

(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)

(86)(22)出願日 令和1年11月27日(2019.11.27)

(65)公表番号 特表2022-513652(P2022-513652
A)

(43)公表日 令和4年2月9日(2022.2.9)

(86)国際出願番号 PCT/US2019/063641

(87)国際公開番号 WO2020/113029

(87)国際公開日 令和2年6月4日(2020.6.4)

審査請求日 令和4年11月11日(2022.11.11)

(31)優先権主張番号 62/772,406

(32)優先日 平成30年11月28日(2018.11.28)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

前置審査

(73)特許権者 500039463

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
BOARD OF REGENTS, TH
E UNIVERSITY OF TEX
AS SYSTEMアメリカ合衆国 7 8 7 0 1 テキサス州
, オースティン, ウェスト 7 番 ストリ
ート 2 1 0
2 1 0 West 7th Street
Austin, Texas 7 8 7 0 1
U . S . A .

(74)代理人 110000729

弁理士法人ユニアス国際特許事務所

(72)発明者 バサール、ラフェット

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プ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

(a a) 前記2つの遺伝子は、

(a) NK G 2 AおよびC I S H、(b) NK G 2 AおよびT G F B R I I、(c) C I S HおよびT G F B R I I、(j) C I S HおよびT I G I T、(q) C D 4 7およびC I S H、(r) C D 4 7およびT G F B R I I、(u) C D 4 7およびT I G I T、(y) A D A M 1 7およびC I S H、(z) T G F B R I IおよびA D A M 1 7、(b 1) S H P 1およびC I S H、(c 1) C I S HおよびT G F B R I I、(d 1) S H P 1およびT G F B R I I、ならびに(e 1) S H P 1およびT I G I Tからなる群より選択され、又は

(b b) 前記3つの遺伝子は、NK G 2 A、C I S H、T G F B R I I、T I G I T、C D 9 6、C D 4 7、S H P 1、及びA D A M 1 7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)TGFBRII、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ガイドエンドヌクラ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ガイドエンドヌクラーゼが、Cas9である、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記RNAガイドエンドヌクラーゼを導入する工程が、前記RNAガイドエンドヌクラ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:

(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】

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:

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

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)TGFBRII、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。

10

20

30

40

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TGFBRII、(3) TGFBRII、CD96、およびTIGIT、(4) TGFBRII、CISH、およびTIGIT、(5) TIM3、CISH、およびTGFBRII、(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。

10

【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、骨髓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。

20

【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。

30

【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。

40

【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、TGFBRIIおよびCISH; NKG2A、TGFBRIIおよびCISH; 又はADAM17、TGFBRII NKG2AおよびSHP1を破壊する工程

を含む、方法。

【請求項 23】

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、インビボ増殖、インビボ持続性および／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- γ 、CD107および／またはTNF α 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

(aa) 前記2つの遺伝子は、

(a) NKG2AおよびCISH、(b) NKG2AおよびTGFBRII、(c) CISHおよびTGFBRII、(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からなる群より選択され、又は

(bb) 前記3つの遺伝子は、NKG2A、CISH、TGFBRII、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、骨髓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、TGFBRIIおよびCISH又は；前記NK細胞のNKG2A、TGFBRIIおよびCISH；又は前記NK細胞のADAM17、TGFBRII、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、インビボ増殖、インビボ持続性および／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- γ 、CD107および／またはTNF α 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、TGFBRII、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、CRISPR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。

10

【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、銅鎖、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。

20

【請求項39】

前記CARが、CD3、CD28、OX40/CD134、4-1BB/CD137、FcRI、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。

30

【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、

40

(a) NKG2AおよびCISH、(b) NKG2AおよびTGFBRII、(c) CISHおよびTGFBRII、(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、(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、TGFBRII、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。

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。

【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。

【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 細胞が、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】

【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 62 / 772 , 406 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、免疫細胞のマルチプ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。

【発明の概要】

10

20

30

40

50

【 0 0 0 4 】

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。

【 0 0 0 5 】

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、NK 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、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。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。

【 0 0 0 6 】

上記方法は、例えば以下のような特定の遺伝子の組み合わせ：(a) NK G 2 AおよびC I S H、(b) NK G 2 AおよびT G F B R I I、(c) C I S HおよびT G F B R I I、(d) T I G I TおよびF O X O 1、(e) T I G I TおよびT G F B R I I、(f) C D 9 6およびF O X O 1、(g) C D 9 6およびT G F B R I I、(h) F O X O 1およびT G F B R I I、(i) C D 9 6およびT I G I T、(j) C I S HおよびT I G I T、(k) T I M 3およびC I S H、(l) T I M 3およびT G F B R I I、(m) F O X O 1およびT G F B R I I、(n) T I M 3およびT I G I T、(o) S I G L E C 7およびC I S H、(p) S I G L E C 7およびT G F B R I I、(q) C D 4 7およびC I S H、(r) C D 4 7およびT G F B R I I、(s) S I R P AおよびC I S H、(t) S I R P AおよびT G F B R I I、(u) C D 4 7およびT I G I T、(v) C D 4 7およびS I R P A、(w) A 2 A RおよびC I S H、(x) A 2 A RおよびT G F B R I I、(y) A D A M 1 7およびC I S H、(z) T G F B R I IおよびA D A M 1 7、(a) A 2 A RおよびT I G I T、(b) S H P 1およびC I S H、(c) C I S HおよびT G F B R I I、(d) S H P 1およびT G F B R I I、(e) S H P 1およびT I G I T、または(f) S H P 1およびT I M 3のノックダウンを含み得る。上記方法は、(1) NK G 2 A、C I S HおよびT G F B R I I、(2) T I G I T、F O X O 1およびT G F B R I I、(3) T G F B R I I、C D 9 6およびT I G I T、(4) T G F B R 2、C I S HおよびT I G I T、(5) T I M 3、C I S HおよびT G F B R I I、(6) C D 9 6、F O X O 1およびT G F B R I I、(7) T G F B R I I、T I M 3およびT I G I T、(8) S I G L E C 7、C I S HおよびT G F B R I I、(9) C D 4 7、C I S HおよびT G F B R I I、(10) S I R P A、C I S HおよびT G F B R I I、(11) T G F B R I I、C D 4 7およびT I G I T、(12) T G F B R I I、C D 4 7およびS I R P A、(13) A 2 A R、C I S HおよびT G F B R I I、(14) T G F B R I I、C I S HおよびA D A M 1 7、(15) T G F B R I I、T I M 3およびT I G I T、(16) T G F B R I I、A 2 A RおよびT I G I T、(17) S H P 1、C I S HおよびT G F B R I I、(18) T G F B R I I、C I S HおよびS H P 1、(19) T G F B R I I、S H P 1およびT I G I T、または(20) T G F B R I I、S H P 1およびT I M 3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 ~ j 1のいずれか1つが、他のサブグループa ~ j 1のうちのいずれか1つ以上と組み合わせられ得

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 つ以上と組み合わせられ得るか、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 つ以上と組み合わせられ得る。

【 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 RNA 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。RNA ガイドエンドヌクレアーゼの導入は、RNA ガイドエンドヌクレアーゼをコードする核酸（例えば、mRNA）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、NK細胞、B細胞、マクロファージ、NK 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、CAR 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（CAR）および / または 1 つ以上の 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⁺ T細胞、CD4⁺ 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、骨髓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。

【 0 0 0 9 】

いくつかの態様において、導入工程は、トランスフ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 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。具体的な場合において、第 1 の群の CRISPR gRNA は、第 2 の群の CRISPR gRNA 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 CRISPR gRNA は、1 つ、2 つ、3 つまたは 4 つ以上の CRISPR gRNA を含む。いくつかの態様において、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、異なる 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。具体的な実施形態では、ある群の CRISPR gRNA が、ある群の gRNA 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 gRNA はそれぞれ、異なる遺伝子を標的化する。

【 0 0 1 0 】

特定の態様において、上記方法は、NK G2A、CD47、TGFR2 および CISH；NK G2A、CISH、TGFR2 および ADORA2；NK G2A、TGFR2 および CISH；TIGIT、CD96、CISH および ADORA2；または ADAM17、TGFR2、NK G2A および SHP1 を破壊する工程を含む。

【 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、インビボ増殖、インビボ持続性および / 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、IFN- γ 、CD107 および / または TNF 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、CAR および / または TCR を免疫細胞に導入する工程（例えば、CAR および / または TCR 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、AAV6 などの

10

20

30

40

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、SIGLEC-7、LAG3、TIM3、CISH、FOXO1、TGFB2、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。

10

【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、SIGLEC-7、LAG3、TIM3、CISH、FOXO1、TGFB2、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。

20

【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⁺T細胞、CD4⁺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、臍帯血または骨髓から単離され得る。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。

30

【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、TGFR2およびCISH；NKG2A、CISH、TGFR2およびADORA2；NKG2A、TGFR2およびCISH；TIGIT、CD96、CISHおよびADORA2；またはADAM17、TGFR2、NKG2AおよびSHIP1）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、インビボ増殖、インビボ持続性および/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- γ 、CD107および/またはTNF α 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。

40

【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、SIGLEC-7、LAG3、TIM3、CISH、FOXO1、TGFB2、TIGIT、CD96、ADORA2、NR

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
10
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、銅鎖、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
20
- 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 -
30
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。
40

【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
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。

【 0 0 2 2 】

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

【 0 0 2 3 】

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。

【 0 0 2 4 】

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、TGFB2、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

30

【 0 0 2 5 】

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、FcRI、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

40

50

ファ変異体)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、固形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】

20

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。

【0030】

30

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。

【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まれる。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】

40

【図1】CRISPR/Cas9は、NK細胞において複数の遺伝子(NKG2A、CD47、TGFB β 2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TGFB β 2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、CRISPR KOの前および後のタンパク質の発現を表している。

【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、ＣＲＩＳＰＲ ＫＯ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－、ＴＮＦ 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－、ＴＮＦ 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⁵¹Ｃｒ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－Ｂ処置（５０ｎｇ／ｍｌ）の３０分後に、ｐＳＭＡＤ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－を添加しても、ＫＯ ＣＡＲ－ＮＫ細胞においてｐＳＭＡＤ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－、ＴＮＦ 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CD96 KO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、CRISPR KO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、TGFBRII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、TGFBRII)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、KO CAR-NK細胞においてpSMAD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、TGFR2およびCISH)を破壊すると、抗腫瘍効果が高まる。

【0048】

【図17】TGFR2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、TGFR2、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

【 0 0 5 2 】

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、インピボにおける増殖および持続性ならびに細胞傷害性と相関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、NK T細胞およびiNK T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、iNK T細胞、NK T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

【 0 0 5 3 】

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

20

【 0 0 5 4 】

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、NK TまたはiNK T細胞）を作製するためのさらなる方法が提供される。

30

40

I. 定義

【 0 0 5 5 】

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。

【 0 0 5 6 】

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「an」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るまたは互いから排除して記載するために使用される。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。

10

【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。

20

【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徵、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、特定の特徵、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せられ得る。

30

【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」)。

40

【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

50

(例えば、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))に由来し得る。

【0063】

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。

【0064】

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

【0065】

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。例えば、癌の処置は、例えば、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

【0066】

「被験体」および「患者」とは、ヒトまたは非ヒト、例えば、霊長類、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。

【0067】

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

【0068】

句「薬学的にまたは薬理的に許容され得る」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(例えば、ヒト)への投与の場合、調製物は、FDA Office of Biological Standards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

【0069】

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(例えば、水、アルコール溶液/水溶液、食塩水、非経口ビヒクル、例えば、塩化ナトリウム、リンゲルデキストロースなど)、非水溶媒(例えば、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、例えば、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(例えば、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に、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。

II. 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（TGFR2）、IgおよびITIM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（PDL-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

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、遺伝子の全部または一部の欠失、例えば、1つ以上のエク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。例えば、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 DNA 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 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。

