

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7672702号  
(P7672702)

(45)発行日 令和7年5月8日(2025.5.8)

(24)登録日 令和7年4月25日(2025.4.25)

(51)国際特許分類	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 1 1 0
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 1 2 N 5/0783(2010.01)	C 1 2 N 5/0783
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z
C 1 2 N 15/864(2006.01)	C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z

請求項の数 55 (全80頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-530101(P2021-530101)	(73)特許権者	500039463
(86)(22)出願日	令和1年11月27日(2019.11.27)		ボード オブ リージェンツ, ザ ユニバ ーシティ オブ テキサス システム
(65)公表番号	特表2022-513652(P2022-513652		BOARD OF REGENTS, TH E UNIVERSITY OF TEX AS SYSTEM
	A)		アメリカ合衆国 78701 テキサス州
(43)公表日	令和4年2月9日(2022.2.9)		, オースティン, ウエスト 7番ストリ ート 210
(86)国際出願番号	PCT/US2019/063641		210 West 7th Street
(87)国際公開番号	WO2020/113029		Austin, Texas 78701
(87)国際公開日	令和2年6月4日(2020.6.4)		U.S.A.
審査請求日	令和4年11月11日(2022.11.11)	(74)代理人	110000729
(31)優先権主張番号	62/772,406		弁理士法人ユニアス国際特許事務所
(32)優先日	平成30年11月28日(2018.11.28)		バーサル、ラフェット
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
前置審査			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 機能および抑制性環境に対する抵抗性を増強するための免疫細胞のマルチブレックスゲノム編集

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

NK細胞の2つ又は3つの遺伝子を破壊するためのインピトロの方法であって、前記NK細胞が、キメラ抗原受容体(CAR)および/またはT細胞受容体(TCR)を発現し、かつ

(a a)前記2つの遺伝子は、

(a)NKG2AおよびCISH、(b)NKG2AおよびTGFBR1I、(c)CISHおよびTGFBR1I、(j)CISHおよびTIGIT、(q)CD47およびCISH、(r)CD47およびTGFBR1I、(u)CD47およびTIGIT、(y)ADAM17およびCISH、(z)TGFBR1IおよびADAM17、(b1)SHP1およびCISH、(c1)CISHおよびTGFBR1I、(d1)SHP1およびTGFBR1I、ならびに(e1)SHP1およびTIGITからなる群より選択され、又は

(b b)前記3つの遺伝子は、NKG2A、CISH、TGFBR1I、TIGIT、CD96、CD47、SHP1、及びADAM17からなる群から選択される、方法。

## 【請求項2】

前記破壊が、各遺伝子に対するガイドRNA(gRNA)をNK細胞に導入することを含む、請求項1に記載の方法。

## 【請求項3】

前記3つの遺伝子が、(1)NKG2A、CISHおよびTGFBRII、(3)TGFBRII、CD96およびTIGIT、(4)TGFBR2、CISHおよびTIGIT、(9)CD47、CISHおよびTGFBRII、(11)TGFBRII、CD47およびTIGIT、(14)TGFBRII、CISHおよびADAM17、(17)SHP1、CISHおよびTGFBRII、(18)TGFBRII、CISHおよびSHP1、及び(19)TGFBRII、SHP1およびTIGITからなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

RNAガイドエンドヌクレアーゼを導入する工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、Cas9である、請求項4に記載の方法。

10

【請求項6】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼを導入する工程が、前記RNAガイドエンドヌクレアーゼをコードする核酸を前記NK細胞に導入する工程を含む、請求項4に記載の方法。

【請求項7】

前記核酸が、mRNAである、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

NK細胞の遺伝子を破壊するためのインピトロの方法であって、

前記NK細胞が、キメラ抗原受容体(CAR)および/またはT細胞受容体(TCR)  
を発現し、かつ

20

前記遺伝子が、以下のサブグループのうちの2つを含む、方法：

(a)NKG2AおよびCISH、(b)NKG2AおよびTGFBRII、(c)CISHおよびTGFBRII、(e)TIGITおよびTGFBRII、(g)CD96およびTGFBRII、(i)CD96およびTIGIT、(j)CISHおよびTIGIT、(q)CD47およびCISH、(r)CD47およびTGFBRII、(u)CD47およびTIGIT、(y)ADAM17およびCISH、(z)TGFBRIIおよびADAM17、(b1)SHP1およびCISH、(c1)CISHおよびTGFBRII、(d1)SHP1およびTGFBRII、ならびに(e1)SHP1およびTIGIT。

【請求項9】

30

NK細胞の遺伝子を破壊するためのインピトロの方法であって、

前記NK細胞が、キメラ抗原受容体(CAR)および/またはT細胞受容体(TCR)  
を発現し、かつ

前記遺伝子が、以下のサブグループのうちの2つを含む、方法：

前記遺伝子が、以下のサブグループのうちの1つ

(a)NKG2AとCISH、(b)NKG2AとTGFBRII、(c)CISHとTGFBRII、(e)TIGITとTGFBRII、(g)CD96とTGFBRII、(i)CD96とTIGIT、(j)CISHとTIGIT、(q)CD47とCISH、(r)CD47とTGFBRII、(u)CD47とTIGIT、(y)ADAM17とCISH、(z)TGFBRIIとADAM17、(b1)SHP1とCISH、(c1)CISHとTGFBRII、(d1)SHP1とTGFBRII、および(e1)SHP1とTIGIT

40

および

以下のサブグループのうちの1つ：(1)NKG2A、CISH、およびTGFBRII、(3)TGFBRII、CD96、およびTIGIT、(4)TGFBR2、CISH、およびTIGIT、(9)CD47、CISH、およびTGFBRII、(11)TGFBRII、CD47、およびTIGIT、(14)TGFBRII、CISH、およびADAM17、(17)SHP1、CISH、およびTGFBRII、(18)TGFBRII、CISH、およびSHP1、ならびに(19)TGFBRII、SHP1、およびTIGIT。

50

## 【請求項 10】

NK細胞の遺伝子を破壊するためのインビトロの方法であって、  
前記NK細胞が、キメラ抗原受容体(CAR)および/またはT細胞受容体(TCR)  
を発現し、かつ

前記遺伝子が、以下のサブグループのうちの2つを含む、方法：

(1) NKG2A、CISH、およびTGFBR1I、(3) TGFBR1I、CD96  
 、およびTIGIT、(4) TGFBR2、CISH、およびTIGIT、(5) TIM  
 3、CISH、およびTGFBR1I、(9) CD47、CISH、およびTGFBR1I、  
 (11) TGFBR1I、CD47、およびTIGIT、(14) TGFBR1I、  
 CISH、およびADAM17、(17) SHP1、CISH、およびTGFBR1I、  
 (18) TGFBR1I、CISH、およびSHP1、ならびに(19) TGFBR1I  
 、SHP1、およびTIGIT。

## 【請求項 11】

前記破壊が、同時である、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記NK細胞が、ウイルス特異的である、請求項2に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記NK細胞が、末梢血、臍帯血、骨髄またはそれらの混合物に由来する、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 14】

前記臍帯血が、2単位以上の個々の臍帯血単位からプールされている、請求項13に記載の方法。

## 【請求項 15】

導入が、トランスフェクトまたは形質導入を含む、請求項2に記載の方法。

## 【請求項 16】

導入が、エレクトロポレーションを含む、請求項2に記載の方法。

## 【請求項 17】

エレクトロポレーションが、1回より多く行われる、請求項16に記載の方法。

## 【請求項 18】

2回のエレクトロポレーションが行われる、請求項16に記載の方法。

## 【請求項 19】

第1の群のCRISPR gRNAが、第1のエレクトロポレーションにおいて導入され、第2の群のCRISPR gRNAが、2回目のエレクトロポレーションにおいて導入される、請求項18に記載の方法。

## 【請求項 20】

前記第1の群および/または第2の群のCRISPR gRNAが、1つ、2つ、3つまたは4つのCRISPR gRNAを含む、請求項19に記載の方法。

## 【請求項 21】

2つのCRISPR gRNAが、第1のエレクトロポレーションにおいて導入され、2つのCRISPR gRNAが、2回目のエレクトロポレーションにおいて導入される、請求項18に記載の方法。

## 【請求項 22】

NK細胞遺伝子を破壊するためのインビトロの方法であって、

前記NK細胞が、キメラ抗原受容体(CAR)および/またはT細胞受容体(TCR)  
を発現し、かつ

前記方法がNKG2A、CD47、TGFBR2およびCISH；NKG2A、TGFBR1IおよびCISH；又はADAM17、TGFBR1I NKG2AおよびSHP1を破壊する工程

を含む、方法。

## 【請求項 23】

10

20

30

40

50

前記破壊によって、前記NK細胞の抗腫瘍細胞傷害性の増強、インビオ増殖、インビオ持続性および／または機能の改善がもたらされる、請求項1に記載の方法。

【請求項24】

前記NK細胞が、IFN- $\gamma$ 、CD107および／またはTNF- $\alpha$ の分泌を増加させている、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記NK細胞が、パーフォリンおよび／またはグランザイムBの産生を増加させている、請求項23に記載の方法。

【請求項26】

NK細胞の2つ又は3つの遺伝子の発現が妨害されたNK細胞であって、ここで、NK細胞は、キメラ抗原受容体(CAR)および／またはT細胞受容体(TCR)を発現しており、以下のいずれかである

(a a) 前記2つの遺伝子は、

(a) NKG2AおよびCISH、(b) NKG2AおよびTGFBR1I、(c) CISHおよびTGFBR1I、(j) CISHおよびTIGIT、(q) CD47およびCISH、(r) CD47およびTGFBR1I、(u) CD47およびTIGIT、(y) ADAM17およびCISH、(z) TGFBR1IおよびADAM17、(b1) SHP1およびCISH、(c1) CISHおよびTGFBR1I、(d1) SHP1およびTGFBR1I、ならびに(e1) SHP1およびTIGITからなる群より選択され、又は

(b b) 前記3つの遺伝子は、NKG2A、CISH、TGFBR2、TIGIT、CD96、CD47、SHP1、ADAM17、からなる群から選択されるNK細胞。

【請求項27】

前記NK細胞が、ウイルス特異的である、請求項26に記載の細胞。

【請求項28】

前記NK細胞が、末梢血、臍帯血、骨髄またはそれらの混合物から単離される、請求項26に記載の細胞。

【請求項29】

前記臍帯血が、2単位以上の個々の臍帯血単位からプールされている、請求項28に記載の細胞。

【請求項30】

NK細胞の遺伝子の発現が妨害されたNK細胞であって、ここで、NK細胞は、キメラ抗原受容体(CAR)および／またはT細胞受容体(TCR)を発現しており、

前記NK細胞のNKG2A、CD47、TGF- $\beta$ 2およびCISH又は；前記NK細胞のNKG2A、TGFBR2およびCISH；又は前記NK細胞のADAM17、TGFBR2、NKG2AおよびSHP1、が破壊されている細胞。

【請求項31】

前記NK細胞が、抗腫瘍細胞傷害性の増強、インビオ増殖、インビオ持続性および／または機能の改善を有する、請求項26に記載の細胞。

【請求項32】

前記NK細胞のIFN- $\gamma$ 、CD107および／またはTNF- $\alpha$ の分泌を増加させている、請求項26に記載の細胞。

【請求項33】

前記NK細胞が、パーフォリンおよび／またはグランザイムBの産生を増加させている、請求項26に記載の細胞。

【請求項34】

前記CARが、前記細胞の内在性の阻害性遺伝子の遺伝子座に挿入されている、請求項26に記載の細胞であって、

前記阻害性遺伝子の遺伝子座が、NKG2A、CISH、TGFBR2、TIGIT、

10

20

30

40

50

CD96、CD47、SHIP1、ADAM17、からなる群より選択される、細胞。

【請求項35】

前記CARが、前記阻害性遺伝子の内在性プロモーターの支配下にある、請求項34に記載の細胞。

【請求項36】

前記CARが、CRISP R媒介性の遺伝子編集によって、前記阻害性遺伝子の遺伝子座に挿入された、請求項34に記載の細胞。

【請求項37】

前記CARが、F(ab')2、Fab'、Fab、FvおよびscFvからなる群より選択される抗原結合ドメインを含む、請求項26に記載の細胞。

【請求項38】

前記CARが、CD19、CD319(CS1)、ROR1、CD20、癌胎児抗原、アルファフェトプロテイン、CA-125、MUC-1、上皮性腫瘍抗原、黒色腫関連抗原、変異型p53、変異型ras、HER2/Neu、ERBB2、葉酸結合タンパク質、HIV-1エンベロープ糖タンパク質gp120、HIV-1エンベロープ糖タンパク質gp41、GD2、CD5、CD123、CD23、CD30、CD56、c-Met、メソテリン、GD3、HERV-K、IL-11Rアルファ、カッパー鎖、ラムダ鎖、CSPG4、ERBB2、WT-1、TRAIL/DR4、VEGFR2、CD33、CD47、CLL-1、U5snRNP200、CD200、BAFF-R、BCMAおよびCD99からなる群より選択される1つ以上の腫瘍関連抗原を標的化する、請求項26に記載の細胞。

10

【請求項39】

前記CARが、CD3、CD28、OX40/CD134、4-1BB/CD137、Fc RI、ICOS/CD278、ILRB/CD122、IL-2RG/CD132、DAP12、CD70およびCD40からなる群より選択される少なくとも1つのシグナル伝達ドメインを含む、請求項26に記載の細胞。

【請求項40】

前記細胞が、IL-7、IL-2、IL-15、IL-12、IL-18、IL-21およびそれらの組み合わせからなる群より選択される異種サイトカインを発現するように操作されている、請求項26に記載の細胞。

20

【請求項41】

前記細胞が、自殺遺伝子をさらに含む、請求項26に記載の細胞。

【請求項42】

前記自殺遺伝子が、膜結合型腫瘍壊死因子(TNF)-アルファ変異遺伝子である、請求項41に記載の細胞。

【請求項43】

CAR、および/又はTCR、阻害性遺伝子配列に対するgRNAをコードする発現ベクターであって、

前記阻害性遺伝子配列が、

(aa)2つの遺伝子であり、

(a)NKG2AおよびCISH、(b)NKG2AおよびTGFBR1I、(c)CISHおよびTGFBR1I、(j)CISHおよびTIGIT、(q)CD47およびCISH、(r)CD47およびTGFBR1I、(u)CD47およびTIGIT、(y)ADAM17およびCISH、(z)TGFBR1IおよびADAM17、(b1)SHP1およびCISH、(c1)CISHおよびTGFBR1I、(d1)SHP1およびTGFBR1I、(e1)SHP1およびTIGIT、ならびに(f1)SHP1およびTIM3からなる群より選択され、又は

(bb)3つの遺伝子であり、NKG2A、CISH、TGFBR2、TIGIT、CD47、SHP1、ADAM17、CD96からなる群から選択される、阻害性遺伝子に由来する、ベクター。

30

40

50

**【請求項 4 4】**

前記 g R N A が、前記阻害性遺伝子に特異的である、請求項 4\_3 に記載のベクター。

**【請求項 4 5】**

前記ベクターが、レトロウイルスベクターである、請求項 4\_3 に記載のベクター。

**【請求項 4 6】**

前記ベクターが、A A V ベクターである、請求項 4\_3 に記載のベクター。

**【請求項 4 7】**

前記 C A R が、前記阻害性遺伝子に対する相同性アームに隣接している、請求項 4\_3 に記載のベクター。

**【請求項 4 8】**

請求項 4\_3 に記載のベクターを発現するように操作された、宿主細胞。

10

**【請求項 4 9】**

前記細胞が、T 細胞、N K 細胞、B 細胞または幹細胞である、請求項 4\_8 に記載の細胞。

**【請求項 5 0】**

前記細胞が、請求項 2\_6 に記載の細胞である、請求項 4\_9 に記載の細胞。

**【請求項 5 1】**

請求項 2\_6 ~ 4\_2 のいずれか一項に記載の N K 細胞の集団を含む、薬学的組成物。

**【請求項 5 2】**

被験体における免疫関連障害、感染症または癌を処置するための、請求項 2\_6 ~ 4\_2 のいずれか一項に記載の細胞の集団を含む組成物。

20

**【請求項 5 3】**

前記免疫関連障害が、自己免疫障害、移植片対宿主病、同種移植片拒絶または炎症状態である、請求項 5\_2 に記載の組成物。

**【請求項 5 4】**

前記免疫関連障害が、炎症状態であり、前記 N K 細胞が、糖質コルチコイドレセプターの発現を本質的に有しない、請求項 5\_2 に記載の組成物。

**【請求項 5 5】**

前記 N K 紡錐が、前記被験体に対して自己又は同種である、請求項 5\_2 に記載の組成物。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】**

30

**【0 0 0 1】****(関連出願の相互参照)**

本願は、2018年11月28日出願の米国仮特許出願第 6 2 / 7 7 2 , 4 0 6 号に対する優先権を主張する。この仮出願は、その全体が参照により本明細書中に援用される。

**【0 0 0 2】**

本開示は、概して、免疫学、細胞生物学、分子生物学および医学の分野に関する。より詳細には、本発明は、免疫細胞のマルチブレックス編集およびその使用方法に関する。

**【背景技術】****【0 0 0 3】**

細胞免疫療法は、癌を処置できる大きな可能性を秘めている。しかしながら、ほとんどの免疫療法のアプローチが、単独で適用されたとき、悪性腫瘍、特に固形腫瘍の大部分に対する価値は限定的である。この成功が限定的である理由としては、腫瘍細胞の表面上での腫瘍抗原の発現が低く、免疫系による腫瘍細胞の検出が低下していること、免疫細胞の不活性化を誘導する阻害性レセプター（例えば、P D 1、N K G 2 A、T I G I T または C I S H ）に対するリガンドが発現していること；および免疫応答を抑制し、腫瘍細胞の増殖および生存を促進する物質（例えば、トランスフォーミング成長因子 - ( T G F ) およびアデノシン）を放出する細胞（例えば、制御性 T 細胞または骨髄系由来サプレッサー細胞）が微小環境において誘導されることが挙げられる。このように、細胞免疫療法の方法の改善に対するニーズが未だ対処されていない。

40

**【発明の概要】**

50

## 【0004】

本開示は、操作された免疫細胞を特に含む癌免疫療法に関する組成物および方法を提供する。具体的な実施形態は、1つ、2つまたはそれ以上の遺伝子の発現を欠くようにまたはその発現を低下させるように人間の手によって改変されたある特定の免疫細胞に関し、具体的な場合において、そのような改変を有する細胞は、抗原レセプターのような非天然のタンパク質を含む1つ以上の異種タンパク質も発現する。非天然の免疫細胞を作製する方法も含まれる。ある特定の場合において、異種抗原レセプターの導入は、発現が低減または排除される遺伝子のゲノム遺伝子座において行われる。

## 【0005】

1つの実施形態において、本開示は、免疫細胞の少なくとも2つの遺伝子を破壊するためのインビトロ方法を提供し、その少なくとも2つの遺伝子は、NKG2A、SIGLE C-7、LAG3、TIM3、CISH、FOXO1、TGFBR2、TIGIT、CD96、ADORA2、NR3C1、PD1、PDL-1、PDL-2、CD47、SIRPA、SHIP1、ADAM17、RPS6、4EBP1、CD25、CD40、IL21R、ICAM1、CD95、CD80、CD86、IL10R、CD5、CD7およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。特定の態様において、3つ、4つ、5つもしくは6つまたはそれ以上の遺伝子が破壊される。具体的な態様において、2つ以上の遺伝子の破壊は、同じ方法工程における破壊など、同時である。その方法は、各遺伝子に対するガイドRNA(gRNA)を免疫細胞に導入する工程を含み得る。

## 【0006】

上記方法は、例えば以下の特徴の組み合わせ：(a) NKG2AおよびCISH、(b) NKG2AおよびTGFBR2I、(c) CISHおよびTGFBR2I、(d) TIGITおよびFOXO1、(e) TIGITおよびTGFBR2I、(f) CD96およびFOXO1、(g) CD96およびTGFBR2I、(h) FOXO1およびTGFBR2I、(i) CD96およびTIGIT、(j) CISHおよびTIGIT、(k) TIM3およびCISH、(l) TIM3およびTGFBR2I、(m) FOXO1およびTGFBR2I、(n) TIM3およびTIGIT、(o) SIGLEC7およびCISH、(p) SIGLEC7およびTGFBR2I、(q) CD47およびCISH、(r) CD47およびTGFBR2I、(s) SIRPAおよびCISH、(t) SIRPAおよびTGFBR2I、(u) CD47およびTIGIT、(v) CD47およびSIRPA、(w) A2ARおよびCISH、(x) A2ARおよびTGFBR2I、(y) ADAM17およびCISH、(z) TGFBR2IおよびADAM17、(a) A2ARおよびTIGIT、(b) SHP1およびCISH、(c) CISHおよびTGFBR2I、(d) SHP1およびTGFBR2I、(e) SHP1およびTIGIT、または(f) SHP1およびTIM3のノックダウンを含み得る。上記方法は、(1) NKG2A、CISHおよびTGFBR2I、(2) TIGIT、FOXO1およびTGFBR2I、(3) TGFBR2I、CD96およびTIGIT、(4) TGFBR2、CISHおよびTIGIT、(5) TIM3、CISHおよびTGFBR2I、(6) CD96、FOXO1およびTGFBR2I、(7) TGFBR2I、TIM3およびTIGIT、(8) SIGLEC7、CISHおよびTGFBR2I、(9) CD47、CISHおよびTGFBR2I、(10) SIRPA、CISHおよびTGFBR2I、(11) TGFBR2I、CD47およびTIGIT、(12) TGFBR2I、CD47およびSIRPA、(13) A2AR、CISHおよびTGFBR2I、(14) TGFBR2I、CISHおよびADAM17、(15) TGFBR2I、TIM3およびTIGIT、(16) TGFBR2I、A2ARおよびTIGIT、(17) SHP1、CISHおよびTGFBR2I、(18) TGFBR2I、CISHおよびSHP1、(19) TGFBR2I、SHP1およびTIGIT、または(20) TGFBR2I、SHP1およびTIM3のノックダウンを含み得る。任意の上記サブグループを、上に開示されたような第2のサブグループと組み合わせてもよい。例えば、サブグループa～j1のいずれか1つが、他のサブグループa～j1のうちのいずれか1つ以上と組み合わされ得

10

20

30

40

50

るか、サブグループ a ~ j 1 のいずれか 1 つ以上が、他のサブグループ 1 ~ 2 3 のいずれか 1 つ以上と組み合わされ得るか、またはサブグループ 1 ~ 2 3 のいずれか 1 つ以上が、他のサブグループ 1 ~ 2 3 のいずれか 1 つ以上と組み合わされ得る。

【 0 0 0 7 】

いくつかの態様において、上記方法は、C a s 9 などの R N A ガイドエンドヌクレアーゼを上記細胞に導入する工程をさらに含む。 R N A ガイドエンドヌクレアーゼの導入は、 R N A ガイドエンドヌクレアーゼをコードする核酸（例えば、m R N A ）を上記免疫細胞に導入することを含み得る。

【 0 0 0 8 】

ある特定の態様において、免疫細胞は、T 細胞、 N K 細胞、 B 細胞、マクロファージ、 N K T 細胞または幹細胞である。代替の場合において、免疫細胞は、 C A R T 細胞ではないなど、 T 細胞ではない。いくつかの態様において、免疫細胞は、1 つ以上のキメラ抗原レセプター（ C A R ）および / または 1 つ以上の T 細胞レセプター（ T C R ）を発現するように操作されている。免疫細胞は、ウイルス特異的 T 細胞など、ウイルス特異的であり得る。 T 細胞は、制御性 T 細胞であり得る。 B 細胞は、制御性 B 細胞であり得る。いくつかの態様において、幹細胞は、間葉系幹細胞（ M S C ）または人工多能性幹（ i P S ）細胞である。特定の態様において、 T 細胞は、 C D 8 + T 細胞、 C D 4 + T 細胞またはガンマ - デルタ T 細胞である。免疫細胞は、末梢血、臍帯血、骨髄またはそれらの混合物から単離され得る。いくつかの態様において、臍帯血は、2 単位以上の個々の臍帯血単位からプールされている。

10

【 0 0 0 9 】

いくつかの態様において、導入工程は、トランسفェクトまたは形質導入を含む。例えば、導入は、2 回以上行われ得るエレクトロポレーション、例えば、2 回または 3 回のエレクトロポレーションを含む。いくつかの態様において、第 1 の群の C R I S P R g R N A が、第 1 のエレクトロポレーションにおいて導入され、第 2 の群の C R I S P R g R N A が、2 回目のエレクトロポレーションにおいて導入される。具体的な場合において、第 1 の群の C R I S P R g R N A は、第 2 の群の C R I S P R g R N A と異なる。特定の態様において、第 1 の群および / または第 2 の群の C R I S P R g R N A は、1 つ、2 つ、3 つまたは 4 つ以上の C R I S P R g R N A を含む。いくつかの態様において、2 つの C R I S P R g R N A が、第 1 のエレクトロポレーションにおいて導入され、異なる 2 つの C R I S P R g R N A が、2 回目のエレクトロポレーションにおいて導入される。具体的な実施形態では、ある群の C R I S P R g R N A が、ある群の g R N A を含み、そのうちの少なくとも 2 つは、異なる遺伝子を標的化し、特定の実施形態では、その群の g R N A はそれぞれ、異なる遺伝子を標的化する。

20

30

【 0 0 1 0 】

特定の態様において、上記方法は、 N K G 2 A 、 C D 4 7 、 T G F R 2 および C I S H ； N K G 2 A 、 C I S H 、 T G F R 2 および A D O R A 2 ； N K G 2 A 、 T G F R 2 および C I S H ； T I G I T 、 C D 9 6 、 C I S H および A D O R A 2 ；または A D A M 1 7 、 T G F R 2 、 N K G 2 A および S H P 1 を破壊する工程を含む。

40

【 0 0 1 1 】

いくつかの態様では、破壊によって、免疫細胞の抗腫瘍細胞傷害性の増強、インビオ増殖、インビオ持続性および / または機能の改善がもたらされる。特定の態様において、その免疫細胞は、改変が無い場合と比べて、 I F N - 、 C D 1 0 7 および / または T N F の分泌を増加させている。いくつかの態様において、その免疫細胞は、改変が無い場合と比べて、パーフォリンおよび / またはグランザイム B の産生を増加させている。

【 0 0 1 2 】

追加の態様において、上記方法は、 C A R および / または T C R を免疫細胞に導入する工程（例えば、 C A R および / または T C R をコードする核酸を免疫細胞に導入する工程）をさらに含む。いくつかの態様において、その核酸は、レトロウイルスベクターなどの発現ベクター内に存在する。ある特定の態様において、そのベクターは、 A A V 6 などの

50

アデノウイルス関連ベクターである。いくつかの態様において、そのベクターは、NKG2A、SINGLEC-7、LAG3、TIM3、CISH、FOXO1、TGFBR2、TIGIT、CD96、ADORA2、NR3C1、PD1、PDL-1、PDL-2、CD47、SIRPA、SHIP1、ADAM17、RPS6、4EBP1、CD25、CD40、IL21R、ICAM1、CD95、CD80、CD86、IL10R、CD5、CD7およびそれらの組み合わせからなる群より選択される阻害性遺伝子配列などの阻害性遺伝子配列をさらに含む。特定の態様において、そのベクターは、阻害性遺伝子に対するガイドRNAをさらに含む。CARは、阻害性遺伝子に対する相同性アームに隣接していることがある。いくつかの態様において、CAR配列を含むベクターを導入することにより、免疫細胞の阻害性遺伝子の遺伝子座（例えば、阻害性遺伝子のエキソン）にCARが挿入され、そのCARは、阻害性遺伝子の内在性プロモーターの支配下になる。特定の態様において、ベクターの導入は、阻害性遺伝子の発現をさらに妨害する。

#### 【0013】

別の実施形態では、免疫細胞の少なくとも2つの遺伝子の発現が妨害された免疫細胞（例えば、開示される実施形態の免疫細胞）が提供され、その免疫細胞は、各遺伝子に対するCRISPRガイドRNA（gRNA）を前記免疫細胞に導入することを含む工程によって少なくとも作製され、少なくとも2つの遺伝子は、NKG2A、SINGLEC-7、LAG3、TIM3、CISH、FOXO1、TGFBR2、TIGIT、CD96、ADORA2、NR3C1、PD1、PDL-1、PDL-2、CD47、SIRPA、SHIP1、ADAM17、RPS6、4EBP1、CD25、CD40、IL21R、ICAM1、CD95、CD80、CD86、IL10R、CD5、CD7およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。いくつかの態様において、3つ、4つ、5つもしくは6つまたはそれ以上の遺伝子が、破壊される。

#### 【0014】

ある特定の態様において、免疫細胞は、T細胞、NK細胞、B細胞または幹細胞である。いくつかの態様において、免疫細胞は、キメラ抗原レセプター（CAR）および/またはT細胞レセプター（TCR）を発現するように操作されている。免疫細胞は、ウイルス特異的T細胞など、ウイルス特異的であり得る。T細胞は、制御性T細胞であり得る。B細胞は、制御性B細胞であり得る。いくつかの態様において、幹細胞は、間葉系幹細胞（MSC）または人工多能性幹（iPS）細胞である。特定の態様において、T細胞は、CD8<sup>+</sup>T細胞、CD4<sup>+</sup>T細胞またはガンマ-デルタT細胞である。免疫細胞は、末梢血、臍帯血または骨髄から単離され得る。いくつかの態様において、臍帯血は、2単位以上の個々の臍帯血単位からプールされている。

#### 【0015】

特定の態様において、上記方法は、特定の遺伝子群（例えば、NKG2A、CD47、TGF-R2およびCISH；NKG2A、CISH、TGF-R2およびADORA2；NKG2A、TGF-R2およびCISH；TIGIT、CD96、CISHおよびADORA2；またはADAM17、TGF-R2 NKG2AおよびSHP1）を破壊する工程を含む。

#### 【0016】

いくつかの態様では、破壊によって、免疫細胞の抗腫瘍細胞傷害性の増強、インビオ増殖、インビオ持続性および/または機能の改善がもたらされる。特定の態様において、その免疫細胞は、IFN- $\gamma$ 、CD107および/またはTNF $\alpha$ の分泌を増加させている。いくつかの態様において、その免疫細胞は、パーフォリンおよび/またはグランザイムBの産生を増加させている。

#### 【0017】

いくつかの態様において、上記細胞は、CARおよび/またはTCRを発現するように操作されている。CARは、例えば、その細胞の内在性の阻害性遺伝子の遺伝子座に挿入され得、阻害性遺伝子の遺伝子座は、NKG2A、SINGLEC-7、LAG3、TIM3、CISH、FOXO1、TGFBR2、TIGIT、CD96、ADORA2、NR

10

20

30

40

50

3 C 1、P D 1、P D L - 1、P D L - 2、C D 4 7、S I R P A、S H I P 1、A D A M 1 7、R P S 6、4 E B P 1、C D 2 5、C D 4 0、I L 2 1 R、I C A M 1、C D 9 5、C D 8 0、C D 8 6、I L 1 0 R、C D 5、C D 7 およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。いくつかの態様において、C A Rは、阻害性遺伝子の内在性プロモーターの支配下にある。ある特定の態様において、C A Rは、C R I S P R 媒介性の遺伝子編集によって、阻害性遺伝子の遺伝子座に挿入される。

【0018】

いくつかの態様において、C A Rは、F ( a b ' ) 2、F a b '、F a b、F v およびs c F v からなる群より選択される抗原結合ドメインを含む。ある特定の態様において、C A Rは、C D 1 9、C D 3 1 9 ( C S 1 )、R O R 1、C D 2 0、癌胎児抗原、アルファフェトプロテイン、C A - 1 2 5、M U C - 1、上皮性腫瘍抗原、黒色腫関連抗原、変異型p 5 3、変異型r a s、H E R 2 / N e u、E R B B 2、葉酸結合タンパク質、H I V - 1 エンベロープ糖タンパク質g p 1 2 0、H I V - 1 エンベロープ糖タンパク質g p 4 1、G D 2、C D 5、C D 1 2 3、C D 2 3、C D 3 0、C D 5 6、c - M e t、メソテリン、G D 3、H E R V - K、I L - 1 1 Rアルファ、カッパー鎖、ラムダ鎖、C S P G 4、E R B B 2、W T - 1、T R A I L / D R 4、V E G F R 2、C D 3 3、C D 4 7、C L L - 1、U 5 s n R N P 2 0 0、C D 2 0 0、B A F F - R、B C M A、C D 9 9 およびそれらの組み合わせからなる群より選択される1つ以上の腫瘍関連抗原を標的化する。特定の態様において、C A Rは、C D 3 、C D 2 8、O X 4 0 / C D 1 3 4、4 - 1 B B / C D 1 3 7、F c R I 、I C O S / C D 2 7 8、I L R B / C D 1 2 2、I L - 2 R G / C D 1 3 2、D A P 1 2、C D 7 0、C D 4 0 およびそれらの組み合わせからなる群より選択される少なくとも1つのシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、免疫細胞は、1つ以上の異種サイトカイン（例えば、I L - 7、I L - 2、I L - 1 5、I L - 1 2、I L - 1 8 およびI L - 2 1 の1つ以上）を含む。ある特定の態様において、C A Rは、膜結合型非分泌性T N F - アルファ変異体または誘導性カスパーゼ9などの自殺遺伝子をさらに含む。

【0019】

少なくとも1つのC A Rおよび/またはT C R、少なくとも1つの阻害性遺伝子配列ならびに少なくとも1つのg R N Aをコードする発現ベクターがさらに本明細書中に提供される。いくつかの態様において、その阻害性遺伝子配列は、N K G 2 A、S I G L E C - 7、L A G 3、T I M 3、C I S H、F O X O 1、T G F B R 2、T I G I T、C D 9 6、A D O R A 2、N R 3 C 1、P D 1、P D L - 1、P D L - 2、C D 4 7、S I R P A、S H I P 1、A D A M 1 7、R P S 6、4 E B P 1、C D 2 5、C D 4 0、I L 2 1 R、I C A M 1、C D 9 5、C D 8 0、C D 8 6、I L 1 0 R、C D 5 およびC D 7 からなる群より選択される阻害性遺伝子由来である。特定の態様において、g R N Aは、阻害性遺伝子に特異的である。いくつかの態様において、ベクターは、A A Vベクターなどのウイルスベクターである。C A Rは、阻害性遺伝子に対する相同性アームに隣接していることがある。上記実施形態のベクターを発現するように操作された宿主細胞（例えば、実施形態の細胞）も本明細書中に提供される。態様において、その細胞は、T 細胞、N K 細胞、B 細胞または幹細胞である。

【0020】

開示される実施形態の免疫細胞の集団を含む薬学的組成物も本明細書中に提供される。別の実施形態は、免疫関連障害、感染症および/または癌を処置するための、開示される実施形態の細胞の集団を含む組成物を提供する。

【0021】

さらなる実施形態では、被験体の疾患または障害を処置する方法が提供され、その方法は、有効量の開示される実施形態の免疫細胞をその被験体に投与する工程を含む。いくつかの態様において、その疾患または障害は、感染症、癌（例えば、固形癌または血液悪性腫瘍）または免疫関連障害である。免疫関連障害は、例えば、自己免疫障害、移植片対宿主病、同種移植片拒絶または炎症状態であり得る。いくつかの態様において、免疫関連障

10

20

30

40

50

害は、炎症状態であり、免疫細胞は、糖質コルチコイドレセプターの発現を本質的に有しない。ある特定の態様において、免疫細胞は、レシピエント個体に対して自己または同種異系である。

【0022】

追加の態様において、上記方法は、免疫細胞を投与される個体に少なくとも第2の治療薬を投与する工程をさらに含む。いくつかの態様において、その少なくとも第2の治療薬には、化学療法、免疫療法、手術、放射線療法、ホルモン療法または生物療法が含まれる。ある特定の態様において、免疫細胞および/または少なくとも第2の治療薬は、静脈内に、腹腔内に、気管内に、腫瘍内に、筋肉内に、内視鏡的に、病巣内に、経皮的に、皮下に、領域性に、または直接注射もしくは灌流によって、投与される。

10

【0023】

別の実施形態は、CARを発現するように免疫細胞を操作するための方法を提供し、その方法は、CRISPR gRNAを使用して、そのCARをその免疫細胞の阻害性遺伝子の遺伝子座に挿入する工程を含む。いくつかの態様において、CARは、発現ベクター（例えば、レトロウイルスベクター、プラスミド、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルス関連ウイルスベクターなど）によってコードされる。ある特定の態様において、ウイルスベクターは、AAV6などのアデノウイルス関連ベクターである。

【0024】

いくつかの態様において、上記ベクターは、NKG2A、SIGLEC-7、LAG3、TIM3、CISH、FOXO1、TGFBR2、TIGIT、CD96、ADORA2、NR3C1、PD1、PDL-1、PDL-2、CD47、SIRPA、SHIP1、ADAM17、RPS6、4EBP1、CD25、CD40、IL21R、ICAM1、CD95、CD80、CD86、IL10R、CD5、CD7およびそれらの組み合わせからなる群より選択される阻害性遺伝子配列などの阻害性遺伝子配列をさらに含む。いくつかの態様において、CRISPR gRNAは、阻害性遺伝子に対するものである。ある特定の態様において、CARは、阻害性遺伝子に対する相同性アームに隣接している。特定の態様において、CARは、阻害性遺伝子の任意の部分（例えば、阻害性遺伝子のエキソン）において、その阻害性遺伝子の遺伝子座に挿入される。CARは、阻害性遺伝子の内在性プロモーターの支配下であり得る。具体的な態様において、CARは、阻害性遺伝子の発現を妨害する。

