胞表面受容体は、ヒンジドメインをさらに含む。一部の実施形態では、ヒンジドメインは、C D 8 に由来する。一実施形態では、C D 8 ヒ

50

ンジドメインは、配列番号 2 1 に記載のアミノ酸配列、または配列番号 2 1 との少なくとも 5 0、少なくとも 5 5、少なくとも 6 0、少なくとも 6 5、少なくとも 7 0、少なくとも 7 5、少なくとも 8 0、少なくとも 8 5、少なくとも 9 0、少なくとも 9 5、少なくとも 9 6、少なくとも 9 7、少なくとも 9 8 もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するそのバリエーションを含む。

【 0 2 0 0 】

ある特定の実施形態では、不活化された細胞表面受容体は、膜貫通ドメインをさらに含む。一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、C D 8 に由来する。一実施形態では、C D 8 膜貫通ドメインは、配列番号 2 3 に記載のアミノ酸配列、または配列番号 2 3 との少なくとも 5 0、少なくとも 5 5、少なくとも 6 0、少なくとも 6 5、少なくとも 7 0、少なくとも 7 5、少なくとも 8 0、少なくとも 8 5、少なくとも 9 0、少なくとも 9 5、少なくとも 9 6、少なくとも 9 7、少なくとも 9 8 もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するそのバリエーションを含む。

10

【 0 2 0 1 】

ある特定の実施形態では、不活化された細胞表面受容体は、その細胞外ドメイン、膜貫通領域および細胞質ドメイン中に、抗体によって特異的に認識される 1 つまたは複数のエピトープを含む。一部の実施形態では、不活化された細胞表面受容体は、エピトープと膜貫通領域との間にヒンジ領域をさらに含む。一部の実施形態では、不活化された細胞表面受容体は、抗体によって特異的に認識される 1 つより多いエピトープを含み、エピトープは、同じか、または異なるアミノ酸配列を有してもよく、エピトープを、(G G G G S)_n (式中、n は、1 ~ 8 の整数である) の配列 (配列番号 2 5) を有する可撓性ペプチドリinker などの、ペプチドリinker を介して互いに連結することができる。一部の実施形態では、不活化された細胞表面受容体は、サイトカインをさらに含む。ある特定の実施形態では、サイトカインは、不活化された細胞表面受容体の細胞質ドメイン中にある。好ましくは、サイトカインは、本明細書に記載されるものなどの、自己プロテアーゼペプチド配列を介して、直接的または間接的に、抗体によって特異的に認識されるエピトープに作動可能に連結される。一部の実施形態では、サイトカインは、自己プロテアーゼペプチド配列を介して膜貫通領域に接続することによってエピトープに間接的に連結される。

20

【 0 2 0 2 】

他の実施形態では、人工細胞死ポリペプチドは、抗ウイルス薬によって認識されるウイルス酵素である。ある特定の実施形態では、ウイルス酵素は、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (H S V - t k) である。ある特定の実施形態では、H S V - t k は、配列番号 9 6 と少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % などの少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列、好ましくは、配列番号 9 6 のアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。この酵素は、非毒性プロドラッグであるガンシクロビルをリン酸化した後、内因性キナーゼによって G C V - 三リン酸にリン酸化されるようになり、D N A への組み込み時に鎖終結および一本鎖切断を引き起こし、それによって、分裂細胞を殺滅する。ある特定の実施形態では、キメラ抗原受容体 (C A R) を発現する操作された免疫細胞中でのウイルス酵素の発現は、細胞を抗ウイルス薬と接触させた場合、操作された免疫細胞の細胞死を誘導する。ある特定の

30

40

【 0 2 0 3 】

ある特定の実施形態では、人工細胞死ポリペプチドは、低分子化合物によって標的化される抗原を含む。ある特定の実施形態では、抗原は、国際公開第 2 0 1 5 1 4 3 0 2 9 A 1 号パンフレットおよび第 2 0 1 8 1 8 7 7 9 1 A 1 号パンフレット (これらの開示は、その全体が参照により本出願に組み込まれる) に記載されたトランケートされた前立腺特異的膜抗原 (P S M A) ポリペプチドである。ある特定の実施形態では、前立腺特異的膜抗原 (P S M A) ポリペプチドは、配列番号 9 7 と少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % などの少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列、好ましくは、配列番号 9 7 のアミノ酸配列を含むか

50

、またはそれからなる。ある特定の実施形態では、キメラ抗原受容体（CAR）を発現する操作された免疫細胞中でのトランケートされたPSMAの発現は、細胞を、小さいペプチドを介してPSMAに結合する放射性同位体コンジュゲート薬と接触させた場合、操作された免疫細胞の細胞死を誘導する。PSMA標的化合物は、国際公開第2010/108125号パンフレットに記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0204】

ある特定の実施形態では、人工細胞死ポリペプチドは、リンカーを介して前立腺特異的膜抗原（PSMA）に融合された単純ヘルペスウイルススチミジンキナーゼ（HSV-tk）を含む。ある特定の実施形態では、リンカーは、配列番号48のアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、人工細胞死ポリペプチドは、配列番号98と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%などの少なくとも90%同一であるアミノ酸配列、好ましくは、配列番号98のアミノ酸配列を含む。

10

【0205】

ある特定の実施形態では、人工細胞死ポリペプチドは、自己プロテアーゼペプチド配列によって作動可能に連結された単純ヘルペスウイルススチミジンキナーゼ（HSV-tk）および前立腺特異的膜抗原（PSMA）ポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、自己プロテアーゼペプチドは、ゾセア・アシグナ（*Thosea asigna*）ウイルス2A（T2A）ペプチドである。ある特定の実施形態では、人工細胞死ポリペプチドは、配列番号99と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%などの少なくとも90%同一であるアミノ酸配列、好ましくは、配列番号99のアミノ酸配列を含む。

20

【0206】

ある特定の実施形態では、人工ポリペプチドは、自己プロテアーゼペプチド配列によって作動可能に連結された前立腺特異的膜抗原（PSMA）ポリペプチドおよび分化抗原群24（CD24）ポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、自己プロテアーゼペプチドは、ゾセア・アシグナ（*Thosea asigna*）ウイルス2A（T2A）ペプチドである。ある特定の実施形態では、人工細胞死ポリペプチドは、配列番号100と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%などの少なくとも90%同一であるアミノ酸配列、好ましくは、配列番号100のアミノ酸配列を含む。

30

【0207】

IV. HLA

一態様では、MHC Iおよび/またはMHC IIノックアウトおよび/またはノックダウンを、「同種異系」細胞療法における使用のために細胞中に組み込むことができ、その細胞は、対象から収集され、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、RFXANK、CIITA、RFX5およびRFXAP遺伝子発現をノックアウトまたはノックダウン、例えば、破壊するように改変された後、異なる対象に戻される。本明細書に記載されるB2M、TAP1、TAP2、タパシン、RFXANK、CIITA、RFX5およびRFXAP遺伝子のノックアウトまたはノックダウンは、(1) GvH応答を防止する；(2) HvG応答を防止する；ならびに/または(3) T細胞の安全性および有効性を改善する。したがって、ある特定の実施形態では、ここで開示される発明は、T細胞中のB2M、TAP1、TAP2、タパシン、RFXANK、CIITA、RFX5およびRFXAP遺伝子からなる群から選択される1つまたは複数の遺伝子を独立にノックアウトおよび/またはノックダウンすることを含む。ある特定の実施形態では、ここで開示される方法は、T細胞中のB2M、TAP1、TAP2、タパシン、RFXANK、CIITA、RFX5およびRFXAP遺伝子からなる群から選択される2つの遺伝子、特に、B2MおよびCIITAを独立にノックアウトおよび/またはノックダウンして、クラスIおよびII HLAの破壊を達成することを含む。ある特定の実施形態では、本出願のiPS

40

50

C またはその誘導体細胞を、非古典的 H L A クラス I タンパク質（例えば、H L A - E および H L A - G）などの、免疫回避と関連する 1 つまたは複数のタンパク質をコードする外因性ポリヌクレオチドを導入することによってさらに改変することができる。特に、B 2 M 遺伝子の破壊は、全ての M H C クラス I 分子の表面発現を除去し、細胞を、「自己喪失」応答を介して N K 細胞による溶解に対して脆弱にする。外因性 H L A - E 発現は、N K 媒介性溶解に対する耐性をもたらし得る（Gornalusse et al., Nat Biotechnol. 2017; 35(8): 765-772）。

【0208】

ある特定の実施形態では、i P S C またはその誘導体細胞は、ヒト白血球抗原 E（H L A - E）およびヒト白血球抗原 G（H L A - G）の少なくとも一方をコードする外因性ポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、H L A - E は、配列番号 65 と少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% などの少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列、好ましくは、配列番号 65 のアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、H L A - G は、配列番号 68 と少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% などの少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列、好ましくは、配列番号 68 を含む。

10

【0209】

ある特定の実施形態では、外因性ポリヌクレオチドは、リンカーを介して H L A - E に融合された成熟 B 2 M タンパク質に作動可能に連結されたシグナルペプチドを含むポリペプチドをコードする。特定の実施形態では、外因性ポリペプチドは、配列番号 66 と少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% などの少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含む。

20

【0210】

他の実施形態では、外因性ポリヌクレオチドは、リンカーを介して H L A - G に融合された成熟 B 2 M タンパク質に作動可能に連結されたシグナルペプチドを含むポリペプチドをコードする。特定の実施形態では、外因性ポリペプチドは、配列番号 69 と少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% などの少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含む。

【0211】

V. 他の任意選択のゲノム編集

ある特定の実施形態では、本出願の細胞は、インターロイキン 15（I L - 15）および/もしくはインターロイキン（I L - 15）受容体またはそのバリエーションをコードする外因性ポリヌクレオチドをさらに含む。本明細書で使用される場合、「インターロイキン - 15」または「I L - 15」は、T および N K 細胞の活性化および増殖を調節するサイトカインを指す。I L - 15 の「機能的部分」（「生物活性部分」とは、完全長または成熟 I L - 15 の 1 つまたは複数の機能を保持する I L - 15 の一部を指す。そのような機能は、N K 細胞生存の促進、N K 細胞の調節および T 細胞の活性化および増殖ならびに造血幹細胞からの N K 細胞発生の支援を含む。当業者によって理解されるように、種々の I L - 15 分子の配列が当業界で公知である。ある特定の実施形態では、I L - 15 は、野生型 I L - 15 である。ある特定の実施形態では、I L - 15 は、ヒト I L - 15 である。

30

40

【0212】

別の実施形態では、本出願の細胞は、F c R I I I（C D 16）の天然に存在しないバリエーション、例えば、h n C D 16 をコードする外因性ポリヌクレオチドをさらに含む（例えば、その内容の全体が参照により本明細書に組み込まれる、Zhu et al., Blood 2017, 130:4452 を参照されたい）。本明細書で使用される場合、用語「h n C D 16 a」とは、C D 16 の高親和性の非切断性バリエーション（抗体依存性細胞傷害（A D C C）に關与する低親和性 F c 受容体）を指す。典型的には、C D 16 は、プロテアーゼによって A D C C 中に切断されるが、h n C D 16 C A R は、この切断を受けず、かくして

50

、ADCシグナルをより長く持続させる。一部の実施形態では、hncd16は、その内容全体が参照により本明細書に明示的に組み込まれるBlood 2016 128:3363に開示された通りである。

【0213】

別の実施形態では、本出願の細胞は、インターロイキン12(IL-12)もしくはインターロイキン21(IL-21)またはそのバリエーションをコードする外因性ポリヌクレオチドをさらに含む。

【0214】

別の実施形態では、本出願の細胞は、同種異系適用のために宿主対移植片免疫反応製を克服するためのNK阻害モダリティとして、白血球表面分化抗原群CD47(CD47)をコードする外因性ポリヌクレオチドをさらに含む。本明細書で使用される場合、「インテグリン関連タンパク質」(IAP)とも称されることがある、用語「CD47」は、ヒトにおいてはCD47遺伝子によってコードされる膜貫通タンパク質を指す。CD47は、膜インテグリンとのパートナーである免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、リガンドであるトロンボスポンジン-1(TSP-1)およびシグナル調節タンパク質アルファ(SIRPα)にも結合する。CD47は、CD47を発現する細胞に、マクロファージ攻撃を逃れさせるマクロファージに対するシグナルとして作用する。例えば、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、Deuse-T, et al., Nature Biotechnology 2019 37: 252-258を参照されたい。

10

【0215】

別の実施形態では、本出願の細胞は、構成的に活性化されたIL-7受容体またはそのバリエーションをコードする外因性ポリヌクレオチドをさらに含む。IL-7は、T細胞の発生および成熟において重要な役割を有する。それは、ナイーブおよびセントラルメモリーT細胞サブセットの生成を促進し、その恒常性を調節する。IL-7は*in vivo*で腫瘍特異的T細胞の生存時間を延長させたことが以前に報告されている。Cancer Medicine. 2014;3(3):550-554。以前の研究では、構成的に活性化されたIL-7受容体(C7R)は、リガンドの非存在下で、または共受容体のガンマ鎖(γ)の存在下で、IL-7シグナル伝達をもたらすことが報告された。Shum et al, Cancer Discovery. 2017;7(11):1238-1247。システインおよび/またはプロリンなどの膜貫通ドメインの挿入は、IL-7Rのホモ二量体化をもたらした。ホモ二量体の形成時に、JAK1/JAK1の交差リン酸化は、STAT5を活性化し、それによって、IL-7の下流のシグナル伝達を活性化する。そのような構成的に活性化されたIL-7受容体(C7R)組成物のための構築物は、国際公開第2018/038945号パンフレットに開示されており、その内容は参照により本出願に組み込まれる。

20

30

【0216】

別の実施形態では、本出願の細胞は、PSMAまたはHSV-tkなどの、1つまたは複数のイメージングもしくはリポータータンパク質をコードする外因性ポリヌクレオチドをさらに含む。例えば、細胞は、国際公開第2015/143029号パンフレットおよび同第2018/187791号パンフレットの開示(それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる)によるイメージングリポーターとして前立腺特異的膜抗原(PSMA)をコードする外因性ポリヌクレオチドを含有してもよい。

40

【0217】

上記細胞の一実施形態では、1つまたは複数の選択された部位でのゲノム編集は、他のさらなる人工細胞死ポリペプチドタンパク質、標的化モダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬学的に活性化されたタンパク質およびペプチド、薬物標的候補、またはゲノム操作されたiPSCもしくはその誘導体細胞の生着、輸送、ホーミング、生存能力、自己再生、持続性、および/もしくは生存を促進するタンパク質をコードする1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドの挿入を含んでもよい。

【0218】

一部の実施形態では、挿入のための外因性ポリヌクレオチドは、(1)CMV、EF1

50

a、PGK、CAG、UBC、もしくは他の構成的、誘導的、時間、組織、もしくは細胞型特異的プロモーターを含む1つもしくは複数の外因性プロモーター；または(2)AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、ベータ-2ミクログロブリン、GAPDH、TCRもしくはRUNX1、またはゲノムセーフハーバーの基準を満たす他の遺伝子座を含む選択された部位に含まれる1つもしくは複数の内因性プロモーターに作動可能に連結される。一部の実施形態では、上記方法を使用して生成されたゲノム操作されたiPSCは、カスパーゼ、チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、B細胞CD20、ErbB2またはCD79bを含むタンパク質をコードする1つまたは複数の異なる外因性ポリヌクレオチドを含み、ゲノム操作されたiPSCが2つ以上の自殺遺伝子を含む場合、自殺遺伝子は、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、H11、ベータ-2ミクログロブリン、GAPDH、TCRまたはRUNX1を含む異なるセーフハーバー遺伝子座に組み込まれる。タンパク質をコードする他の外因性ポリヌクレオチドは、PETリポーター、恒常性サイトカイン、および阻害チェックポイント阻害タンパク質、例えば、PD1、PD-L1、およびCTLA4をコードするものならびにCD47/シグナル調節タンパク質アルファ(SIRP)軸を標的とするタンパク質を含んでもよい。一部の他の実施形態では、本明細書に提供される方法を使用して生成されたゲノム操作されたiPSCは、標的化モダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬物標的候補、免疫応答調節およびモジュレーション、またはiPSCもしくはその誘導体細胞の生着、輸送、ホーミング、生存能力、自己再生、持続性、および/もしくは生存を抑制するタンパク質と関連する1つまたは複数の内因性遺伝子にインデルを含む。