10

【 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、例えば、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、エクソンにおいて誘導される。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のエクソン、第2のエクソンまたはそれ以降のエクソンの N 末端部分の近くにおいて生じる。

20

【 0 0 7 5 】

上記免疫細胞には、ガイド RNA 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 mRNA 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 RNA が同時に導入される。例えば、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 RNA 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 RNA がさらに導入され得る。

30

【 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 (例えば、RNA 干渉 (R N A i)、低分子干渉 RNA (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 mRNA 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 RNA 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 mRNA 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 RNA 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。

40

【 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、DNA 標的化分子 (例えば、DNA 結合タンパク質または DNA 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、DNA 標的化分子は、DNA 結合ドメイン、例えば、ジンクフィンガータンパク質 (Z F P) の DNA 結合ドメイン、転写活性化因子様タンパク質 (T A L) の DNA 結合ドメインもしくは T A L エフェクター (T A L E) の DNA 結合ドメイン、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート (C R I S P R) の DNA 結合ドメイン、またはメガヌクレアーゼの DNA 結合ドメインを含む。ジンクフィンガー、T A L E およ

50

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。

【0078】

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、リボソーム送達手段、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。

【0079】

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、200IU/mL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。

【0080】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1: マルチプレックス編集または 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
TGFBR2	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)	AGGCCACATAGTGCTGCACA (gRNA1); 配列番号 1
	TGTACAGCAGTGGCTGGTGG (gRNA2); 配列番号 2
NKG2A (エキソン 4)	AACAACTATCGTTACCACAG; 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)	ACCCTGATGGGACGTACACT; 配列番号 6
CD96 (エキソン 2)	AGGCACAGTAGAAGCCGTAT; 配列番号 7
TIM3 (エキソン 2)	AGACGGGCACGAGGTTCCT; 配列番号 8
SHP1 (エキソン 4)	TCACGCACAAGAAACGTCCA; 配列番号 9
PD1 (エキソン 2)	CCCCTTCGGTCACCACGAGC; 配列番号 10
PDL1 (エキソン 3)	ATTACTGTACGTTCCCA; 配列番号 11
PDL2 (エキソン 3)	CCCCATAGATGATTATGCAT; 配列番号 12
TGFB2 (エキソン 5)	GACGGCTGAGGAGCGGAAGA (gRNA1); 配列番号 13
	TGTGGAGGTGAGCAATCCCC (gRNA2); 配列番号 14

10

20

【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。

30

【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。

40

【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す得る遺伝子の破壊、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。

10

【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（RGEN）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。

20

【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。

30

【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ヌクレオチドを改変することによって、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。

40

【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

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 Cas9 バリエーションが、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 Cas9 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。

【0091】

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鋳型は、「編集鋳型」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、外来性の鋳型ポリヌクレオチドが、編集鋳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。

【0092】

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。

【0093】

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せられ得、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、単一の発現構築物が、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。

【0094】

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

10

20

30

40

50

ては、C a s 1、C a s 1 B、C a s 2、C a s 3、C a s 4、C a s 5、C a s 6、C a s 7、C a s 8、C a s 9 (C s n 1 および C s x 1 2 とし ても 知 ら れ る)、C a s 1 0、C s y 1、C s y 2、C s y 3、C s e 1、C s e 2、C s c 1、C s c 2、C s a 5、C s n 2、C s m 2、C s m 3、C s m 4、C s m 5、C s m 6、C m r 1、C m r 3、C m r 4、C m r 5、C m r 6、C s b 1、C s b 2、C s b 3、C s x 1 7、C s x 1 4、C s x 1 0、C s x 1 6、C s a X、C s x 3、C s x 1、C s x 1 5、C s f 1、C s f 2、C s f 3、C s f 4、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 . p y o g e n e s の C a s 9 タンパク質のアミノ酸配列は、S w i s s P r o t データベースにアクセス番号 Q 9 9 Z W 2 と して 見 ら れ 得 る。

10

【 0 0 9 5 】

C R I S P R 酵 素 は、C a s 9 (例 え ば、S . p y o g e n e s ま た は S . p n e u m o n i a 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。バクテリアは、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 . p y o g e n e s 由来のC a s 9 の R u v C 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 (D 1 0 A) は、両方の鎖を切断するヌクレアーゼ由来のC a s 9 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、C a s 9 ニッカーゼは、ガイド配列、例えば、D N A 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、N H E J ま た は H D R を 誘 導 す る た め に 使 用 さ れ る。

20

【 0 0 9 6 】

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つのコドンとその宿主細胞の遺伝子においてより高頻度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 (m R N A) の翻訳効率と相関することが多く、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 (t R N A) 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で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應させることができる。

30

【 0 0 9 7 】

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って標的配列への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、またはそれらを超える。

40

【 0 0 9 8 】

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、S m i t h - W a t e r m a n アルゴリズム、N e e d l e m a n - W u n s c h アルゴリズム、B u r r o

50

ws - Wheeler Transformに基づくアルゴリズム (例えば、Burrows 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】

CRISPR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。CRISPR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。CRISPR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、RNA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、Myc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-S-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、シアン蛍光タンパク質 (CFP)、黄色蛍光タンパク質 (YFP)、および青色蛍光タンパク質 (BFP) を含む自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。CRISPR酵素は、DNA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 DNA結合ドメイン (DBD) 融合物、GAL4 A DNA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。CRISPR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US20110059502に記載されている。

III. 阻害性遺伝子の遺伝子座におけるCARおよび/またはTCR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CARおよび/またはTCRの挿入に関する。CARおよび/またはTCRは、阻害性遺伝子の遺伝子座 (例えば、NKG2A、Siglec7、LAG3、TIM3、CISH、FOXO1、TGFB2、TIGIT、CD96、アデノシンレセプター2A、NR3C1、PD1、PDL-1、PDL-2、CD47、SIRPa、SHIP1、ADAM17、pS6、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CARおよび/またはTCRの挿入は、部位特異的であり得る。例えば、1つ以上のCARおよび/またはTCR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CARおよび/またはTCR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CARおよび/またはTCR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。CARおよび/またはTCRは、アデノ随伴ウイルス (AAV) 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

つかの場合において、*rAAV*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、*CAR*および/または*TCR*が、*rAAV*または*AAV*ベクターによって、*NKG2A*、*Siglec7*、*LAG3*、*TIM3*、*CISH*、*FOXO1*、*TGFB β* 2、*TIGIT*、*CD96*、アデノシンレセプター2*A*、*NR3C1*、*PD1*、*PDL-1*、*PDL-2*、*CD47*、*SIRP α* 、*SHIP1*、*ADAM17*、*pS6*、*4EBP1*、*CD25*、*CD40*、*IL21R*、*ICAM1*、*CD95*、*CD80*、*CD86*、*IL10R*、*CD5*または*CD7*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DNAを導入することによって行うことができ、ここで、そのDNAは、標的遺伝子座に対して相同性を有する。DNA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DNAは、標的遺伝子座において染色体DNAと組み換わり得る。マーカー遺伝子は、相補DNA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 kb～約5 kb長（例えば、約0.2 kb、0.4 kb、0.6 kb、0.8 kb、1.0 kb、1.2 kb、1.4 kb、1.6 kb、1.8 kb、2.0 kb、2.2 kb、2.4 kb、2.6 kb、2.8 kb、3.0 kb、3.2 kb、3.4 kb、3.6 kb、3.8 kb、4.0 kb、4.2 kb、4.4 kb、4.6 kb、4.8 kbから約5.0 kb長など）であり得る。

【0103】

1つの方法において、ガイドRNA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RNA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RNAは、AAVベクター修復マトリックスに含められ得る。AAVベクターは、P2Aペプチドなどの自己切断2Aペプチドに続いてCARcDNAをコードし得る。CARカセットおよびガイドRNA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、AAVベクターおよびCas9（例えば、Cas9 mRNA）が導入（例えば、エレクトロポレーション）され得る。

IV. 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CAR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、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞またはガンマ-デルタT細胞）、NK細胞、インバリアントNK細胞、NKT細胞、B細胞、幹細胞（例えば、間葉系幹細胞（MSC）または人工多能性幹（iPSC）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、CARを発現し得、かつ/またはTCR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、骨髄性細胞、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。

【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

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。

【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。

【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。

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ー細胞の誘導、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年で報告されてきた。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ピボで活性化された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。

【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⁺細胞、CD8⁺細胞、およびそれらの部分集団、例えば、機能、活性化状態、成

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】

T細胞（例えば、CD4⁺および／またはCD8⁺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（T_N）細胞、エフェクターT細胞（T_{EFF}）、メモリーT細胞およびそのサブタイプ（例えば、幹細胞メモリーT（T_{SCM}）、セントラルメモリーT（T_{CM}）、エフェクターメモリーT（T_{EM}）または最終分化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（T_{reg}）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】

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⁺またはCD8⁺選択工程を用いることにより、CD4⁺ヘルパーT細胞およびCD8⁺細胞傷害性T細胞が分離される。そのようなCD4⁺およびCD8⁺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。

【0114】

いくつかの実施形態において、CD8⁺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（T_{CM}）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。

【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、gentleMACSTM Dissociator, Miltenyi Biotec, 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

10

20

30

40

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（PBMC）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+同種異系リンパ球およびIL-2で再刺激され得る。

【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。

【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（PBMC）、未刺激の白血球搬出法生成物（PBSC）、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

10

20

30

40

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細胞をエキソピボで拡大する方法 (Spanholz 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 (aAPC) 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⁺/CD3⁻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⁺細胞の単離、ならびにSCF、IL-7、IL-15およびIL-2を含む培地中で培養することによるCD56⁺/CD3⁻細胞への分化によって、NK細胞を得る。

10

【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。

20

【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ピボ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。

30

【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、100~300 mMの濃度、特に200 mM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。

40

【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-Rex 100 MまたはG

50

- R e x 1 0 0 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。

【 0 1 2 6 】

いくつかの態様において、A P C は、ガンマ線を照射される。ある特定の態様において、A P C は、膜結合型 I L - 2 1 (m b I L - 2 1) を発現するように操作される。特定の態様において、A P C は、I L - 2 1、I L - 1 5 および / または I L - 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、M N C と A P C とは、1 : 2 の比で培養される。いくつかの態様において、I L - 2 は、5 0 ~ 2 0 0 I U / m L の濃度 (例えば、1 0 0 I U / m L) で存在する。特定の態様において、I L - 2 は、2 ~ 3 日ごとに補充される。

10

【 0 1 2 7 】

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 I L - 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。

【 0 1 2 8 】

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、1 0 個未満のバイオリアクターの使用を含む。

20

【 0 1 2 9 】

具体的な態様において、N K 細胞は、少なくとも 5 0 0 倍、8 0 0 倍、1 0 0 0 倍、1 2 0 0 倍、1 5 0 0 倍、2 0 0 0 倍、2 5 0 0 倍、3 0 0 0 倍または 5 0 0 0 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 N K 細胞を培養することにより、静置液体培養と比べて 1 0 0 0 倍超の N K 細胞が生成される。

【 0 1 3 0 】

ある特定の態様において、上記方法は、ヒト白血球抗原 (H L A) の適合を含まない。いくつかの態様において、N K 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。

【 0 1 3 1 】

いくつかの態様において、上記の拡大された N K 細胞は、末梢血から拡大された N K 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 N K 細胞は、末梢血から拡大された N K 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 D N A 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 N K 細胞は、末梢血から拡大された N K 細胞と比べて、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 N K 細胞は、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、C D 5 7、K L R G 1 および / または P D 1 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 N K 細胞は、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 N K 細胞は、C D 5 7、K L R G 1 および / または P D 1 を低発現しているか、または発現していない。

30

40

【 0 1 3 2 】

いくつかの態様において、拡大された N K 細胞は、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、T r y p a n o s o m a c r u z i、H I V、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。