20

【0025】

いくつかの態様において、CARは、CD19、CD319(CS1)、ROR1、CD20、癌胎児抗原、アルファフェトプロテイン、CA-125、MUC-1、上皮性腫瘍抗原、黒色腫関連抗原、変異型p53、変異型ras、HER2/Neu、ERBB2、葉酸結合タンパク質、HIV-1エンベロープ糖タンパク質gp120、HIV-1エンベロープ糖タンパク質gp41、GD2、CD5、CD123、CD23、CD30、CD56、c-Met、メソテリン、GD3、HERV-K、IL-11Rアルファ、カッパー鎖、ラムダ鎖、CSPG4、ERBB2、WT-1、TRAIL/DR4、VEGFR2、CD33、CD47、CLL-1、U5snRNP200、CD200、BAFF-R、BCMA、CD99およびそれらの組み合わせからなる群より選択される1つ以上の腫瘍関連抗原を標的化する。特定の態様において、CARは、CD3、CD28、OX40/CD134、4-1BB/CD137、Fc RI、ICOS/CD278、ILRB/CD122、IL-2RG/CD132、DAP12、CD70およびCD40からなる群より選択される少なくとも1つのシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、CARをコードするベクターは、サイトカイン（例えば、IL-7、IL-2、IL-15、IL-12、IL-18、IL-21またはそれらの組み合わせ）もコードする。代替の場合において、そのサイトカインは、CARをコードするベクターとは別個のベクター上に存在する。ある特定の態様において、CARをコードする発現構築物は、自殺遺伝子（例えば、誘導性カスパーゼ9または膜結合型非分泌性TNF-アル

30

40

50

ファ变異体)をさらに含む。

【0026】

本方法によって作製される免疫細胞などの免疫細胞の阻害性遺伝子に少なくとも1つのCARが挿入されている免疫細胞が、さらに本明細書中に提供される。本開示の実施形態の免疫細胞の集団(例えば、T細胞、B細胞、NK細胞、NKT細胞、マクロファージ、幹細胞の集団、それらの混合物などの集団)を含む組成物も本明細書中に提供される。

【0027】

別の実施形態は、上記実施形態の細胞の集団を含む組成物を提供し、ある特定の実施形態において、その集団は、任意の種類の病状の処置のために(少なくとも、免疫関連障害、感染症および/または癌の処置などのために)利用される。

10

【0028】

さらなる実施形態は、被験体の疾患または障害を処置する方法を提供し、その方法は、有効量の上記実施形態の免疫細胞をその被験体に投与する工程を含む。いくつかの態様において、その疾患または障害は、感染症；癌(例えば、固体癌または血液悪性腫瘍)；および/または免疫関連障害である。免疫関連障害は、いくつかの場合において、自己免疫障害、移植片対宿主病、同種移植片拒絶および/または炎症状態であり得る。いくつかの態様において、免疫関連障害は、炎症状態であり、免疫細胞は、糖質コルチコイドレセプターの発現を本質的に有しない。ある特定の態様において、免疫細胞は、レシピエント個体に対して自己または同種異系である。

【0029】

追加の態様において、上記方法は、少なくとも第2の治療薬を個体に投与する工程をさらに含む。いくつかの態様において、その少なくとも第2の治療薬には、化学療法、免疫療法、手術、放射線療法、ホルモン療法または生物療法が含まれる。ある特定の態様において、免疫細胞および/または少なくとも第2の治療薬は、静脈内に、腹腔内に、気管内に、腫瘍内に、筋肉内に、内視鏡的に、病巣内に、経皮的に、皮下に、領域性に、または直接注射もしくは灌流によって、投与される。免疫細胞および少なくとも第2の治療薬は、同時に投与されてもよいし、異なる時点において投与されてもよく、それらは、異なる時点において投与されるとき、または同時であるが同じ製剤としてではなく投与されるとき、同じ経路によって投与されてもよいし、そうでなくてもよい。

20

【0030】

本開示の他の目的、特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかになるだろう。しかしながら、この詳細な説明から当業者には本開示の趣旨および範囲内での様々な変更および改変が明らかになるので、その詳細な説明および具体例は、本開示の特定の実施形態を示すが、単に例証として与えられることを理解するべきである。

30

【0031】

以下の図面は、本明細書の一部を成し、本発明のある特定の態様をさらに実証するために含められる。本発明は、本明細書中に提示される具体的な実施形態の詳細な説明と併せてこれらの図面の1つ以上を参照することによって、より理解される可能性がある。

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1】CRISP/R/Cas9は、NK細胞において複数の遺伝子(NKG2A、CD47、TGFBR2およびCISH)の効率的な破壊を媒介する。この遺伝子セットでは、1回目のエレクトロポレーションにおいてNKG2AおよびCD47をノックアウトし、2回目のエレクトロポレーションにおいてCISHおよびTGFBR2を標的化した。両方の回のエレクトロポレーションについて、PCRおよびフローサイトメトリーを使用してノックアウト効率を検証することに成功した。フローパネル内の赤色(右側のピーク)および青色(左側のピーク)のヒストグラムは、それぞれ、CRISP/RKOの前および後のタンパク質の発現を表している。

40

【0033】

【図2】別の遺伝子セット(TIGIT(T)、CD96(C)、CISH(CH)、ア

50

デノシン (A) ) を用いた、NK細胞におけるマルチプレックス遺伝子編集の検証。この遺伝子セットでは、1回目のエレクトロポレーションにおいてTIGITおよびCD96をノックアウトし、2回目のエレクトロポレーションにおいてCISHおよびアデノシンを標的化した。両方の回のエレクトロポレーションについて、PCRおよびフローサイトメトリーを使用してノックアウト効率を検証することに成功した。フローパネル内の赤色(右側のピーク)および青色(左側のピーク)のヒストグラムは、それぞれ、CRISP RKOの前および後のタンパク質の発現を表している。

【0034】

【図3】NK細胞において複数の遺伝子 (NKG2A、CD47、TGFBR2およびCISH) を破壊することにより、標的腫瘍細胞に対する機能が高まる。標的細胞株による刺激後に、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  およびCD107の分泌が増大した。プレフェルジンAの存在下において標的細胞株で5時間、共刺激された様々なNK細胞(編集済み 対 Cas9のみ)を用いて、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  およびCD107産生のフローサイトメトリー解析を行った。

10

【0035】

【図4A】NK細胞において複数の遺伝子 (NKG2A、CD47、TGFBR2およびCISH) を破壊することにより、抗腫瘍細胞傷害性が高まる。遺伝子編集されたNK細胞の細胞傷害活性 対 Cas9のみのNK細胞の細胞傷害活性を、K562に対する<sup>51</sup>Cr放出アッセイによって測定した。

【図4B】NK細胞において複数の遺伝子 (NKG2A、CD47、TGFBR2およびCISH) を破壊することにより、抗腫瘍細胞傷害性が高まる。組換えTGF- $\beta$ 処置(50ng/ml)の30分後に、pSMA-D活性をフローサイトメトリーによって測定した。外来性TGF- $\beta$ を添加しても、KOCAR-NK細胞においてpSMA-Dの活性化は誘導されなかった。

20

【0036】

【図5】CyTOF解析によって示されるように、NK細胞は、サイトカインの刺激を受けるかまたは標的を認識すると、CD16およびCD62Lの発現を失う。

【0037】

【図6】NK細胞においてADAM17をノックアウトすると、CD16およびCD62Lのシェディングが阻止される。

30

【0038】

【図7】NK細胞においてADAM17をノックアウトすると、K562標的に対するADCCおよび細胞傷害性が改善される。

【0039】

【図8】72時間後のNK細胞におけるSHP1ノックアウト効率のFACSベースのスクリーニング。

【0040】

【図9】NK細胞においてSHP1を破壊すると、抗腫瘍効果が高まる。NK細胞をK562細胞またはRaji細胞と1:1の比で4時間共培養した。インキュベーションの後、それらの細胞をアネキシンVで染色し、生細胞および死細胞を解析した。K562細胞は、NK細胞の殺滅に対して感受性であり、Raji細胞は、NK細胞の殺滅に対して抵抗性である。

40

【0041】

【図10A】NK細胞においてSHP1を破壊すると、抗腫瘍効果が高まる。NK細胞をK562細胞またはRaji細胞と2:1の比で5時間共培養した。

【図10B】NK細胞においてSHP1を破壊すると、抗腫瘍効果が高まる。様々なエフェクター：標的比での溶解パーセント、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  およびCD107aのパーセンテージ、ならびに生細胞または死細胞のパーセンテージを示している。

【0042】

【図11】NK-CAR細胞においてSHP1を破壊すると、アポトーシスアッセイによ

50

って評価される抗腫瘍効果が高まる。

【0043】

【図12A】7日目のFACSベースのNKG2Aノックアウト効率。

【図12B】拡大されたNK細胞においてNKG2Aを破壊すると、抗腫瘍効果が高まる。

【図12C】NK-CAR細胞においてNKG2Aを破壊すると、Raji標的に対する抗腫瘍効果が高まる。

【0044】

【図13】別の遺伝子セット、つまり、TIGIT(T)、CD96(C)、CISH(CH)およびアデノシン(ADORA2A)(A)を用いて、アプローチを検証した。この遺伝子セットの場合、1回目のエレクトロポレーションの間にTIGITおよびCD96を1セットのNK細胞においてノックアウトした。TIGITおよびCD96KO細胞における2回目のノックアウトでは、CISHおよびアデノシン(ADORA2A)を標的化した。両方の回のエレクトロポレーションについて、PCRおよびフローサイトメトリーを使用してノックアウト効率を検証することに成功した。フローパネル内の赤色(右側のピーク)および青色(左側のピーク)のヒストグラムは、それぞれ、CRISPRKOの前および後のタンパク質の発現を表している。

10

【0045】

【図14】NK細胞において複数の遺伝子を破壊すると、抗腫瘍効果が高まる。これを評価するために、複数の遺伝子(NKG2A、CISH、TGFBR1Iおよびアデノシン(ADORA2A))のノックアウト細胞およびcas9だけをエレクトロポレーションした細胞を、コントロールとして、K562(NK感受性)細胞およびRaji(NK抵抗性)細胞とともに、5時間使用した。NK細胞の機能をフローサイトメトリー測定によって評価したところ、標的細胞株による刺激を受けたとき、KO細胞ではTNF-、IFN-およびCD107aの増加が観察された。

20

【0046】

【図15】NK細胞において複数の遺伝子を破壊すると、抗腫瘍効果が高まる。これを評価するために、複数の遺伝子(NKG2A、CISH、TGFBR1I)のノックアウト細胞およびcas9だけをエレクトロポレーションした細胞を、コントロールとして使用した。NKG2Aの発現をフローサイトメトリーによって確認した。外来性TGF-を添加しても、KOCAR-NK細胞においてpSMAの活性化は誘導されなかった。

30

【0047】

【図16】NK-CAR細胞において複数の遺伝子(NKG2A、TGF-R2およびCISH)を破壊すると、抗腫瘍効果が高まる。

【0048】

【図17】TGF-R2のKOは、TGF-の抑制作用からNK-CAR細胞を守る。

【0049】

【図18】マルチプレックス遺伝子編集は、種々のNK-CAR構築物で、種々の標的に対して再現性がある。

【0050】

【図19】複数の阻害性遺伝子のマルチプレックス遺伝子編集は、NKの構造を維持し、TGF-によって誘導される疲弊からNK細胞を守る。

40

【発明を実施するための形態】

【0051】

ある特定の実施形態において、本開示は、CRISPR-Cas9技術を用いて、ヒト免疫細胞(例えば、T細胞、NK細胞、CARを形質導入されたT細胞またはCARを形質導入されたNK細胞)において2つ以上の遺伝子(例えば、遺伝子(例えば、アデノシン2aレセプター、TGF-R2、NKG2A、TIGITおよび/またはCISHをはじめとした表1に列挙される遺伝子))を同時にノックダウン(またはノックアウト)する新規アプローチを提供する。それらの免疫細胞は、末梢血または臍帯血またはそれらの組み合わせに由来し得る。

50

## 【0052】

本研究は、これらのタンパク質の低発現が、T細胞およびNK細胞の機能の改善、インビボにおける増殖および持続性ならびに細胞傷害性と相關することを実証した。このストラテジーはまた、T細胞、NK細胞、NKT細胞およびiNKT細胞を、TGFおよびアデノシンによって主に駆動される免疫抑制性の腫瘍微小環境から守る。したがって、本方法を用いることにより、様々な養子細胞療法用の生成物（例えば、NK細胞、T細胞（例えば、ウイルス特異的T細胞および制御性T細胞）、B細胞（例えば、制御性B細胞）、CARを形質導入されたNK細胞、CAR-T細胞、ならびにTCRによって操作されたTおよびNK細胞、iNKT細胞、NKT細胞）の有効性を改善することができる。その養子細胞療法用の生成物は、例えば癌（例えば、血液悪性腫瘍または固形悪性腫瘍）から感染症および免疫障害にまで及ぶ様々な疾患を処置するために使用され得る。

10

## 【0053】

特定の実施形態において、上記免疫細胞は、少なくとも1つのCARを発現する。CAR技術は、過去数年間でいくつもの進歩が見られた。実際に、CAR-CD19が、B細胞白血病およびリンパ腫を有する患者において目覚ましい臨床結果を示し、昨年、2つのCAR-T製品がFDAに承認された。CARを形質導入されたT細胞が、過去数年間で先頭に立ったが、たくさんの前臨床研究、ならびに本出願人らが主導する第I/I相CAR-NK試験も、癌に対してCAR-NK細胞の有効性を示した。CAR技術が前進しているにもかかわらず、未だにCARは、大部分がウイルスベクターを用いてT細胞またはNK細胞に形質導入されており、ウイルスベクターは、ランダムにしか細胞のDNAにインテグレートせず、クローン増殖、癌化、導入遺伝子の発現の変化または転写のサイレンシングをもたらす恐れがある。したがって、特定のDNA遺伝子座へのCARの挿入を標的化する方法を見つけることが有益であろう。

20

## 【0054】

したがって、1つの実施形態において、本開示は、CRISPR/Cas9を用いて、特定の遺伝子の遺伝子座（例えば、阻害性遺伝子またはチェックポイントタンパク質の遺伝子座）にCARを挿入するための方法を提供する。遺伝子の遺伝子座におけるCARの挿入は、所望であれば必要に応じてそのCARをその遺伝子のプロモーターの支配下に置きつつ、同時に遺伝子の発現を妨害するためにも使用することができる。具体的には、本方法は、AAV6ベクターおよびCRISPR/Cas9技術を用いて、阻害性遺伝子（例えば、NKG2A、CISH、PD-1、TIGIT、TIM3、SHP1またはTGF-R2を含むがこれらに限定されない表1に列挙される遺伝子など）の遺伝子座におけるCARの挿入を導き得る。阻害性遺伝子の遺伝子座におけるCARの挿入により、CARの発現がチェックポイントのプロモーターの制御下になって、腫瘍微小環境においてアップレギュレートされることも可能にしつつ、チェックポイント分子（例えば）の阻害効果を妨害することができる。これは、固形腫瘍にCAR治療を適用する場合に有用であり、ここで、チェックポイント分子のアップレギュレーションは、CAR治療の成功に悪影響を及ぼし得る。したがって、高い安全性プロファイルを有し得るCAR挿入方法を用いて養子細胞療法（例えば、T細胞、B細胞、NK、NKTまたはiNKT細胞）を作製するためのさらなる方法が提供される。

30

## I. 定義

## 【0055】

本明細書中で使用されるとき、特定の構成要素に関する「本質的に含まない」は、その特定の構成要素が、意図的に組成物に製剤化されていないことおよび/または夾雑物としてでさえもしくは微量でさえ存在しないことを意味するために本明細書中で使用される。ゆえに、ある組成物の任意の意図されない混入に起因する、その特定の構成要素の総量は、0.05%未満、好ましくは、0.01%未満である。標準的な分析方法ではその特定の構成要素の量を検出できない組成物が最も好ましい。

40

## 【0056】

本明細書中で使用されるとき、「a」または「an」は、1つ以上を意味し得る。請求

50

項で使用されるとき、語「a」または「a n」は、語「～を含む」とともに使用されるとき、1つまたは1つより多いことを意味し得る。本明細書中で使用されるとき、「別の」は、少なくとも第2のものまたはそれ以上のものを意味し得る。なおもさらには、用語「～を有する」、「～を含む (including)」、「～を含む (containing)」および「～を含む (comprising)」は、相互交換可能であり、当業者は、これらの用語がオープンエンドの用語であることを承知している。具体的な実施形態において、本開示の態様は、例えば、本開示の1つ以上の配列「から本質的になり」得るか、またはそれら「からなり」得る。本発明のいくつかの実施形態は、本開示の1つ以上のエレメント、方法工程および/または方法からなり得るか、またはそれらから本質的になり得る。本明細書中に記載される任意の方法または組成物は、本明細書中に記載される他の任意の方法または組成物に対して実行され得ることが企図される。本願の範囲は、本明細書に記載されるプロセス、機械、製造、組成物、手段、方法および工程の特定の実施形態に限定されると意図されていない。本明細書中で使用されるとき、用語「または」および「および/または」は、複数の構成要素を組み合わせてまたは互いから排除して記載するため使用される。例えば、「x、y および/またはz」とは、「x」のみ、「y」のみ、「z」のみ、「x、y およびz」、「(x およびy) またはz」、「x または(y およびz)」または「x またはy またはz」のことを指し得る。x、y またはz が、ある実施形態から明確に排除され得ることが明確に企図される。

#### 【0057】

請求項での用語「または」の使用は、選択肢だけを指すと明示的に示されない限り、またはそれらの選択肢が相互排他的でない限り、「および/または」を意味するために使用されるが、本開示は、選択肢だけおよび「および/または」を指すという定義を支持する。本明細書中で使用されるとき、「別の」は、少なくとも第2のものまたはそれ以上のものを意味し得る。用語「約」、「実質的に」および「およそ」は、一般に、述べられている値プラスまたはマイナス5%を意味する。

#### 【0058】

本明細書全体にわたる「1つの実施形態」、「ある実施形態」、「特定の実施形態」、「関連する実施形態」、「ある特定の実施形態」、「追加の実施形態」または「さらなる実施形態」またはそれらの組み合わせに対する言及は、その実施形態に関連して記載される特定の特徴、構造または特性が、本開示の少なくとも1つの実施形態に含められることを意味する。したがって、本明細書全体にわたる様々な箇所における前述の句の出現は、必ずしもすべてが同じ実施形態について言及しているわけではない。さらに、特定の特徴、構造または特性が、1つ以上の実施形態において任意の好適な様式で組み合わされ得る。

#### 【0059】

「免疫障害」、「免疫関連障害」または「免疫媒介性障害」とは、免疫応答が、その疾患の発症または進行において重要な役割を果たす障害のことを指す。免疫媒介性障害としては、自己免疫障害、同種移植片拒絶、移植片対宿主病ならびに炎症状態およびアレルギー状態が挙げられる。

#### 【0060】

「免疫応答」は、刺激に対する、B細胞またはT細胞または自然免疫細胞などの免疫系細胞の応答である。1つの実施形態において、応答は、特定の抗原に特異的である（「抗原特異的応答」）。

#### 【0061】

本明細書中で使用される用語「阻害性遺伝子」とは、その遺伝子産物が、1つ以上のタイプの免疫細胞の活性、増殖および/または持続性にとって直接または間接的に有害である遺伝子のことを指す。

#### 【0062】

「自己免疫疾患」とは、免疫系が、正常な宿主の一部である抗原（すなわち、自己抗原）に対して免疫応答（例えば、B細胞応答またはT細胞応答）を起こし、その結果、組織が傷害される疾患のことを指す。自己抗原は、宿主細胞に由来し得るか、または共生生物

10

20

30

40

50

( 例えは、通常、粘膜表面にコロニー形成する微生物 ( 共生生物として知られる ) ) に由來し得る。

【 0 0 6 3 】

本明細書中で使用される用語「操作された」とは、細胞、核酸、ポリペプチド、ペクターなどをはじめとした、人間の手によって作製された実体のことを指す。少なくともいくつかの場合において、操作された実体は、合成物であり、天然に存在しないエレメントまたは本開示において使用されるように構成されたエレメントを含む。

【 0 0 6 4 】

疾患または状態を「処置する」またはそれらの処置とは、その疾患の徴候または症状を軽減する目的で、1つ以上の薬物を患者に投与することを含み得るプロトコルを実行することを指す。処置の望ましい効果としては、疾患の進行速度の低下、疾患状態の回復または緩和、および予後の緩解または改善が挙げられる。軽減は、現れる疾患または状態の徴候または症状が現れる前ならびに現れた後において生じ得る。したがって、「処置する」または「処置」は、疾患または望ましくない状態を「予防する」またはそれらの「予防」を含み得る。さらに、「処置する」または「処置」は、徴候または症状の完全な軽減を必要とせず、治癒を必要とせず、詳細には、患者に対して周辺効果しか及ぼさないプロトコルを含む。

10

【 0 0 6 5 】

本願全体にわたって使用される用語「治療効果」または「治療的に有効な」とは、この状態の医学的処置に関して被験体の福祉を増進または向上させる何らかのことを指す。これには、ある疾患の徴候または症状の頻度または重症度の低下が含まれるが、これらに限定されない。例えは、癌の処置は、例えは、腫瘍サイズの減少、腫瘍の侵襲性の低下、癌の成長速度の低下、または転移の予防を含み得る。癌の処置とは、癌を有する被験体の生存時間の延長のことも指し得る。

20

【 0 0 6 6 】

「被験体」および「患者」とは、ヒトまたは非ヒト、例えは、靈長類、哺乳動物および脊椎動物のことを指す。特定の実施形態において、被験体は、ヒトである。

【 0 0 6 7 】

本明細書中で使用されるとき、「哺乳動物」は、本発明の方法にとって適切な被験体である。哺乳動物は、ヒトを含む、高等脊椎動物の哺乳綱の任意のメンバーであり得、生児出生、体毛、および子を養うための乳を分泌する女性 ( 雌 ) の乳腺を特徴とし得る。さらに、哺乳動物は、気候条件の変動にもかかわらず体温を一定に維持する能力を特徴とする。哺乳動物の例は、ヒト、ネコ、イヌ、ウシ、マウス、ラット、ウマ、ヤギ、ヒツジおよびチンパンジーである。哺乳動物は、「患者」または「被験体」または「個体」と称されることがある。

30

【 0 0 6 8 】

句「薬学的にまたは薬理学的に許容され得る」とは、ヒトなどの動物に適宜投与されたとき、有害反応、アレルギー反応または他の不都合な反応をもたらさない分子実体および組成物のことを指す。抗体またはさらなる活性成分を含む薬学的組成物の調製は、本開示に照らせば当業者に公知である。さらに、動物 ( 例えは、ヒト ) への投与の場合、調製物は、F D A O f f i c e o f B i o l o g i c a l S t a n d a r d s が要求する無菌性、発熱性、一般的な安全性および純度の規格を満たすべきであることが理解される。

40

【 0 0 6 9 】

本明細書中で使用されるとき、「薬学的に許容され得るキャリア」は、当業者に公知であるように、任意のおよびすべての水性溶媒 ( 例えは、水、アルコール溶液 / 水溶液、食塩水、非経口ビヒクル、例えは、塩化ナトリウム、リソゲルデキストロースなど ) 、非水溶媒 ( 例えは、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油および注射可能な有機エステル、例えは、オレイン酸エチル ) 、分散媒、コーティング、界面活性剤、酸化防止剤、保存剤 ( 例えは、抗菌剤または抗真菌剤、抗酸化剤、キレート剤および不活性ガス ) 、等張剤、吸収遅延剤、塩、薬物、薬物安定剤、ゲル、結合剤、賦形剤、崩壊剤、

50

潤滑剤、甘味剤、香味剤、色素、流動性および栄養補給剤、そのような同様の材料ならびにそれらの組み合わせを含む。薬学的組成物中の様々な構成要素のpHおよび正確な濃度は、周知のパラメータに従って調整される。

#### 【0070】

本明細書中で使用されるとき、遺伝子の「破壊」とは、破壊が無い場合の遺伝子産物の発現レベルと比べて、ある細胞における対象遺伝子によってコードされる1つ以上の遺伝子産物の発現が無くなることまたは低下することを指す。例示的な遺伝子産物としては、遺伝子によってコードされるmRNAおよびタンパク質産物が挙げられる。破壊は、いくつかの場合では、一過性または可逆的であり、他の場合では、永続的である。切断型または非機能性の産物が生成され得るという事実があるにもかかわらず、破壊は、いくつかの場合において、機能的なまたは完全長のタンパク質またはmRNAの破壊である。本明細書中のいくつかの実施形態において、遺伝子の活性または機能は、発現とは全く異なって妨害される。遺伝子破壊は、一般に、人工的な方法、すなわち、化合物、分子、複合体もしくは組成物の添加もしくは導入、および/または当該遺伝子の核酸もしくは当該遺伝子に関連する核酸の、DNAレベルなどでの破壊によって誘導される。遺伝子破壊のための例示的な方法としては、遺伝子のサイレンシング、ノックダウン、ノックアウト、および/または遺伝子編集などの遺伝子破壊の手法が挙げられる。例としては、一般に発現の一過性の低下をもたらすアンチセンス技術（例えば、RNAi、siRNA、shRNAおよび/またはリボザイム）、ならびに例えば切断および/または相同組換えの誘導によって、標的化された遺伝子の不活性化または破壊をもたらす遺伝子編集の手法が挙げられる。例としては、挿入、変異および欠失が挙げられる。破壊は、通常、遺伝子によってコードされる正常な産物または「野生型」産物の発現を阻止し、かつ/またはその発現を完全に無くす。そのような遺伝子破壊の例示は、遺伝子または遺伝子の一部の挿入、フレームシフト変異およびミスセンス変異、欠失、ノックインならびにノックアウト（遺伝子全体の欠失を含む）である。そのような破壊は、コード領域、例えば、1つ以上のエキソンにおいて生じ得るため、停止コドンの挿入などによって完全長の産物、機能的な産物または任意の産物を生成することができなくなる。そのような破壊は、遺伝子の転写を防ぐよう、プロモーターもしくはエンハンサーまたは転写の活性化に影響する他の領域における破壊によっても生じ得る。遺伝子破壊には、相同組換えによる標的化された遺伝子不活性化を含む遺伝子ターゲティングが含まれる。

#### I I . マルチプレックス遺伝子編集

#### 【0071】

ある特定の実施形態において、本開示は、任意のタイプの免疫細胞のマルチプレックス遺伝子編集に関する。CRISPRは、免疫細胞において2つ以上の遺伝子（例えば、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の遺伝子）の発現を妨害するために使用することができる一例である。それらの遺伝子は、表1に列挙される遺伝子、例えば、NK細胞レセプターA（NKG2A）、シアル酸結合Ig様レクチン7（SIGLEC-7、CD328）、リンパ球活性化3（LAG3）、T細胞免疫グロブリンムチンファミリーメンバー3（TIM3、CD366、HAVCR2）、サイトカイン誘導性SH2含有タンパク質（CISH、CIS-1、SOCS）、フォークヘッドボックスO1（FOXO1）、トランスフォーミング成長因子ベータレセプター2（TGF-R2）、IgおよびTIMドメインを有するT細胞免疫受容体（TIGIT）、CD96、アデノシンレセプター2A（ADORA2）、核レセプターサブファミリー3グループCメンバー1（NR3C1）、プログラム細胞死1（PD1）、プログラム細胞死1リガンド1（PD-L-1）、プログラム細胞死1リガンド2（PDL-2）、CD47、シグナル調節タンパク質アルファ（SIRPA）、SH2ドメイン含有イノシトール5-ホスファターゼ1（SHIP1）、ADAMメタロペプチダーゼドメイン17（ADAM17）、リボソームタンパク質S6（RPS6）、真核生物翻訳開始因子4E結合タンパク質1（4EBP1）、CD25、CD40、インターロイキン21レセプター（IL21R）、細胞間接着分子1（ICAM1）、CD95、CD80、CD86、インターロイキン21レセプ

10

20

30

40

50

ター( I L 1 0 R )、 C D 5、 C D 7 から選択され得るか、または他の阻害性遺伝子も存在し得る。遺伝子編集によって、複数の遺伝子の発現を同時に妨害することが可能になる。

#### 【 0 0 7 2 】

いくつかの実施形態において、遺伝子破壊は、その遺伝子において破壊をもたらすこと( 例えは、ノックアウト、挿入、ミスセンス変異またはフレームシフト変異、例えは、両アレルフレームシフト変異、遺伝子の全部または一部の欠失、例えは、1 つ以上のエキソンもしくはゆえに一部分の欠失、および / またはノックイン ) によって行われる。例えは、破壊は、遺伝子またはその一部分の配列に標的化されるように特異的にデザインされた、ジンクフィンガーヌクレアーゼ( Z F N ) および転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ( T A L E N ) などの D N A 結合標的化ヌクレアーゼ、ならびに C R I S P R 会合ヌクレアーゼ( C a s ) などの R N A ガイドヌクレアーゼをはじめとした、配列特異的ヌクレアーゼまたは標的化ヌクレアーゼによってもたらされ得る。

#### 【 0 0 7 3 】

いくつかの実施形態において、破壊は、一過性または可逆的であり、その遺伝子の発現は、後になって回復する。他の実施形態において、破壊は、可逆的または一過性でなく、例えは、永続的である。

#### 【 0 0 7 4 】

いくつかの実施形態において、遺伝子破壊は、その遺伝子における、通常は標的化様式での、1 つ以上の二本鎖切断および / または1 つ以上の一本鎖切断の誘導によって行われる。いくつかの実施形態において、二本鎖または一本鎖の切断は、ヌクレアーゼ、例えは、遺伝子標的化ヌクレアーゼなどのエンドヌクレアーゼによって行われる。いくつかの態様において、その切断は、遺伝子のコード領域、例えは、エキソンにおいて誘導される。例えは、いくつかの実施形態において、その誘導は、コード領域、例えは、第1 のエキソン、第2 のエキソンまたはそれ以降のエキソンの N 末端部分の近くにおいて生じる。

#### 【 0 0 7 5 】

上記免疫細胞には、ガイド R N A および C R I S P R 酵素、または C R I S P R 酵素をコードする m R N A が導入され得る。いくつかの態様において、その細胞には、1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つまたはそれ以上のガイド R N A が同時に導入される。例えは、その細胞には、第1 のエレクトロポレーションの間に1 つ、2 つまたは3 つのガイド R N A が導入され得、次いで、第2 のエレクトロポレーションなどの間に1 つ、2 つまたは3 つのさらなるガイド R N A がさらに導入され得る。

#### 【 0 0 7 6 】

いくつかの実施形態において、遺伝子破壊は、アンチセンス法( 例えは、 R N A 干渉( R N A i )、低分子干渉 R N A ( s i R N A )、短ヘアピン( s h R N A ) および / またはリボザイム ) を用いて達成され、それらを用いることにより、遺伝子の発現が選択的に抑制または阻止される。 s i R N A 技術は、遺伝子から転写される m R N A のヌクレオチド配列と相同な配列およびそのヌクレオチド配列と相補的な配列を有する二本鎖 R N A 分子を使用する R N A i である。 s i R N A は、一般に、遺伝子から転写される m R N A の1 つの領域と相同 / 相補的であるか、または種々の領域と相同 / 相補的である複数の R N A 分子を含む s i R N A であり得る。いくつかの態様において、 s i R N A は、ポリシストロニック構築物に含められる。

#### 【 0 0 7 7 】

いくつかの実施形態において、破壊は、遺伝子に特異的に結合するかまたはハイブリダイズする、 D N A 標的化分子( 例えは、 D N A 結合タンパク質または D N A 結合核酸 ) またはそれを含む複合体、化合物もしくは組成物を用いて達成される。いくつかの実施形態において、 D N A 標的化分子は、 D N A 結合ドメイン、例えは、ジンクフィンガータンパク質( Z F P ) の D N A 結合ドメイン、転写活性化因子様タンパク質( T A L ) の D N A 結合ドメインもしくは T A L エフェクター( T A L E ) の D N A 結合ドメイン、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート( C R I S P R ) の D N A 結合ドメイン、またはメガヌクレアーゼの D N A 結合ドメインを含む。ジンクフィンガー、 T A L E およ

び C R I S P R システムの結合ドメインは、例えば、天然に存在するジンクフィンガーまたは T A L E タンパク質の認識ヘリックス領域の操作（1つ以上のアミノ酸の変更）を介して、所定のヌクレオチド配列に結合するように操作され得る。操作された D N A 結合タンパク質（ジンクフィンガーまたは T A L E ）は、天然に存在しないタンパク質である。デザインに対する合理的な基準としては、置換ルールの適用、ならびに既存の Z F P および / または T A L E のデザインおよび結合データの情報を保存しているデータベースにおける情報を処理するためのコンピュータアルゴリズムが挙げられる。

【 0 0 7 8 】

C R I S P R 媒介性の破壊の場合、ガイド R N A およびエンドヌクレアーゼは、細胞または細胞内コンパートメントの内側への送達を可能にする当該分野で公知の任意の手段によって免疫細胞に導入され得、使用され得る作用物質 / 化学物質および / または分子（タンパク質および核酸）としては、非限定的な例として、リポソーム送達手段、高分子キャリア、化学的キャリア、リポプレックス、ポリプレックス、デンドリマー、ナノ粒子、エマルジョン、天然のエンドサイトーシスまたは貪食経路、ならびにエレクトロポレーションなどの物理的な方法が挙げられる。具体的な態様では、エレクトロポレーションを用いて、ガイド R N A およびエンドヌクレアーゼまたはエンドヌクレアーゼをコードする核酸を導入する。

【 0 0 7 9 】

例示的な1つの具体的な方法では、複数の遺伝子の C R I S P R ノックアウトのための方法は、臍帯血または末梢血からの、 N K 細胞などの免疫細胞の単離を含み得る。 N K 細胞を単離し、照射済みのフィーダー細胞と、一例として 1 : 2 の比などで培養プレート上に播種し得る。次いで、それらの細胞に、 2 0 0 I U / m L の濃度などの I L - 2 の存在下において、 g R N A および C a s 9 をエレクトロポレーションし得る。培地は、一例として、1日おきに交換し得る。1 ~ 3 日後に、 N K 細胞を単離してフィーダー細胞を除去し、次いで、その N K 細胞に C A R 構築物を形質導入し得る。次いで、その N K 細胞を、さらなる遺伝子に対する第2の C R I S P R C a s 9 ノックアウトに供し得る。エレクトロポレーションの後、 N K 細胞をフィーダー細胞とともに、例えば 5 ~ 9 日間、播種し得る。

【 0 0 8 0 】

10

20

30

40

50

## 【表1】

表1:マザーリックス編集またはCAR ノックインのための遺伝子。ノックインのための例示的な位置を示す。

NK細胞、T細胞またはMSC細胞	
NKG2A	エキソン4
SIGLEC-7	エキソン1
LAG3	エキソン1
TIM3	エキソン2
CISH	エキソン5
FOXO1	エキソン1
TGFB2	エキソン5
TIGIT	エキソン2
CD96	エキソン2
ADORA2	エキソン2
NR3C1	エキソン2
PD1	エキソン1
PDL-1	エキソン3
PDL-2	エキソン3
CD47	エキソン2
SIRPA	エキソン2
SHIP1	エキソン1
ADAM17	エキソン1
B2M	エキソン2
CD16	
B細胞またはT細胞	
RPSS6	エキソン2
4EBP1	エキソン4
CD25	エキソン3
CD40	エキソン3
IL21R	エキソン1
ICAM1	エキソン4
CD95	エキソン2
CD80	エキソン3
CD86	エキソン1
IL10R	エキソン3
CD5	
CD7	エキソン2

## 【0081】

10

20

30

40

50

## 【表 2】

表 2: 遺伝子ノックアウト用の例示的な gRNA 配列

CISH (エキソン 4)	AGGCCACATAGTGCACAG (gRNA1); 配列番号 1
	TGTACAGCAGTGGCTGGTGG (gRNA2); 配列番号 2
NKG2A (エキソン 4)	AACAACTATCGTTACACAG; 配列番号 3
A2AR (エキソン 3)	CTCCTCGGTGTACATCACGG (gRNA1); 配列番号 4
	AGTAGTTGGTGACGTTCTGC (gRNA2); 配列番号 5
TIGIT (エキソン 3)	ACCCCTGATGGGACGTACACT; 配列番号 6
CD96 (エキソン 2)	AGGCACAGTAGAACGCCGTAT; 配列番号 7
TIM3 (エキソン 2)	AGACGGGCACGAGGTTCCCT; 配列番号 8
SHP1 (エキソン 4)	TCACGCACAAGAACGTCCA; 配列番号 9
PD1 (エキソン 2)	CCCCCTCGGTACCGACGAGC; 配列番号 10
PDL1 (エキソン 3)	ATTTACTGTCACGGTTCCCA; 配列番号 11
PDL2 (エキソン 3)	CCCCATAGATGATTATGCAT; 配列番号 12
TGFBR2 (エキソン 5)	GACGGCTGAGGAGCGGAAGA (gRNA1); 配列番号 13
	TGTGGAGGTGAGCAATCCCC (gRNA2); 配列番号 14