10

20

【0219】

さらに、改変されたT細胞は、標的遺伝子における機能喪失をもたらす、そのゲノム中の1つまたは複数の編集を示してもよい。標的遺伝子の機能喪失は、ゲノム改変に基づく標的遺伝子の発現の低下、例えば、コードされた遺伝子産物の不活化、または発現もしくは機能の減少をもたらす標的遺伝子中のRNA誘導性ヌクレアーゼ媒介性切断を特徴とする。機能喪失のために標的化することができる遺伝子の例としては、B2M、PD-1、CISH、CIITA、HLAクラスII組織適合性アルファ鎖遺伝子(例えば、HLA-DQA1、HLA-DRA、HLA-DPA1、HLA-DMA-HLA-DQA2および/またはHLA-DOA)、HLAクラスII組織適合性ベータ鎖遺伝子(例えば、HLA-DMB、HLA-DOB、HLA-DPB1、HLA-DQB1、HLA-DQB2、HLA-DQB3、HLA-DRB1、HLA-DRB3、HLA-DRB4、および/またはHLA-DRB5)、CD32B、CTLA4、NKG2A、BIM、CCR5、CCR7、CD96、CDK8、CXCR3、EP4(PGE2受容体)、Fas、GITR、IL1R8、KIRDL1、KIR2DL1-3、LAG3、SOCS遺伝子、ソルチリン、TIM3、TRAC、RAG1、RAG2およびNLRC5が挙げられる。

30

【0220】

本出願の改変された細胞は、記載された編集のいずれか、ならびに記載されたそのような編集の任意の組合せを示してもよい。

40

【0221】

VI. iPSCにおける選択された遺伝子座での標的化ゲノム編集

本出願の実施形態によれば、1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドは、iPSCの染色体上の1つまたは複数の遺伝子座に組み込まれる。

【0222】

本明細書で互換的に使用される、ゲノム編集、またはゲノミック編集、または遺伝子編集は、DNAが、標的化される細胞のゲノム中で挿入、欠失、および/または置換される遺伝子操作の型である。標的化ゲノム編集(「標的化ゲノミック編集」または「標的化遺伝子編集」と互換的である)は、ゲノム中の予め選択された部位での挿入、欠失、および/または置換を可能にする。内因性配列が標的化編集に挿入部位で欠失または破壊され

50

る場合、影響される配列を含む内因性遺伝子は、配列欠失または破壊に起因してノックアウトまたはノックダウンされたものであってよい。したがって、標的化編集を使用して、内因性遺伝子発現を正確に破壊することもできる。同様に本明細書で使用されるのは、挿入部位に内因性配列の欠失を有する、または有しない、ゲノム中の予め選択された部位への1つまたは複数の外因性配列の挿入を含むプロセスを指す用語「標的化組込み」である。

【0223】

標的化編集を、ヌクレアーゼ非依存的手法によって、またはヌクレアーゼ依存的手法によって達成することができる。ヌクレアーゼ非依存の標的化編集手法では、宿主細胞の酵素機構を介して、挿入される外因性ポリヌクレオチドを挟む相同配列によって相同組換えが誘導される。

10

【0224】

あるいは、標的化編集を、特異的レアカットエンドヌクレアーゼによる二本鎖切断(DSB)の特異的導入によってより高い頻度で達成することができる。そのようなヌクレアーゼ依存の標的化編集は、DSBに応答して生じる非相同末端結合(NHEJ)を含むDNA修復機構を利用する。外因性遺伝物質を含有するドナーベクターがなければ、NHEJは、少数の内因性ヌクレオチドの無作為の挿入または欠失(インデル)をもたらすことが多い。比較して、一对の相同アームによって挟まれた外因性遺伝物質を含有するドナーベクターが存在する場合、外因性遺伝物質を、相同組換えによる相同性修復(HDR)の間にゲノム中に導入し、「標的化組込み」をもたらすことができる。

20

【0225】

特異的かつ標的化されたDSBを導入することができる利用可能なエンドヌクレアーゼとしては、限定されるものではないが、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)およびRNA誘導性CRISPR(クラスター化された規則的間隔の短いパリンドローム反復)系が挙げられる。さらに、phiC31およびBxb1インテグラーゼを利用するDICE(デュアルインテグラーゼカセット交換)系も、標的化組込みのための有望な手段である。

【0226】

ZFNは、ジンクフィンガーDNA結合ドメインに融合されたヌクレアーゼを含む標的化ヌクレアーゼである。「ジンクフィンガーDNA結合ドメイン」または「ZFB D」とは、1つまたは複数のジンクフィンガーを介して配列特異の様式でDNAに結合するポリペプチドドメインを意味する。ジンクフィンガーは、構造が亜鉛イオンの配位によって安定化されるジンクフィンガー結合ドメイン内の約30アミノ酸のドメインである。ジンクフィンガーの例としては、限定されるものではないが、C2H2ジンクフィンガー、C3Hジンクフィンガー、およびC4ジンクフィンガーが挙げられる。「設計された」ジンクフィンガードメインは、設計/組成が、原則として、合理的基準、例えば、存在するZFP設計および結合データの情報を保存するデータベース中の情報をプロセッシングするための置換規則およびコンピュータアルゴリズムの適用の結果得られる、天然には存在しないドメインである。例えば、米国特許第6,140,081号明細書；同第6,453,242号明細書；および同第6,534,261号明細書を参照されたい；また、国際公開第98/53058号パンフレット；同第98/53059号パンフレット；同第98/53060号パンフレット；同第02/016536号パンフレットおよび同第03/016496号パンフレットを参照されたい。「選択された」ジンクフィンガードメインは、産生が主に、ファージディスプレイ、相互作用捕捉またはハイブリッド選択などの経験的プロセスの結果得られる、天然には見出されないドメインである。ZFNは、米国特許第7,888,121号明細書および米国特許第7,972,854号明細書により詳細に記載されており、これらの完全な開示は、参照により本明細書に組み込まれる。当業界におけるZFNの最も認識された例は、FokIヌクレアーゼと、ジンクフィンガーDNA結合ドメインとの融合物である。

30

40

【0227】

50

T A L E Nは、T A LエフェクターDNA結合ドメインに融合されたヌクレアーゼを含む標的化ヌクレアーゼである。「転写活性化因子様エフェクターDNA結合ドメイン」、「T A LエフェクターDNA結合ドメイン」または「T A L E DNA結合ドメイン」とは、T A Lエフェクタータンパク質のDNAへの結合を担うT A Lエフェクタータンパク質のポリペプチドドメインを意味する。T A Lエフェクタータンパク質は、感染の間にキサントモナス(Xanthomonas)属の植物病原体によって分泌される。これらのタンパク質は、植物細胞の核に進入し、そのDNA結合ドメインを介してエフェクター特異的DNA配列に結合し、その転写活性化ドメインを介してこれらの配列で遺伝子転写を活性化する。T A LエフェクターDNA結合ドメイン特異性は、反復可変性2残基(RVD)と呼ばれる選択された反復位置に多型性を含む、エフェクター可変数の不完全な34アミノ酸の反復に依存する。T A L E Nは、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2011/0145940号明細書により詳細に記載されている。当業界におけるT A L E Nの最も認識された例は、FokIヌクレアーゼと、T A LエフェクターDNA結合ドメインとの融合ポリペプチドである。

10

【0228】

本出願にとって好適な標的化ヌクレアーゼのさらなる例としては、限定されるものではないが、個別に使用されるにしても、組み合わせで使用されるにしても、Spol1、Bxb1、phiC31、R4、PhiBT1、およびWp/SPBc/TP901-1が挙げられる。

【0229】

20

標的化ヌクレアーゼの他の非限定例としては、天然に存在するヌクレアーゼおよび組換えヌクレアーゼ；cas、cpf、cse、csy、csn、csd、cst、csh、csa、csm、およびcmrを含むファミリーに由来するCRISPR関連ヌクレアーゼ；制限エンドヌクレアーゼ；メガヌクレアーゼ；ホーミングエンドヌクレアーゼなどが挙げられる。例として、CRISPR/Cas9は、2つの主要な成分：(1) Cas9エンドヌクレアーゼおよび(2) crRNA-tracrRNA複合体を必要とする。同時発現された場合、2つの成分は、複合体を形成し、PAMおよびPAMの近くのシード領域を含む標的DNA配列に動員される。crRNAおよびtracrRNAを組み合わせて、キメラガイドRNA(gRNA)を形成させて、Cas9を誘導して選択された配列を標的化することができる。次いで、これらの2つの成分を、トランスフェクションまたは形質導入によって哺乳動物細胞に送達することができる。別の例として、CRISPR/Cpf1は、2つの主要な成分：(1) Cpf1エンドヌクレアーゼおよび(2) crRNAを含む。同時発現された場合、2つの成分は、リボ核タンパク質(RNP)複合体を形成し、PAMおよびPAMの近くのシード領域を含む標的DNA配列に動員される。crRNAを組み合わせて、キメラガイドRNA(gRNA)を形成させて、Cpf1を誘導して選択された配列を標的化することができる。次いで、これらの2つの成分を、トランスフェクションまたは形質導入によって哺乳動物細胞に送達することができる。

30

【0230】

MAD7は、5'-TTTN-3'および5'-CTTN-3' PAM部位に対する優先性を有し、tracrRNAを必要としないユーバクテリウム・レクターレ(Eubacterium rectale)細菌を起源とする操作されたCas12aバリエーションである。例えば、開示が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第2018/236548号パンフレットを参照されたい。

40

【0231】

DICE媒介性挿入は、一对のリコンビナーゼ、例えば、phiC31とBxb1とを使用して、それぞれの酵素自身の小さいattBおよびattP認識部位に厳密に制限される、外因性DNAの単方向性組込みをもたらす。これらの標的att部位は哺乳動物ゲノム中に天然に存在しないため、それらを、所望の組込み部位で最初にゲノム中に導入しなければならない。例えば、開示が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第2015/0140665号パンフレットを参照されたい。

50

【0232】

本出願の一態様は、標的化ゲノム組込みのための1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を提供する。一実施形態では、構築物は、所望の組込み部位に特異的な一对のホモロジーアームをさらに含み、標的化組込みの方法は、構築物を細胞に導入して、細胞宿主の酵素機構による部位特異的相同組換えを可能にすることを含む。別の実施形態では、細胞中での標的化組込みの方法は、1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入すること、および所望の組込み部位に特異的なDNA結合ドメインを含むZFN発現カセットを細胞に導入して、ZFN媒介性挿入を可能にすることを含む。さらに別の実施形態では、細胞中での標的化組込みの方法は、1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入すること、および所望の組込み部位に特異的なDNA結合ドメインを含むTALEN発現カセットを細胞に導入して、TALEN媒介性挿入を可能にすることを含む。別の実施形態では、細胞中での標的化組込みの方法は、1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入すること、および所望の組込み部位に特異的なガイド配列を含むgRNAを細胞に導入して、Cpf1媒介性挿入を可能にすることを含む。別の実施形態では、細胞中での標的化組込みの方法は、1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入すること、および所望の組込み部位に特異的なガイド配列を含むgRNAを細胞に導入して、Cas9媒介性挿入を可能にすることを含む。さらに別の実施形態では、細胞中での標的化組込みの方法は、一对のDICEリコンビナーゼの1つまたは複数のatt部位を含む構築物を、細胞中の所望の組込み部位に導入すること、1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入すること、およびDICEリコンビナーゼのための発現カセットを導入して、DICE媒介性標的化組込みを可能にすることを含む。

【0233】

標的化組込みのための部位としては、限定されるものではないが、理論的には、宿主細胞または生物に対する有害効果なしに、新しく組み込まれたDNAの予測可能な発現を提供することができる、ヒトゲノムの遺伝子内または遺伝子外領域であるゲノムセーフハーバーが挙げられる。ある特定の実施形態では、標的化組込みのためのゲノムセーフハーバーは、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、GAPDH、TCRおよびRUNX1遺伝子からなる群から選択される遺伝子の1つまたは複数の遺伝子座である。

【0234】

他の実施形態では、標的化組込みのための部位は、挿入部位での内因性遺伝子の欠失または発現の低下のために選択される。本明細書で使用される場合、遺伝子の発現に関する用語「欠失」とは、遺伝子の発現を無効化する任意の遺伝子改変を指す。遺伝子の発現の「欠失」の例としては、例えば、遺伝子の発現を無効化する、遺伝子のDNA配列の除去または欠失、遺伝子の遺伝子座での外因性ポリヌクレオチド配列の挿入、および遺伝子内の1つまたは複数の置換が挙げられる。

【0235】

標的欠失のための遺伝子としては、限定されるものではないが、主要組織適合性複合体(MHC)クラスIおよびMHCクラスIIタンパク質の遺伝子が挙げられる。複数のMHCクラスIおよびクラスIIタンパク質は、同種異系拒絶問題を回避するために、同種異系レシピエントにおける組織適合性について一致しなければならない。MHCクラスI欠損、またはMHCクラスII欠損、またはその両方を含む「MHC欠損」とは、減少または低下したレベルが、他の細胞または合成法によって天然に検出可能なレベルより低くなるような、MHCクラスIIタンパク質ヘテロ二量体および/またはMHCクラスIIヘテロ二量体を含む完全なMHC複合体の表面発現を欠く、または最早維持しない、またはそのレベルが低下している細胞を指す。MHCクラスI欠損を、MHCクラスI遺伝子座(染色体6p21)の任意の領域の機能的欠失、または限定されるものではないが、ベータ-2ミクログロブリン(B2M)遺伝子、TAP1遺伝子、TAP2遺伝子およびタパ

シン遺伝子を含む1つまたは複数のMHCクラスI関連遺伝子の欠失またはその発現レベルの低下によって達成することができる。例えば、B2M遺伝子は、全てのMHCクラスIヘテロ二量体の細胞表面発現にとって必須の共通サブユニットをコードする。B2Mヌル細胞は、MHC-I欠損である。MHCクラスII欠損を、限定されるものではないが、RFXANK、CIITA、RFX5およびRFXAPを含むMHC-II関連遺伝子の機能的欠失または低下によって達成することができる。CIITAは、クラスIIタンパク質発現にとって必要とされる転写因子RFX5の活性化によって機能する転写コアクチベーターである。CIITAヌル細胞は、MHC-II欠損である。ある特定の実施形態では、1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、RFXANK、CIITA、RFX5およびRFXAP遺伝子からなる群から選択される遺伝子の1つまたは複数の遺伝子座に組み込むことによって、組込みを有する遺伝子を欠失させるか、またはその発現を低下させる。

10

【0236】

標的欠失のための他の遺伝子としては、限定されるものではないが、組換え活性化遺伝子1および2(RAG1およびRAG2)が挙げられる。RAG1およびRAG2は、組換えシグナル配列(RSS)とコードセグメントとの間の境界に二本鎖切断を導入することによってV(D)J組換えを開始させるタンパク質複合体の部分をコードする。RAG1/RAG2遺伝子の欠失またはその発現レベルの低下は、細胞中でのさらなるTCR再構成を防止し、かくして、自己反応性TCRの予想外の生成を防止する(Minagawa et al., Cell Stem Cell. 2018 Dec 6;23(6):850-858)。

20

【0237】

ある特定の実施形態では、1つまたは複数の遺伝子座のうち少なくとも1つが、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、RFXANK、CIITA、RFX5およびRFXAP遺伝子からなる群から選択される遺伝子などのMHC遺伝子のものであるという条件で、外因性ポリヌクレオチドは、細胞の染色体上の1つまたは複数の遺伝子座に組み込まれ、好ましくは、1つまたは複数の遺伝子座は、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、GAPDH、RUNX1、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、CIITA、RFX5、RFXAP、TRAC、TRBC1、TRBC2、RAG1、RAG2、NKG2A、NKG2D、CD38、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、またはTIGIT遺伝子からなる群から選択される遺伝子のものである。好ましくは、1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドは、ベータ-2ミクログロブリン(B2M)遺伝子、TAP1遺伝子、TAP2遺伝子またはタパシン遺伝子などのMHCクラスI関連遺伝子の遺伝子座；およびRFXANK、CIITA、RFX5、RFXAP、またはCIITA遺伝子などのMHC-II関連遺伝子の遺伝子座；および必要に応じてさらに、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、GAPDH、TCRおよびRUNX1遺伝子からなる群から選択されるセーフハーバー遺伝子の遺伝子座に組み込まれる。より好ましくは、1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドは、CIITA、AAVS1およびB2M遺伝子の遺伝子座に組み込まれる。

30

【0238】

ある特定の実施形態では、(i)キメラ抗原受容体(CAR)をコードする外因性ポリヌクレオチドは、AAVS1遺伝子の遺伝子座に組み込まれる；(ii)人工細胞死ポリペプチドをコードする外因性ポリペプチドは、CIITA遺伝子の遺伝子座に組み込まれる；ならびに(iii)ヒト白血球抗原E(HLA-E)および/またはヒト白血球抗原G(HLA-G)をコードする外因性ポリペプチドは、B2M遺伝子の遺伝子座に組み込まれる；ここで、外因性ポリヌクレオチドの組込みは、CIITAおよびB2M遺伝子を欠失させるか、またはその発現を低下させる。