【 0 1 3 3 】

いくつかの態様において、N K 細胞は、例えばレシipient 自体に対して、自己の N K

50

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

【0134】

いくつかの態様において、APCは、ユニバーサル抗原提示細胞(uAPC)である。ある特定の態様において、uAPCは、(1)CD48および/またはCS1(CD319)、(2)膜結合型インターロイキン-21(mbIL-21)、ならびに(3)41BBリガンド(41BBL)を発現するように操作される。いくつかの態様において、uAPCは、CD48を発現する。ある特定の態様において、uAPCは、CS1を発現する。特定の態様において、uAPCは、CD48およびCS1を発現する。いくつかの態様において、uAPCは、内在性のHLAクラスI、IIおよび/またはCD1d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、uAPCは、ICAM-1(CD54)および/またはLFA-3(CD58)を発現する。特定の態様において、uAPCはさらに、K562細胞などの白血病細胞由来のaAPCと定義される。

10

C. 幹細胞

【0135】

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(PSC)、間葉系幹細胞(MSC)または造血幹細胞(HSC)などの幹細胞であり得る。

【0136】

本明細書中で使用される多能性幹細胞は、通常、iPS細胞またはiPSCと省略される、人工多能性幹(iPS)細胞であり得る。生殖細胞を除く任意の細胞をiPSC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。

20

【0137】

体細胞は、当業者に公知の方法を用いて初期化されて、iPS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、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、Klf4、c-Myc、Oct3/4、Sox2、NanogおよびLin28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、Oct3/4、Sox2、c-MycおよびKlf4が使用されるか、またはOct3/4、Sox2、NanogおよびLin28が使用される。

30

【0138】

iPSC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、TESRTM培地またはE8TM/Essential 8TM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。

40

V. 遺伝的に操作された抗原レセプター

【0139】

本開示の免疫細胞は、抗原レセプター(例えば、操作されたTCR、CAR、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CARおよび/またはTCRを発現するように改変される。複数のCARおよび/またはTCR(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、CRI^{SPR}を用いた阻害性遺伝子の遺伝子座におけるCARまたはTCRのノックインによって、CARまたはTCRを発現するように操作される。

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）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、プロセッ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WO200014257、WO2013126726、WO2012/129514、WO2014031687、WO2013/166321、WO2013/071154、WO2013/123061、米国特許出願公開番号US2002131960、US2013287748、US20130149337、米国特許第6,451,995号、同第7,446,190号、同第8,252,592号、同第8,339,645号、同第8,398,282号、同第7,446,179号、同第6,410,319号、同第7,070,995号、同第7,265,209号、同第7,354,762号、同第7,446,191号、同第8,324,353号および同第8,479,118号、ならびに欧州特許出願番号EP2537416に記載されているもの、および/またはSadellain 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/2014055668A1に記載されているものが含まれる。

40

A. キメラ抗原レセプター

50

【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_H鎖およびV_L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、黒色腫瘍関連抗原、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き、持続性を改善するためにサイトカインと同時に発現され得る。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に発現され得る。

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, 4 1 0, 3 1 9 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に、選択されるかまたはアミノ酸置換によって改変される。

【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。

【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⁺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。

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）または可変β鎖および可変α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。

【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

10

20

30

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、TCRは、シグナル伝達の媒介に関わるCD3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「TCR」は、その機能的TCR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、型または型のTCRをはじめとしたインタクトなまたは完全長のTCRも包含する。

【0161】

したがって、本明細書中の目的では、TCRへの言及には、任意のTCRまたは機能的フラグメント（例えば、MHC分子において結合した特異的な抗原ペプチド、すなわち、MHC-ペプチド複合体に結合するTCRの抗原結合部分）が含まれる。交換可能に使用され得る、TCRの「抗原結合部分」または抗原結合フラグメントとは、TCRの構造ドメインの一部分しか含まないが、完全なTCRが結合する抗原（例えば、MHC-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MHC-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TCRの可変ドメイン（例えば、TCRの可変α鎖および可変β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。

【0162】

いくつかの実施形態において、TCR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（CDR）を形成し、それにより、抗原認識がもたらされ、TCR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、CDRは、フレームワーク領域（FR）によって隔てられる（例えば、Jores et al., 1990; Chothia et al., 1988; Lefranc et al., 2003を参照のこと）。いくつかの実施形態において、CDR3は、プロセシングされた抗原の認識に与する主要なCDRであるが、アルファ鎖のCDR1は、抗原ペプチドのN末端部と相互作用すると示されているのに対して、ベータ鎖のCDR1は、そのペプチドのC末端部と相互作用する。CDR2は、MHC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（HV4）領域を含み得る。

【0163】

いくつかの実施形態において、TCR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、TCR鎖の細胞外の部分（例えば、α鎖、β鎖）は、2つの免疫グロブリンドメインである、N末端における可変ドメイン（例えば、V_αまたはV_β；通常、KabatsナンバリングであるKabata et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th 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、α鎖定常ドメインまたはC_α、通常、Kabataに基づくアミノ酸117~259、β鎖定常ドメインまたはC_β、通常、Kabata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TCRの細胞外の部分は、2つの膜近位定常ドメイン、およびCDRを含む2つの膜遠位可変ドメインを含む。TCR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、TCR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TCR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。

【0164】

いくつかの実施形態において、TCR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、正に帯電している。いくつかの場合において、TCR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、TCRはCD3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TCRは、そのタンパク質を細胞膜に固定し得、CD3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（ α 、 β ）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つを含む。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。

10

【0166】

いくつかの実施形態において、TCRは、2本の鎖（ α および β ）（または必要に応じて γ および δ ）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（ α 鎖と β 鎖または γ 鎖と δ 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 DNA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、インビボ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細胞クローンが、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ンであり得る。いくつかの実施形態において、標的抗原に対するTCRクローンは、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ンである。例えば、腫瘍抗原（例えば、Parkhurst et al., 2009およびCohen 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-Rohena 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。

20

30

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。

40

【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

50

的ガイドンスについては、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 WO 2007/103009 を参照のこと。

【0169】

a APC システムは、少なくとも 1 つの外來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 (Fc RI)、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。こ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、EGFRvIII、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、EGFRvIII、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 (アクセッション番号 NG_007275.1)、EBNA (アクセッション番号 NG_002392.2)、WT1 (アクセッション番号 NG_009272.1)、CD123 (アクセッション番号 NC_000023.11)、NY-ESO (アクセッション番号 NC_000023.11)、EGFRvIII (アクセッション番号 NG_007726.3)、MUC1 (アクセッション番号 NG_029383.1)、HER2 (アクセッション番号 NG_007503.1)、CA-125 (アクセッション番号 NG_055257.1)、WT1 (アクセッション番号 NG_009272.1)、Mage-A3 (アクセッション番号 NG_013244.1)、Mage-A4 (アクセッション番号 NG_01

10

20

30

40

50

3 2 4 5 . 1)、M a g e - A 1 0 (ア ク セ ッ シ ョ ン 番 号 N C _ 0 0 0 0 2 3 . 1 1)、
T R A I L / D R 4 (ア ク セ ッ シ ョ ン 番 号 N C _ 0 0 0 0 0 3 . 1 2)、お よ び / ま た は
C E A (ア ク セ ッ シ ョ ン 番 号 N C _ 0 0 0 0 1 9 . 1 0)。

【 0 1 7 2 】

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、M A G E 1、3 および M A G E 4 (または他の M A G E 抗原、例えば、国際特許公開番号 W O 9 9 / 4 0 1 8 8 に開示されているもの) ; P R A M E ; B A G E ; R A G E、L a g e (N Y E S O 1 としても知られる) ; S A G E ; および H A G E または G A G E 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 , 5 4 4 , 5 1 8 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 (P S M A)、前立腺特異的抗原 (P S A)、前立腺酸性リン酸塩、N K X 3 . 1 および前立腺の 6 回膜貫通上皮抗原 (S T E A P) が挙げられる。

10

【 0 1 7 3 】

他の腫瘍関連抗原としては、P l u - 1、H A S H - 1、H a s H - 2、C r i p t o および C r i p t i n 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 (G n R H)、短い 10 アミノ酸長のペプチドであり得る。

20

【 0 1 7 4 】

腫瘍抗原には、H E R - 2 / n e u 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 M A R T - 1 / M e l a n - A、g p 1 0 0、g p 7 5、m d a - 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、p 5 3、R a s、c - M y c、細胞質セリン / トレオニンキナーゼ (例えば、A - R a f、B - R a f および C - R a f、サイクリン依存性キナーゼ)、M A G E - A 1、M A G E - A 2、M A G E - A 3、M A G E - A 4、M A G E - A 6、M A G E - A 1 0、M A G E - A 1 2、M A R T - 1、B A G E、D A M - 6、- 1 0、G A G E - 1、- 2、- 8、G A G E - 3、- 4、- 5、- 6、- 7 B、N A 8 8 - A、M A R T - 1、M C 1 R、G p 1 0 0、P S A、P S M、チロシナーゼ、T R P - 1、T R P - 2、A R T - 4、C A M E L、C E A、C y p - B、h T E R T、h T R T、i C E、M U C 1、M U C 2、ホスホイノシチド 3 - キナーゼ (P I 3 K)、T R K レセプター、P R A M E、P 1 5、R U 1、R U 2、S A R T - 1、S A R T - 3、ウィルムス腫瘍抗原 (W T 1)、A F P、- カテニン / m、カスパーゼ - 8 / m、C E A、C D K - 4 / m、E L F 2 M、G n T - V、G 2 5 0、H S P 7 0 - 2 M、H S T - 2、K I A A 0 2 0 5、M U M - 1、M U M - 2、M U M - 3、ミオシン / m、R A G E、S A R T - 2、T R P - 2 / I N T 2、7 0 7 - A P、アネキシン I I、C D C 2 7 / m、T P I / m b c r - a b 1、B C R - A B L、インターフェロン制御因子 4 (I R F 4)、E T V 6 / A M L、L D L R / F U T、P m 1 / R A R、腫瘍関連カルシウムシグナル伝達物質 1 (T A C S T D 1) T A C S T D 2、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 (E G F R) (特に、E G F R v I I I)、血小板由来成長因子レセプター (P D G F R)、血管内皮成長因子レセプター (V E G F R))、細胞質チロシンキナーゼ (例えば、s r c ファミリー、s y k - Z A P 7 0 ファミリー)、インテグリン結合キナーゼ (I L K)、シグナル伝達性転写因子 S T A T 3、S T A T 5 および S T A T 6、低酸素誘導因子 (例えば、H I F - 1 および H I F - 2)、核因子 - カッパー B (N F - B)、N o t c h レセプター (例えば、N o t c h 1 ~ 4)、c - M e t、ラパマイシンの哺乳動物標的 (m T O R)、W N T、細胞外シグナル制御キナーゼ (E R K) およびそれらの調節サブユニット、P M S A、P R - 3、M D M 2、メソテリン、腎細胞癌 - 5 T 4、S M 2 2 - アルファ、炭酸脱水酵素 I (C A I) および I X (C A I X) (G 2 5 0 とし

30

40

50

ても知られる)、STEAD、TEL/AML1、GD2、プロテイナーゼ3、hTERT、肉腫転座切断点(sarcoma translocation breakpoints)、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(mesothelium)、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、fos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。

10

【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、サバイピン、メソテリン、変異型ras、bcr/abl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ン性再配列;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。

20

【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。

30

【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 pneumoniae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、ならびにそ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。

40

【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、

50

HSV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、ウィルスカプシドを形成する(UL)の5つのタンパク質:UL6、UL18、UL35、UL38ならびに主要カプシドタンパク質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、カプシドタンパク質、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(Rykman, 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)。

【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)。

【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(ヌクレオカプシドタンパク質)、M(マトリックスタンパク質)SH、GおよびF(ウィ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。

【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)のうちのいずれかが1つが含まれる(例えば、Rieder et al., 1999を参照のこと)。

【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

10

20

30

40

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、ペスチ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）、ボ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。

10

【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を有する抗原が含まれる。

20

【0187】

使用が企図される、メチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA) 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、Agrシステム、SarおよびSae、Arlシステム、Sarホモログ (Rot、Mg r A、Sar S、Sar R、Sar T、Sar U、Sar V、Sar X、Sar ZおよびT c a R)、S r r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、Clpタンパク質、Htr A、Msr R、アコニターゼ、Ccp A、Svr A、Msa、Cfv AおよびCfv Bが挙げられる（例えば、*Staphylococcus: Molecular Genetics*, 2008 Ca i s t e r A c a d e m i c P r e s s, E d . J o d i L i n d s a y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。

30

【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、Psp A、コリン結合タンパク質A (Cbp A)、Nan A、Nan B、SpnHL、Pav A、Lyt A、Phtおよびピリンタンパク質 (Rrg A; Rrg B; Rrg C) 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、本明細書中で使用するための *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

40

50

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、キャプ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、ネオリケッチア属のポリペプチド、ノカルジア属のポリペプチド、パスツ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、リケッチア属のポリペプチド、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、ビボ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、ミクロスポ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（Phialomonium）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、リノスポ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（Scolecobasidium）のポリペプチド、スポ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、トリコスポロン属のポリペプチドおよびキシロヒファ属（Xylomyces）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、クリプトスポ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、エントアメーバ属のポリペプチド、ジアルジア属のポリペプチド、ハモンディア属（Hamondia）のポリペプチド、ヘパトゾーン属のポリペプチド、イソス

ボラ属のポリペプチド、リーシュマニア属のポリペプチド、微孢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、ペンタ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、アエルロストロングイルウス属 (*Aelurostrongylus*) 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、クーペリア属のポリペプチド、クレノソマ属 (*Crenosoma*) 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、ディベタロネマ属のポリペプチド、裂頭条虫属のポリペプチド、ジブ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 (*Lagochilascaris*) 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、ムエレリウス属 (*Muellerius*) 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、プロトストロングイルス属 (*Protostrongylus*) 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 (*Spirocerca*) 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、ストロングイ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. falciparum* 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、ツェツェバエ、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改変される。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化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)の腫瘍壊死因子(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(HSV-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、誘導性カパーゼ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- , -リアーゼ(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))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 Maus 白血病ウイルスベクター(MoMLV)、MSCV、SFV、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(marabavirus)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、単一のベクターが、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ー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*、

20

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。

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シングナル、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に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 30110 bp 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。tk プ

50

ロモーターでは、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。

【0203】

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 PCRTM 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。

【0204】

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、参照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。

【0205】

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 EPDB 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。

【0206】

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 r e)、血清応答エレメントプロモーター(s r e)、ホルボールエステルプロモーター(T P A)およびミニマルT A T Aボックス近傍の応答エレメントプロモーター(t r e))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、G e n b a n k(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X 0 5 2 4 4、ヌクレオチド2 8 3 ~ 3 4 1)またはマウス乳腺腫瘍プロモーター(A T C Cから入手可能, C a t . N o . A T C C 4 5 0 0 7)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、C M V I E、デクチン - 1、デクチン - 2、ヒトC D 1 1 c、F 4 / 8 0、S M 2 2、R S V、S V 4 0、A d M L P、ベータ - アクチン、M H CクラスIまたはM H CクラスI I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。

10

【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千ベース離れた距離)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、A T G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(A T G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エレメントを含めることによって、発現効率が高められ得る。

20

【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(I R E S)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。I R E S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I R E Sエレメント、ならびに哺乳動物のメッセージ由来のI R E Sが、報告されている。I R E S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I R E S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と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。I R E S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。

30

40

【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2 A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、F 2 A(口蹄疫ウイルス2 A)または「2 A様」配列(例えば、T h o s e a a s i g n aウイルス2 A; T 2 A)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(「o r i」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

50

である、上に記載されたようなEBVのoriP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oriP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(ARS)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

【0211】

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

【0212】

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、DHFR、GPT、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、GFP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(tk)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(CAT)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FACS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

【0213】

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

【0214】

本開示の免疫細胞へのDNAまたはRNA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、DNAの直接送達(例えば、エキソビボ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;DEAE-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;リボ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(microprojectile bombardment);炭化ケイ素繊維を伴った攪拌;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DNA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

VI. 処置方法

【0215】

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。

【0216】

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（エキソピボで拡大された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（エキソピボで拡大された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（エキソピボで拡大された、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（エキソピボで拡大された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（エキソピボで拡大され、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。

10

【 0 2 1 7 】

20

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。

【 0 2 1 8 】

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、膵臓、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（*g a s t r i c*）癌または胃（*s t o m a c h*）癌（消化器癌および消化管間質癌を含む）、膵癌、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。

30

【 0 2 1 9 】

40

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；腺様嚢胞癌；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；嚢胞腺癌；乳頭状嚢胞腺癌；乳頭状漿液性嚢胞腺癌；粘液性嚢胞腺癌；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

50

皮膚癌；扁平上皮化生を伴う腺癌；胸腺腫、悪性；卵巢間質腫瘍、悪性；莢膜細胞腫、悪性；顆粒膜細胞腫、悪性；アンドロblastoma、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；ミューラー管混合腫瘍；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；卵巢甲状腺腫、悪性；絨毛癌；中腎腫、悪性；血管肉腫；血管内皮腫、悪性；カボジ肉腫；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；歯源性腫瘍、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；髄膜腫、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；ワルデンシュトレームマクログロブリン血症；悪性組織球増殖症；多発性骨髄腫；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；骨髄性白血病；好塩基球性白血病；好酸球性白血病；単球性白血病；肥満細胞白血病；巨核芽球性白血病；骨髄性肉腫；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）；急性骨髄性白血病（AML）；および慢性骨髄芽球性白血病。

【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、血液または骨髄の癌であり、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、自己免疫疾患を有する。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睪丸炎、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）、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパシー、チャグ・ストラウス症候群、癰痕性類天疱瘡、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、グレーブズ病、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 (ITP)、IgA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 (例えば、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 (例えば、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)、白斑ならびにウェゲ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、1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。

10

【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。GVHD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。GVHDには、急性と慢性の2種類がある。急性GVHDは、移植後の最初の3ヶ月以内に現れる。急性GVHDの徴候としては、手および足における赤みがあ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もあり、より重篤になることがある。急性GVHDは、胃および腸にも影響することがあり、その場合、筋痙攣、悪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GVHDが肝臓に影響していることを示す。慢性GVHD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GVHDは、移植の3ヶ月後またはそれ以降に発症する。慢性GVHDの症状は、急性GVHDの症状と似ているが、さらに、慢性GVHD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、例えば、腎臓、肝臓、皮膚、脾臓、肺および / または心臓、あるいは細胞移植片、例えば、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、例えば、顔面の組織であり得る。免疫細胞は、移植の前、移植と同時に、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、例えば、移植の少なくとも1時間前、少なくとも12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。

20

30

40

【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、例えば、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 / m²のフルダラビンが

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 3.8×10^4 、少なくとも 3.8×10^5 、少なくとも 3.8×10^6 、少なくとも 3.8×10^7 、少なくとも 3.8×10^8 、少なくとも 3.8×10^9 または少なくとも 3.8×10^{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 3.8×10^9 ～約 3.8×10^{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 5×10^6 細胞/kg体重～約 7.5×10^8 細胞/kg体重、例えば、約 2×10^7 細胞～約 5×10^8 細胞/kg体重または約 5×10^7 細胞～約 2×10^8 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、アザチオプ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、シクロスポリンおよびタクロリムス）；mTOR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寛容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 22nd 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ンモニウム；塩化ヘキサメチウム；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）；単糖類、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ニダーゼ糖タンパク質（sHASEGP）、例えば、ヒト可溶性PH-20ヒアルロニ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ゼ、例えば、コンドロイチナーゼと併用される。

20

30

40

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

50

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

【 0 2 3 3 】

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こととする作用物質、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

【 0 2 3 4 】

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、同時から数分、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んが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

【 0 2 3 5 】

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 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

【 0 2 3 6 】

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

【 0 2 3 7 】

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にインターカレートする能力、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

【 0 2 3 8 】

化学療法剤の例としては、アルキル化剤（例えば、チオテパ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、ブスルファン、インブスルファンおよびピボスルファン) ; 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 (methy lamel amines) (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 (trimethylololomelamine) を含む) ; アセトゲニン (特に、プラタシンおよびプラタシノン) ; カンプトテシン (合成アナログであるトボテカンを含む) ; プリオスタチン ; カリスタチン ; CC - 1065 (そのアドゼレシン、カルゼレシン (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) ; ドラストチン ; デュオカルマイシン (合成アナログである KW - 2189 および CB1 - TM1 を含む) ; エレウセロビン (eleutherobin) ; パンクラチスタチン (pancratistatin) ; サルコジクチン (sarcodictyin) ; スポンギスタチン (spongistatin) ; ナイトロジェンマスタード (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、ノベンビキン (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 (ranimnustine)) ; 抗生物質 (例えば、エンジン抗生物質 (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) ; エスペラマイシン ; 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 (carabycin)、カルミノマイシン (carminomycin)、カルジノフィリン (carzinophilin)、クロモシニス、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン (detorubicin)、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、ドキシソルビシン (モルホリノ - ドキシソルビシン、シアノモルホリノ - ドキシソルビシン、2 - ピロリノ - ドキシソルビシンおよびデオキシドキシソルビシンを含む)、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)、ロドルビシン (rodorubicin)、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 - FU)) ; 葉酸アナログ (例えば、デノプテリン (denopter in)、プ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 (thiamiprine) およびチオグアニン) ; ピリミジンアナログ (例えば、アンシタピン、アザシチジン、6 - アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン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

10

20

30

40

50

ホファミン (deffofamine) ; 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) ; エボチロン ; エトグルシド ; 硝酸ガリウム ; ヒドロキシ尿素 ; レンチナン ; ロニダイニン (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 (mopidanmol) ; ニトラエリン ; ペントスタチン ; フェナメット (phenamet) ; ピラルピシン ; ロソキサントロン (losoxantrone) ; 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 ; トリアジクオン (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 (roridin) A およびアングイジン (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ピン ; 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) ; ビンブラスチン ; 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 ; ピノレルピン ; 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 ; アミノプテリン ; 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 RFS 2000 ; 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) ; カベシタピン ; カルボプラチン、プロカルバジン、プリコマイシン、ゲムシタピエン、ナベルピン、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 (transplatinum)、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、広く使用され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】

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、ADCESTRIS (登録商標) (プレントキシマブベドチン) および KADCYLA (登録商標) (トラスツ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ない。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、HMFG、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。

【0243】

免疫療法の例としては、免疫アジュバント、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。

【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ドメイン 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-ドメイン Ig サプレッサー (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。

【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、ランブロリズマブが、代替のおよび等価な名称である MK-3475 およびペンブロリズマブとしても知られていることは公知である。

【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

10

20

30

40

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、PD-1 リガンド結合パートナーは、PDL1および/またはPDL2である。別の実施形態において、PDL1結合アンタゴニストは、PDL1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、PDL1結合パートナーは、PD-1および/またはB7-1である。別の実施形態において、PDL2結合アンタゴニストは、PDL2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、PDL2結合パートナーは、PD-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。

【0247】

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、抗PD-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PD-1抗体は、ニボルマブ、ペンブロリズマブおよびCT-011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、PD-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Fc領域）に融合されたPDL1またはPDL2の細胞外の部分またはPD-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、PD-1結合アンタゴニストは、AMP-224である。MDX-1106-04、MDX-1106、ONO-4538、BMS-936558およびOPDIVO（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PD-1抗体である。MK-3475、Merck3475、ランブロリズマブ、KEYTRUDA（登録商標）およびSCH-900475としても知られるペンブロリズマブは、例示的な抗PD-1抗体である。hBATまたはhBAT-1としても知られるCT-011も、抗PD-1抗体である。B7-DCIgとしても知られるAMP-224は、PDL2-Fc融合可溶性レセプターである。

【0248】

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、CD152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（CTLA-4）である。ヒトCTLA-4の完全cDNA配列は、Genbankアクセッション番号U15006を有する。CTLA-4は、T細胞の表面上に見られ、抗原提示細胞の表面上のCD80またはCD86に結合したとき「切」スイッチとして作用する。CTLA-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。CTLA-4は、T細胞共刺激タンパク質であるCD28に似ており、両分子は、抗原提示細胞上のCD80およびCD86（それぞれB7-1およびB7-2とも呼ばれる）に結合する。CTLA-4は、T細胞に阻害シグナルを伝達するのに対して、CD28は、刺激シグナルを伝達する。細胞内CTLA-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CD28を介したT細胞の活性化により、B7分子に対する阻害性レセプターであるCTLA-4が高発現される。

【0249】

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CTLA-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。

【0250】

本方法における使用に適した抗ヒトCTLA-4抗体（またはそれ由来のVHおよび/もしくはVL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CTLA-4抗体を使用することができる。例示的な抗CTLA-4抗体は、イピリムマブ（10D1、MDX-010、MDX-101およびYervoy（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CDRおよび軽鎖CDRまたは重鎖VRおよび軽鎖VR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VH領域のCDR1、CDR2およびCDR3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CDR1、CDR2およびCDR3ドメインを含む。別の実施形態において、その抗体は、CTLA-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CTLA-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90%の変換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90%、95%または99%の変換領域同一性）を有する。

4. 手術

【0251】

癌を有する人のおよそ60%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。

【0252】

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。

5. 他の作用物質

【0253】

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（FAK）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c225）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。

VII. 製品またはキット

【0254】

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

10

20

30

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】

VIII. 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まれる。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られ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、TGFB2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TGFB2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、TGFB2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を見出された。プレフェルジン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- γ 、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- γ 、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、TGFB2およびCISHの破壊によって確かめた。そのNK細胞は、 ^{51}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TGFBによる処置（50 ng/ml）の30分後に、pSMAD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ADCCおよび細胞傷害性が改善されること（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NKGA、CISH、TGFBRII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。それらを等体積濃度で混合した後の最終濃度は、44uM である。

【0265】

【表4】

表4. Cas9 スクレーパー

	体積
Alt-R S.p. Cas9 スクレーパー 3NLS(61uM)	3ul
T 緩衝液	7ul
総体積	10ul
最終濃度	18uM

10

20

30

40

50

【 0 2 6 6 】

【表 5】

表 5.crRNA:tracrRNA と Cas9 スクエアーズ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

【 0 2 6 7 】

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 スクエアーズミックスと合わせ、室温で 1 5 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。

【 0 2 6 8 】

【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

【 0 2 6 9 】

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用意することによって、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

【 0 2 7 0 】

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

【 0 2 7 1 】

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。当業者に明らかなそのような類似の代替物および改変のすべてが、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-675 206), 2004. 10
- 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 30
 g Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001.
 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

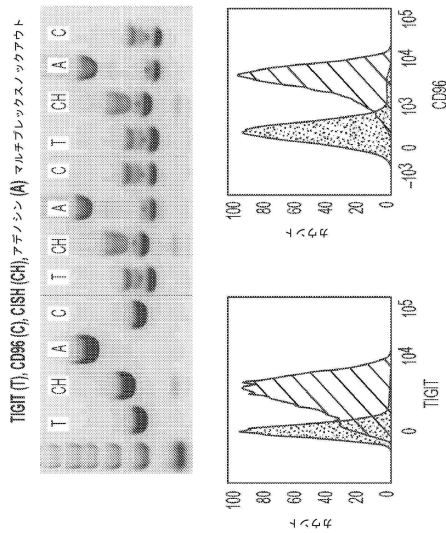
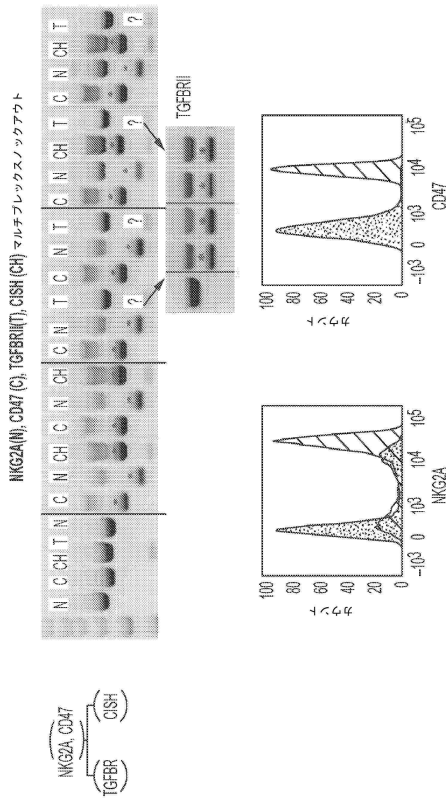
U.S. Patent No. 6,225,042	
U.S. Patent No. 6,355,479	
U.S. Patent No. 6,362,001	
U.S. Patent No. 6,410,319	
U.S. Patent No. 6,416,998	
U.S. Patent No. 6,544,518	
U.S. Patent No. 6,790,662	
U.S. Patent No. 7,109,304	
U.S. Patent No. 7,442,548	
U.S. Patent No. 7,446,190	10
U.S. Patent No. 7,598,364	
U.S. 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 1】

【図 2】



10

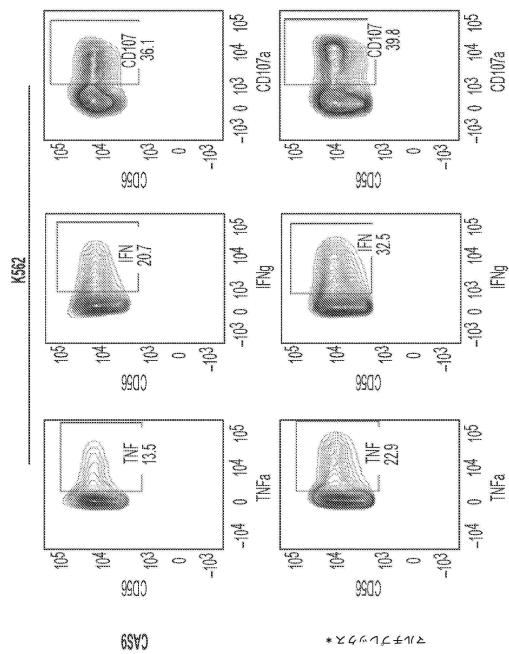
20

30

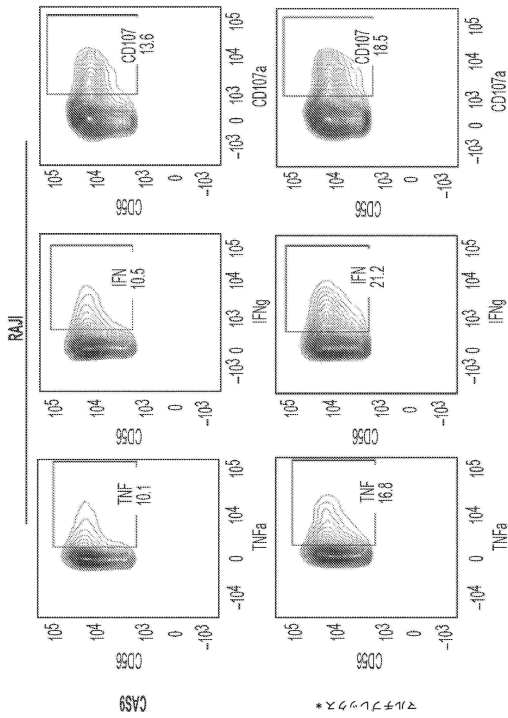
40

50

【図 3 - 1】



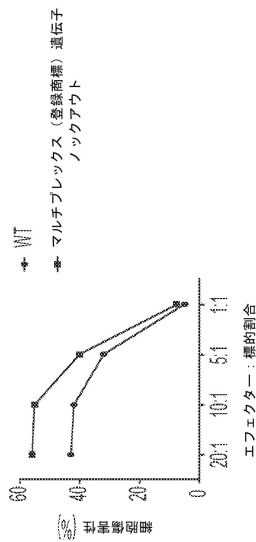
【図 3 - 2】



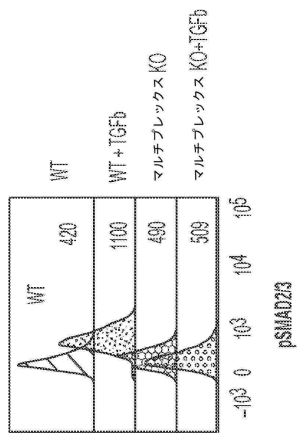
10

20

【図 4 A】



【図 4 B】

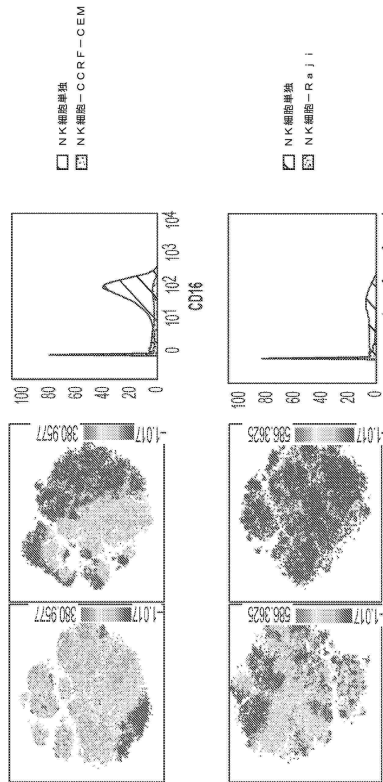


30

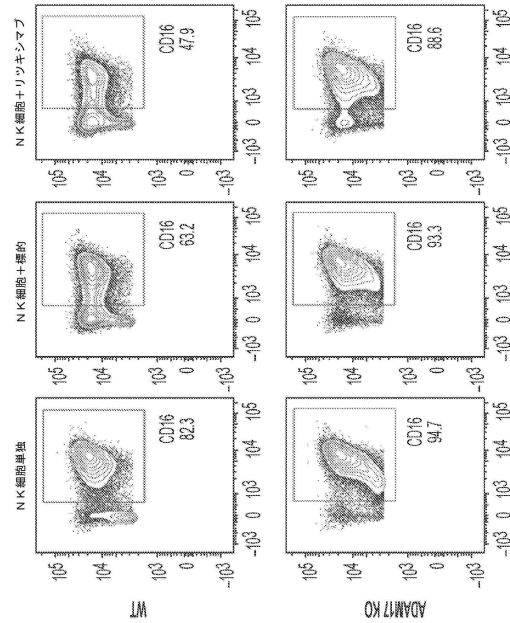
40

50

【図 5】



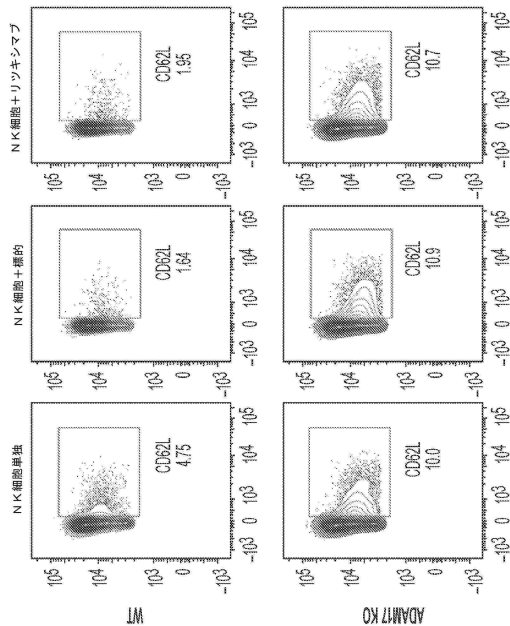
【図 6 - 1】



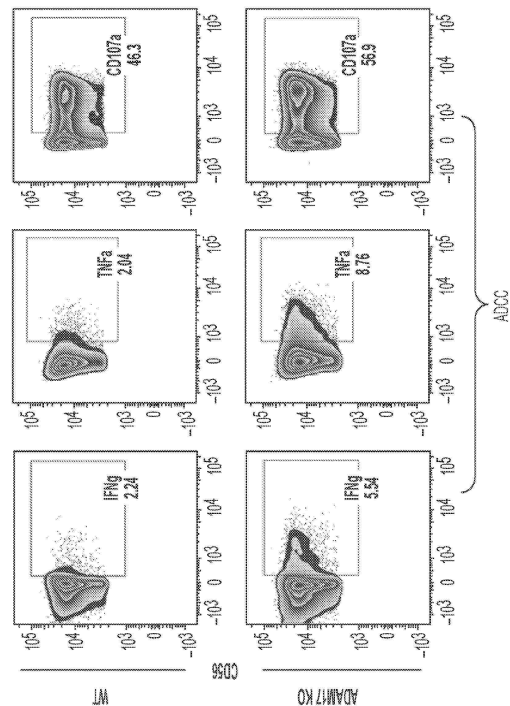
10

20

【図 6 - 2】



【図 7 - 1】

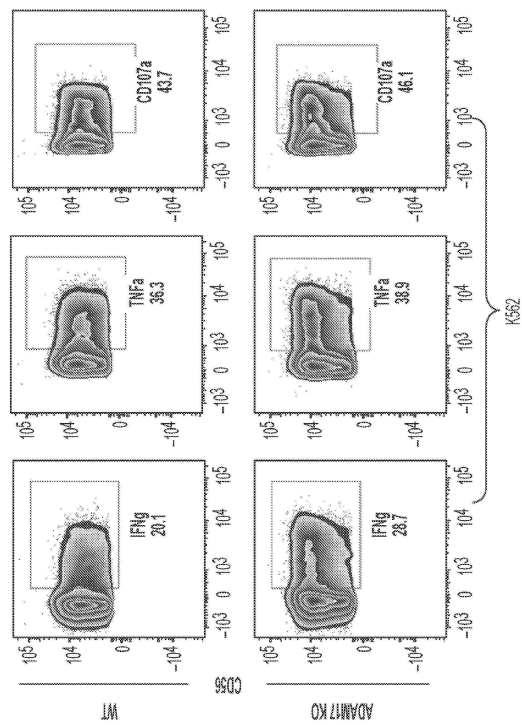


30

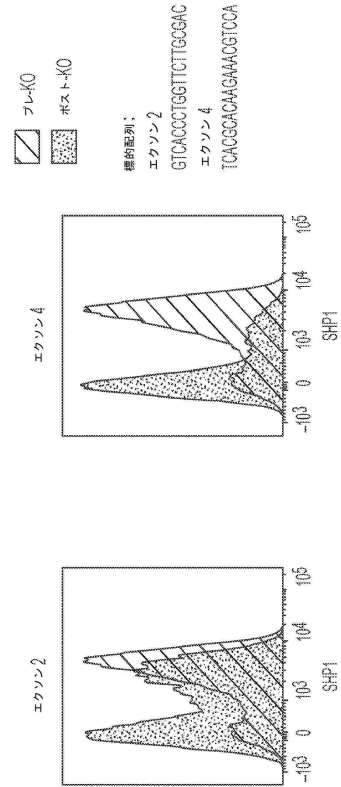
40

50

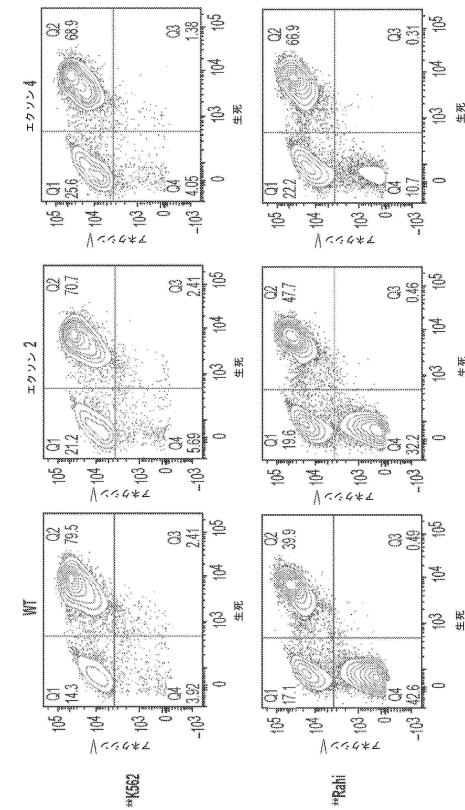
【図 7 - 2】



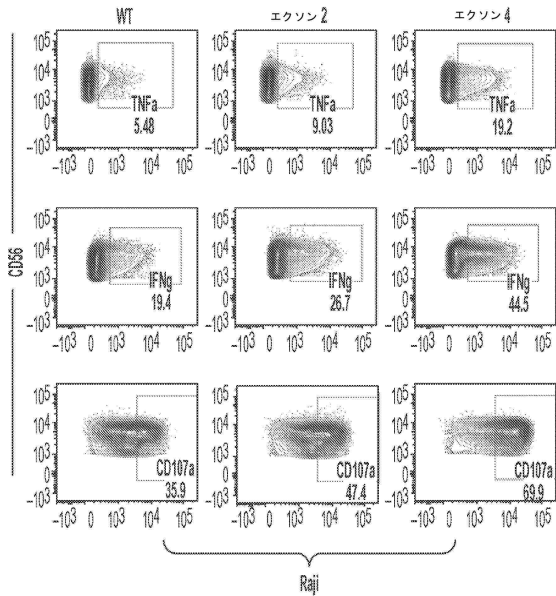
【図 8】



【図 9】



【図 10 A - 1】



10

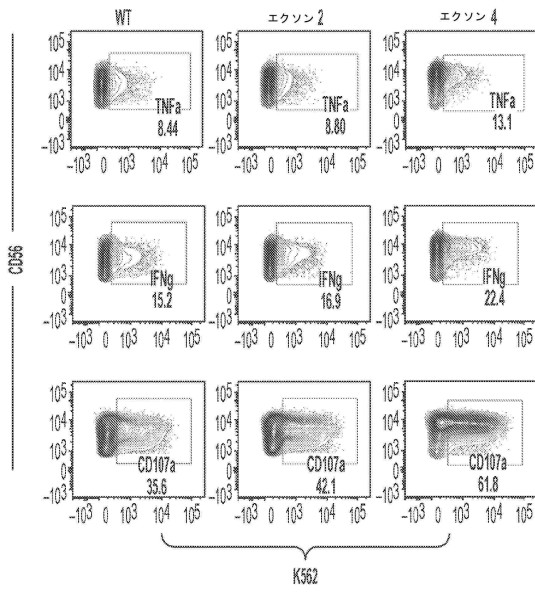
20

30

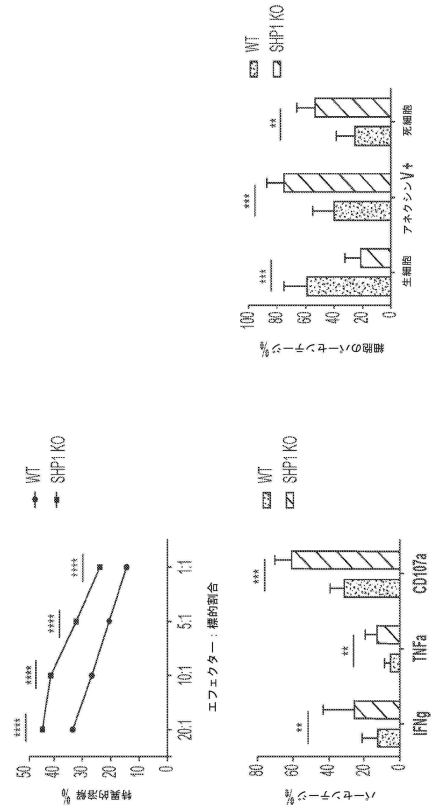
40

50

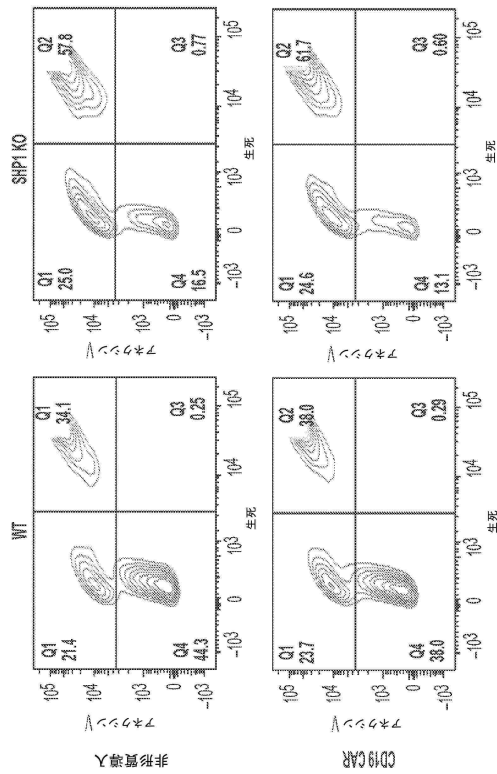
【図 10 A - 2】



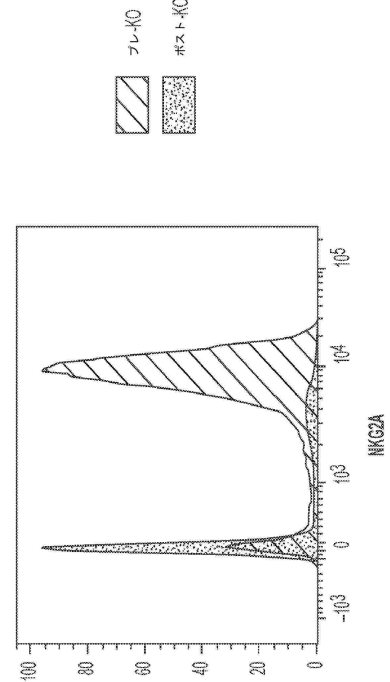
【図 10 B】



【図 11】



【図 12 A】



10

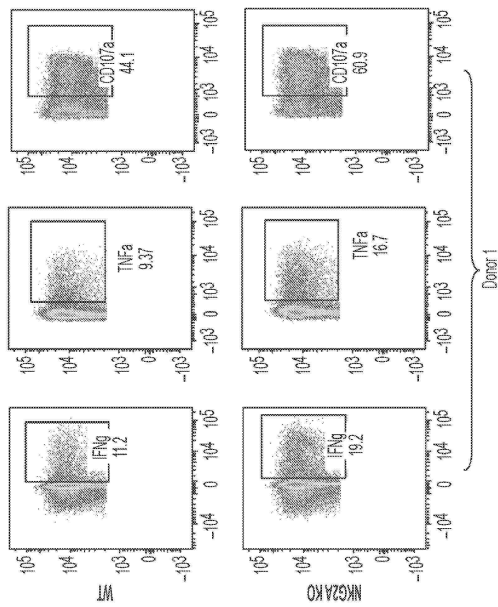
20

30

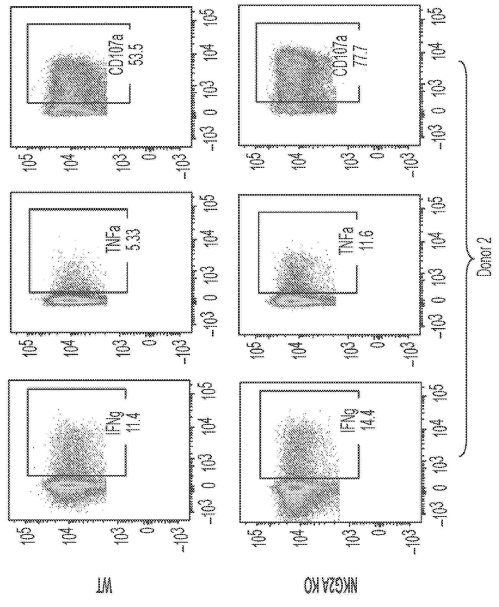
40

50

【図 1 2 B - 1】



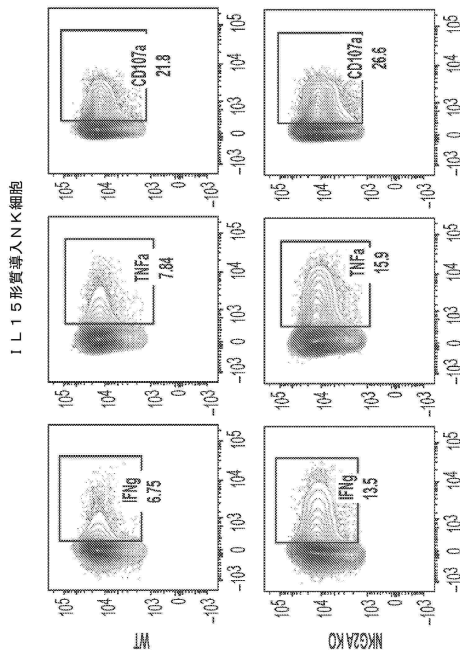
【図 1 2 B - 2】



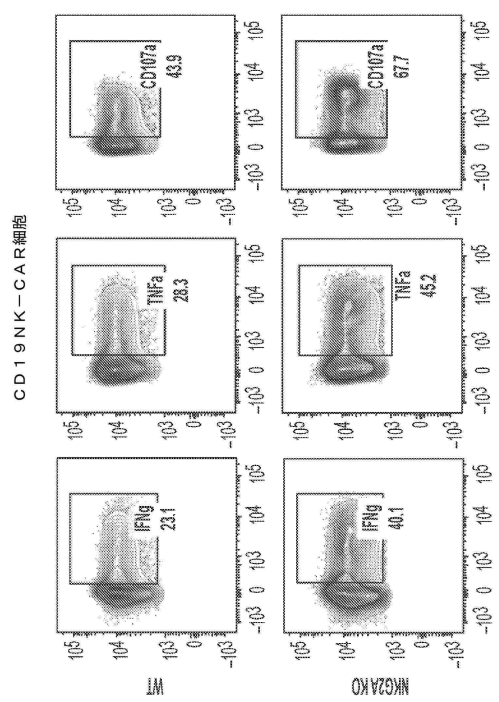
10

20

【図 1 2 C - 1】



【図 1 2 C - 2】

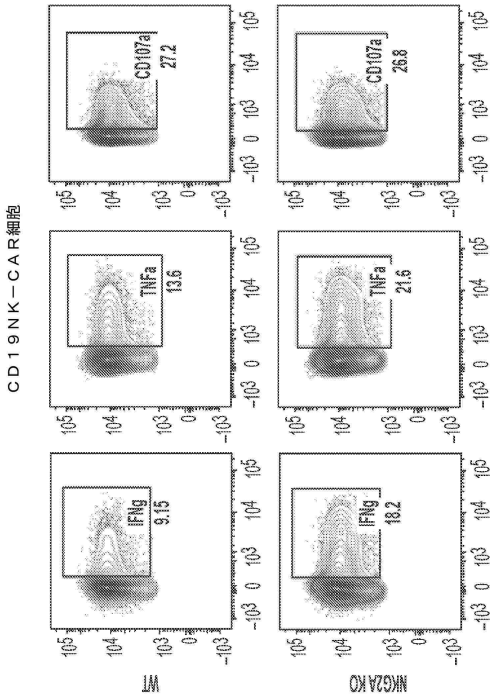


30

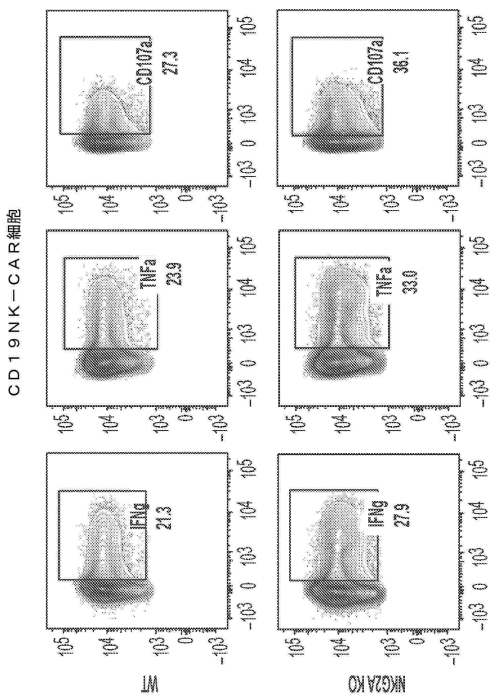
40

50

【図 1 2 C - 3】



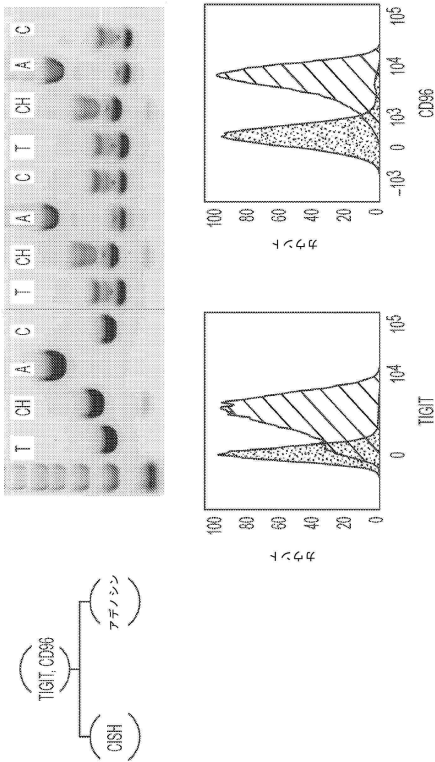
【図 1 2 C - 4】



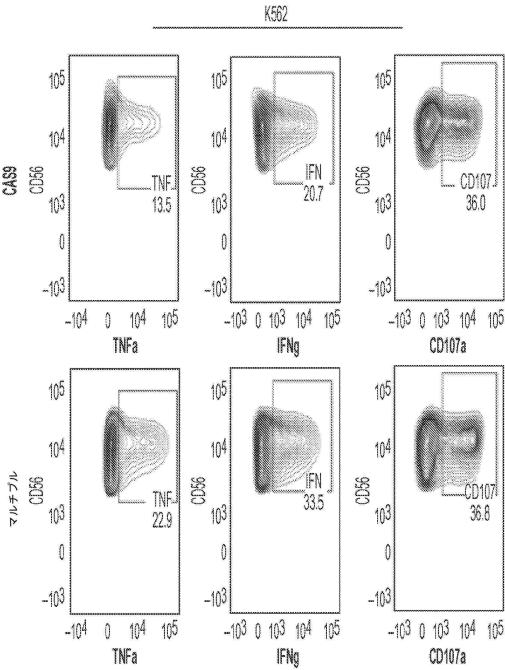
10

20

【図 1 3】



【図 1 4 - 1】

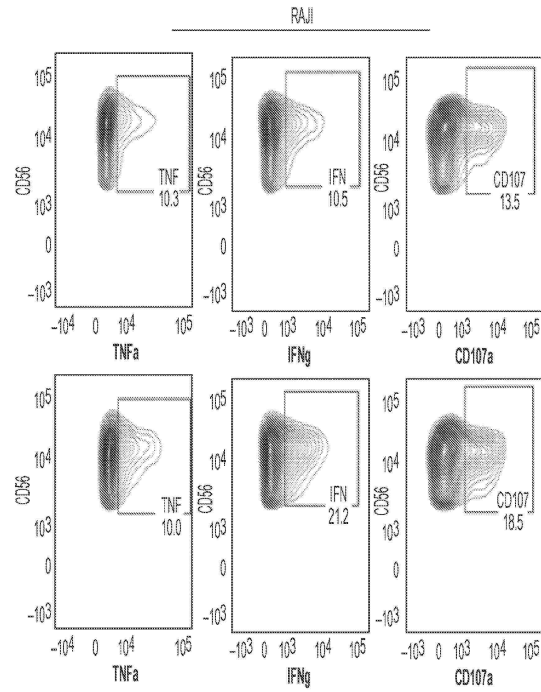


30

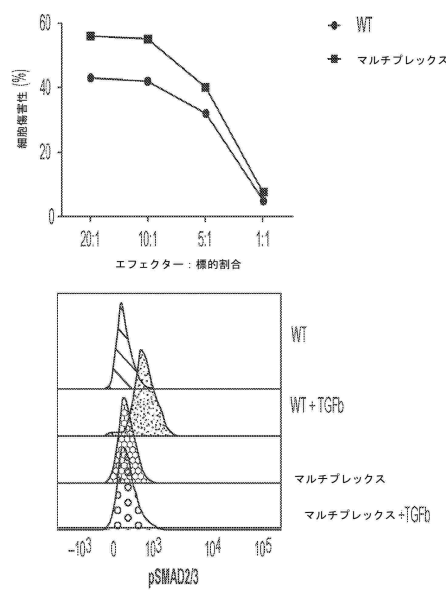
40

50

【図 1 4 - 2】



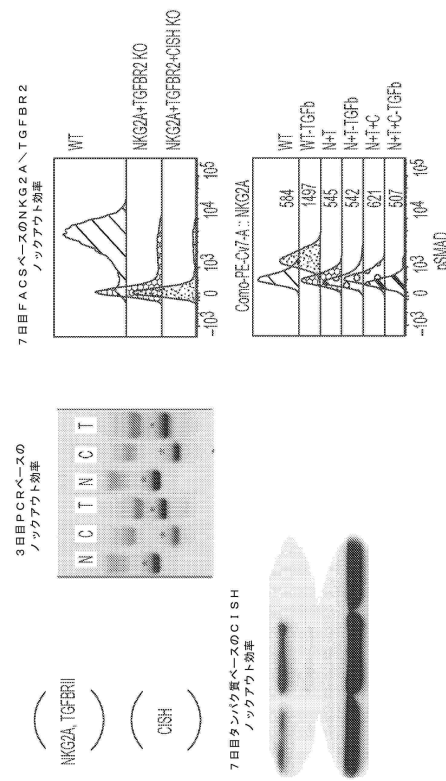
【図 1 4 - 3】



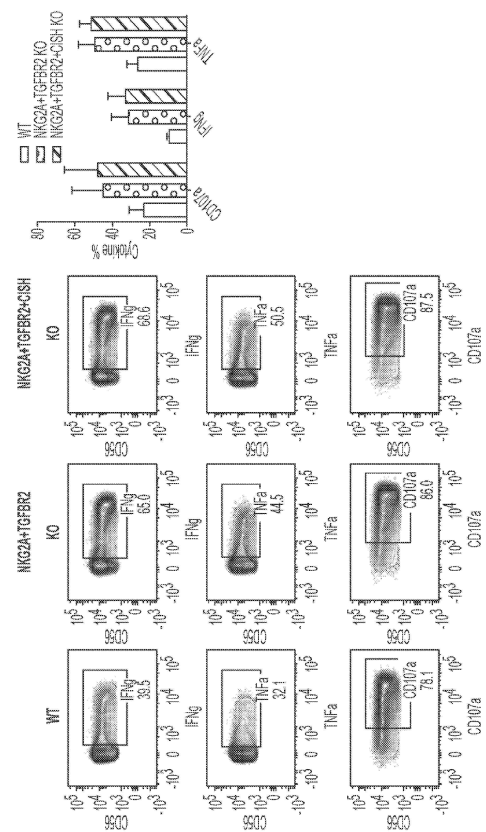
10

20

【図 1 5】



【図 1 6 - 1】

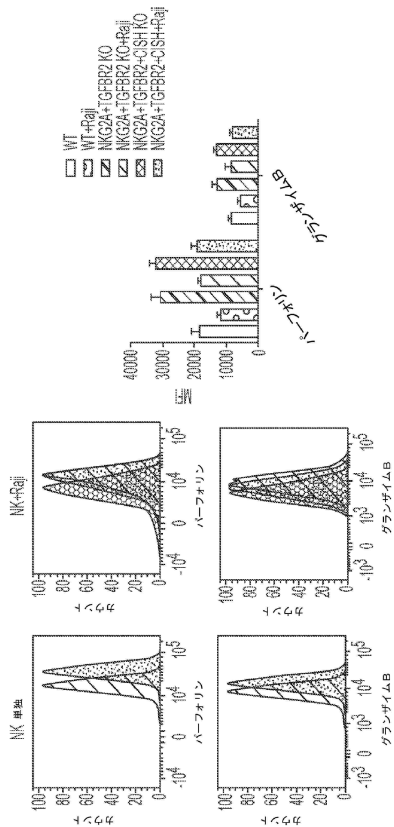


30

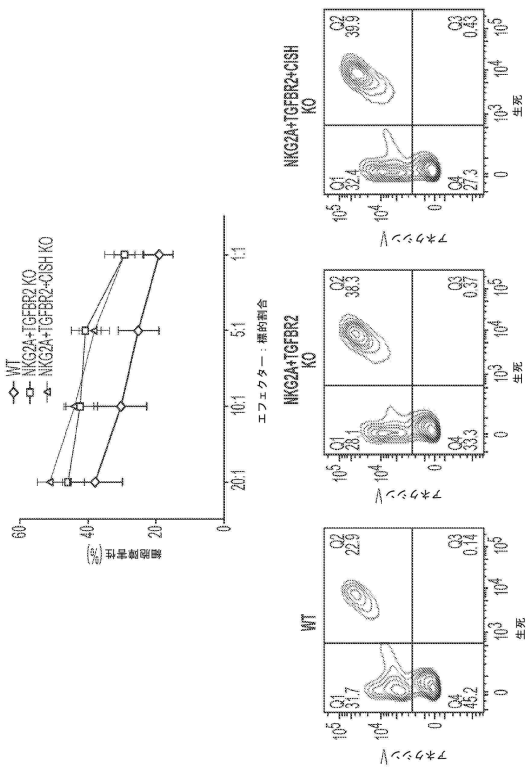
40

50

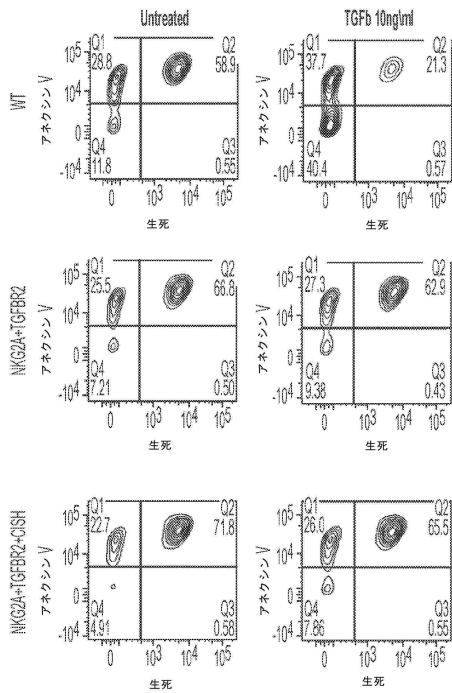
【図 16 - 2】



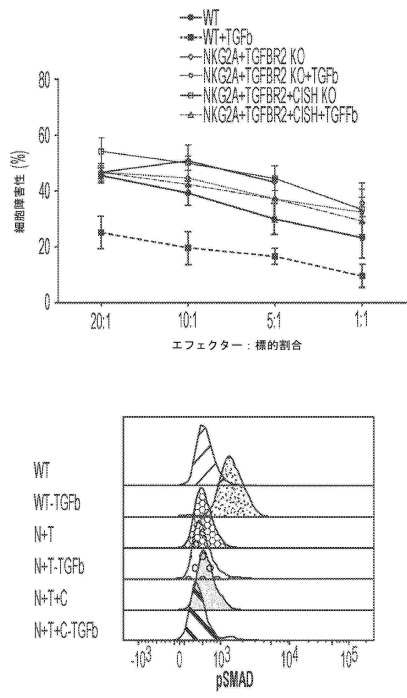
【図 16 - 3】



【図 17 - 1】



【図 17 - 2】



10

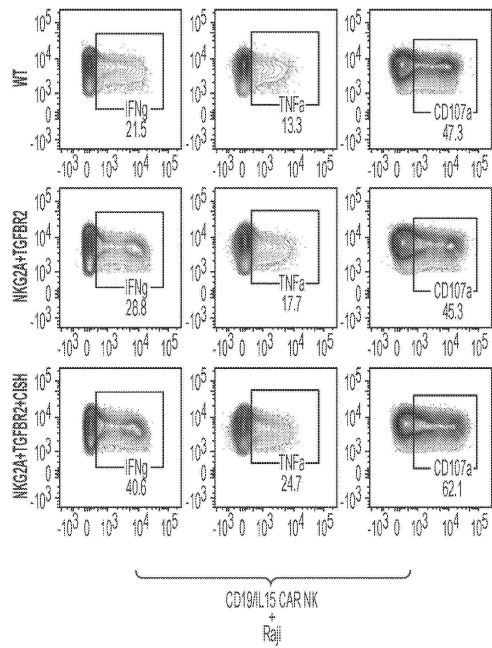
20

30

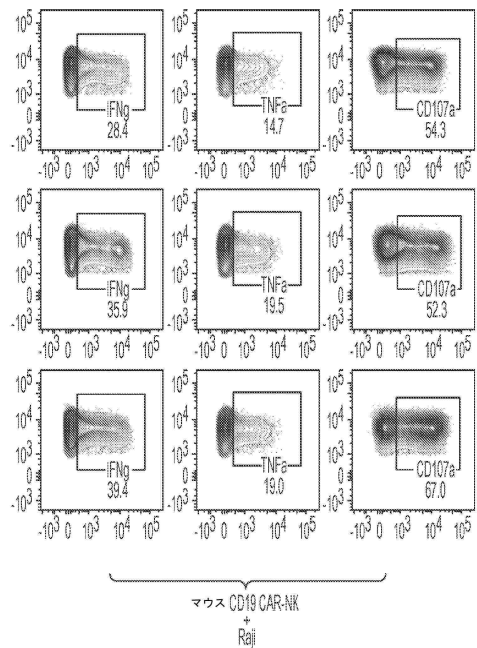