10

20

30

40

## 【0082】

いくつかの実施形態において、本開示の免疫細胞は、2つ以上の遺伝子の発現が変更されるように改変される。いくつかの実施形態において、遺伝子発現の変更は、その遺伝子において破壊をもたらすこと（例えば、ノックアウト、挿入、ミスセンス変異またはフレームシフト変異、例えば、両アレルフレームシフト変異、その遺伝子の全部または一部の欠失、例えば、1つ以上のエキソンもしくはゆえに一部分の欠失、および／またはノックイン）によって行われる。具体的な実施形態において、遺伝子発現の変更は、遺伝子またはその一部分の配列に標的化されるように特異的にデザインされたDNA結合標的化ヌクレアーゼ、例えば、CRISPR会合ヌクレアーゼ（Cas）などのRNAガイドヌクレアーゼをはじめとした、配列特異的ヌクレアーゼまたは標的化ヌクレアーゼによってもたらされ得る。

## 【0083】

いくつかの実施形態において、遺伝子の発現、活性および／または機能の変更は、その遺伝子を破壊することによって行われる。いくつかの態様において、遺伝子は、その発現が、遺伝子改変が無い場合の発現または改変をもたらす構成要素の導入が無い場合の発現と比べて、少なくとも10、20、30もしくは40%または約10、20、30もしくは40%低下するように、通常、少なくとも50、60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%または約50、60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%低下するように、改変される。

## 【0084】

いくつかの実施形態において、変更は、一過性または可逆的であり、所望であれば、遺伝子の発現は、後になって回復する。他の実施形態において、変更は、可逆的または一過性でなく、例えば、永続的である。

## 【0085】

いくつかの実施形態において、遺伝子の変更は、その遺伝子における、通常は標的化様式での、1つ以上の二本鎖切断および／または1つ以上の一本鎖切断の誘導によって行われる。いくつかの実施形態において、二本鎖または一本鎖の切断は、ヌクレアーゼ、例えば、遺伝子標的化ヌクレアーゼなどのエンドヌクレアーゼによって行われる。いくつかの態様において、その切断は、遺伝子のコード領域、例えば、エキソンにおいて誘導される

50

。例えば、いくつかの実施形態において、その誘導は、コード領域、例えば、第1のエキソン、第2のエキソンまたはそれ以降のエキソンのN末端部分の近くにおいて生じる。

【0086】

いくつかの態様において、二本鎖または一本鎖の切断は、非相同末端結合 (NHEJ) または相同組換え修復 (HDR) などによる細胞の修復プロセスを介した修復を受ける。いくつかの態様において、この修復プロセスは、エラーが発生しやすく、遺伝子の完全なノックアウトをもたらし得る遺伝子の破壊、例えば、フレームシフト変異、例えば、両アレルのフレームシフト変異をもたらす。例えば、いくつかの態様において、破壊は、欠失、変異および/または挿入を誘導することを含む。いくつかの実施形態では、破壊によって、停止コドンが早期に存在するようになる。いくつかの態様において、挿入、欠失、転座、フレームシフト変異および/または中途での停止コドンが存在することにより、遺伝子の発現、活性および/または機能が妨害される。

【0087】

いくつかの実施形態において、上記変更は、RNAガイドエンドヌクレアーゼ (RGE N) を介した変更など、1つ以上のDNA結合核酸を用いて行われる。例えば、上記変更は、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート (CRISPR) およびCRISPR会合 (Cas) タンパク質を用いて行われ得る。一般に、「CRISPRシステム」とは、CRISPR会合 (「Cas」) 遺伝子 (Cas遺伝子をコードする配列を含む)、tracr (トランスクレアーゼ活性化CRISPR) 配列 (例えば、tracrRNAまたは活性な部分的tracrRNA)、tracrメイト配列 (内在性のCRISPRシステムの文脈では「直列反復配列」、およびtracrRNAによってプロセシングされた部分的な直列反復配列を包含する)、ガイド配列 (内在性のCRISPRシステムの文脈では「スペーサー」とも称される)、ならびに/またはCRISPR遺伝子座由来の他の配列および転写物の発現に関与するかまたはその活性を指示する転写物および他のエレメントのことを総称する。

【0088】

CRISPR/CasヌクレアーゼまたはCRISPR/Casヌクレアーゼシステムは、DNAに配列特異的に結合する非コードRNA分子 (ガイド) RNA、およびヌクレアーゼ機能 (例えば、2つのヌクレアーゼドメイン) を有するCasタンパク質 (例えば、Cas9) を含み得る。CRISPRシステムの1つ以上のエレメントが、I型、II型またはIII型CRISPRシステムに由来し得、例えば、内在性のCRISPRシステムを含む特定の生物 (例えば、*Streptococcus pyogenes*) に由来し得る。

【0089】

いくつかの態様において、CasヌクレアーゼおよびgRNA (標的配列に特異的なcrRNAと既定のtracrRNAとの融合物を含む) が、細胞に導入される。一般に、gRNAの5'末端における標的部位が、相補的な塩基対形成によって、Casヌクレアーゼをその標的部位、例えば、遺伝子に標的化する。標的部位は、プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 配列 (例えば、通常、NGGまたはNAG) のすぐ5'の位置に基づいて選択され得る。この点において、gRNAは、標的DNA配列に対応するようにガイドRNAの最初の20、19、18、17、16、15、14、14、12、11または10ヌクレオチドを変更することによって、所望の配列に標的化される。一般に、CRISPRシステムは、標的配列の部位においてCRISPR複合体の形成を促進するエレメントを特徴とする。通常、「標的配列」とは、一般に、ガイド配列が相補性を有するようにデザインされる配列のことを指し、標的配列とガイド配列とのハイブリダイゼーションが、CRISPR複合体の形成を促進する。ハイブリダイゼーションを引き起こし、CRISPR複合体の形成を促進するのに十分な相補性があれば、完全な相補性は必ずしも必要ない。

【0090】

CRISPRシステムは、標的部位における二本鎖切断 (DSB) に続いて、本明細書

10

20

30

40

50

中で論じられるような破壊または変更を誘導し得る。他の実施形態では、「ニッカーゼ」とみなされる Cas 9 バリエントが、標的部位において一本鎖にニックを入れるために使用される。例えば特異性を改善するために、対のニッカーゼを使用することができ、そのニッカーゼの各々は、配列を標的化する異なる gRNA の対によって導かれ、ニックが同時に導入されると、5' オーバーハングが導入される。他の実施形態では、遺伝子発現に影響するように、触媒的に不活性な Cas 9 が、転写抑制因子または転写活性化因子などの異種エフェクタードメインに融合される。

#### 【 0 0 9 1 】

標的配列は、DNA ポリヌクレオチドまたは RNA ポリヌクレオチドなどの任意のポリヌクレオチドを含み得る。標的配列は、細胞のオルガネラ内など、細胞の核または細胞質に位置し得る。一般に、標的配列を含む標的化される遺伝子座への組換えのために使用され得る配列または鑄型は、「編集鑄型」または「編集ポリヌクレオチド」または「編集配列」と称される。いくつかの態様では、外来性の鑄型ポリヌクレオチドが、編集鑄型と称されることがある。いくつかの態様において、組換えは、相同組換えである。

10

#### 【 0 0 9 2 】

通常、内在性の CRISPR システムの文脈では、CRISPR 複合体（標的配列にハイブリダイズし、1つ以上の Cas タンパク質と複合体化するガイド配列を含む）の形成によって、標的配列においてまたは標的配列の近くで（例えば、標的配列から 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50 塩基対以内またはそれ以上以内において）一方または両方の鎖の切断が生じる。野生型 tracr 配列の全部もしくは一部分（例えば、野生型 tracr 配列の約 20 ヌクレオチド、約 26 ヌクレオチド、約 32 ヌクレオチド、約 45 ヌクレオチド、約 48 ヌクレオチド、約 54 ヌクレオチド、約 63 ヌクレオチド、約 67 ヌクレオチド、約 85 ヌクレオチドもしくはそれ以上または約 20 ヌクレオチド超、約 26 ヌクレオチド超、約 32 ヌクレオチド超、約 45 ヌクレオチド超、約 48 ヌクレオチド超、約 54 ヌクレオチド超、約 63 ヌクレオチド超、約 67 ヌクレオチド超、約 85 ヌクレオチド超もしくはそれ以上）を含み得るかまたはそれからなり得る tracr 配列も、ガイド配列に作動可能に連結された tracr メイト配列の全部または一部分への tracr 配列の少なくとも一部分に沿ったハイブリダイゼーションなどによって、CRISPR 複合体の一部を形成し得る。tracr 配列は、ハイブリダイズし、CRISPR 複合体の形成に参加する、tracr メイト配列に対して十分な相補性（例えば、最適にアラインメントされたとき、tracr メイト配列の長さに沿って少なくとも 50%、60%、70%、80%、90%、95% または 99% の配列相補性）を有する。

20

#### 【 0 0 9 3 】

CRISPR システムの1つ以上のエレメントの発現によって、1つ以上の標的部位において CRISPR 複合体の形成が指示されるように、その CRISPR システムのそれらのエレメントの発現を駆動する1つ以上のベクターが細胞に導入され得る。また、構成要素がタンパク質および / または RNA として細胞に送達され得る。例えば、Cas 酵素、tracr メイト配列に連結されたガイド配列、および tracr 配列がそれぞれ、別個のベクター上の別個の調節エレメントに作動可能に連結され得る。あるいは、同じまたは異なる調節エレメントから発現されるエレメントの2つ以上が、単一ベクターにおいて組み合わされ得、ここで、1つ以上のさらなるベクターが、第1のベクターに含まれていない CRISPR システムの任意の構成要素を提供する。そのベクターは、制限エンドヌクレアーゼ認識配列などの1つ以上の挿入部位（「クローニング部位」とも称される）を含み得る。いくつかの実施形態において、1つ以上の挿入部位が、1つ以上のベクターの1つ以上の配列エレメントの上流および / または下流に配置される。複数の異なるガイド配列が使用されるとき、单一の発現構築物が、細胞内の異なる複数の対応する標的配列に対して CRISPR 活性を標的化するために使用され得る。

30

#### 【 0 0 9 4 】

ベクターは、Cas タンパク質などの CRISPR 酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に連結された調節エレメントを含み得る。Cas タンパク質の非限定的な例とし

40

50

ては、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9 (Casn1およびCasx12としても知られる)、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Cas5、Casn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Casx17、Casx14、Casx10、Casx16、CasX、Casx3、Casx1、Casx15、Casf1、Casf2、Casf3、Casf4、それらのホモログまたはそれらの改変バージョンが挙げられる。これらの酵素は、公知であり；例えば、S. pyogenesのCas9タンパク質のアミノ酸配列は、SwissProtデータベースにアクセスション番号Q99ZW2として見られ得る。

10

#### 【0095】

C R I S P R 酵素は、Cas9 (例えば、S. pyogenesまたはS. pneumoniae由来のもの) であり得る。C R I S P R 酵素は、標的配列の位置 (例えば、標的配列内および / または標的配列の相補鎖内) において、一方または両方の鎖の切断を指示し得る。ベクターは、対応する野生型酵素に対して変異したC R I S P R 酵素をコードし得、その変異したC R I S P R 酵素は、標的配列を含む標的ポリヌクレオチドの一方または両方の鎖を切断する能力を欠く。例えば、S. pyogenes由来のCas9のRuvC I触媒ドメインにおけるアスパラギン酸からアラニンへの置換 (D10A) は、両方の鎖を切断するヌクレアーゼ由来のCas9をニッカーゼ (一本鎖を切断する) に変換する。いくつかの実施形態において、Cas9ニッカーゼは、ガイド配列、例えば、DNA標的のセンス鎖およびアンチセンス鎖をそれぞれ標的化する2つのガイド配列と組み合わせて使用され得る。この組み合わせは、両方の鎖にニックを入れることができ、NHEJまたはHDRを誘導するために使用される。

20

#### 【0096】

いくつかの実施形態において、C R I S P R 酵素をコードする酵素コード配列は、真核細胞などの特定の細胞における発現に向けてコドンが最適化される。真核細胞は、特定の生物 (例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌまたは非ヒト霊長類を含むがこれらに限定されない哺乳動物) の細胞またはそれらの生物に由来する細胞であり得る。一般に、コドンの最適化とは、天然のアミノ酸配列を維持しつつ、天然の配列の少なくとも1つのコドンをその宿主細胞の遺伝子においてより高頻度にまたは最も高頻度に使用されるコドンで置き換えることによって、目的の宿主細胞において発現が高まるように核酸配列を改変するプロセスのことを指す。様々な種が、特定のアミノ酸のある特定のコドンについて特定の偏りを示す。コドンの偏り (生物間でのコドン使用頻度の差異) は、メッセンジャーRNA (mRNA) の翻訳効率と相關することが多く、その翻訳効率は、とりわけ、翻訳されるコドンの特性および特定の転移RNA (tRNA) 分子の利用可能性に依存すると考えられている。細胞において優勢に選択されるtRNAは、通常、ペプチド合成において最も高頻度に使用されるコドンを反映する。したがって、コドンの最適化に基づいて、遺伝子を所与の生物における最適な遺伝子発現に適応させることができる。

30

#### 【0097】

一般に、ガイド配列は、標的配列とハイブリダイズする標的ポリヌクレオチド配列であつて標的配列へのC R I S P R 複合体の配列特異的結合を指示する標的ポリヌクレオチド配列に対して十分な相補性を有する任意のポリヌクレオチド配列である。いくつかの実施形態において、ガイド配列と対応する標的配列との相補性の程度は、好適なアラインメントアルゴリズムを用いて最適にアラインメントしたとき、約50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%またはそれ以上であるか、またはそれを超える。

40

#### 【0098】

最適なアラインメントは、配列をアラインメントするための任意の好適なアルゴリズムを使用して決定され得、そのアルゴリズムの非限定的な例としては、Smith-Watermannアルゴリズム、Needleman-Wunschアルゴリズム、Burro

50

ws - Wheeler Transformに基づくアルゴリズム(例えば、Burro ws Wheeler Aligner)、Clustal W、Clustal X、BLAT、Novoalign(Novocraft Technologies, ELAND( Illumina, San Diego, Calif. )、SOAP(soap.genomics.org.cnにおいて利用可能)およびMaq(maq.sourceforge.netにおいて利用可能)が挙げられる。

#### 【0099】

C R I S P R 酵素は、1つ以上の異種タンパク質ドメインを含む融合タンパク質の一部であり得る。C R I S P R 酵素融合タンパク質は、任意のさらなるタンパク質配列、および必要に応じて、任意の2つのドメインの間にリンカー配列を含み得る。C R I S P R 酵素に融合され得るタンパク質ドメインの例としては、エピトープタグ、レポーター遺伝子配列、ならびに以下の活性：メチラーゼ活性、デメチラーゼ活性、転写活性化活性、転写阻止活性、転写終結因子活性、ヒストン修飾活性、R N A 切断活性および核酸結合活性のうちの1つ以上を有するタンパク質ドメインが挙げられるがこれらに限定されない。エピトープタグの非限定的な例としては、ヒスチジン(His)タグ、V5タグ、FLAGタグ、インフルエンザ赤血球凝集素(HA)タグ、My cタグ、VSV-Gタグおよびチオレドキシン(Trx)タグが挙げられる。レポーター遺伝子の例としては、グルタチオン-5-トランスフェラーゼ(GST)、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)ベータガラクトシダーゼ、ベータ-グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質(GFP)、HcRed、DsRed、シアノ蛍光タンパク質(CFP)、黄色蛍光タンパク質(YFP)、および青色蛍光タンパク質(BFP)を含む自己蛍光タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。C R I S P R 酵素は、D N A 分子に結合するかまたは他の細胞分子に結合するタンパク質またはタンパク質のフラグメントをコードする遺伝子配列に融合され得、それらのタンパク質としては、マルトース結合タンパク質(MBP)、S-タグ、Lex A D N A 結合ドメイン(DBD)融合物、GAL4A D N A 結合ドメイン融合物および単純ヘルペスウイルス(HSV)BP16タンパク質融合物が挙げられるが、これらに限定されない。C R I S P R 酵素を含む融合タンパク質の一部を形成し得るさらなるドメインは、参照により本明細書中に援用されるU S 2 0 1 1 0 0 5 9 5 0 2に記載されている。

III. 阻害性遺伝子の遺伝子座におけるC A R および/またはT C R の挿入

#### 【0100】

いくつかの実施形態において、本開示は、免疫細胞の特定の遺伝子の遺伝子座におけるC A R および/またはT C R の挿入に関する。C A R および/またはT C R は、阻害性遺伝子の遺伝子座(例えば、NKG2A、S i g l e c 7、L A G 3、T I M 3、C I S H、F O X O 1、T G F B R 2、T I G I T、C D 9 6、アデノシンレセプター-2A、N R 3 C 1、P D 1、P D L - 1、P D L - 2、C D 4 7、S I R P a、S H I P 1、A D A M 1 7、p S 6、4 E B P 1、C D 2 5、C D 4 0、I L 2 1 R、I C A M 1、C D 9 5、C D 8 0、C D 8 6、I L 1 0 R、C D 5、C D 7 およびそれらの組み合わせからなる群より選択される遺伝子)に挿入され得る。

#### 【0101】

本明細書中に開示される方法のいずれかにおける1つ以上のC A R および/またはT C R の挿入は、部位特異的であり得る。例えば、1つ以上のC A R および/またはT C R は、プロモーターに隣接して、またはプロモーターの近くに、挿入され得る。別の例では、1つ以上の導入遺伝子が、遺伝子(例えば、阻害性遺伝子)のエキソンに隣接して、遺伝子のエキソンの近くに、または遺伝子のエキソン内に、挿入され得る。そのような挿入は、遺伝子の発現を妨害しながら、同時にC A R および/またはT C R をノックインするために使用され得る。別の例では、1つ以上のC A R および/またはT C R が、遺伝子のイントロンに隣接して、遺伝子のイントロンの近くに、または遺伝子のイントロン内に、挿入され得る。C A R および/またはT C R は、アデノ隨伴ウイルス(A A V)のウイルスベクターによって導入され得、標的化されたゲノム位置にインテグレートされ得る。いく

10

20

20

30

40

50

つかの場合において、r A A Vベクターを使用して、ある特定の位置への導入遺伝子の挿入を指示することができる。例えば、いくつかの場合において、C A Rおよび/またはT C Rが、r A A VまたはA A Vベクターによって、N K G 2 A、S i g l e c 7、L A G 3、T I M 3、C I S H、F O X O 1、T G F B R 2、T I G I T、C D 9 6、アデノシンレセプター2 A、N R 3 C 1、P D 1、P D L - 1、P D L - 2、C D 4 7、S I R P a、S H I P 1、A D A M 1 7、p S 6、4 E B P 1、C D 2 5、C D 4 0、I L 2 1 R、I C A M 1、C D 9 5、C D 8 0、C D 8 6、I L 1 0 R、C D 5またはC D 7遺伝子の少なくとも一部分にインテグレートされ得る。

#### 【0102】

細胞の標的化される遺伝子座の改変は、細胞にD N Aを導入することによって行うことができ、ここで、そのD N Aは、標的遺伝子座に対して相同性を有する。D N Aは、マーカー遺伝子を含むことができ、それにより、インテグレートされた構築物を含む細胞の選択が可能になる。標的ベクター内の相補D N Aは、標的遺伝子座において染色体D N Aと組み換わり得る。マーカー遺伝子は、相補D N A配列、3'組換えアームおよび5'組換えアームに隣接し得る。細胞内の複数の遺伝子座が標的化され得る。例えば、複数のゲノム改変が一工程で行われるように、1つ以上の標的遺伝子座に特異的な組換えアームを有する導入遺伝子が同時に導入され得る。相同性アームは、約0.2 k b～約5 k b長（例えば、約0.2 k b、0.4 k b、0.6 k b、0.8 k b、1.0 k b、1.2 k b、1.4 k b、1.6 k b、1.8 k b、2.0 k b、2.2 k b、2.4 k b、2.6 k b、2.8 k b、3.0 k b、3.2 k b、3.4 k b、3.6 k b、3.8 k b、4.0 k b、4.2 k b、4.4 k b、4.6 k b、4.8 k bから約5.0 k b長など）であり得る。

10

#### 【0103】

1つの方法において、ガイドR N Aは、阻害性遺伝子の遺伝子座の領域（例えば、その遺伝子のプロモーター、エキソンまたはイントロンに隣接した領域）を標的化するようにデザインされ得る。ガイドR N Aは、阻害性遺伝子のエキソン（例えば、第1、第2または第3のエキソン）の5'末端を標的化し得る。ガイドR N Aは、A A Vベクター修復マトリックスに含められ得る。A A Vベクターは、P 2 Aペプチドなどの自己切断2 Aペプチドに続いてC A R c D N Aをコードし得る。C A RカセットおよびガイドR N A配列は、阻害性遺伝子に対する相同性アームに隣接していることがある。次いで、免疫細胞に、A A VベクターおよびC a s 9（例えば、C a s 9 m R N A）が導入（例えば、エレクトロポレーション）され得る。

20

30

#### I V . 免疫細胞

#### 【0104】

本開示のある特定の実施形態は、複数の遺伝子のノックアウトを有するようにおよび/または阻害性遺伝子の遺伝子座にC A Rのノックインを有するように操作された免疫細胞に関する。それらの免疫細胞は、T細胞（例えば、制御性T細胞、C D 4<sup>+</sup> T細胞、C D 8<sup>+</sup> T細胞またはガンマ-デルタT細胞）、N K細胞、インバリアントN K細胞、N K T細胞、B細胞、幹細胞（例えば、間葉系幹細胞（M S C）または人工多能性幹（i P S C）細胞）であり得る。それらの免疫細胞は、ウイルス特異的であり得、C A Rを発現し得、かつ/またはT C Rを発現し得る。いくつかの実施形態において、それらの細胞は、単球または顆粒球、例えば、骨髓性細胞、マクロファージ、好中球、樹状細胞、マスト細胞、好酸球および/または好塩基球である。免疫細胞を作製および操作する方法、ならびに養子細胞療法のためにそれらの細胞を使用および投与する方法も本明細書中に提供され、その場合、それらの細胞は、自己または同種異系であり得る。したがって、それらの免疫細胞は、癌細胞を標的化するためなどの免疫療法として使用され得る。

40

#### 【0105】

上記免疫細胞は、被験体、特にヒト被験体から単離され得る。それらの免疫細胞は、目的の被験体（例えば、特定の疾患もしくは状態を有すると疑われる被験体、特定の疾患もしくは状態の素因を有すると疑われる被験体、または特定の疾患もしくは状態に対する治

50

療を受けている被験体)から得ることができる。免疫細胞は、それらが被験体内に存在する任意の位置から回収することができ、それらの位置としては、血液、臍帯血、脾臓、胸腺、リンパ節および骨髄が挙げられるが、これらに限定されない。単離された免疫細胞は、直接使用され得るか、または凍結などによって、ある時間にわたって保存され得る。

【0106】

上記免疫細胞は、それらが存在する任意の組織から濃縮／精製されてもよく、それらの組織としては、血液(血液バンクまたは臍帯血バンクによって回収された血液を含む)、脾臓、骨髄、外科手技中に除去および／または露出された組織、ならびに生検手技を介して得られた組織が挙げられるが、これらに限定されない。免疫細胞が濃縮、単離および／または精製される組織／器官は、生存している被験体と生存していない被験体の両方から単離され得る。ここで、生存していない被験体は、臓器ドナーである。特定の実施形態において、免疫細胞は、末梢血もしくは臍帯血またはそれらの混合物などの血液から単離される。いくつかの態様において、臍帯血から単離された免疫細胞は、CD4陽性またはCD8陽性T細胞の抑制によって測定されるような、高い免疫調節能を有する。具体的な態様において、免疫細胞は、高い免疫調節能を求めて、プールされた血液、特に、プールされた臍帯血から単離される。プールされた血液は、2つ以上の起源(例えば、3、4、5、6、7、8、9、10個以上の起源(例えば、ドナー被験体))からの血液であり得る。

10

【0107】

免疫細胞の集団は、治療を必要とする被験体または低い免疫細胞活性に関連する疾患に罹患している被験体から得ることができる。したがって、それらの細胞は、治療を必要とする被験体にとって自己であり得る。あるいは、免疫細胞の集団は、ドナー、好ましくは、組織適合性がマッチしたドナーから得ることができる。その免疫細胞集団は、末梢血、臍帯血、骨髄、脾臓、または免疫細胞が被験体もしくはドナーに存在する他の任意の器官／組織から収集され得る。それらの免疫細胞は、被験体および／またはドナーのプール、例えば、プールされた臍帯血から単離され得る。

20

【0108】

免疫細胞集団が、被験体とは異なるドナーから得られるとき、そのドナーは、好ましくは同種異系であるが、但し、得られる細胞は、それらの細胞が被験体に導入可能であるという点で、被験体と適合している。同種異系ドナー細胞は、ヒト白血球抗原(HLA)が適合していてもよいし、そうでなくてもよい。

30

A. T細胞

【0109】

いくつかの実施形態において、免疫細胞は、T細胞である。機能的な抗腫瘍エフェクタ－細胞の誘導、活性化および拡大のためのいくつかの基本的なアプローチが、過去20年で報告してきた。これらとしては、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)などの自己細胞；自己DC、リンパ球、人工抗原提示細胞(APC)、またはT細胞リガンドおよび活性化抗体でコーティングされたビーズ、または標的細胞膜の捕捉によって単離された細胞を用いてエキソビオで活性化されたT細胞；抗宿主腫瘍T細胞レセプター(TCR)を天然に発現している同種異系細胞；および「T-ボディ」として知られる抗体様腫瘍認識能を示す腫瘍反応性TCR分子またはキメラTCR分子を発現するように遺伝的に再プログラムされたまたは「再指示された」非腫瘍特異的な自己細胞または同種異系細胞が挙げられる。これらのアプローチは、本明細書中に記載される方法において使用され得る、T細胞を調製および免疫化するための数多くのプロトコルの元となった。

40

【0110】

いくつかの実施形態において、T細胞は、血液、骨髄、リンパ液、臍帯またはリンパ系器官に由来する。いくつかの態様において、それらの細胞は、ヒト細胞である。それらの細胞は、通常、初代細胞であり、例えば、被験体から直接単離された細胞、および／または被験体から単離され、凍結された細胞である。いくつかの実施形態において、それらの細胞には、T細胞または他の細胞型の1つ以上のサブセット(例えば、T細胞集団全体、CD4<sup>+</sup>細胞、CD8<sup>+</sup>細胞、およびそれらの部分集団、例えば、機能、活性化状態、成

50

熟度、分化の可能性、拡大、再循環、局在化および／または残存能、抗原特異性、抗原レセプターのタイプ、特定の器官もしくはコンパートメントに存在すること、マーカーもしくはサイトカイン分泌のプロファイル、および／または分化の程度によって定義される部分集団）が含まれる。処置される被験体に関して、細胞は、同種異系細胞および／または自己細胞であり得る。いくつかの態様において、既存技術などの場合、細胞は、多能性および／または複能性である（例えば、人工多能性幹細胞（iPSC）などの幹細胞）。いくつかの実施形態において、上記方法は、被験体から細胞を単離する工程、それらを本明細書中に記載されるように調製、処理、培養および／または操作する工程、ならびに凍結保存の前または後にそれらを同じ患者に再導入する工程を含む。

## 【0111】

10

T細胞（例えば、CD4<sup>+</sup>および／またはCD8<sup>+</sup>T細胞）のサブタイプおよび部分集団に含まれるのは、ナイーブT（TN）細胞、エフェクターT細胞（TEFF）、メモリーT細胞およびそのサブタイプ（例えば、幹細胞メモリーT（TSCM）、セントラルメモリーT（TCM）、エフェクターメモリーT（TEM）または最終分化型エフェクターメモリーT細胞、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）、未熟T細胞、成熟T細胞、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、粘膜関連インバリアントT（MAIT）細胞、内在性および獲得型（adaptive）の制御性T（Treg）細胞、ヘルパーT細胞（例えば、TH1細胞、TH2細胞、TH3細胞、TH17細胞、TH9細胞、TH22細胞、濾胞性ヘルパーT細胞）、アルファ／ベータT細胞およびデルタ／ガンマT細胞である。

## 【0112】

20

いくつかの実施形態において、T細胞集団の1つ以上は、表面マーカーなどの特異的マーカーが陽性であるかまたは特異的マーカーが陰性である細胞が濃縮されているか、または枯渇している。いくつかの場合において、そのようなマーカーは、ある特定のT細胞集団（例えば、非メモリー細胞）上に存在しないかまたは比較的低レベルでしか発現されないが、ある特定の他のT細胞集団（例えば、メモリー細胞）上には存在するかまたは比較的高レベルで発現されるマーカーである。

## 【0113】

いくつかの実施形態において、T細胞は、非T細胞（例えば、B細胞、単球または他の白血球）上に発現されているマーカー（例えば、CD14）のネガティブ選択によってPBMCサンプルから分離される。いくつかの態様では、CD4<sup>+</sup>またはCD8<sup>+</sup>選択工程を用いることにより、CD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞およびCD8<sup>+</sup>細胞傷害性T細胞が分離される。そのようなCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>集団は、1つ以上のナイーブ、メモリーおよび／またはエフェクターT細胞の部分集団上に発現されているまたは比較的高い程度に発現されているマーカーのポジティブまたはネガティブ選択によって、さらに部分集団にソーティングされ得る。

30

## 【0114】

いくつかの実施形態において、CD8<sup>+</sup>T細胞は、それぞれの部分集団に関連する表面抗原に基づくポジティブ選択またはネガティブ選択などによって、ナイーブ、セントラルメモリー、エフェクターメモリーおよび／またはセントラルメモリー幹細胞がさらに濃縮されるかまたは枯渇される。いくつかの実施形態において、セントラルメモリーT（TCM）細胞の濃縮は、投与後の長期生存率、拡大および／または生着を改善するなどの有効性を高めるために行われ、これは、いくつかの態様において、そのような部分集団において特に頑健である。

40

## 【0115】

いくつかの実施形態において、T細胞は、自己T細胞である。この方法では、腫瘍サンプルを患者から入手し、単一細胞の懸濁液を得る。その単一細胞の懸濁液は、任意の好適な様式で、例えば、機械的に（例えば、gentleMACS<sup>TM</sup> Dissociator, Miltenyi Biotech, Auburn, Calif. を用いて腫瘍を脱凝集させて）または酵素的に（例えば、コラゲナーゼまたはDNase）得ることができる。腫瘍の酵素消化物の単一細胞の懸濁液を、インターロイキン-2 (IL-2) 中で培養

50

する。

【0116】

培養されたT細胞は、プールされ、急速に拡大され得る。約10～約14日間にわたる急速な拡大によって、抗原特異的T細胞の数が少なくとも約50倍（例えば、50、60、70、80、90もしくは100倍またはそれ以上）増加する。より好ましくは、約10～約14日間にわたる急速な拡大によって、少なくとも約200倍（例えば、200、300、400、500、600、700、800、900またはそれ以上）増加する。

【0117】

当該分野で公知であるようないくつかの方法のうちのいずれかによって、拡大が達成され得る。例えば、T細胞は、フィーダーリンパ球と、インターロイキン-2（IL-2）またはインターロイキン-15（IL-15）のいずれか（IL-2が好ましい）との存在下において非特異的T細胞レセプター刺激を用いて容易に拡大され得る。その非特異的T細胞レセプター刺激は、およそ30ng/mlの、マウスモノクローナル抗CD3抗体であるOKT3（Ortho-McNeil（登録商標），Raritan, N.J.から入手可能）を含み得る。あるいは、T細胞は、T細胞成長因子（例えば、300IU/mlのIL-2またはIL-15（IL-2が好ましい））の存在下において1つ以上の癌抗原（エピトープなどのその抗原性部分、または細胞を含む）で末梢血単核球（PBM）をインビトロにおいて刺激することによって容易に拡大され得、その癌抗原は、必要に応じてベクターから発現され得、例えば、ヒト白血球抗原A2（HLA-A2）結合ペプチドである。そのインビトロで誘導されたT細胞は、HLA-A2を発現している抗原提示細胞に対してパルスされた同じ癌抗原による再刺激によって急速に拡大される。あるいは、それらのT細胞は、例えば、照射された自己リンパ球または照射されたHLA-A2<sup>+</sup>同種異系リンパ球およびIL-2で再刺激され得る。

10

20

30

【0118】

上記自己T細胞は、それらの自己T細胞の増殖および活性化を促進するT細胞成長因子を発現するように改変され得る。好適なT細胞成長因子としては、例えば、インターロイキン（IL）-2、IL-7、IL-15およびIL-12が挙げられる。好適な改変方法は、当該分野で公知である。例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001；およびAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994を参照のこと。特定の態様において、改変された自己T細胞は、T細胞成長因子を高レベルで発現する。T細胞成長因子コード配列（例えば、IL-12のコード配列）は、T細胞成長因子コード配列への作動可能な連結が高レベル発現を促進するプロモーターと同様に、当該分野において容易に入手可能である。

B. NK細胞

【0119】

いくつかの実施形態において、免疫細胞は、ナチュラルキラー（NK）細胞である。NK細胞は、種々の腫瘍細胞、ウイルスに感染した細胞、ならびに骨髄および胸腺における一部の正常細胞に対して自発的な細胞傷害性を有するリンパ球の部分集団である。NK細胞は、骨髄、リンパ節、脾臓、扁桃および胸腺において分化し、成熟する。NK細胞は、ヒトにおいては、CD16、CD56およびCD8などの特定の表面マーカーによって検出され得る。NK細胞は、T細胞抗原レセプター、汎TマーカーCD3、または表面免疫グロブリンB細胞レセプターを発現しない。

40

【0120】

ある特定の実施形態において、NK細胞は、当該分野で周知の方法によってヒト末梢血単核球（PBM））、未刺激の白血球搬出法生成物（PBS）、ヒト胚性幹細胞（hESC）、人工多能性幹細胞（iPSC）、骨髄または臍帯血から得られる。特に、臍帯血

50

が、NK細胞を得るために使用される。ある特定の態様において、NK細胞は、以前に報告された、NK細胞をエキソビオで拡大する方法 (Spanholtz et al., 2011; Shah et al., 2013) によって単離され、拡大される。この方法では、CB単核細胞をフィコール密度勾配遠心分離によって単離し、IL-2および人工抗原提示細胞 (APC) とともにバイオリアクター内で培養する。7日後に、細胞培養物から、CD3を発現する任意の細胞を枯渇させ、さらに7日間、再培養する。再度、細胞のCD3枯渇を行い、CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>細胞またはNK細胞のパーセンテージを測定するために特徴付ける。他の方法では、臍帯血を使用し、CD34<sup>+</sup>細胞の単離、ならびにSCF、IL-7、IL-15およびIL-2を含む培地内で培養することによるCD56<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>細胞への分化によって、NK細胞を得る。

#### 【0121】

具体的な実施形態において、NK細胞は、調製中のある時点において拡大される。具体的な場合において、NK細胞の拡大は、臍帯血由来の単核細胞 (MNC) を抗原提示細胞 (APC) およびIL-2の存在下において刺激すること；およびそれらの細胞をAPCで再刺激して、拡大されたNK細胞を生成することを含み、少なくともいくつかの場合において、この方法は、バイオリアクター内で行われる。刺激工程は、MNCをNK細胞に向かわせることができる。再刺激工程は、IL-2の存在を含んでもよいし、含まなくてもよい。特定の態様において、その方法は、刺激工程中に任意の培地構成要素の除去または添加を含まない。特定の態様において、その方法は、ある特定の時間枠内 (例えば、15日未満、例えば、14日) で行われる。

#### 【0122】

ある特定の実施形態において、NK細胞は、拡大するためのエキソビオでの方法によって拡大され、その方法は、(a) 臍帯血から単核細胞 (MNC) の出発集団を得る工程；(b) そのMNCを抗原提示細胞 (APC) およびIL-2の存在下において刺激する工程；および(c) その細胞をAPCで再刺激して、拡大されたNK細胞を生成する工程を含み、その方法は、バイオリアクター内で行われ、優良製造規範 (good manufacturing practice) (GMP) に準拠している。工程 (b) の刺激によって、MNCをNK細胞に向かわせることができる。工程 (c) は、IL-2の存在を含んでもよいし、含まなくてもよい。特定の態様において、その方法は、工程 (b) の間に任意の培地構成要素の除去または添加を含まない。特定の態様において、その方法は、15日未満 (例えば、14日) で行われる。

#### 【0123】

いくつかの態様において、上記方法は、例えばCD3などの1つ以上の特定のマーカーが陽性の細胞を枯渇させる工程をさらに含む。ある特定の態様において、枯渇工程は、工程 (b) と工程 (c) の間に行われる。いくつかの態様において、それらの細胞は、CD3枯渇のためにバイオリアクターから取り出され、工程 (c) のためのバイオリアクターに入れられる。

#### 【0124】

ある特定の態様において、臍帯血からMNCの出発集団を得る工程は、デキストラン、ヒト血清アルブミン (HSA) 、DNaseおよび/または塩化マグネシウムの存在下において臍帯血を解凍する工程を含む。特定の態様において、臍帯血からMNCの出発集団を得る工程は、デキストランおよび/またはDNaseの存在下において臍帯血を解凍する工程を含む。具体的な態様において、臍帯血は、5~20% (例えば、10%) のデキストランの存在下において洗浄される。ある特定の態様において、臍帯血は、100~300mMの濃度、特に200mMなどの塩化マグネシウムの存在下において懸濁される。いくつかの態様において、得る工程は、フィコール密度勾配遠心分離を行って単核細胞 (MNC) を得る工程を含む。