40

【0239】

VII. 誘導体細胞

別の態様では、本発明は、本出願のiPSCの分化に由来する細胞、誘導体細胞に関する

50

る。上記のように、i P S C 細胞中に導入されたゲノム編集は、誘導体細胞中で保持される。i P S C 分化から得られる誘導体細胞のある特定の実施形態では、誘導体細胞は、T 細胞である。他の実施形態では、誘導体細胞は、C D 3 4 + 造血前駆細胞 (H P C) である。

【 0 2 4 0 】

ある特定の実施形態では、本出願は、特定の H L A クラス I (H L A - I) アレルのコンテキストにおいて非ヒトペプチドの認識について拘束される再構成された T 細胞受容体 (T C R) をコードする 1 つまたは複数のポリヌクレオチド、およびキメラ抗原受容体 (C A R) をコードする外因性ポリヌクレオチド；ならびに以下のさらなる特徴：

- (a) 人工細胞死ポリペプチドをコードする外因性ポリヌクレオチド；
 - (b) B 2 M、T A P 1、T A P 2、タパシン、R F X A N K、C I I T A、R F X 5 および R F X A P 遺伝子のうちの 1 つもしくは複数の欠失もしくは発現低下；
 - (c) R A G 1 および R A G 2 遺伝子の欠失もしくは発現低下；
 - (d) F c R I I I (C D 1 6) の天然に存在しないバリエーションをコードする外因性ポリヌクレオチド；
 - (e) インターロイキン 1 5 (I L - 1 5) および / もしくは インターロイキン (I L - 1 5) 受容体またはそのバリエーションもしくはトランケーションをコードする外因性ポリヌクレオチド；
 - (f) 構成的に活性なインターロイキン 7 (I L - 7) 受容体もしくはそのバリエーションをコードする外因性ポリヌクレオチド；
 - (g) インターロイキン 1 2 (I L - 1 2) もしくは インターロイキン 2 1 (I L - 2 1) またはそのバリエーションをコードする外因性ポリヌクレオチド；
 - (h) ヒト白血球抗原 E (H L A - E) および / もしくは ヒト白血球抗原 G (H L A - G) をコードする外因性ポリヌクレオチド；
 - (i) 白血球表面分化抗原群 C D 4 7 (C D 4 7) および / もしくは C D 2 4 をコードする外因性ポリヌクレオチド；または
 - (j) P S M A もしくは H S V - t k などの、1 つもしくは複数のイメージングもしくはリポータータンパク質をコードする外因性ポリヌクレオチド
- のうちの 1 つまたは複数を含む人工多能性幹細胞 (i P S C) に由来する C D 3 4 + 造血前駆細胞 (H P C) も提供する。

【 0 2 4 1 】

ある特定の実施形態では、本出願は、特定の H L A クラス I (H L A - I) アレルのコンテキストにおいて非ヒトペプチドの認識について拘束される再構成された T 細胞受容体 (T C R) をコードする 1 つまたは複数のポリヌクレオチド、およびキメラ抗原受容体 (C A R) をコードする外因性ポリヌクレオチド；ならびに以下のさらなる特徴：

- (a) 人工細胞死ポリペプチドをコードする外因性ポリヌクレオチド；
- (b) B 2 M、T A P 1、T A P 2、タパシン、R F X A N K、C I I T A、R F X 5 および R F X A P 遺伝子のうちの 1 つもしくは複数の欠失もしくは発現低下；
- (c) R A G 1 および R A G 2 遺伝子の欠失もしくは発現低下；
- (d) F c R I I I (C D 1 6) の天然に存在しないバリエーションをコードする外因性ポリヌクレオチド；
- (e) インターロイキン 1 5 (I L - 1 5) および / もしくは インターロイキン (I L - 1 5) 受容体またはそのバリエーションもしくはトランケーションをコードする外因性ポリヌクレオチド；
- (f) 構成的に活性なインターロイキン 7 (I L - 7) 受容体もしくはそのバリエーションをコードする外因性ポリヌクレオチド；
- (g) インターロイキン 1 2 (I L - 1 2) もしくは インターロイキン 2 1 (I L - 2 1) またはそのバリエーションをコードする外因性ポリヌクレオチド；
- (h) ヒト白血球抗原 E (H L A - E) および / もしくは ヒト白血球抗原 G (H L A - G) をコードする外因性ポリヌクレオチド；

(i) 白血球表面分化抗原群 C D 4 7 (C D 4 7) および / もしくは C D 2 4 をコードする外因性ポリヌクレオチド ; または

(j) P S M A もしくは H S V - t k などの、 1 つもしくは複数のイメージングもしくはリポータータンパク質をコードする外因性ポリヌクレオチド

のうちの 1 つまたは複数を含む T 細胞を提供する。

【 0 2 4 2 】

ある特定の実施形態では、再構成された T C R は、再構成された T C R を有しない T 細胞よりも、細胞分裂刺激後に分化した T 細胞の拡大の増加を可能にする。

【 0 2 4 3 】

ある特定の実施形態では、 i P S C は、 T 細胞から再プログラミングされており、再構成された T C R は、 T 細胞に対して内因性である。 10

【 0 2 4 4 】

ある特定の実施形態では、 T C R は、組換え体である。

【 0 2 4 5 】

ある特定の実施形態では、 i P S C は、末梢血単核細胞 (P B M C)、好ましくは、 C D 3 4 + 造血幹細胞 (H S C) または T 細胞から再プログラミングされる。

【 0 2 4 6 】

ある特定の実施形態では、再構成された T C R は、インフルエンザ - A、エプスタイン・バーウイルス (E B V)、およびサイトメガロウイルス (C M V) からなる群から選択されるウイルスに由来する抗原に結合する。 20

【 0 2 4 7 】

ある特定の実施形態では、再構成 T C R をコードする 1 つまたは複数のポリヌクレオチドは、 T R A V 2 7 および T R A V 1 3 - 1 からなる群から選択される T C R 可変遺伝子 ; T R A J 4 1 および T R A J 3 7 からなる群から選択される T C R 連結遺伝子 ; ならびに T C R 定常遺伝子 T R A C を含む。

【 0 2 4 8 】

ある特定の実施形態では、再構成された T C R をコードする 1 つまたは複数のポリヌクレオチドは、鎖可変遺伝子 T R B V 1 9 ; T R B J 2 - 7、 T R B J 2 - 5、および T R B J 2 - 6 からなる群から選択される鎖可変遺伝子 ; T R B C 1 および T R B C 2 からなる群から選択される鎖定常遺伝子を含む。 30

【 0 2 4 9 】

ある特定の実施形態では、組換え再構成 T C R は、インフルエンザ - A、エプスタイン・バーウイルス (E B V)、およびサイトメガロウイルス (C M V) からなる群から選択されるウイルスに由来する抗原に結合する。

【 0 2 5 0 】

ある特定の実施形態では、 C D 3 4 + または T 細胞は、ヒト白血球抗原 E (H L A - E) および / またはヒト白血球抗原 G (H L A - G) をコードする外因性ポリヌクレオチドを含む。

【 0 2 5 1 】

ある特定の実施形態では、少なくとも 1 つの外因性ポリヌクレオチドが、 B 2 M、 T A P 1、 T A P 2、タパシン、 R F X A N K、 C I I T A、 R F X 5 および R F X A P 遺伝子からなる群から選択される遺伝子の遺伝子座に組み込まれることによって、遺伝子の欠失または発現低下をもたらすという条件で、 1 つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドは、 A A V S 1、 C C R 5、 R O S A 2 6、コラーゲン、 H T R P、 H 1 1、 G A P D H、 R U N X 1、 B 2 M、 T A P 1、 T A P 2、タパシン、 N L R C 5、 C I I T A、 R F X A N K、 C I I T A、 R F X 5、 R F X A P、 T R A C、 T R B C 1、 T R B C 2、 R A G 1、 R A G 2、 N K G 2 A、 N K G 2 D、 C D 3 8、 C I S、 C B L - B、 S O C S 2、 P D 1、 C T L A 4、 L A G 3、 T I M 3、または T I G I T 遺伝子からなる群から選択される細胞の染色体上の 1 つまたは複数の遺伝子座に組み込まれる。ある特定の実施形態では、 1 つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドは、 C I I T A、 A A V S 1 および B 40 50

2 M 遺伝子の遺伝子座に組み込まれる。

【0252】

ある特定の実施形態では、キメラ抗原受容体 (CAR) をコードする外因性ポリヌクレオチドは、AAVS1 遺伝子の遺伝子座に組み込まれる；人工細胞死ポリペプチドをコードする外因性ポリペプチドは、CIITA 遺伝子の遺伝子座に組み込まれる；ならびにヒト白血球抗原 E (HLA-E) および / またはヒト白血球抗原 G (HLA-G) をコードする外因性ポリペプチドは、B2M 遺伝子の遺伝子座に組み込まれる；ここで、外因性ポリヌクレオチドの組み込みは、CIITA および B2M 遺伝子を欠失させるか、またはその発現を低下させる。

【0253】

また、(i) 配列番号 61 のアミノ酸配列を有するキメラ抗原受容体 (CAR) をコードする外因性ポリヌクレオチド；(ii) 配列番号 71 のアミノ酸配列を有するアポトーシス誘導ドメインを含む人工細胞死ポリペプチドをコードする外因性ポリヌクレオチド；(iii) 配列番号 86 のアミノ酸配列を有する TCR、および配列番号 87 のアミノ酸配列を有する TCR を含む再構成された T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子座をコードするポリヌクレオチド；ならびに(iv) 必要に応じて、配列番号 66 のアミノ酸配列を有するヒト白血球抗原 E (HLA-E) をコードする外因性ポリヌクレオチドであって、AAVS1、CIITA および B2M 遺伝子の遺伝子座に組み込まれることによって、CIITA および B2M を欠失させるか、またはその発現を低下させる、1 つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含む T 細胞も提供される。

【0254】

VIII . 分化の方法

また、本出願の T 細胞を製造する方法であって、細胞分化のための条件下で本出願の iPSC 細胞を分化させることによって、T 細胞を得ることを含む方法も提供される。

【0255】

本出願の iPSC を、当業界で公知の任意の方法によって分化させることができる。例示的な方法は、米国特許第 8,372,642 号明細書、同第 8,574,179 号明細書、同第 10,100,282 号明細書、同第 10,865,381 号明細書、国際公開第 2010/099539 号パンフレット、同第 2012/109208 号パンフレット、同第 2017/070333 号パンフレット、同第 2017/070337 号パンフレット、同第 2018/067836 号パンフレット、同第 2018/195175 号パンフレット、同第 2020/061256 号パンフレット、同第 2017/179720 号パンフレット、同第 2016/010148 号パンフレット、および同第 2018/048828 号パンフレットに記載されており、それぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。分化プロトコールは、フィーダー細胞を使用してもよいが、またはフィーダーフリーであってもよい。本明細書で使用される場合、「フィーダー細胞」または「フィーダー」は、フィーダー細胞は第 2 の細胞型の支援のための刺激、増殖因子および栄養素を提供するため、第 2 の型の細胞が増殖、拡大、または分化することができる環境を提供するために、第 2 の型の細胞と同時培養されるある型の細胞を記述する用語である。

【0256】

Notch シグナル伝達は、特に、前駆細胞が T 細胞運命に向かうのを駆動する重要な役割を果たしている。ヒト胸腺では、Notch ファミリータンパク質 DLL1、DLL4 および Jag2 (胸腺中の間質細胞によって発現される) は、受容体 Notch1 (初期胸腺細胞によって発現される) を介してシグナル伝達する。

【0257】

一般的な態様では、本出願は、再構成された TCR をコードするポリヌクレオチドを含む人工多能性幹細胞 (iPSC) 由来 CD34 + HPC などの、再構成された TCR をコードするポリヌクレオチドを含む CD34 + 造血前駆細胞 (HPC) を T 細胞に分化させる方法であって、デルタ様タンパク質 4 (DLL4) および Jagged2 (JAG2) を含み、必要に応じて、フィブロネクチンタンパク質またはその断片、SCF、FLT3

10

20

30

40

50

L、TPO、および/またはIL-7をさらに含む培地中でCD34+HPCを培養することを含む方法も提供する。ある特定の実施形態では、DLL4およびJAG2タンパク質は、例えば、プロテインGコーティングの存在下または非存在下でポリドーパミンを使用して、細胞培養プレート上に固定される。ある特定の実施形態では、細胞は、21日、28、35日などの約21~約35日、またはその間の任意の日数にわたって、DLL4およびJAG2を含む培地中で培養される。

【0258】

ある特定の実施形態では、組換えDLL4は、バリエーションDLL4である。DLL4バリエーションおよび配列の非限定例は、表2に提供される。

【0259】

【表2】

表2

| 名称 | 説明 | 配列番号 |
|---------------|---|------|
| DLL4-Fc 融合物 1 | 野生型ヒトDLL4、Fc融合タンパク質としてN末端からEGF5まで | 90 |
| DLL4-Fc 融合物 2 | 野生型ヒトDLL4、Fc融合タンパク質としてN末端からEGF2まで | 91 |
| DLL4-Fc 融合物 3 | 野生型ヒトDLL4、Fc融合タンパク質として完全なECD | 92 |
| DLL4-Fc 融合物 4 | バリエーションヒトDLL4(G28S、F107L、L206P)、Fc融合タンパク質としてN末端からEGF5まで | 93 |
| DLL4-Fc 融合物 5 | バリエーションヒトDLL4、Fc融合タンパク質としてN末端からEGF2まで | 94 |
| DLL4-Fc 融合物 6 | バリエーションヒトDLL4、Fc融合タンパク質として完全なECD | 95 |

細胞外ドメイン(ECD);上皮増殖因子(EGF)リピート;N=アミノ末端

【0260】

ある特定の実施形態では、方法は、インターロイキン-2(IL-2)、IL-7、およびIL-15からなる群から選択される1つまたは複数のサイトカインを含む培地中で細胞を培養することをさらに含む。ある特定の実施形態では、細胞は、1~35日間にわたってサイトカインと共に培養される。特定の実施形態では、方法は、IL-2、IL-7およびIL-15を含む培地中で細胞を培養することを含む。特定の実施形態では、IL-2、IL-7およびIL-15は、分化の21日目に培地に添加される。

【0261】

ある特定の実施形態では、方法は、抗CD3抗体を含む培地中で細胞を培養することをさらに含む。ある特定の実施形態では、抗CD3抗体は、例えば、ポリスチレンなどのプラスチック材料上への直接吸収によって、細胞培養プレート上に固定される。抗CD3抗体の非限定例は、それぞれ、Kung et al., Science, 1979 Oct 19;206(4416):347-9およびCallard et al., Clin Exp Immunol, 1981 Mar;43(3):497-505に記載されたOKT3およびUCHT1であり、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。ある特定の実施形態では、抗CD3抗体は、OKT3である。ある特定の実施形態では、抗CD3抗体は、UCHT1である。

【0262】

また、再構成されたTCRを含む人工多能性幹細胞(iPSC)由来CD34+造血前駆細胞(HPC)をT細胞に分化させる方法であって、

(a)デルタ様タンパク質4(DLL4)および組換えJagged2(JAG2)を含み、必要に応じて、フィブロネクチンタンパク質またはその断片をさらに含み、必要に応じて、フィブロネクチンタンパク質またはその断片、SCF、FLT3L、TPO、および/またはIL-7をさらに含む培地中で細胞を培養すること;

(b) インターロイキン - 2 (I L - 2)、 I L - 7、および I L - 1 5 を含む培地中で細胞を培養すること；ならびに

(c) 抗 C D 3 抗体、好ましくは、 O K T 3 または U C H T 1 を含む培地中で細胞を培養すること

を含む方法も提供される。

【 0 2 6 3 】

ある特定の実施形態では、細胞は、 2 1 日、 2 8 日、 3 5 日などの約 2 1 ~ 約 3 5 日、またはその間の任意の日数にわたって、 D L L 4 および J A G 2 を含む培地中で培養される。

【 0 2 6 4 】

ある特定の実施形態では、細胞は、分化の 0 日目から約 2 1 日目まで D L L 4 および J A G 2 を含む培地中で培養される。

【 0 2 6 5 】

ある特定の実施形態では、細胞は、分化の 2 1 日目から約 2 8 日目まで I L - 2、 I L - 7、および I L - 1 5 を含む培地中で培養される。

【 0 2 6 6 】

ある特定の実施形態では、細胞は、分化の 2 1 日目から約 2 8 日目まで O K T 3 または U C H T 1 などの抗 C D 3 抗体を含む培地中で培養される。

【 0 2 6 7 】

ある特定の実施形態では、細胞は、分化の 2 1 日目から約 2 8 日目まで、 I L - 2、 I L - 7、および I L - 1 5、ならびに O K T 3 または U C H T 1 などの抗 C D 3 抗体を含む培地中で培養される。