40

50

【図 18 - 1】



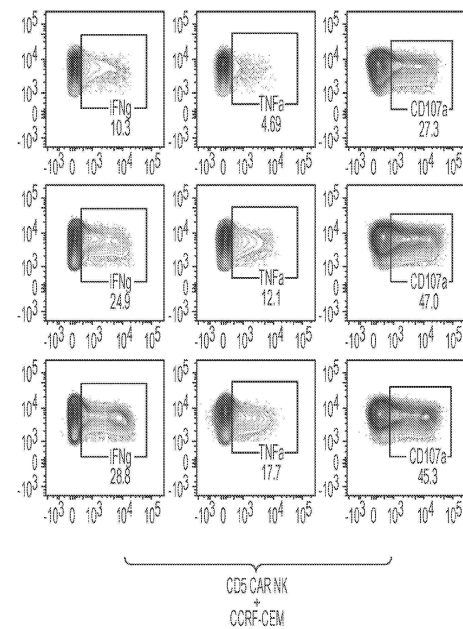
【図 18 - 2】



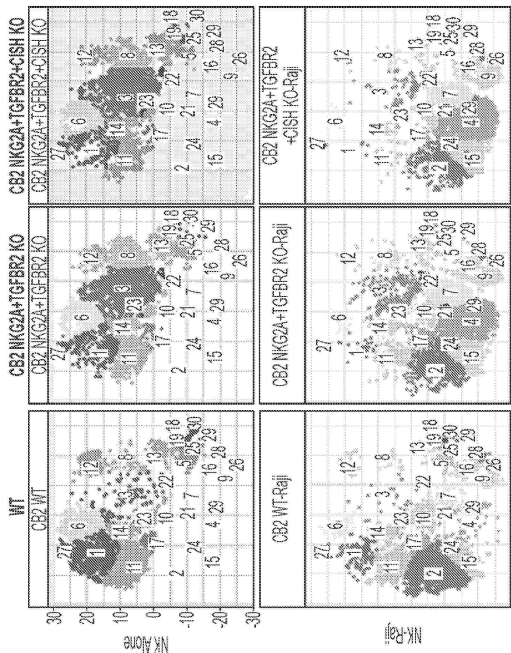
10

20

【図 18 - 3】



【図 19 - 1】

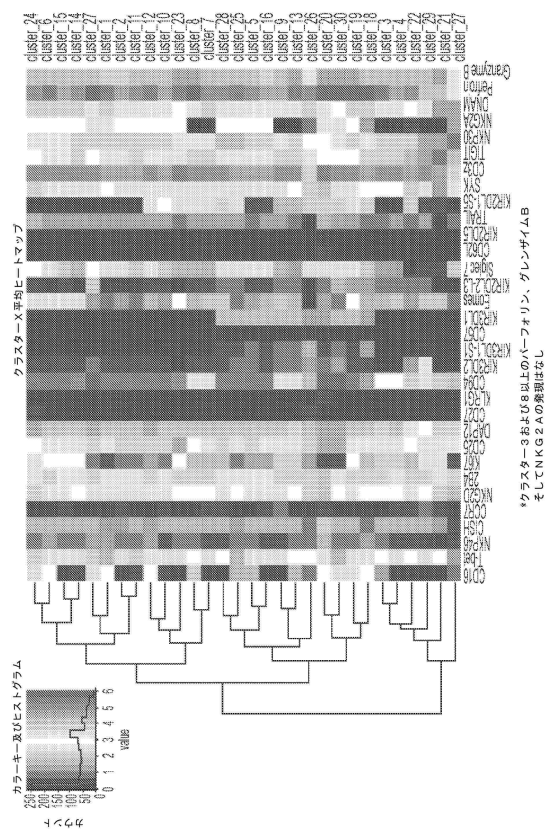


30

40

50

【 図 1 9 - 2 】



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 7 7 0 3 0、ヒューストン、ホルコム プールバード 1 5 1 5 ユニ
ット# 0 0 6 5、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 トランスプランテーション アンド セル セラピー内

(72)発明者 シュボール、エリザベス

アメリカ合衆国 テキサス州 7 7 0 3 0、ヒューストン、ホルコム プールバード 1 5 1 5 ユニ
ット# 0 0 6 5、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 トランスプランテーション アンド セル セラピー内

(72)発明者 レズヴァニ、ケイティ

アメリカ合衆国 テキサス州 7 7 0 3 0、ヒューストン、ホルコム プールバード 1 5 1 5 ユニ
ット# 0 0 6 5、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 トランスプランテーション アンド セル セラピー内

審査官 植原 克典

(56)参考文献

特表 2 0 1 6 - 5 2 4 4 6 4 (J P , A)
国際公開第 2 0 1 8 / 0 6 8 1 3 5 (W O , A 1)
特表 2 0 1 5 - 5 3 1 2 4 2 (J P , A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 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)