#### 【0125】

ある特定の態様において、バイオリアクターは、気体透過性のバイオリアクターである。特定の態様において、気体透過性のバイオリアクターは、G-Rex100MまたはG

10

20

30

40

50

- R × 100 である。いくつかの態様において、工程 (b) の刺激は、3 ~ 5 L の培地 (例えば、3、3.5、4、4.5 または 5 L) において行われる。

【0126】

いくつかの態様において、APC は、ガンマ線を照射される。ある特定の態様において、APC は、膜結合型 IL-21 (mbIL-21) を発現するように操作される。特定の態様において、APC は、IL-21、IL-15 および / または IL-2 を発現するように操作される。いくつかの態様において、MNC と APC とは、1 : 2 の比で培養される。いくつかの態様において、IL-2 は、50 ~ 200 IU / mL の濃度 (例えば、100 IU / mL) で存在する。特定の態様において、IL-2 は、2 ~ 3 日ごとに補充される。

10

【0127】

特定の態様において、工程 (b) は、6 ~ 8 日間 (例えば、7 日間) 行われる。いくつかの態様において、工程 (c) は、6 ~ 8 日間 (例えば、7 日間) 行われる。いくつかの態様において、工程 (c) は、細胞の分割を含まない。特定の態様において、上記細胞には、工程 (c) の間に IL-2 が 2 回供給され、具体的な場合では、工程 (c) の間に他の培地構成要素が添加されないか、または除去されない。

【0128】

いくつかの態様において、上記方法は、3 つ、4 つ、5 つまたは 6 つのバイオリアクターの使用を含む。特定の態様において、上記方法は、10 個未満のバイオリアクターの使用を含む。

20

【0129】

具体的な態様において、NK 細胞は、少なくとも 500 倍、800 倍、1000 倍、1200 倍、1500 倍、2000 倍、2500 倍、3000 倍または 5000 倍拡大される。特定の態様において、バイオリアクター内で NK 細胞を培養することにより、静置液体培養と比べて 1000 倍超の NK 細胞が生成される。

【0130】

ある特定の態様において、上記方法は、ヒト白血球抗原 (HLA) の適合を含まない。いくつかの態様において、NK 細胞の出発集団は、ハプロタイプ一致ドナーから得られない。

【0131】

いくつかの態様において、上記の拡大された NK 細胞は、末梢血から拡大された NK 細胞と比べて高い抗腫瘍活性を有する。ある特定の態様において、上記の拡大された NK 紡錘は、末梢血から拡大された NK 細胞と比べて、1 つ以上の細胞周期遺伝子、1 つ以上の細胞分裂遺伝子および / または 1 つ以上の DNA 複製遺伝子を高発現している。いくつかの態様において、上記の拡大された NK 紡錘は、末梢血から拡大された NK 紡錘と比べて、より高い増殖能を有する。いくつかの態様において、上記の拡大された NK 紡錘は、疲弊を示さない。ある特定の態様において、疲弊は、パーフォリン、グランザイム、CD57、KLRG1 および / または PD1 の発現を測定することによって検出される。いくつかの態様において、上記の拡大された NK 紡錘は、パーフォリンおよび / または グランザイムを高発現している。ある特定の態様において、上記の拡大された NK 紡錘は、CD57、KLRG1 および / または PD1 を低発現しているか、または発現していない。

30

【0132】

いくつかの態様において、拡大された NK 紡錘は、臨床的に妥当な用量を含む。ある特定の態様において、臍帯血は、凍結臍帯血である。特定の態様において、凍結臍帯血は、1 つ以上の感染症 (例えば、A 型肝炎、B 型肝炎、C 型肝炎、Trypanosoma cruzi、HIV、ヒト T リンパ向性ウイルス、梅毒、ジカウイルスなど) について試験済みである。いくつかの態様において、臍帯血は、3、4、5、6、7 または 8 単位の個々の臍帯血単位などからプールされた臍帯血である。

40

【0133】

いくつかの態様において、NK 紡錘は、例えばレシピエント自体に対して、自己の NK

50

細胞ではない。ある特定の態様において、N K 細胞は、例えばレシピエント自体に対して、同種異系のN K 細胞ではない。

【 0 1 3 4 】

いくつかの態様において、A P C は、ユニバーサル抗原提示細胞 ( u A P C ) である。ある特定の態様において、u A P C は、( 1 ) C D 4 8 および / または C S 1 ( C D 3 1 9 ) 、( 2 ) 膜結合型インターロイキン - 2 1 ( m b I L - 2 1 ) 、ならびに ( 3 ) 4 1 B B リガンド ( 4 1 B B L ) を発現するように操作される。いくつかの態様において、u A P C は、C D 4 8 を発現する。ある特定の態様において、u A P C は、C S 1 を発現する。特定の態様において、u A P C は、C D 4 8 および C S 1 を発現する。いくつかの態様において、u A P C は、内在性の H L A クラス I 、 I I および / または C D 1 d 分子の発現を本質的に有しない。ある特定の態様において、u A P C は、I C A M - 1 ( C D 5 4 ) および / または L F A - 3 ( C D 5 8 ) を発現する。特定の態様において、u A P C はさらに、K 5 6 2 細胞などの白血病細胞由来の a A P C と定義される。

C . 幹細胞

【 0 1 3 5 】

いくつかの実施形態において、本開示の免疫細胞は、人工多能性幹細胞 ( P S C ) 、間葉系幹細胞 ( M S C ) または造血幹細胞 ( H S C ) などの幹細胞であり得る。

【 0 1 3 6 】

本明細書中で使用される多能性幹細胞は、通常、i P S 細胞またはi P S C と省略される、人工多能性幹 ( i P S ) 細胞であり得る。生殖細胞を除く任意の細胞をi P S C の出発点として使用することができる。例えば、細胞型は、ケラチノサイト、線維芽細胞、造血細胞、間葉系細胞、肝臓細胞または胃細胞であり得る。細胞分化の程度または細胞が回収される動物の年齢に制限はない。未分化な前駆細胞 ( 体性幹細胞を含む ) および最終分化した成熟細胞でさえも、本明細書中に開示される方法において体細胞の起源として使用することができる。

【 0 1 3 7 】

体細胞は、当業者に公知の方法を用いて初期化されて、i P S 細胞を生成し得る。一般に、体細胞から多能性幹細胞を生成するためには、核の初期化因子が使用される。いくつかの実施形態において、K 1 f 4 、 c - M y c 、 O c t 3 / 4 、 S o x 2 、 N a n o g および L i n 2 8 のうちの少なくとも 3 つまたは少なくとも 4 つが使用される。他の実施形態では、O c t 3 / 4 、 S o x 2 、 c - M y c および K 1 f 4 が使用されるか、または O c t 3 / 4 、 S o x 2 、 N a n o g および L i n 2 8 が使用される。

【 0 1 3 8 】

i P S C は、いったん誘導されると、多能性を維持するのに十分な培地中で培養することができる。ある特定の実施形態では、不確定条件が使用され得る。例えば、多能性細胞は、その幹細胞を未分化な状態で維持するために、線維芽細胞フィーダー細胞上で、または線維芽細胞フィーダー細胞に曝露された培地上で培養され得る。いくつかの実施形態において、その細胞は、細胞分裂を終結させるために照射または抗生物質で処置されたマウス胎仔線維芽細胞をフィーダー細胞として共存させて培養される。あるいは、多能性細胞は、T E S R <sup>TM</sup> 培地またはE 8 <sup>TM</sup> / E s s e n t i a l 8 <sup>TM</sup> 培地などのフィーダー非依存性の明確な培養系を用いて、本質的に未分化な状態で培養および維持され得る。

V . 遺伝的に操作された抗原レセプター

【 0 1 3 9 】

本開示の免疫細胞は、抗原レセプター ( 例えば、操作された T C R 、 C A R 、キメラサイトカインレセプター、ケモカインレセプター、それらの組み合わせなど ) を発現するように遺伝的に操作され得る。例えば、免疫細胞は、癌抗原に対する抗原特異性を有する C A R および / または T C R を発現するように変更される。複数の C A R および / または T C R ( 例えば、種々の抗原に対するもの ) が、免疫細胞に加えられ得る。いくつかの態様において、免疫細胞は、C R I S P R を用いた阻害性遺伝子の遺伝子座における C A R または T C R のノックインによって、C A R または T C R を発現するように操作される。

10

20

30

40

50

## 【0140】

好適な改変方法は、当該分野で公知である。例えば、Sambrook and Ausubel, 前出を参照のこと。例えば、上記細胞は、Heemskerk et al., 2008 および Johnson et al., 2009 に記載されている形質導入法を用いて、癌抗原に対する抗原特異性を有する TCR を発現するように形質導入され得る。

## 【0141】

レトロウイルスによって形質導入された TCR 鎖と内在性の TCR 鎖との対形成によって引き起こされる自己反応性に関する長期的な問題を克服する選択肢として、完全長 TCR および（または および）鎖をコードする RNA のエレクトロポレーションを使用することができる。そのような代替の対形成が、一過性のトランスフェクションストラテジーにおいて起きたとしても、導入された TCR および 鎖は、一過性に発現されるだけなので、生成される可能性がある自己反応性 T 細胞は、しばらくするとこの自己反応性を失う。導入された TCR および 鎖の発現が減少すると、正常な自己の T 細胞だけが残る。これは、完全長 TCR 鎖が、安定したレトロウイルス形質導入によって導入されたときは当てはまらず、導入された TCR 鎖は失われることはなく、患者に絶えず自己反応性が存在するようになる。

10

## 【0142】

いくつかの実施形態において、上記細胞は、1つ以上の抗原レセプターをコードする、遺伝子操作を介して導入された1つ以上の核酸、およびそのような核酸の遺伝的に操作された産物を含む。いくつかの実施形態において、それらの核酸は、異種であり、すなわち、正常には、細胞または細胞から得られるサンプルに存在しない（例えば、別の生物または細胞から得られ、それは、例えば、操作されている細胞および/またはそのような細胞が由来する生物において通常見られない）。いくつかの実施形態において、それらの核酸は、自然界に見られない核酸（例えばキメラ）など、天然に存在しない。

20

## 【0143】

いくつかの実施形態において、上記CARは、抗原に特異的に結合する細胞外の抗原認識ドメインを含む。いくつかの実施形態において、その抗原は、細胞表面上に発現されるタンパク質である。いくつかの実施形態において、上記CARは、TCR様CARであり、抗原は、TCRと同様に主要組織適合遺伝子複合体（MHC）分子の状況において細胞表面上で認識される、プロセシングを受けたペプチド抗原（例えば、細胞内タンパク質のペプチド抗原）である。

30

## 【0144】

CAR および組換え TCR をはじめとした例示的な抗原レセプター、ならびにそれらのレセプターを操作するための方法およびそれらのレセプターを細胞に導入するための方法としては、例えば、国際特許出願公開番号 WO 200014257, WO 2013126726, WO 2012/129514, WO 2014031687, WO 2013/166321, WO 2013/071154, WO 2013/123061、米国特許出願公開番号 US 2002131960, US 2013287748, US 20130149337、米国特許第 6,451,995 号、同第 7,446,190 号、同第 8,252,592 号、同第 8,339,645 号、同第 8,398,282 号、同第 7,446,179 号、同第 6,410,319 号、同第 7,070,995 号、同第 7,265,209 号、同第 7,354,762 号、同第 7,446,191 号、同第 8,324,353 号および同第 8,479,118 号、ならびに欧州特許出願番号 EP 2537416 に記載されているもの、および/または Sadelaar et al., 2013; Davila et al., 2013; Turtle et al., 2012; Wu et al., 2012 によって記載されたものが挙げられる。いくつかの態様において、遺伝的に操作された抗原レセプターには、米国特許第 7,446,190 号に記載されているような CAR、および国際特許出願公開番号 WO / 2014055668 A1 に記載されているものが含まれる。

40

## 【0145】

いくつかの実施形態において、上記CARは、a) 1つ以上の細胞内のシグナル伝達ドメイン、b) 膜貫通ドメイン、およびc) 抗原結合領域を含む細胞外のドメインを含む。

## 【0146】

いくつかの実施形態において、操作された抗原レセプターには、活性化型または刺激型のCAR、共刺激型のCAR (WO 2014/055668を参照のこと) および/または阻害型のCAR (iCAR、Fedorov et al., 2013を参照のこと) をはじめとしたCARが含まれる。それらのCARは、一般に、1つ以上の細胞内のシグナル伝達構成要素に、いくつかの態様ではリンカーおよび/または膜貫通ドメインを介して連結された、細胞外の抗原(またはリガンド)結合ドメインを含む。そのような分子は、通常、天然の抗原レセプターを介するシグナル、共刺激レセプターとともにそのようなレセプターを介するシグナル、および/または共刺激レセプターのみを介するシグナルを模倣するかまたはまねる。

10

## 【0147】

本開示のある特定の実施形態は、細胞内のシグナル伝達ドメイン、膜貫通ドメイン、および1つ以上のシグナル伝達モチーフを含む細胞外のドメインを含む、抗原特異的CARポリペプチド(免疫原性を低減するためにヒト化されたCAR(hCAR)を含む)をコードする核酸を含む核酸の使用に関する。ある特定の実施形態において、そのCARは、1つ以上の抗原の間で共有される空間を含むエピトープを認識し得る。ある特定の実施形態において、結合領域は、モノクローナル抗体の相補性決定領域、モノクローナル抗体の可変領域、および/またはそれらの抗原結合フラグメントを含み得る。別の実施形態において、その特異性は、レセプターに結合するペプチド(例えば、サイトカイン)に由来する。

20

## 【0148】

ヒトCAR核酸は、ヒト患者に対する細胞免疫療法を増強するために使用されるヒト遺伝子であり得ると企図される。具体的な実施形態において、本発明は、CARの完全長cDNAまたはコード領域を含む。その抗原結合領域またはドメインは、特定のヒトモノクローナル抗体に由来する一本鎖可変フラグメント(scfv)のV<sub>H</sub>鎖およびV<sub>L</sub>鎖のフラグメント(例えば、参照により本明細書中に援用される米国特許第7,109,304号に記載されているもの)を含み得る。そのフラグメントは、ヒト抗原特異的抗体の任意の数の異なる抗原結合ドメインでもあり得る。より具体的な実施形態において、そのフラグメントは、ヒト細胞における発現のためにヒトのコドン使用頻度に最適化された配列によってコードされる抗原特異的scfvである。

30

## 【0149】

配置は、多量体であり得る(例えば、ダイアボディまたは多量体)。その多量体は、軽鎖および重鎖の可変部分がダイアボディに交差対形成することによって形成される可能性が最も高い。その構築物のヒンジ部分には、完全欠失から、1つ目のシステインが維持されること、セリン置換ではなくプロリン置換であること、1つ目のシステインまで切断されることにまで及ぶ複数の選択肢があり得る。Fc部分を欠失させることができる。安定したかつ/または二量体化する任意のタンパク質が、この目的にかない得る。Fcドメインのうちの1つだけ、例えば、ヒト免疫グロブリンのCH2ドメインまたはCH3ドメインを使用することができる。二量体化を改善するように改変されたヒト免疫グロブリンのヒンジ、CH2およびCH3領域を使用することもできる。免疫グロブリンのヒンジ部分だけを使用することもできる。CD8アルファの部分を使用することもできる。

40

## 【0150】

いくつかの実施形態において、上記CAR核酸は、膜貫通ドメインおよび改変されたCD28細胞内シグナル伝達ドメインなどの、他の共刺激レセプターをコードする配列を含む。他の共刺激レセプターとしては、CD28、CD27、OX-40(CD134)、DAP10、DAP12および4-1BB(CD137)のうちの1つ以上が挙げられるが、これらに限定されない。CD3によって惹起される1次シグナルに加えて、ヒトC

50

A R に挿入されたヒト共刺激レセプターによって提供されるさらなるシグナルが、N K 細胞の完全な活性化にとって重要であり、インビボでの持続性および養子免疫療法の治療の成功の改善を助け得る。

【 0 1 5 1 】

いくつかの実施形態において、C A R は、養子療法によって標的化される特定の細胞型において発現される抗原などの特定の抗原（またはマーカーまたはリガンド）、例えば、癌マーカーおよび／または減衰応答を誘導することを目的とした抗原（例えば、正常細胞型上または非罹患細胞型上に発現される抗原）に対する特異性を有するように構築される。したがって、上記C A R は通常、その細胞外の部分に、1 つ以上の抗原結合分子（例えば、1 つ以上の抗原結合フラグメント、抗原結合ドメインもしくは抗原結合部分）または1 つ以上の抗体可変ドメイン、および／または抗体分子を含む。いくつかの実施形態において、上記C A R は、抗体分子の抗原結合部分（例えば、モノクローナル抗体（m A b）の可変重鎖（V H）および可変軽鎖（V L）に由来する一本鎖抗体フラグメント（s c F v））を含む。

10

【 0 1 5 2 】

キメラ抗原レセプターのある特定の実施形態において、そのレセプターの抗原特異的部分（抗原結合領域を含む細胞外ドメインと称され得る）は、腫瘍関連抗原または病原体特異的抗原結合ドメインを含む。抗原には、デクチン-1などのパターン認識レセプターによって認識される糖鎖抗原が含まれる。腫瘍関連抗原は、腫瘍細胞の細胞表面上に発現される限り、任意の種類であってよい。腫瘍関連抗原の例示的な実施形態としては、C D 1 9、C D 2 0、癌胎児抗原、アルファフェトプロテイン、C A - 1 2 5、M U C - 1、C D 5 6、E G F R、c - M e t、A K T、H e r 2、H e r 3、上皮性腫瘍抗原、黒色腫関連抗原、変異型p 5 3、変異型r a sなどが挙げられる。ある特定の実施形態において、C A R は、腫瘍関連抗原の量が少ないと、持続性を改善するためにサイトカインと同時発現され得る。例えば、C A R は、I L - 7、I L - 2、I L - 1 5、I L - 1 2、I L - 1 8、I L - 2 1またはそれらの組み合わせなどの1 つ以上のサイトカインと同時発現され得る。

20

【 0 1 5 3 】

キメラレセプターをコードするオープンリーディングフレームの配列は、ゲノムD N A起源、c D N A起源から得ることができるか、または合成することができるか（例えば、P C Rを介して）、またはそれらの組み合わせであり得る。イントロンはm R N Aを安定化すると見出されているので、ゲノムD N Aのサイズおよびイントロンの数に応じて、c D N Aまたはそれらの組み合わせを使用することが望ましい場合がある。また、m R N Aを安定化するために内在性または外来性の非コード領域を使用することもさらに有益であり得る。

30

【 0 1 5 4 】

上記キメラ構築物は、裸のD N Aとしてまたは好適なベクターに入った状態で免疫細胞に導入され得ることが企図される。裸のD N Aを用いたエレクトロポレーションによって細胞を安定的にトランスフェクトする方法は、当該分野で公知である。例えば、米国特許第6,410,319号を参照のこと。裸のD N Aとは、一般に、発現にとって適切な向きでプラスミド発現ベクターに含められたキメラレセプターをコードするD N Aのことを指す。

40

【 0 1 5 5 】

あるいは、キメラ構築物を免疫細胞に導入するために、ウイルスベクター（例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターまたはレンチウイルスベクター）を用いることができる。本開示の方法に従って使用するのに適したベクターは、免疫細胞において非複製性のベクターである。ウイルスに基づくベクターが多数知られており（例えば、H I V、S V 4 0、E B V、H S VまたはB P Vに基づくベクター）、細胞内に維持されるそのウイルスのコピー数は、その細胞の生存能を維持するほど十分低い。

50

## 【0156】

いくつかの態様において、抗原に特異的に結合する構成要素または抗原特異的認識構成要素は、1つ以上の膜貫通ドメインおよび細胞内のシグナル伝達ドメインに連結される。いくつかの実施形態において、上記CARは、CARの細胞外ドメインに融合された膜貫通ドメインを含む。1つの実施形態において、そのCARにおけるドメインの1つと天然に会合する膜貫通ドメインが使用される。いくつかの場合において、その膜貫通ドメインは、レセプター複合体の他のメンバーとの相互作用を最小限に抑えるためにそのようなドメインが同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインに結合するのを回避するよう、選択されるかまたはアミノ酸置換によって改変される。

## 【0157】

膜貫通ドメインは、いくつかの実施形態において、天然起源または合成起源に由来する。起源が天然である場合、そのドメインは、いくつかの態様において、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する。膜貫通領域は、T細胞レセプターのアルファ鎖、ベータ鎖またはゼータ鎖、CD28、CD3ゼータ、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、ICOS/CD278、GITR/CD357、NKG2DおよびDAP分子に由来する（すなわち、それらの分子の膜貫通領域を少なくとも含む）膜貫通領域を含む。あるいは、膜貫通ドメインは、いくつかの実施形態において、合成の膜貫通ドメインである。いくつかの態様において、合成の膜貫通ドメインは、ロイシンおよびバリンなどの疎水性残基を主に含む。いくつかの態様では、フェニルアラニン、トリプトファンおよびバリンのトリプレットが、合成の膜貫通ドメインの各末端に見られることがある。

10

## 【0158】

ある特定の実施形態において、NK細胞などの免疫細胞を遺伝的に改変するための本明細書中に開示されるプラットフォーム技術としては、(i)エレクトロポレーションデバイス（例えば、ヌクレオフェクター）を用いた非ウイルス遺伝子導入、(ii)エンドドメイン（例えば、CD28/CD3-、CD137/CD3-または他の組み合わせ）を介してシグナル伝達するCAR、(iii)長さが不定の細胞外ドメインであって抗原認識ドメインを細胞表面に接続する細胞外ドメインを有するCAR、およびいくつかの場合では、(iv)CAR<sup>+</sup>免疫細胞を頑強かつ数値的に拡大することができる、K562に由来する人工抗原提示細胞（aAPC）（Singh et al., 2008; Singh et al., 2011）が挙げられる。

20

## B. T細胞レセプター（TCR）

## 【0159】

いくつかの実施形態において、遺伝的に操作された抗原レセプターには、組換えTCR、および/または天然に存在するT細胞からクローニングされたTCRが含まれる。「T細胞レセプター」または「TCR」とは、可変α鎖および可変β鎖（それぞれTCRおよびTCRとしても知られる）または可变γ鎖および可变δ鎖（それぞれTCRおよびTCRとしても知られる）を含む分子であって、MHCレセプターに結合した抗原ペプチドに特異的に結合することができる分子のことを指す。いくつかの実施形態において、TCRは、型である。

30

## 【0160】

通常、型および型として存在するTCRは、一般に構造が似ているが、それらを発現しているT細胞は、解剖学的位置または機能が異なり得る。TCRは、細胞表面上にまたは可溶型として見られ得る。一般に、TCRは、T細胞（またはTリンパ球）の表面上に見られ、通常、その表面上で、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）分子に結合した抗原の認識に関与する。いくつかの実施形態において、TCRは、定常ドメイン、膜貫通ドメイン、および/または短い細胞質テイルも含み得る（例えば、Janeway et al., 1997を参照のこと）。例えば、いくつかの態様において、TCRの各鎖は、1つのN末端免疫グロブリン可変ドメイン、1つの免疫グロブリン定常ドメイン、膜貫通領

40

50

域、および C 末端に短い細胞質テイルを有し得る。いくつかの実施形態において、T C R は、シグナル伝達の媒介に関わる C D 3 複合体のインバリアントタンパク質と会合される。別段述べられない限り、用語「T C R」は、その機能的 T C R フラグメントを包含すると理解されるべきである。この用語は、<sub>α</sub>型または<sub>β</sub>型の T C R をはじめとしたインタクトなまたは完全長の T C R も包含する。

#### 【 0 1 6 1 】

したがって、本明細書中の目的では、T C R への言及には、任意の T C R または機能的 フラグメント（例えば、M H C 分子において結合した特異的な抗原ペプチド、すなわち、M H C - ペプチド複合体に結合する T C R の抗原結合部分）が含まれる。交換可能に使用され得る、T C R の「抗原結合部分」または抗原結合フラグメントとは、T C R の構造ドメインの一部分しか含まないが、完全な T C R が結合する抗原（例えば、M H C - ペプチド複合体）に結合する分子のことを指す。いくつかの場合において、抗原結合部分は、特異的なM H C - ペプチド複合体に結合するための結合部位を形成するのに十分な T C R の可変ドメイン（例えば、T C R の可変<sub>α</sub>鎖および可変<sub>β</sub>鎖）を含み、例えば一般に、各鎖が3つの相補性決定領域を含む。

#### 【 0 1 6 2 】

いくつかの実施形態において、T C R 鎖の可変ドメインは、会合してループ、または免疫グロブリンに類似の相補性決定領域（C D R）を形成し、それにより、抗原認識がもたらされ、T C R 分子の結合部位を形成することによってペプチド特異性が決定され、ペプチド特異性が決定される。通常、免疫グロブリンと同様に、C D R は、フレームワーク領域（F R）によって隔てられる（例えば、J o r e s et a l . , 1 9 9 0 ; C h o t h i a et a l . , 1 9 8 8 ; L e f r a n c et a l . , 2 0 0 3 を参照のこと）。いくつかの実施形態において、C D R 3 は、プロセシングされた抗原の認識に関与する主要な C D R であるが、アルファ鎖の C D R 1 は、抗原ペプチドの N 末端部と相互作用するとも示されているのに対して、ベータ鎖の C D R 1 は、そのペプチドの C 末端部と相互作用する。C D R 2 は、M H C 分子を認識すると考えられている。いくつかの実施形態において、鎖の可変領域は、さらなる超可変性（H V 4）領域を含み得る。

#### 【 0 1 6 3 】

いくつかの実施形態において、T C R 鎖は、定常ドメインを含む。例えば、免疫グロブリンと同様に、T C R 鎖の細胞外の部分（例えば、<sub>α</sub>鎖、<sub>β</sub>鎖）は、2つの免疫グロブリンドドメインである、N 末端における可変ドメイン（例えば、V<sub>α</sub> または V<sub>β</sub>；通常、K a b a t ナンバリングであるK a b a t et a l . , "Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. of Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5<sup>th</sup> ed. に基づくアミノ酸1~116）、および細胞膜に隣接した1つの定常ドメイン（例えば、<sub>α</sub>鎖定常ドメインまたはC<sub>α</sub>、通常、K a b a t に基づくアミノ酸117~259、鎖定常ドメインまたはC<sub>β</sub>、通常、K a b a t に基づくアミノ酸117~295）を含み得る。例えば、いくつかの場合、それらの2本の鎖によって形成されるT C R の細胞外の部分は、2つの膜近位定常ドメイン、およびC D R を含む2つの膜遠位可変ドメインを含む。T C R ドメインの定常ドメインは、システイン残基がジスルフィド結合を形成する短い接続配列を含み、それにより、それらの2本の鎖の間に連結が形成される。いくつかの実施形態では、T C R が、定常ドメインに2つのジスルフィド結合を含むように、そのT C R は、鎖および鎖の各々に追加のシステイン残基を有してもよい。

#### 【 0 1 6 4 】

いくつかの実施形態において、T C R 鎖は、膜貫通ドメインを含み得る。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメインは、正に帶電している。いくつかの場合において、T C R 鎖は、細胞質テイルを含む。いくつかの場合において、その構造のおかげで、T C R は C D 3 のような他の分子と会合することができる。例えば、膜貫通領域とともに定常ドメインを含むT C R は、そのタンパク質を細胞膜に固定し得、C D 3 シグナル伝達装置また

10

20

30

40

50

は複合体のインバリアントサブユニットと会合し得る。

【0165】

一般に、CD3は、哺乳動物においては3つの異なる鎖（、および）および鎖を有し得る多タンパク質複合体である。例えば、哺乳動物では、この複合体は、CD3鎖、CD3鎖、2つのCD3鎖、およびホモ二量体のCD3鎖を含み得る。CD3鎖、CD3鎖およびCD3鎖は、単一の免疫グロブリンドメインを含む免疫グロブリンスーパーファミリーの高度に関連した細胞表面タンパク質である。CD3鎖、CD3鎖およびCD3鎖の膜貫通領域は、負に帯電しており、これは、これらの鎖が、正に帯電したT細胞レセプター鎖と会合できるようにする特性である。CD3鎖、CD3鎖およびCD3鎖の各細胞内テイルは、免疫受容活性化チロシンモチーフまたはITAMとして知られる保存された単一のモチーフを含むのに対して、各CD3鎖は、3つ含む。一般に、ITAMは、TCR複合体のシグナル伝達能に関わる。これらのアクセサリー分子は、負に帯電した膜貫通領域を有し、TCRから細胞へのシグナルの伝播において役割を果たす。CD3鎖および鎖は、TCRと一体となって、T細胞レセプター複合体として知られる複合体を形成する。

【0166】

いくつかの実施形態において、TCRは、2本の鎖および（または必要に応じておよび）のヘテロ二量体であり得るか、または一本鎖TCR構築物であり得る。いくつかの実施形態において、TCRは、ジスルフィド結合などによって連結された2本の別個の鎖（鎖と鎖または鎖と鎖）を含むヘテロ二量体である。いくつかの実施形態において、標的抗原（例えば、癌抗原）に対するTCRが特定され、細胞に導入される。いくつかの実施形態において、TCRをコードする核酸は、公的に入手可能なTCR DN A配列のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅などによって、種々の起源から得ることができる。いくつかの実施形態において、TCRは、生物学的起源、例えば、細胞、例えば、T細胞（例えば、細胞傷害性T細胞）、T細胞ハイブリドーマまたは他の公的に入手可能な起源から得られる。いくつかの実施形態において、T細胞は、インビオで単離された細胞から得ることができる。いくつかの実施形態において、高親和性T細胞クローニング、患者から単離され得、TCRが単離され得る。いくつかの実施形態において、T細胞は、培養されたT細胞ハイブリドーマまたはクローニングであり得る。いくつかの実施形態において、標的抗原に対するTCRクローニングは、ヒト免疫系遺伝子（例えば、ヒト白血球抗原系またはHLA）で操作されたトランスジェニックマウスにおいて産生されたクローニングである。例えば、腫瘍抗原（例えば、Parkhurst et al., 2009およびChen et al., 2005）を参照のこと。いくつかの実施形態では、ファージディスプレイを用いて、標的抗原に対するTCRが単離される（例えば、Varela-Rohen et al., 2008およびLi, 2005を参照のこと）。いくつかの実施形態において、TCRまたはその抗原結合部分は、TCRの配列の知識によって合成的に作製され得る。

C. 抗原提示細胞

【0167】

マクロファージ、Bリンパ球および樹状細胞を含む抗原提示細胞は、特定のMHC分子の発現によって識別される。APCは、抗原を内部移行し、その抗原の一部をMHC分子とともにその細胞膜の外膜上に再発現する。MHCは、複数の遺伝子座を含む大きな遺伝子複合体である。MHC遺伝子座は、クラスIおよびクラスII MHCと称されるMHC膜分子の主要な2クラスをコードする。Tヘルパーリンパ球は、一般に、MHCクラスII分子と会合した抗原を認識し、T細胞傷害性リンパ球は、MHCクラスI分子と会合した抗原を認識する。MHCは、ヒトではHLA複合体と称され、マウスではH-2複合体と称される。

【0168】

いくつかの場合において、上記実施形態の治療的組成物および細胞療法用の生成物を調製する際には、aAPCが有用である。抗原提示システムの調製および使用に関する一般

10

20

30

40

50

的ガイダンスについては、例えば、米国特許第6,225,042号、同第6,355,479号、同第6,362,001号および同第6,790,662号；米国特許出願公開第2009/0017000号および同第2009/0004142号；ならびに国際公開番号WO2007/103009を参照のこと。

#### 【0169】

a A P Cシステムは、少なくとも1つの外来性の補助分子を含み得る。任意の好適な数および組み合わせの補助分子が使用され得る。補助分子は、共刺激分子および接着分子などの補助分子から選択され得る。例示的な共刺激分子としては、CD86、CD64(FcR $\gamma$  I)、41BBリガンドおよびIL-21が挙げられる。接着分子としては、例えば細胞間の接触または細胞とマトリックスとの接触を促進する、セレクチンなどの糖結合糖タンパク質、インテグリンなどの膜貫通結合糖タンパク質、カドヘリンなどのカルシウム依存性タンパク質、および細胞間接着分子(ICAM)などの1回膜貫通型免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリータンパク質が挙げられ得る。例示的な接着分子としては、LFA-3、およびICAM-1などのICAMが挙げられる。共刺激分子および接着分子をはじめとした例示的な補助分子の選択、クローニング、調製および発現に有用な手法、方法および試薬は、例えば、米国特許第6,225,042号、同第6,355,479号および同第6,362,001号に例証されている。

#### D. 抗原

#### 【0170】

遺伝的に操作された抗原レセプターによって標的化される抗原には、養子細胞療法を介して標的化される疾患、状態または細胞型の状況において発現される抗原が含まれる。それらの疾患および状態には、血液癌、免疫系の癌（例えば、リンパ腫、白血病および/またはミエローマ、例えば、B、Tおよび骨髄性白血病、リンパ腫ならびに多発性骨髄腫）をはじめとした癌および腫瘍を含む、増殖性、腫瘍性および悪性の疾患および障害が含まれる。いくつかの実施形態において、抗原は、正常細胞もしくは正常組織または非標的化細胞もしくは非標的化組織と比べて、その疾患または状態の細胞上、例えば、腫瘍細胞上または病原性細胞上に、選択的に発現されるかまたは過剰発現される。他の実施形態において、抗原は、正常細胞上に発現され、かつ/または操作された細胞上に発現される。

#### 【0171】

任意の好適な抗原が、本方法において標的化され得る。その抗原は、ある特定の癌細胞に関連することもあるが、いくつかの場合では、非癌性細胞と関連しないこともある。例示的な抗原としては、感染性物質、自己(auto)抗原/自己(self)抗原、腫瘍関連抗原/癌関連抗原、および腫瘍新抗原に由来する抗原性分子(Linnemann et al., 2015)が挙げられるが、これらに限定されない。特定の態様において、それらの抗原には、NY-ESO、EGFR $\gamma$  III、Muc-1、Her2、CA-125、WT-1、Mage-A3、Mage-A4、Mage-A10、TRAIL/DR4およびCEAが含まれる。特定の態様において、2つ以上の抗原レセプターに対する抗原としては、CD19、EBNA、WT1、CD123、NY-ESO、EGFR $\gamma$  III、MUC1、HER2、CA-125、WT1、Mage-A3、Mage-A4、Mage-A10、TRAIL/DR4および/またはCEAが挙げられるが、これらに限定されない。これらの抗原に対する配列は、当該分野で公知であり、例えば、GenBank(登録商標)データベースにおける以下のものである：CD19(アクセシション番号NG\_007275.1)、EBNA(アクセシション番号NG\_002392.2)、WT1(アクセシション番号NG\_009272.1)、CD123(アクセシション番号NC\_000023.11)、NY-ESO(アクセシション番号NC\_000023.11)、EGFR $\gamma$  III(アクセシション番号NG\_007726.3)、MUC1(アクセシション番号NG\_029383.1)、HER2(アクセシション番号NG\_007503.1)、CA-125(アクセシション番号NG\_055257.1)、WT1(アクセシション番号NG\_009272.1)、Mage-A3(アクセシション番号NG\_013244.1)、Mage-A4(アクセシション番号NG\_01

10

20

30

40

50

3245.1)、Mage-A10(アクセッショ番号NC\_000023.11)、TRAIL/DR4(アクセッショ番号NC\_000003.12)、および/またはCEA(アクセッショ番号NC\_000019.10)。

【0172】

腫瘍関連抗原は、例として、前立腺癌、乳癌、直腸結腸癌、肺癌、膵臓癌、腎癌、中皮腫、卵巣癌、肝臓癌、脳癌、骨癌、胃癌、脾臓癌、精巣癌、子宮頸癌、肛門癌、胆嚢癌、甲状腺癌または黒色腫に由来し得る。例示的な腫瘍関連抗原または腫瘍細胞由来抗原としては、MAGE1、3およびMAGE4(または他のMAGE抗原、例えば、国際特許公開番号WO99/40188に開示されているもの)；PRAME；BAGE；RAGE；Lage(NY\_ESO1としても知られる)；SAGE；およびHAGEまたはGAGEが挙げられる。腫瘍抗原のこれらの非限定的な例は、黒色腫、肺癌、肉腫および膀胱癌などの広範囲の腫瘍タイプにおいて発現される。例えば、米国特許第6,544,518号を参照のこと。前立腺癌の腫瘍関連抗原としては、例えば、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、前立腺特異的抗原(PSA)、前立腺酸性リン酸塩、NKX3.1および前立腺の6回膜貫通上皮抗原(STEAP)が挙げられる。

【0173】

他の腫瘍関連抗原としては、P1u-1、HASH-1、Hash-2、CryptoおよびCryptinが挙げられる。さらに、腫瘍抗原は、多くの癌の処置において有用な自己ペプチドホルモン、例えば、完全長の性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)、短い10アミノ酸長のペプチドであり得る。