【 0 2 6 8 】

I X . ポリヌクレオチド、ベクター、および宿主細胞

(1) C A R をコードする核酸

別の一般的な態様では、本発明は、本出願の実施形態による本発明にとって有用なキメラ抗原受容体 (C A R) をコードする単離された核酸に関する。タンパク質のアミノ酸配列を変化させることなく、 C A R のコード配列を変化させる (例えば、置き換える、欠失させる、挿入するなど) ことができることが当業者によって理解されるであろう。したがって、当業者であれば、タンパク質のアミノ酸配列を変化させることなく本出願の C A R をコードする核酸配列を変更することができることを理解するであろう。

【 0 2 6 9 】

ある特定の実施形態では、単離された核酸は、 C D 1 9 を標的とする C A R をコードする。特定の実施形態では、 C A R をコードする単離された核酸は、配列番号 6 2 と少なくとも 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 % または 1 0 0 % などの少なくとも 9 0 % 同一であるポリヌクレオチド配列、好ましくは、配列番号 6 2 のポリヌクレオチド配列を含む。

【 0 2 7 0 】

別の一般的な態様では、本出願は、本出願の実施形態による本発明にとって有用な C A R をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターを提供する。プラスミド、コスミド、ファージベクターまたはウイルスベクターなどの、本開示を考慮した当業者には公知の任意のベクターを使用することができる。一部の実施形態では、ベクターは、プラスミドなどの組換え発現ベクターである。ベクターは、発現ベクターの従来機能を確立するための任意のエレメント、例えば、プロモーター、リボソーム結合エレメント、ターミネーター、エンハンサー、選択マーカー、および複製起点を含んでもよい。プロモーターは、構成的、誘導的、または抑制的プロモーターであってもよい。核酸を細胞に送達することができるいくつかの発現ベクターが当業界で公知であり、細胞中での C A R の産生のために本明細書で使用することができる。従来クローニング技術または人工遺伝子合成を使用して、本出願の実施形態による組換え発現ベクターを生成することができる。

【 0 2 7 1 】

10

20

30

40

50

特定の態様では、本出願は、本出願の実施形態による本発明にとって有用なC A Rの標的化組込みのためのベクターを提供する。ある特定の実施形態では、ベクターは、5'から3'の順に、(a)プロモーター；(b)本出願の実施形態によるC A Rをコードするポリヌクレオチド配列；および(c)ターミネーター/ポリアダニル化シグナルを有する外因性ポリヌクレオチドを含む。

【0272】

ある特定の実施形態では、プロモーターは、C A Gプロモーターである。ある特定の実施形態では、C A Gプロモーターは、配列番号63と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または100%などの少なくとも90%同一であるポリヌクレオチド配列を含む。他のプロモーターを使用することもでき、その例としては、限定されるものではないが、E F 1 a、U B C、C M V、S V 4 0、P G K 1、およびヒトベータアクチンが挙げられる。

10

【0273】

ある特定の実施形態では、ターミネーター/ポリアダニル化シグナルは、S V 4 0シグナルである。ある特定の実施形態では、S V 4 0シグナルは、配列番号64と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または100%などの少なくとも90%同一であるポリヌクレオチド配列を含む。他のターミネーター配列を使用することもでき、その例としては、限定されるものではないが、B G H、h G H、およびP G Kが挙げられる。

【0274】

ある特定の実施形態では、C A Rをコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号62と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または100%などの少なくとも90%同一であるポリヌクレオチド配列を含む。

20

【0275】

一部の実施形態では、ベクターは、外因性ポリヌクレオチドを挟む左側ホモロジーマームおよび右側ホモロジーマームをさらに含む。本明細書で使用される場合、「左側ホモロジーマーム」および「右側ホモロジーマーム」は、外因性ポリヌクレオチドを挟み、外因性ポリヌクレオチドの特殊化された染色体遺伝子座への組込みを容易にする一对の核酸配列を指す。左側および右側ホモロジーマームの配列を、目的の組込み部位に基づいて設計することができる。一部の実施形態では、左側または右側ホモロジーマームは、組込み部位の左側または右側配列と相同である。

30

【0276】

ある特定の実施形態では、左側ホモロジーマームは、配列番号80と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または100%などの少なくとも90%同一であるポリヌクレオチド配列を含む。ある特定の実施形態では、右側ホモロジーマームは、配列番号81と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または100%などの少なくとも90%同一であるポリヌクレオチド配列を含む。

【0277】

特定の実施形態では、ベクターは、配列番号82と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または100%などの少なくとも85%同一であるポリヌクレオチド配列、好ましくは、配列番号82のポリヌクレオチド配列を含む。

40

【0278】

(2) 不活化された細胞表面受容体をコードする核酸

別の一般的な態様では、本発明は、本出願の実施形態による本発明にとって有用な不活化された細胞表面受容体をコードする単離された核酸に関する。タンパク質のアミノ酸配列を変化させることなく、不活化された細胞表面受容体のコード配列を変化させる(例えば、置き換える、欠失させる、挿入するなど)ことができることが当業者によって理解されるであろう。したがって、当業者であれば、タンパク質のアミノ酸配列を変化させるこ

50

となく本出願の不活化された細胞表面受容体をコードする核酸配列を変更することができることを理解するであろう。

【0279】

ある特定の実施形態では、単離された核酸は、モノクローナル抗体特異的エピトープ、およびサイトカインを含むものなどの、本明細書に記載の任意の不活化された細胞表面受容体をコードし、ここで、モノクローナル抗体特異的エピトープとサイトカインとは、自己プロテアーゼペプチド配列によって作動可能に連結されている。

【0280】

一部の実施形態では、単離された核酸は、イブリツモマブ、チウキセタン、ムロモナブ - CD3、トシツモマブ、アブシキシマブ、バシリキシマブ、ブレンツキシマブベドチン、セツキシマブ、インフリキシマブ、リツキシマブ、アレムツズマブ、ベバシズマブ、セルトリズマブペゴール、ダクリズマブ、エクリズマブ、エファリズマブ、ゲムツズマブ、ナタリズマブ、オマリズマブ、パリビズマブ、ポラツズマブベドチン、ラニビズマブ、トシリズマブ、トラスツズマブ、ベドリズマブ、アダリムマブ、ペリムマブ、カナキヌマブ、デノスマブ、ゴリムマブ、イピリムマブ、オフアツムマブ、パニツムマブ、またはウステキヌマブなどの抗体によって特異的に認識されるエピトープを含む、不活化された細胞表面受容体をコードする。

10

【0281】

ある特定の実施形態では、単離された核酸は、トランケートされた上皮増殖因子 (t E G F R) バリエーションを有する不活化された細胞表面受容体をコードする。好ましくは、不活化された細胞表面受容体は、セツキシマブ、マツズマブ、ネシツムマブまたはパニツムマブ、好ましくは、セツキシマブによって特異的に認識されるエピトープを含む。

20

【0282】

ある特定の実施形態では、単離された核酸は、ポラツズマブベドチンによって特異的に認識されるエピトープなどの、CD79bの1つまたは複数のエピトープを有する不活化された細胞表面受容体をコードする。

【0283】

ある特定の実施形態では、単離された核酸は、リツキシマブによって特異的に認識されるエピトープなどの、CD20の1つまたは複数のエピトープを有する不活化された細胞表面受容体をコードする。

30

【0284】

ある特定の実施形態では、単離された核酸は、トラスツズマブによって特異的に認識されるエピトープなどの、Her2受容体の1つまたは複数のエピトープを有する不活化された細胞表面受容体をコードする。

【0285】

ある特定の実施形態では、自己プロテアーゼペプチド配列は、ブタテッシュウウイルス - 1 2 A (P 2 A) である。

【0286】

ある特定の実施形態では、トランケートされた上皮増殖因子 (t E G F R) バリエーションは、配列番号71のアミノ酸配列に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる。

40

【0287】

ある特定の実施形態では、ポラツズマブベドチンによって特異的に認識されるモノクローナル抗体特異的エピトープは、配列番号74と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%などの少なくとも90%同一であるアミノ酸配列からなる。

【0288】

ある特定の実施形態では、リツキシマブによって特異的に認識されるモノクローナル抗体特異的エピトープは、配列番号75と少なくとも90%、91%、92%、93%、9

50

4%、95%、96%、97%、98%、99%または100%などの少なくとも90%同一であるアミノ酸配列からなる。

【0289】

ある特定の実施形態では、トラスツズマブによって特異的に認識されるモノクローナル抗体特異的エピトープは、配列番号76と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%などの少なくとも90%同一であるアミノ酸配列からなる。

【0290】

ある特定の実施形態では、自己プロテアーゼペプチドは、配列番号72のアミノ酸配列に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。

10

【0291】

別の一般的な態様では、本出願は、本出願の実施形態による本発明にとって有用な不活化された細胞表面受容体をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターを提供する。プラスミド、コスミド、ファージベクターまたはウイルスベクターなどの、本開示を考慮した当業者には公知の任意のベクターを使用することができる。一部の実施形態では、ベクターは、プラスミドなどの組換え発現ベクターである。ベクターは、発現ベクターの従来の機能を確立するための任意のエLEMENT、例えば、プロモーター、リボソーム結合ELEMENT、ターミネーター、エンハンサー、選択マーカー、および複製起点を含んでもよい。プロモーターは、構成的、誘導的、または抑制的プロモーターであってもよい。核酸を細胞に送達することができるいくつかの発現ベクターが当業界で公知であり、細胞中での不活化された細胞表面受容体の産生のために本明細書で使用することができる。従来のクローニング技術または人工遺伝子合成を使用して、本出願の実施形態による組換え発現ベクターを生成することができる。

20

【0292】

特定の態様では、本出願は、本出願の実施形態による本発明にとって有用な不活化された細胞表面受容体の標的化組込みのためのベクターを提供する。ある特定の実施形態では、ベクターは、5'から3'の順に、(a)プロモーター；(b)トランケートされた上皮増殖因子(tEGFR)バリエーションを含む不活化された細胞表面受容体などの、不活化された細胞表面受容体をコードするポリヌクレオチド配列を有する外因性ポリヌクレオチドを含む。

30

【0293】

ある特定の実施形態では、プロモーターは、CAGプロモーターである。ある特定の実施形態では、CAGプロモーターは、配列番号63と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または100%などの少なくとも90%同一であるポリヌクレオチド配列を含む。他のプロモーターを使用することもでき、その例としては、限定されるものではないが、EF1a、UBC、CMV、SV40、PGK1、およびヒトベータアクチンが挙げられる。

【0294】

ある特定の実施形態では、ターミネーター/ポリアデニル化シグナルは、SV40シグナルである。ある特定の実施形態では、SV40シグナルは、配列番号64と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または100%などの少なくとも90%同一であるポリヌクレオチド配列を含む。他のターミネーター配列を使用することもでき、その例としては、限定されるものではないが、BGH、hGH、およびPGKが挙げられる。

40

【0295】

一部の実施形態では、ベクターは、外因性ポリヌクレオチドを挟む左側ホモロジーマームおよび右側ホモロジーマームをさらに含む。

【0296】

(3)HLA構築物をコードする核酸

50

別の一般的な態様では、本発明は、本出願の実施形態による本発明にとって有用なHLA構築物をコードする単離された核酸に関する。タンパク質のアミノ酸配列を変化させることなく、HLA構築物のコード配列を変化させる（例えば、置き換える、欠失させる、挿入するなど）ことができることが当業者によって理解されるであろう。したがって、当業者であれば、タンパク質のアミノ酸配列を変化させることなく本出願のHLA構築物をコードする核酸配列を変更することができることを理解するであろう。

【0297】

ある特定の実施形態では、単離された核酸は、成熟B2M、および/または成熟HLA-Eのコード配列などの、HLAコード配列に作動可能に連結された、HLA-Gシグナルペプチドなどのシグナルペプチドを含むHLA構築物をコードする。いくつかの実施形態では、HLAコード配列は、4X GGGGSリンカーによって作動可能に連結されているHLA-GおよびB2M、および/または3X GGGGSリンカーによって作動可能に連結されているB2MおよびHLA-Eをコードする。特定の実施形態では、HLA構築物をコードする単離された核酸は、配列番号67と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または100%などの少なくとも90%同一であるポリヌクレオチド配列、好ましくは、配列番号67のポリヌクレオチド配列を含む。別の実施形態では、HLA構築物をコードする単離された核酸は、配列番号70と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または100%などの少なくとも90%同一であるポリヌクレオチド配列、好ましくは、配列番号70のポリヌクレオチド配列を含む。

10

20

【0298】

別の一般的な態様では、本出願は、本出願の実施形態による本発明にとって有用なHLA構築物をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターを提供する。プラスミド、コスミド、ファージベクターまたはウイルスベクターなどの、本開示を考慮した当業者には公知の任意のベクターを使用することができる。一部の実施形態では、ベクターは、プラスミドなどの組換え発現ベクターである。ベクターは、発現ベクターの従来機能を確立するための任意のエLEMENT、例えば、プロモーター、リボソーム結合ELEMENT、ターミネーター、エンハンサー、選択マーカー、および複製起点を含んでもよい。プロモーターは、構成的、誘導的、または抑制的プロモーターであってもよい。核酸を細胞に送達することができるいくつかの発現ベクターが当業界で公知であり、細胞中でのHLA構築物の産生のために本明細書で使用することができる。従来クロニング技術または人工遺伝子合成を使用して、本出願の実施形態による組換え発現ベクターを生成することができる。

30

【0299】

特定の態様では、本出願は、本出願の実施形態による本発明にとって有用なHLA構築物の標的化組込みのためのベクターを提供する。ある特定の実施形態では、ベクターは、5'から3'の順に、(a)プロモーター；(b)HLA構築物をコードするポリヌクレオチド配列；および(c)ターミネーター/ポリアデニル化シグナルを有する外因性ポリヌクレオチドを含む。

【0300】

ある特定の実施形態では、プロモーターは、CAGプロモーターである。ある特定の実施形態では、CAGプロモーターは、配列番号63と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または100%などの少なくとも90%同一であるポリヌクレオチド配列を含む。他のプロモーターを使用することもでき、その例としては、限定されるものではないが、EF1a、UBC、CMV、SV40、PGK1、およびヒトベータアクチンが挙げられる。

40

【0301】

ある特定の実施形態では、ターミネーター/ポリアデニル化シグナルは、SV40シグナルである。ある特定の実施形態では、SV40シグナルは、配列番号64と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または100

50

0%などの少なくとも90%同一であるポリヌクレオチド配列を含む。他のターミネーター配列を使用することもでき、その例としては、限定されるものではないが、BGH、hGH、およびPGKが挙げられる。

【0302】

ある特定の実施形態では、HLA構築物をコードするポリヌクレオチド配列は、HLA-Gシグナルペプチドなどのシグナルペプチド、成熟B2M、および成熟HLA-Eを含み、ここで、HLA-GおよびB2Mは、4X GGGGSリンカー（配列番号31）によって作動可能に連結されており、B2M導入遺伝子およびHLA-Eは、3X GGGGSリンカー（配列番号25）によって作動可能に連結されている。特定の実施形態では、HLA構築物は、配列番号67と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または100%などの少なくとも90%同一であるポリヌクレオチド配列、好ましくは、配列番号67のポリヌクレオチド配列を含む。別の実施形態では、HLA構築物は、配列番号70と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または100%などの少なくとも90%同一であるポリヌクレオチド配列、好ましくは、配列番号70のポリヌクレオチド配列を含む。

10

【0303】

一部の実施形態では、ベクターは、外因性ポリヌクレオチドを挟む左側ホモロジーマームおよび右側ホモロジーマームをさらに含む。

【0304】

ある特定の実施形態では、左側ホモロジーマームは、配列番号77と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または100%などの少なくとも90%同一であるポリヌクレオチド配列を含む。ある特定の実施形態では、右側ホモロジーマームは、配列番号78と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または100%などの少なくとも90%同一であるポリヌクレオチド配列を含む。

20

【0305】

特定の実施形態では、ベクターは、配列番号79と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または100%などの少なくとも85%同一であるポリヌクレオチド配列、好ましくは、配列番号79のポリヌクレオチド配列を含む。

30

【0306】

(4) 宿主細胞

別の一般的な態様では、本出願は、本出願のベクターおよび/または本出願の構築物をコードする単離された核酸を含む宿主細胞を提供する。本開示を考慮した当業者には公知の任意の宿主細胞を、本出願の外因性ポリヌクレオチドの組換え発現のために使用することができる。特定の実施形態によれば、組換え発現ベクターは、化学的トランスフェクション、ヒートショック、またはエレクトロポレーションなどの従来の方法によって宿主細胞中に形質転換され、そこで、それは組換え核酸が有効に発現されるように宿主細胞ゲノム中に安定的に組み込まれる。

40

【0307】

宿主細胞の例としては、例えば、目的のベクターもしくは構築物の産生にとって有用な本出願のベクターもしくは単離された核酸を含有する組換え細胞；または好ましくは、1つもしくは複数の染色体遺伝子座に組み込まれた、本出願の1つもしくは複数の単離された核酸を含有する操作されたiPSCもしくはその誘導体細胞が挙げられる。本出願の単離された核酸の宿主細胞はまた、本出願の1つまたは複数の単離された核酸を含む、T細胞などの免疫エフェクター細胞であってもよい。免疫エフェクター細胞を、本出願の操作されたiPSCの分化によって取得することができる。本開示を考慮して、当業界における任意の好適な方法を、分化のために使用することができる。免疫エフェクター細胞は、免疫エフェクター細胞に、本出願の1つまたは複数の単離された核酸をトランスフェクト

50

することによって取得することもできる。

【0308】

I X . 組成物

別の一般的な態様では、本出願は、本出願の単離されたポリヌクレオチド、本出願の宿主細胞および/またはiPSCもしくはその誘導体細胞を含む組成物を提供する。

【0309】

ある特定の実施形態では、組成物は、ペプチド、サイトカイン、チェックポイント阻害剤、マイトジェン、増殖因子、低分子RNA、dsRNA(二本鎖RNA)、siRNA、オリゴヌクレオチド、単核血液細胞、目的の1つもしくは複数のポリ核酸を含むベクター、抗体、化学療法剤もしくは放射性部分、または免疫調節薬(IMiD)からなる群から選択される1つまたは複数の治療剤をさらに含む。

10

【0310】

ある特定の実施形態では、組成物は、本出願の単離されたポリヌクレオチド、本出願の宿主細胞および/またはiPSCもしくはその誘導体細胞と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物である。本明細書で使用される場合、用語「医薬組成物」は、薬学的に許容される担体と共に、本出願の単離されたポリヌクレオチド、本出願の単離されたポリペプチド、本出願の宿主細胞、および/または本出願のiPSCもしくはその誘導体細胞を含む生成物を意味する。本出願のポリヌクレオチド、ポリペプチド、宿主細胞、および/またはiPSCもしくはその誘導体細胞ならびにそれらを含む組成物はまた、本明細書に記載の治療適用のための薬剤の製造においても有用である。

20

【0311】

本明細書で使用される場合、用語「担体」とは、任意の賦形剤、希釈剤、充填剤、塩、緩衝剤、安定剤、可溶化剤、油、脂質、脂質含有ベシクル、ミクロスフェア、リポソーム封入剤、または医薬製剤における使用について当業界で周知の他の材料を指す。担体、賦形剤または希釈剤の特徴は、特定の適用のための投与経路に依存することが理解されるであろう。本明細書で使用される場合、用語「薬学的に許容される担体」とは、本明細書に記載の組成物の有効性または本明細書に記載の組成物の生物活性を阻害しない非毒性材料を指す。特定の実施形態によれば、本開示を考慮すると、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、宿主細胞、および/またはiPSCもしくはその誘導体細胞における使用にとって好適な任意の薬学的に許容される担体を使用することができる。

30

【0312】

薬学的に活性な成分と、薬学的に許容される担体との製剤は、当業界において、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy(例えば、第21版(2005)、およびその後の版)で公知である。さらなる成分の非限定例としては、緩衝剤、希釈剤、溶媒、等張性調節剤、保存剤、安定剤、およびキレート剤が挙げられる。1つまたは複数の薬学的に許容される担体を、本出願の医薬組成物を製剤化する際に使用することができる。

【0313】

X . 使用方法

別の一般的な態様では、本出願は、それを必要とする対象における疾患または状態を処置する方法を提供する。方法は、それを必要とする対象に、治療有効量の本出願の細胞および/または本出願の組成物を投与することを含む。ある特定の実施形態では、疾患または状態は、がんである。がんは、例えば、固形がんまたは液体がんであってもよい。がんは、例えば、肺がん、胃がん、結腸がん、肝臓がん、腎細胞癌、膀胱尿路上皮癌、転移性黒色腫、乳がん、卵巣がん、子宮頸がん、頭頸部がん、膝がん、子宮内膜がん、前立腺がん、甲状腺がん、神経膠腫、グリア芽腫、および他の固形腫瘍、ならびに非ホジキンリンパ腫(NHL)、ホジキンリンパ腫/ホジキン病(HD)、急性リンパ性白血病(ALL)、慢性リンパ性白血病(CLL)、慢性骨髄性白血病(CML)、多発性骨髄腫(MM)、急性骨髄性白血病(AML)、および他の液体腫瘍からなる群から選択することができる。好ましい実施形態では、がんは、非ホジキンリンパ腫(NHL)である。

40

50

【0314】

本出願の実施形態によれば、組成物は、治療有効量の単離されたポリヌクレオチド、単離されたポリペプチド、宿主細胞、および/またはiPSCもしくはその誘導体細胞を含む。本明細書で使用される場合、用語「治療有効量」とは、対象において所望の生物学的応答または薬学的応答を惹起する活性成分または成分の量を指す。治療有効量を、記述される目的に関して、経験的に、および日常的な様式で決定することができる。

【0315】

本出願の細胞および/または本出願の医薬組成物を参照して本明細書で使用される場合、治療有効量とは、それを必要とする対象における免疫応答をモジュレートする細胞および/または医薬組成物の量を意味する。

10

【0316】

特定の実施形態によれば、治療有効量とは、以下の効果：(i) 処置しようとする疾患、障害もしくは状態の重症度またはそれと関連する症状を低減させる、もしくは改善する；(ii) 処置しようとする疾患、障害もしくは状態、またはそれと関連する症状の持続期間を低減させる；(iii) 処置しようとする疾患、障害もしくは状態、またはそれと関連する症状の進行を防止する；(iv) 処置しようとする疾患、障害もしくは状態、またはそれと関連する症状の退縮を引き起こす；(v) 処置しようとする疾患、障害もしくは状態、またはそれと関連する症状の発達もしくは開始を防止する；(vi) 処置しようとする疾患、障害もしくは状態、またはそれと関連する症状の再発を防止する；(vii) 処置しようとする疾患、障害もしくは状態、またはそれと関連する症状を有する対象の入院を減らす；(viii) 処置しようとする疾患、障害もしくは状態、またはそれと関連する症状を有する対象の入院の長さを減らす；(ix) 処置しようとする疾患、障害もしくは状態、またはそれと関連する症状を有する対象の生存を増加させる；(xi) 対象における処置しようとする疾患、障害もしくは状態、またはそれと関連する症状を阻害する、もしくは低減させる；および/または(xii) 別の療法の予防もしくは治療効果を増強する、もしくは改善する、のうちの1、2、3、4つ、またはそれ以上を達成するのに十分な療法の量を指す。

20

【0317】

特定の実施形態では、本発明の細胞は、処置される患者にとって同種異系である。

【0318】

治療有効量または投与量は、処置しようとする疾患、障害または状態、投与の手段、標的部位、対象の生理学的状態（例えば、年齢、体重、健康を含む）、対象がヒトまたは動物であるかどうか、投与される他の薬剤、および処置が予防的または治療的であるかなど、種々の因子に応じて変化してもよい。処置投与量は、安全性および有効性を最適化するために最適に滴定される。

30

【0319】

特定の実施形態によれば、本明細書に記載の組成物は、対象への意図される投与経路にとって好適であるように製剤化される。例えば、本明細書に記載の組成物を、静脈内、皮下、または筋肉内投与にとって好適であるように製剤化することができる。

【0320】

本出願の細胞および/または本出願の医薬組成物を、当業者には公知の任意の都合のよい様式で投与することができる。例えば、本出願の細胞を、エアロゾル吸入、注射、摂取、輸注、埋込み、および/または移植によって対象に投与することができる。本出願の細胞を含む組成物を、経動脈、皮下、皮内、腫瘍内、結節内、髄内、筋肉内、胸膜内、静脈内(i.v.)注射、または腹腔内に投与することができる。ある特定の実施形態では、本出願の細胞を、対象のリンパ球枯渇なしで、またはありで投与することができる。

40

【0321】

本出願の細胞を含む医薬組成物を、滅菌液体調製物、典型的には、細胞懸濁液との等張性水性溶液中で、または必要に応じて、典型的には、選択されたpHに緩衝化される、エマルジョン、分散体として提供することができる。組成物は、担体、例えば、細胞の完全

50

性および生存性にとって、ならびに細胞組成物の投与にとって好適な、水、食塩水、リン酸緩衝食塩水などを含んでもよい。

【0322】

本出願の細胞を、必要に応じて、様々な他の成分と共に好適な量の適切な溶媒中に組み入れることによって、滅菌注射溶液を調製することができる。そのような組成物は、細胞組成物と一緒に使用にとって、およびヒトなどの対象への投与にとって好適である、滅菌水、生理食塩水、グルコース、デキストロースなどの薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤を含んでもよい。細胞組成物を提供するための好適な緩衝剤は、当業界で周知である。使用されるビヒクル、希釈剤、または添加剤はいずれも、本出願の細胞の完全性および生存性の保存と適合する。

10

【0323】

本出願の細胞および/または本出願の医薬組成物を、任意の生理学的に許容されるビヒクル中で投与することができる。本出願の細胞を含む細胞集団は、精製された細胞集団を含んでもよい。当業者であれば、様々な周知の方法を使用して細胞集団中の細胞を容易に決定することができる。本出願の遺伝的に改変された細胞を含む細胞集団中の純度の範囲は、約50%~約55%、約55%~約60%、約60%~約65%、約65%~約70%、約70%~約75%、約75%~約80%、約80%~約85%、約85%~約90%、約90%~約95%、または約95%~約100%であってもよい。当業者であれば、投与量を容易に調整することができ、例えば、純度の低下は、投与量の増加を必要としない。

20

【0324】

本出願の細胞は一般に、細胞および/または細胞を含む医薬組成物が投与される対象の体重1キログラムあたりの細胞数(細胞/kg)に基づく用量として投与される。一般に、細胞用量は、投与の様式および位置に応じて、約 10^4 ~約 10^{10} 、例えば、約 10^5 ~約 10^9 、約 10^5 ~約 10^8 、約 10^5 ~約 10^7 、または約 10^5 ~約 10^6 細胞/kg体重の範囲である。一般に、全身投与の場合、本出願の免疫細胞が、腫瘍および/またはがんの領域において投与される領域投与よりも高い用量が使用される。例示的な用量範囲としては、限定されるものではないが、 1×10^4 ~ 1×10^8 、 $2 \sim 10^4$ ~ 1×10^8 、 3×10^4 ~ 1×10^8 、 4×10^4 ~ 1×10^8 、 5×10^4 ~ 6×10^8 、 7×10^4 ~ 1×10^8 、 8×10^4 ~ 1×10^8 、 9×10^4 ~ 1×10^8 、 1×10^5 ~ 1×10^8 、 1×10^5 ~ 9×10^7 、 1×10^5 ~ 8×10^7 、 1×10^5 ~ 7×10^7 、 1×10^5 ~ 6×10^7 、 1×10^5 ~ 5×10^7 、 1×10^5 ~ 4×10^7 、 1×10^5 ~ 4×10^7 、 1×10^5 ~ 3×10^7 、 1×10^5 ~ 2×10^7 、 1×10^5 ~ 1×10^7 、 1×10^5 ~ 9×10^6 、 1×10^5 ~ 8×10^6 、 1×10^5 ~ 7×10^6 、 1×10^5 ~ 6×10^6 、 1×10^5 ~ 5×10^6 、 1×10^5 ~ 4×10^6 、 1×10^5 ~ 4×10^6 、 1×10^5 ~ 3×10^6 、 1×10^5 ~ 2×10^6 、 1×10^5 ~ 1×10^6 、 2×10^5 ~ 9×10^7 、 2×10^5 ~ 8×10^7 、 2×10^5 ~ 7×10^7 、 2×10^5 ~ 6×10^7 、 2×10^5 ~ 5×10^7 、 2×10^5 ~ 4×10^7 、 2×10^5 ~ 4×10^7 、 2×10^5 ~ 3×10^7 、 2×10^5 ~ 2×10^7 、 2×10^5 ~ 1×10^7 、 2×10^5 ~ 9×10^6 、 2×10^5 ~ 8×10^6 、 2×10^5 ~ 7×10^6 、 2×10^5 ~ 6×10^6 、 2×10^5 ~ 5×10^6 、 2×10^5 ~ 4×10^6 、 2×10^5 ~ 4×10^6 、 2×10^5 ~ 3×10^6 、 2×10^5 ~ 2×10^6 、 2×10^5 ~ 1×10^6 、 3×10^5 ~ 3×10^6 細胞/kgなどが挙げられる。さらに、単回用量が投与されるかどうか、または複数用量が投与されるかどうかを説明するために、用量を調整することができる。どの有効用量が考慮されるかの正確な決定は、各対象にとって個別の因子に基づくものであってよい。

30

40

【0325】

本明細書で使用される場合、用語「処置する」、「処置すること」および「処置」は全て、対象において必ず識別できるわけではないが、対象において識別可能であってもよい、がんに関連する少なくとも1つの測定可能な身体パラメータの改善または好転を指すこ

50

とが意図される。用語「処置する」、「処置すること」および「処置」はまた、疾患、障害、または状態の退縮を引き起こすこと、その進行を防止すること、またはその進行を少なくとも減速させることを指してもよい。特定の実施形態では、「処置する」、「処置すること」および「処置」とは、腫瘍またはより好ましくは、がんなどの疾患、障害、または状態と関連する1つまたは複数の症状の軽減、その発達もしくは開始の防止、またはその持続期間の低減を指す。特定の実施形態では、「処置する」、「処置すること」および「処置」とは、疾患、障害、または状態の再発の防止を指す。特定の実施形態では、「処置する」、「処置すること」および「処置」とは、疾患、障害、または状態を有する対象の生存の増加を指す。特定の実施形態では、「処置する」、「処置すること」および「処置」とは、対象における疾患、障害、または状態の除去を指す。

10

【0326】

本出願の細胞および/または本出願の医薬組成物を、1つまたは複数の追加の治療剤と共に投与することができる。ある特定の実施形態では、1つまたは複数の治療剤は、ペプチド、サイトカイン、チェックポイント阻害剤、マイトジェン、増殖因子、低分子RNA、dsRNA（二本鎖RNA）、siRNA、オリゴヌクレオチド、単核血液細胞、目的の1つもしくは複数のポリ核酸を含むベクター、抗体、化学療法剤もしくは放射性部分、または免疫調節薬（IMiD）からなる群から選択される。本発明の細胞と共に使用することができる有用な第2の治療剤または補助治療剤としては、限定されるものではないが、化学療法剤、例えば、アルキル化剤、例えば、チオテパおよびシクロホスファミド（cyclophosphamide）など、アルキルスルホネート、例えば、ブスルファン、イムプロスルファンおよびピボスルファンなど；アジリジン、例えば、ベンゾドパ、コルボクオン；エチレンイミンおよびメチルメラミン（methylnmelamine）、例えば、アルトレタミン（altretamine）、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド；デルタ-9-テトラヒドロカンナビノール；カンプトテシン、イリノテカン、アセチルカンプトテシン、スコボレクチン、および9-アミノカンプトテシン；プリオスタチン；カリスタチン；CC-1065（そのアドゼレシン、カルゼレシンおよびビゼレシン合成アナログを含む）；ポドフィロトキシン；ポドフィリン酸；テニポシド；クリプトフィシン（特に、クリプトフィシン1およびクリプトフィシン8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成アナログ、KW-2189およびCB1-TMIを含む）；エレウテロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンギスタチン；窒素マスタード、例えば、クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベムビチン（novembichin）、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなど；ニトロソウレア、例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムスチン（ranimustine）など；抗生物質、例えば、エンジン抗生物質（例えば、カリケアミシン、特に、カリケアミシガンマIIおよびカリケアミシンオメガII（例えば、Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)を参照されたい））；ジネミシン、例えば、ジネミシンAなど；エスペラミシン；ならびにネオカルジノスタチンクロモフォアおよび関連する色素タンパク質エンジン抗生物質クロモフォア）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン（chromomycinis）、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルピシン（ADRIAMYCIN（登録商標））、モルホリノ-ドキシソルピシン、シアノモルホリノドキシソルピシン、2-ピロリノ-ドキシソルピシン、ドキシソルピシンHClリポソーム注射（DOXIL（登録商標））およびデオキシドキシソルピシンを含む）、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、例えば、マイトマイシンCなど、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシンなど

20

30

40

50

; 代謝拮抗剤、例えば、メトトレキサート、ゲムシタピン (GEMZAR (登録商標))、
 テガフル (UFTORAL (登録商標))、カペシタピン (XELODA (登録商標))、
 エボチロン、および 5 - フルオロウラシル (5 - FU) など; 葉酸アナログ、例えば、
 デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサートなど; プリン
 アナログ、例えば、フルダラビン、6 - メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン
 など; ピリミジンアナログ、例えば、アンシタピン、アザシチジン、6 - アザウリジン、
 カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロ
 クスウリジンなど; アンドロゲン剤、例えば、カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノ
 ロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなど; 抗副腎抗体、例えば
 、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなど; 葉酸補充薬、例えば、フロリン酸 10
 など; アセグラトン; アルドホスファミドグリコシド; アミノレブリン酸; エニルウラシル
 ; アムサクリン; ベストラブシル; ビサントレン; エダトラキサート; デホファミン;
 デメコルシン; ジアジクオン; エルホルミチン; 酢酸エリプチニウム; エトグルシド; 硝
 酸ガリウム; ヒドロキシウレア; レンチナン; ロニダイニン; メイタンシノイド、例えば
 、メイタンシンおよびアンサマイトシンなど; ミトグアゾン; ミトキサントロン; モピダ
 ンモル (mopidanmol); ニトラエリン; ペントスタチン; フェナメト; ピラルピシン
 ; ロソキサントロン; 2 - エチルヒドラジド; プロカルバジン; PSK (登録商標) 多糖
 複合体 (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); ラ
 ゴキサン; リゾキシン; シゾフラン; スピロゲルマニウム; テヌアゾン酸; トリアジクオン
 ; 2, 2', 2'' - トリクロロトリエチルアミン; トリコテセン (特に、T - 2トキシシ 20
 ン、ベラクリン A、ロリジン A およびアングイジン); ウレタン; ビンデシン (ELDISINE (登録商標)、
 FIELDSIN (登録商標)); ダカルバジン; マンノムスチ
 ン; ミトプロニトール; ミトラクトール; ピポプロマン; ガシトシン; アラビノシド (「
 Ara - C」); チオテパ; タキソイド、例えば、パクリタキセル (TAXOL (登録商
 標))、パクリタキセルのアルブミン操作されたナノ粒子製剤 (ABRAXANET (商
 標))、およびドセタキセル (TAXOTERE (登録商標)); クロラムブシル; 6 -
 チオグアニン; メルカプトプリン; メトトレキサート; 白金アナログ、例えば、シスプラ
 チンおよびカルボプラチンなど; ビンブラスチン (VELBAN (登録商標)); 白金;
 エトボシド (VP - 16); イホスファミド; ミトキサントロン; ビンクリスチン (ON
 COVIN (登録商標)); オキサリプラチン; ロイコボリン (leucovovin); ビノレ 30
 ルピン (NAVELBINE (登録商標)); ノバントロン; エダトレキサート; ダウノ
 マイシン; アミノプテリン; シクロスポリン、シロリムス、ラパマイシン、ラパログ、イ
 バンドロン酸; トポイソメラーゼ阻害剤 RFS 2000; ジフルオロメチルオルニチン (di
 fluoromethylomithine) (DMFO); レチノイド、例えば、レチノイン酸など;
 シクロホスファミド、ドキシソルピシン、ビンクリスチン、およびプレドニゾロンの併用療
 法の省略形である CHOP、および 5 - FU、ロイコボリンと併せてオキサリプラチン (E
 LOXATIN (商標)) を用いる処置レジメンの省略形である FOLFOX; 抗エスト
 ロゲン剤および選択的エストロゲン受容体モジュレータ (SERM)、例えば、タモキシ
 フェン (NOLVADEX (登録商標) タモキシフェンを含む)、ラロキシフェン (E
 VISTA (登録商標))、ドロキシフェン、4 - ヒドロキシタモキシフェン、トリオ 40
 キシフェン、ケオキシフェン、LYI 17018、オナプリストン、およびトレミフェン
 (FARESTON (登録商標)) など; 抗プロゲステロン剤; エストロゲン受容体ダウ
 ンレギュレータ (ERD); エストロゲン受容体アンタゴニスト、例えば、フルベストラ
 ント (FASLODEX (登録商標)) など; 卵巣を抑制するか、または閉鎖するように
 機能する薬剤、例えば、黄体形成ホルモン放出ホルモン (LHRH) アゴニスト、例えば
 、酢酸ロイプロリド (LUPRON (登録商標)) および ELIGARD (登録商標))、
 酢酸ゴセレリン、酢酸ブセレリンおよびトリプテレリンなど; 他の抗アンドロゲン剤、例
 えば、フルタミド、ニルタミドおよびピカルタミドなど; ならびに副腎におけるエストロ
 ゲン産生を調節するアロマターゼ酵素を阻害するアロマターゼ阻害剤、例えば、4 (5)
 - イミダゾール、アミノグルテチミド、酢酸メゲストール (MEGASE (登録商標)) 50

)、エキセメスタン (AROMASIN (登録商標))、ホルメスタン (formestanie)、ファドロゾール、ボロゾール (RIVISOR (登録商標))、レトロゾール (FEMARA (登録商標))、およびアナストロゾール (ARIMIDEX (登録商標)) など; ビスホスホネート、例えば、クロドロネート (例えば、BONEFOS (登録商標)) または OSTAC (登録商標))、エチドロネート (DIDROCAL (登録商標))、NE-58095、ゾレドロ酸/ゾレドロネート (ZOMETA (登録商標))、アレンドロネート (FOSAMAX (登録商標))、パミドロネート (AREDIA (登録商標))、チルドロネート (SKELID (登録商標))、またはリセドロネート (ACTONEL (登録商標)) など; トロキサシタピン (1, 3-ジオキソランヌクレオシドシトシンアナログ); 例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 6, 344, 321 号明細書に記載された アプタマー; 抗 HGF モノクローナル抗体 (例えば、Aveo からの AV299、Amgen からの AMG102); トランケートされた mTOR バリエーション (例えば、Compugen からの CGEN241); mTOR 誘導経路を遮断するタンパク質キナーゼ阻害剤 (例えば、Arqule からの ARQ197、Exelixis からの XL880、SGX Pharmaceuticals からの SGX523、SuperGen からの MP470、Pfizer からの PF2341066); ワクチン、例えば、THERATOPE (登録商標) ワクチンおよび遺伝子療法 ワクチン、例えば、ALLOVECTIN (登録商標) ワクチン、LEUVECTIN (登録商標) ワクチン、および VAXID (登録商標) ワクチン など; トポイソメラーゼ 1 阻害剤 (例えば、LURTOTECAN (登録商標)); rmRH (例えば、ABARELIX (登録商標)); ラパチニブジトシレート (GW572016 としても知られる、Erbb-2 および EGFR のデュアルチロシンキナーゼ低分子阻害剤); COX-2 阻害剤、例えば、セレコキシブ (CELEBREX (登録商標)); 4-(5-(4-メチルフェニル)-3-(トリフルオロメチル)-1H-ピラゾール-1-イル)ベンゼンスルホンアミド; ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体が挙げられる。

10

20

【実施例】

【0327】

[実施例 1]

i T 細胞の生成

CAR-i T 細胞を作製するために使用される iPSC を作出するために、3つの方法を使用することができる。1つの方法は、ドナーの血液から収集される T 細胞を使用する。これらの T 細胞は、再構成された および 遺伝子クラスターを有し、したがって、それらが iPSC になるように再プログラミングされた場合、得られる TiPSC (T 細胞由来 iPSC) は、同じ遺伝子再構成を有する。TCR は、既知の抗原特異性および HLA 拘束性を有する (図 1A)。別の方法は、ドナーに由来する非 T 細胞から始まる。細胞型は、任意の体細胞であってよく、好ましくは、このプロセスのために使用される細胞は、表面タンパク質 CD34 の発現によって定義される末梢血造血幹細胞 (HSC) である。これらの PiPSC (末梢血 CD34 HSC 由来 iPSC) を、トラステッド再構成 TCR 導入遺伝子のセットをノックインする遺伝子操作によって T-PiPSC (TCR を発現する PiPSC) に変換することができる (図 1B)。第3の方法は、ドナーの血液から収集される T 細胞を使用する。T 細胞を、内因性 TCR 遺伝子座をトラステッド再構成 TCR 導入遺伝子で置き換える遺伝子操作によって T-PiPSC (TCR を発現する iPSC) に変換することができる (図 1C)。および 鎖に関する再構成された TCR 導入遺伝子は、単一の多シストロン性構築物として、または2つの別々の構築物: 1つのアルファおよび1つのベータとして送達される。

30

40

【0328】

PiPSC の生成

最初に、末梢血単核細胞 (PBMC) を、健康なドナーから収集した。次いで、表面タンパク質 CD34 の発現によって定義される造血幹細胞 (HSC) を単離した。

50

【0329】

増殖しているHSCを、iPSC再プログラミングにかけた。iPSCを、当業界で公知の方法を使用して再プログラミングした。iPSC再プログラミングの例示的な方法は、米国特許第8,183,038号明細書；同第8,268,620号明細書；同第8,440,461号明細書；同第9,499,786号明細書；同第10,865,381号明細書；同第8,952,801号明細書；同第8,546,140号明細書；同第9,644,184号明細書；同第9,328,332号明細書；および同第8,765,470号明細書に記載されており、それぞれ、その全体が参照により組み込まれる。

【0330】

TiPSCの生成

TiPSCを生成するための2つの戦略がある。1つの手法は、ドナーのHLA型またはTCRの抗原特異性の知識を必要としない。任意のT細胞をTiPSCに再プログラミングし、遺伝子操作によって未知のTCRを既知のトラステッドTCRで置き換えることができる(図1C)。T細胞を再プログラミングするために、ドナーからPBM Cを収集し、T細胞の有糸分裂を引き起こす刺激の存在下で培養する。これらのものはCD3分子およびCD28分子、フィトヘマグルチニン(PHA)などの非特異的マイトジェン、または他のT細胞マイトジェンに対するアゴニストとして作用する抗体を含んでもよい。IL-2の存在下で用いられる場合、マイトジェンは、T細胞の増殖を引き起こし、当業界で公知の方法を使用して、T細胞を、iPSC再プログラミングの影響を受けやすくする。iPSC再プログラミングの例示的な方法は、米国特許第8,183,038号明細書；同第8,268,620号明細書；同第8,440,461号明細書；同第9,499,786号明細書；同第10,865,381号明細書；同第8,952,801号明細書；同第8,546,140号明細書；同第9,644,184号明細書；同第9,328,332号明細書；および同第8,765,470号明細書に記載されており、それぞれ、その全体が参照により組み込まれる。

【0331】

TiPSCを再プログラミングするための第2の手法は、コードされたTCRに、既知の抗原およびHLA特異性を与える特異的TCR遺伝子再構成を有する特異的T細胞の同定を含む(図1A)。例えば、HLA-A*02:01のコンテクストにおいてインフルエンザA抗原性ペプチドGILGFVFTLを認識するT細胞を収集し、マイトジェンおよびIL-2を使用して活性化し、当業界で公知の方法を使用して再プログラミングする。iPSC再プログラミングの例示的な方法は、米国特許第8,183,038号明細書；同第8,268,620号明細書；同第8,440,461号明細書；同第9,499,786号明細書；同第10,865,381号明細書；同第8,952,801号明細書；同第8,546,140号明細書；同第9,644,184号明細書；同第9,328,332号明細書；および同第8,765,470号明細書に記載されており、それぞれ、その全体が参照により組み込まれる。次いで、得られるTiPSCを使用して、元の抗原特異的TCRを発現するT細胞を誘導する。

【0332】

iT細胞の分化

T-PiPSCからのHPCの生成のために、B-27補給物質、Xenofree、マイナスビタミンA(1X)、非必須アミノ酸(1X)、L-アスコルビン酸リン酸マグネシウム塩n-水和物(250μM)、モノチオグリセロール(100μM)、およびヘパリン(100ng/ml)を添加した、50%Iscoveの改変Dulbecco培地および50%Ham's F12栄養混合物から構成されるHDM基本培地中でiPSCを培養した。0日目に、HDM基本培地に、H1152(1μM)、CHIR99021(2μM)、bFGF(50ng/ml)、およびVEGF(50ng/ml)を添加した。1日目に、80%の培地を除去し、CHIR99021(2μM)、bFGF(50ng/ml)、およびVEGF(50ng/ml)を添加したHDM基本培地と交換した。2、3および4日目に、80%の培地を除去し、BMP4(25ng/ml)、

10

20

30

40

50

b F G F (5 0 n g / m l)、および V E G F (5 0 n g / m l) を添加した H D M 基本培地と交換した。5、6、7、8日目に、80%の培地を除去し、B M P 4 (5 n g / m l)、S C F (1 0 0 n g / m l)、T P O (5 0 n g / m l)、F L T 3 L (2 0 n g / m l)、および I L - 3 (2 0 n g / m l) を添加した H D M 基本培地と交換した。出発 i P S C 供給源に応じて、7~9日目に H P C を収集した。H P C は、細胞表面上の C D 3 4 +、C D 4 3 +、+ / - C D 4 5 と定義された。

【0333】

T - H P C からのアルファベータ i P S C 由来 T (i T) 細胞の生成のための分化条件は、T C R + C および C D 3 + 表現型を有する i T 細胞の最適な収量にとりだけでなく、増殖および標的殺滅を含む、i T 細胞の機能を最適化するためにも重要である。優れた i T 細胞を生成するために、改善された収量、生存能力および表現型、ならびに i T 細胞の適応度および標的殺滅のための条件を試験した。C D 3 4 + 細胞が、限定されるものではないが、トラステッド再構成 T C R を含む、再構成された T C R を発現する、C D 3 4 + H P C の i T 細胞への分化の例示的な方法が、本明細書に例示される。

10

【0334】

N o t c h シグナル伝達は、特に、前駆細胞が T 細胞運命に向かうのを駆動する重要な役割を果たしている。ヒト胸腺では、N o t c h ファミリータンパク質 D L L 1、D L L 4 および J a g 2 (胸腺中の間質細胞によって発現される) は、受容体 N o t c h 1 (初期胸腺細胞によって発現される) を介してシグナル伝達する。i T 細胞分化に対する D L L 4 および J A G 2 を含む D L L 4 の効果を試験するために、21~35日間にわたって、以下のタンパク質：R e t r o n e c t i n (登録商標) (T a k a r a B i o、S h i g a、J a p a n) を含む組換えデルタ様タンパク質 4 (D L L 4) および組換え J a g g e d 2 (J A G 2) および R e t r o n e c t i n (登録商標) を含む D L L 4 を使用してコーティングされたプレート上で H P C を培養した。H P C を i T 細胞に分化させるために使用した T 細胞分化培地 (T C D M) 基本培地は、C T S 免疫細胞血清代替物 (1 0 %)、グルタマックス補給物質 (1 X)、L - アスコルビン酸リン鎖マグネシウム塩 n - 水和物 (2 5 0 μ M)、およびニコチンアミド (2 m M) を添加した C T S A I M V 培地から構成されていた。図 2 は、D L L 4 と J A G 2 との組合せが i T 細胞の収量を増加させたことを示す。

20

【0335】

分化の 1 4 ~ 2 8 日目におけるサイトカインの添加も評価した。T C D M 基本培地に、I L - 2 および I L - 7 を添加し、I L - 1 5 を添加したか、添加しなかった。培地への I L - 1 5 の添加は、2 8 日目に i T 細胞の収量ならびに i T 細胞の生存率 (%) を増加させた (図 3)。I L - 1 5 および D L L 4 または D L L 4 および J A G 2 で処理した i T 細胞の機能をさらに試験するために、C D 1 9 を標的とする C A R を発現するように操作された i P S C から H P C を生成し、上記のように培養した。I L - 1 5 で処理した細胞のうち、D L L 4 および J A G 2 をコーティングしたプレート上で培養したものは、i T 細胞生存能力の増加および C D 1 9 + R e h 標的細胞の溶解の増加を有していた (図 4)。

30

【0336】

次に、分化条件を試験して、得られた i T 細胞中での T C R アビディティを最適化した。分化の 2 1 ~ 2 8 日目に、細胞を、2 つの抗 C D 3 抗体、O K T 3 (K u n g e t a l . , S c i e n c e . 1 9 7 9 O c t 1 9 ; 2 0 6 (4 4 1 6) : 3 4 7 - 9) または U C H T 1 (C a l l a r d e t a l . , C l i n E x p I m m u n o l . 1 9 8 1 M a r ; 4 3 (3) : 4 9 7 - 5 0 5) のうちの 1 つでコーティングしたプレート上で培養した。両抗体は重複するエピトープを標的とするが、異なる効果 (例えば、C D 3 / T C R へのコンフォメーション変化の誘導、アゴニズムの強度など) を示す。O K T 3 および U C H T 1 を比較する場合、U C H T 1 はより正確な T 細胞同一性 (T C R / C D 3 +) を支持したが、O K T 3 はより多い C D 5 6 発現を惹起した (データは示さない)。I L - 1 5 で処理した細胞間で抗体を比較した場合、U C H T 1 は、より高い i T 収量ならびに C D 1 9 + 標的細胞の溶解の増加をもたらした (図 5)。

40

50

【0337】

複数の時点での条件の変化の試験により、優れた生存能力および機能を有する iT 細胞が得られる以下の改善された分化方法が発見された。HPC 細胞を解凍し、MicroBead キットを使用して CD34 + 細胞を富化した。CD34 + 細胞を、TCDM - I 培地中、DLL4 / JAG2 / RN (Retronection (登録商標)、組換えヒトフィブロネクチン断片) をコーティングしたプレート上に 2.5×10^4 個の生きた細胞 / cm^2 で播種した。TCDM - I は、SCF (50 ng/ml)、FLT3L (50 ng/ml)、TPO (50 ng/ml)、および IL - 7 (50 ng/ml) を添加した TCDM 基本培地である。細胞を毎週収集し、1 ~ 14 日目までタンパク質をコーティングしたプレート上に再播種した。14 日目に、細胞を凍結保存した。次いで、凍結保存した細胞を解凍し、 4.16×10^4 個の生きた細胞 / cm^2 で TCDM - I 培地中、DLL4 / JAG2 / RN でコーティングしたプレート上に播種した。TCDM - I 培地を使用して、14 ~ 21 日目に 24 ~ 72 時間毎に培地を交換した。21 日目に、細胞を収集し、TCDM + IL - 2、IL - 7、IL - 15 中、MOPC - 21 マウス IgG アイソタイプ Ab (Melchers, Biochem J. 1970 Oct;119(4):765-72) ($8 \mu\text{g/ml}$) と混合した UCHT1 抗 CD3 Ab ($2 \mu\text{g/ml}$) をコーティングしたプレート上に 8.3×10^4 個の生きた細胞 / cm^2 で播種した。28 日目に、細胞を評価のために収集した (図 6)。

【0338】

[実施例 2]

CAR - T 細胞の生成

未知の特異性を有する TCR を発現する T 細胞に由来する T - iPSC を、CD19 を標的とする CAR を発現するように操作して、その腫瘍細胞殺滅活性を評価した。実施例 1 に記載された方法を使用して、CAR - T - iPSC 細胞を使用して T 細胞を分化させた。分化の 28 日後、細胞を収集し、系列マーカー、成熟マーカーおよびサイトカイン受容体について染色し、次いで、フローサイトメリーによって分析した (図 7)。大部分の細胞は CD45 陽性であった。CD45 を発現する細胞を、他の全てのマーカーについて分析した。CD45 陽性細胞は、TCR と CD3 とを同時発現した。多くの CD3 陽性細胞は、CD56 陰性である。大部分の細胞は、CD7 と CD5 との両方について陽性のサブセットと共に CD7 を発現した。CD8 が発現された場合、それは CD8 と CD8 とのヘテロ二量体としてであった。CD4 発現は検出されなかった。共刺激分子 CD28 および CD27 の発現は低かった。細胞は、CD25、CD122、CD127、CD132 および CD215 を含む IL - 2 ファミリーのサイトカイン受容体を発現した。さらに、28 日目に、CAR - iT 細胞を、未染色のままにしたか、または抗 FMC63 CAR 抗体で染色した。CAR - iT 細胞の多く (74%) が、その表面上に CAR タンパク質を発現した (図 8)。

【0339】

次いで、CAR - iT 細胞を、B 細胞リンパ腫細胞 (Reh) の抗原特異的殺滅について評価した。これらの試験について、Reh 細胞または CD19 遺伝子をノックアウトして CD19 陰性細胞を作製した Reh 細胞の型を使用した。CAR - iT 細胞または PBMC 由来 CART 細胞を、1 : 1 の比で標的細胞と共に同時培養した。標的細胞殺滅を、Incucyte 機器を使用して測定した。CD19 陽性 Reh 細胞を CAR - T 細胞に曝露した場合、iPSC 由来と PBMC 由来との両方の CAR - iT 細胞が腫瘍殺滅を媒介した (図 9A)。対照的に、CD19 陰性 Reh 標的は、殺滅から免れた (図 9B)。

【0340】

[実施例 3]

トラステッド TCR の同定

パブリック TCR は、ある特定の HLA 型を有する複数の個体において頻繁に存在する配列である。例えば、HLA - I 分子 HLA - A*02 : 01 のコンテキストにおいてインフルエンザ A ウイルスマトリックスタンパク質 (エピトープ : GILGFVFTL) の

抗原性ペプチド配列を認識するパブリックTCRがある。HLA-A*02:01アレルを有し、インフルエンザAに曝露された、全てではないが多くの人も、共通のパブリックTCRを共有するT細胞を有するであろう。そのようなパブリックTCRの相同性を、2つのレベルで記述することができる。遺伝子レベルでは、これらのパブリックTCRは、TCRアルファV (TRAV) およびTCRベータV (TRBV) 遺伝子使用を共有するが、それらはTCR再構成中の、または異なる多様性 (TRBV/TRAV) もしくは連結 (TRBJ) 遺伝子の使用による、無作為なn/pヌクレオチド付加の結果として、配列レベルで異なる場合がある (図10)。そのようなパブリックTCRは、本明細書ではパブリックTCRアロタイプと称される。n/p付加と共に、再構成されたV遺伝子、D遺伝子およびJ遺伝子 (ベータ鎖) またはV遺伝子およびJ遺伝子 (アルファ鎖) の物理的共通部分は、抗原に対する特異性を付与するTCRの部分、いわゆる、相補性決定領域3 (CDR3) を含む。

10

【0341】

【表3】

表3:異なるレベルの同一性に基づくパブリック TCR 型の例

| パブリック TCR の型 | TRBV | TRBJ | TRAV | TRAJ | CDR3 |
|---------------|--------|---------|--------|----------|--|
| 共有されたVアロタイプ | TRBV19 | 未定義 | TRAV27 | 未定義 | TRBV および TRAV C 末端で同一である;TRBJ および TRAJで異なるかもしれない |
| 共有された完全なアロタイプ | TRBV19 | TRBJ2.7 | TRAV27 | TRAJ42.1 | V および J で同一であるが、p/n 付加から一部変化している |
| 共有された CDR3 | TRBV19 | TRBJ2.7 | TRAV27 | TRAJ42.1 | p/n 付加を含む完全な CDR で同一である |

20

【0342】

HLA-A*02:01を有する個体は、第2のHLA-A遺伝子 (通常、HLA-A*02:01ではない)、2つのHLA-B遺伝子、および2つのHLA-C遺伝子も有し、これらの他の遺伝子は個体間で多様であるため、パブリックTCRアロタイプおよび配列は、自然ではリスク回避されている (図11)。すなわち、これらのTCRは、胸腺選択の間に膨大な多様性の他の非HLA-A*02タンパク質に曝露され、それらは一掃されない。かくして、これらのTCRは、非HLA-A*02分子を認識することができず、HLA-A*02:01を欠く人々においても、移植片対宿主疾患に関与する可能性が低い。

30

【0343】

図1Bに示される方法に従って、PiPSCを、配列番号84のアルファ鎖および配列番号85のベータ鎖を有する組換えパブリック再構成 TCRを発現するように操作した。組換えパブリック再構成 TCRは、HLA-A*02:01のコンテキストにおいてインフルエンザエピトープGILGFVFTL (配列番号83) を認識する。導入遺伝子は、構成的CAGプロモーターの制御下にあった。陰性対照またはGILGFVFTLエピトープを発現するように操作されたB細胞前駆体白血病細胞系であるNa1m6細胞を、1:1または5:1のエフェクター:標的比で操作された iT細胞と共に培養した。図12は、パブリックTCRを発現するように操作された iT細胞が、インフルエンザエピトープを発現する標的細胞を殺滅することができたことを示し、ゲノム操作されたパブリックTCRが機能的であったことを示している。

40

【0344】

当業者であれば、広い発明の概念から逸脱することなく、上記の実施形態に対して変更

50

を加えることができることを理解するであろう。したがって、本発明は、開示される特定の実施形態に限定されないが、本明細書によって定義される本発明の精神および範囲内の改変を包含することが意図されることが理解される。

【図面】

【図 1 - 1】

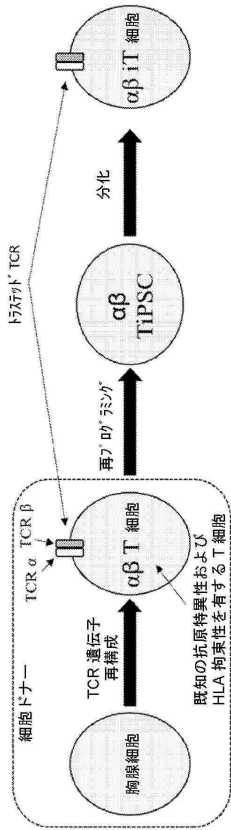


図 1A

【図 1 - 2】

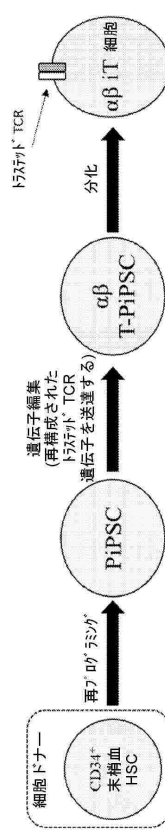


図 1B

10

20

30

40

50

【 図 1 - 3 】

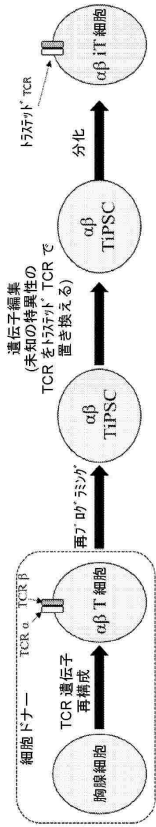


図 1C

【 図 2 】

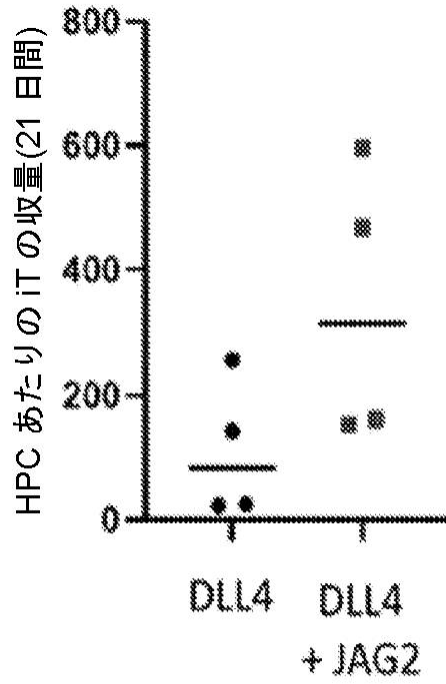


図 2

【 図 3 】

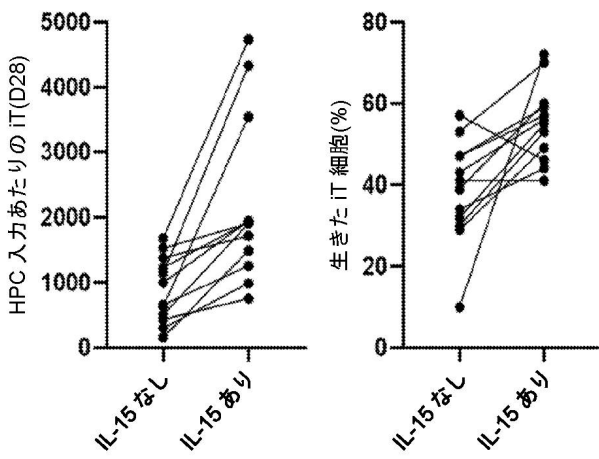


図 3

【 図 4 】

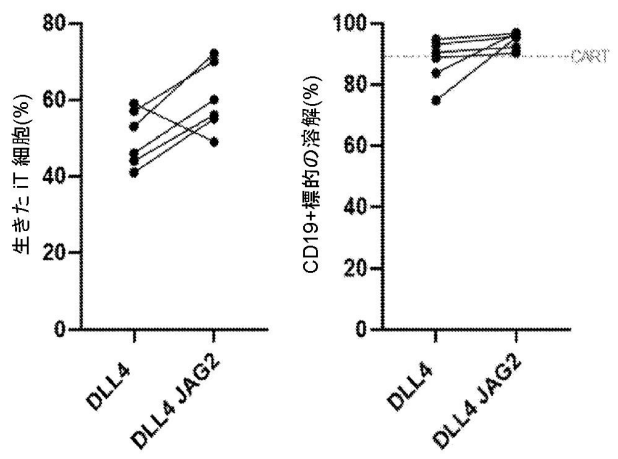


図 4

10

20

30

40

50

【 図 5 】

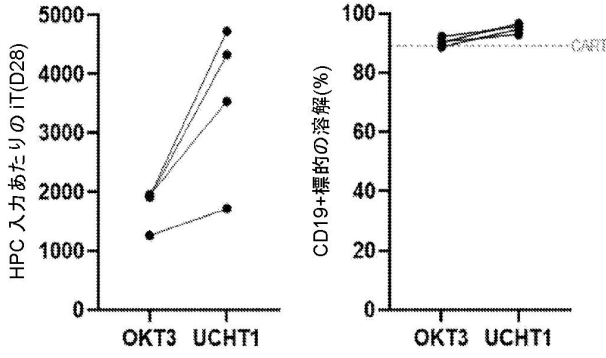


図 5

【 図 6 】

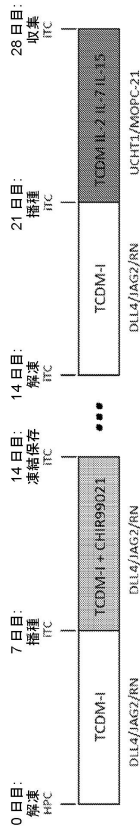


図 6

10

20

【 図 7 - 1 】

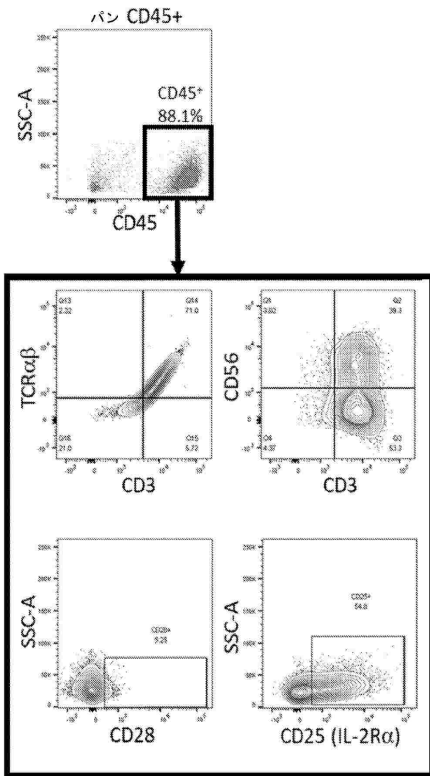


図 7

【 図 7 - 2 】

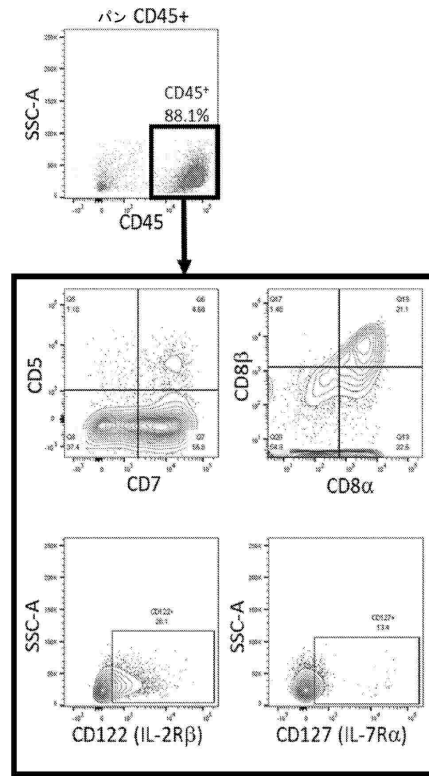


図 7(続き)

30

40

50

【 図 7 - 3 】

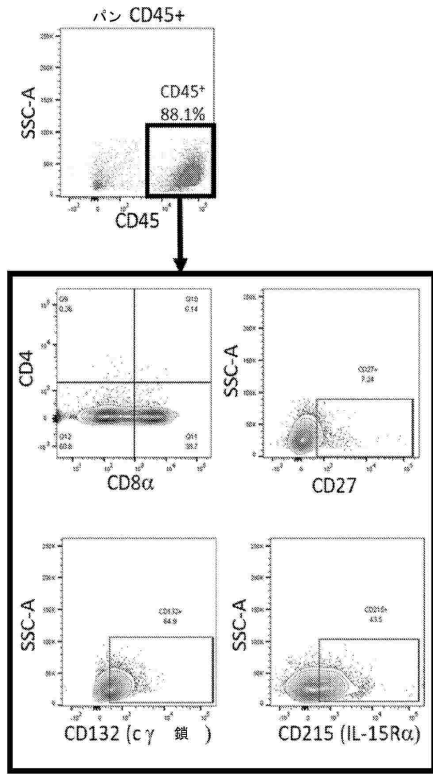


図 7(続き)