【0174】

腫瘍抗原には、HER-2/neuの発現などの腫瘍関連抗原の発現を特徴とする癌に由来する腫瘍抗原が含まれる。目的の腫瘍関連抗原には、系列特異的腫瘍抗原、例えば、メラノサイト-黒色腫系列抗原MART-1/Melan-A、gp100、gp75、mda-7、チロシナーゼおよびチロシナーゼ関連タンパク質が含まれる。例証的な腫瘍関連抗原としては、p53、Ras、c-Myc、細胞質セリン/トレオニンキナーゼ(例えば、A-Raf、B-RafおよびC-Raf、サイクリン依存性キナーゼ)、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A10、MAGE-A12、MART-1、BAGE、DAM-6、-10、GAGE-1、-2、-8、GAGE-3、-4、-5、-6、-7B、NA88-A、MART-1、MC1R、Gp100、PSA、PSM、チロシナーゼ、TRP-1、TRP-2、ART-4、CAMEL、CEA、Cyp-B、hTERT、hTRT、iCE、MUC1、MUC2、ホスホイノシチド3-キナーゼ(PI3K)、TRKレセプター、PRAME、P15、RU1、RU2、SART-1、SART-3、ウィルムス腫瘍抗原(WT1)、AFP、-カテニン/m、カスパーゼ-8/m、CEA、CDK-4/m、ELF2M、GnT-V、G250、HSP70-2M、HST-2、KIAA0205、MUM-1、MUM-2、MUM-3、ミオシン/m、RAGE、SART-2、TRP-2/INT2、707-AP、アネキシンII、CDC27/m、TP1/mbc-r-abl、BCR-ABL、インターフェロン制御因子4(IRF4)、ETV6/AML、LDLR/FUT、Pml/RAR、腫瘍関連カルシウムシグナル伝達物質1(TACSTD1)TACSTD2、レセプターチロシンキナーゼ(例えば、上皮成長因子レセプター(EGFR)(特に、EGFRvIII)、血小板由来成長因子レセプター(PDGFR)、血管内皮成長因子レセプター(VEGFR))、細胞質チロシンキナーゼ(例えば、srcファミリー、syk-ZAP70ファミリー)、インテグリン結合キナーゼ(ILK)、シグナル伝達性転写因子STAT3、STATSおよびSTATE、低酸素誘導因子(例えば、HIF-1およびHIF-2)、核因子-カッパーB(NF-B)、Notchレセプター(例えば、Notch1~4)、c-Met、ラバマイシンの哺乳動物標的(mTOR)、WNT、細胞外シグナル制御キナーゼ(ERK)およびそれらの調節サブユニット、PMMA、PR-3、MDM2、メソテリン、腎細胞癌-5T4、SM22-アルファ、炭酸脱水酵素I(CAI)およびIX(CAIX)(G250)とし

10

20

30

40

50

ても知られる)、STEAD、TEL / AML1、GD2、プロティナーゼ3、hTERT、肉腫転座切断点(sarcoma translocation break points)、EphA2、ML-IAP、EpCAM、ERG (TMPRSS2 ETS融合遺伝子)、NA17、PAX3、ALK、アンドロゲンレセプター、サイクリンB1、ポリシアル酸、MYCN、RhoC、GD3、フコシルGM1、メソテリアン(mesotheliian)、PSCA、sLe、PLAC1、GM3、BORIS、Tn、GlobOH、NY-BR-1、RGSS、SART3、STn、PAX5、OY-TES1、精子タンパク質17、LCK、HMWMAA、AKAP-4、SSX2、XAGE1、B7H3、レグマイン(legumain)、TIE2、Page4、MAD-CT-1、FAP、MAD-CT-2、foss関連抗原1、CBX2、CLDN6、SPANX、TPTE、ACTL8、ANKRD30A、CDKN2A、MAD2L1、CTAG1B、SUNC1、LRRN1ならびにイディオタイプのうちのいずれか1つ以上に由来するかまたはいずれか1つ以上を含む腫瘍抗原が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0175】

抗原は、腫瘍細胞において変異した遺伝子由来の、または正常細胞と比べて腫瘍細胞において異なるレベルで転写される遺伝子由来の、エピトープ領域またはエピトープペプチド(例えば、テロメラーゼ酵素、サバイシン、メソテリン、変異型ras、bcr/ab1再配列、Her2/neu、変異型または野生型p53、シトクロムP450 1B1、およびN-アセチルグルコサミン転移酵素-Vなどの異常に発現されるイントロン配列)；ミエローマおよびB細胞リンパ腫においてユニークなイディオタイプを生成する免疫グロブリン遺伝子のクローニング再配列；オンコウイルスのプロセスに由来するエピトープ領域またはエピトープペプチドを含む腫瘍抗原(例えば、ヒトパピローマウイルスタンパク質E6およびE7)；エプスタイン・バーウイルスタンパク質LMP2；腫瘍選択的に発現する変異していない腫瘍胎児性タンパク質(例えば、癌胎児抗原およびアルファ-フェトプロテイン)を含み得る。

#### 【0176】

他の実施形態において、抗原は、病原性微生物または日和見病原性微生物(本明細書中で感染症微生物とも呼ばれる)(例えば、ウイルス、真菌、寄生生物および細菌)から得られるかまたはそれらに由来する。ある特定の実施形態において、そのような微生物に由来する抗原には、完全長タンパク質が含まれる。

#### 【0177】

本明細書中に記載される方法において使用が企図される抗原を有する例証的な病原性生物としては、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、単純ヘルペスウイルス(HSV)、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、サイトメガロウイルス(CMV)、エプスタイン・バーウイルス(EBV)、インフルエンザA、BおよびC、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、ポリオーマウイルス(例えば、BKウイルスおよびJCウイルス)、アデノウイルス、メチシリン耐性Staphylococcus aureus(MRSA)を含むブドウ球菌属の種、ならびにStreptococcus pneumoniaiaeを含む連鎖球菌属の種が挙げられる。当業者が理解するように、本明細書中に記載されるような抗原として使用するためのこれらおよび他の病原性微生物に由来するタンパク質、ならびにこれらのタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、刊行物ならびにGENBANK(登録商標)、SWISS-PROT(登録商標)およびTERMBL(登録商標)などの公的データベースにおいて特定され得る。

#### 【0178】

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に由来する抗原には、HIVビリオン構造タンパク質(例えば、gp120、gp41、p17、p24)、プロテアーゼ、逆転写酵素、またはtat、rev、nef、vif、vprおよびvpuによってコードされるHIVタンパク質のうちのいずれかが含まれる。

#### 【0179】

単純ヘルペスウイルス(例えば、HSV1およびHSV2)に由来する抗原としては、

10

20

30

40

50

H S V 後期遺伝子から発現されるタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。後期群の遺伝子は、ビリオン粒子を形成するタンパク質を主にコードする。そのようなタンパク質としては、ウイルスキャプシドを形成する(UL)の5つのタンパク質:UL6、UL18、UL35、UL38ならびに主要キャプシドタンパク質UL19、UL45およびUL27(これらの各々が、本明細書中に記載されるような抗原として使用され得る)が挙げられる。本明細書中で抗原としての使用が企図される他の例証的なHSVタンパク質としては、ICP27(H1、H2)、糖タンパク質B(gB)および糖タンパク質D(gD)タンパク質が挙げられる。HSVゲノムは、少なくとも74個の遺伝子を含み、その各々が、抗原として使用され得る可能性があるタンパク質をコードする。

## 【0180】

サイトメガロウイルス(CMV)に由来する抗原としては、CMV構造タンパク質、ウイルス複製の前初期および初期に発現されるウイルス抗原、糖タンパク質IおよびII、キャプシドタンパク質、コートタンパク質、低分子マトリックスタンパク質(lower matrix protein)pp65(ppUL83)、p52(ppUL44)、IE1およびIE2(UL123およびUL122)、UL128~UL150の遺伝子クラスターのタンパク質産物(Rykmann, et al., 2006)、エンベロープ糖タンパク質B(gB)、gH、gN、ならびにpp150が挙げられる。当業者が理解するように、本明細書中に記載される抗原として使用するためのCMVタンパク質は、GENBANK(登録商標)、SWISS-PROT(登録商標)およびTREMBL(登録商標)などの公的データベースにおいて特定され得る(例えば、Bennekov et al., 2004; Loewendorf et al., 2010; Marschall et al., 2009を参照のこと)。

10

## 【0181】

ある特定の実施形態において使用が企図されるエプスタイン・バンウイルス(EBV)に由来する抗原としては、EBV溶解性タンパク質gp350およびgp110、エプスタイン・バン核抗原(EBNA)-1、EBNA-2、EBNA-3A、EBNA-3B、EBNA-3C、EBNA-リーダータンパク質(EBNA-LP)、ならびに潜伏感染膜タンパク質(LMP)-1、LMP-2AおよびLMP-2Bを含む、潜伏感染サイクル中に生成されるEBVタンパク質が挙げられる(例えば、Lockey et al., 2008を参照のこと)。

20

## 【0182】

本明細書中で使用が企図される呼吸器合胞体ウイルス(RSV)に由来する抗原には、RSVゲノムによってコードされる11個のタンパク質またはそれらの抗原性フラグメント: NS1、NS2、N(ヌクレオキャプシドタンパク質)、M(マトリックスタンパク質)SH、GおよびF(ウイルスコートタンパク質)、M2(第2のマトリックスタンパク質)、M2-1(伸長因子)、M2-2(転写制御)、RNAポリメラーゼ、ならびにリンタンパク質Pのうちのいずれかが含まれる。

30

## 【0183】

使用が企図される水疱性口内炎ウイルス(VSV)に由来する抗原には、VSVゲノムによってコードされる主要な5つのタンパク質およびそれらの抗原性フラグメント:巨大タンパク質(L)、糖タンパク質(G)、核タンパク質(N)、リンタンパク質(P)およびマトリックスタンパク質(M)のうちのいずれか1つが含まれる(例えば、Riedler et al., 1999を参照のこと)。

40

## 【0184】

ある特定の実施形態において使用が企図されるインフルエンザウイルスに由来する抗原としては、赤血球凝集素(HA)、ノイラミニダーゼ(NA)、核タンパク質(NP)、マトリックスタンパク質M1およびM2、NS1、NS2(NEP)、PA、PB1、PB1-F2、ならびにPB2が挙げられる。

## 【0185】

例示的なウイルス抗原としては、アデノウイルスのポリペプチド、アルファウイルスの

50

ポリペプチド、カリシウイルスのポリペプチド（例えば、カリシウイルスのキャプシド抗原）、コロナウイルスのポリペプチド、ジステンパーウイルスのポリペプチド、エボラウイルスのポリペプチド、エンテロウイルスのポリペプチド、フラビウイルスのポリペプチド、肝炎ウイルス（A E）のポリペプチド（B型肝炎コアまたは表面抗原、C型肝炎ウイルスのE 1もしくはE 2糖タンパク質、コアまたは非構造タンパク質）、ヘルペスウイルスのポリペプチド（単純ヘルペスウイルスまたは水痘帯状疱疹ウイルスの糖タンパク質を含む）、感染性腹膜炎ウイルスのポリペプチド、白血病ウイルスのポリペプチド、マールブルグウイルスのポリペプチド、オルトミクソウイルスのポリペプチド、パピローマウイルスのポリペプチド、パラインフルエンザウイルスのポリペプチド（例えば、赤血球凝集素ポリペプチドおよびノイラミニダーゼポリペプチド）、パラミクソウイルスのポリペプチド、パルボウイルスのポリペプチド、ペストウイルスのポリペプチド、ピコルナウイルスのポリペプチド（例えば、ポリオウイルスのキャプシドポリペプチド）、ポックスウイルスのポリペプチド（例えば、ワクシニアウイルスのポリペプチド）、狂犬病ウイルスのポリペプチド（例えば、狂犬病ウイルスの糖タンパク質G）、レオウイルスのポリペプチド、レトロウイルスのポリペプチド、およびロタウイルスのポリペプチドも挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0186】

ある特定の実施形態において、抗原は、細菌抗原であり得る。ある特定の実施形態において、目的の細菌抗原は、分泌型ポリペプチドであり得る。他のある特定の実施形態において、細菌抗原には、細菌の細胞外面上に露出したポリペプチドの一部分を有する抗原が含まれる。

#### 【0187】

使用が企図される、メチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* (M RSA) を含むブドウ球菌属の種に由来する抗原としては、ビルレンス制御因子、例えば、A grシステム、Sar および Sae、Ar 1システム、Sar ホモログ (Rot、M gr A、Sar S、Sar R、Sar T、Sar U、Sar V、Sar X、Sar Z および Tca R)、Srr システムならびに TRAP が挙げられる。抗原として役立ち得る他のブドウ球菌属のタンパク質としては、C1p タンパク質、HtrA、Msrr、アコニターゼ、CcpA、SvrA、MsA、CfvA および CfvB が挙げられる（例えば、*Staphylococcus* : Molecular Genetics, 2008 Caster Academic Press, Ed. Jodi Lindsay を参照のこと）。*Staphylococcus aureus* の2種 (N315 および Mu50) のゲノムが、配列決定済みであり、例えば、PATRIC (PATRIC : The VBI PathoSystems Resource Integration Center, Snyder et al., 2007) において公的に入手可能である。当業者が理解するように、抗原として使用するためのブドウ球菌属のタンパク質は、GenBank (登録商標)、Swiss-Prot (登録商標) および TREMBL (登録商標) などの他の公的データベースにおいても特定され得る。

#### 【0188】

本明細書中に記載されるある特定の実施形態において使用が企図される *Streptococcus pneumoniae* に由来する抗原としては、ニューモリシン、PspA、コリン結合タンパク質A (CbpA)、NanA、NanB、SpnHL、PavA、LytA、Pht および ピリンタンパク質 (RrgA; RrgB; RrgC) が挙げられる。*Streptococcus pneumoniae* の抗原性タンパク質も、当該分野で公知であり、いくつかの実施形態において抗原として使用され得る（例えば、Zysk et al., 2000 を参照のこと）。*Streptococcus pneumoniae* の毒性株の全ゲノム配列は、配列決定済みであり、当業者が理解するように、本明細書で使用するための *S. pneumoniae* タンパク質は、GENBANK (登録商標)、SWISS-PROT (登録商標) および TREMBL (登録商標) などの他の公的データベースにおいても特定され得る。本開示に係る抗原として特に興味深いタ

ンパク質としては、肺炎球菌の表面に露出すると予測される病原性因子およびタンパク質が挙げられる（例えば、Frolet et al., 2010を参照のこと）。

【0189】

抗原として使用され得る細菌抗原の例としては、アクチノマイセス属のポリペプチド、バチルス属のポリペプチド、バクテロイデス属のポリペプチド、ボルデテラ属のポリペプチド、バルトネラ属のポリペプチド、ボレリア属のポリペプチド（例えば、*B. burgdorferi OspA*）、ブルセラ属のポリペプチド、カンピロバクター属のポリペプチド、キャブノサイトファーガ属のポリペプチド、クラミジア属のポリペプチド、コリネバクテリウム属のポリペプチド、コクシエラ属のポリペプチド、デルマトフィルス属のポリペプチド、エンテロコッカス属のポリペプチド、エーリキア属のポリペプチド、エシエリキア属のポリペプチド、フランシセラ属のポリペプチド、フソバクテリウム属のポリペプチド、ヘモバルトネラ属のポリペプチド、ヘモフィルス属のポリペプチド（例えば、*H. influenzae b*型外膜タンパク質）、ヘリコバクター属のポリペプチド、クレブシエラ属のポリペプチド、L型細菌のポリペプチド、レプトスピラ属のポリペプチド、リステリア属のポリペプチド、マイコバクテリウム属のポリペプチド、マイコプラズマ属のポリペプチド、ナイセリア属のポリペプチド、ネオリケッチャ属のポリペプチド、ノカルジア属のポリペプチド、パストレラ属のポリペプチド、ペプトコッカス属のポリペプチド、ペプトストレプトコッカス属のポリペプチド、肺炎球菌のポリペプチド（すなわち、*S. pneumoniae*のポリペプチド）（本明細書中の説明を参照のこと）、プロテウス属のポリペプチド、シュードモナス属のポリペプチド、リケッチャ属のポリペプチド、ロシャリメア属のポリペプチド、サルモネラ属のポリペプチド、シゲラ属のポリペプチド、ブドウ球菌属のポリペプチド、A群連鎖球菌のポリペプチド（例えば、*S. pyogenes*のMタンパク質）、B群連鎖球菌（*S. agalactiae*）のポリペプチド、トレポネーマ属のポリペプチド、およびエルシニア属のポリペプチド（例えば、*Y. pestis*のF1およびV抗原）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0190】

真菌抗原の例としては、アブシディア属のポリペプチド、アクレモニウム属のポリペプチド、アルテルナリア属のポリペプチド、アスペルギルス属のポリペプチド、バシジオボラス属のポリペプチド、ビポラーリス属のポリペプチド、ブラストミセス属のポリペプチド、カンジダ属のポリペプチド、コクシジオイデス属のポリペプチド、コニディオボラス属のポリペプチド、クリプトコッカス属のポリペプチド、カーバラリア属のポリペプチド、エピデルモフィトン属のポリペプチド、エクソフィアラ属のポリペプチド、ゲオトリクム属のポリペプチド、ヒストプラズマ属のポリペプチド、マツレラ属のポリペプチド、マラセチア属のポリペプチド、ミクロスボルム属のポリペプチド、モニリエラ属のポリペプチド、モルチエレラ属のポリペプチド、ケカビ属のポリペプチド、ペシロマイセス属のポリペプチド、ペニシリウム属のポリペプチド、フィアレモニウム属（*Phialemonium*）のポリペプチド、フィアロフォラ属のポリペプチド、プロトテカ属のポリペプチド、シュードアレシェリア属のポリペプチド、シュードミクロドキウム属（*Pseudomicrodochium*）のポリペプチド、フィチウム属のポリペプチド、リノスボリジウム属のポリペプチド、クモノスカビ属のポリペプチド、スコレコバシジウム属（*Scolécobasidium*）のポリペプチド、スプロトリクス属のポリペプチド、ステンフィリウム属（*Stemphylium*）のポリペプチド、白癬菌属のポリペプチド、トリコスボロン属のポリペプチドおよびキシロヒファ属（*Xylohypha*）のポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0191】

原生動物の寄生生物抗原の例としては、バベシア属のポリペプチド、バランチジウム属のポリペプチド、ベスノイチア属（*Besnoitia*）のポリペプチド、クリプトスピリジウム属のポリペプチド、エイメリア属のポリペプチド、エンセファリトゾーン属のポリペプチド、エントアーベ属のポリペプチド、ジアルジア属のポリペプチド、ハモンディア属（*Hammondia*）のポリペプチド、ヘパトゾーン属のポリペプチド、イソス

10

20

30

40

50

ポラ属のポリペプチド、リーシュマニア属のポリペプチド、微胞子虫門のポリペプチド、ネオスポラ属のポリペプチド、ノゼマ属のポリペプチド、ペントトリコモナス属のポリペプチド、プラスモディウム属のポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。蠕虫寄生生物抗原の例としては、アカントケイロネマ属のポリペプチド、アエルロストロンギルウス属 (*A elurostrongylus*) のポリペプチド、鉤虫属のポリペプチド、住血線虫属のポリペプチド、回虫属のポリペプチド、ブルギア属のポリペプチド、ブノストムム属のポリペプチド、キャピラリア属のポリペプチド、カベルチア属 (*Chabertia*) のポリペプチド、クーベリア属のポリペプチド、クレノソマ属 (*Cremonosoma*) のポリペプチド、ディクチオカウルス属のポリペプチド、ジオクトフィーメ属のポリペプチド、ディペタロネマ属のポリペプチド、裂頭条虫属のポリペプチド、ジプリジウム属のポリペプチド、イヌ糸状虫属のポリペプチド、ドラクンクルス属のポリペプチド、エンテロビウス属のポリペプチド、フィラロイデス属 (*Filaroides*) のポリペプチド、ヘモンクス属のポリペプチド、ラゴキラスカリス属 (*Lagochilus caris*) のポリペプチド、ロア糸状虫属 (*Loa*) のポリペプチド、マンソネラ属のポリペプチド、ムエリエリウス属 (*Muelerius*) のポリペプチド、ナノフィエツス属 (*Nanophyetus*) のポリペプチド、アメリカ鉤虫属のポリペプチド、ネマトジルス属のポリペプチド、腸結節虫属のポリペプチド、オンコセルカ属のポリペプチド、オピストルキス属のポリペプチド、オステルタギア属のポリペプチド、パラフィラリア属 (*Parafilaria*) のポリペプチド、肺吸虫属のポリペプチド、パラスカリス属 (*Parascaris*) のポリペプチド、フィサロプテラ属のポリペプチド、プロトストロンギルス属 (*Protostongylus*) のポリペプチド、セタリア属のポリペプチド、スピロセルカ属 (*Spirocercus*) のポリペプチド、スピロメトラ属のポリペプチド、ステファノフィラリア属のポリペプチド、ストロンギロイデス属のポリペプチド、ストロンギルス属のポリペプチド、テラジア属のポリペプチド、トキサスカリス属のポリペプチド、トキソカラ属のポリペプチド、旋毛虫属のポリペプチド、毛様線虫属のポリペプチド、鞭虫属のポリペプチド、ウンシナリア属のポリペプチドおよびウケレリア属のポリペプチド（例えば、*P. falci parum* のスポロゾイト周囲ポリペプチド (*PfCSP*)）、スポロゾイト表面タンパク質2 (*PfSSP2*)、肝臓状態抗原 (*liver state antigen*) 1 のカルボキシル末端 (*PfLSA1* c 末端)、ならびに搬出タンパク質1 (*PfExp-1*)、ニューモシスチス属のポリペプチド、サルコシスティス属のポリペプチド、住血吸虫属のポリペプチド、タイレリア属のポリペプチド、トキソプラズマ属のポリペプチド、ならびにトリパノソーマ属のポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0192】

外寄生生物抗原の例としては、ノミ；カタダニおよびヒメダニを含むマダニ；ハエ、例えば、小虫、蚊、スナバエ、ブユ、ウマバエ、ノサシバエ、メクラアブ、ツェツエバエ、サシバエ、ハエ幼虫症の原因となるハエおよび刺して血を吸う小さな羽虫 (*biting gnats*)；アリ；クモ、シラミ；ダニ；ならびに半翅類の昆虫、例えば、トコジラミおよびサシガメのポリペプチド（抗原ならびにアレルゲンを含む）が挙げられるが、これらに限定されない。

#### E. 自殺遺伝子

#### 【0193】

いくつかの場合において、本開示の任意の細胞が、異種サイトカイン、操作されたレセプターなど以外の1つ以上の作用物質を産生するように変更される。具体的な実施形態において、NK細胞などの細胞は、1つ以上の自殺遺伝子を有するように操作され、本明細書中で使用される用語「自殺遺伝子」は、プロドラッグが投与された際に、遺伝子産物が、宿主細胞を殺滅する化合物に変更する遺伝子と定義される。いくつかの場合において、NK細胞療法は、NK細胞療法を受けている個体および/またはNK細胞療法を受けた個体が、1つ以上の有害事象の1つ以上の症状（例えば、サイトカイン放出症候群、神経毒性、アナフィラキシー/アレルギーおよび/またはオンターゲット/オフ腫瘍毒性（例と

10

20

30

40

50

して))を示したとき、または1つ以上の症状を有するリスクがあると考えられるとき(切迫した場合を含む)、任意の種類の1つ以上の自殺遺伝子の利用の対象となり得る。自殺遺伝子の使用は、治療のために計画されたプロトコルの一部であり得るか、またはそれを使用する必要性が認められたときにだけ使用され得る。いくつかの場合において、細胞療法は、もはや必要なくなったという理由で、自殺遺伝子またはその遺伝子産物を標的化する作用物質を使用することによって終結される。

#### 【0194】

自殺遺伝子の例としては、操作された非分泌性(膜結合型を含む)の腫瘍壞死因子(TNF) - アルファ変異ポリペプチド(その全体が参照により本明細書中に援用されるPCT/US19/62009を参照のこと)が挙げられ、それらのポリペプチドは、TNF - アルファ変異体に結合する抗体の送達によって標的化され得る。使用され得る自殺遺伝子/プロドラッグの組み合わせの例は、単純ヘルペスウイルス - チミジンキナーゼ(HS V - tk)と、ガンシクロビル、アシクロビルまたはFIAU;オキシドレダクターゼとシクロヘキシミド;シトシンデアミナーゼと5 - フルオロシトシン;チミジンキナーゼチミジル酸キナーゼ(Tdk : Tmk)とAZT;およびデオキシシチジンキナーゼとシトシンアラビノシドである。プロドラッグである6 - メチルプリンデオキシリボシドを毒性のプリンである6 - メチルプリンに変換するいわゆる自殺遺伝子であるE.coliのプリンヌクレオシドホスホリラーゼが使用され得る。他の自殺遺伝子としては、CD20、CD52、誘導性カスパー9、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ(PNP)、シトクロムp450酵素(CYP)、カルボキシペプチダーゼ(CP)、カルボキシルエステラーゼ(CE)、ニトロ還元酵素(NTR)、グアニンリボシリルトランスフェラーゼ(XGRTP)、グリコシダーゼ酵素、メチオニン-,-リーザ(MET)およびチミジンホスホリラーゼ(TP)が例として挙げられる。

#### F. 送達方法

#### 【0195】

当業者であれば、本開示の抗原レセプターを発現させるために標準的な組換え手法(例えば、Sambrook et al., 2001およびAusubel et al., 1996(両方が参照により本明細書中に援用される)を参照のこと)によってベクターを構築する能力を十分に備えているだろう。ベクターとしては、プラスミド、コスミド、ウイルス(バクテリオファージ、動物ウイルスおよび植物ウイルス)および人工染色体(例えば、YAC)、例えば、レトロウイルスベクター(例えば、モロニーマウス白血病ウイルスベクター(MoMLV)、MSCV、SFFV、MPSV、SNVなどに由来するもの)、レンチウイルスベクター(例えば、HIV-1、HIV-2、SIV、BIV、FIVなどに由来するもの)、アデノウイルス(Ad)ベクター(その複製可能型、複製欠損型およびガットレス型(gutless forms)を含む)、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、サルウイルス40(SV-40)ベクター、ウシパピローマウイルスベクター、エプスタイン・バーウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ハーベイマウス肉腫ウイルスベクター、マウス乳癌ウイルスベクター、ラウス肉腫ウイルスベクター、パルボウイルスベクター、ポリオウイルスベクター、水疱性口内炎ウイルスベクター、マラバウイルス(maraba virus)ベクターおよびB群アデノウイルスenadenotucirevベクターが挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0196】

具体的な実施形態において、ベクターは、PCT/US19/62014(その全体が参照により本明細書中に援用される)に記載されているようなマルチシストロニックベクターである。そのような場合、单一のベクターが、CARまたはTCR(その発現構築物は、CARまたはTCRの部分の相互交換を可能にするためにモジュール形式で構成され得る)、自殺遺伝子および1つ以上のサイトカインをコードし得る。

#### a. ウイルスベクター

#### 【0197】

10

20

30

40

50

抗原レセプターをコードするウイルスベクターが、本開示のある特定の態様において提供され得る。組換えウイルスベクターを作製する際、必須ではない遺伝子は、通常、異種（または非天然）タンパク質の遺伝子またはコード配列で置き換えられる。ウイルスベクターは、ウイルス配列を利用して、核酸および場合によってはタンパク質を細胞に導入する一種の発現構築物である。ある特定のウイルスが細胞に感染する能力またはレセプター媒介性のエンドサイトシスを介して細胞に侵入する能力、および宿主細胞のゲノムにインテグレートし、ウイルス遺伝子を安定かつ効率的に発現する能力によって、それらのウイルスが、外来核酸を細胞（例えば、哺乳動物細胞）に移行させるための魅力的な候補になった。本発明のある特定の態様の核酸を送達するために使用され得るウイルスベクターの非限定的な例を下記に記載する。

10

## 【0198】

レンチウイルスは、複雑なレトロウイルスであり、一般的なレトロウイルス遺伝子であるgag、polおよびenvに加えて、調節機能または構造機能を有する他の遺伝子も含む。レンチウイルスベクターは、当該分野で周知である（例えば、米国特許第6,013,516号および同第5,994,136号を参照のこと）。

## 【0199】

組換えレンチウイルスベクターは、非分裂細胞に感染することができ、インビボとエキソビボの両方において遺伝子導入および核酸配列発現のために使用され得る。例えば、非分裂細胞に感染することができる組換えレンチウイルス（ここで、好適な宿主細胞が、パッケージング機能を有する2つ以上のベクター、すなわちgag、polおよびenv、ならびにrevおよびtatでトランスフェクトされる）は、参照により本明細書中に援用される米国特許第5,994,136号に記載されている。

20

## b. 調節エレメント

## 【0200】

本開示において有用なベクターに含められる発現カセットは、特に、タンパク質コード配列に作動可能に連結された真核生物転写プロモーター、介在配列を含むスプライスシグナル、および転写終結/ポリアデニル化配列を（5'から3'の方向で）含む。タンパク質をコードする遺伝子の転写を真核細胞において制御するプロモーターおよびエンハンサーは、複数の遺伝的エレメントから構成される。細胞機構は、各エレメントによって運ばれる調節情報を集め、統合することができ、それにより、異なる遺伝子が、多くの場合は複雑なパターンである異なるパターンの転写制御を展開することが可能になる。本開示の状況において使用されるプロモーターとしては、構成的プロモーター、誘導性プロモーターおよび組織特異的プロモーターが挙げられる。

30

## (i) プロモーター/エンハンサー

## 【0201】

本明細書中に提供される発現構築物は、抗原レセプターの発現を駆動するプロモーターを含む。プロモーターは、一般に、RNA合成のための開始部位の位置を特定するよう機能する配列を含む。これの最もよく知られている例は、TATAボックスであるが、哺乳動物のターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ遺伝子のプロモーターおよびSV40後期遺伝子のプロモーターなど、一部のプロモーターでは、TATAボックスを欠き、開始部位自体と重なっている不連続なエレメントが、開始の場所を固定するのを助ける。さらなるプロモーターエレメントが、転写開始の頻度を制御する。通常、これらは、開始部位の30110bp上流の領域に位置するが、いくつかのプロモーターは、開始部位の下流にも機能的エレメントを含むと示されている。コード配列をプロモーター「の支配下に」するためには、転写読み枠の転写開始部位の5'末端を、選択されたプロモーターの「下流」（すなわち、3'）に置く。「上流」のプロモーターは、DNAの転写を刺激し、コードされるRNAの発現を促進する。

40

## 【0202】

プロモーターエレメント間の間隔は、変更がきくことが多く、エレメントが、反転されるかまたは互いにに対して移動された場合でも、プロモーターの機能は保存される。tkP

50

口モーターでは、プロモーターエレメント間の間隔は、活性が低下し始めるまで最大 50 bp 広げられ得る。プロモーターに応じて、個々のエレメントは、協同的にまたは独自に機能して転写を活性化し得るとみられる。プロモーターは、核酸配列の転写性の活性化に関わるシス作用性制御配列のことを指す「エンハンサー」と併せて使用されてもよいし、使用されなくてもよい。

#### 【 0 2 0 3 】

プロモーターは、コードセグメントおよび / またはエキソンの上流に位置する 5' 非コード配列を単離することによって得られることがあるような、ある核酸配列と天然に会合したプロモーターであり得る。そのようなプロモーターは、「内在性」プロモーターと呼ぶことができる。同様に、エンハンサーは、ある核酸配列の下流または上流に位置する、その配列と天然に会合したエンハンサーであり得る。あるいは、ある核酸配列とその天然の環境では天然には会合していないプロモーターのことを指す、組換えプロモーターまたは異種プロモーターの支配下にコード核酸セグメントを置くことによって、一定の利点が得られる。また、組換えエンハンサーまたは異種エンハンサーは、その天然の環境では核酸配列と天然には会合していないエンハンサーのことを指す。そのようなプロモーターまたはエンハンサーには、他の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサー、ならびに他の任意のウイルスまたは原核細胞もしくは真核細胞から単離されたプロモーターまたはエンハンサー、ならびに「天然に存在」しない、すなわち、種々の転写制御領域の種々のエレメントおよび / または発現を変化させる変異を含む、プロモーターまたはエンハンサーが含まれ得る。例えば、組換え DNA の構築において最もよく使用されるプロモーターとしては、ラクタマーゼ (ペニシリナーゼ)、ラクトースおよびトリプトファン (trp-) プロモーターシステムが挙げられる。プロモーターおよびエンハンサーの核酸配列を合成的に作製することに加えて、組換えクローニング、および / または PCR™ をはじめとした核酸増幅技術を用いて、ある配列が、本明細書中に開示される組成物に関連して作製され得る。さらに、核以外のオルガネラ (例えば、ミトコンドリア、葉緑体など) 内での配列の転写および / または発現を指示する調節配列も同様に使用できることが企図される。

#### 【 0 2 0 4 】

当然、発現のために選択されたオルガネラ、細胞型、組織、器官または生物における DNA セグメントの発現を効果的に指示するプロモーターおよび / またはエンハンサーを使用することが重要になる。分子生物学の当業者は、一般に、タンパク質発現のために、プロモーター、エンハンサーおよび細胞型の組み合わせを使用することを承知している (例えば、参考により本明細書中に援用される Sambrook et al. 1989 を参照のこと)。使用されるプロモーターは、構成的プロモーター、組織特異的プロモーター、誘導性プロモーター、および / または導入された DNA セグメントの高レベル発現を指示する、適切な条件下において有用なプロモーター (例えば、組換えタンパク質および / または組換えペプチドの大規模生成において有益なプロモーター) であり得る。そのプロモーターは、異種であっても、内在性であってもよい。

#### 【 0 2 0 5 】

さらに、任意のプロモーター / エンハンサーの組み合わせ (例えば、epd. isb-sib.ch / のワールドワイドウェブを介した Eukaryotic Promoter Data Base E P D B に従って) も、発現を駆動するために使用され得る。T3、T7 または SP6 細胞質発現系の使用が、別の実行可能な実施形態である。適切な細菌ポリメラーゼが、送達複合体の一部としてまたはさらなる遺伝的発現構築物として提供される場合、真核細胞は、ある特定の細菌プロモーターからの細胞質での転写を支持し得る。

#### 【 0 2 0 6 】

プロモーターの非限定的な例としては、初期ウイルスプロモーターまたは後期ウイルスプロモーター (例えば、SV40 初期または後期プロモーター、サイトメガロウイルス (CMV) 最初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルス (RSV) 初期プロモーター) ; 真核細胞プロモーター (例えば、ベータアクチンプロモーター、GADPH プロモーター、メタロチオネインプロモーター) ; および連鎖状応答エレメントプロモーター (例えば、サ

10

20

30

40

50

イクリックAMP応答エレメントプロモーター（c re）、血清応答エレメントプロモーター（s re）、ホルボールエスチルプロモーター（TPA）およびミニマルTATAボックス近傍の応答エレメントプロモーター（t re））が挙げられる。ヒト成長ホルモンプロモーター配列（例えば、Genbank（登録商標）に記載されているヒト成長ホルモンミニマルプロモーター、アクセッション番号X05244、ヌクレオチド283～341）またはマウス乳腺腫瘍プロモーター（ATCCから入手可能、Cat. No. ATCC45007）を使用することも可能である。ある特定の実施形態において、プロモーターは、CMV IE、デクチン-1、デクチン-2、ヒトCD11c、F4/80、SM22、RSV、SV40、Ad MLP、ベータ-アクチン、MHCクラスIまたはMHCクラスIIプロモーターであるが、しかしながら、治療用の遺伝子の発現を駆動するために有用な他の任意のプロモーターも本開示の実施に適用できる。

#### 【0207】

ある特定の態様において、本開示の方法は、エンハンサー配列、すなわち、プロモーターの活性を増加させる核酸配列であって、シスで、かつその向きを問わず、比較的長い距離（標的プロモーターから最大数キロベース離れた距離）にわたって作用する能力を有する核酸配列にも関する。しかしながら、エンハンサーは、所与のプロモーターに対して近位でも機能し得るので、エンハンサーの機能は必ずしもそのような長い距離に限定されない。

（i i）開始シグナルおよび連結発現

#### 【0208】

コード配列の効率的な翻訳のために、本開示に提供される発現構築物において、特異的な開始シグナルも使用され得る。これらのシグナルは、ATG開始コドンまたは隣接配列を含む。外来性の翻訳制御シグナル（ATG開始コドンを含む）が提供される必要がある場合がある。当業者であれば、これを判断することおよび必要なシグナルを提供することが容易にできるだろう。インサート全体の翻訳を確保するためには、開始コドンが、所望のコード配列の読み枠と「インフレーム」でなければならないことは周知である。その外来性の翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然のものまたは合成のものであり得る。適切な転写エンハンサー要素を含めることによって、発現効率が高められ得る。

#### 【0209】

ある特定の実施形態において、配列内リボソーム進入部位（IRES）エレメントの使用は、多重遺伝子のメッセージ、すなわちポリシストロニックなメッセージを生成するために使用される。IRESエレメントは、5'メチル化キャップ依存的翻訳のリボソームスキヤニングモデルを迂回し、内部の部位において翻訳を開始することができる。ピコルナウイルス科の2つのメンバー（ポリオおよび脳心筋炎）由来のIRESエレメント、ならびに哺乳動物のメッセージ由来のIRESが、報告されている。IRESエレメントは、異種のオープンリーディングフレームに連結できる。各々がIRESによって隔てられた複数のオープンリーディングフレームを一緒に転写することができ、ポリシストロニックなメッセージを生成できる。IRESエレメントのおかげで、各オープンリーディングフレームが、効率的な翻訳のためにリボソームに接近できるようになる。単一のプロモーター／エンハンサーを用いて複数の遺伝子を効率的に発現して、単一のメッセージを転写することもできる。

#### 【0210】

さらに、本開示に提供される構築物内の遺伝子の連結発現または同時発現をもたらすために、ある特定の2A配列エレメントが使用され得る。例えば、オープンリーディングフレームを連結して単一のシストロンを形成することによって遺伝子を同時発現するために、切断配列が使用され得る。例示的な切断配列は、F2A（口蹄疫ウイルス2A）または「2A様」配列（例えば、Thosea asignaウイルス2A；T2A）である。

（i i i）複製開始点

宿主細胞においてベクターを増殖させるために、そのベクターは、1つ以上の複製開始部位（「ori」と呼ばれることが多い）、例えば、複製が開始される特異的な核酸配列

10

20

30

40

50

である、上に記載されたような E B V の o r i P またはプログラミングにおける機能が似ているかもしくは高められた遺伝的に操作された o r i P に対応する核酸配列を含み得る。あるいは、上に記載されたような染色体外で複製する他のウイルスの複製起点、または自律複製配列 ( A R S ) を使用することができる。

c . 選択マーカーおよびスクリーニング可能なマーカー

【 0 2 1 1 】

いくつかの実施形態において、本開示の構築物を含む細胞は、マーカーを発現ベクターに含めることによって、インビトロまたはインビボにおいて特定され得る。そのようなマーカーは、発現ベクターを含む細胞を容易に特定できるようにする特定可能な変化を細胞にもたらす。一般に、選択マーカーは、選択を可能にする特性を付与するマーカーである。ポジティブ選択マーカーは、そのマーカーが存在することによってその選択が可能になるマーカーであり、ネガティブ選択マーカーは、その存在が選択を妨げるマーカーである。ポジティブ選択マーカーの例は、薬物耐性マーカーである。

10

【 0 2 1 2 】

通常、薬物選択マーカーを含めることにより、形質転換体のクローニングおよび特定が助けられ、例えば、ネオマイシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、D H F R 、 G P T 、ゼオシンおよびヒスチジノールに対して耐性にする遺伝子が、有用な選択マーカーである。条件の実行に基づいて形質転換体の判別を可能にする表現型を付与するマーカーに加えて、比色解析を基礎とする、 G F P などのスクリーニング可能なマーカーをはじめとした他のタイプのマーカーも企図される。あるいは、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ ( t k ) またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ ( C A T ) などの、ネガティブ選択マーカーとしてスクリーニング可能な酵素が利用され得る。当業者であれば、免疫学的マーカーをおそらくは F A C S 解析と併せて使用する方法も承知しているだろう。使用されるマーカーは、遺伝子産物をコードする核酸と同時に発現されることが可能である限り、重要ではないと考えられている。選択マーカーおよびスクリーニング可能なマーカーのさらなる例は、当業者に周知である。

20

d . 他の核酸送達方法

【 0 2 1 3 】

抗原レセプターをコードする核酸のウイルス送達に加えて、以下の方法が、所与の宿主細胞への組換え遺伝子送達のさらなる方法であるので、本開示において考慮される。

30

【 0 2 1 4 】

本開示の免疫細胞への D N A または R N A などの核酸の導入は、本明細書中に記載されるようにまたは当業者に公知であるように、細胞を形質転換するための核酸送達に適した任意の方法を使用し得る。そのような方法としては、 D N A の直接送達 ( 例えば、エキソビオトランスフェクション、注射 (マイクロインジェクションを含む) ) ; エレクトロポレーション ; リン酸カルシウム沈殿 ; D E A E - デキストランに続くポリエチレングリコールの使用 ; 直接的な音波負荷 ; リポソーム媒介性のトランスフェクションおよびレセプター媒介性のトランスフェクション ; 微粒子銃 ( m i c r o p r o j e c t i l e b o m b a r d m e n t ) ; 炭化ケイ素纖維を伴った攪拌 ; アグロバクテリウム媒介性の形質転換 ; 乾燥 / 阻害媒介性の D N A 取り込み、およびそのような方法の任意の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。これらの手法などの手法の適用により、オルガネラ、細胞、組織または生物が安定にまたは一過性に形質転換され得る。

40

V I . 処置方法

【 0 2 1 5 】

本開示の実施形態は、癌、任意の種類の感染症および任意の免疫障害について個体を処置する方法を含む。その個体は、最初の処置として、または別の処置の後にもしくは別の処置の最中に、本開示の処置方法を使用し得る。免疫療法の方法は、癌のタイプまたはステージに基づいて、癌を有する個体のニーズに合わせることができ、少なくともいくつかの場合では、免疫療法は、処置の期間中にその個体に対して改変され得る。

【 0 2 1 6 】

50

具体的な場合において、処置方法は、以下のとおりである：1) 任意のタイプの血液悪性腫瘍を有する癌患者を処置するために、TまたはNK細胞（エキソビボで拡大されたTもしくはNK細胞、またはCARもしくはTCRを発現するTもしくはNK細胞）を用いる養子細胞療法、（2）任意のタイプの固形癌を有する癌患者を処置するために、TまたはNK細胞（エキソビボで拡大されたTもしくはNK細胞、またはCARもしくはTCRを発現するTもしくはNK細胞）を用いる養子細胞療法、（3）免疫障害を有する患者を処置するために、Tregおよび制御性B細胞を用いる養子細胞療法（エキソビボ拡大された、またはCARまたはTCRを発現する）、（4）感染症を有する患者を処置するために、TまたはNK細胞（エキソビボで拡大されたTもしくはNK細胞、またはCARもしくはTCRを発現するTもしくはNK細胞）を用いる養子細胞療法。本開示は、ヒトNK細胞における複数の遺伝子をノックダウン／ノックアウトすることが、細胞の機能の改善および腫瘍微小環境に対する抵抗性に寄与することを初めて示した。具体的な実施形態において、これには、患者自身の免疫細胞または養子移入された免疫細胞の機能を高める新規の免疫療法アプローチを用いた患者のケアに対して直接の意味がある。実施形態は、免疫療法に向けて高度に機能的なT、NKおよびB細胞（エキソビボで拡大され、かつCARまたはTCRが操作された細胞）を作製する新規アプローチを提供する。これらには、癌（血液腫瘍と固形腫瘍の両方）（NK細胞およびT細胞、また、CAR T細胞およびCAR NK細胞）、自己免疫障害および同種免疫障害（B細胞、制御性B細胞および制御性T細胞）の標的化、および感染症の処置（病原体特異的T細胞）が含まれる。

## 【0217】

いくつかの実施形態において、本開示は、有効量の本開示の免疫細胞を投与する工程を含む、免疫療法のための方法を提供する。1つの実施形態において、免疫応答を誘発する免疫NK細胞集団の移入によって、内科疾患または内科障害が処置される。本開示のある特定の実施形態において、免疫応答を誘発する免疫細胞集団の移入によって、癌または感染症が処置される。個体の癌を処置するためまたは癌の進行を遅延させるための方法が本明細書中に提供され、その方法は、有効量の抗原特異的細胞療法を個体に投与する工程を含む。本方法は、免疫障害、固形癌、血液癌およびウイルス感染症の処置に適用され得る。

## 【0218】

本処置方法が有用な腫瘍には、任意の悪性細胞タイプ、例えば、固形腫瘍または血液腫瘍に見られる細胞タイプが含まれる。例示的な固形腫瘍としては、脾臓、結腸、盲腸、胃、脳、頭部、頸部、卵巣、腎臓、喉頭、肉腫、肺、膀胱、黒色腫、前立腺および乳房からなる群より選択される器官の腫瘍が挙げられ得るが、これらに限定されない。例示的な血液腫瘍としては、骨髄の腫瘍、TまたはB細胞悪性腫瘍、白血病、リンパ腫、芽腫、ミエローマなどが挙げられる。本明細書中に提供される方法を用いて処置され得る癌のさらなる例としては、肺癌（小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌および肺扁平上皮癌を含む）、腹膜癌、胃（gastric）癌または胃（stomach）癌（消化器癌および消化管間質癌を含む）、脾癌、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、直腸結腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌または腎癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、様々なタイプの頭頸部癌、および黒色腫が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0219】

癌は、具体的には以下の組織タイプの癌であり得るが、これらに限定されない：新生物、悪性；癌腫；癌腫、未分化；巨細胞および紡錘形細胞癌；小細胞癌；乳頭状癌；扁平上皮癌；リンパ上皮癌；基底細胞癌；毛母癌；移行上皮癌；乳頭状移行上皮癌；腺癌；ガストリノーマ、悪性；胆管癌；肝細胞癌；肝細胞癌・胆管癌の混合型；索状腺癌；腺様囊胞癌；腺腫性ポリープ内腺癌；腺癌、家族性大腸ポリポーシス；固形癌；カルチノイド腫瘍、悪性；細気管支肺胞腺癌；乳頭状腺癌；嫌色素性癌；好酸性癌；好酸性腺癌；好塩基性癌；明細胞腺癌；顆粒細胞癌；濾胞腺癌；乳頭状・濾胞腺癌；非被包性硬化癌；副腎皮質癌；類内膜癌；皮膚付属器癌；アポクリン腺癌；皮脂腺癌；耳垢腺癌；粘表皮癌；囊胞腺癌；乳頭状囊腺癌；乳頭状漿液性囊胞腺癌；粘液性囊胞腺癌；粘液性腺癌；印環細胞癌；浸潤性導管癌；髓様癌；小葉癌；炎症性癌；パジェット病、乳房；腺房細胞癌；腺扁平上

10

20

30

40

50

皮癌；扁平上皮化生を伴う腺癌；胸腺腫、悪性；卵巣間質腫瘍、悪性；莢膜細胞腫、悪性；顆粒膜細胞腫、悪性；アンドロプラストーマ、悪性；セルトリ細胞癌；ライディッヒ細胞腫瘍、悪性；脂質細胞腫瘍、悪性；傍神経節腫、悪性；乳房外傍神経節腫、悪性；褐色細胞腫；グロムス血管肉腫；悪性黒色腫；無色素性黒色腫；表在拡大型黒色腫；悪性黒子黒色腫；末端黒子型黒色腫；結節性黒色腫；巨大色素性母斑内悪性黒色腫；類上皮細胞黒色腫；青色母斑、悪性；肉腫；線維肉腫；線維性組織球腫、悪性；粘液肉腫；脂肪肉腫；平滑筋肉腫；横紋筋肉腫；胎児性横紋筋肉腫；胞巣状横紋筋肉腫；間質肉腫；混合腫瘍、悪性；ミュラー管混合腫瘍；腎芽腫；肝芽腫；癌肉腫；間葉腫、悪性；ブレンナー腫瘍、悪性；葉状腫瘍、悪性；滑膜肉腫；中皮腫、悪性；未分化胚腫；胎児性癌；奇形腫、悪性；卵巣甲状腺腫、悪性；絨毛癌；中腎腫、悪性；血管肉腫；血管内皮腫、悪性；カポジ肉腫；血管外皮腫、悪性；リンパ管肉腫；骨肉腫；傍皮質骨肉腫；軟骨肉腫；軟骨芽細胞腫、悪性；間葉性軟骨肉腫；骨巨細胞腫瘍；ユーイング肉腫；歯原性腫瘍、悪性；エナメル上皮歯牙肉腫；エナメル上皮腫、悪性；エナメル上皮線維肉腫；松果体腫、悪性；脊索腫；グリオーマ、悪性；上衣腫；アストロサイトーマ；原形質性アストロサイトーマ；細線維性アストロサイトーマ；星芽腫；膠芽腫；乏突起膠腫；希突起芽腫；原始神経外胚葉性；小脳肉腫；神経節神経芽腫；神経芽腫；網膜芽腫；嗅神経原腫瘍；髓膜腫、悪性；神経線維肉腫；神経鞘腫、悪性；顆粒細胞腫、悪性；悪性リンパ腫；ホジキン病；ホジキン；側肉芽腫；悪性リンパ腫、小リンパ球性；悪性リンパ腫、大細胞型、びまん性；悪性リンパ腫、濾胞性；菌状息肉腫；他の特定の非ホジキンリンパ腫；B細胞リンパ腫；低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）；小リンパ球性（SL）NHL；中悪性度／濾胞性NHL；中悪性度びまん性NHL；高悪性度免疫芽球性NHL；高悪性度リンパ芽球性NHL；高悪性度小非切れ込み型細胞NHL；巨大病変（bulky disease）NHL；マントル細胞リンパ腫； AIDS関連リンパ腫；ワルデンシュトーレムマクログローブリン血症；悪性組織球増殖症；多発性骨髓腫；肥満細胞肉腫；免疫増殖性小腸疾患；白血病；リンパ性白血病；形質細胞性白血病；赤白血病；リンパ肉腫細胞白血病；骨髓性白血病；好塩基球性白血病；好酸球性白血病；单球性白血病；肥満細胞白血病；巨核芽球性白血病；骨髓性肉腫；ヘアリー細胞白血病；慢性リンパ性白血病（CLL）；急性リンパ芽球性白血病（ALL）；急性骨髓性白血病（AML）；および慢性骨髓芽球性白血病。

#### 【0220】

特定の実施形態は、白血病の処置方法に関する。白血病は、血液または骨髓の癌であり、血液細胞、通常は白血球細胞（白血球）の異常な増殖（分裂増殖による生成）を特徴とする。白血病は、血液腫瘍と呼ばれる広範な疾患群の一部である。白血病は、多種多様な疾患を網羅する広義語である。白血病は、急性および慢性の形態に臨床的におよび病理学的に分けられる。

#### 【0221】

本開示のある特定の実施形態において、免疫細胞は、それを必要とする個体（例えば、癌または感染症を有する個体）に送達される。次いで、それらの細胞は、その個体の免疫系を増強して、それぞれの癌細胞または病原性細胞を攻撃する。いくつかの場合では、その個体に免疫細胞が1回以上提供される。個体に免疫細胞が2回以上提供される場合、投与間の時間は、その個体において伝播するのに十分な時間であるべきであり、具体的な実施形態では、投与間の時間は、1、2、3、4、5、6、7日間またはそれ以上である。

#### 【0222】

本開示のある特定の実施形態は、免疫媒介性障害を処置または予防するための方法を提供する。1つの実施形態において、被験体は、自己免疫疾患有する。自己免疫疾患の非限定的な例としては、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質抗体症候群、自己免疫性アジソン病、副腎の自己免疫疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性卵巣炎および自己免疫性睾丸炎、自己免疫性血小板減少症、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアック多発性皮膚炎（celiac spate-dermatitis）、慢性疲労免疫不全症候群（CFIDS）、慢性炎症性脱髓性多発ニューロパシー、チャーグ・ストラウス症候群、瘢痕性類天疱瘡、CREST症候群、寒冷凝集素病、クロ

10

20

30

40

50

ーン病、円板状狼瘡、本態性混合型クリオグロブリン血症、線維筋痛症 - 線維筋炎、糸球体腎炎、グレーヴズ病、ギランバレー、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少紫斑病 ( I T P ) 、 I g A ニューロパシー、若年性関節炎、扁平苔癬、エリテマトーデス、メニエール病、混合結合組織病、多発性硬化症、 1 型糖尿病または免疫媒介性糖尿病、重症筋無力症、ネフローゼ症候群 ( 例えは、微小変化群、巣状糸球体硬化症または膜性腎症 ) 、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発性動脈炎、多発性軟骨炎、多腺症候群、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、スティフ・マン症候群、全身性エリテマトーデス、エリテマトーデス、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、脈管炎 ( 例えは、結節性多発性動脈炎、高安動脈炎、側頭動脈炎 / 巨細胞性動脈炎または疱疹状皮膚炎脈管炎 ) 、白斑ならびにウェグナー肉芽腫症が挙げられる。したがって、本明細書中に開示される方法を用いて処置され得る自己免疫疾患のいくつかの例としては、多発性硬化症、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、 I 型糖尿病、クローン病；潰瘍性大腸炎、重症筋無力症、糸球体腎炎、強直性脊椎炎、脈管炎または乾癬が挙げられるが、これらに限定されない。被験体は、喘息などのアレルギー性障害も有し得る。

#### 【 0223 】

さらに別の実施形態では、被験体は、移植される器官または幹細胞のレシピエントであり、拒絶反応を予防および / または処置するために免疫細胞が使用される。特定の実施形態において、被験体は、移植片対宿主病を有するか、または移植片対宿主病を発症するリスクがある。 G V H D は、血縁ドナーまたは非血縁ドナーからの幹細胞を使用するまたは含む任意の移植に関して起こり得る合併症である。 G V H D には、急性と慢性の 2 種類がある。急性 G V H D は、移植後の最初の 3 ヶ月以内に現れる。急性 G V H D の徴候としては、手および足における赤みがかった発疹が挙げられ、それは、剥皮または皮膚の水疱形成を伴って広がることがあり、より重篤になることがある。急性 G V H D は、胃および腸にも影響することがあり、その場合、筋痙攣、恶心および下痢が認められる。皮膚および目の黄変 ( 黄疸 ) は、急性 G V H D が肝臓に影響していることを示す。慢性 G V H D は、その重症度に基づいて等級付けされる : ステージ / グレード 1 が軽度であり ; ステージ / グレード 4 が重度である。慢性 G V H D は、移植の 3 ヶ月後またはそれ以降に発症する。慢性 G V H D の症状は、急性 G V H D の症状と似ているが、さらに、慢性 G V H D は、眼の粘液腺、口の唾液腺ならびに胃壁および腸を滑らかにする腺にも影響し得る。本明細書中に開示される任意の免疫細胞集団を使用することができる。移植される器官の例としては、臓器移植片、例えは、腎臓、肝臓、皮膚、臍臓、肺および / または心臓、あるいは細胞移植片、例えは、小島、肝細胞、筋芽細胞、骨髄または造血性幹細胞もしくは他の幹細胞が挙げられる。移植片は、複合性の移植片、例えは、顔面の組織であり得る。免疫細胞は、移植の前、移植と同時、または移植の後に、投与され得る。いくつかの実施形態において、免疫細胞は、移植の前に、例えは、移植の少なくとも 1 時間前、少なくとも 1 2 時間前、少なくとも 1 日前、少なくとも 2 日前、少なくとも 3 日前、少なくとも 4 日前、少なくとも 5 日前、少なくとも 6 日前、少なくとも 1 週間前、少なくとも 2 週間前、少なくとも 3 週間前、少なくとも 4 週間前または少なくとも 1 ヶ月前に投与される。 1 つの非限定的な具体例では、治療有効量の免疫細胞の投与は、移植の 3 ~ 5 日前に行われる。

#### 【 0224 】

いくつかの実施形態において、被験体には、免疫細胞療法の前に骨髄非破壊的なリンパ球除去化学療法が施され得る。その骨髄非破壊的なリンパ球除去化学療法は、任意の好適な経路によって投与され得る任意の好適なそのような治療であり得る。その骨髄非破壊的なリンパ球除去化学療法は、特に、癌が転移性であり得る黒色腫である場合、例えは、シクロホスファミドおよびフルダラビンの投与を含み得る。シクロホスファミドおよびフルダラビンの例示的な投与経路は、静脈内である。同様に、任意の好適な用量のシクロホスファミドおよびフルダラビンが投与され得る。特定の態様では、およそ 60 mg / kg のシクロホスファミドが 2 日間投与され、その後、およそ 25 mg / m<sup>2</sup> のフルダラビンが

10

20

30

40

50

5日間投与される。

【0225】

ある特定の実施形態では、免疫細胞の増殖および活性化を促進する成長因子が、免疫細胞と同時にまたは免疫細胞に続いて被験体に投与される。免疫細胞成長因子は、免疫細胞の増殖および活性化を促進する任意の好適な成長因子であり得る。好適な免疫細胞成長因子の例としては、インターロイキン(IL)-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18およびIL-21が挙げられ、これらは、単独でまたは様々な組み合わせで(例えば、IL-2とIL-7、IL-2とIL-15、IL-7とIL-15、IL-2とIL-7とIL-15、IL-12とIL-7、IL-12とIL-15またはIL-12とIL-2)使用され得る。

10

【0226】

治療有効量の免疫細胞が、非経口投与をはじめとしたいくつかの経路、例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、胸骨内もしくは関節内の注射または注入によって投与され得る。

【0227】

養子細胞療法において使用するための免疫細胞の治療有効量は、処置される被験体において所望の効果を達成する量である。例えば、これは、進行を阻害するために必要な免疫細胞の量、または自己免疫疾患もしくは同種免疫疾患を後退させるために必要な免疫細胞の量、または自己免疫疾患によって引き起こされる症状、例えば、疼痛および炎症を和らげることができる量であり得る。これは、炎症に伴う症状、例えば、疼痛、浮腫および体温上昇を和らげるために必要な量であり得る。これは、移植された器官の拒絶反応を減少させるまたは予防するために必要な量でもあり得る。

20

【0228】

上記免疫細胞集団は、疾患状態を回復させるために、上記疾患と一致した処置レジメンで、例えば、1日から数日間にわたって1回または数回で、投与され得るか、または疾患の進行を阻害するためおよび疾患の再発を予防するために、長期間にわたる定期的な投与で投与され得る。製剤において用いられる正確な用量は、投与経路および疾患または障害の重篤度にも依存し、医師の判断および各患者の状況に従って決定されるべきである。免疫細胞の治療有効量は、処置される被験体、苦痛の重症度およびタイプならびに投与様式に依存する。いくつかの実施形態において、ヒト被験体の処置において使用され得る用量は、少なくとも $3.8 \times 10^4$ 、少なくとも $3.8 \times 10^5$ 、少なくとも $3.8 \times 10^6$ 、少なくとも $3.8 \times 10^7$ 、少なくとも $3.8 \times 10^8$ 、少なくとも $3.8 \times 10^9$ または少なくとも $3.8 \times 10^{10}$ 免疫細胞/ $m^2$ で変動する。ある特定の実施形態において、ヒト被験体の処置において使用される用量は、約 $3.8 \times 10^9$ ～約 $3.8 \times 10^{10}$ 免疫細胞/ $m^2$ で変動する。さらなる実施形態において、免疫細胞の治療有効量は、約 $5 \times 10^6$ 細胞/ $kg$ 体重～約 $7.5 \times 10^8$ 細胞/ $kg$ 体重、例えば、約 $2 \times 10^7$ 細胞～約 $5 \times 10^8$ 細胞/ $kg$ 体重または約 $5 \times 10^7$ 細胞～約 $2 \times 10^8$ 細胞/ $kg$ 体重で変動し得る。免疫細胞の正確な量は、被験体の年齢、体重、性別および生理学的状態に基づいて当業者によってすぐに決定される。有効量は、インビトロモデルまたは動物モデルの試験系から導かれた用量反応曲線から外挿され得る。

30

【0229】

上記免疫細胞は、免疫媒介性障害を処置するための1つ以上の他の治療薬と併用して投与され得る。併用療法としては、1つ以上の抗菌剤(例えば、抗生物質、抗ウイルス剤および抗真菌剤)、抗腫瘍剤(例えば、フルオロウラシル、メトトレキサート、パクリタキセル、フルダラビン、エトポシド、ドキソルビシンまたはビンクリスチン)、免疫枯渇剤(例えば、フルダラビン、エトポシド、ドキソルビシンまたはビンクリスチン)、免疫抑制剤(例えば、アザチオブリンまたは糖質コルチコイド、例えば、デキサメタゾンまたはプレドニゾン)、抗炎症剤(例えば、糖質コルチコイド(例えば、ヒドロコルチゾン、デキサメタゾンまたはプレドニゾン)または非ステロイド性抗炎症剤(例えば、アセチルサリチル酸、イブプロフェンまたはナプロキセンナトリウム))、サイトカイン(例えば、インターロイキン-10またはトランスフォーミング成長因子-ベータ)、ホルモン(例

40

50

えば、エストロゲン) またはワクチンが挙げられ得るが、これらに限定されない。さらに、カルシニューリン阻害剤(例えば、シクロスボリンおよびタクロリムス) ; mT0R阻害剤(例えば、ラパマイシン) ; ミコフェノール酸モフェチル、抗体(例えば、CD3、CD4、CD40、CD154、CD45、IVIgまたはB細胞を認識する抗体) ; 化学療法剤(例えば、メトトレキサート、トレオスルファン、ブスルファン) ; 照射; またはケモカイン、インターロイキンもしくはそれらの阻害剤(例えば、BAFF、IL-2、抗IL-2R、IL-4、JAKキナーゼ阻害剤)を含むがこれらに限定されない免疫抑制剤または免疫対応誘発剤が投与され得る。そのようなさらなる医薬品は、所望の効果に応じて免疫細胞の投与前、投与中または投与後に投与され得る。上記細胞および作用物質のこの投与は、同じ経路または異なる経路による投与、および同じ部位または異なる部位における投与であり得る。

10

#### A. 薬学的組成物

##### 【0230】

免疫細胞(例えば、T細胞、B細胞またはNK細胞)および薬学的に許容され得るキャリアを含む薬学的組成物および製剤も本明細書中に提供される。

##### 【0231】

本明細書中に記載されるような薬学的組成物および製剤は、所望の程度の純度を有する活性成分(例えば、抗体またはポリペプチド)を1つ以上の自由選択の薬学的に許容され得るキャリア( Remington's Pharmaceutical Sciences 22<sup>nd</sup> edition, 2012 )と混合することによって、凍結乾燥された製剤または水溶液の形態で調製され得る。薬学的に許容され得るキャリアは、一般に、使用される投与量および濃度においてレシピエントにとって無毒性であり、それらのキャリアとしては、緩衝剤(例えば、リン酸、クエン酸および他の有機酸) ; 酸化防止剤(アスコルビン酸およびメチオニンを含む) ; 保存剤(例えば、塩化オクタデシルジメチルベンジルアミノニウム ; 塩化ヘキサメトニウム ; 塩化ベンザルコニウム ; 塩化ベンゼトニウム ; フェノールアルコール、ブチルアルコールまたはベンジルアルコール ; アルキルパラベン(例えば、メチルパラベンまたはプロピルパラベン) ; カテコール ; レゾルシノール ; シクロヘキサノール ; 3-ペンタノール ; およびm-クレゾール) ; 低分子量(約10残基未満)のポリペプチド ; タンパク質(例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン) ; 親水性ポリマー(例えば、ポリビニルピロリドン) ; アミノ酸(例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンまたはリジン) ; 单糖類、二糖類および他の炭水化物(グルコース、マンノースまたはデキストリンを含む) ; キレート剤(例えば、EDTA) ; 糖類(例えば、スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトール) ; 塩形成対イオン(例えば、ナトリウム) ; 金属錯体(例えば、Zn-タンパク質複合体) ; および/または非イオン性界面活性剤(例えば、ポリエチレングリコール(PEG))が挙げられるが、これらに限定されない。例示的な本明細書中の薬学的に許容され得るキャリアとしては、間質薬物分散剤、例えば、中性で活性な可溶性ヒアルロンダーゼ糖タンパク質(sHASEGP)、例えば、ヒト可溶性PH-20ヒアルロンダーゼ糖タンパク質、例えば、rHuPH20(HYLENEX(登録商標) , Baxter International, Inc.)がさらに挙げられる。rHuPH20を含むある特定の例示的なsHASEGPおよび使用方法は、米国特許公開第2005/0260186号および同第2006/0104968号に記載されている。1つの態様において、sHASEGPは、1つ以上のさらなるグリコサミノグリカナーを、例えば、コンドロイチナーゼと併用される。

20

#### B. 併用療法

##### 【0232】

ある特定の実施形態において、本実施形態の組成物および方法は、少なくとも1つのさらなる治療と併用される免疫細胞集団を含む。そのさらなる治療は、放射線療法、手術(例えば、ランペクトミーおよび乳房切除術)、化学療法、遺伝子治療、DNA治療、ウイルス治療、RNA治療、免疫療法、骨髄移植、ナノ治療、モノクローナル抗体治療または

30

40

50

前述の組み合わせであり得る。そのさらなる治療は、アジュvant療法またはネオアジュvant療法の形態であり得る。

【0233】

いくつかの実施形態において、さらなる治療は、小分子酵素阻害剤または抗転移剤の投与である。いくつかの実施形態において、さらなる治療は、副作用制限剤（例えば、処置の副作用の発生率および／または重症度を下げる目的とする作用物質、例えば、抗悪心剤など）の投与である。いくつかの実施形態において、さらなる治療は、放射線療法である。いくつかの実施形態において、さらなる治療は、手術である。いくつかの実施形態において、さらなる治療は、放射線療法と手術の併用である。いくつかの実施形態において、さらなる治療は、ガンマ線照射である。いくつかの実施形態において、さらなる治療は、P B K / A K T / m T O R 経路を標的化する治療、H S P 9 0 阻害剤、チューブリン阻害剤、アポトーシス阻害剤および／または化学予防剤である。さらなる治療は、当該分野で公知の化学療法剤の1つ以上であり得る。

10

【0234】

免疫細胞療法は、免疫チェックポイント療法などのさらなる癌治療の前、最中、後または様々な組み合わせで投与され得る。それらの投与は、同時に数分、数日、数週間までの範囲の間隔で行われ得る。免疫細胞療法がさらなる治療薬とは別に患者に提供される実施形態では、それら2つの化合物が、なおも患者に対して有益な併用効果を発揮できるように、各送達時点の間にかなりの期間が経過しないことを保証するのが一般的である。そのような場合、抗体療法と抗癌療法とが、互いの約12～24または72時間以内に、より詳細には、互いの約6～12時間以内に患者に提供され得ることが企図される。いくつかの状況において、それぞれの投与間に数日（2、3、4、5、6または7）から数週間（1、2、3、4、5、6、7または8）が経過した場合、処置期間をかなり延長することが望ましいことがある。

20

【0235】

様々な組み合わせが使用され得る。下記の例の場合、免疫細胞療法が、「A」であり、抗癌療法が、「B」である：

A / B / A B / A / B B / B / A A / A / B A / B / B B / A / A A / B / B /  
B B / A / B / B  
B / B / B / A B / B / A / B A / A / B / B A / B / A / B A / B / B / A B  
/ B / A / A  
B / A / B / A B / A / A / B A / A / A / B B / A / A / A A / B / A / A A  
/ A / B / A

30

【0236】

本実施形態の任意の化合物または治療の患者への投与は、それらの作用物質に毒性がある場合はそれを考慮して、そのような化合物を投与するための一般的なプロトコルに従う。ゆえに、いくつかの実施形態では、併用療法に起因し得る毒性をモニタリングする工程が存在する。

1. 化学療法

【0237】

多種多様の化学療法剤が、本実施形態に従って使用され得る。用語「化学療法」とは、薬物を使用して癌を処置することを指す。「化学療法剤」は、癌の処置において投与される化合物または組成物を意味するために使用される。これらの作用物質または薬物は、細胞内でのそれらの活性様式によって、例えば、それらが細胞周期に影響するか否かおよびどのステージにおいて細胞周期に影響するかによって、分類される。あるいは、作用物質は、DNAを直接架橋する能力、DNAにインターラートする能力、または核酸合成に影響することによって染色体異常および有糸分裂異常を誘導する能力に基づいて特徴付けられ得る。

40

【0238】

化学療法剤の例としては、アルキル化剤（例えば、チオテバおよびシクロスホスファミ

50

ド) ; スルホン酸アルキル ( 例えば、プスルファン、インプロスルファンおよびピポスルファン ) ; アジリジン ( 例えば、ベンゾドパ ( benzodopa ) 、カルボコン、メツレドパ ( meturedopa ) およびウレドパ ( uredopa ) ) ; エチレンイミンおよびメチルアメラミン ( methylamelines ) ( アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミドおよびトリメチローロメラミン ( trimethyloolomelamine ) を含む ) ; アセトゲニン ( 特に、ブラタシンおよびブラタシノン ) ; カンプトテシン ( 合成アナログであるトポテカンを含む ) ; ブリオスタチン ; カリスタチン ; C C - 1 0 6 5 ( そのアドゼレシン、カルゼレシン ( carzelesin ) およびビゼレシン ( bizelesin ) 合成アナログを含む ) ; 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 ( 合成アナログである KW - 2 1 8 9 および C B 1 - T M 1 を含む ) ; エレウセロビン ( eleutherobin ) ; パンクラチスタチン ( pancratistatin ) ; サルコジクチイン ( sarcodictyin ) ; スポンギスタチン ( spongistatin ) ; ナイトロジエンマスター 10 ド ( 例えば、クロラムブシル、クロルナファジン ( chlornaphazine ) 、コロホスファミド ( cholophosphamide ) 、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、塩酸メクロレタミンオキシド、メルファラン、ノベンピキン ( novembichin ) 、フェネステリン ( phenesterine ) 、プレドニムスチン、トロフォスファミド ( trofosfamide ) およびウラシルマスター 20 ド ) ; ニトロソ尿素 ( 例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチンおよびラニムヌスチン ( ranimustine ) ) ; 抗生物質 ( 例えば、エンジイン抗生物質 ( 例えば、カリケアマイシン、特に、カリケアマイシンガンマ I およびカリケアマイシンオメガ I 1 ) ) ; ジネマイシン ( dynemicin ) ( ジネマイシン A を含む ) ; ビスホスホネート ( 例えば、クロドロネート ) ; エスペラミシン ; ならびにネオカルチノスタチンクロモフォアおよび関連色素タンパク質であるエンジイ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、アウトラルニシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン ( carabacin ) 、カルミノマイシン ( carminomycin ) 、カルジノフィリン ( carzinophilin ) 、クロモミシニス、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン ( detorubycin ) 、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、ドキソルビシン ( モルホリノ - ドキソルビシン、シアノモルホリノ - ドキソルビシン、2 - ピロリノ - ドキソルビシンおよびデオキシドキソルビシンを含む ) 、エピルビシン、エソルビシン ( esorubicin ) 、イダルビシン、マルセロマイシン ( marcellomycin ) 、マイトマイシン ( 例えば、マイトマイシン C ) 、ミコフェノール酸、ノガラルニシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン ( potfiromycin ) 、ピューロマイシン、クエラマイシン ( quelamycin ) 、ロドロビシン ( rodorubycin ) 、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、ジノスタチンおよびゾルビシン ; 抗代謝産物 ( 例えば、メトトレキサートおよび 5 - フルオロウラシル ( 5 - F U ) ) ; 葉酸アナログ ( 例えば、デノプテリン ( denopterin ) 、ブテロプテリンおよびトリメトレキサート ) ; 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 ( thiamprine ) およびチオグアニン ) ; ピリミジンアナログ ( 例えば、アンシタビン、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、エノシタビンおよびフロクスウリジン ) ; アンドロゲン ( 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、メピチオスタンおよびテストラクトン ) ; 抗副腎 ( anti-adrenals ) ( 例えば、ミトタンおよびトリロスタン ) ; 葉酸補給剤 ( 例えば、フロリン酸 ( frolinic acid ) ) ; アセグラトン ; アルドホスファミドグリコシド ( aldophosphamide glycoside ) ; 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 ( bestrabucil ) ; ビサントレン ( bisantrene ) ; エダトラキセート ( edatraxate ) ; デ 30 40 50

ホファミン (defofamine) ; デメコルチン ; ジアジコン ; エルフォルミチン (elformithine) ; 酢酸エリプチニウム (elliptinium acetate) ; エポチロン ; エトグルシド ; 硝酸ガリウム ; ヒドロキシ尿素 ; レンチナン ; 口ニダイニン (lonidainine) ; メイタンシノイド (maytansinoids) (例えば、メイタンシンおよびアンサミトシン (ansamitocins)) ; ミトグアゾン ; ミトキサントロン ; モピダンモール (mopidanol) ; ニトラエリン ; ペントスタチン ; フェナメット (phenamet) ; ピラルビシン ; ロソキサントロン (losoxanthrone) ; ポドフィリン酸 (podophyllinic acid) ; 2-エチルヒドラジド ; プロカルバジン ; PSK多糖複合体 ; ラゾキサン ; リゾキシン ; シゾフィラン ; スピロゲルマニウム ; テヌアゾン酸 ; トリアジクォン (triaziquone) ; 2,2',2"-トリクロロトリエチルアミン ; トリコテシン (特に、T-2トキシン、ベラクリンA、ロリジン (rоридин) Aおよびアンゲイジン (anguidine)) ; ウレタン ; ピンデシン ; 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 (gacytosine) ; アラビノシド (「Ara-C」) ; シクロホスファミド ; タキソイド、例えば、パクリタキセルおよびドセタキセルゲムシタビン ; 6-チオグアニン ; メルカプトプリン ; 白金配位錯体 (例えば、シスプラチン、オキサリプラチンおよびカルボプラチン) ; ピンプラスチン ; 白金 ; エトポシド (VP-16) ; イホスファミド ; ミトキサントロン ; ピンクリスチン ; ピノレルビン ; ノバントロン ; テニポシド ; エダトレキセート ; ダウノマイシン ; アミノブテリン ; キセロダ (xeloda) ; イバンドロネート ; イリノテカン (例えば、CPT-11) ; トポイソメラーゼ阻害剤 RFS2000 ; ジフルオロメチルオルニチン (DMFO) ; レチノイド (例えば、レチノイン酸) ; カペシタビン ; カルボプラチン、プロカルバジン、ブリコマイシン、ゲムシタビエン、ナベルビン、ファルネシル-タンパク質タンスフェラーゼ阻害剤、トランスプラチナ (transplatin) )、ならびに上記のいずれかの薬学的に許容され得る塩、酸または誘導体が挙げられる。