【 図 8 】

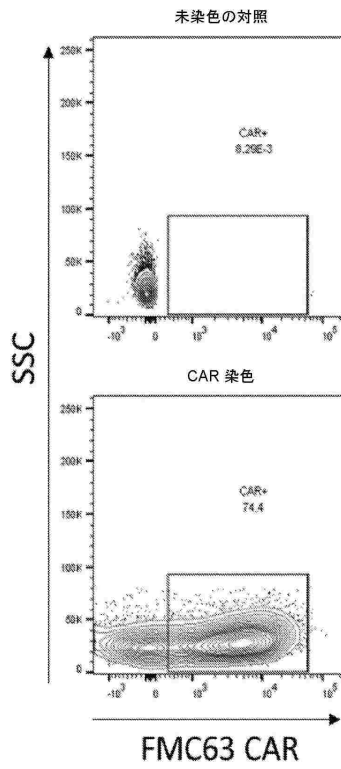


図 8

【 図 9 - 1 】

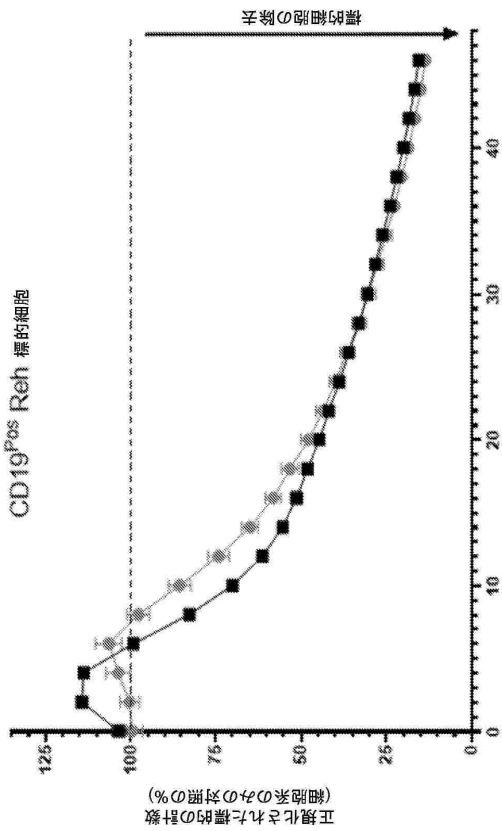


図 9A

【 図 9 - 2 】

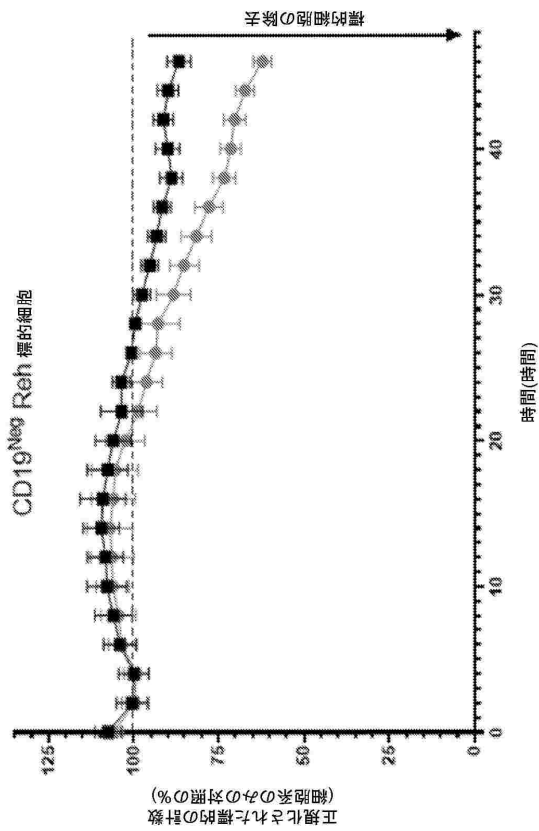


図 9B

10

20

30

40

50

【配列表】

2024513906000001.app

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/023347

| | | |
|---|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
| INV. C12N5/074 C12N5/0783 C07K14/725 | | |
| ADD. | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) | | |
| C12N C07K | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) | | |
| EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | TOSHINOBU NISHIMURA ET AL: "Generation of Rejuvenated Antigen-Specific T Cells by Reprogramming to Pluripotency and Redifferentiation", CELL STEM CELL, vol. 12, no. 1, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 114-126, XP055567898, AMSTERDAM, NL ISSN: 1934-5909, DOI: 10.1016/j.stem.2012.11.002 | 1, 2, 5-15, 17, 20-26, 36-48 |
| Y | the whole document table 1 | 1-48 |
| | ----- -/-- | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search | | Date of mailing of the international search report |
| 13 July 2022 | | 13/09/2022 |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Offermann, Stefanie |

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/023347

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

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

a. forming part of the international application as filed:

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

on paper or in the form of an image file.

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

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

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

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

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

3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/023347

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims.; it is covered by claims Nos.:
1-48

30

40

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2022/023347

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|---------------------------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | US 2013/078226 A1 (NAKAUCHI HIROMITSU [JP] ET AL) 28 March 2013 (2013-03-28) | 1, 2, 5-15, 17, 20-26, 36-48 |
| Y | paragraphs [0035], [0261], [0270], [0297]; claims 1-11 | 1-48 |
| Y | ----- RAUL VIZCARDO ET AL: "Regeneration of Human Tumor Antigen-Specific T Cells from iPSCs Derived from Mature CD8+ T Cells", CELL STEM CELL, vol. 12, no. 1, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 31-36, XP055240588, AMSTERDAM, NL ISSN: 1934-5909, DOI: 10.1016/j.stem.2012.12.006 the whole document | 1-48 |
| Y | ----- MARIA THEMELI ET AL: "Generation of tumor-targeted human T lymphocytes from induced pluripotent stem cells for cancer therapy", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 31, no. 10, 11 August 2013 (2013-08-11), pages 928-933, XP055485171, New York ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.2678 the whole document figure 1 | 1-48 |
| X | ----- MINAGAWA ATSUTAKA ET AL: "Enhancing T Cell Receptor Stability in Rejuvenated iPSC-Derived T Cells Improves Their Use in Cancer Immunotherapy", CELL STEM CELL, ELSEVIER, CELL PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 23, no. 6, 6 December 2018 (2018-12-06), page 850, XP085555973, ISSN: 1934-5909, DOI: 10.1016/J.STEM.2018.10.005 | 1, 2, 5-15, 17, 20-26, 36-48 |
| Y | the whole document | 1-48 |
| X | ----- WO 2014/165707 A2 (SLOAN KETTERING INST CANCER [US]) 9 October 2014 (2014-10-09) | 1, 2, 5-15, 17, 20-26, 36-48 |
| Y | page 5, line 30 - page 6, line 1; claims 77-87 page 23, line 29 - page 24, line 18 page 76, line 4 - line 13 page 77, line 2 - line 5 | 1-48 |
| | ----- -/-- | |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2022/023347

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|---------------------------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 2017/088012 A1 (CARTHERICS PTY LTD [AU]) 1 June 2017 (2017-06-01) | 1, 2, 5-15, 17, 20-26, 36-48 |
| Y | paragraphs [0034], [0173], [0175]; claims 44, 45 paragraphs [0101], [0102], [0104], [0107] | 1-48 |
| X | WO 2020/117526 A1 (FATE THERAPEUTICS INC [US]) 11 June 2020 (2020-06-11) | 1, 2, 5-15, 17, 20-26, 36-48 |
| Y | paragraph [0089]; claim 3 | 1-48 |
| Y | WO 2020/168300 A1 (EDITAS MEDICINE INC [US]) 20 August 2020 (2020-08-20) paragraphs [0092], [0255], [0257]; claim 1 | 1-48 |
| Y | YANG XINBO ET AL: "Structural basis for clonal diversity of the human T-cell response to a dominant influenza virus epitope", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 292, no. 45, 1 November 2017 (2017-11-01), pages 18618-18627, XP055925661, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M117.810382 the whole document | 1-48 |
| T | Wallet Mark A ET AL: "Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Gamma Delta CAR-T Cells for Cancer Immunotherapy", Blood: 63rd ASH Annual Meeting Abstracts POSTER ABSTRACTS 703.CELLULAR IMMUNOTHERAPIES: BASIC AND TRANSLATIONAL, 23 November 2021 (2021-11-23), pages 2771-2772, XP055941910, Retrieved from the Internet: URL:https://reader.elsevier.com/reader/sd/pi/S0006497121047145?token=8418FFEFDA8E8B062E1B241C5FEB067779406E195486A2D0F3C4EE9E5480942C33BEE787CC108CCA71C1DB780E261E0E&originRegion=eu-west-1&originCreation=20220713081216 [retrieved on 2022-07-13] | |

10

20

30

40

International Application No. PCT/US2022 /023347

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

10

1. claims: 1-48

iPSC (in particular T cell derived iPSC, so called "T-iPSC") or T cells comprising polynucleotides encoding a (recombinant) re-arranged ?? T cell receptor (TCR) which is preferentially a "public" TCR recognising a non-human antigen, such as a viral antigen from influenza-A, Epstein-Barr virus (EBV) or cytomegalovirus (CMV), and a CAR. Regarding claim 35 it is noted that the TCR with SEQ ID NOs:86 and 87 is specific for an influenza antigen.

2. claims: 49-59

methods for differentiating a (iPSC-derived) CD34+ HPC comprising a polynucleotide encoding a rearranged TCR (which also might be a ?? TCR; the antigen is not defined; no CAR has to be present) to a T cell using a medium comprising inter alia DLL4.

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/023347

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|----|------------------|-------------------------|------------------|
| US 2013078226 | A1 | 28-03-2013 | US 2013078226 A1 | 28-03-2013 |
| | | | US 2017009206 A1 | 12-01-2017 |
| | | | US 2021032595 A1 | 04-02-2021 |
| ----- | | | | |
| WO 2014165707 | A2 | 09-10-2014 | AU 2014248119 A1 | 22-10-2015 |
| | | | AU 2019229342 A1 | 03-10-2019 |
| | | | AU 2021201731 A1 | 15-04-2021 |
| | | | CA 2908668 A1 | 09-10-2014 |
| | | | DK 2981607 T3 | 16-11-2020 |
| | | | EP 2981607 A2 | 10-02-2016 |
| | | | EP 3789487 A1 | 10-03-2021 |
| | | | ES 2831315 T3 | 08-06-2021 |
| | | | PT 2981607 T | 20-11-2020 |
| | | | US 2016009813 A1 | 14-01-2016 |
| | | | US 2019375850 A1 | 12-12-2019 |
| | | | WO 2014165707 A2 | 09-10-2014 |
| | | | ----- | |
| WO 2017088012 | A1 | 01-06-2017 | AU 2016361451 A1 | 07-06-2018 |
| | | | CA 3004120 A1 | 01-06-2017 |
| | | | CN 109152824 A | 04-01-2019 |
| | | | EP 3380117 A1 | 03-10-2018 |
| | | | EP 3708587 A1 | 16-09-2020 |
| | | | EP 3708588 A1 | 16-09-2020 |
| | | | ES 2862907 T3 | 08-10-2021 |
| | | | IL 259586 A | 31-07-2018 |
| | | | JP 6976960 B2 | 08-12-2021 |
| | | | JP 2018535701 A | 06-12-2018 |
| | | | JP 2022027762 A | 14-02-2022 |
| | | | MY 189819 A | 10-03-2022 |
| | | | SG 10201912825X A | 27-02-2020 |
| | | | SG 11201803493U A | 30-05-2018 |
| | | | US 2018353588 A1 | 13-12-2018 |
| | | | WO 2017088012 A1 | 01-06-2017 |
| ----- | | | | |
| WO 2020117526 | A1 | 11-06-2020 | AU 2019392265 A1 | 03-06-2021 |
| | | | CA 3121128 A1 | 11-06-2020 |
| | | | CN 113166232 A | 23-07-2021 |
| | | | EP 3891177 A1 | 13-10-2021 |
| | | | IL 283607 A | 29-07-2021 |
| | | | JP 2022510207 A | 26-01-2022 |
| | | | KR 20210099601 A | 12-08-2021 |
| | | | SG 11202105480W A | 29-06-2021 |
| | | | US 2022127328 A1 | 28-04-2022 |
| | | | WO 2020117526 A1 | 11-06-2020 |
| ----- | | | | |
| WO 2020168300 | A1 | 20-08-2020 | AU 2020221409 A1 | 02-09-2021 |
| | | | CA 3128888 A1 | 20-08-2020 |
| | | | CL 2021002147 A1 | 22-04-2022 |
| | | | CN 113518821 A | 19-10-2021 |
| | | | EP 3924467 A1 | 22-12-2021 |
| | | | IL 285543 A | 30-09-2021 |
| | | | JP 2022520402 A | 30-03-2022 |
| | | | KR 20210129105 A | 27-10-2021 |
| | | | PE 20211959 A1 | 30-09-2021 |
| | | | SG 11202108644U A | 29-09-2021 |
| | | | US 2022143084 A1 | 12-05-2022 |
| | | | WO 2020168300 A1 | 20-08-2020 |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

| (51)国際特許分類 | F I | テーマコード (参考) |
|--------------------------|-----------------|-------------|
| A 6 1 P 43/00 (2006.01) | A 6 1 P 43/00 | 1 2 1 |
| A 6 1 K 35/17 (2015.01) | A 6 1 K 35/17 | |
| A 6 1 K 45/00 (2006.01) | A 6 1 K 45/00 | |
| A 6 1 K 38/02 (2006.01) | A 6 1 K 38/02 | |
| A 6 1 K 38/19 (2006.01) | A 6 1 K 38/19 | |
| A 6 1 K 31/713(2006.01) | A 6 1 K 31/713 | |
| A 6 1 K 31/7088(2006.01) | A 6 1 K 31/7088 | |
| A 6 1 K 39/395(2006.01) | A 6 1 K 39/395 | D |
| A 6 1 K 35/545(2015.01) | A 6 1 K 39/395 | N |
| C 1 2 N 5/0783(2010.01) | A 6 1 K 39/395 | E |
| C 1 2 N 5/078(2010.01) | A 6 1 K 39/395 | T |
| | A 6 1 K 35/545 | |
| | C 1 2 N 5/0783 | |
| | C 1 2 N 5/078 | |

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

ストリート 3 6 7 5 , センチュリー セラピューティクス , インコーポレイテッド内

- (72)発明者 サントステファノ , キャサリーン
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 1 0 4 , フィラデルフィア , マーケット ストリート 3
 6 7 5 , センチュリー セラピューティクス , インコーポレイテッド内
- (72)発明者 サランテス , ブレンダ
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 1 0 4 , フィラデルフィア , マーケット ストリート 3
 6 7 5 , センチュリー セラピューティクス , インコーポレイテッド内
- (72)発明者 メンドンサ , マーク
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 1 0 4 , フィラデルフィア , マーケット ストリート 3
 6 7 5 , センチュリー セラピューティクス , インコーポレイテッド内
- (72)発明者 西村 聡修
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 1 0 4 , フィラデルフィア , マーケット ストリート 3
 6 7 5 , センチュリー セラピューティクス , インコーポレイテッド内
- (72)発明者 ナーソ , マイケル , フランシス
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 1 0 4 , フィラデルフィア , マーケット ストリート 3
 6 7 5 , センチュリー セラピューティクス , インコーポレイテッド内
- (72)発明者 グルン , ブッダ
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 1 0 4 , フィラデルフィア , マーケット ストリート 3
 6 7 5 , センチュリー セラピューティクス , インコーポレイテッド内
- (72)発明者 シュー , ゼンロン
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 1 0 4 , フィラデルフィア , マーケット ストリート 3
 6 7 5 , センチュリー セラピューティクス , インコーポレイテッド内
- (72)発明者 モース , バリー
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 1 0 4 , フィラデルフィア , マーケット ストリート 3
 6 7 5 , センチュリー セラピューティクス , インコーポレイテッド内
- (72)発明者 ボルヘス , ルイス
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 1 0 4 , フィラデルフィア , マーケット ストリート 3
 6 7 5 , センチュリー セラピューティクス , インコーポレイテッド内
- (72)発明者 カートン , ジル , マリナーリ
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 1 0 4 , フィラデルフィア , マーケット ストリート 3

675, センチュリー セラピューティクス, インコーポレイテッド内

F ターム (参考) 4B065 AA90X AA90Y AB01 BA02 BB19 CA24 CA25 CA44
4C084 AA01 AA02 AA03 AA07 AA19 BA03 DA01 MA02 MA13 MA17
MA21 MA22 MA56 MA66 MA67 NA05 ZB072 ZB261 ZB262 ZC751
4C085 AA13 AA14 BB11 BB36 CC23 EE03 GG01 GG02 GG03 GG04
GG05 GG06
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA02 MA04 MA13 MA17 MA21 MA22
MA56 MA66 MA67 NA05 ZB26 ZC75
4C087 BB64 BB65 CA12 MA13 MA17 MA21 MA22 MA56 MA66 MA67
NA05 NA14 ZB26 ZC75