## 2. 放射線療法

### 【0239】

DNA損傷を引き起こす、広く使用してきた他の因子としては、線、X線および/または腫瘍細胞への放射性同位体の定方向送達として一般的に知られているものが挙げられる。マイクロ波、陽子ビーム照射およびUV照射などの他の形態のDNA損傷因子も企図される。これらの因子のすべてが、DNA、DNAの前駆体、DNAの複製および修復ならびに染色体のアセンブリおよび維持に対して広範囲のダメージをもたらす可能性が最も高い。X線の線量の範囲は、長期間 (3~4週間) にわたる50~200レントゲンという1日線量から、2000~6000レントゲンという単回線量までの範囲である。放射性同位体の線量の範囲は、大きく異なり、同位体の半減期、放射される放射線の強度およびタイプ、ならびに腫瘍性細胞による取り込みに依存する。

## 3. 免疫療法

### 【0240】

当業者は、さらなる免疫療法が上記実施形態の方法と併用してまたは併せて使用され得ることを理解する。癌の処置の状況において、免疫治療薬は、通常、癌細胞を標的化し、破壊するために免疫エフェクター細胞および免疫エフェクター分子を使用することに頼る。リツキシマブ (RITUXAN (登録商標)) が、そのような例である。免疫エフェクターは、例えば、腫瘍細胞の表面上の何らかのマーカーに特異的な抗体であり得る。その抗体は、単独で治療のエフェクターとして機能し得るか、または他の細胞をリクルートして、実際に細胞殺滅に影響し得る。その抗体はまた、薬物またはトキシン (化学療法剤、放射性核種、リシンA鎖、コレラ毒素、百日咳毒素など) に結合体化され得、標的化剤として役立ち得る。あるいは、そのエフェクターは、腫瘍細胞標的と直接または間接的に相互作用する表面分子を有するリンパ球であり得る。様々なエフェクター細胞には、細胞傷害性T細胞およびNK細胞が含まれる。

### 【0241】

10

20

30

40

50

抗体 - 薬物結合体 (ADC) は、殺細胞薬に共有結合的に連結されたモノクローナル抗体 (Mab) を含み、併用療法において使用され得る。このアプローチは、抗原標的に対するMabの高い特異性を非常に強力な細胞傷害性薬物と組み合わせることから、豊富なレベルの抗原を有する腫瘍細胞にペイロード (薬物) を送達する「武装した」Mabをもたらす。また、薬物の標的化送達は、正常組織への曝露を最小限に抑えることから、毒性の低減および治療指数の改善をもたらす。例示的なADC薬物としては、ADCETRIS (登録商標) (ブレンツキシマブベドチン) およびKADCYLA (登録商標) (トラスツズマブエムタンシンまたはT-DM1) が挙げられる。

#### 【0242】

免疫療法の1つの態様において、腫瘍細胞は、標的化の影響を受けやすい何らかのマーカー、すなわち、他の大部分の細胞上に存在しない何らかのマーカーを有さなければならぬ。多くの腫瘍マーカーが存在し、これらのいずれかが、本実施形態の状況において標的化に好適であり得る。一般的な腫瘍マーカーとしては、CD20、癌胎児抗原、チロシナーゼ (p97)、gp68、TAG-72、HMF G、Sialyl Lewis抗原、MucA、MucB、PLAP、ラミニンレセプター、erb Bおよびp155が挙げられる。免疫療法の代替の態様は、抗癌効果と免疫刺激効果とを組み合わせることである。IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、ガンマ-IFNなどのサイトカイン、MIP-1、MCP-1、IL-8などのケモカイン、およびFLT3リガンドなどの成長因子をはじめとした免疫刺激分子も存在する。

10

#### 【0243】

免疫療法の例としては、免疫アジュvant、例えば、Mycobacterium bovis、Plasmodium falciparum、ジニトロクロロベンゼンおよび芳香族化合物) ; サイトカイン療法、例えば、インターフェロン、およびIL-1、GM-CSFならびにTNF; 遺伝子治療、例えば、TNF、IL-1、IL-2およびp53; ならびにモノクローナル抗体、例えば、抗CD20、抗ガングリオシドGM2および抗p185が挙げられる。1つ以上の抗癌療法が、本明細書中に記載される抗体療法とともに使用され得ることが企図される。

20

#### 【0244】

いくつかの実施形態において、免疫療法は、免疫チェックポイント阻害剤であり得る。免疫チェックポイントは、シグナル (例えば、共刺激分子) を強めるかまたはシグナルを弱めるかのいずれかである。免疫チェックポイントの遮断によって標的化され得る阻害性免疫チェックポイントとしては、アデノシンA2Aレセプター (A2AR)、B7-H3 (CD276としても知られる)、BおよびTリンパ球アテニュエーター (BTLA)、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4 (CD152としても知られるCTLA-4)、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO)、キラー細胞免疫グロブリン (KIR)、リンパ球活性化遺伝子-3 (LAG3)、プログラム死1 (PD-1)、T細胞免疫グロブリンDメインおよびムチンドメイン3 (TIM-3)、ならびにT細胞活性化のV-DメインIgサブレッサー (VISTA) が挙げられる。特に、免疫チェックポイント阻害剤は、PD-1軸および/またはCTLA-4を標的化する。

30

#### 【0245】

免疫チェックポイント阻害剤は、小分子、組換え型のリガンドまたはレセプターなどの薬物であり得るか、または特に、ヒト抗体などの抗体である。免疫チェックポイントタンパク質またはそのアナログの公知の阻害剤が、使用され得、特に、キメラ化型、ヒト化型またはヒト型の抗体が使用され得る。当業者が承知しているように、代替のおよび/または等価な名称が、本開示において述べられるある特定の抗体に対して使用され得る。そのような代替のおよび/または等価な名称は、本開示の文脈において相互交換可能である。例えば、ランプロリズマブが、代替のおよび等価な名称であるMK-3475およびベンプロリズマブとしても知られていることは公知である。

40

#### 【0246】

いくつかの実施形態において、PD-1結合アンタゴニストは、PD-1がそのリガン

50

ド結合パートナーに結合するのを阻害する分子である。具体的な態様において、P D - 1 リガンド結合パートナーは、P D L 1 および / または P D L 2 である。別の実施形態において、P D L 1 結合アンタゴニストは、P D L 1 がその結合パートナーに結合するのを阻害する分子である。具体的な態様において、P D L 1 結合パートナーは、P D - 1 および / または B 7 - 1 である。別の実施形態において、P D L 2 結合アンタゴニストは、P D L 2 がその結合パートナーに結合するのを阻害する分子である。具体的な態様において、P D L 2 結合パートナーは、P D - 1 である。アンタゴニストは、抗体、その抗原結合フラグメント、イムノアドヘシン、融合タンパク質またはオリゴペプチドであり得る。

#### 【 0 2 4 7 】

いくつかの実施形態において、P D - 1 結合アンタゴニストは、抗 P D - 1 抗体（例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体）である。いくつかの実施形態において、抗 P D - 1 抗体は、ニボルマブ、ベンプロリズマブおよび C T - 0 1 1 からなる群より選択される。いくつかの実施形態において、P D - 1 結合アンタゴニストは、イムノアドヘシン（例えば、定常領域（例えば、免疫グロブリン配列の F c 領域）に融合された P D L 1 または P D L 2 の細胞外の部分または P D - 1 結合部分を含むイムノアドヘシン）である。いくつかの実施形態において、P D - 1 結合アンタゴニストは、A M P - 2 2 4 である。M D X - 1 1 0 6 - 0 4 、M D X - 1 1 0 6 、O N O - 4 5 3 8 、B M S - 9 3 6 5 5 8 および O P D I V O (登録商標) としても知られるニボルマブは、使用され得る抗 P D - 1 抗体である。M K - 3 4 7 5 、M e r c k 3 4 7 5 、ランプロリズマブ、K E Y T R U D A (登録商標) および S C H - 9 0 0 4 7 5 としても知られるベンプロリズマブは、例示的な抗 P D - 1 抗体である。h B A T または h B A T - 1 としても知られる C T - 0 1 1 、抗 P D - 1 抗体である。B 7 - D C I g としても知られる A M P - 2 2 4 は、P D L 2 - F c 融合可溶性レセプターである。

#### 【 0 2 4 8 】

本明細書中に提供される方法において標的化され得る別の免疫チェックポイントは、C D 1 5 2 としても知られる細胞傷害性 T リンパ球関連タンパク質 4 (C T L A - 4) である。ヒト C T L A - 4 の完全 c D N A 配列は、G e n b a n k アクセッション番号 L 1 5 0 0 6 を有する。C T L A - 4 は、T 細胞の表面上に見られ、抗原提示細胞の表面上の C D 8 0 または C D 8 6 に結合したとき「切」スイッチとして作用する。C T L A 4 は、ヘルパー T 細胞の表面上に発現される免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、T 細胞に阻害シグナルを伝達する。C T L A 4 は、T 細胞共刺激タンパク質である C D 2 8 に似ており、両分子は、抗原提示細胞上の C D 8 0 および C D 8 6 (それぞれ B 7 - 1 および B 7 - 2 とも呼ばれる) に結合する。C T L A 4 は、T 細胞に阻害シグナルを伝達するのに対して、C D 2 8 は、刺激シグナルを伝達する。細胞内 C T L A 4 は、制御性 T 細胞にも見られ、それらの細胞の機能にとって重要であり得る。T 細胞レセプターおよび C D 2 8 を介した T 細胞の活性化により、B 7 分子に対する阻害性レセプターである C T L A - 4 が高発現される。

#### 【 0 2 4 9 】

いくつかの実施形態において、免疫チェックポイント阻害剤は、抗 C T L A - 4 抗体（例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体）、それらの抗原結合フラグメント、イムノアドヘシン、融合タンパク質またはオリゴペプチドである。

#### 【 0 2 5 0 】

本方法における使用に適した抗ヒト C T L A - 4 抗体（またはそれ由来の V H および / もしくは V L ドメイン）は、当該分野で周知の方法を用いて作製され得る。あるいは、当該分野で認められている抗 C T L A - 4 抗体を使用することができる。例示的な抗 C T L A - 4 抗体は、イピリムマブ (1 0 D 1 、M D X - 0 1 0 、M D X - 1 0 1 および Y e r v o y (登録商標) としても知られる) またはその抗原結合フラグメントおよびバリアントである。他の実施形態において、その抗体は、イピリムマブの重鎖 C D R および軽鎖 C D R または重鎖 V R および軽鎖 V R を含む。したがって、1 つの実施形態において、その抗体は、イピリムマブの V H 領域の C D R 1 、C D R 2 および C D R 3 ドメインならびに

10

20

30

40

50

イピリムマブのV L 領域の C D R 1、 C D R 2 および C D R 3 ドメインを含む。別の実施形態において、その抗体は、 C T L A - 4 上の、上述の抗体と同じエピトープへの結合について競合し、かつ / または C T L A - 4 上の、上述の抗体と同じエピトープに結合する。別の実施形態において、その抗体は、上述の抗体に対して少なくとも約 9 0 % の可変領域アミノ酸配列同一性（例えば、イピリムマブと少なくとも約 9 0 %、 9 5 % または 9 9 % の可変領域同一性）を有する。

#### 4 . 手術

##### 【 0 2 5 1 】

癌を有する人のおよそ 6 0 % が、予防的手術、診断的手術または進行度診断手術、根治的手術および緩和手術をはじめとした何らかのタイプの手術を受ける。根治的手術には、癌性組織の全部または一部を物理的に除去、切除および / または破壊する摘出術が含まれ、他の治療（例えば、本実施形態の処置、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、遺伝子治療、免疫療法および / または代替療法）と併せて使用され得る。腫瘍摘出術とは、腫瘍の少なくとも一部を物理的に除去することを指す。手術による処置には、腫瘍摘出術に加えて、レーザー手術、凍結手術、電気手術および顕微鏡下手術（モース術）が含まれる。

10

##### 【 0 2 5 2 】

癌性細胞、組織または腫瘍の一部または全部を切除する際、身体に空洞が形成され得る。処置は、さらなる抗癌療法によるその領域の灌流、直接注射または局所適用によって達成され得る。そのような処置は、例えば、1、2、3、4、5、6 もしくは 7 日ごとに、または 1、2、3、4 および 5 週間ごとに、または 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 もしくは 12 ヶ月ごとに、反復され得る。これらの処置は、様々な投与量の処置でもあり得る。

20

#### 5 . 他の作用物質

##### 【 0 2 5 3 】

処置の治療効果を改善するために、本実施形態のある特定の態様と組み合わせて他の作用物質が使用され得ることが企図される。これらのさらなる作用物質としては、細胞表面レセプターおよびギャップ結合のアップレギュレーションに影響する作用物質、細胞分裂抑制剤および分化剤、細胞接着の阻害剤、アポトーシス誘導物質に対する過剰増殖細胞の感度を高める作用物質、または他の生物学的作用物質が挙げられる。ギャップ結合数を増加させることによる細胞間のシグナル伝達の増加は、隣接する過剰増殖細胞集団に対する抗過剰増殖効果を高め得る。他の実施形態では、処置の抗過剰増殖の有効性を改善するために、本実施形態のある特定の態様と組み合わせて細胞分裂抑制剤または分化剤が使用され得る。本実施形態の有効性を改善するために、細胞接着の阻害剤が企図される。細胞接着阻害剤の例は、接着斑キナーゼ（ F A K ）阻害剤およびロバスタチンである。アポトーシスに対する過剰増殖細胞の感度を高める他の作用物質（例えば、抗体 c 2 2 5 ）が、処置の有効性を改善するために本実施形態のある特定の態様と組み合わせて使用され得ることがさらに企図される。

30

#### V I I . 製品またはキット

##### 【 0 2 5 4 】

免疫細胞を含む製品またはキットも本明細書中に提供される。その製品またはキットは、個体の癌を処置するためもしくは癌の進行を遅延させるためにまたは癌を有する個体の免疫機能を高めるために免疫細胞を使用するための指示を含む添付文書をさらに含み得る。本明細書中に記載される抗原特異的免疫細胞のいずれかが、その製品またはキットに含められ得る。好適な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、バッグおよびシリンジが挙げられる。その容器は、ガラス、プラスチック（例えば、ポリ塩化ビニルまたはポリオレフィン）または金属合金（例えば、ステンレス鋼またはハステロイ）などの種々の材料から形成され得る。いくつかの実施形態において、その容器は、製剤およびラベルを保持し、そのラベルは、容器に付着しているかまたは関連付けられており、その容器には、使用法が示されている場合がある。その製品またはキットは、商業的な観点およびユーザーの観点から望ましい他の材料をさらに含むことがあり、それらの材料としては、他の緩衝

40

50

液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、および使用するための指示を含む添付文書が挙げられる。いくつかの実施形態において、その製品は、1つ以上の別の作用物質（例えば、化学療法剤および抗悪性腫瘍剤）をさらに含む。その1つ以上の作用物質に適した容器としては、例えば、ボトル、バイアル、バッグおよびシリンジが挙げられる。

【実施例】

【0255】

V III. 実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために含められる。以下の実施例に開示される手法は、本発明の実施において十分に機能すると本発明者が発見した手法であり、ゆえにその実施に対する好ましい形式であると考えることができることが当業者によって認識されるべきである。しかしながら、当業者は、本開示に鑑みて、開示される具体的な実施形態において多くの変更を行うことができ、それらの変更は、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく、なおも同様または類似の結果をもたらすと認識するはずである。

実施例1 - マルチプレックス遺伝子編集

【0256】

T細胞およびNK細胞などの免疫細胞において複数の遺伝子の発現を同時に妨害することの有効性を試験するために、いくつかの研究を行って、CRISPR/Cas9を用いて異なる遺伝子の組み合わせの破壊を試験した。第1の研究では、CRISPR/Cas9を使用して、NK細胞においてNKG2A、CD47、TGFBR2およびCISHの発現を妨害した。この遺伝子セットでは、NKG2AおよびCD47を1回目のエレクトロポレーションにおいてノックアウトし、2回目のエレクトロポレーションにおいてCISHおよびTGFBR2を標的化した。両方の回のエレクトロポレーションに対してPCRおよびフローサイトメトリーを用いたノックアウト効率の検証が成功した（図1）。

【0257】

TIGIT、CD96、CISH、アデノシン（図2）、ならびにNKG2A、CD47、TGFBR2およびCISH（図3）を含むさらなる遺伝子セットにおいて、複数の遺伝子を破壊する方法を検証した。複数の遺伝子を破壊することにより、標的腫瘍細胞に対する機能が高まることが見出された。ブレフェルジンAの存在下において5時間、標的細胞株で共刺激された様々なNK細胞（編集済み 対 Cas9のみ）を用いて、IFN-、TNF およびCD107の産生のフローサイトメトリー解析を行った。標的細胞株による刺激の後、IFN-、TNF およびCD107の分泌が増大した（図3）。

【0258】

この機能の増強を、NK細胞におけるNKG2A、CD47、TGFBR2およびCISHの破壊によって確かめた。そのNK細胞は、<sup>51</sup>Cr放出アッセイによって測定したとき、K562細胞に対して抗腫瘍細胞傷害性の増大を示した（図4A）。さらに、組換えTGF-Bによる処置（50ng/ml）の30分後に、pSMA活性をフローサイトメトリーによって測定した（図4B）。NK細胞は、サイトカインで刺激されるかまたは標的を認識すると、CD16およびCD62Lの発現を失うこと（図5）、およびNK細胞においてADAM17をノックアウトすると、CD16およびCD62Lのシェディングが阻止され（図6）、K562標的に対するADC効率が改善されること（図7）も観察された。

【0259】

さらなる研究は、NK細胞においてSHP1を破壊すると、抗腫瘍効果が高まることを示した（図9および10）。NK細胞を、K562/Raji細胞と1:1の比で4時間共培養した。インキュベーションの後、それらの細胞をアネキシンVで染色し、生細胞および死細胞を解析した。K562細胞は、NK細胞の殺滅に対して感受性であり、Raji細胞は、NK細胞の殺滅に対して抵抗性である。さらに、NK-CAR細胞においてNKG2Aを破壊すると、Raji標的に対する抗腫瘍効果が高まった（図12）。

【0260】

10

20

30

40

50

本アプローチを、さらなる遺伝子セット、つまり、TIGIT、CD96、CISHおよびアデノシン、ならびにNKG2A、CISH、TGFBR1Iおよびアデノシンを用いてさらに検証した。NK細胞の機能をフローサイトメトリー測定によって評価したところ、標的細胞株で刺激すると、それらの細胞においてTNF、IFN およびCD107aの増加が観察された(図13~14)。

#### 【0261】

したがって、本方法は、免疫細胞において複数の遺伝子の発現を同時に妨害して、その免疫細胞の機能を高めるために用いることができる。

#### 実施例2-方法

##### 【0262】

sgRNA-Cas9のプレ複合体化およびエレクトロポレーション：近接領域にまたがる1つまたは2つのsgRNAを各遺伝子に対してデザインし、使用した。1ugのcas9(PNA Bio)および500ngのsgRNA(全sgRNAの合計)の反応物を各遺伝子に対して作製し、氷上で20分間インキュベートした。20分後、250,000個のNK細胞を、T-緩衝液\*(Neon Electroporation Kit, Invitrogen)に添付されているもの、RNP複合体および細胞を含む総体積は14ulであるべきである)に再懸濁し、Neon Transfection Systemを用いて10ulのエレクトロポレーションチップでエレクトロポレーションした。NK細胞に対するエレクトロポレーション条件は、1600V、10msおよび3パルス\*である。次いで、それらの細胞を、APC(1NK:2APC)、SCGM培地(優先的には抗生物質不含)、200IU/mlのIL2を含む培養プレートに加え、37恒温器において回復させた。

##### 【0263】

crRNAのプレ複合体化およびエレクトロポレーション：crRNAとtracrRNAとの二重鎖をピペットおよび遠心機を用いて混合した。その混合物をサーモサイクラーにおいて95°で5分間インキュベートし、次いで、卓上で室温に冷却した。

##### 【0264】

##### 【表3】

表3. crRNAとtracrRNAとの二重鎖

	体積	濃度		体積	濃度
crRNA#1	2.2ul	100uM	crRNA#2	2.2ul	100uM
tracrRNA	2.2ul	100uM	tracrRNA	2.2ul	100uM
IDTE緩衝液	5.6ul		IDTE緩衝液	5.6ul	
総体積	10ul	44uM	総体積	10ul	44uM

crRNAおよびtracrRNAの出発濃度は、100uMである。それらを等モル濃度で混合した後の最終濃度は、44uMである。

##### 【0265】

##### 【表4】

表4.Cas9スクリアーゼ<sup>®</sup>

	体積
Alt-R S.p.Cas9スクリアーゼ <sup>®</sup> 3NLS(61uM)	3ul
T緩衝液	7ul
総体積	10ul
最終濃度	18uM

10

20

30

40

50

## 【0266】

## 【表5】

表5.crRNA:tracrRNA と Cas9 ヌクレアーゼ ミックスとの組み合わせ

	体積
crRNA#1:tracrRNA 二重鎖 (工程 1)	2ul
Cas9(工程 2)	2ul
総体積	4ul

10

## 【0267】

c r R N A : t r a c r R N A 二重鎖を、ピペットを用いて C a s 9 ヌクレアーゼ ミックスと合わせ、室温で 15 分間インキュベートした。次いで、その混合物を c r R N A と合わせた。

## 【0268】

## 【表6】

表6.crRNA#1 および crRNA#2

	体積
crRNA#1+tracrRNA+cas9(工程 3)	2.25ul
crRNA#2+tracrRNA+cas9(工程 3)	2.25ul
総体積	4.5ul

20

## 【0269】

まず、 A P C ( 1 N K : 2 A P C ) 、 S C G M 培地 ( 好ましくは抗生物質不含 ) および 2 0 0 I U / m L の I L - 2 を含む培養プレートを調製することによって、エレクトロポレーションを行った。 1 ウェルあたり 2 5 0 , 0 0 0 個の細胞の調製物を、使用の直前に、 7 . 5 u l の T 緩衝液に再懸濁した。エレクトロポレーション条件は、 1 6 0 0 V 、 1 0 m s および 3 パルス \* であった。次いで、それらの細胞を培養プレートに加え、 3 7 恒温器において回復させた。

30

## 【0270】

N K 細胞の拡大 : M i l t e n y i の N K 細胞単離キット ( 1 3 0 - 0 9 2 - 6 5 7 ) を用いて臍帯血または末梢血から N K 細胞を単離する。 N K 細胞をフィーダー細胞と 1 : 2 の比 ( 1 N K 細胞 2 フィーダー細胞 ) で I L 2 ( 2 0 0 I U / m l ) の存在下において S C G M 培地に入れる。培地を 1 日おきに I L 2 とともに交換する。 4 日目に、 N K 細胞単離キットを用いて N K 細胞を再度選択して、フィーダー細胞を除去するか、またはすべてのフィーダー細胞が死ぬまで 7 日目まで待つ。キメラ抗原レセプターを形質導入するか、または C R I S P R - C a s 9 に対するエレクトロポレーションを行う。

40

## 【0271】

本明細書中に開示および特許請求される方法のすべてが、本開示に鑑みて、過度の実験を行うことなく実施および実行され得る。本発明の組成物および方法を好ましい実施形態の点から説明してきたが、本発明の概念、趣旨および範囲から逸脱することなく、本明細書中に記載された方法および方法の工程または工程の順序に変更が適用されてもよいことが当業者には明らかだろう。より詳細には、同じまたは類似の結果が達成される限り、化学的かつ生理的に関係するある特定の作用物質を本明細書中に記載される作用物質の代わりに用いてもよいことが明らかだろう。当業者に明らかにそのような類似の代替物および改变のすべてが、添付の請求項によって定義される本発明の趣旨、範囲および概念の範囲

50

内であるとみなされる。

#### 文献

以下の参考文献は、それらが本明細書に記載されたものを補足する例示的な手順または他の詳細を提供する範囲で、参照により本明細書に具体的に組み込まれる。

Austin-Ward and Villaseca, *Revista Medica de Chile*, 126(7):838-845, 1998.  
Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994.

Bennekov et al., *Mt. Sinai J. Med.* 71 (2): 86-93, 2004.

Bukowski et al., *Clinical Cancer Res.*, 4(10):2337-2347, 1998.

Camacho et al. *J Clin Oncology* 22(145): Abstract No. 2505 (antibody CP-675 10 206), 2004.

Campbell, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 298: 23-57, 2006.

Chothia et al., *EMBO J.* 7:3745, 1988.

Christodoulides et al., *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-3037, 1998.

Cohen et al. *J Immunol.* 175:5799-5808, 2005.

Davidson et al., *J. Immunother.*, 21(5):389-398, 1998.

Davila et al. *PLoS ONE* 8(4): e61338, 2013.

Doulatov et al., *Cell Stem Cell.* 10:120-36, 2012.

European patent application number EP2537416

Fedorov et al., *Sci. Transl. Medicine*, 5(215), 2013. 20

Frolet et al., *BMC Microbiol.* 10:190 (2010).

Gaj et al., *Trends in Biotechnology* 31(7), 397-405, 2013.

Hanibuchi et al., *Int. J. Cancer*, 78(4):480-485, 1998.

Heemskerk et al. *Hum Gene Ther.* 19:496-510, 2008.

Hellstrand et al., *Acta Oncologica*, 37(4):347-353, 1998.

Hollander, *Front. Immun.*, 3:3, 2012.

Hubert et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 14523-28, 1999.

Hui and Hashimoto, *Infection Immun.*, 66(11):5329-5336, 1998.

Hurwitz et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(17): 10067-10071, 1998.

International Patent Publication No. WO 00/37504 30

International Patent Publication No. WO 01/14424

International Patent Publication No. WO 2007/069666

International Patent Publication No. WO 2007/069666

International Patent Publication No. WO 98/42752

International Patent Publication No. WO/2014055668

International Patent Publication No. WO1995001994

International Patent Publication No. WO1998042752

International Patent Publication No. WO2000037504

International Patent Publication No. WO200014257

International Patent Publication No. WO2001014424 40

International Patent Publication No. WO2006/121168

International Patent Publication No. WO2007/103009

International Patent Publication No. WO2009/101611

International Patent Publication No. WO2009/114335

International Patent Publication No. WO2010/027827

International Patent Publication No. WO2011/066342

International Patent Publication No. WO2012/129514

International Patent Publication No. WO2013/071154

International Patent Publication No. WO2013/123061

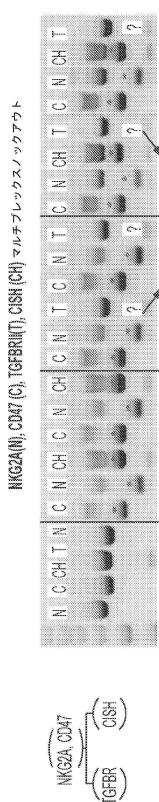
International Patent Publication No. WO2013/166321 50

- International Patent Publication No. WO2013126726  
International Patent Publication No. WO2014/055668  
International Patent Publication No. WO2014031687  
International Patent Publication No. WO2015016718  
International Patent Publication No. WO99/40188  
Janeway et al, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 433, 1997.  
Johnson et al. *Blood* 114:535-46, 2009.  
Jores et al., *PNAS U.S.A.* 87:9138, 1990.  
Kim et al., *Nature Biotechnology* 31, 251-258, 2013. 10  
Kirchmaier and Sugden, *J. Virol.*, 72(6):4657-4666, 1998.  
Leal, M., *Ann N Y Acad Sci* 1321, 41-54, 2014.  
Lefranc et al., *Dev. Comp. Immunol.* 27:55, 2003.  
Li et al. *Nat Biotechnol.* 23:349-354, 2005.  
Li et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4275-4279, 1992.  
Linnemann, C. et al. *Nat Med* 21, 81-85, 2015.  
Lockey et al., *Front. Biosci.* 13:5916-27, 2008.  
Loewendorf et al., *J. Intern. Med.* 267(5):483-501, 2010.  
Ludwig et al. *Nature Biotech.*, (2):185-187, 2006a.  
Ludwig et al. *Nature Methods*, 3(8):637-646, 2006b. 20  
Marschall et al., *Future Microbiol.* 4:731-42, 2009.  
Mokyr et al. *Cancer Res* 58:5301-5304, 1998.  
Notta et al., *Science*, 218-221, 2011.  
Pardoll, *Nat Rev Cancer*, 12(4): 252-64, 2012  
Parkhurst et al. *Clin Cancer Res.* 15: 169-180, 2009.  
Qin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24):14411-14416, 1998.  
Rieder et al., *J. Interferon Cytokine Res.* (9):499-509, 2009.  
Rykman, et al., *J. Virol.* 80(2):710-22, 2006.  
Sadelain et al., *Cancer Discov.* 3(4): 388-398, 2013.  
Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001. 30  
Shah et al., *PLoS One*, 8:e776781, 2013.  
Singh et al., *Cancer Research*, 68:2961-2971, 2008.  
Singh et al., *Cancer Research*, 71:3516-3527, 2011.  
Takahashi et al., *Cell*, 126(4):663-76, 2007.  
Terakura et al. *Blood*. 1:72- 82, 2012.  
Turtle et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 24(5): 633-39, 2012.  
U.S. Patent No. 4,870,287  
U.S. Patent No. 5,739,169  
U.S. Patent No. 5,760,395 40  
U.S. Patent No. 5,801,005  
U.S. Patent No. 5,824,311  
U.S. Patent No. 5,830,880  
U.S. Patent No. 5,844,905  
U.S. Patent No. 5,846,945  
U.S. Patent No. 5,885,796  
U.S. Patent No. 5,994,136  
U.S. Patent No. 6,013,516  
U.S. Patent No. 6,103,470  
U.S. Patent No. 6,207,156 50

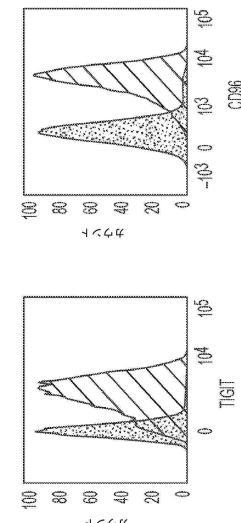
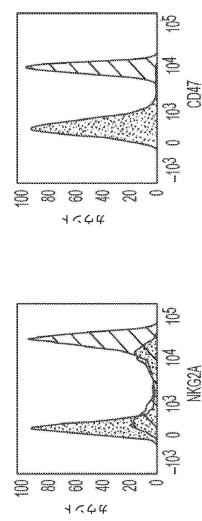
U.S. Patent No. 6,225,042	
U.S. Patent No. 6,355,479	
U.S. Patent No. 6,362,001	
U.S. Patent No. 6,410,319	
U.S. Patent No. 6,416,998	
U.S. Patent No. 6,544,518	
U.S. Patent No. 6,790,662	
U.S. Patent No. 7,109,304	
U.S. Patent No. 7,442,548	
U.S. Patent No. 7,446,190	10
U.S. Patent No. 7,598,364	
U.S. Patent No. 7,989,425	
U.S. Patent No. 8,008,449	
U.S. Patent No. 8,017,114	
U.S. Patent No. 8,058,065	
U.S. Patent No. 8,071,369	
U.S. Patent No. 8,119,129	
U.S. Patent No. 8,129,187	
U.S. Patent No. 8,183,038	
U.S. Patent No. 8,268,620	20
U.S. Patent No. 8,329,867	
U.S. Patent No. 8,354,509	
U.S. Patent No. 8,546,140	
U.S. Patent No. 8,691,574	
U.S. Patent No. 8,735,553	
U.S. Patent No. 8,741,648	
U.S. Patent No. 8,900,871	
U.S. Patent No. 9,175,268	
U.S. Patent Publication No. 2010/0210014	
U.S. Patent Publication No. 12/478,154	30
U.S. Patent Publication No. 2002131960	
U.S. Patent Publication No. 2003/0211603	
U.S. Patent Publication No. 2005/0260186	
U.S. Patent Publication No. 2006/0104968	
U.S. Patent Publication No. 2009/0004142	
U.S. Patent Publication No. 2009/0017000	
U.S. Patent Publication No. 2009/0246875	
U.S. Patent Publication No. 2011/0104125	
U.S. Patent Publication No. 2011/0301073	
U.S. Patent Publication No. 20110008369	40
U.S. Patent Publication No. 2012/0276636	
U.S. Patent Publication No. 2013/0315884	
U.S. Patent Publication No. 20130149337	
U.S. Patent Publication No. 2013287748	
U.S. Patent Publication No. 2014/0120622	
U.S. Patent Publication No. 2014022021	
U.S. Patent Publication No. 20140294898	
Varela-Rohena et al. Nat Med. 14: 1390-1395, 2008.	
Wang et al. J Immunother. 35(9):689-701, 2012.	
Wu et al., Adv. Cancer Res., 90: 127-56, 2003.	50

Wu et al., *Cancer*, 18(2): 160-75, 2012.  
Yamanaka et al., *Cell*, 131(5):861-72, 2007.  
Yu et al., *Science*, 318:1917-1920, 2007.  
Zysk et al., *Infect. Immun.* 68(6):3740-43, 2000.

## 【 図面 】



【図2】



10

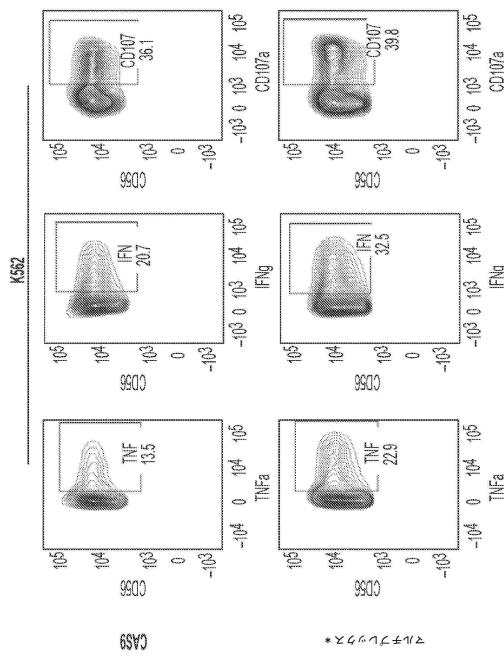
20

30

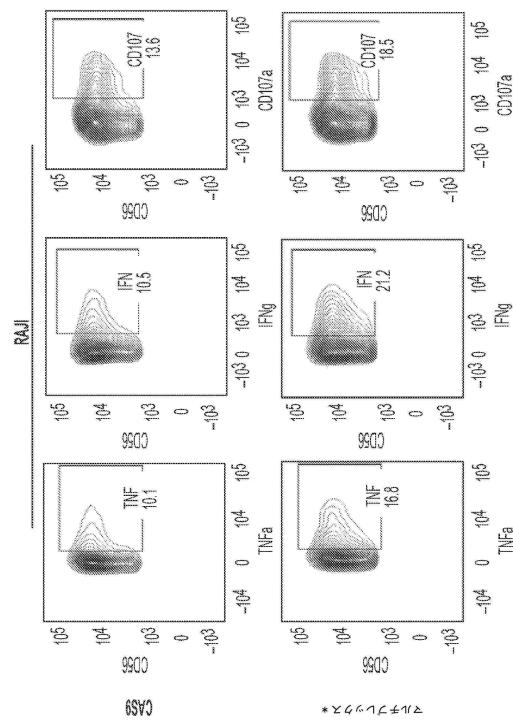
40

50

【図3-1】



【図3-2】



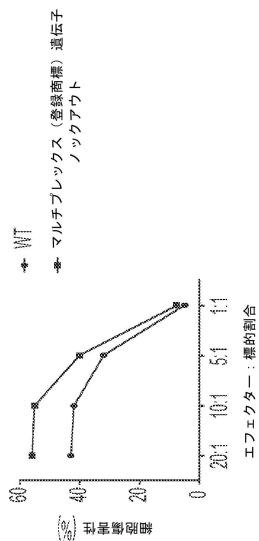
10

20

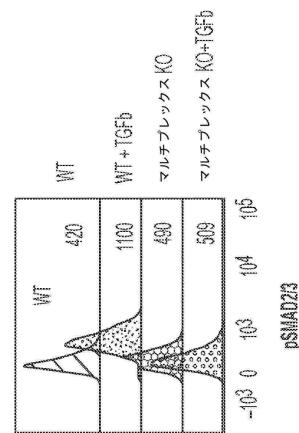
30

40

【図4 A】

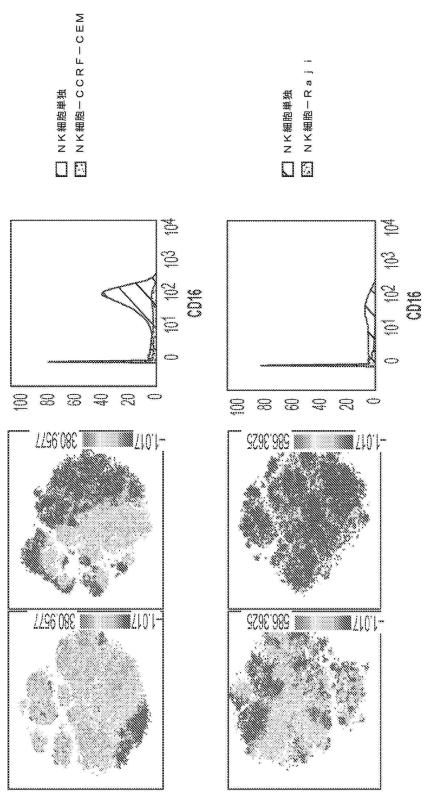


【図4 B】

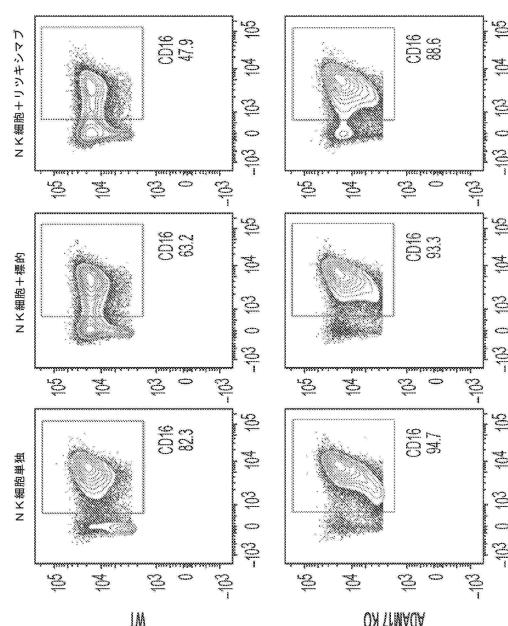


50

【図5】



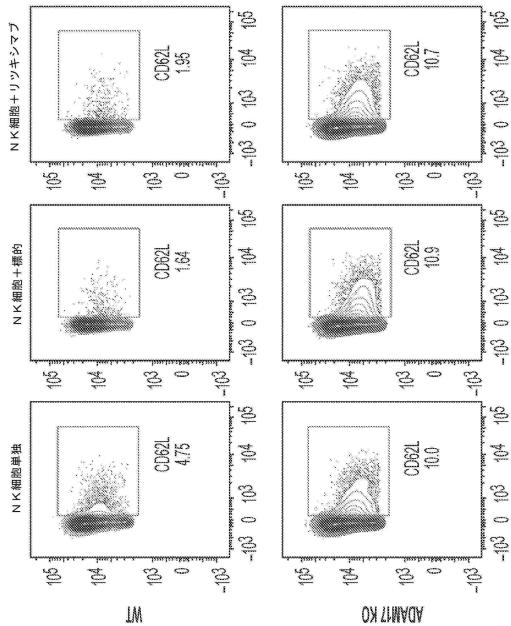
【図6-1】



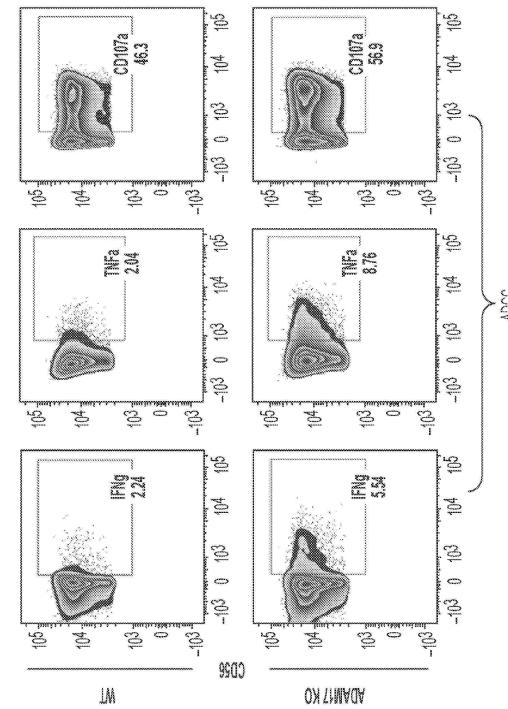
10

20

【図6-2】



【図7-1】

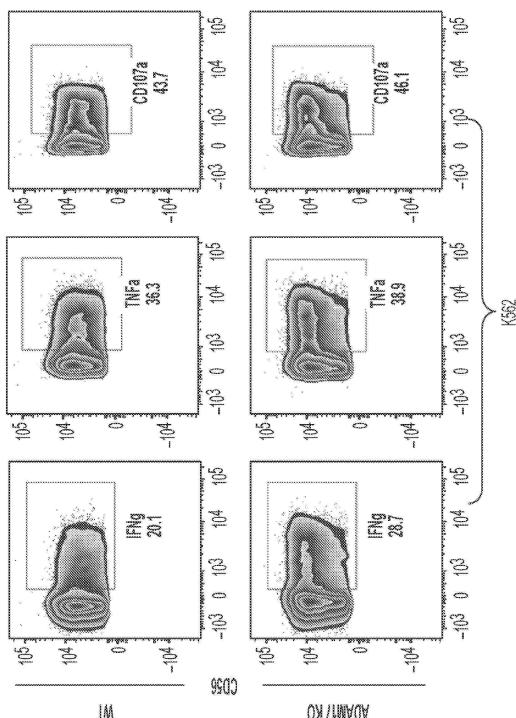


30

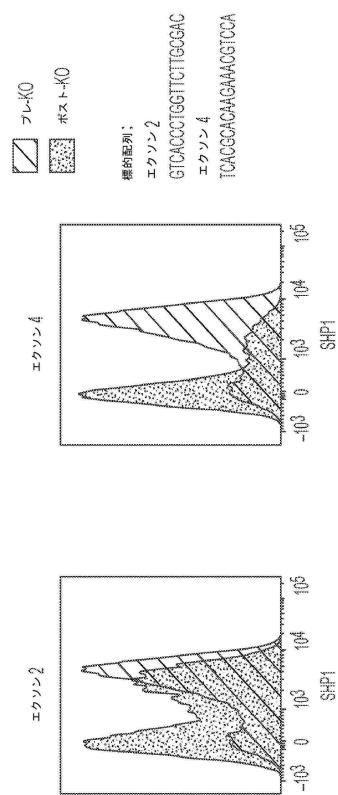
40

50

【図 7 - 2】



【図 8】



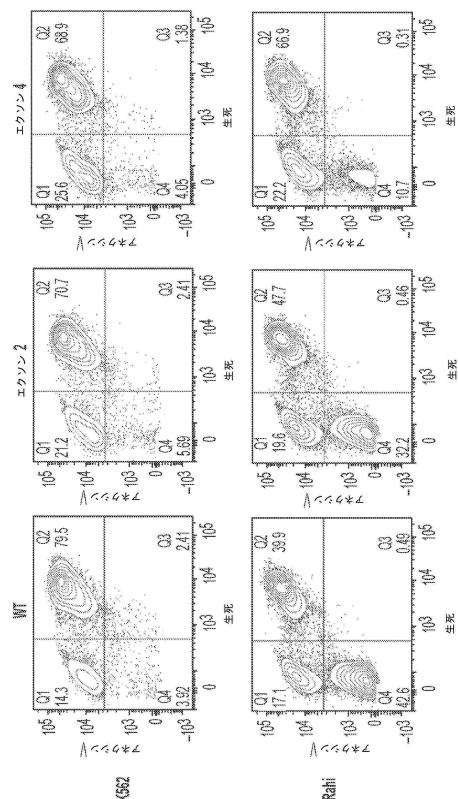
10

20

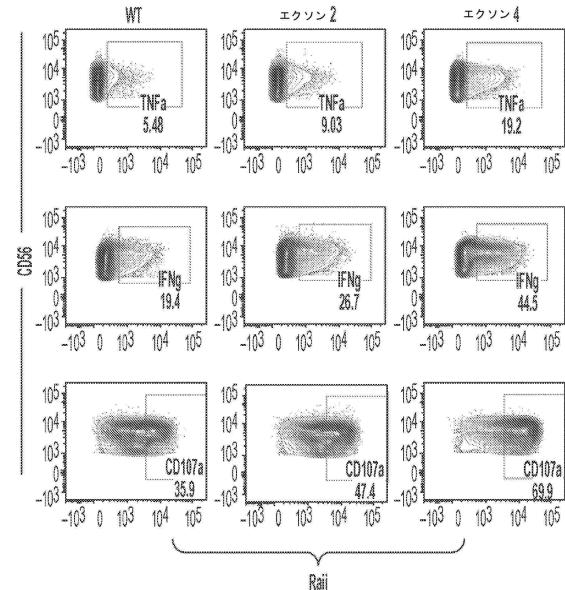
30

40

【図 9】

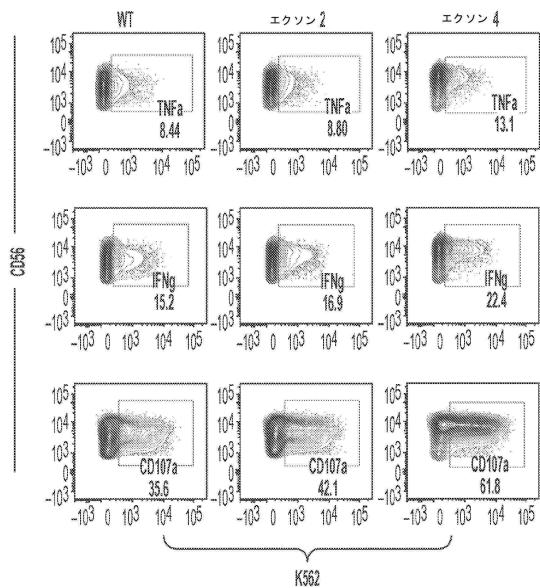


【図 10 A - 1】

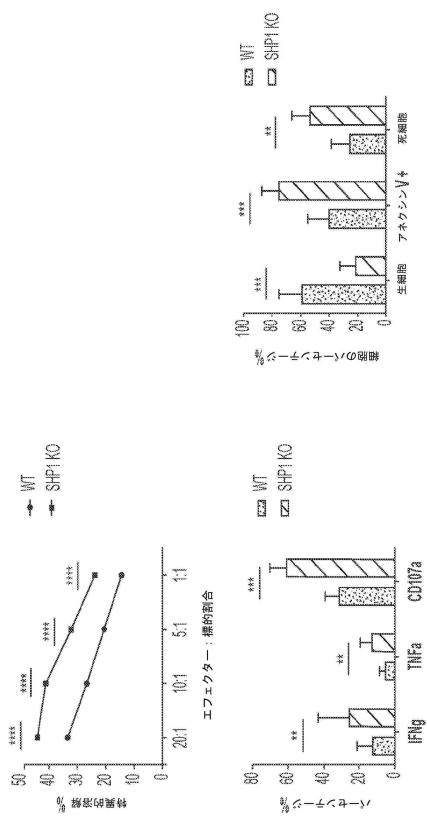


50

【図 10 A - 2】



【図 10 B】



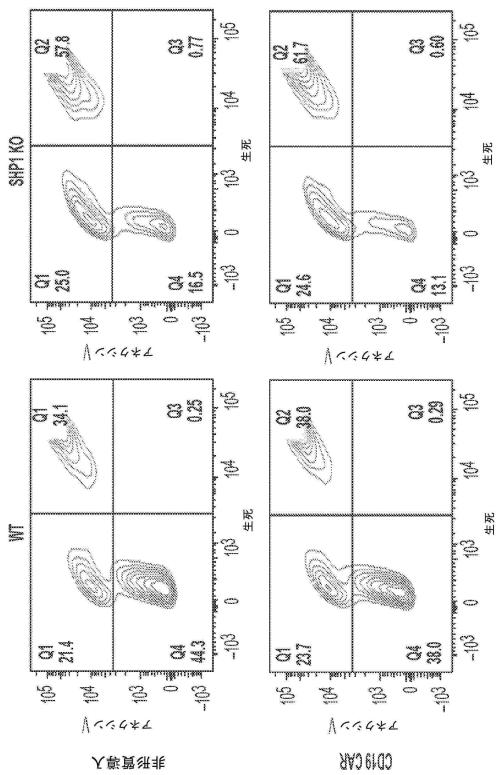
10

20

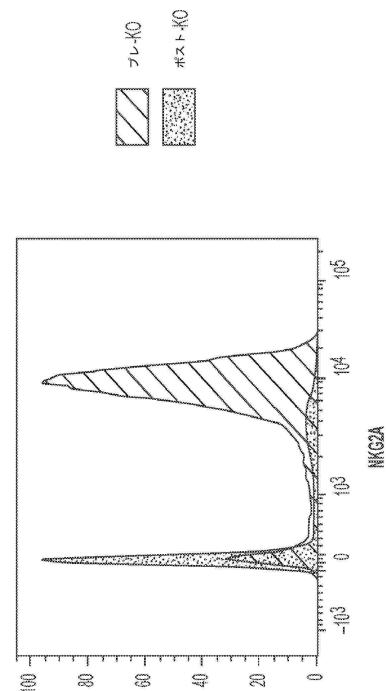
30

40

【図 11】

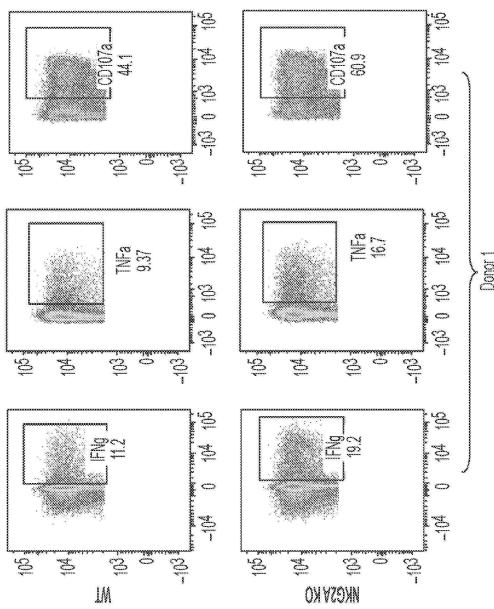


【図 12 A】

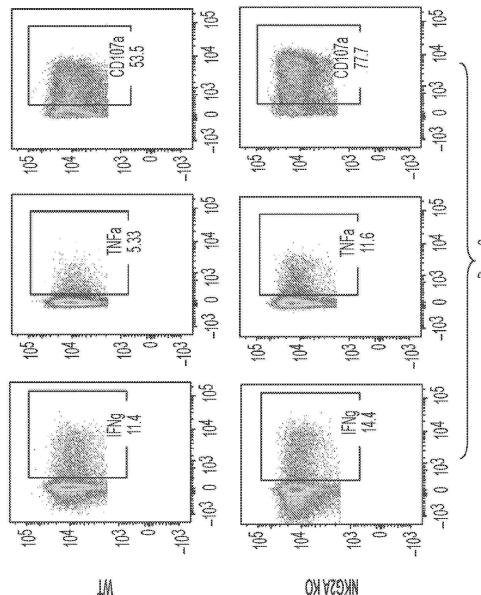


50

【図 1 2 B - 1】



【図 1 2 B - 2】



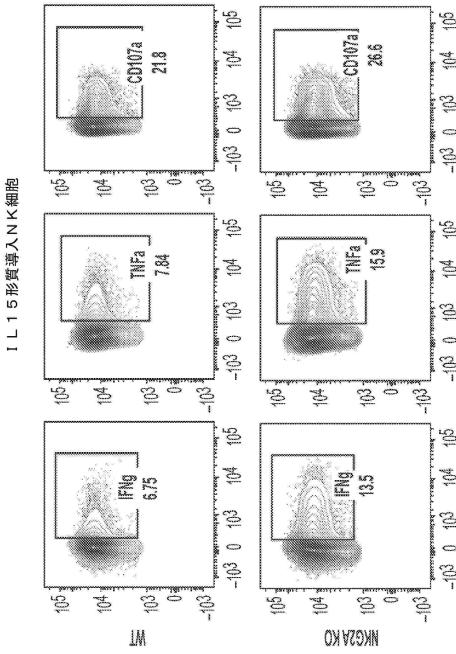
10

20

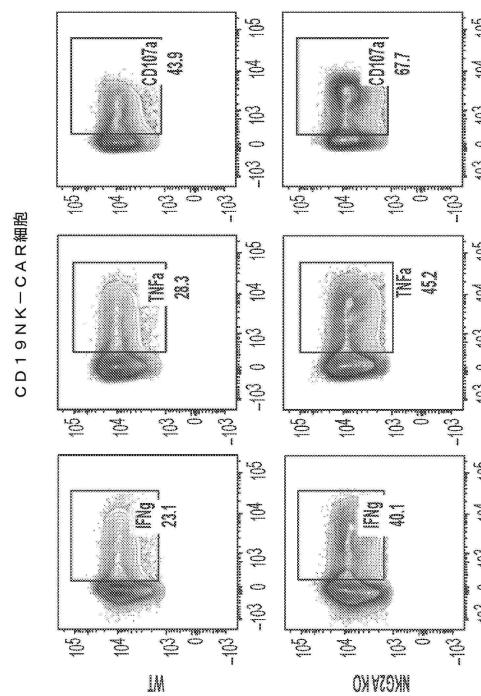
30

40

【図 1 2 C - 1】

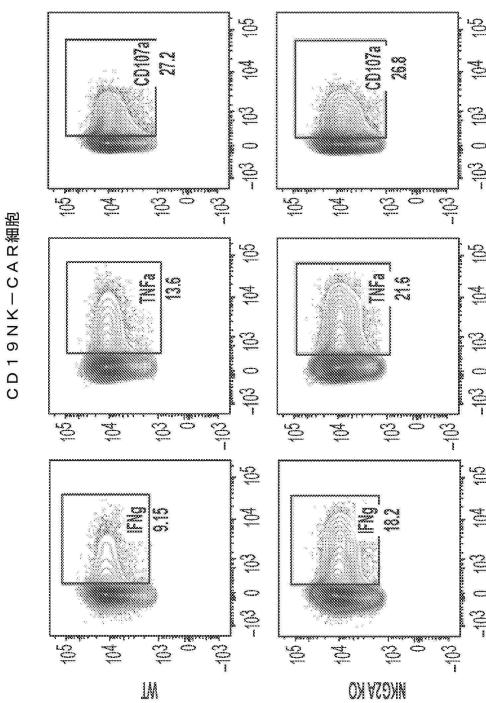


【図 1 2 C - 2】

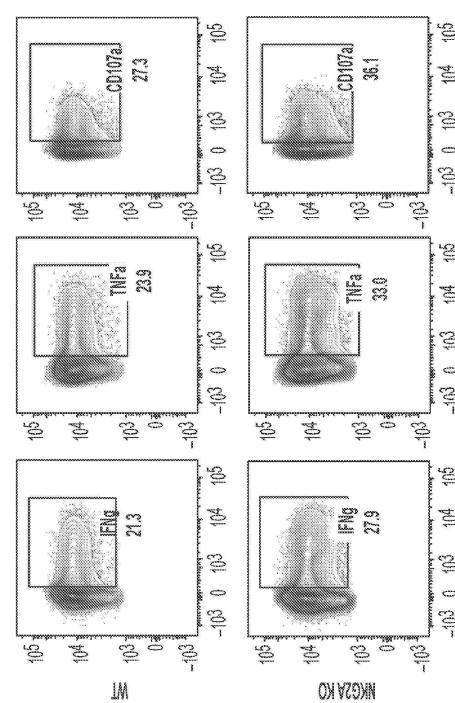


50

【図 1 2 C - 3】



【図 1 2 C - 4】



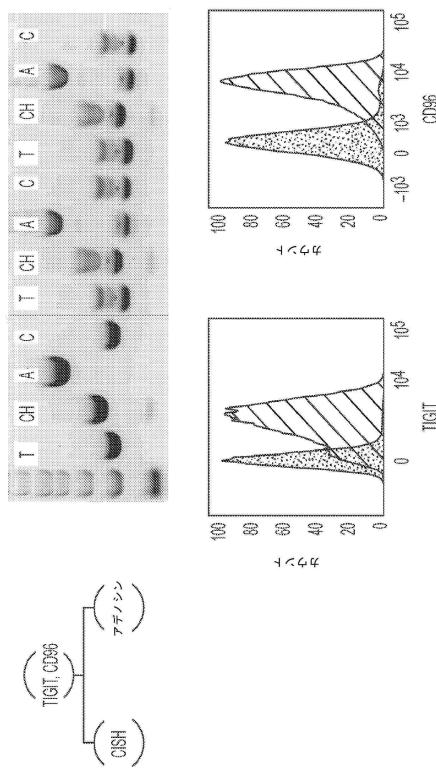
10

20

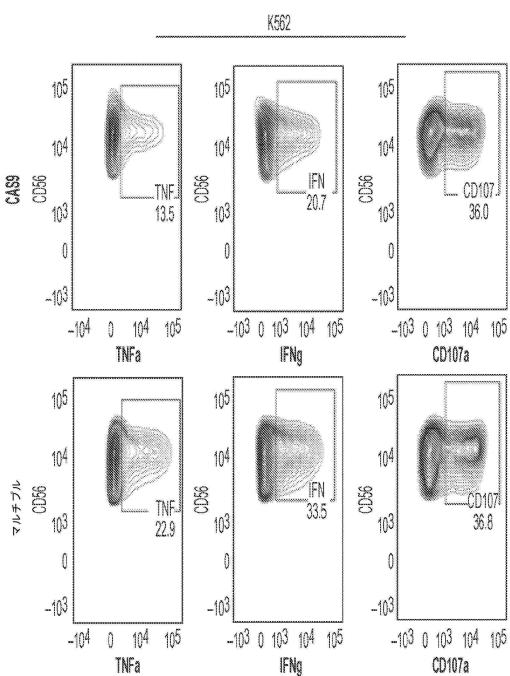
30

40

【図 1 3】

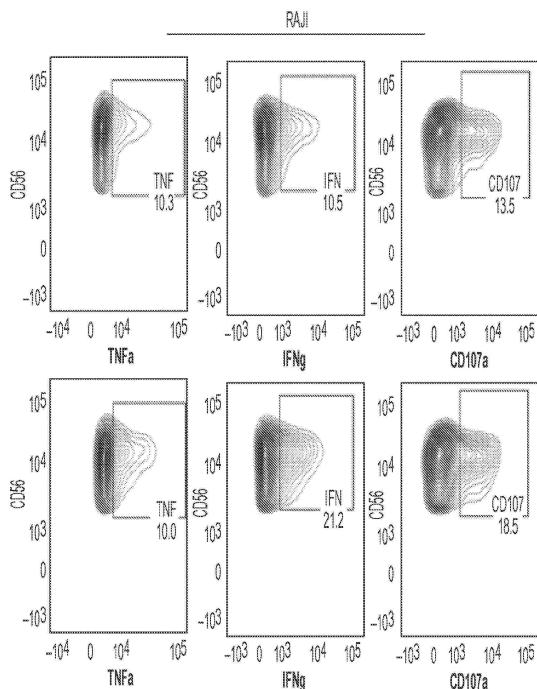


【図 1 4 - 1】

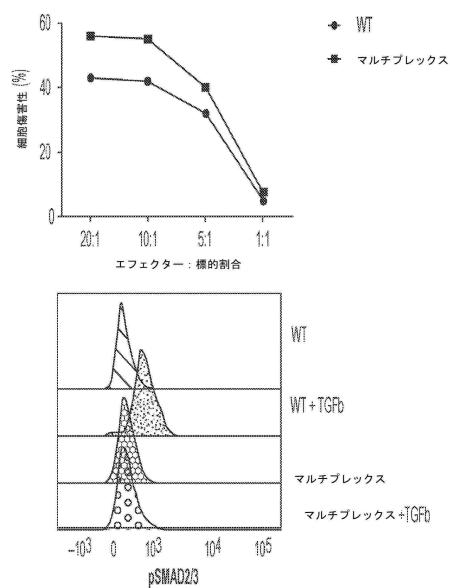


50

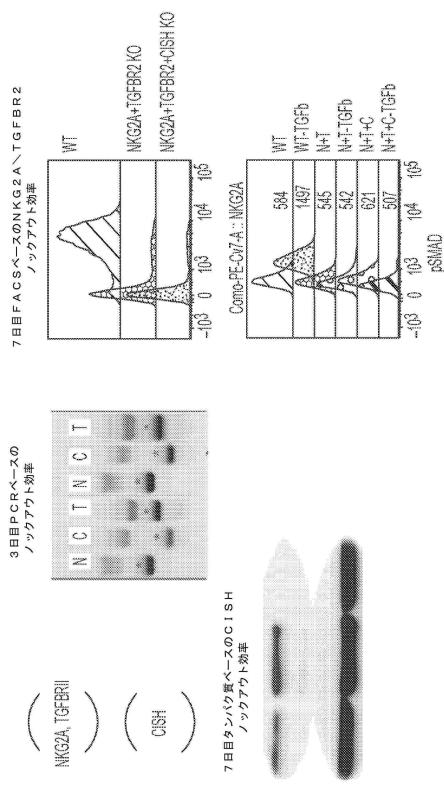
【図 1-4-2】



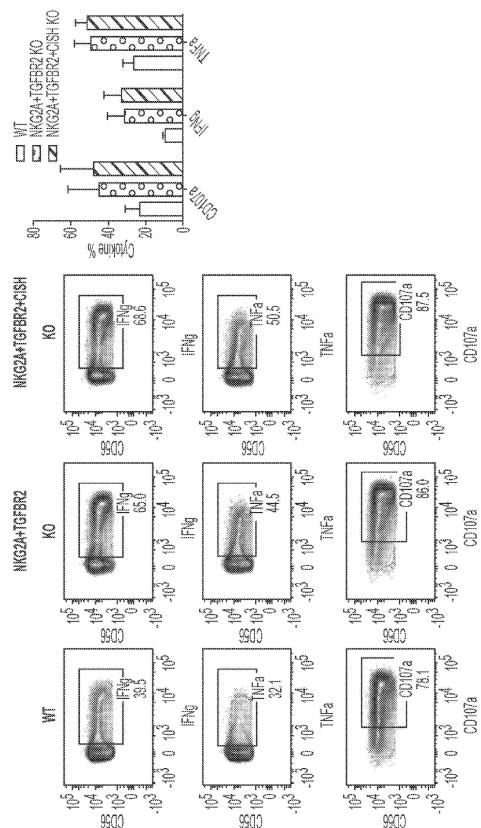
【図14-3】



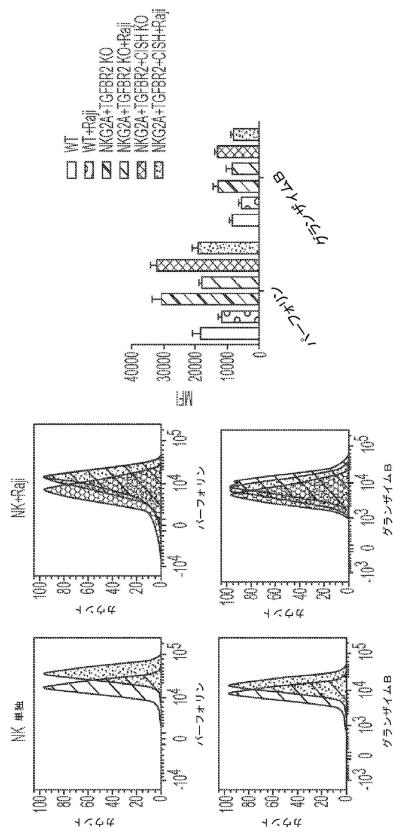
【図15】



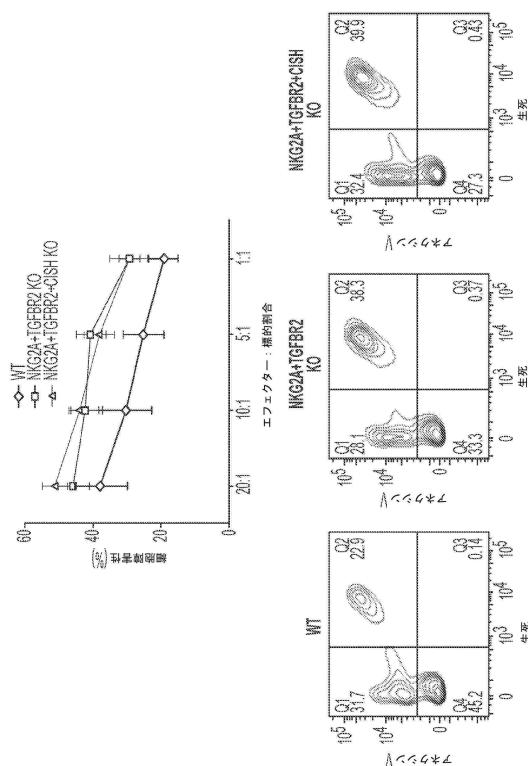
### 【図 16-1】



【図 16-2】



【図 16-3】

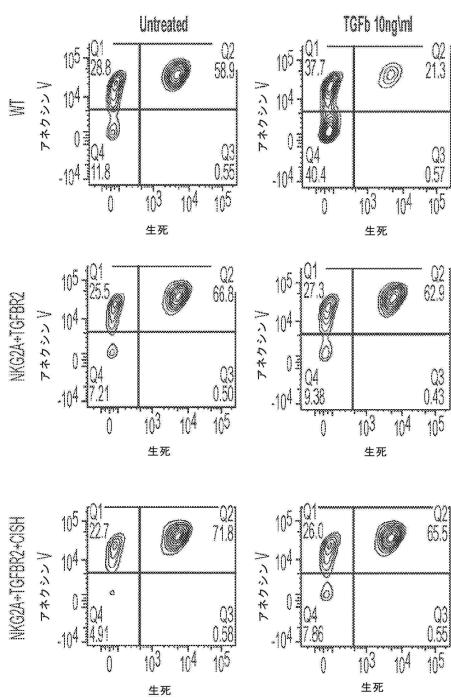


10

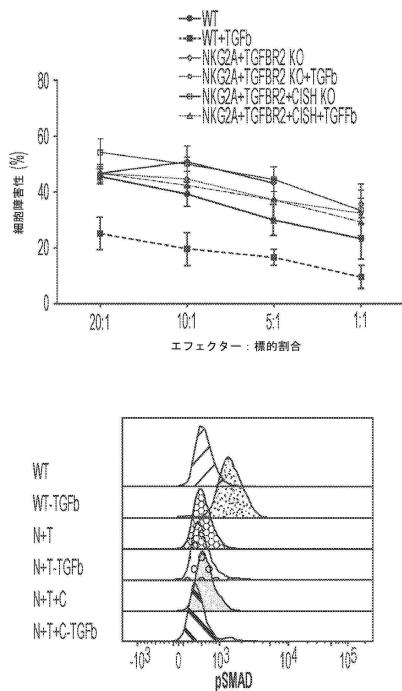
20

30

【図 17-1】



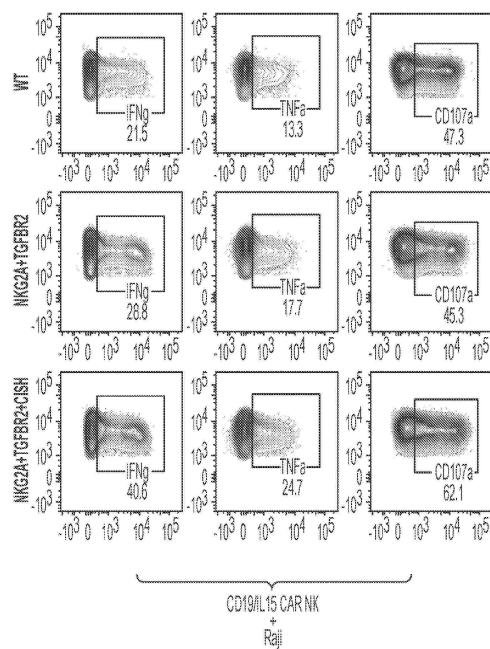
【図 17-2】



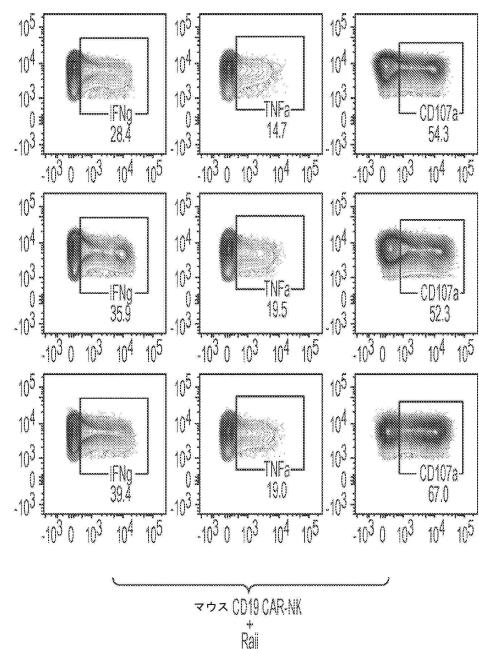
40

50

【図 18-1】



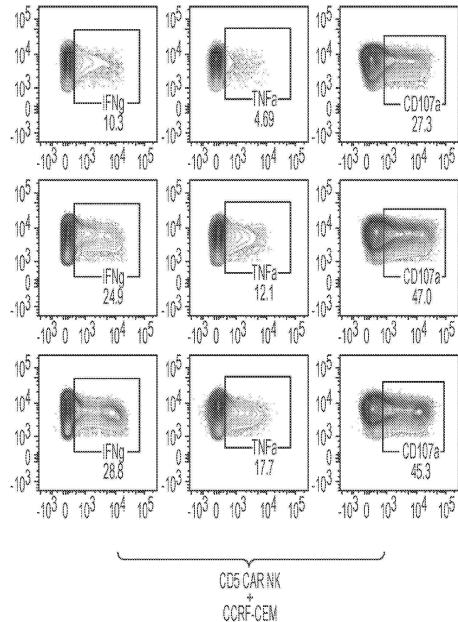
【図 18-2】



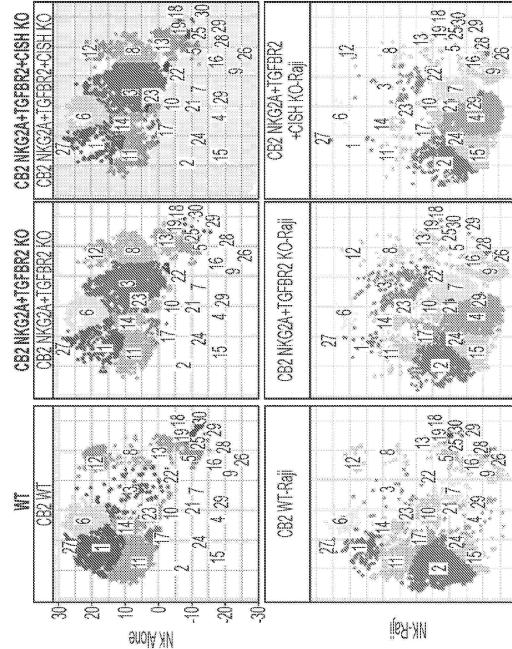
10

20

【図 18-3】



【図 19-1】

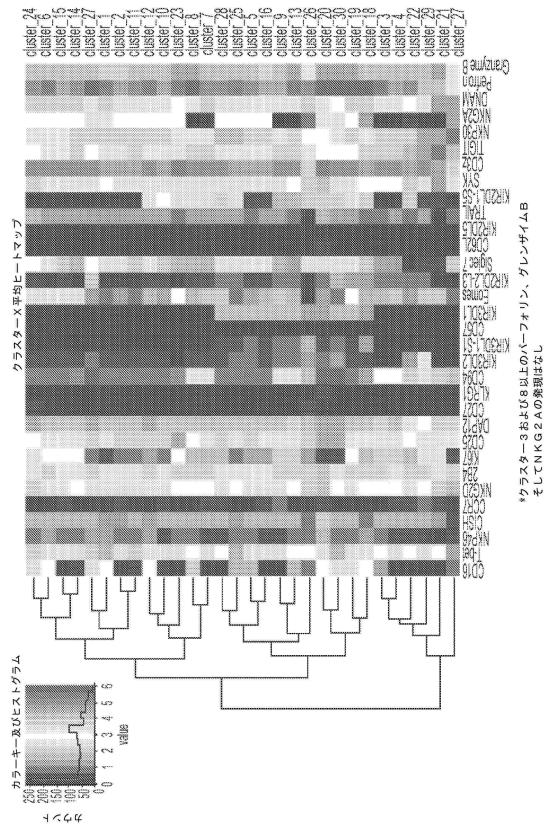


30

40

50

【図19-2】



10

【配列表】

0007672702000001.app

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

		F I		
C 1 2 N	15/867 (2006.01)	C 1 2 N	15/867	Z
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	31/00 (2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 K	35/17 (2025.01)	A 6 1 K	35/17	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	40/15 (2025.01)	A 6 1 K	40/15	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z Z N A
C 1 2 N	15/55 (2006.01)	C 1 2 N	15/55	
C 1 2 N	15/31 (2006.01)	C 1 2 N	15/31	
C 1 2 N	5/0781(2010.01)	C 1 2 N	5/0781	
C 1 2 N	5/0789(2010.01)	C 1 2 N	5/0789	
C 0 7 K	14/725 (2006.01)	C 0 7 K	14/725	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	5/0775(2010.01)	C 1 2 N	5/0775	

アメリカ合衆国 テキサス州 77030、ヒューストン、ホルコム ブールバード 1515 ユニット#0065、ユー.ティー.エム.ディー.アンダーソン キャンサー センター、ステム セル トランスプランテイション アンド セル セラピー内

## (72)発明者 シュポール、エリザベス

アメリカ合衆国 テキサス州 77030、ヒューストン、ホルコム ブールバード 1515 ユニット#0065、ユー.ティー.エム.ディー.アンダーソン キャンサー センター、ステム セル トランスプランテイション アンド セル セラピー内

## (72)発明者 レズヴァニア、ケイティ

アメリカ合衆国 テキサス州 77030、ヒューストン、ホルコム ブールバード 1515 ユニット#0065、ユー.ティー.エム.ディー.アンダーソン キャンサー センター、ステム セル トランスプランテイション アンド セル セラピー内

## 審査官 植原 克典

## (56)参考文献 特表2016-524464 (JP, A)

国際公開第2018/068135 (WO, A1)

特表2015-531242 (JP, A)

## (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )