

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7664913号
(P7664913)

(45)発行日 令和7年4月18日(2025.4.18)

(24)登録日 令和7年4月10日(2025.4.10)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	14/705 (2006.01)	C 0 7 K	14/705
A 6 1 K	40/31 (2025.01)	A 6 1 K	40/31
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00
C 1 2 N	5/078 (2010.01)	C 1 2 N	5/078
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
請求項の数 19 (全102頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2022-521958(P2022-521958)	(73)特許権者	521439154
(86)(22)出願日	令和2年10月19日(2020.10.19)		フェイト セラビューティクス、インコ
(65)公表番号	特表2022-552314(P2022-552314		ーポレイテッド
	A)		アメリカ合衆国 9 2 1 3 1 カリフォル
(43)公表日	令和4年12月15日(2022.12.15)		ニア州, サン ディエゴ, スクリップス
(86)国際出願番号	PCT/US2020/056387		サミット ドライブ 1 2 2 7 8
(87)国際公開番号	WO2021/077117	(74)代理人	110001656
(87)国際公開日	令和3年4月22日(2021.4.22)		弁理士法人谷川国際特許事務所
審査請求日	令和5年10月19日(2023.10.19)	(72)発明者	バラマール, バーラム
(31)優先権主張番号	62/916,468		アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォル
(32)優先日	令和1年10月17日(2019.10.17)		ニア州, サン ディエゴ, スイート 2 0
(33)優先権主張国・地域又は機関			0, ジェネラル アトミクス コート 3
	米国(US)		5 3 5
(31)優先権主張番号	PCT/US2020/054601	(72)発明者	ビョーダール, リャン
(32)優先日	令和2年10月7日(2020.10.7)		アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォル
最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 免疫のための増強されたキメラ抗原受容体エフェクター細胞操作およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

キメラ抗原受容体であって、少なくとも1つの抗原認識ドメインを含むエクトドメインと、膜貫通ドメインと、少なくとも1つのシグナル伝達ドメインを含むエンドドメインと、を含み、

前記少なくとも1つのシグナル伝達ドメインが、Tおよび／またはNK細胞の活性化または機能に特異的なシグナル伝達タンパク質の細胞質ドメインに由来し、

前記キメラ抗原受容体が、該キメラ抗原受容体を含む人工多能性幹細胞（iPSC）から分化された派生エフェクター細胞に含まれる場合、末梢血、臍帯血、または任意の他のドナー組織から得られた一次免疫細胞と比較して、増加された細胞毒性を有し、

前記キメラ抗原受容体は、膜貫通ドメインと、以下の形態：CD28H－（CD28H－2B4）、CD28H－（CD28H－2B4－CD3ζ）、DNAM1－（DNAM1－CS1）、KIR2DS2－（KIR2DS2－DAP10－CD3ζ）、NKG2D－（2B4－CS1）及びNKG2D－（2B4－CS1－CD3ζ）のいずれかを含むエンドドメイン（TM－（エンドドメイン））を含む、キメラ抗原受容体。

【請求項2】

（a）前記シグナル伝達タンパク質が、2B4（ナチュラルキラー細胞受容体2B4）、4－1BB（腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー9）、CD16（IgGFc領域受容体IIII－A）、CD2（T細胞表面抗原CD2）、CD28（T細胞特異的表面糖タンパク質CD28）、CD28H（膜貫通型および免疫グロブリンドメイン含

有タンパク質 2)、CD3ζ (T細胞表面糖タンパク質 CD3ゼータ鎖)、DAP10 (造血細胞シグナルトランスデューサー)、DAP12 (TYROタンパク質チロシンキナーゼ結合タンパク質)、DNAM1 (CD226抗原)、FcERIγ (高親和性免疫グロブリンイプシロン受容体サブユニットガンマ)、IL21R (インターロイキン-21受容体)、IL-2Rβ / IL-15RB (インターロイキン-2受容体サブユニットベータ)、IL-2Rγ (サイトカイン受容体共通サブユニットガンマ)、IL-7R (インターロイキン-7受容体サブユニットアルファ)、KIR2DS2 (キラー細胞免疫グロブリン様受容体 2DS2)、NKG2D (NKG2-DタイプIIインテグラルメンブレンタンパク質)、NKP30 (天然細胞毒性誘発受容体3)、NKP44 (天然細胞毒性誘発受容体2)、NKP46 (天然細胞毒性誘発受容体1)、CS1 (SLAMファミリーメンバー7)、およびCD8 (T細胞表面糖タンパク質 CD8アルファ鎖) のうちのいずれか1つを含み、ならびに／あるいは

10

(b) 前記少なくとも1つのシグナル伝達ドメインが、それぞれ、配列番号21～41、54、および56によって表される、2B4、4-1BB、CD16、CD2、CD28、CD28H、CD3ζ、DAP10、DAP12、DNAM1、FcERIγ、IL21R、IL-2Rβ (IL-15Rβ)、IL-2Rγ、IL-7R、KIR2DS2、NKG2D、NKP30、NKP44、NKP46、CD3ζ1XX、CS1、もしくはCD8の細胞質ドメインに対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ならびに／あるいは

(c) 前記少なくとも1つのシグナル伝達ドメインが、2B4、CD28H、CD3ζ、DAP10、FcERIγ、KIR2DS2、NKG2D、CD3ζ、CD3ζ1XX、DNAM1、CS1、若しくはこれらの組合せの細胞質ドメインに対して90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のキメラ抗原受容体。

20

【請求項3】

前記少なくとも1つのシグナル伝達ドメインが、それぞれ、配列番号21～41、54、および56によって表される、2B4、4-1BB、CD16、CD2、CD28、CD28H、CD3ζ、DAP10、DAP12、DNAM1、FcERIγ、IL21R、IL-2Rβ (IL-15Rβ)、IL-2Rγ、IL-7R、KIR2DS2、NKG2D、NKP30、NKP44、NKP46、CD3ζ1XX、CS1、もしくはCD8の細胞質ドメインに対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記細胞質ドメインが、ITAM (免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ)、YxxMモチーフ、TxYxxV/Iモチーフ、FcRγ、ヘミITAM、および／またはIT様モチーフを含む、請求項2に記載のキメラ抗原受容体。

30

【請求項4】

前記エンドドメインが、第1のシグナル伝達ドメイン及び第2のシグナル伝達ドメインを含み、前記第1及び第2のシグナル伝達ドメインが、異なる、請求項1に記載のキメラ抗原受容体。

【請求項5】

(a) 前記第2のシグナル伝達ドメインが、それぞれ、配列番号21～41、54、および56によって表される、2B4、4-1BB、CD16、CD2、CD28、CD28H、CD3ζ、DAP10、DAP12、DNAM1、FcERIγ、IL21R、IL-2Rβ (IL-15Rβ)、IL-2Rγ、IL-7R、KIR2DS2、NKG2D、NKP30、NKP44、NKP46、CD3ζ1XX、CS1、もしくはCD8の細胞質ドメインに対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、又は

40

(b) それぞれ、配列番号21～41、54、および56によって表される、2B4、4-1BB、CD16、CD2、CD28、CD28H、CD3ζ、DAP10、DAP12、DNAM1、FcERIγ、IL21R、IL-2Rβ (IL-15Rβ)、IL-2Rγ、IL-7R、KIR2DS2、NKG2D、NKP30、NKP44、NKP46、CD3ζ1XX、CS1、もしくはCD8の細胞質ドメインに対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む第3のシグナル伝達ドメインを含む、

50

請求項 4 に記載のキメラ抗原受容体。

【請求項 6】

前記エンドドメインが、1つのシグナル伝達ドメインのみを含み、前記エンドドメインが、CS1の細胞質ドメインに対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のキメラ抗原受容体。

【請求項 7】

前記エンドドメインが、2つの異なるシグナル伝達ドメインを含み、前記エンドドメインが、CD28H-2B4、DNAM1-CS1 及び 2B4-CS1 の形態のうちのいずれか1つにおける融合細胞質ドメインを含む、請求項 4 に記載のキメラ抗原受容体。

【請求項 8】

前記エンドドメインが、3つの異なるシグナル伝達ドメインを含み、前記エンドドメインが、CD28H-2B4-CD3ζ、KIR2DS2-DAP10-CD3ζ 及び 2B4-CS1-CD3ζ の形態のうちのいずれか1つにおける融合細胞質ドメインを含む、請求項 4 に記載のキメラ抗原受容体。

【請求項 9】

前記膜貫通ドメインが、CD28H、KIR2DS2 又は NKG2D の膜貫通領域に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のキメラ抗原受容体。

【請求項 10】

前記膜貫通ドメインが、それぞれ、配列番号 6、10、16 及び 17 によってそれぞれ表される、CD28H、DNAM1、KIR2DS2 又は NKG2D の膜貫通領域に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のキメラ抗原受容体。

【請求項 11】

前記キメラ抗原受容体が、膜貫通ドメインおよびエンドドメイン（TM-（エンドドメイン））を含み、前記キメラ抗原受容体が、CD28H-（CD28H-2B4）、CD28H-（CD28H-2B4-CD3ζ）、DNAM1-（DNAM1-CS1）、DAP10-（DAP10-CD3ζ） 及び NKG2D-（2B4-CS1） の形態のうちの1つを含む、請求項 1 に記載のキメラ抗原受容体。

【請求項 12】

前記抗原認識ドメインが、疾患、病原体、液体腫瘍、または固形腫瘍に関連する抗原に特異的に結合する、請求項 1 に記載のキメラ抗原受容体。

【請求項 13】

前記抗原認識ドメインが、

(i) CD19、BCMA、CD20、CD22、CD38、CD123、HER2、CD52、EGFR、GD2、MICA/B、MSLN、VEGFR2、PSMA、および PDL1 のうちのいずれか1つ、または

(ii) ADGRE2、炭酸脱水酵素 IX (CAIX)、CCR1、CCR4、がん胎児性抗原 (CEA)、CD3、CD5、CD7、CD8、CD10、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD44V6、CD49f、CD56、CD70、CD74、CD99、CD123、CD133、CD138、CDS、CLEC12A、サイトメガロウイルス (CMV) 感染細胞の抗原、上皮糖タンパク質 2 (EGP2)、上皮糖タンパク質-40 (EGP-40)、上皮細胞接着分子 (EpCAM)、EGFRvIII、受容体チロシンタンパク質キナーゼ erbB2、3、4、EGFR、EGFR-VIII、ERBB 葉酸結合タンパク質 (FBP)、胎児のアセチルコリン受容体 (AChR)、葉酸受容体-a、ガングリオシド G2 (GD2)、ガングリオシド G3 (GD3)、ヒト上皮増殖因子受容体 2 (HER-2)、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT)、ICAM-1、インテグリン B7、インターロイキン-13 受容体サブユニットアルファ-2 (IL-13Rα2)、κ-軽鎖、キナーゼ挿入ドメイン受容体 (KDR)、ルイス A (CA19.9)、ルイス Y (LeY)、L

10

20

30

40

50

1 細胞接着分子 (L1-CAM)、LILRB2、黒色腫抗原ファミリーA1 (MAGE-A1)、MICA/B、ムチン1 (Muc-1)、ムチン16 (Muc-16)、メソセリン (MSLN)、NKCSI、NKG2Dリガンド、c-Met、がん-精巢抗原NY-ESO-1、腫瘍胎児性抗原 (h5T4)、PRAME、前立腺幹細胞抗原 (PSCA)、PRAME前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、腫瘍関連糖タンパク質72 (TAG-72)、TIM-3、TRBC1、TRBC2、血管内皮増殖因子R2 (VEGF-R2)、ウィルムス腫瘍タンパク質 (WT-1)、および病原体抗原のうちのいずれか1つに特異的である、請求項1に記載のキメラ抗原受容体。

【請求項14】

前記エクトドメインが、

(i) 2つの抗原認識ドメイン、

(ii) シグナルペプチド、および／または

(iii) スパーサー／ヒンジ、のうちの1つ以上を含む、請求項1に記載のキメラ抗原受容体。

【請求項15】

前記キメラ抗原受容体が、細胞表面発現外因性サイトカインまたはその受容体の部分的または全長ペプチドを共発現するバイシストロン性構築物に含まれ、前記外因性サイトカインまたはその受容体が、

(a) IL2、IL4、IL6、IL7、IL9、IL10、IL11、IL12、IL15、IL18、IL21、およびそのそれぞれの受容体のうちの少なくとも1つ、または

(b)

(i) 自己切断ペプチドを使用することによるIL15とIL15R α との共発現、

(ii) IL15とIL15R α との融合タンパク質、

(iii) 切断されたもしくは排除されたIL15R α の細胞内ドメインを有するIL15/IL15R α 融合タンパク質、

(iv) IL15とIL15R α の膜結合Sushiドメインとの融合タンパク質、

(v) IL15とIL15R β との融合タンパク質、

(vi) IL15と共通受容体 γ Cとの融合タンパク質であって、前記共通受容体 γ Cが、天然であるか、もしくは改変されている、融合タンパク質、ならびに

(vii) IL15R β のホモ二量体のうちの少なくとも1つを含む、請求項1に記載のキメラ抗原受容体。

【請求項16】

iPSC分化からの前記派生エフェクター細胞が、派生CD34細胞、派生造血幹細胞および前駆細胞、派生造血多分化能前駆細胞、派生T細胞前駆細胞、派生NK細胞前駆細胞、派生T細胞、派生NKT細胞、派生NK細胞、派生B細胞、または派生免疫エフェクター細胞のうちの1つ以上を含む、請求項1に記載のキメラ抗原受容体。

【請求項17】

前記iPSC派生エフェクター細胞が、前記キメラ抗原受容体を発現し、一次T、NK、および／またはNKT細胞には存在しない少なくとも1つの機能的特性を含む、請求項16に記載のキメラ抗原受容体。

【請求項18】

細胞またはその集団であって、

(i) 前記細胞が、免疫細胞、人工多能性細胞 (iPSC)、クローン iPSC、もしくは iPSC 細胞株細胞であるか、または前記細胞が、前記 iPSC を分化させることから得られた派生エフェクター細胞であり、

(ii) 前記細胞が、請求項1～17のいずれか一項に記載の少なくとも1つのキメラ抗原受容体 (CAR) を含む、細胞またはその集団。

【請求項19】

請求項18に記載の派生エフェクター細胞を含む組成物の、医薬の製造のための使用。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2019年10月17日に出願された米国仮特許出願第62/916,468号、及び2020年10月7日に出願された国際出願PCT/US20/54601の優先権を主張し、それらの開示は参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

電子的に提出された配列表への参照

本出願は、参照により、本出願とともに提出されたASCIIテキスト形式の配列表のコンピューター可読形式(CRF)を組み込んでおり、056932-530001WO__SEQUENCE__LISTING__ST25.txtと題する、2020年10月19日に作成され、サイズは92,883バイトである。

【0003】

本開示は、既製の免疫細胞製品の分野に広く関係している。より具体的には、本開示は、インビボで治療的に関連する特性を送達することができる多機能エフェクター細胞を開発するための戦略に関係している。本開示の下で開発された細胞製品は、患者由来の細胞療法の重大な制限に対処している。

【背景技術】

【0004】

養子細胞療法の分野は現在、患者由来およびドナー由来の細胞の使用に重点が置かれているため、がん免疫療法の一貫した製造を達成し、利益を得る可能性のあるすべての患者に治療を提供することが特に困難である。患者の良好な転帰を促進するために、養子移入されたリンパ球の有効性および持続性を改善する必要もある。T細胞およびナチュラルキラー(NK)細胞などのリンパ球は、自然免疫および獲得免疫において重要な役割を果たす強力な抗腫瘍エフェクターである。しかしながら、養子細胞療法のためのこれらの免疫細胞の使用は依然として困難であり、改善に対する満たされていない要求が存在する。したがって、養子免疫療法においてT細胞およびNK細胞、または他の免疫エフェクター細胞の可能性を最大限に利用する重要な機会が残っている。

【発明の概要】

【0005】

応答率、細胞枯渇、輸血された細胞の喪失(生存および/または持続性)、標的喪失または系譜転換による腫瘍エスケープ、腫瘍標的化の精度、標的外毒性、腫瘍外効果から、固形腫瘍に対する有効性、すなわち、腫瘍微小環境および関連する免疫抑制、動員、輸送、および浸潤に及ぶ問題に対処する機能的に改善されたエフェクター細胞が必要である。

【0006】

本発明の目的は、単一細胞由来のiPSC(人工多能性幹細胞)クローン株から分化した派生非多能性細胞を生成するための方法および組成物を提供することであり、iPSCはそのゲノムに1つまたはいくつかの遺伝子改変を含む。当該1つまたはいくつかの遺伝子改変には、DNAの挿入、欠失、および置換が含まれ、これらの改変は、分化、拡大、継代、および/または移植後の、その後の由来細胞において保持され、機能し続ける。

【0007】

本出願のiPSC由来の非多能性細胞には、CD34細胞、造血性内皮細胞、HSC(造血幹細胞および前駆細胞)、造血多分化能前駆細胞、T細胞前駆細胞、NK細胞前駆細胞、T細胞、NKT細胞、NK細胞、B細胞、ならびに一次NK、T、および/またはNKT細胞に存在する1つ以上の機能的特性を有する免疫エフェクター細胞が含まれるが、これらに限定されない。本出願のiPSC由来の非多能性細胞は、同じ遺伝子改変を含むiPSCからの分化を通じて、それらのゲノムに1つまたはいくつかの遺伝子改変を含む。遺伝子操作された派生細胞を得るための操作されたクローンiPSC分化戦略では、分化におけるiPSCの発生の可能性が、iPSCの操作されたモダリティによって悪影響

10

20

30

40

50

を受けないこと、および操作されたモダリティが派生細胞で意図したとおりに機能することも必要である。さらに、この戦略は、末梢血から得られたT細胞またはNK細胞などの初代リンパ球を操作する際の現在の障壁、すなわち、そのような細胞はしばしば、再現性と均一性を欠き、高い細胞死と低い細胞増殖を伴う不十分な細胞の持続性を呈する細胞をもたらす、そのような細胞を操作することが困難であることに起因する障壁を克服する。さらに、この戦略は、最初は不均一な一次細胞源を使用して別の方法で得られる不均一なエフェクター細胞集団の生成を回避する。

【0008】

本発明のいくつかの態様は、それぞれ、再プログラミングプロセスの後、それと同時、およびその前のゲノム操作の戦略を反映する、(I)、(II)、または(III)を含む方法を使用して得られたゲノム操作されたiPSCを提供する。

10

(I)：iPSCを(i)および(ii)のうち的一方または両方を任意の順序で遺伝子操作する：(i) 1つ以上の構築物をiPSCに導入して、選択した部位で標的化組み込みを可能にする、(ii) (a) 選択された部位の認識が可能な1つ以上のエンドヌクレアーゼを使用して、選択された部位に1つ以上の二本鎖切断をiPSCに導入する、(b) ステップ(I) (ii) (a) のiPSCを培養し、内因性DNA修復により、選択された部位で標的化されたイン／デルを生成できるようにする、それにより、部分的または完全に分化した細胞への分化が可能なゲノム操作されたiPSCを得る。

(II)：再プログラミング非多能性細胞を遺伝子操作して、ゲノム操作されたiPSCを得る：これには、(i) 非多能性細胞を1つ以上の再プログラミング因子、ならびに任意選択的に、非多能性細胞の再プログラミングを開始するためのTGFβ受容体／ALK阻害剤、MEK阻害剤、GSK3阻害剤および／またはROCK阻害剤を含む小分子組成物と接触させることと、(ii) ステップ(II) (i) の再プログラミング非多能性細胞に、(a) および(b)：(a) 選択された部位での標的化された組み込みを可能にする1つ以上の構築物、(b) 選択された部位認識が可能な少なくとも1つのエンドヌクレアーゼを使用して、選択された部位での1つ以上の二本鎖切断、の一方または両方を任意の順序で導入し、次いで、ステップ(II) (ii) (b) の細胞を培養して、内因性DNA修復により、選択された部位に標的化されたイン／デルを生成することができるようにすることと、が含まれ、したがって、得られるゲノム操作されたiPSCは少なくとも1つの機能的な標的化されたゲノム編集を含み、当該ゲノム操作されたiPSCは部分的または完全に分化した細胞に分化することができる。

20

30

(III)：再プログラミングするために非多能性細胞を遺伝子操作して、ゲノム操作されたiPSCを得る：これには、(i) 非多能性細胞に、(a) および(b)：(a) 選択された部位での標的化された組み込みを可能にする1つ以上の構築物、(b) 選択された部位認識が可能な少なくとも1つのエンドヌクレアーゼを使用して、選択された部位での1つ以上の二本鎖切断、の一方または両方を任意の順序で導入する(ステップ(III) (i) (b) の細胞を培養して、内因性DNA修復により、選択された部位に標的化されたイン／デルを生成することができるようにすることと、(ii) ステップ(III) (i) の細胞を、1つ以上の再プログラミング因子、ならびに任意選択的に、TGFβ受容体／ALK阻害剤、MEK阻害剤、GSK3阻害剤、および／またはROCK阻害剤を含む小分子組成物と接触させて、選択された部位に標的化された編集を含むゲノム操作されたiPSCを得ることと、の(i) および(ii) が含まれ、それにより、少なくとも1つの機能的な標的化されたゲノム編集を含むゲノム操作されたiPSCを得、当該ゲノム操作されたiPSCは、部分的に分化した細胞または完全に分化した細胞に分化することができる。

40

【0009】

上述の方法の一実施形態では、1つ以上の選択された部位での少なくとも1つの標的化されたゲノム編集は、安全スイッチタンパク質、標的化モダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬学的に活性なタンパク質およびペプチド、薬物標的候補、あるいは、ゲノム操作されたiPSCまたはその派生細胞の生着、輸送、ホーミング、生存能力、

50

自己複製、持続性、および／または生存を促進するタンパク質をコードする1つ以上の外因性ポリヌクレオチドの挿入を含む。いくつかの実施形態では、挿入のための外因性ポリヌクレオチドは、(1) CMV、EF1 α 、PGK、CAG、UBC、または他の構成的、誘導性、一過性、組織特異性、または細胞型特異性プロモーターを含む1つ以上の外因性プロモーター；あるいは(2) AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、ベータ2ミクログロブリン、GAPDH、TCR、またはRUNX1、またはゲノムセーフハーバーの基準を満たす他の遺伝子座を含む選択した部位に含まれる1つ以上の内因性プロモーターへと作動可能に連結される。いくつかの実施形態では、上述の方法を使用して生成されたゲノム操作されたiPSCは、カスパーゼ、チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、改変されたEGFR、またはB細胞CD20を含むタンパク質をコードする1つ以上の異なる外因性ポリヌクレオチドを含み、ここで、ゲノム操作されたiPSCが2つ以上の自殺遺伝子を含む場合、自殺遺伝子は、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、ベータ2ミクログロブリン、GAPDH、TCR、またはRUNX1を含む異なるセーフハーバー遺伝子座に組み込まれている。一実施形態では、外因性ポリヌクレオチドは、IL2、IL4、IL6、IL7、IL9、IL10、IL11、IL12、IL15、IL18、IL21、および／またはそれらのそれぞれの受容体の部分的または完全なペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、外因性ポリヌクレオチドによってコードされるIL2、IL4、IL6、IL7、IL9、IL10、IL11、IL12、IL15、IL18、IL21、および／またはそれらのそれぞれの受容体の部分的または完全なペプチドは、融合タンパク質の形態である。

【0010】

いくつかの他の実施形態では、本明細書で提供される方法を使用して生成されたゲノム操作されたiPSCは、標的化モダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬物標的候補、免疫応答調節および調整、あるいはiPSCまたはその派生細胞の生着、輸送、ホーミング、生存能力、自己複製、持続性、および／または生存を抑制するタンパク質に関連する1つ以上の内因性遺伝子におけるイン／デルを含む。いくつかの実施形態では、破壊のための内因性遺伝子は、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、CIITA、RFX5、RFXAP、および染色体6p21領域の任意の遺伝子のうちの少なくとも1つを含む。

【0011】

さらにいくつかの他の実施形態では、本明細書で提供される方法を使用して生成されたゲノム操作されたiPSCは、AAVS1遺伝子座に外因性ポリヌクレオチドをコードするカスパーゼ、およびH11遺伝子座に外因性ポリヌクレオチドをコードするチミジンキナーゼを含む。

【0012】

またいくつかの他の実施形態では、アプローチ(I)、(II)、および／または(III)は、ゲノム操作されたiPSCを、MEK阻害剤、GSK3阻害剤、およびROCK阻害剤を含む小分子組成物と接触させて、ゲノム操作されたiPSCの多能性を維持する。一実施形態では、少なくとも1つの標的化されたゲノム編集を含む、得られたゲノム操作されたiPSCは、機能的であり、分化能があり、同じ機能的なゲノム編集を含む非多能性細胞に分化することができる。

【0013】

本出願の一態様は、少なくとも1つの抗原認識ドメインを含む細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および少なくとも1つのシグナル伝達ドメインを含むエンドドメインを含むキメラ抗原受容体を提供し、少なくとも1つのシグナル伝達ドメインは、Tおよび／またはNK細胞の活性化または機能に特異的なシグナル伝達タンパク質の細胞質ドメインに由来し得、人工多能性幹細胞(iPSC)を含む場合、キメラ抗原受容体は、所望の派生エフェクター細胞に向けられたiPSCの分化を促進し、iPSCから分化したiPSC由来エフェクター細胞は、末梢血、臍帯血、または任意の他のドナー組織から得られた一次免

疫細胞と比較して、(i) 改善された持続性および／または生存、(ii) 改善された細胞増殖、(iii) 増加された細胞毒性、(iv) 増加されたアロ拒絶反応に対する耐性、(v) 改善された腫瘍浸潤、(vi) バイスタンダー免疫細胞を腫瘍部位に遊走させる、および／または活性化もしくは動員する増強された能力、ならびに(vii) 腫瘍免疫抑制を低減させる増強された能力、を含むが、これらに限定されない、特徴のうちの少なくとも1つを有する。様々な実施形態では、(a) シグナル伝達タンパク質は、2B4 (ナチュラルキラー細胞受容体2B4)、4-1BB (腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー9)、CD16 (IgG Fc領域受容体IIIA)、CD2 (T細胞表面抗原CD2)、CD28 (T細胞特異的表面糖タンパク質CD28)、CD28H (膜貫通型および免疫グロブリンドメイン含有タンパク質2)、CD3ζ (T細胞表面糖タンパク質CD3ゼータ鎖)、DAP10 (造血細胞シグナルトランスデューサー)、DAP12 (TYROタンパク質チロシンキナーゼ結合タンパク質)、DNAM1 (CD226抗原)、FcERIγ (高親和性免疫グロブリンイプシロン受容体サブユニットガンマ)、IL21R (インターロイキン-21受容体)、IL-2Rβ/IL-15RB (インターロイキン-2受容体サブユニットベータ)、IL-2Rγ (サイトカイン受容体共通サブユニットガンマ)、IL-7R (インターロイキン-7受容体サブユニットアルファ)、KIR2DS2 (キラー細胞免疫グロブリン様受容体2DS2)、NKG2D (NKG2-DタイプIIインテグラルメンブレンタンパク質)、NKP30 (天然細胞毒性誘発受容体3)、NKP44 (天然細胞毒性誘発受容体2)、NKP46 (天然細胞毒性誘発受容体1)、CS1 (SLAMファミリーメンバー7)、およびCD8 (T細胞表面糖タンパク質CD8アルファ鎖) のうちのいずれか1つを含む、ならびに／または(b) 少なくとも1つのシグナル伝達ドメインは、それぞれ、(a) 配列番号21~41、54、および56によって表される、2B4、4-1BB、CD16、CD2、CD28、CD28H、CD3ζ、DAP10、DAP12、DNAM1、FcERIγ、IL21R、IL-2Rβ (IL-15Rβ)、IL-2Rγ、IL-7R、KIR2DS2、NKG2D、NKP30、NKP44、NKP46、CD3ζ1XX、CS1、若しくはCD8；及び／又は(b) 2B4、CD28H、CD3ζ、DAP10、FcERIγ、KIR2DS2、NKG2D、CD3ζ、CD3ζ1XX、DNAM1、CS1の、細胞質ドメインもしくはその一部に対して少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、または約99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、少なくとも1つのシグナル伝達ドメインは、それぞれ、配列番号21~41、54、および56によって表される、2B4、4-1BB、CD16、CD2、CD28、CD28H、CD3ζ、DAP10、DAP12、DNAM1、FcERIγ、IL21R、IL-2Rβ (IL-15Rβ)、IL-2Rγ、IL-7R、KIR2DS2、NKG2D、NKP30、NKP44、NKP46、CD3ζ1XX、CS1、もしくはCD8の細胞質ドメインもしくはその一部に対して少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、または約99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、当該細胞質ドメインの部分は、ITAM (免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ)、YxxMモチーフ、TxYxxV/Iモチーフ、FcRγ、ヘミITAM、および／またはITT様モチーフを含む。

【0014】

様々な実施形態では、エンドドメインは、第1のシグナル伝達ドメイン、第2のシグナル伝達ドメイン、および任意選択的に第3のシグナル伝達ドメインを含み、第1、第2、および第3のシグナル伝達ドメインは、異なる。エンドドメインが、第2のシグナル伝達ドメイン、および任意選択的に第3のシグナル伝達ドメインを含むこれらの実施形態のうちのいくつかでは、第2または第3のシグナル伝達ドメインは、それぞれ、配列番号21~41、54、および56によって表される、2B4、4-1BB、CD16、CD2、CD28、CD28H、CD3ζ、DAP10、DAP12、DNAM1、FcERIγ、IL21R、IL-2Rβ (IL-15Rβ)、IL-2Rγ、IL-7R、KIR2DS2、NKG2D、NKP30、NKP44、NKP46、CD3ζ1XX、CS1、

もしくはCD8の細胞質ドメインもしくはその一部に対して少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、または約99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。様々な実施形態では、エンドドメインは、2つの異なるシグナル伝達ドメインを含み、当該エンドドメインドメインは、2B4-CD3ζ/1XX、2B4-DNAM1、2B4-FcERIγ、2B4-DAP10、CD16-DNAM1、CD16-DAP10、CD16-DAP12、CD2-CD3ζ/1XX、CD2-DNAM1、CD2-FcERIγ、CD2-DAP10、CD28-DNAM1、CD28-FcERIγ、CD28-DAP10、CD28-DAP12、CD28H-CD3ζ/1XX、DAP10-CD3ζ/1XX、DAP10-DAP12、DAP12-CD3ζ/1XX、DAP12-DAP10、DNAM1-CD3ζ/1XX、KIR2DS2-CD3ζ/1XX、KIR2DS2-DAP10、KIR2DS2-2B4、およびNKp46-2B4を含むが、これらに限定されない、形態のうちのいずれか1つにおける融合細胞質ドメインまたはその一部を含む。様々な実施形態では、エンドドメインは、3つの異なるシグナル伝達ドメインを含み、当該エンドドメインドメインは、2B4-DAP10-CD3ζ/1XX、2B4-IL21R-DAP10、2B4-IL2RB-DAP10、2B4-IL2RB-CD3ζ/1XX、2B4-41BB-DAP10、CD16-2B4-DAP10、およびKIR2DS2-2B4-CD3ζ/1XXから選択される形態のうちのいずれか1つにおける融合細胞質ドメインまたはその一部をさらに含む。

【0015】

10

いくつかの実施形態では、エンドドメインは、1つのシグナル伝達ドメインのみを含み、エンドドメインは、DNAM1、CD28H、KIR2DS2、DAP12、またはDAP10の細胞質ドメインもしくはその一部に対して少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、または約99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

20

【0016】

キメラ抗原受容体の様々な実施形態では、膜貫通ドメインは、CD2、CD3D、CD3E、CD3G、CD3ζ、CD4、CD8、CD8a、CD8b、CD16、CD27、CD28、CD28H、CD40、CD84、CD166、4-1BB、OX40、ICOS、ICAM-1、CTLA4、PD1、LAG3、2B4、BTLA、DNAM1、DAP10、DAP12、FcERIγ、IL7、IL12、IL15、KIR2DL4、KIR2DS1、KIR2DS2、NKp30、NKp44、NKp46、NKG2C、NKG2D、CS1、またはT細胞受容体ポリペプチドの膜貫通領域もしくはその一部に対して少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、または約99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。様々な実施形態では、膜貫通ドメインは、それぞれ、(a) 配列番号1~20、53、および55によって表される、2B4、CD2、CD16、CD28、CD28H、CD3ζ、DAP10、DAP12、DNAM1、FcERIγ、KIR2DS2、NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46、CS1、若しくはCD8；又は(b) DAP10、KIR2DS2、2B4、NKG2D、CD28H、及びDNAM1の膜貫通領域もしくはその一部に対して少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、または約99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。様々な実施形態では、膜貫通ドメインおよびその直接連結されたシグナル伝達ドメインは、同じタンパク質または異なるタンパク質に由来する。

30

40

【0017】

キメラ抗原受容体の様々な実施形態では、キメラ抗原受容体は、膜貫通ドメインおよびエンドドメイン(TM-(エンドドメイン))を含み、キメラ抗原受容体は、

(i) NKG2D-(2B4-IL2RB-CD3ζ)、CD8-(41BB-CD3ζ1XX)、CD28-(CD28-2B4-CD3ζ)、CD28H-(CD28H-CD3ζ)、CD28H-(CD28H-2B4)、CD28H-(CD28H-2B4-CD3ζ)、DNAM1-(DNAM1-CD3ζ)、DNAM1-(DNAM1-C

50

S1)、DAP10-(DAP10-CD3ζ)、KIR2DS2-(KIR2DS2-CD3ζ)、KIR2DS2-(KIR2DS2-DAP10)、KIR2DS2-(KIR2DS2-DAP10-CD3ζ)、KIR2DS2-(KIR2DS2-2B4)、CD16-(CD16-2B4-DAP10)、CD16-(CD16-DNAM1)、NKp46-(NKp46-2B4)、NKp46-(NKp46-2B4-CD3ζ)、NKp46-(NKp46-CD2-DAP10)、CD2-(CD2-CD3ζ)、2B4-(2B4-CD3ζ)、2B4-(2B4-FcERIg)、CS1-(CS1-CD3ζ)、NKG2D-(CS1)、NKG2D-(2B4-CS1)、及びNKG2D-(2B4-CS1-CD3ζ)の形態のうちの1つ、または

(ii) DAP10-(DAP10-CD3ζ)、KIR2DS2-(KIR2DS2-CD3ζ)、KIR2DS2-(KIR2DS2-DAP10)、KIR2DS2-(KIR2DS2-2B4)、2B4-(2B4-CD3ζ)、2B4-(2B4-FcERIg)、NKG2D-(2B4-CS1)、CD28H-(CD28H-2B4)、CD28H-(CD28H-2B4-CD3ζ)、及びDNAM1-(DNAM1-CS1)の形態のうちの1つ、または

(iii) 配列番号57~74の各々によって表される配列に対して約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0018】

キメラ抗原受容体の様々な実施形態では、抗原認識ドメインは、疾患、病原体、液体腫瘍、または固形腫瘍に関連する抗原と特異的に結合する。様々な実施形態では、抗原認識ドメインは、(i) CD19、BCMA、CD20、CD22、CD38、CD123、HER2、CD52、EGFR、GD2、MICA/B、MSLN、VEGF-R2、PSMA、およびPDL1のうちのいずれか1つ、または(ii) ADGRE2、炭酸脱水酵素IX(CALX)、CCR1、CCR4、がん胎児性抗原(CEA)、CD3、CD5、CD7、CD8、CD10、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD44V6、CD49f、CD56、CD70、CD74、CD99、CD123、CD133、CD138、CDS、CLEC12A、サイトメガロウイルス(CMV)感染細胞の抗原、上皮糖タンパク質2(EGP2)、上皮糖タンパク質-40(EGP-40)、上皮細胞接着分子(EpCAM)、EGFRvIII、受容体チロシンタンパク質キナーゼerbB-2、3、4、EGFR、EGFRvIII、ERBB葉酸結合タンパク質(FBP)、胎児のアセチルコリン受容体(AChR)、葉酸受容体-a、ガングリオシドG2(GD2)、ガングリオシドG3(GD3)、ヒト上皮増殖因子受容体2(HER-2)、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)、ICAM-1、インテグリンB7、インターロイキン-13受容体サブユニットアルファ-2(IL-13Rα2)、κ-軽鎖、キナーゼ挿入ドメイン受容体(KDR)、ルイスA(CA19.9)、ルイスY(LeY)、L1細胞接着分子(L1-CAM)、LILRB2、黒色腫抗原ファミリーA1(MAGE-A1)、MICA/B、ムチン1(Muc-1)、ムチン16(Muc-16)、メソセリン(MSLN)、NKCSI、NKG2Dリガンド、c-Met、がん-精巣抗原NY-ESO-1、腫瘍胎児性抗原(h5T4)、PRAME、前立腺幹細胞抗原(PSCA)、PRAME前立腺特異的膜抗原(PSMA)、腫瘍関連糖タンパク質72(TAG-72)、TIM-3、TRBC1、TRBC2、血管内皮増殖因子R2(VEGF-R2)、ウィルムス腫瘍タンパク質(WT-1)、および病原体抗原のうちのいずれか1つに特異的であり得る。

【0019】

キメラ抗原受容体の様々な実施形態では、エクストドメインは、(i) 2つの抗原認識ドメイン、(ii) シグナルペプチド、および/または(iii) スペーサー/ヒンジのうちの1つ以上を含む。いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体は、細胞表面発現外因性サイトカインまたはその受容体の部分的または完全長ペプチドを共発現するバイシストロン性構築物に含まれ得、外因性サイトカインまたはその受容体は、(a) IL2、IL

10

20

30

40

50

4、IL6、IL7、IL9、IL10、IL11、IL12、IL15、IL18、IL21、およびそのそれぞれの受容体のうちの少なくとも1つ、または(b)(i)自己切断ペプチドを用いることによるIL15とIL15R α の共発現、(ii)IL15とIL15R α との融合タンパク質、(iii)切断されたまたは排除されたIL15R α の細胞内ドメインを有するIL15/IL15R α 融合タンパク質、(iv)IL15とIL15R α の膜結合Sushiドメインの融合タンパク質、(v)IL15とIL15R β との融合タンパク質、(vi)IL15と共通受容体 γ Cとの融合タンパク質であって、共通受容体 γ Cは、天然であるか、もしくは改変されている、融合タンパク質、ならびに(vii)IL15R β のホモ二量体のうちの少なくとも1つを含む。

【0020】

キメラ抗原受容体が人工多能性幹細胞(iPSC)に含まれ、所望の派生エフェクター細胞に向けられたiPSCの分化を促進するこれらの実施形態のいくつかでは、iPSC分化からの派生エフェクター細胞は、派生CD34細胞、派生造血幹細胞および前駆細胞、派生造血多能性前駆細胞、派生T細胞前駆細胞、派生NK細胞前駆細胞、派生T細胞、派生NKT細胞、派生NK細胞、派生B細胞、または派生免疫エフェクター細胞のうちの1つ以上を含む。様々な実施形態では、iPSC由来免疫エフェクター細胞は、当該キメラ抗原受容体を発現し、iPSC由来免疫エフェクター細胞は、一次T、NK、および/またはNKT細胞には存在しない少なくとも1つの機能的特性を含む。

【0021】

別の態様では、本発明は、細胞またはその集団を提供し、(i)細胞は、免疫細胞、人工多能性細胞(iPSC)、クローンiPSC、またはiPSC細胞株細胞であり得るか、または細胞は、iPSCを分化させることから得られた派生エフェクター細胞であり得、(ii)細胞は、本明細書で提供される少なくとも1つのキメラ抗原受容体(CAR)を含む。様々な実施形態では、細胞は、(i)CD38ノックアウト、(ii)その対応する細胞と比較して、B2Mヌルまたは低、任意選択的にCIITAヌルまたは低、(iii)HLA-Gもしくは切断不可能なHLA-Gの導入された発現、またはCD58およびCD54の一方もしくは両方のノックアウト、(iv)CD16またはそのバリエーション、(v)異なるターゲティング特異性を有する第2のCAR、(vi)細胞表面発現外因性サイトカインおよび/またはその受容体の部分または完全ペプチド、(vii)表2に列挙されている遺伝子型のうちの少なくとも1つ、(viii)その対応する一次細胞と比較して、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCR、NKG2A、NKG2D、CD25、CD69、CD44、CD56、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、およびTIGITのうちの少なくとも1つにおける欠失または低減された発現、あるいは(ix)その対応する細胞と比較して、HLA-E、41BBL、CD3、CD4、CD8、CD16、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、A2AR、抗原特異的TCR、Fc受容体、エンゲージャー、およびアゴニストと結合するための表面トリガー受容体のうちの少なくとも1つにおける導入されたまたは増加した発現、のうちの1つ以上をさらに含む。

【0022】

様々な実施形態では、細胞は、高親和性の切断不可能なCD16(hnCD16)またはそのバリエーションをさらに含む。高親和性の切断不可能なCD16またはそのバリエーションのいくつかの実施形態は、(a)CD16のエクトドメインドメインにおけるF176VおよびS197P、(b)CD64に由来する完全または部分的なエクトドメイン、(c)非天然(または非CD16)膜貫通ドメイン、(d)非天然(または非CD16)細胞内ドメイン、(e)非天然(または非CD16)シグナル伝達ドメイン、(f)非天然刺激ドメイン、ならびに(g)CD16に由来せず、同じまたは異なるポリペプチドに由来する膜貫通、シグナル伝達、および刺激ドメイン、のうちの少なくとも1つを含む。特定の実施形態では、(a)非天然膜貫通ドメインは、CD3D、CD3E、CD3G、CD3 ζ 、CD4、CD8、CD8a、CD8b、CD27、CD28、CD40、CD84

10

20

30

40

50

、CD166、4-1BB、OX40、ICOS、ICAM-1、CTLA-4、PD-1、LAG-3、2B4、BTLA、CD16、IL7、IL12、IL15、KIR2DL4、KIR2DS1、NKP30、NKP44、NKP46、NKG2C、NKG2D、CS1、もしくはT細胞受容体(TCR)ポリペプチドに由来し得、(b)非天然刺激ドメインは、CD27、CD28、4-1BB、OX40、ICOS、PD-1、LAG-3、2B4、BTLA、DAP10、DAP12、CTLA-4、またはNKG2Dポリペプチドに由来し得、(c)非天然シグナル伝達ドメインは、CD3 ζ 、2B4、DAP10、DAP12、DNAM1、CD137(41BB)、IL21、IL7、IL12、IL15、NKP30、NKP44、NKP46、NKG2C、もしくはNKG2Dポリペプチドに由来し得るか、または(d)非天然膜貫通ドメインは、NKG2Dに由来し得、非天然刺激ドメインは、2B4に由来し得、非天然シグナル伝達ドメインは、CD3 ζ に由来し得る。

【0023】

様々な実施形態では、細胞は、第2のCARをさらに含み、第2のCARは、(i)T細胞特異的もしくはNK細胞特異的、(ii)二重特異性抗原結合CAR、(iii)切り替え可能なCAR、(iv)二量体化されたCAR、(v)分割CAR、(vi)多鎖CAR、(vii)誘導性CAR、(viii)細胞表面発現外因性サイトカインおよび／もしくはその受容体の部分的もしくは完全なペプチドと、任意選択的に別個の構築物もしくはバイシストロン性構築物において共発現され、(xi)チェックポイント阻害剤と、任意選択的に別個の構築物もしくはバイシストロン性構築物において共発現され、(xii)CD19、BCMA、CD20、CD22、CD38、CD123、HER2、CD52、EGFR、GD2、MICA/B、MSLN、VEGFR2、PSMA、およびPDL1のうちの少なくとも1つに特異的であり、ならびに／または(xiii)ADGRE2、炭酸脱水酵素IX(CALX)、CCR1、CCR4、がん胎児性抗原(CEA)、CD3、CD5、CD7、CD8、CD10、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD44V6、CD49f、CD56、CD70、CD74、CD99、CD123、CD133、CD138、CDS、CLEC12A、サイトメガロウイルス(CMV)感染細胞の抗原、上皮糖タンパク質2(EGP2)、上皮糖タンパク質-40(EGP-40)、上皮細胞接着分子(EpCAM)、EGFRvIII、受容体チロシンタンパク質キナーゼerbB-2、3、4、EGFR、EGFR-VIII、ERBB葉酸結合タンパク質(FBP)、胎児のアセチルコリン受容体(AChR)、葉酸受容体-a、ガングリオシドG2(GD2)、ガングリオシドG3(GD3)、ヒト上皮増殖因子受容体2(HER-2)、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)、ICAM-1、インテグリンB7、インターロイキン-13受容体サブユニットアルファ-2(IL-13R α 2)、 κ -軽鎖、キナーゼ挿入ドメイン受容体(KDR)、ルイスA(CA19.9)、ルイスY(LeY)、L1細胞接着分子(L1-CAM)、LILRB2、黒色腫抗原ファミリーA1(MAGE-A1)、MICA/B、ムチン1(Muc-1)、ムチン16(Muc-16)、メソセリン(MSLN)、NKCSI、NKG2Dリガンド、c-Met、がん-精巣抗原NY-ESO-1、腫瘍胎児性抗原(h5T4)、PRAME、前立腺幹細胞抗原(PSCA)、PRAME前立腺特異的膜抗原(PSMA)、腫瘍関連糖タンパク質72(TAG-72)、TIM-3、TRBC1、TRBC2、血管内皮増殖因子R2(VEGFR2)、ウィルムス腫瘍タンパク質(WT-1)、および病原体抗原のうちのいずれか1つに特異的である。

【0024】

様々な実施形態では、細胞は、細胞表面発現の外因性サイトカインおよび／またはその受容体の部分的もしくは完全なペプチドを含み、外因性サイトカインまたはその受容体は、(a)IL2、IL4、IL6、IL7、IL9、IL10、IL11、IL12、IL15、IL18、IL21、およびそのそれぞれの受容体のうちの少なくとも1つを含むか、または(b)(i)自己切断ペプチドを使用することによってIL15およびIL15R α の共発現、(ii)IL15とIL15R α との融合タンパク質、(iii)切

10

20

30

40

50

断されたまたは排除された I L 1 5 R α の細胞内ドメインを有する I L 1 5 / I L 1 5 R α 融合タンパク質、(i v) I L 1 5 と I L 1 5 R α との膜結合 S u s h i ドメインの融合タンパク質、(v) I L 1 5 と I L 1 5 R β との融合タンパク質、(v i) I L 1 5 と共通受容体 γ C との融合タンパク質であって、共通受容体 γ C が、天然であるか、もしくは改変されている、融合タンパク質ならびに (v i i) I L 1 5 R β のホモ二量体、のうちの少なくとも1つを含み、(i) ~ (v i i) のうちのいずれか1つは、別個の構築物で、またはバイシストロン性構築物において、C A R と共発現され得、任意選択的に、(c) 一過性発現される。

【0025】

細胞またはその集団が派生エフェクター細胞であるいくつかの実施形態では、派生エフェクター細胞は、造血細胞であり得、末梢血、臍帯血、または任意の他のドナー組織から得られる対応する一次細胞と比較してより長いテロメアを含むか、または、C A R は、以下の特徴：(i) T もしくは N K 細胞に特異的であること、(i i) 抗原結合において二重特異性であること、(i i i) 切り替え可能な C A R であること、(i v) 二量体化された C A R であること、(v) 分割 C A R であること、(v i) 多鎖 C A R であること、(v i i) 誘導性 C A R であること、および (v i i i) B 2 M 、 T A P 1 、 T A P 2 、 タパシン、N L R C 5 、 C I I T A 、 R F X A N K 、 R F X 5 、 R F X A P 、 T C R α もしくは β 定常領域、N K G 2 A 、 N K G 2 D 、 C D 3 8 、 C D 2 5 、 C D 6 9 、 C D 4 4 、 C D 5 8 、 C D 5 4 、 C D 5 6 、 C I S 、 C B L - B 、 S O C S 2 、 P D 1 、 C T L A 4 、 L A G 3 、 T I M 3 、または T I G I T の遺伝子遺伝子座のうちの1つに挿入されることであり得、挿入が遺伝子座の遺伝子の発現をノックアウトするもしくは低減する、挿入されること、のうちの少なくとも1つを有する。様々な実施形態では、派生エフェクター細胞は、T細胞を腫瘍部位に動員および／または遊走させることができ得、派生エフェクター細胞は、1つ以上のチェックポイント阻害剤の存在下で腫瘍の免疫抑制を低減させることができ得る。様々な実施形態では、派生エフェクター細胞は、派生 C D 3 4 細胞、派生造血幹細胞および前駆細胞、派生造血多分化能前駆細胞、派生 T 細胞前駆細胞、派生 N K 細胞前駆細胞、派生 T 細胞、派生 N K T 細胞、派生 N K 細胞、派生 B 細胞、または派生免疫エフェクター細胞を含む。

【0026】

細胞細胞がチェックポイント阻害剤と共発現される第2の C A R をさらに含む、または派生エフェクター細胞が1つ以上のチェックポイント阻害剤の存在下で腫瘍免疫抑制を低減させることができるこれらの実施形態のいくつかでは、チェックポイント阻害剤は、P D - 1 、 P D L - 1 、 T I M - 3 、 T I G I T 、 L A G - 3 、 C T L A - 4 、 2 B 4 、 4 - 1 B B 、 4 - 1 B B L 、 A 2 a R 、 B A T E 、 B T L A 、 C D 3 9 、 C D 4 7 、 C D 7 3 、 C D 9 4 、 C D 9 6 、 C D 1 6 0 、 C D 2 0 0 、 C D 2 0 0 R 、 C D 2 7 4 、 C E A C A M 1 、 C S F - 1 R 、 F o x p l 、 G A R P 、 H V E M 、 I D O 、 E D O 、 T D O 、 L A I R - 1 、 M I C A / B 、 N R 4 A 2 、 M A F B 、 O C T - 2 、 R a r a (レチノイン酸受容体アルファ) 、 T L R 3 、 V I S T A 、 N K G 2 A / H L A - E 、および阻害性 K I R を含む1つ以上のチェックポイント分子に対するアンタゴニストであり得る。様々な実施形態では、チェックポイント阻害剤は、(a) アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、イピリムマブ、I P H 4 1 0 2 、 I P H 4 3 、 I P H 3 3 、リリムマブ、モナリズマブ、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、およびそれらの誘導体もしくは機能的同等物のうちの1つ以上、または(b) アテゾリズマブ、ニボルマブ、およびペムブロリズマブのうちの少なくとも1つを含む。

【0027】

細胞またはその集団のこれらの実施形態のいくつかでは、派生エフェクター細胞は、末梢血、臍帯血、または任意の他のドナー組織から得られたその対応する一次細胞と比較して、(i) 改善された持続性および／もしくは生存、(i i) 増加されたアロ反応性レシピエント免疫細胞に対する耐性、(i i i) 増加された細胞毒性、(i v) 改善された腫瘍湿潤、(v) 増強または獲得された A D C C 、(v i) バイスタンダー免疫細胞を腫瘍

10

20

30

40

50

部位に遊走させる、および／または活性化もしくは動員する増強された能力、(v i i) 腫瘍免疫抑制を低減させる増強された能力、(v i i i) 腫瘍抗原逃避の救済における改善した能力、(i x) 腫瘍抗原を安定化する能力、ならびに(x) フラトリサイドを回避する能力、の特徴のうちの少なくとも1つを有する。

【0028】

細胞またはその集団のいくつかの実施形態では、細胞は、(i) セーフハーバー遺伝子座または選択された遺伝子座に組み込まれた1つ以上の外因性ポリヌクレオチド、または(i i) 異なるセーフハーバー遺伝子座または2つを超える選択された遺伝子座に組み込まれた2つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、セーフハーバー遺伝子座は、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、GAPDH、またはRUNX1のうちの少なくとも1つを含み得、選択された遺伝子座は、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCR、NKG2A、NKG2D、CD38、CD25、CD69、CD44、CD58、CD54、CD56、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、またはTIGITのうちの1つであり得、外因性ポリヌクレオチドの組み込みは、遺伝子座における遺伝子の発現をノックアウトする。遺伝子座がTCRである実施形態では、TCR遺伝子座は、TCRアルファまたはTCRベータの定常領域であり得る。

【0029】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載の細胞またはその集団を含む組成物を提供する。関連する態様では、本発明は、本明細書で提供される派生エフェクター細胞、および1つ以上の治療薬を含む治療用途のための組成物を提供する。様々な実施形態では、1つ以上の治療薬は、ペプチド、サイトカイン、チェックポイント阻害剤、マイトジェン、成長因子、小RNA、dsRNA(二本鎖RNA)、単核血液細胞、フィーダー細胞、フィーダー細胞構成要素もしくはその置換因子、目的の1つ以上のポリ核酸を含むベクター、抗体またはその機能的バリエーションもしくは断片、化学療法剤もしくは放射性部分、または免疫調節薬(IMiD)を含む。組成物がチェックポイント阻害剤を含むこれらの実施形態のいくつかにおいて、チェックポイント阻害剤は、(a) PD-1、PDL-1、TIM-3、TIGIT、LAG-3、CTLA-4、2B4、4-1BB、4-1BBL、A2aR、BATE、BTLA、CD39、CD47、CD73、CD94、CD96、CD160、CD200、CD200R、CD274、CEACAM1、CSF-1R、Foxp1、GARP、HVEM、IDO、EDO、TDO、LAIR-1、MICA/B、NR4A2、MAFB、OCT-2、Rara(レチノイン酸受容体アルファ)、TLR3、VISTA、NKG2A/HLA-E、または阻害性KIRを含むチェックポイント分子に対する1つ以上のアンタゴニスト、(b) アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、イピリムマブ、IPH4102、IPH43、IPH33、リリムマブ、モナリズマブ、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、およびそれらの誘導体または機能的同等物のうちの1つ以上、または(c) アテゾリズマブ、ニボルマブ、およびペムブロリズマブの少なくとも1つを含み得るか、または、1つ以上の治療薬は、ベネトクラクス、アザシチジン、およびボマリドマイドのうちの1つ以上を含む。組成物が抗体を含むこれらの実施形態のいくつかでは、抗体は、(a) 抗CD20、抗HER2、抗CD52、抗EGFR、抗CD123、抗GD2、抗PDL1、および／または抗CD38抗体、(b) リツキシマブ、ベルツズマブ、オフアツムマブ、ウブリツキシマブ(ublituximab)、オカラツズマブ(ocaratuzumab)、オビヌツズマブ、トラスツズマブ、ペルツズマブ、アレムツズマブ、セルツキシマブ(certuximab)、ジヌツキシマブ、アベルマブ、ダラツムマブ、イサツキシマブ、MOR202、7G3、CSL362、エロツズマブ、およびそれらのヒト化もしくはFc改変されたバリエーションもしくは断片、ならびにそれらの機能的同等物およびバイオシミラーのうちの1つ以上、または(c) ダラツムマブ、およびCD38ノックアウトを含む派生エフェクター細胞、ならびに任意選択的にCD16またはそのバリエーションの発現を含み得る。

10

20

30

40

50

【0030】

別の態様では、本発明は、養子細胞療法に好適な対象に組成物を導入することによる、本明細書で提供される組成物の治療用途を提供し、対象は、自己免疫障害、血液悪性腫瘍、固形腫瘍、がん、またはウイルス感染を有する。

【0031】

さらに別の態様では、本発明は、本明細書に記載のCARを含む派生エフェクター細胞を製造する方法を提供し、この方法は、遺伝子操作されたiPSCを分化させることを含み、iPSCは、CARをコードするポリヌクレオチドを含み、任意選択的に、1つ以上の編集により、(i) CD38ノックアウト、(ii) その対応する細胞と比較して、B2Mヌルまたは低、任意選択的にCIITAヌルまたは低、(iii) HLA-Gもしくは切断不可能なHLA-Gの導入された発現、またはCD58およびCD54の一方もしくは両方のノックアウト、(iv) CD16またはそのバリエーション、(v) 異なるターゲティング特異性を有するキメラ抗原受容体(CAR)、(vi) 細胞表面発現外因性サイトカインまたはその受容体の部分または完全ペプチド、(vii) 表2に列挙されている遺伝子型のうちの少なくとも1つ、(viii) その対応する一次細胞と比較して、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCR α もしくは β 定常領域、NKG2A、NKG2D、CD25、CD69、CD44、CD56、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、およびTIGITのうちの少なくとも1つにおける欠失または低減された発現、ならびに／あるいは(ix) その対応する一次細胞と比較して、HLA-E、41BBL、CD3、CD4、CD8、CD16、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、A2AR、抗原特異的TCR、Fc受容体、エンゲージャー、および二重もしくは多重特異性またはユニバーサルエンゲージャーと結合するための表面トリガー受容体のうちの少なくとも1つにおける導入されたまたは増加した発現、をもたらす。様々な実施形態では、この方法は、クローンiPSCをゲノム操作して、CARをコードするポリヌクレオチドをノックインすること、ならびに任意選択的に、(i) CD38をノックアウトすること、(ii) B2MおよびCIITAをノックアウトすること、(iii) CD58およびCD54の一方または両方をノックアウトすること、ならびに／または(iv) HLA-Gもしくは切断不可能なHLA-G、高親和性の切断不可能なCD16もしくはそのバリエーション、第2のCAR、および／または細胞表面発現外因性サイトカインもしくはその受容体の部分的もしくは完全なペプチドの発現を導入すること、をさらに含む。いくつかの実施形態では、ゲノム操作は、標的化された編集を含む。特定の実施形態では、標的化された編集は、欠失、挿入、またはイン／デルを含み、標的化された編集は、CRISPR、ZFN、TALEN、ホーミングヌクレアーゼ、相同組換え、またはこれらの方法の任意の他の機能的変形によって実施され得る。

【0032】

さらに別の態様では、本発明は、クローンiPSCのCRISPR媒介編集を提供し、編集は、本明細書に記載のCARをコードするポリヌクレオチドのノックインを含む。様々な実施形態では、クローンiPSCの編集は、CD38をノックアウトすることをさらに含み、CARは、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCR α もしくは β 定常領域、NKG2A、NKG2D、CD38、CD25、CD69、CD44、CD58、CD54、CD56、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、またはTIGITを含む遺伝子座のうちの1つに挿入され得、挿入は、遺伝子座の遺伝子の発現をノックアウトする。

【0033】

さらに別の態様では、本発明は、本明細書に記載のCARを含む細胞を、治療を必要とする対象に投与することを含む、疾患または状態を治療する方法を提供する。様々な実施形態では、細胞は、CD38ノックアウト、CD16またはそのバリエーションを含む派生エフェクター細胞を含み、任意選択的に、(i) B2MおよびCIITAノックアウト、(

i i) H L A - G もしくは切断不可能な H L A - G の導入された発現、または C D 5 8 および C D 5 4 の一方または両方のノックアウト、(i i i) 第 2 の C A R の導入された発現、および／または細胞表面発現外因性サイトカインもしくはその受容体の部分もしくは完全ペプチド、ならびに／または(i i i) 表 2 に列挙されている遺伝子型の少なくとも 1 つ、を含み得る。様々な実施形態では、細胞の投与は、本明細書に記載の C A R なしでエフェクター細胞を使用する治療と比較して、(i) M I C A / B 抗原の腫瘍細胞表面シエディングを低減すること、(i i) 腫瘍細胞表面 M I C A / B 密度を増加すること、(i i i) 腫瘍抗原逃避を防ぐこと、(i v) 腫瘍微小環境抑制を克服すること、(v) エフェクター細胞の活性化および殺滅機能を増強すること、ならびに(v i) インビボ腫瘍進行制御、腫瘍細胞負荷の低減、腫瘍クリアランス、および／または改善された生存率、のうちの 1 つ以上をもたらす。

10

【 0 0 3 4 】

本明細書で提供される組成物および方法の様々な目的および利点は、例示および例として、本発明のある特定の実施形態が示される添付の図面と併せて以下の説明から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 5 】

【図 1】 i P S C 由来細胞における細胞表面発現のサイトカインのためのいくつかの構築物設計の図解である。I L 1 5 は例示的な例として使用されており、他の望ましいサイトカインに置き換えることができる。

20

【図 2 A】 同一の s c F v および C D 8 ヒンジ領域を有し、エンドドメインを含むシグナル伝達構成要素のみが異なる C A R 構築物を例示する。

【図 2 B】 同上。

【図 2 C】 同上。

【図 3 A】 T h y 1 . 1 発現の F A C S ソーティングおよび C A R 抗体染色を用いたレンチウイルス形質導入後、i P S C 派生細胞が標的的特異的 C A R を安定して発現することを示す。

【図 3 B】 同上。

【図 3 C】 同上。

【図 3 D】 同上。

30

【図 3 E】 同上。

【図 3 F】 同上。

【図 3 G】 同上。

【図 3 H】 同上。

【図 3 I】 同上。

【図 4】 図 4 A は M M . 1 S 標的細胞に対する、i P S C 誘導エフェクター細胞中で構築された種々の C A R 構築物の、多発性骨髄腫抗原特異的細胞障害アッセイを示す図である。図 4 B は示した C A R の殺滅高率を示す 1 / E C 5 0 を示す図である。

【図 5】 フローサイトメトリーにより決定されたテロメア長のグラフ表示であり、これは、i P S C 由来の成熟派生 N K 細胞が、成体末梢血 N K 細胞と比較してより長いテロメアを維持していることを示す。

40

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 6 】

i P S C (人工多能性幹細胞) のゲノム改変には、ポリヌクレオチドの挿入、欠失、および置換が含まれる。ゲノム操作された i P S C における外因性遺伝子発現は、元のゲノム操作された i P S C の長期クローン拡大後、細胞分化後、およびゲノム操作された i P S C に由来する細胞からの脱分化細胞型において、遺伝子サイレンシングまたは遺伝子発現の低減などの問題に遭遇することが多い。一方、T 細胞または N K 細胞などの初代免疫細胞を直接操作することは困難であり、養子細胞療法のための操作された免疫細胞の調製および送達に障害をもたらす。本発明は、自殺遺伝子および他の機能的モダリティを含む

50

1つ以上の外因性遺伝子を安定的に組み込むための効率的で信頼できる標的化アプローチを提供し、これは生着、輸送、ホーミング、遊走、細胞毒性、生存能力、維持、増殖、寿命、自己複製、持続性、および／または生存に関する改善された治療的特性を、HSC（造血幹細胞および前駆細胞）、T細胞前駆細胞、NK細胞前駆細胞、T細胞、NK T細胞、NK細胞を含むが、これらに限定されないiPSC派生細胞にもたらす。

【0037】

定義

本明細書で別段の定義がない限り、本出願に関連して使用される科学用語および技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。さらに、文脈上別段の必要がない限り、単数形には複数形が含まれ、複数形には単数形が含まれるものとする。

10

【0038】

本発明は、本明細書に記載される特定の方法論、プロトコル、および試薬などに限定されず、したがって異なり得ることを理解されたい。本明細書で使用される用語は、単に特定の実施形態を説明することを目的としており、特許請求の範囲によってのみ定義される本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

【0039】

本明細書で使用される場合、「a」、「an」、および「the」という冠詞は、冠詞の文法的目的語の1つまたは2つ以上（すなわち、少なくとも1つ）を指すために本明細書で使用される。例として、「要素」は、1つの要素または2つ以上の要素を意味する。

【0040】

20

代替案（例えば、「または」）の使用は、代替案の一方、両方、またはそれらの任意の組み合わせを意味すると理解されるべきである。

【0041】

「および／または」という用語は、代替案の一方または両方のいずれかを意味すると理解されるべきである。

【0042】

本明細書で使用される場合、「約」または「およそ」という用語は、参照の数量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量、または長さと比較して、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、または1%まで変動する数量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量、または長さを指す。一実施形態では、「約」または「およそ」という用語は、参照の数量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量、または長さの、±15%、±10%、±9%、±8%、±7%、±6%、±5%、±4%、±3%、±2%、または±1%の数量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量、または長さの範囲を指す。

30

【0043】

本明細書で使用される場合、「実質的に」または「本質的に」という用語は、参照の数量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量、または長さと比較して、約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%以上の数量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量、または長さを指す。一実施形態では、「本質的に同じ」または「実質的に同じ」という用語は、参照の数量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量、または長さとはほぼ同じ数量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量、または長さの範囲を指す。

40

【0044】

本明細書で使用される場合、「実質的に含まない」および「本質的に含まない」という用語は交換可能に使用され、細胞集団または培養培地などの組成物を説明するために使用される場合、特定の物質またはその供給源を含まない、例えば、特定の物質またはその供給源を95%含まない、96%含まない、97%含まない、98%含まない、99%含まないか、または従来手段によって測定されるとき検出不能である組成物を指す。組成物

50

中のある特定の成分または物質を「含まない」または「本質的に含まない」という用語はまた、そのような成分または物質が、（１）任意の濃度で組成物に含まれない、または（２）機能的に不活性だが、低濃度で組成物に含まれることを意味する。同様の意味は、「不在」という用語に適用することができ、特定の物質または組成物のその供給源が不在であることを指す。

【００４５】

本明細書全体を通して、文脈上別段の必要がない限り、「含む（comprise）」、「含む（comprises）」、および「含む（comprising）」という用語は、記載されたステップもしくは要素またはステップもしくは要素の群を含むことを意味するが、任意の他のステップもしくは要素またはステップもしくは要素の群を除外することを意味しないと理解される。特定の実施形態では、「含む（include）」、「有する」、「含有する」、および「含む（comprise）」という用語は、同義語として使用される。

10

【００４６】

「からなる」とは、「からなる」という句に続くものを含み、これに限定されることを意味する。したがって、「からなる」という句は、列記された要素が必要または必須であり、他の要素が存在し得ないことを示す。

【００４７】

「本質的にからなる」とは、句の後に列記された任意の要素を含むことを意味し、列記される要素の開示において特定された活性または動作に干渉または寄与しない他の要素に限定される。したがって、「本質的にからなる」という句は、列記される要素が必要または必須であることを示すが、他の要素は任意選択的ではなく、列記された要素の活性または動作に影響を及ぼすか否かに応じて存在しても存在しなくてもよい。

20

【００４８】

本明細書全体を通して、「一実施形態」、「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への言及は、実施形態に関連して説明される特定の特色、構造、または特徴は、本発明の少なくとも１つの実施形態に含まれる。したがって、本明細書全体を通して様々な場所での前述の句の出現は、必ずしもすべてが同じ実施形態を参照しているわけではない。さらに、特定の特色、構造、または特徴は、１つ以上の実施形態において任意の好適な方法で組み合わせることができる。

30

【００４９】

「エキスピボ」という用語は、一般に、好ましくは自然条件の改変を最小限に抑えて、生体外の人工環境の生体組織内または生体組織上で行われる実験または測定など、生体外で行われる活動を指す。特定の実施形態では、「エキスピボ」手順は、生物から採取され、通常は無菌条件下で、典型的には数時間または最大約２４時間（しかしながら、状況に応じて最大４８または７２時間以上を含む）実験装置で培養された生細胞または組織を伴う。ある特定の実施形態では、そのような組織または細胞を収集して凍結し、後にエキスピボ処理のために解凍することができる。生細胞または組織を使用して数日より長く続く組織培養実験または手順は、典型的には、「インビトロ」とであるとみなされるが、ある特定の実施形態では、この用語は、エキスピボと交換可能に使用され得る。

40

【００５０】

「インビボ」という用語は、一般に、生体内で行われる活動を指す。

【００５１】

本明細書で使用される場合、「再プログラミング」または「脱分化」または「分化能の増加」または「発生能の増加」という用語は、細胞の分化能を増加させるか、または細胞をより分化していない状態に脱分化する方法を指す。例えば、分化能が増加した細胞は、再プログラミングされていない状態の同じ細胞と比較して、より大きな発生可塑性を有する（つまり、より多くの細胞型に分化することができる）。言い換えれば、再プログラミングされた細胞は、再プログラミングされていない状態の同じ細胞よりもあまり分化しな

50

い状態にある細胞である。

【0052】

本明細書で使用される場合、「分化」という用語は、特殊化していない（「コミットしていない」）またはあまり特殊化していない細胞が、例えば、血液細胞または筋細胞などの特殊化された細胞の特色を獲得するプロセスである。分化したまたは分化誘導された細胞は、細胞の系統内でより特殊化した（「コミットした」）位置をとった細胞である。「コミットした」という用語は、分化のプロセスに適用される場合、通常の下で、特定の細胞型または細胞型のサブセットに分化し続ける点まで分化経路を進んでおり、通常の下では、異なる細胞型に分化するか、またはあまり分化しない細胞型に戻るできない細胞を指す。本明細書で使用される場合、「多能性」という用語は、体または体細胞のすべての系統（すなわち、胚そのもの）を形成する細胞の能力を指す。例えば、胚性幹細胞は、外胚葉、中胚葉、内胚葉の3つの胚葉のそれぞれから細胞を形成できる多能性幹細胞の一種である。多能性は、完全な生物を生み出すことができない不完全または部分的に多能性の細胞（例えば、エピブラスト幹細胞またはEpiSC）から、完全な生物（例えば、胚性幹細胞）を生み出すことができるより原始的でより多能性の細胞に及ぶ発生能の連続体である。

10

【0053】

本明細書で使用されるとき、「人工多能性幹細胞」またはiPSCという用語は、幹細胞が、誘導または変更された、分化した成人、新生児または胎児細胞から産生された、すなわち、3つのすべての胚葉または真皮層：中胚葉、内胚葉、および外胚葉のすべての組織に分化できる細胞にリプログラミングされたことを意味する。産生されたiPSCは、自然界に見られる細胞を指さない。

20

【0054】

本明細書で使用される場合、「胚性幹細胞」という用語は、胚盤胞の内部細胞塊の天然に存在する多能性幹細胞を指す。胚性幹細胞は多能性であり、発生中に外胚葉、内胚葉および中胚葉の3つの主要な胚葉のすべての誘導体を生じさせる。それらは胚体外膜または胎盤に寄与しない、すなわち、全能性ではない。

【0055】

本明細書で使用される場合、「多分化能幹細胞」という用語は、1つ以上の胚葉（外胚葉、中胚葉、および内胚葉）の細胞に分化するが、3つすべてにはない発生の可能性を有する細胞を指す。したがって、多分化能細胞は「部分的に分化した細胞」とも呼ばれる。多分化能細胞は当技術分野で周知であり、多分化能細胞の例には、例えば、造血幹細胞および神経幹細胞などの成体幹細胞が含まれる。「多分化能」は、細胞が所与の系統で多くの細胞型を形成する可能性があるが、他の系統の細胞は形成しない可能性があることを示す。例えば、多分化能造血細胞は、多くの異なる血液細胞型（赤、白、血小板など）を形成することができるが、ニューロンを形成することはできない。したがって、「多分化能」という用語は、全能性および多能性よりも低い発生能の程度を有する細胞の状態を指す。

30

【0056】

多能性は、部分的に、細胞の多能性の特徴を評価することによって決定することができる。多能性の特徴には、(i) 多能性幹細胞の形態、(ii) 無制限の自己再生の可能性、(iii) SSEA1（マウスのみ）、SSEA3/4、SSEA5、TRA1-60/81、TRA1-85、TRA2-54、GCTM-2、TG343、TG30、CD9、CD29、CD133/プロミン、CD140a、CD56、CD73、CD90、CD105、OCT4、NANOG、SOX2、CD30、および/またはCD50を含むがこれらに限定されない多能性幹細胞マーカーの発現、(iv) 3つすべての体細胞系統（外胚葉、中胚葉、内胚葉）に分化する能力、(v) 3つの体細胞系統からなる奇形腫の形成、ならびに(vi) 3つの体細胞系統からの細胞からなる胚様体の形成が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0057】

50

後期胚盤胞のエピブラスト幹細胞（EpiSC）に類似した多能性の「プライミング」または「準安定」状態、および初期／着床前胚盤胞の細胞塊に類似した多能性の「ナイーブ」または「グラウンド」状態の2種類の多能性が以前に説明されている。両方の多能性状態は上述のような特徴を呈するが、ナイーブまたはグラウンド状態はさらに、（i）雌性細胞におけるX染色体の事前不活性化または再活性化、（ii）単一細胞培養中のクロールン性および生存の改善、（iii）DNAメチル化の全体的な低減、（iv）発生制御遺伝子プロモーターへのH3K27me3抑制クロマチンマーク沈着の低減、および（v）プライミング状態の多能性細胞と比較して分化マーカーの発現の低減を呈する。外因性多能性遺伝子が体細胞に導入され、発現され、その後、サイレンシングされるか、または結果として得られる多能性細胞から除去される細胞再プログラミングの標準的な方法論は、一般に、多能性のプライミング状態の特徴を有するとみなされる。標準的な多能性細胞培養条件下では、そのような細胞は、グラウンド状態の特徴が観察される外因性導入遺伝子の発現が維持されない限り、プライミング状態のままであり、グラウンド状態の特徴が観察される。

10

【0058】

本明細書で使用される場合、「多能性幹細胞形態」という用語は、胚性幹細胞の古典的な形態学的特色を指す。正常な胚性幹細胞の形態は、核と細胞質の比率が高く、核小体が顕著に存在し、典型的な細胞間間隔がある、形状が丸くて小さいことを特徴とする。

【0059】

本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、任意の動物、好ましくはヒト患者、家畜、または他の飼育動物を指す。

20

【0060】

「多能性因子」または「再プログラミング因子」は、単独で、または他の薬剤と組み合わせてのいずれかで、細胞の発生能を増加させることができる薬剤を指す。多能性因子には、細胞の発生能を増加させることができるポリヌクレオチド、ポリペプチド、および小分子が含まれるが、これらに限定されない。例示的な多能性因子には、例えば、転写因子および小分子再プログラミング剤が含まれる。

【0061】

「培養」または「細胞培養」は、インビトロ環境における細胞の維持、成長、および／または分化を指す。「細胞培養培地」、「培養培地」（それぞれの場合において単数の「培地」）、「補充成分」および「培地補充成分」は、細胞培養を培養する栄養組成物を指す。

30

【0062】

「培養する」または「維持する」とは、例えば滅菌プラスチック（またはコーティングされたプラスチック）細胞培養皿またはフラスコ内で、組織外または体外で細胞を維持、増殖（成長）、および／または分化させることを指す。「培養」または「維持」は、細胞を増殖および／または維持するのに役立つ栄養素、ホルモン、および／または他の因子の供給源として培養培地を利用し得る。

【0063】

本明細書で使用される場合、「中胚葉」という用語は、初期胚発生中に現れ、循環系の血液細胞、筋肉、心臓、真皮、骨格、ならびに他の支持組織および結合組織を含む様々な特殊化した細胞型を生じさせる3つの胚葉のうちの1つを指す。

40

【0064】

本明細書で使用される場合、「二次造血内皮細胞」（HE）または「多能性幹細胞由来の二次造血内皮細胞」（iHE）という用語は、内皮造血転換と呼ばれるプロセスにおいて造血幹細胞および前駆細胞を生じさせる内皮細胞のサブセットを指す。胚における造血細胞の発達は、側板中胚葉から血管芽細胞を経て二次造血内皮細胞および造血前駆細胞へと順次進行する。

【0065】

「造血幹細胞および前駆細胞」、「造血幹細胞」、「造血前駆細胞」、または「造血前

50

駆細胞」という用語は、造血系統にコミットしているが、さらなる造血分化が可能であり、多分化能造血幹細胞（血球芽細胞）、骨髓系前駆細胞、巨核球前駆細胞、赤血球前駆細胞、およびリンパ系前駆細胞を含む細胞を指す。造血幹細胞および前駆細胞（HSC）は、骨髓（単球およびマクロファージ、好中球、好塩基球、好酸球、赤血球、巨核球／血小板、樹状細胞）、およびリンパ系（T細胞、B細胞、NK細胞）を含むすべての血液細胞型を生じさせる多分化能幹細胞である。本明細書で使用される「二次造血幹細胞」という用語は、T系統細胞、NK系統細胞、およびB系統細胞を含む成熟骨髓およびリンパ系細胞型の両方を生じさせることができるCD34+造血細胞を指す。造血細胞には、原始赤血球、巨核球、およびマクロファージを生じさせる原始造血細胞の様々なサブセットも含まれる。

10

【0066】

本明細書で使用される場合、「Tリンパ球」および「T細胞」という用語は、交換可能に使用され、胸腺で成熟を完了し、体内の特定の外来抗原の特定ならびにMHCクラスIで制限された様式において他の免疫細胞の活性化および非活性化を含む、免疫系において様々な役割を有する主要な型の白血球を指す。T細胞は、培養されたT細胞、例えば、初代T細胞、もしくは培養されたT細胞株、例えば、ジャーカット、SupT1などからのT細胞、または哺乳動物から得られたT細胞などの任意のT細胞であり得る。T細胞は、CD3+細胞であり得る。T細胞は、任意の型のT細胞であり得、CD4+／CD8+二重陽性T細胞、CD4+ヘルパーT細胞（例えば、Th1およびTh2細胞）、CD8+T細胞（例えば、細胞毒性T細胞）、末梢血単核細胞（PBMC）、末梢血白血球（PBL）、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）、メモリーT細胞、ナイーブT細胞、制御性T細胞、ガンマデルタT細胞（ $\gamma\delta$ T細胞）などを含むが、これらに限定されない、任意の発生段階のものであり得る。追加の型のヘルパーT細胞には、Th3（Treg）、Th17、Th9、またはTfh細胞などの細胞が含まれる。追加の型のメモリーT細胞には、セントラルメモリーT細胞（Tcm細胞）、エフェクターメモリーT細胞（Tem細胞およびTEMRA細胞）などの細胞が含まれる。T細胞はまた、T細胞受容体（TCR）またはキメラ抗原受容体（CAR）を発現するように改変されたT細胞などの遺伝子操作されたT細胞を指し得る。T細胞またはT細胞様エフェクター細胞はまた、幹細胞または前駆細胞から分化され得る。T細胞様派生エフェクター細胞は、いくつかの点でT細胞系統を有し得るが、同時に、一次T細胞には存在しない1つまたは複数の機能的特性を有する。

20

30

【0067】

「CD4+T細胞」は、表面にCD4を発現し、細胞媒介性免疫応答に関連するT細胞のサブセットを指す。それらは、刺激後の分泌プロファイルを特徴とし、これには、IFN- γ 、TNF- α 、IL2、IL4、およびIL10などのサイトカインの分泌が含まれ得る。「CD4」は、最初はTリンパ球上の分化抗原として定義された55kDの糖タンパク質であるが、単球／マクロファージを含む他の細胞にも見られる。CD4抗原は、免疫グロブリン超遺伝子ファミリーのメンバーであり、MHC（主要組織適合遺伝子複合体）クラスII制限免疫応答の関連認識要素として関与している。Tリンパ球では、それらはヘルパー／インデューサーサブセットを定義する。

【0068】

40

「CD8+T細胞」とは、表面にCD8を発現し、MHCクラスI制限され、細胞毒性T細胞として機能するT細胞のサブセットを指す。「CD8」分子は、胸腺細胞、ならびに細胞毒性およびサプレッサーTリンパ球に見られる分化抗原である。CD8抗原は、免疫グロブリン超遺伝子ファミリーのメンバーであり、主要組織適合遺伝子複合体クラスI制限相互作用における関連認識要素である。

【0069】

本明細書で使用される場合、「NK細胞」または「ナチュラルキラー細胞」という用語は、CD56またはCD16の発現およびT細胞受容体（CD3）の不在によって定義される末梢血リンパ球のサブセットを指す。本明細書で使用される場合、「適応NK細胞」および「メモリーNK細胞」という用語は、交換可能であり、表現型的にCD3-および

50

CD56+であり、NKG2CおよびCD57のうちの少なくとも1つ、ならびに任意選択的にCD16を発現するが、PLZF、SYK、

【0070】

【数1】

FceRγ

、およびEAT-2のうちの1つ以上の表現に欠くNK細胞のサブセットを指す。いくつかの実施形態では、CD56+NK細胞の単離された亜集団は、CD16、NKG2C、CD57、NKG2D、NCRリガンド、NKp30、NKp40、NKp46、活性化および阻害性KIR、NKG2A、ならびに／またはDNAM-1の発現を含む。CD56+は、暗いまたは明るい発現であり得る。NK細胞、またはNK細胞様エフェクター細胞は、幹細胞または前駆細胞から分化され得る。NK細胞様派生エフェクター細胞は、いくつかの点でNK細胞系統を有し得るが、同時に、一次NK細胞には存在しない1つ以上の機能的特性を有する。

【0071】

本明細書で使用される場合、「NKT細胞」または「ナチュラルキラーT細胞」という用語は、T細胞受容体(TCR)を発現するCD1d制限T細胞を指す。従来の主要組織適合(MHC)分子によって提示されるペプチド抗原を検出する従来のT細胞とは異なり、NKT細胞は、非古典的なMHC分子であるCD1dによって提示される脂質抗原を認識する。2つの型のNKT細胞が認識されている。インバリエントまたはI型NKT細胞は、非常に限られたTCRレパートリー、つまり、限られたスペクトルのβ鎖(ヒトではVβ11)に関連する標準的なα鎖(ヒトではVα24-Jα18)を発現する。非古典的または非インバリエントII型NKT細胞と呼ばれるNKT細胞の2番目の集団は、より不均一なTCRαβの使用を示す。I型NKT細胞は、免疫療法に好適であると考えられる。適応またはインバリエント(I型)NKT細胞は、以下のマーカー:TCR Va24-Ja18、Vb11、CD1d、CD3、CD4、CD8、aGalCer、CD161、およびCD56のうちの少なくとも1つ以上の発現により特定され得る。

【0072】

本明細書で使用される場合、「単離された」などの用語は、元の環境から分離された、すなわち、単離された細胞の環境は、「単離されていない」参照細胞が存在する環境で見出される少なくとも1つの構成要素を実質的に含まない細胞または細胞の集団を指す。この用語には、自然環境で見出される一部またはすべての構成要素から取り出された、例えば、組織や生検試料から単離された細胞が含まれる。この用語はまた、細胞が天然に存在しない環境で見出される、例えば、細胞培養または細胞懸濁液から単離されるため、少なくとも1つ、いくつか、またはすべての構成要素から取り出される細胞を含む。したがって、単離された細胞は、自然界に見られる場合、または天然に存在しない環境で成長するか、保存されるか、もしくは生存する場合、他の物質、細胞、または細胞集団を含む少なくとも1つの構成要素から部分的または完全に分離される。単離された細胞の特定の例には、部分的に純粋な細胞組成物、実質的に純粋な細胞組成物、および天然に存在しない培地で培養された細胞が含まれる。単離された細胞は、所望の細胞またはその集団を環境中の他の物質または細胞から分離することから、または環境から1つ以上の他の細胞集団もしくは亜集団を取り除くことから得ることができる。

【0073】

本明細書で使用される場合、「精製する」などの用語は、純度を高めることを指す。例えば、純度を少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、または100%に増加させることができる。

【0074】

本明細書で使用される場合、「コード化」という用語は、ヌクレオチドの定義された配列(すなわち、rRNA、tRNA、およびmRNA)またはアミノ酸の定義された配列

10

20

30

40

50

およびそれらから生じる生物学的特性のいずれかを有する、生物学的プロセスにおける他のポリマーおよび巨大分子の合成のためのテンプレートとして役立つ、遺伝子、cDNA、またはmRNAなどのポリヌクレオチド中のヌクレオチドの特定の配列の固有の特性を指す。したがって、遺伝子は、その遺伝子に対応するmRNAの転写および翻訳が細胞または他の生物学的系においてタンパク質を産生する場合、タンパク質をコードする。mRNA配列と同一であり、通常配列表に提供されるヌクレオチド配列であるコード鎖と、遺伝子またはcDNAの転写のテンプレートとして使用される非コード鎖との両方を、その遺伝子またはcDNAのタンパク質または他の産物をコードすると称することができる。

【0075】

「構築物」は、インビトロまたはインビボのいずれかで宿主細胞に送達されるポリヌクレオチドを含む巨大分子または分子の複合体を指す。本明細書で使用される場合、「ベクター」は、外来遺伝子材料の標的細胞への送達または移動を指向することができる任意の核酸構築物を指し、標的細胞で複製および／または発現することができる。本明細書で使用される場合、「ベクター」という用語は、送達される構築物を含む。ベクターは、線状または環状分子であり得る。ベクターは、組み込みまたは非組み込みであり得る。ベクターの主な種類には、プラスミド、エピソードベクター、ウイルスベクター、コスミド、および人工染色体が含まれるが、これらに限定されない。ウイルスベクターには、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、センダイウイルスベクターなどが含まれるが、これらに限定されない。

【0076】

「組み込み」とは、構築物の1つ以上のヌクレオチドが細胞ゲノムに安定して挿入される、すなわち、細胞の染色体DNA内の核酸配列に共有結合されることを意味する。「標的化された組み込み」とは、構築物のヌクレオチドが、予め選択された部位または「組み込み部位」で細胞の染色体またはミトコンドリアDNAに挿入されることを意味する。本明細書で使用される場合、「組み込み」という用語はさらに、組み込み部位での内因性配列またはヌクレオチドの欠失の有無にかかわらず、構築物の1つ以上の外因性配列またはヌクレオチドの挿入を伴うプロセスを指す。挿入部位に欠失がある場合、「組み込み」は、欠失される内因性配列またはヌクレオチドを1つ以上の挿入されたヌクレオチドに置き換えることをさらに含み得る。

【0077】

本明細書で使用される場合、「外因性」という用語は、参照される分子または参照される活性が宿主細胞に導入されるか、または宿主細胞に非天然であることを意味することを意図する。分子は、例えば、コード化核酸を宿主の遺伝子材料に導入することにより、例えば、宿主の染色体に組み込むことにより、またはプラスミドなどの非染色体遺伝子材料として導入され得る。したがって、コード化核酸の発現に関して使用される場合の用語は、コード化核酸を発現可能な形態で細胞に導入することを指す。「内因性」という用語は、宿主細胞に存在する参照される分子または活性を指す。同様に、コード化核酸の発現に関して使用される場合の用語は、細胞内に含まれ、外因的に導入されていないコード化核酸の発現を指す。

【0078】

本明細書で使用される場合、「目的の遺伝子」または「目的のポリヌクレオチド配列」は、適切な制御配列の制御下に置かれると、RNAに転写され、場合によってはインビボでポリペプチドに翻訳されるDNA配列である。目的の遺伝子またはポリヌクレオチドには、原核生物の配列、真核生物のmRNAからのcDNA、真核生物（例えば、哺乳類）からのDNAからのゲノムDNA配列、および合成DNA配列が含まれ得るが、これらに限定されない。例えば、目的の遺伝子は、miRNA、shRNA、天然ポリペプチド（すなわち、自然界に見られるポリペプチド）またはそれらの断片；バリエーションポリペプチド（すなわち、天然ポリペプチドと100%未満の配列同一性を有する天然ポリペプチドの変異体）またはその断片；操作されたポリペプチドまたはペプチド断片、治療用ペプチドまたはポリペプチド、撮像マーカー、選択可能なマーカーなどをコードし得る。

【0079】

本明細書で使用される場合、「ポリヌクレオチド」という用語は、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドまたはそれらの類似体のいずれかである、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。ポリヌクレオチドの配列は、4つのヌクレオチド塩基：アデニン（A）、シトシン（C）、グアニン（G）、チミン（T）、およびポリヌクレオチドがRNAの場合、チミンに対してウラシル（U）で構成される。ポリヌクレオチドは、遺伝子または遺伝子断片（例えば、プローブ、プライマー、EST、またはSAGEタグ）、エキソン、イントロン、メッセンジャーRNA（mRNA）、トランスファーRNA、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブ、およびプライマーを含み得る。ポリヌクレオチドはまた、二本鎖分子および一本鎖分子の両方を指す。

10

【0080】

本明細書で使用される場合、「ペプチド」、「ポリペプチド」、および「タンパク質」という用語は、交換可能に使用され、ペプチド結合によって共有結合されたアミノ酸残基を有する分子を指す。ポリペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸を含まなければならない、ポリペプチドのアミノ酸の最大数に制限はない。本明細書で使用される場合、これらの用語は、例えば、当技術分野で一般にペプチド、オリゴペプチド、およびオリゴマーとも称される短い鎖と、当技術分野で一般にポリペプチドまたはタンパク質と称されるより長い鎖との両方を指す。「ポリペプチド」には、例えば、とりわけ、生物学的に活性な断片、実質的に相同なポリペプチド、オリゴペプチド、ホモ二量体、ヘテロ二量体、ポリペプチドのバリエーション、改変されたポリペプチド、誘導体、類似体、融合タンパク質が含まれる。ポリペプチドには、天然ポリペプチド、組換えポリペプチド、合成ポリペプチド、またはそれらの組み合わせが含まれる。

20

【0081】

「作動可能に連結された」とは、一方の機能が他方によって影響を受けるように、単一の核酸断片上の核酸配列の会合を指す。例えば、プロモーターは、そのコード配列または機能的RNAの発現に影響を及ぼすことができる場合（すなわち、コード配列または機能的RNAがプロモーターの転写制御下にある）、コード配列または機能的RNAと作動可能に連結されている。コード配列は、センスまたはアンチセンス配向で制御配列に作動可能に連結され得る。

30

【0082】

本明細書で使用される場合、「遺伝子インプリント」という用語は、供給源細胞またはiPSCにおける優先的な治療属性に寄与し、供給源細胞由来のiPSCおよび／またはiPSC由来の造血系細胞において保持可能な遺伝的または後成的情報を指す。本明細書で使用される場合、「供給源細胞」は、再プログラミングを通じてiPSCを生成するために使用され得る非多能性細胞であり、供給源細胞由来のiPSCは、任意の造血系統細胞を含む特定の細胞型にさらに分化され得る。供給源細胞由来のiPSC、およびそれから分化した細胞は、時折、状況に応じて、まとめて「由来」または「派生」細胞と呼ばれる。例えば、本明細書全体を通して使用される派生エフェクター細胞、または派生NK系統細胞もしくは派生T系統細胞は、末梢血、臍帯血、または他のドナー組織などの天然／天然源から得られたそれらの対応する一次細胞と比較して、iPSCから分化した細胞である。本明細書で使用される場合、優先的な治療属性を付与する遺伝子インプリントは、ドナー特異的、疾患特異的、または治療応答特異的な選択された供給源細胞を再プログラミングすることによって、またはゲノム編集を使用して、遺伝子改変されたモダリティをiPSCに導入することによってのいずれかでiPSCに組み込まれる。特異的に選択されたドナー、疾患、または治療状況から取得されたソース細胞の態様では、優先的な治療属性に寄与する遺伝的インプリントには、根本的な分子事象が同定されているかどうかに関係なく、選択されたソース細胞の派生細胞に渡される、保持可能な表現型、すなわち優先的な治療属性を表す、状況特異的な遺伝的またはエピジェネティック改変を含み得る。

40

50

ドナー特異的、疾患特異的、または治療応答特異的供給源細胞は、i P S Cおよび由来造血系統細胞において保持可能な遺伝子インプリントを含み得、これらの遺伝子インプリントには、例えば、ウイルス特異的T細胞またはインバリアントナチュラルキラーT (i N K T) 細胞からの予め配置された単一特異性T C R ; 追跡可能で望ましい遺伝子多型、例えば、選択されたドナーの高親和性C D 1 6 受容体をコードする点変異のためのホモ接合性 ; 所定のH L A 要件、すなわち、集団が増加したハプロタイプを呈する選択されたH L A 適合ドナー細胞が含まれるが、これに限定されない。本明細書で使用される場合、優先的な治療属性には、由来細胞の改善された生着、輸送、ホーミング、生存能、自己再生、持続性、免疫応答の制御および調節、生存、ならびに細胞毒性が含まれる。優先的な治療属性は、抗原標的化受容体の発現、H L A の提示またはその欠如、腫瘍微小環境に対する耐性、バイスタンダー免疫細胞の誘導および免疫調節、腫瘍外効果の低減による改善された標的特異性、化学療法などの治療に対する耐性にも関係している可能性がある。

【0083】

本明細書で使用される場合、「増強された治療特性」という用語は、同じ一般的な細胞型の典型的な免疫細胞と比較して増強された細胞の治療特性を指す。例えば、「増強された治療特性」を有するNK細胞は、典型的な、未改変の、および／または天然に存在するNK細胞と比較して、増強、改善、および／または増大された治療特性を有する。免疫細胞の治療特性には、細胞生着、輸送、ホーミング、生存能、自己再生、持続性、免疫応答の制御および調節、生存、ならびに細胞毒性が含まれ得るが、これらに限定されない。免疫細胞の治療特性は、抗原標的化受容体の発現、H L A の提示またはその欠如、腫瘍微小環境に対する耐性、バイスタンダー免疫細胞の誘導および免疫調節、腫瘍外効果の低減による改善された標的特異性、化学療法などの治療に対する耐性によっても示される。

【0084】

本明細書で使用される場合、「エンゲージャー」という用語は、免疫細胞、例えば、T細胞、NK細胞、NK T細胞、B細胞、マクロファージ、好中球、および腫瘍細胞間の連結を形成し、免疫細胞を活性化することができる分子、例えば、融合ポリペプチドを指す。エンゲージャーの例には、二重特異性T細胞エンゲージャー (B i T E)、二重特異性キラー細胞エンゲージャー (B i K E)、三重特異性キラー細胞エンゲージャー、もしくは多重特異性キラー細胞エンゲージャー、または複数の免疫細胞型と適合性のあるユニバーサルエンゲージャーが含まれるが、これらに限定されない。

【0085】

本明細書で使用される場合、「表面トリガー受容体」という用語は、免疫応答、例えば、細胞毒性応答を誘発または開始することができる受容体を指す。表面トリガー受容体は操作することができ、エフェクター細胞、例えば、T細胞、NK細胞、NK T細胞、B細胞、マクロファージ、好中球で発現させることができる。いくつかの実施形態では、表面トリガー受容体は、エフェクター細胞の天然の受容体および細胞型とは関係なく、エフェクター細胞と特定の標的細胞、例えば、腫瘍細胞との間の二重または多重特異性抗体の結合を容易にする。このアプローチを使用して、ユニバーサル表面トリガー受容体を含むi P S Cを生成し、次いでそのようなi P S Cをユニバーサル表面トリガー受容体を発現する様々なエフェクター細胞型の集団に分化させることができる。「ユニバーサル」とは、表面トリガー受容体が、細胞型に関係なく任意のエフェクター細胞で発現および活性化され得、ユニバーサル受容体を発現するすべてのエフェクター細胞が、エンゲージャーの腫瘍結合特異性に関係なく、表面トリガー受容体によって認識可能な同じエピトープを有するエンゲージャーに結合または連結され得ることを意味する。いくつかの実施形態では、同じ腫瘍標的化特異性を有するエンゲージャーは、ユニバーサル表面トリガー受容体と結合するために使用される。いくつかの実施形態では、異なる腫瘍標的化特異性を有するエンゲージャーは、ユニバーサル表面トリガー受容体と結合するために使用される。したがって、1つまたは複数のエフェクター細胞型を使用して、1つの特定の型の腫瘍細胞を殺滅する場合もあれば、2つ以上の型の腫瘍を殺滅する場合もある。表面トリガー受容体は、一般に、エフェクター細胞活性化のための共刺激ドメインと、エンゲージャーのエピト

ープに特異的なエピトープ結合領域とを含む。二重特異性エンゲージャーは、一方の端で表面トリガー受容体のエピトープ結合領域に特異的であり、もう一方の端で腫瘍抗原に特異的である。

【0086】

本明細書で使用される場合、「安全スイッチタンパク質」という用語は、細胞療法の潜在的な毒性またはさもなければ有害作用を防止するように設計された操作されたタンパク質を指す。場合によっては、安全スイッチタンパク質の発現は、安全スイッチタンパク質をコードする遺伝子をそのゲノムに恒久的に組み込んだ、移植された操作された細胞の安全性の懸念に対処するために条件付きで制御される。この条件付き制御は可変であってよく、小分子を介した翻訳後活性化ならびに組織特異的および／または一時的な転写制御による制御が含まれ得る。安全スイッチは、アポトーシスの誘導、タンパク質合成の阻害、DNA複製、成長停止、転写および転写後の遺伝子制御、ならびに／または抗体を介した枯渇を媒介し得る。場合によっては、安全スイッチタンパク質は、外因性分子、例えば、プロドラッグによって活性化され、活性化されると、治療用細胞のアポトーシスおよび／または細胞死を誘発する。安全スイッチタンパク質の例には、カスパーゼ9（またはカスパーゼ3または7）、チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、B細胞CD20、改変されたEGFR、およびそれらの任意の組み合わせなどの自殺遺伝子が含まれるが、これに限定されない。この戦略では、有害事象が発生した場合に投与されるプロドラッグは、自殺遺伝子産物によって活性化され、形質導入された細胞を殺滅する。

【0087】

本明細書で使用される場合、「薬学的に活性なタンパク質またはペプチド」という用語は、生物に対して生物学的小および／または薬学的効果を達成することができるタンパク質またはペプチドを指す。薬学的に活性なタンパク質は、疾患に対して治療的、根治的、または姑息的特性を有し、疾患の重症度を回復させる、緩和する、軽減する、逆転させる、または和らげるために投与することができる。薬学的に活性なタンパク質はまた、予防的特性を有し、疾患の発症を予防するため、またはそれが出現したときにそのような疾患もしくは病的状態の重症度を和らげるために使用される。薬学的に活性なタンパク質には、全タンパク質もしくはペプチド、またはそれらの薬学的に活性な断片が含まれる。それはまた、タンパク質もしくはペプチドの薬学的に活性な類似体、またはタンパク質もしくはペプチドの断片の類似体を含む。薬学的に活性なタンパク質という用語はまた、協調的または相乗的に作用して治療上の利益を提供する複数のタンパク質またはペプチドを指す。薬学的に活性なタンパク質またはペプチドの例には、受容体、結合タンパク質、転写および翻訳因子、腫瘍成長抑制タンパク質、抗体もしくはその断片、成長因子、および／またはサイトカインが含まれるが、これらに限定されない。

【0088】

本明細書で使用される場合、「シグナル伝達分子」という用語は、細胞シグナル伝達を調節する、それに関与する、阻害する、活性化する、低減する、または増加させる任意の分子を指す。シグナル伝達とは、最終的に細胞内の生化学的事象を引き起こす経路に沿ったタンパク質複合体の動員による化学改変の形態での分子シグナルの伝達を指す。シグナル伝達経路は当技術分野で周知であり、Gタンパク質結合受容体シグナル伝達、チロシンキナーゼ受容体シグナル伝達、インテグリンシグナル伝達、トールゲートシグナル伝達、リガンド依存性イオンチャネルシグナル伝達、ERK/MAPKシグナル伝達経路、Wntシグナル伝達経路、cAMP依存性経路、およびIP3/DAGシグナル伝達経路を含むが、これらに限定されない。

【0089】

本明細書で使用される場合、「標的化モダリティ」という用語は、細胞に遺伝的に組み込まれて、i) 独特のキメラ抗原受容体(CAR)またはT細胞受容体(TCR)に関連する場合、抗原特異性、ii) モノクローナル抗体または二重特異性エンゲージャーに関連する場合、エンゲージャー特異性、iii) 形質転換された細胞の標的化、iv) がん幹細胞の標的化、およびv) 特定の抗原または表面分子の不在下での他の標的化戦略が含

10

20

30

40

50

まれるがこれらに限定されない抗原および／またはエピトープ特異性を促進する分子、例えば、ポリペプチドを指す。

【0090】

本明細書で使用される場合、「特異的」または「特異性」という用語は、非特異的または非選択的結合とは対照的に、分子、例えば、受容体またはエンゲージャーが標的分子に選択的に結合する能力を指すために使用され得る。

【0091】

本明細書で使用される場合、「養子細胞療法」という用語は、本明細書で使用される場合、遺伝子改変されているか否かにかかわらず、注入前にエクスピボで拡大されたT細胞またはB細胞として特定される、自家または同種異系リンパ球の当該注入に関連する細胞ベースの免疫療法を指す。

【0092】

本明細書で使用される場合、「治療的に十分な量」は、その意味の範囲内で、非毒性であるが、それが言及する特定の治療および／または薬学的組成物の十分なおよび／または有効な量を含み、所望の治療効果を提供する。必要な正確な量は、患者の一般的な健康状態、患者の年齢、ならびに状態の段階および重症度などの要因に応じて、対象ごとに異なる。特定の実施形態では、治療的に十分な量は、治療される対象の疾患または状態に関連する少なくとも1つの症状を回復させる、低減する、および／または改善するのに十分である、および／または効果的である。

【0093】

多能性幹細胞の分化には、培養培地中の刺激剤または細胞の物理的状态の変化など、培養系の変化が必要である。最も一般的な戦略は、系統特異的分化を開始するための一般的かつ重要な中間体として胚様体（EB）の形成を利用する。「胚様体」は、三次元領域内に多数の系統を生じさせるため、胚発生を模倣することが示されている三次元クラスターである。典型的には数時間から数日である分化プロセスを通じて、単純なEB（例えば、分化を誘発する凝集した多能性幹細胞）は成熟を続け、囊胞性EBに発達し、その時点で（典型的には数日から数週間）、さらに処理されて分化を続ける。EB形成は、多能性幹細胞を三次元の多層細胞クラスター内で互いに近接させることによって開始され、典型的には、これは多能性細胞を液滴に沈降させ、細胞を「U」底ウェルプレートに沈降させるか、または機械的攪拌などによるものを含む、いくつかの方法のうちの1つによって達成される。多能性培養維持培地中で維持された凝集体は適切なEBを形成しないため、EBの発生を促進するために、多能性幹細胞凝集体はさらなる分化の手掛かりが必要である。したがって、多能性幹細胞の凝集体は、選択した系統に向けて誘発の手掛かりを提供する分化培地に移す必要がある。多能性幹細胞のEBベースの培養は、典型的には、EB細胞クラスター内で中程度の増殖を伴う分化した細胞集団（外胚葉、中胚葉、および内胚葉胚葉）の生成をもたらす。細胞分化を促進することが証明されているが、EBは、三次元構造の細胞が環境からの分化の手掛かりに一貫して曝されていないため、異なる分化状態の異種細胞を生じさせる。加えて、EBは作製および維持が困難である。さらに、EBを介した細胞分化は、適度な細胞拡大を伴い、これも分化効率の低下に寄与する。

【0094】

対照的に、「EB形成」とは異なる「凝集体形成」は、多能性幹細胞由来細胞の集団を拡大するために使用することができる。例えば、凝集体ベースの多能性幹細胞の拡大中に、増殖および多能性を維持するための培養培地が選択される。細胞増殖は一般に、より大きな凝集体を形成する凝集体のサイズを増加させ、これらの凝集体は、培養内の細胞増殖を維持し、細胞数を増加させるために、日常的に機械的または酵素的に小さな凝集体に解離され得る。EB培養とは異なり、維持培養下の凝集体内で培養された細胞は、多能性のマーカーを維持する。多能性幹細胞凝集体は、分化を誘導するためにさらなる分化の手掛かりを必要とする。

【0095】

本明細書で使用される場合、「単層分化」は、細胞の三次元多層クラスターによる分化

10

20

30

40

50

とは異なる分化方法、すなわち「EB形成」を指す用語である。本明細書に開示される他の利点の中でも、単層分化は、分化開始のためのEB形成の必要性を回避する。単層培養はEB形成などの胚発生を模倣しないため、特定の系統への分化は、EBの3つすべての胚葉分化と比較して最小限であるとみなされる。

【0096】

本明細書で使用される場合、「解離した」細胞は、他の細胞から、または表面（例えば、培養プレート表面）から実質的に分離または精製された細胞を指す。例えば、細胞は、機械的または酵素的方法によって動物または組織から解離され得る。代替的に、インビトロで凝集する細胞は、クラスターの懸濁液、単一細胞、または単一細胞とクラスターとの混合物への解離などによって、酵素的または機械的に互いに解離することができる。さらに別の代替の実施形態では、付着細胞は、培養プレートまたは他の表面から解離される。したがって、解離は、細胞外マトリックス（ECM）および基質（例えば、培養表面）との細胞相互作用の破壊、または細胞間のECMの破壊を伴い得る。

【0097】

本明細書で使用される場合、「フィーダー細胞」または「フィーダー」は、フィーダー細胞が、第2の細胞型を支持するための刺激、成長因子、および栄養素を提供するため、第2の型の細胞が成長、拡大、または分化することができる環境を提供するために第2の型の細胞と共培養される1つの型の細胞を説明する用語である。フィーダー細胞は、任意選択的に、それらが支持する細胞とは異なる種からである。例えば、幹細胞を含むある特定の型のヒト細胞は、マウス胚性線維芽細胞または不死化マウス胚性線維芽細胞の初代培養によって支持することができる。別の例では、末梢血由来細胞または形質転換された白血病細胞がナチュラルキラー細胞の拡大および成熟を支持する。フィーダー細胞は、典型的には、他の細胞と共培養するとき、それらが支持している細胞よりも成長するのを防ぐために、照射またはマイトマイシンなどの有糸分裂剤アンタゴニストで処理することによって不活化され得る。フィーダー細胞は、内皮細胞、間質細胞（例えば、上皮細胞または線維芽細胞）、および白血病細胞を含み得る。前述のことを制限することなく、1つの特定のフィーダー細胞型は、ヒト皮膚線維芽細胞などのヒトフィーダーであり得る。別のフィーダー細胞型は、マウス胚性線維芽細胞（MEF）であり得る。一般に、様々なフィーダー細胞を部分的に使用して、多能性を維持し、ある特定の系統への分化を指向し、増殖能力を高め、エフェクター細胞などの特殊化された細胞型への成熟を促進することができる。

【0098】

本明細書で使用される場合、「フィーダーフリー」（FF）環境は、フィーダー細胞または間質細胞を本質的に含まない、および／またはフィーダー細胞の培養によって予め条件付けされていない培養条件、細胞培養物、または培養培地などの環境を指す。「予め条件付けされた」培地とは、フィーダー細胞が培地内で少なくとも1日などの期間培養された後に採取された培地を指す。予め条件付けされた培地には、培地で培養されたフィーダー細胞によって分泌される成長因子およびサイトカインを含む、多くのメディエーター物質を含む。いくつかの実施形態では、フィーダーフリー環境は、フィーダー細胞または間質細胞の両方を含まず、またフィーダー細胞の培養によって予め条件付けされていない。

【0099】

iPSCおよびそれから分化した由来非多能性細胞のゲノム編集もしくは改変、または非多能性細胞およびそれから再プログラミングされた由来iPSCのゲノム編集または改変の文脈で使用される場合、「機能的」は、（1）直接的なゲノム編集もしくは改変により、または最初にゲノム操作される開始細胞からの分化もしくはその再プログラミングを介した「伝達」により達成される、遺伝子レベルでの良好なノックイン、ノックアウト、ノックダウン遺伝子発現、トランスジェニックもしくは制御された遺伝子発現、例えば、所望の細胞の発達段階での誘導性もしくは一時的な発現、あるいは（2）（i）直接的なゲノム編集により当該細胞において得られた遺伝子発現の改変、（ii）最初にゲノム操作される開始細胞からの分化もしくはその再プログラミングを介した「伝達」により当該

細胞で維持される遺伝子発現の改変、(i i i) 当該細胞の初期の発生段階でのみ現れる、または分化または再プログラミングを介して当該細胞を生じさせる開始細胞でのみ現れる遺伝子発現の改変の結果としての当該細胞における下流の遺伝子制御、または(i v) 最初に、i P S C、前駆細胞、もしくは脱分化した細胞起源で行われたゲノム編集もしくは改変に由来する、成熟細胞産物内に提示される、増強されたもしくは新たに獲得された細胞機能もしくは属性による、細胞レベルでの良好な細胞機能／特性の除去、追加、または改変を指す。

【0100】

H L AクラスI欠損、H L AクラスII欠損、またはその両方を含む「H L A欠損」とは、H L AクラスIタンパク質ヘテロ二量体および／またはH L AクラスIIのヘテロ二量体を含む完全なM H C複合体の表面発現が欠如しているか、またはもはや維持されていないか、またはレベルの減少もしくは低減が他の細胞または合成方法によって自然に検出可能なレベルよりも低いようなレベルの低減を有するいずれかの細胞を指す。

【0101】

本明細書で使用される場合、「改変されたH L A欠損i P S C」は、改善された分化の可能性、抗原標的化、抗原提示、抗体認識、持続性、免疫回避、抑制に対する耐性、増殖、共刺激、サイトカイン刺激、サイトカイン産生（オートクリンまたはパラクリン）、走化性、ならびに細胞毒性に関連するがこれらに限定されないタンパク質、例えば、非古典的H L AクラスIタンパク質（例えば、H L A－EおよびH L A－G）、キメラ抗原受容体（C A R）、T細胞受容体（T C R）、C D 1 6 F c受容体、B C L 1 1 b、N O T C H、R U N X 1、I L 1 5、4 1 B B、D A P 1 0、D A P 1 2、C D 2 4、C D 3 7、4 1 B B L、C D 4 7、C D 1 1 3、およびP D L 1を発現する遺伝子を導入することによってさらに改変されるH L A欠損i P S Cを指す。「改変されたH L A欠損」の細胞には、i P S C以外の細胞も含まれる。

【0102】

F c Rと略される「F c受容体」は、それらが認識する抗体の種類に基づいて分類される。例えば、最も一般的なクラスの抗体であるI g Gに結合するものは、F c－ガンマ受容体（F c γ R）と呼ばれ、I g Aに結合するものはF c－アルファ受容体（F c α R）と呼ばれ、I g Eに結合するものはF c－イプシロン受容体（F c ε R）と呼ばれる。F c Rのクラスは、それらが発現する細胞（マクロファージ、顆粒球、ナチュラルキラー細胞、T細胞およびB細胞）および各受容体のシグナル伝達特性によっても区別される。F c－ガンマ受容体（F c γ R）には、F c γ R I（C D 6 4）、F c γ R I I A（C D 3 2）、F c γ R I I B（C D 3 2）、F c γ R I I I A（C D 1 6 a）、F c γ R I I I B（C D 1 6 b）のいくつかのメンバーが含まれ、これらは、分子構造が異なるため抗体親和性が異なる。

【0103】

C F c Rと略される「キメラF c受容体」は、天然の膜貫通および／または細胞内シグナル伝達ドメインが改変されたか、または非天然の膜貫通および／または細胞内シグナル伝達ドメインで置き換えられた操作されたF c受容体を記載するために使用される用語である。キメラF c受容体のいくつかの実施形態では、膜貫通ドメインおよびシグナル伝達ドメインの一方または両方が非天然であることに加えて、1つ以上の刺激ドメインを操作されたF c受容体の細胞内部分に導入して、受容体の誘発により細胞活性化、拡大、および機能を増強することができる。標的抗原への抗原結合ドメインを含むキメラ抗原受容体（C A R）とは異なり、キメラF c受容体は、F c断片、または抗体のF c領域、またはエンゲージャーもしくは結合分子に含まれるF c領域に結合し、標的化された細胞を近接させるかどうかに関係なく細胞を活性化する。例えば、F c γ受容体は、細胞外ドメインでのI g Gの結合に応答し、それによりC F c Rを生成する、細胞内領域内の選択された膜貫通ドメイン、刺激ドメイン、および／またはシグナル伝達ドメインを含むように操作され得る。一例では、C F c Rは、その膜貫通ドメインおよび／または細胞内ドメインを置き換えることにより、F c γ受容体であるC D 1 6を操作することによって生成される

。CD16ベースのFcγRの結合親和性をさらに改善するために、CD64の細胞外ドメインまたはCD16の高親和性バリエーション（例えば、F176V）を組み込むことができる。高親和性CD16細胞外ドメインを伴うFcγRのいくつかの実施形態では、197位にセリンを含むタンパク質分解切断部位が排除されるか、または受容体の細胞外ドメインが切断不可能であるように置き換えられる、すなわち、シェディングの影響を受けず、それにより、hnCD16ベースのFcγRが得られる。

【0104】

FcγR受容体であるCD16は、Fc受容体FcγRIIIa（CD16a）およびFcγRIIIb（CD16b）の2つのアイソフォームを有することが特定されている。CD16aは、NK細胞によって発現される膜貫通タンパク質であり、標的細胞に付着した単量体IgGに結合して、NK細胞を活性化し、抗体依存性細胞媒介性細胞毒性（ADCC）を容易にする。本明細書で使用される場合、「高親和性CD16」、「切断不可能なCD16」、または「高親和性の切断不可能なCD16（hnCD16）」は、CD16の天然または非天然バリエーションを指す。野生型CD16は親和性が低く、NK細胞が活性化されると、白血球上の様々な細胞表面分子の細胞表面密度を調節するタンパク質分解切断プロセスである外部ドメインシェディングに供される。F176VおよびF158Vは、高い親和性を有する例示的なCD16多型バリエーションである。膜近位領域（189～212位）における切断部位（195～198位）が改変または排除されているCD16バリエーションは、シェディングを受けない。切断部位および膜近位領域は、WO2015/148926に詳細に記載されており、その完全な開示は、参照により本明細書に組み込まれる。CD16 S197Pバリエーションは、CD16の設計された切断不可能なバージョンである。F158VおよびS197Pの両方を含むCD16バリエーションは、親和性が高く、切断不可能である。別の例示的な高親和性で切断不可能なCD16（hnCD16）バリエーションは、CD64外部ドメインの3つのエクソンのうちの1つ以上に由来する外部ドメインを含む操作されたCD16である。

【0105】

I. 増強された特性を有する養子細胞療法に有用な細胞および組成物

本明細書で提供されるのは、派生細胞の治療特性を増強しながら、iPSCの分化能およびiPSCおよびその派生細胞の細胞発生生物学に影響を与えることなくクローンiPSCの調節回路を体系的に操作する戦略である。派生細胞は機能的に改善されており、選択的モダリティの組み合わせがゲノム工学を通じてiPSCレベルで細胞に導入された後の養子細胞療法に好適である。本発明以前は、1つ以上の提供された遺伝子編集を含む改変されたiPSCが、細胞発生に入る能力、および／または調節された活性を保持しながら機能的分化細胞を成熟および生成する能力を依然として有するかどうかは不明であった。iPSCからの指向された細胞分化中の予期せぬ失敗は、発生段階特異的遺伝子発現またはその欠如、HLA複合体提示の要件、導入された表面発現モダリティのタンパク質シェディング、ならびに細胞の表現型および／または機能の変化を可能にする分化プロトコルの再構成の必要性を含むがこれらに限定されない態様に起因している。本出願は、本明細書で提供される1つ以上の選択されたゲノム改変がiPSC分化能に悪影響を及ぼさないこと、ならびに操作されたiPSCから派生する機能エフェクター細胞が、iPSC分化後にエフェクター細胞に保持される、個々のまたは組み合わせたゲノム改変に起因する増強および／または獲得した治療特性を有することを示した。

【0106】

1. 新規エンドドメインを有するCAR

実施形態では、キメラ抗原受容体（CAR）は、抗原認識ドメイン、膜貫通ドメインを含む外部ドメインと、1つ以上のシグナル伝達ドメインを含む内部ドメインとを一般に含む融合タンパク質である。実施形態では、本明細書に記載のCARは、人工多能性幹細胞（iPSC）、およびCARを含むように操作されたiPSCから分化した派生エフェクター細胞で発現および機能するように設計されている。実施形態では、本明細書に記載のCARは、iPSC分化を妨害しないように、および／またはそれが所望のエフェクター

細胞型に向けられた i P S C の分化を促進するように設計されている。実施形態では、C A R は、エフェクター細胞増殖、持続性、生存、細胞毒性、アロ拒絶反応に対する耐性、腫瘍浸透、遊走、バイスタンダー免疫細胞を活性化および／または動員する能力、ならびに／または腫瘍の抑制を克服する能力を増強する。実施形態では、本明細書で提供される C A R はまた、細胞株細胞および初代供給源（一次細胞）、すなわち、末梢血、臍帯血、または他のドナー組織などの天然／天然源からの細胞においても直接発現され得る。

【0107】

いくつかの実施形態では、C A R は、当該 C A R を発現する T 細胞、N K 細胞、または N K T 細胞を活性化するのに好適である。ある特定の実施形態では、当該 T 細胞は、C A R 発現 i P S C に由来し、派生 T 細胞は、T ヘルパー細胞、細胞毒性 T 細胞、メモリー T 細胞、制御性 T 細胞、ナチュラルキラー T 細胞、 $\alpha \beta$ T 細胞、 $\gamma \delta$ T 細胞、またはそれらの組み合わせを含み得る。ある特定の実施形態では、当該 N K 細胞は、C A R 発現 i P S C に由来する。ある特定の実施形態では、当該 N K T 細胞は、C A R 発現 i P S C に由来する。いくつかの実施形態では、N K 細胞特異的シグナル伝達構成要素を含む C A R は、N K 細胞特異的である。いくつかの実施形態では、N K 細胞特異的シグナル伝達構成要素を含む C A R は、T 細胞または他の細胞型にも適している。いくつかの実施形態では、T 細胞特異的シグナル伝達構成要素を含む C A R は、T 細胞特異的である。いくつかの実施形態では、T 細胞特異的シグナル伝達構成要素を含む C A R は、N K 細胞または他の細胞型にも適している。いくつかの実施形態では、N K T 細胞特異的シグナル伝達構成要素を含む C A R は、N K T 細胞特異的である。いくつかの実施形態では、N K T 細胞特異的シグナル伝達構成要素を含む C A R は、N K もしくは T 細胞、または他の細胞型にも適している。

【0108】

実施形態では、本明細書に記載の C A R は、少なくともエクストドメインと、膜貫通ドメインと、エンドドメインと、を含む。C A R のエンドドメインは、C A R を発現する細胞の増殖および機能に影響を及ぼし、抗原結合時に C A R を発現するエフェクター細胞を活性化する少なくとも 1 つのシグナル伝達ドメインを含む。C A R エンドドメインのいくつかの実施形態では、1 つ以上の共刺激ドメイン（しばしば追加のシグナル伝達ドメインとも呼ばれる）が、細胞の寿命、記憶分化、および代謝特性に影響を及ぼすためにさらに含まれる。ここで、T 細胞および／または N K 細胞に特異的なシグナル伝達タンパク質は、C A R 融合タンパク質の構成要素、例えば、膜貫通ドメインおよび C A R のエンドドメインに含まれる 1 つ以上のシグナル伝達ドメインを供給するために使用される。C A R 設計に適している例示的なシグナル伝達タンパク質には、2 B 4、4-1 B B、C D 1 6、C D 2、C D 2 8、C D 2 8 H、C D 3 ζ 、D A P 1 0、D A P 1 2、D N A M 1、F c E R I γ 、I L 2 1 R、I L-2 R β (I L-1 5 R β)、I L-2 R γ 、I L-7 R、K I R 2 D S 2、N K G 2 D、N K p 3 0、N K p 4 4、N K p 4 6、C S 1、および C D 8 が含まれるが、これらに限定されない。タンパク質の膜貫通および細胞質配列を含む例示的なシグナル伝達タンパク質の説明を、以下に、さらに表 1 A に提供する。

【0109】

2 B 4 (ナチュラルキラー細胞受容体 2 B 4) は、シグナル伝達リンパ球活性化分子 (S L A M) である C D 4 8 の受容体である。リガンドが結合すると、2 B 4 は、多種多様な免疫細胞の活性化および分化を調節するため、自然免疫応答および適応免疫応答の両方の調節および相互接続に関与する。活性化 N K 細胞受容体として作用する 2 B 4 は、N K 細胞の細胞毒性、I F N- γ の産生、および顆粒エキソサイトーシスを刺激する。N K 細胞の最適な増殖および活性化は、隣接する N K 細胞で発現する C D 4 8 と 2 B 4 の関与に依存しているようである。2 B 4 は、C D 8 + T 細胞増殖の調節にも関与している。活性化 T 細胞での 2 B 4 の発現および C D 4 8 へのその結合は、隣接する T 細胞に共刺激のような機能を提供する。さらに、2 B 4 は、白血球遊走に関与している。

【0110】

4-1 B B (腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー 9) は、T N F S F 9 /

10

20

30

40

50

4-1 B B Lの受容体であり、腫瘍壊死因子を介したシグナル伝達経路を通してT細胞の活性化に関与している。

【0111】

CD16 (IgG Fc領域受容体IIIA)は、IgGのFc領域の受容体である。それは、抗体依存性細胞毒性(ADCC)およびその他の抗体依存性応答を媒介し、免疫応答の調節に関与している。

【0112】

CD2 (T細胞表面抗原CD2)は、リンパ球機能関連抗原CD58 (LFA-3)およびCD48/BCM1と相互作用して、T細胞と他の細胞型との間の接着を媒介する。CD2の細胞質ドメインは、T細胞の活性化を引き起こすシグナル伝達機能に関与している。CD2は、白血球遊走、NK細胞の活性化、T細胞の分化、ならびにIFN-γおよびIL8分泌の調節にも関与している。

【0113】

CD28 (T細胞特異的糖タンパク質CD28)は、T細胞受容体シグナル伝達経路に関与し、T細胞の活性化および共刺激、細胞増殖の誘導、サイトカイン産生、およびT細胞の生存の促進に影響を及ぼす。CD28はまた、制御性T細胞の分化を調節し、TCR/CD3ライゲーションおよびCD40L共刺激と組み合わせてT細胞におけるIL4およびIL10の産生を増強する。

【0114】

CD28H (膜貫通および免疫グロブリンドメイン含有タンパク質2)は、免疫応答、細胞間相互作用、細胞遊走、および血管新生において役割を果たす。HLA2との相互作用を通じて、CD28Hは、TCR媒介性活性化の状況においてT細胞を共刺激する。さらに、CD28Hは、AKT依存性シグナル伝達カスケードを介してT細胞増殖およびサイトカイン産生を増強する。

【0115】

CD3ζ (またはCD3Z; T細胞表面糖タンパク質CD3ゼータ鎖)は、適応免疫応答に不可欠な役割を果たすTリンパ球細胞表面に提示されるTCR-CD3複合体の一部である。抗原提示細胞(APC)がT細胞受容体(TCR)を活性化すると、TCR媒介性シグナルがCD3鎖CD3D、CD3E、CD3G、およびCD3Zによって細胞膜を越えて伝達される。すべてのCD3鎖は、細胞質ドメインに免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ(ITAM)を含む。TCRが関与すると、これらのモチーフは、リン酸化され、下流のシグナル伝達経路の活性化につながる。CD3Zは、胸腺内T細胞の分化に重要な役割を果たす。

【0116】

DAP10 (造血細胞シグナルトランスデューサー)は、KLRK1と関連して、リンパ系および骨髄性細胞で活性化受容体KLRK1-HCSTを形成する膜貫通アダプタータンパク質である。KLRK1-HCST受容体は、腫瘍に対する免疫学的監視において役割を果たし、通常、細胞表面リガンド、例えば、MHCクラスI鎖関連MICAおよびMICB、ならびにUL16結合タンパク質(ULBP)を発現する腫瘍細胞の細胞崩壊に必要であり、これらのリガンドがウイルス感染および腫瘍の形質転換などの応力条件および病的状態によって上方調節されている。NK細胞では、KLRK1-HCSTシグナル伝達は、細胞毒性を直接誘導し、サイトカイン産生を増強する。T細胞では、それは、TCR誘導シグナルの共刺激を提供する。

【0117】

DAP12 (TYROタンパク質チロシンキナーゼ結合タンパク質)は、様々な免疫細胞の表面に見られる受容体の活性化に関連するアダプタータンパク質であり、受容体によるリガンド結合後にシグナル伝達および細胞活性化を媒介する。DAP12は、KIR2DS2およびKLRD1/KLRC2ヘテロ二量体などのナチュラルキラー(NK)細胞受容体と関連しており、NK細胞の活性化を媒介する。DAP12はまた、NK細胞受容体KIR2DS1、KIR2DS2、およびKIR2DS4の輸送および細胞表面発現を

10

20

30

40

50

増強し、細胞表面でのそれらの安定性を確保する。さらに、DAP12は、B細胞の増殖を負に調節する。

【0118】

DNAM1 (CD226抗原)は、免疫応答、細胞間接着、リンパ球シグナル伝達、細胞毒性Tリンパ球 (CTL) およびNK細胞によって媒介される細胞毒性およびリンホカイン分泌に関与している。DNAM1はまた、T細胞受容体シグナル伝達も調節し、IL2、IL5、IL10、IL13、およびIFN γ のものを含むT細胞増殖およびサイトカイン産生を刺激する。

【0119】

FcERI γ (高親和性免疫グロブリンイプシロン受容体サブユニットガンマ)は、様々な免疫受容体からの活性化シグナルを伝達するアダプタータンパク質である。それは、MHCクラスIおよびII、免疫グロブリン媒介免疫応答、自然免疫応答、白血球遊走、IL-10、IL-6、TNF、およびT細胞分化の正の調節を介した抗原処理および外因性ペプチド抗原の提示に関与している。

【0120】

IL21R (インターロイキン-21受容体)は、IL21を媒介したシグナル伝達経路に関与し、ナチュラルキラー細胞の活性化の役割を果たす。

【0121】

IL-2R β / IL-15RB (インターロイキン-2受容体サブユニットベータ)は、インターロイキン2受容体のベータサブユニットであり、IL15RAと関連しており、受容体を媒介したエンドサイトーシスに関与し、IL2のシグナルを形質導入する。IL-2R β は、アポトーシスプロセスの負の調節を通じて細胞の持続性に影響を及ぼし得る。

【0122】

IL-2R γ (サイトカイン受容体共通サブユニットガンマ)は、様々なインターロイキンの受容体に共通のサブユニットであり、IL15、IL21、IL2、IL4、IL7、IL9を媒介したシグナル伝達経路に関与している。

【0123】

IL-7R (インターロイキン-7受容体サブユニットアルファ)は、インターロイキン7の受容体であり、IL7媒介性シグナル伝達経路、細胞形態形成、T細胞分化、細胞数恒常性、細胞増殖、免疫応答、および免疫グロブリン産生に関与している。

【0124】

KIR2DS2 (キラー細胞免疫グロブリン様受容体2DS2)は、HLA-C対立遺伝子のナチュラルキラー (NK) 細胞の受容体である。KIR2DS2は、NK細胞の活性を阻害せず、自然免疫応答および免疫応答の調節に関与している。

【0125】

NKG2D (NKG2-DタイプII内在性膜タンパク質)は、自己腫瘍細胞およびウイルス感染細胞の表面に提示される様々な細胞ストレス誘導性リガンドに結合すると、免疫学的監視に関与する活性化および共刺激受容体として機能を果たす。例えば、NKG2Dは、MICA、MICB、RAET1E、RAET1G、RAET1L / ULBP6、ULBP1、ULBP2、ULBP3 (ULBP2 > ULBP1 > ULBP3)、およびULBP4を含むMHCクラスI関連糖タンパク質の様々なサブファミリーに属するリガンドに結合する。NKG2Dは、NK細胞を活性化し、活性化キラー (NK) 細胞に対して刺激性および共刺激性の両方の自然免疫応答を提供し、細胞毒性活性をもたらす。NKG2Dは、T細胞の活性化を増幅することにより、CD8+T細胞を媒介した適応免疫応答においてT細胞受容体 (TCR) の共刺激受容体として機能する。NKG2Dは、リガンド発現腫瘍細胞のパーフォリン媒介性の排出を刺激する。NKG2Dはまた、カルシウム流入を伴うシグナル伝達に関与し、TNF- α 発現を最高潮に達し、NK細胞を媒介した骨髄移植片拒絶反応に関与している。NKG2Dは、NK細胞の細胞分化および生存においても調節的な役割を果たし得る。

10

20

30

40

50

【0126】

NKp30（天然細胞毒性誘発受容体3）は、ナチュラルキラー細胞の細胞膜受容体であり、BAG6およびNCR3LG1を含む細胞外リガンドの結合により活性化される。NKp30は、細胞認識、免疫応答、および免疫応答の調節に関与している。さらに、NKp30は、腫瘍細胞を含む隣接細胞に対するNK細胞の細胞毒性を刺激し、これらのリガンドを産生する。例えば、腫瘍細胞に対するNK細胞の細胞毒性を制御する。

【0127】

NKp44（天然細胞毒性誘発受容体2）およびNKp46（天然細胞毒性誘発受容体1）は、細胞毒性を活性化する受容体であり、腫瘍細胞の溶解を媒介する活性化ナチュラルキラー（NK）細胞の効率の向上に貢献し得る。NKp44およびNKp46はどちらも、細胞防御応答、自然免疫応答、およびそれらの調節に関与している。

【0128】

CS1（SLAMファミリーメンバー7）は、シグナル伝達リンパ球活性化分子（SLAM）ファミリーの自己リガンド受容体である。SLAM受容体は、多種多様な免疫細胞の活性化を調節し、その分化に機能するため、自然免疫応答および適応免疫応答の両方の調節および相互接続に関与する。SLAM受容体の活性は、小さな細胞質アダプタータンパク質、SH2D1A／SAP、および／またはSH2D1B／EAT-2の有無により制御される。SLAM受容体は、リン酸化SH2D1Bに依存する機構により、NK細胞の活性化および細胞毒性を正に調節する。SLAM受容体はまた、細胞接着にも関与している。

【0129】

CD8（T細胞表面糖タンパク質CD8アルファ鎖）は、免疫応答に不可欠な役割を果たし、外部および内部の両方の攻撃に対する応答で複数の機能を果たす内在性膜糖タンパク質である。T細胞では、CD8は、主にMHCクラスI分子：ペプチド複合体のコレセプターとして機能する。NK細胞では、細胞表面にCD8Aホモ二量体の存在は、複数の標的細胞の接合および溶解を可能にする生存機構を提供する。CD8Aホモ二量体分子はまた、活性化リンパ球の生存および記憶CD8T細胞への分化を促進する。

【0130】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1 A :

	タンパク質名	UniProtKB 受入番号	膜貫通配列	細胞質配列
2B4	ナチュラルキラー細胞受容体 2B4	Q9BZW8	FLVILVLSALFLGTL ACFCV (配列番号 1)	WRRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDVKDL KTRRNHEQEQTFFPGGGSTIYSMIQSQSS APTSQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNH SPSFNSTIYEVIGKSQPKAQNPAPLSRK ELENFDVYS (配列番号 21)
4-1BB _γ	腫瘍壊死因子受容体 スーパーファミリー メンバー9	Q07011	IISFFLALTSTALLFL LFFLTLRFSVV (配列番号 2)	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEGGCEL (配列番号 22)
CD16	IgG Fc 領域受容体 III-A	P08637	VSFCLVMVLLFAVD TGLYFSVKTNIRSST RD (配列番号 3)	WKDHFVKWRKDPQDK (配列番号 23)
CD2	T細胞表面抗原 CD2	P06729	IYLIIGICGGGSLLM VFVALLVFYITKRK KQRSRRNDEELETR AHRVATEERGRKPH QIPASTPQNPAQSQ PPPPGHRVQAPSHR PPPPGHRVQ (配列番号 4)	HQPQKRPPAPSGTQVHQKGPPLPRPR VQPKPPHGAENSLSPSSN (配列番号 24)
CD28	T細胞特異的表面糖 タンパク質 CD28	P10747	FWVLVVVGGVLAC YSLLVTVAFIIFVW (配列番号 5)	RSKRSLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRS (配列番号 25)
CD28H	膜貫通および免疫グ ロブリンドメイン含 有タンパク質 2	Q96BF3	FLFVLLGVGSMGVA AIVWGAW (配列番号 6)	FWGRRSCQQRDSGNPNAFYNSVLY RPRGAPKSEDCSGEGKDQRGQSIYST SFPQAPRQPHLASRPCSPRCPSPRPG HPVSMVRVSPRPSPTQQPRPKGFVKV EE (配列番号 26)
CD3 ζ	T細胞表面糖タンパ ク質 CD3 ゼータ鎖	P20963	LCYLLDGILFIYGV LTLFL (配列番号 7)	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQUALPPR (配列番号 27) RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAFSEIGMK ERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDAL HMQUALPPR (配列番号 41; ITAM1 に 2 つの変異を含 む; CD3 ζ 1XX)
DAPI0	造血細胞シグナルト ランスドューサー	Q9UBK5	LLAGLVAADAVASL LIVGAVF (配列番号 8)	LCARPRSPAQEDGKVIYNMPGRG (配列番号 28)
DAPI2	TYRO タンパク質チ ロシンキナーゼ結合 タンパク質	O43914	GVLGIVMGDLVLT VLIALAV (配列番号 9)	YFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETE SPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK (配列番号 29)

【 0 1 3 1 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

DNAM1	CD226 抗原	Q15762	GGTVLLLLFVISITTI IVIFL (配列番号 10)	NRRRRRERRDLFTESWDTQKAPNNYR SPISTSQPTNQSMDDTREDIYVNYPTFS RRPKTRV (配列番号 30)
FcER1γ	高親和性免疫グロブリンイブシロン受容体サブユニットガンマ	P30273	CYILDAILFLYGIVL TLLYC (配列番号 11)	RLKIQVRKAAITSYEKSDGVYTGLSTR NQETYETLKHEKPPQ (配列番号 31)
IL-21R	インターロイキン-21 受容体	Q9HBE5	GWNPHLLLLLLVI VFIPAFW (配列番号 12)	SLKTHPLWRLWKKIWAVSPERFFMPL YKGCSDGDFKKWVGAPFTGSSLELGPW SPEVPSTLEVYSCHPPRSPAKRLQTEL QEPALVESDGVKPSFWPTAQNSGGS AYSEERDRPYGLVSIDTVTVLDAEGPC TWPCSCEDDGYALDLDAGLEPSGLE DPLLDAGTTVLSCGCVSAGSPGLGGPL GSLLDRLKPLADGEDWAGGLPWGGR SPGGVSESEAGSPLAGLDMDTFDSGFV GSDCSSPVECDFTSPGDEGPPRSYLRLQ WVVIPLPLSSPGPQAS (配列番号 32)
IL-2RB (IL-15RB)	インターロイキン-2 受容体サブユニットベータ	P14784	IPWLGHLLVGLSGA FGFIILVYLLI (配列番号 13)	NCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQL SSEHGGDVQKWLSPPFSSSFSPGGLAP EISPLEVLERDKVTQLLQQDKVPEPAS LSSNHSILTSCFTNQGYFFHLPLDALEIE ACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTG SSPQLQLSGEDDAYCTFPSRDDLLLF SPSLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPS LQERVPRDWDPPQLGPPTPGVPDLVDF QPPPELVREAGEEVPDAGPREGVSFP WSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSL Q ELQGQDPTHLV (配列番号 33)
IL-2RG	サイトカイン受容体共通サブユニットガンマ	P31785	VVISVGSMLIISLL CVYFWL (配列番号 14)	ERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNSAW SGVSKGLAESLPDYSERLCLVSEIPPK GGALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYT LKPET (配列番号 34)
IL-7R	インターロイキン-7 受容体サブユニットアルファ	P16871	PILLTISILSFFSVALL VILACVLW (配列番号 15)	KKRIKPIVWPSLPDHKKTLLEHLCKKPR KNLNVSFNPESFLDCQIHRVDDIQARD EVEGFLQDTFPQQLSESEKQRLGGDVQ SPNCPSSEVVITPESFGRDSSLTCLAGN VSACDAPILSSSRSLDCRESGKNGPHV YQDLLLSLGTNSTLPPPSLQSGILTL NPVAQGPILTSLGSNQEEAYVTMSSF YQNQ (配列番号 35)
KIR2DS 2	キラー細胞免疫グロブリン様受容体 2DS2	P43631	VLIGTSVVKIPFTILL FFLL (配列番号 16)	HRWCSNKKNAAVMDQEPAGNRTVNS EDSDEQDHQEVSYA (配列番号 36)

【 0 1 3 2 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

NKG2D	NKG2-D タイプ II 内在性膜タンパク質	P26718	PFFCCFIAMGIR FILMVA (配列番号 17)	IWSAVFLNSLFNQEVQIPLTESYCGPCP KNWICYKNNCYQFFDESKNWEQAS CMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLKVS HWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNL LTIEMQKGDALYASSFKGYIENCSTP NTYICMQRTV (配列番号 37)
NKp30	天然細胞毒性誘発受容体 3	O14931	AGTVLLLRAGFYAV SFLSVAV (配列番号 18)	GSTVYYQKCLTWKGPRRQLPAVVP PLPPPCGSSAHLPPVPGG (配列番号 38)
Nkp44	天然細胞毒性誘発受容体 2	O95944	LVPVFCGLLVAKSL VLSALLV (配列番号 19)	WWGDIWWKTMMELRSLDTQKATCHL QQVTDLPWTSVSSPVEREILYHTVART KISDDDEHTL (配列番号 39)
NKp46	天然細胞毒性誘発受容体 1	O76036	GLAFLVLVALVWFL VEDWLS (配列番号 20)	RKRTREASRASTWEGRRRLNTQTL (配列番号 40)
CS1	SLAM ファミリーメンバー 7	Q9NQ25	VLLC LLLVPLLLSL FVLGLFL (配列番号 53)	WFLKRERQEEYIEKKRVDICRETPNIC PHSGENTYDTIPHTNRTILKEDPANTV YSTVEIPKKMENPHSLTMPDTPRLFA YENVI (配列番号 54)
CD8	T 細胞表面糖タンパク質 CD8 アルファ鎖	P01732	IYIWAPLAGTC (配列番号 55)	GVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRP VVKSGDKPSLSARYV (配列番号 56)

【0133】

提供される CAR のいくつかの実施形態では、CAR のエンドドメインは、それぞれ、配列番号 21～41、54、および 56 によって表される、2B4、4-1BB、CD16、CD2、CD28、CD28H、CD3ζ、DAP10、DAP12、DNAM1、FcERIγ IL21R、IL-2Rβ (IL-15Rβ)、IL-2Rγ、IL-7R、KIR2DS2、NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46、CD3ζ1XX、CS1、または CD8 の細胞質ドメインもしくはその一部に対して少なくとも約 85%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、または約 99% 同一性であるアミノ酸配列を有する少なくとも第 1 のシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される CAR のシグナル伝達ドメインは、2B4、4-1BB、CD16、CD2、CD28、CD28H、CD3ζ、DAP10、DAP12、DNAM1、FcERIγ IL21R、IL-2Rβ (IL-15Rβ)、IL-2Rγ、IL-7R、KIR2DS2、NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46、CD3ζ1XX、CS1、または CD8 の細胞質ドメインの一部のみ含む。いくつかの実施形態では、CAR シグナル伝達ドメインのために選択される細胞質ドメインの一部は、ITAM (免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ)、YxxM モチーフ、TxYxxV/I モチーフ、FcRγ、ヘミ ITAM、および/または ITT 様モチーフに対して少なくとも約 85%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、または約 99% 同一性であるアミノ酸配列である。

【0134】

提供される CAR のいくつかの実施形態では、第 1 のシグナル伝達ドメインを含む CAR のエンドドメインは、それぞれ、配列番号 21～41、54、および 56 によって表される、2B4、4-1BB、CD16、CD2、CD28、CD28H、CD3ζ、DAP10、DAP12、DNAM1、FcERIγ IL21R、IL-2Rβ (IL-15Rβ)、IL-2Rγ、IL-7R、KIR2DS2、NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46、CD3ζ/1XX (すなわち、CD3ζもしくは CD3ζ1XX)、CS1、または CD8 の細胞質ドメインもしくはその一部に対して少なくとも約 85%

、約 90 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、または約 99 % 同一性であるアミノ酸配列を含む第 2 のシグナル伝達ドメインをさらに含み、第 2 のシグナル伝達ドメインは、第 1 のシグナル伝達ドメインとは異なる。

【0135】

提供される CAR のいくつかの実施形態では、第 1 および第 2 のシグナル伝達ドメインを含む CAR のエンドドメインは、それぞれ、配列番号 21 ~ 41、54、および 56 によって表される、2B4、4-1BB、CD16、CD2、CD28、CD28H、CD3ζ、DAP10、DAP12、DNAM1、FcERIγ、IL21R、IL-2Rβ (IL-15Rβ)、IL-2Rγ、IL-7R、KIR2DS2、NKG2D、NKP30、NKP44、NKP46、CD3ζ/1XX (すなわち、CD3ζ もしくは CD3ζ1XX)、CS1、または CD8 の細胞質ドメインもしくはその一部に対して少なくとも約 85 %、約 90 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、または約 99 % 同一性であるアミノ酸配列を含む第 3 のシグナル伝達ドメインをさらに含み、第 3 のシグナル伝達ドメインは、第 1 および第 2 のシグナル伝達ドメインとは異なる。

【0136】

1 つのシグナル伝達ドメインのみからなるエンドドメインを有する CAR のいくつかの例示的な実施形態では、当該エンドドメインは、DNAM1、CD28H、KIR2DS2、DAP12、または DAP10 を含むが、これらに限定されない、タンパク質の細胞質ドメインもしくはその一部に対して少なくとも約 85 %、約 90 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、または約 99 % 同一性であるアミノ酸配列を含む。

【0137】

2 つの異なるシグナル伝達ドメインからなるエンドドメインを有する CAR のいくつかの例示的な実施形態では、当該エンドドメインは、2B4-CD3ζ/1XX、2B4-DNAM1、2B4-FcERIγ、2B4-DAP10、CD16-DNAM1、CD16-DAP10、CD16-DAP12、CD2-CD3ζ/1XX、CD2-DNAM1、CD2-FcERIγ、CD2-DAP10、CD28-DNAM1、CD28-FcERIγ、CD28-DAP10、CD28-DAP12、CD28H-CD3ζ/1XX、DAP10-CD3ζ/1XX、または DAP10-DAP12、DAP12-CD3ζ/1XX、DAP12-DAP10、DNAM1-CD3ζ/1XX、KIR2DS2-CD3ζ/1XX、KIR2DS2-DAP10、KIR2DS2-2B4、または NKP46-2B4 を含むが、これらに限定されない、形態の融合細胞質ドメインまたはその一部を含む。

【0138】

3 つの異なるシグナル伝達ドメインからなるエンドドメインを有する CAR のいくつかの例示的な実施形態では、当該エンドドメインは、2B4-DAP10-CD3ζ/1XX、2B4-IL21R-DAP10、2B4-IL2RB-DAP10、2B4-IL2RB-CD3ζ/1XX、2B4-41BB-DAP10、CD16-2B4-DAP10、または KIR2DS2-2B4-CD3ζ/1XX を含むが、これらに限定されない、形態の融合細胞質ドメインまたはその一部を含む。

【0139】

いくつかの実施形態では、CAR の膜貫通ドメインは、CD2、CD3D、CD3E、CD3G、CD3ζ、CD4、CD8、CD8a、CD8b、CD16、CD27、CD28、CD28H、CD40、CD84、CD166、4-1BB、OX40、ICOS、ICAM-1、CTLA4、PD1、LAG3、2B4、BTLA、DNAM1、DAP10、DAP12、FcERIγ、IL7、IL12、IL15、KIR2DL4、KIR2DS1、KIR2DS2、NKP30、NKP44、NKP46、NKG2C、NKG2D、CS1、または T 細胞受容体ポリペプチドの膜貫通領域の全長もしくはその一部に対して少なくとも約 85 %、約 90 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、または約 99 % 同一性であるアミノ酸配列を含む。いくつかの他の実施形態では、CAR の膜貫通ドメインは、それぞれ、(a) 配列番号 1 ~ 20、53、および 55 によって表

される、2B4、CD2、CD16、CD28、CD28H、CD3ζ、DAP10、DAP12、DNAM1、FcERIγ、KIR2DS2、NKG2D、Nkp30、Nkp44、Nkp46、CS1、若しくはCD8、又は(b)DAP10、KIR2DS2、2B4、NKG2D、CD28H若しくはDNAM1の膜貫通領域の全長もしくはその一部に対して少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、または約99%同一性であるアミノ酸配列を含む。CARのいくつかの実施形態では、膜貫通ドメインおよびその直接連結されたシグナル伝達ドメインは、同じタンパク質に由来する。CARのいくつかの他の実施形態では、膜貫通ドメインおよび直接連結されたシグナル伝達ドメインは、異なるタンパク質に由来する。

【0140】

表1Bは、膜貫通ドメインおよびエンドドメイン(TM-(エンドドメイン)と表示)を含むCAR構築物の非限定的な例を提供する。一般に、例示されたCAR構築物は、各々、膜貫通ドメインと、1つ以上のシグナル伝達タンパク質の細胞質領域に由来する1つ以上のシグナル伝達ドメインを含むエンドドメインと、を含む。実施形態では、CARエンドドメインに含まれる1つ以上のシグナル伝達ドメインは、TMが由来するのと同じまたは異なるタンパク質に由来する。表1Bに示すように、CARの膜貫通ドメイン(TM)を提示する部分には下線が引かれ、エンドドメインに含まれるドメインは、括弧「()」で示され、TMおよびシグナル伝達ドメインの各々が、ドメイン配列が由来するシグナル伝達タンパク質の名称により表される。実施形態では、各TMまたはシグナル伝達ドメインのアミノ酸配列は、指定されたシグナル伝達タンパク質の対応する膜貫通領域または細胞質領域の全長またはその一部に対して約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、または約99%の同一性であり得る。本明細書で提供される膜貫通ドメインおよびエンドドメインを含む例示的なCAR構築物には、

【配列表2】

NKG2D-(2B4-1L2RB-CD3ζ)、CD8-(41BB-CD3ζ1XX)、CD28-(CD28-2B4-CD3ζ)、CD28H-(CD28H-CD3ζ)、DNAM1-(DNAM1-CD3ζ)、DAP10-(DAP10-CD3ζ)、KIR2DS2-(KIR2DS2-CD3ζ)、KIR2DS2-(KIR2DS2-DAP10)、KIR2DS2-(KIR2DS2-2B4)、CD16-(CD16-2B4-DAP10)、CD16-(CD16-DNAM1)、Nkp46-(Nkp46-2B4)、Nkp46-(Nkp46-2B4-CD3ζ)、Nkp46-(Nkp46-CD2-DAP10)、CD2-(CD2-CD3ζ)、2B4-(2B4-CD3ζ)、2B4-(2B4-FcERIγ)、およびCS1-(CS1-CD3ζ)

が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインおよびエンドドメインを含む上記の例示的なCAR構築物の各々は、表1Bの配列番号57~74の各々によって表される配列に対して約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または100%の同一性のアミノ酸配列を含む。表1Bに提供されている各構築物に対する例示的な配列は、配列の左側の図の対応する領域のフォーマット(すなわち、下線、通常、または太字のテキスト)と一致するようにフォーマット済みのテキストを有する。表1Bの例示的な構築物のほとんどでは、TMが、第1の配列領域であるが、構築物は、TMに先行する細胞外ドメインを含み得(例えば、構築物6を参照)、TMと同じまたは異なるタンパク質に由来し得る。いくつかの実施形態では、CARエンドドメインに含まれる2つ以上のシグナル伝達ドメインは、スペーサーまたはリンカーなどの1つ以上の追加の配列によって分離され得る。

【0141】

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表 1 B :

構築物	配列ドメイン TM-(エンドドメ イン)	例示的な配列	配列番 号
3	NKG2D-(2B4-IL2 RB-CD3z)	SNLFVASWIAVMIIFRIGMAVAIFCCFFFP WRRKRKEKQSETSPKEFLTI YEDVKDLKTRRNHEQEQTTPGGGSTIYSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLI QPSRKSGSRKRNHSPSFNSTIYEVIGKSQPKAQNPARLSRKELENFDVYS NCRNTGPWLKKVVKCNTDPDSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPG GLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLSCTFTNQGYFFF HLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQLQLSGEDDAY CTFPSRDDLLLSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWD QPLGPPTPGVVDLVDFQPPPELVREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGGG EFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLVRVKFSRSADAPAYQQGQNQL YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	57
6	CD8-(41BB- CD3z1XX)	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGGH GLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR	58
7	CD28-(CD28-2B4 -CD3z)	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLHSDYMNMTPRRPGPTR KHYQPYAPPRDFAAYRS WRRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTRRNHE QEQTTPGGGSTIYSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNH PSFNSTIYEVIGKSQPKAQNPARLSRKELENFDVYSRVKFSRSADAPAYQQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	59
8	CD28H-(CD28H-C D3z)	FLFVLLGVGSMGVAAIVWGAWFWRGRRSCQQRDSGNSPGNAFYSNVLYRPRG APKKSSEDCSGEGKDQRGQSIYSTSFPQAPRQPHLASRPCSPRCPSPRP GHPVSMVRVSPRPSPTQQPRPKGFVKVGE RVKFSRSADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY SEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	60
9	DNAM1-(DNAM1-C D3z)	GGTVLLLLFVISITTIIVIFLNRRRRRRERRDLFTESWDTQKAPNNYRSPIS TSQPTNQSMDDTREDIYVNYPTFSRRPKTRV RVKFSRSADAPAYQQGQNQL YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	61
10	DAP10-DAP10-(D AP10-CD3z)	TTPGERSSLPAYPGTSGSCSGCSLSLPLLAGLVAADAVASLLIVGAVFL CARPRSPAQEDGKVYINMPGRGR RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	62

【 0 1 4 2 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

11	<u>KIR2DS2</u> -(KIR2D S2- CD3z)	VLIGTSVVKIPFTILLFFLLHRWCSNKKNAAVMDQEPAGNRTVNSEDSDEQ DHQEVSYARVKFSRSADAPAYQQGQNLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG LSTATKDTYDALHMQALPPR	63
12	<u>KIR2DS2</u> -(KIR2D S2- DAP10)	VLIGTSVVKIPFTILLFFLLHRWCSNKKNAAVMDQEPAGNRTVNSEDSDEQ DHQEVSYALCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRG	64
13	<u>KIR2DS2</u> -(KIR2D S2- 2B4)	VLIGTSVVKIPFTILLFFLLHRWCSNKKNAAVMDQEPAGNRTVNSEDSDEQ DHQEVSYAWRRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTRRNHEQEQTFFPGG GSTIYSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPSFNSTIY EVIGKSQPKAQNPARLSRKELENFDVYS	65
14	<u>CD16</u> -(CD16- 2B4 -DAP10)	VSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWDHKFKWRKDPQDKWRRKR KEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTRRNHEQEQTFFPGGGSTIYSMIQSQSS APTSQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPSFNSTIYEVIGKSQPKAQNP ARLSRKELENFDVYSLCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRG	66
15	<u>CD16</u> -(CD16- DNA M1)	VSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWDHKFKWRKDPQDKNRRRR RERRDLFTESWDTKAPNNYRSPISTSQPTNQSMDDTREDIYVNYPTFSR RPKTRV	67
16	<u>NKp46</u> -(NKp46- 2 B4)	MGLAFLVLVALVWFLVEDWLSRKTRERASRASTWEGRRRLNTQTLWRRKR KEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTRRNHEQEQTFFPGGGSTIYSMIQSQSS APTSQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPSFNSTIYEVIGKSQPKAQNP ARLSRKELENFDVYS	68
17	<u>NKp46</u> -(NKp46- 2 B4 -CD3z)	MGLAFLVLVALVWFLVEDWLSRKTRERASRASTWEGRRRLNTQTLWRRKR KEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTRRNHEQEQTFFPGGGSTIYSMIQSQSS APTSQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPSFNSTIYEVIGKSQPKAQNP ARLSRKELENFDVYSRVKFSRSADAPAYQQGQNLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	69
18	<u>NKp46</u> -(NKp46- C D2 -Dap10)	MGLAFLVLVALVWFLVEDWLSRKTRERASRASTWEGRRRLNTQTLKRKKQ RSRRNDEELETRAHRVATEERGRKPHQIPASTPQNPATSQHPPPPPHRS QAPSHRPPPPGHRVQHQPQRPPAPSGTQVHQKGPPLPRPRVQPKPPHG AAENSLSPSSNLCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRG	70

【 0 1 4 3 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

19	CD2-(CD2-CD3z)	IYLIIGICGGGSLLMVFVALLVFYITKRKKQRSRRNDEELETTRAHRVATEE RGRKPHQIPASTPQNPAATSQHPPPPGHRSQAPSHRPPPGHVRVHQHPQKR PPAPSGTQVHQKQKGPPLPRPRVQPKPPHGAENSLSPSSNRVKFSRSADAP AYQQGQNLQYLNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP R	71
20	2B4-(2B4-CD3z)	FLVIIIVILSALFLGTLACFCVWRRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTR RNHEQEQTTPGGGSTIYSMIQSSSAPTSEQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRKR NHSPSFNSTIYEVIGKSQPKAQNPAPLSRKELNFDVYSRVKFSRSADAPA YQQGQNLQYLNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	72
21	2B4-(2B4-FcERI g)	FLVIIIVILSALFLGTLACFCVWRRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTR RNHEQEQTTPGGGSTIYSMIQSSSAPTSEQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRKR NHSPSFNSTIYEVIGKSQPKAQNPAPLSRKELNFDVYSRLKIQVRKAAIT SYEKSDGVYTGSTRNQETIYETLKHKKPPQ	73
22	CS1-(CS1-CD3z)	VLLCLLVPLLLSLFVLGLFLWFLKRERQEEYIEKKRVDICRETPNICPH SGENTYDTPHTNRTILKEDPANTVYSTVEIPKKMENPHSLTTPDTPRL FAYENVIRVKFSRSADAPAYQQGQNLQYLNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL STATKDTYDALHMQALPPR	74

【0144】

上記に提供される T M - (エンドドメイン) のうちのいずれかを含む C A R は、C A R のエクストドメインに含まれる抗原結合ドメインによって決定される少なくとも 1 つの抗原を特異的に標的とするように構築され得る。いくつかの実施形態では、C A R は、疾患または病原体に関連する抗原を特異的に標的とし得る。いくつかの実施形態では、C A R は、腫瘍抗原を特異的に標的とし得、腫瘍は、液性または固形腫瘍であり得る。C A R のエクストドメインは、抗原特異的結合のための 1 つ以上の抗原認識ドメインを含む。いくつかの実施形態では、外部ドメインは、シグナルペプチドもしくはリーダー配列、および／またはスペーサーをさらに含み得る。

【0145】

ある特定の実施形態では、提供された C A R のエクストドメインは、マウス抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ I g、サメ重鎖のみの抗体 (V N A R)、I g N A R、キメラ抗体、組換え抗体、またはその抗体断片を含む抗原認識ドメインを含む。抗体断片の非限定的な例としては、F a b、F a b'、F (a b)' 2、F (a b)' 3、F v、抗原結合単鎖可変断片 (s c F v)、(s c F v) 2、ジスルフィド安定化 F v (d s F v)、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、単ドメイン抗原結合断片 (s d A b、ナノボディ)、組換え重鎖のみの抗体 (V H H)、および全抗体の結合特異性を維持する他の抗体断片が挙げられる。

【0146】

遺伝子操作された i P S C および派生エフェクター細胞に含まれる C A R によって標的とされ得る抗原の非限定的な例としては、A D G R E 2、炭酸脱水酵素 I X (C A I X)、C C R I、C C R 4、がん胎児性抗原 (C E A)、C D 3、C D 5、C D 7、C D 8、C D 10、C D 19、C D 20、C D 22、C D 30、C D 33、C D 34、C D 38、C D 41、C D 44、C D 44 V 6、C D 49 f、C D 56、C D 70、C D 74、C D 99、C D 123、C D 133、C D 138、C D 269 (B C M A)、C D S、C L E C 12 A、サイトメガロウイルス (C M V) 感染細胞の抗原 (例えば、細胞表面抗原)、上皮糖タンパク質 2 (E G P 2)、上皮糖タンパク質 - 40 (E G P - 40)、上皮細胞接着分子 (E p C A M)、E G F R v I I I、受容体チロシンタンパク質キナーゼ e r b - B 2、3、4、E G F I R、E G F R - V I I I、E R B B 葉酸結合タンパク質 (F B P)、胎児アセチルコリン受容体 (A C h R)、葉酸受容体 - a、ガングリオシド G 2 (

G D 2)、ガングリオシド G 3 (G D 3)、ヒト上皮増殖因子受容体 2 (H E R - 2)、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (h T E R T)、I C A M - 1、インテグリン B 7、インターロイキン - 1 3 受容体サブユニットアルファ - 2 (I L - 1 3 R α 2)、κ - 軽鎖、キナーゼ挿入ドメイン受容体 (K D R)、ルイス A (C A 1 9 . 9)、ルイス Y (L e Y)、L 1 細胞接着分子 (L 1 - C A M)、L I L R B 2、メラノーマ抗原ファミリー A 1 (M A G E - A 1)、ムチン 1 (M u c - 1)、ムチン 1 6 (M u c - 1 6)、メソセリン (M S L N)、N K C S I、N K G 2 D リガンド、c - M e t、がん - 精巢抗原 N Y - E S O - 1、腫瘍胎児性抗原 (h 5 T 4)、P R A M E、前立腺幹細胞抗原 (P S C A)、P R A M E 前立腺特異的膜抗原 (P S M A)、腫瘍関連糖タンパク質 7 2 (T A G - 7 2)、T I M - 3、T R B C I、T R B C 2、血管内皮成長因子 R 2 (V E G F - R 2)、ウィルムス腫瘍タンパク質 (W T - 1)、および当該技術分野で既知の様々な病原体抗原が挙げられる。病原体の非限定的な例としては、病気を引き起こすことが可能なウイルス、細菌、真菌、寄生虫、および原生動物が挙げられる。

【0147】

いくつかの実施形態では、提供される C A R のエクストドメインは、シグナルペプチドをさらに含む。シグナルペプチドは、C A R ポリペプチドを小胞体 (E R) に誘導し、適切なグリコシル化およびプラムサ膜への固定を行う。一般に、分泌タンパク質を E R 経路に標的化する任意の真核生物シグナル配列を使用することができる。例示的な適切なシグナルペプチドには、I L - 2 シグナル配列、カップリーダー配列、C D 8 α リーダー配列、アルブミンシグナル配列、プロラクチンシグナル配列、および I g G シグナルペプチド、および G M - C S F シグナルペプチドが含まれるが、これらに限定されない。

【0148】

いくつかの実施形態では、提供された C A R のエクストドメインは、任意に、抗原認識ドメインと C A R の膜貫通ドメインとの間の柔軟性を提供するために、ヒンジ (スパーサーとも呼ばれる) 領域を含み得る。いくつかの例示的かつ非限定的な実施形態では、C A R のヒンジは、C D 8、C D 2 8、C D 3 ζ、C D 4 0、4 - 1 B B、O X 4 0、C D 8 4、C D 1 6 6、C D 8 α、C D 8 β、I C O S、I C A M - 1、C T L A - 4、C D 2 7、C D 4 0、N K G D 2、I g G 1、または免疫グロブリンの C H 2 / C H 3 ドメイン、またはそれらの組み合わせなどの既知のポリペプチドのヒンジ領域に対して少なくとも約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 %、約 9 6 %、約 9 7 %、約 9 8 %、または約 9 9 % 同一性であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、提供された C A R のヒンジ領域は、免疫グロブリンの C H 2 / C H 3 ドメインに対して少なくとも約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 %、約 9 6 %、約 9 7 %、約 9 8 %、または約 9 9 % 同一性であるアミノ酸配列を含む。

【0149】

いくつかの実施形態では、提供される 1 つ以上の C A R を含むエフェクター細胞は、自己免疫障害、血液悪性腫瘍、固形腫瘍、または H I V、R S V、E B V、C M V、アデノウイルス、もしくは B K ポリオーマウイルスに関連する感染症を治療するために使用され得る。血液悪性腫瘍の例には、急性および慢性白血病 (急性骨髄性白血病 (A M L)、急性リンパ芽球性白血病 (A L L)、慢性骨髄性白血病 (C M L)、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫 (N H L)、ホジキン病、多発性骨髄腫、および骨髄異形成症候群が含まれるが、これらに限定されない。固形がんの例には、脳、前立腺、乳房、肺、結腸、子宮、皮膚、肝臓、骨、脾臓、卵巣、精巣、膀胱、腎臓、頭、首、胃、子宮頸部、直腸、喉頭、および食道のがんが含まれるが、これらに限定されない。様々な自己免疫障害の例には、円形脱毛症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、皮膚筋炎、糖尿病 (1 型)、若年性特発性関節炎のいくつかの形態、糸球体腎炎、グレーブス病、ギランバレー症候群、特発性血小板減少性紫斑病、重症筋無力症、心筋炎のいくつかの形態、多発性硬化症、類天疱瘡 / 類天疱瘡、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性筋炎、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、リウマチ様関節炎、強皮症 / 全身性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデス、甲状腺炎のいくつかの形態、ブドウ膜炎のいくつかの形態、白斑、多発血管炎を伴う肉芽腫症 (ウェゲナー病) が含まれるが、これらに限定されない。ウイルス感染の例には、

H I V-（ヒト免疫不全ウイルス）、H S V-（単純ヘルペスウイルス）、K S H V-（カポシ肉腫関連ヘルペスウイルス）、R S V-（呼吸器合胞体ウイルス）、E B V-（エプスタインバーウイルス）、C M V-（サイトメガロウイルス）、V Z V（水痘带状疱疹ウイルス）、アデノウイルス、レンチウイルス、B Kポリオーマウイルス関連障害）が含まれるが、これらに限定されない。

【0150】

本発明の一態様は、本明細書で提供されるエンドドメインのうちの1つを含むC A Rをコードするポリヌクレオチドを含む、i P S Cおよびそれから分化した派生エフェクター細胞を提供する。当該C A Rの一実施形態では、C A Rは、C D 1 9 特異的である。別の実施形態では、C A Rは、M I C A / B 特異的である。別の実施形態では、C A Rは、B C M A 特異的である。さらに別の実施形態では、C A Rは、C D 3 8 特異的である。さらに別の実施形態では、C A Rは、H E R 2 特異的である。他の1つの実施形態では、C A Rは、M S L N 特異的である。さらに、別の実施形態では、C A Rは、P S M A 特異的である。さらに別の実施形態では、C A Rは、V E G F - R 2 特異的である。

【0151】

本発明の別の態様では、提供されるエンドドメインのうちの1つを含む第1のC A Rをコードするポリヌクレオチドを含む、i P S Cおよびそれから分化した派生エフェクター細胞は、異なる抗原特異性を有する第2のC A Rをさらに含み得る。第2のC A Rのエンドドメインは、第1のC A Rのエンドドメインと同じであっても同じでなくてもよい。いくつかの実施形態では、第2のC A Rは、第1のC A Rのエンドドメインとは異なるエンドドメインを含み、本明細書で提供されるエンドドメインのうちの1つである。いくつかの他の実施形態では、第2のC A Rは、第1のC A Rのエンドドメインとは異なるエンドドメインを含み、本明細書で提供されるエンドドメインのうちの1つではない。

【0152】

非限定的なC A R戦略には、一対の細胞内ドメインの二量体化を介したヘテロ二量体の条件付き活性化C A R（例えば、米国特許第9, 587, 020号を参照されたい）；C A Rを生成するための抗原結合、ヒンジ、およびエンドドメインの相同組換えである分割C A R（例えば、米国公開第2017/0183407号を参照されたい）；抗原結合ドメインおよびシグナル伝達ドメインにそれぞれ接続された2つの膜貫通ドメイン間の非共有結合を可能にする多鎖C A R（例えば、米国公開第2014/0134142号を参照されたい）；二重特異性抗原結合ドメインを有する（例えば、米国特許第9, 447, 194号を参照されたい）か、または同じもしくは異なる抗原もしくはエピトープを認識する一対の抗原結合ドメインを有する（例えば、米国特許第8, 409, 577号を参照されたい）C A R、またはタンデムC A R（例えば、H e g d e e t a l., J C l i n I n v e s t. 2016; 126(8): 3036-3052を参照されたい）；誘導性C A R（例えば、米国公開第2016/0046700号、同第2016/0058857号、同第2017/0166877号を参照されたい）；切り替え可能なC A R（例えば、米国公開第2014/0219975号を参照されたい）；および当技術分野で既知の任意の他の設計が含まれる。

【0153】

本明細書で提供される1つ以上のC A Rの挿入に好適なゲノム遺伝子座には、ゲノムセーフハーバーの基準を満たす遺伝子座、および／または挿入の結果として選択された遺伝子座での遺伝子のノックダウンまたはノックアウトが望まれる遺伝子座が含まれる。いくつかの実施形態では、C A R挿入のための好適なゲノム遺伝子座としては、A A V S 1、C C R 5、R O S A 2 6、コラーゲン、H T R P、H 1 1、G A P D H、R U N X 1、B 2 M、T A P 1、T A P 2、タパシン、N L R C 5、C I I T A、R F X A N K、R F X 5、R F X A P、T C R α または β 定常領域、N K G 2 A、N K G 2 D、C D 3 8、C D 5 8、C D 5 4、C D 5 6、C I S、C B L - B、S O C S 2、P D 1、C T L A 4、L A G 3、T I M 3、およびT I G I Tを含むが、これらに限定されない。

【0154】

一実施形態では、CARを含むiPSCおよびその派生細胞は、TCR定常領域（TRACまたはTRBC）に挿入され、TCRノックアウトをもたらし、任意選択的にCAR発現を内因性TCRプロモーターの制御下に置く。TCRヌルおよび提供されるエンドドメインのうちの1つを含むCARを含むiPSC派生細胞の1つの特定の実施形態では、当該派生細胞は、T細胞である。別の実施形態では、CARを含むiPSCおよびその派生細胞は、NKG2A遺伝子座またはNKG2D遺伝子座に挿入されたCARを有し、NKG2AまたはNKG2Dノックアウトをもたらし、任意選択的にCAR発現を内因性NKG2AまたはNKG2Dプロモーターの制御下に置く。NKG2AまたはNKG2DヌルおよびCARを含むiPSC派生細胞の1つの特定の実施形態では、当該派生細胞は、NK細胞である。さらなる別の実施形態では、CARを含むiPSCおよびその派生細胞は、CD38コード領域に挿入されたCARを有し、CD38ノックアウトをもたらし、任意選択的にCAR発現を内因性CD38プロモーターの制御下に置く。CD38ヌルおよび提供されるエンドドメインのうちの1つを含むCARを含む細胞の一実施形態では、CARは、CD38に特異的である。一実施形態では、提供されるエンドドメインのうちの1つを含むCARを含むiPSCおよびその派生細胞は、CD58コード領域に挿入されたCARを有し、CD58ノックアウトをもたらす。一実施形態では、エンドドメインのうちの1つを含むCARを含むiPSCおよびその派生細胞は、CD54コード領域に挿入されたCARを有し、CD54ノックアウトをもたらす。一実施形態では、エンドドメインのうちの1つを含むCARを含むiPSCおよびその派生細胞は、CIS（サイトカイン誘導性SH2含有タンパク質）コード領域に挿入されたCARを有し、CISノックアウトをもたらす。一実施形態では、エンドドメインのうちの1つを含むCARを含むiPSCおよびその派生細胞は、CBL-B（E3ユビキチンタンパク質リガーゼCBL-B）コード領域に挿入されたCARを有し、CBL-Bノックアウトをもたらす。一実施形態では、提供されるCARを含むiPSCおよびその派生細胞は、SOCS2コード領域に挿入されたCARを有し、SOCS2ノックアウトをもたらす。一実施形態では、提供されるCARを含むiPSCおよびその派生細胞は、CD56（NCAM1）コード領域に挿入されたCARを有する。別の実施形態では、提供されるCARを含むiPSCおよびその派生細胞は、PD1、CTLA4、LAG3、およびTIM3のうちのいずれか1つのコード領域に挿入されたCARを有し、挿入部位でのチェックポイント受容体のノックアウトまたはノックダウンをもたらす。さらなる実施形態では、提供されるCARを含むiPSCおよびその派生細胞は、TIGITのコード領域に挿入されたCARを有し、TIGITノックアウトをもたらす。

【0155】

本明細書でさらに詳しく説明されるように、さらに提供される実施形態は、ゲノム的に操作されたiPSCを分化することから得られた派生エフェクター細胞を含み、iPSCおよび派生細胞は、本明細書で記載されるCARを含み、iPSCおよび派生細胞は、CD38ノックアウト、CD38-CAR、hnCD16、外因性サイトカインおよび／またはそのシグナル伝達構成要素、HLA-Iおよび／またはHLA-II欠損、HLA-Gの過剰発現ならびにCD58およびCD54のうちの1つまたはその両方のノックアウト、TCRヌル、CD3を提示する表面、抗原特異的TCR、NKG2C、DAP10／12、NKG2C-IL15-CD33（「2C1533」）を含むが、これらに限定されない、1つ以上の追加の改変されたモダリティをさらに含む。

【0156】

2. CD38ノックアウト

細胞表面分子CD38は、多発性骨髄腫およびCD20陰性B細胞悪性腫瘍を含む、リンパ系統および骨髄系統の両方に由来する複数の血液悪性腫瘍において高度に上方制御されており、がん細胞を枯渇させる抗体療法の魅力的な標的となっている。抗体を介したがん細胞の枯渇は、通常、直接的な細胞アポトーシスの誘導と、ADCC（抗体依存性細胞媒介性毒性）などの免疫エフェクター機構の活性化との組み合わせに起因する。ADCCに加えて、治療用抗体と協調する免疫エフェクター機構には、食作用（ADCP）および

／または補体依存性細胞毒性（CDC）も含まれる場合がある。

【0157】

悪性細胞上で高度に発現する以外に、CD38は、形質細胞およびNK細胞、ならびに活性化T細胞およびB細胞でも発現される。造血中、CD38は、CD34⁺幹細胞、ならびにリンパ系、赤血球、および骨髄の系統にコミットした前駆細胞で、形質細胞段階まで続く成熟の最終段階中に発現される。CD38は、II型膜貫通糖タンパク質として、ヌクレオチド代謝物の産生に関与する受容体および多機能酵素の両方として細胞機能を実行する。酵素として、CD38は、NAD⁺からADP-リボースへの反応の合成および加水分解を触媒し、それにより細胞接着のプロセス（このプロセスはカルシウム依存である）に重要な小胞体およびリソソームからのカルシウムの放出を刺激する二次メッセンジャーCADPRおよびNAADPを産生する。受容体として、CD38は、CD31を認識し、活性化されたNK細胞におけるサイトカイン放出および細胞毒性を制御する。CD38は、脂質ラフトの細胞表面タンパク質と会合し、細胞質のCa²⁺フラックスを制御し、リンパ系および骨髄系細胞におけるシグナル伝達を媒介することも報告されている。

【0158】

悪性腫瘍治療では、CD38抗原結合受容体を形質導入したT細胞を全身使用すると、CD34⁺造血前駆細胞、単球、NK細胞、T細胞、およびB細胞のCD38⁺画分が溶解し、レシピエント免疫エフェクター細胞機能障害のため、治療応答が不完全になり、有効性が低減または排除されることが示されている。加えて、CD38特異的抗体であるダラツムマブで治療された多発性骨髄腫患者では、骨髄および末梢血の両方でNK細胞の低減が観察されたが、T細胞およびB細胞などの他の免疫細胞型は、CD38の発現にもかかわらず影響を受けなかった（Casneuf et al., Blood Advances, 2017; 1(23): 2105-2114）。理論に制限されることなく、提供されるMICA/B-CARを含むCD38ヌルエフェクター細胞は、CD38を介したフラトリサイドを克服し、特定の抗体および／またはCD38抗原結合ドメインによって誘導されるエフェクター細胞の枯渇または低減を回避できる。さらに、CD38はT細胞またはB細胞などの活性化リンパ球で上方制御されるため、ダラツムマブなどのCD38特異的抗体を使用して、CD38ヌルである提供される適応性同種異系エフェクター細胞のレシピエントにおいて活性化リンパ球を排除するか、またはこれらのリンパ球の活性化を抑制することができ、その結果、これらのエフェクター細胞に対する宿主リンパ球によるアロ拒絶を低減および／または防止することができ、リンパ球枯渇に使用されるCD38抗体の存在にもかかわらず、これらのエフェクター細胞の生存および持続性を増加させることができる。このように、本出願はまた、エフェクター細胞の持続性および／または生存を増強しつつ、レシピエントT細胞およびB細胞の活性化に対する、および／または活性化したレシピエントT細胞およびB細胞を排除する、CD38特異的抗体、分泌型CD38特異的エンゲージャーまたはCD38 CAR（キメラ抗原受容体）を使用することによる同種拒絶反応の低減または防止をする戦略を提供する。

【0159】

本明細書で提供される一実施形態では、iPSCにおけるCD38ノックアウトは、二対立遺伝子ノックアウトである。本明細書に開示されるように、提供されるCD38ヌルiPSCは、指示された分化をして、決定的なヘモジェニック内皮（HE）の可能性を有する中胚葉細胞、決定的なHE、CD34造血細胞、造血幹細胞および前駆細胞、造血多能性前駆細胞（MPP）、T細胞前駆細胞、NK細胞前駆細胞、一般的な骨髄性前駆細胞、一般的なリンパ前駆細胞、赤血球、骨髄性細胞、好中球前駆細胞、T細胞、NKT細胞、NK細胞、B細胞、好中球、樹状細胞、マクロファージ、ならびに一次NK、T、および／またはNKT細胞に存在しない1つ以上の機能的特性を有する派生免疫エフェクター細胞を含むが、これらに限定されない、機能的派生エフェクター細胞を生成するために分化することができる。いくつかの実施形態では、CD38抗体を使用してADCCを誘導するか、またはCD38-CARを標的化細胞殺滅に使用する場合、CD38^{-/-}iPSCおよび／またはその派生エフェクター細胞は当該CD38抗体またはCD38 CAR

によって排除されず、これにより、そのような治療薬の存在下および／または曝露後の i P S C およびそのエフェクター細胞の持続性および／または生存を増加させる。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞は、そのような治療薬の存在下で、および／または曝露後の、インビボでの持続性および／または生存を増加させる。いくつかの実施形態では、C D 3 8 ヌルエフェクター細胞は、i P S C に由来する N K 細胞である。いくつかの実施形態では、C D 3 8 ヌルエフェクター細胞は、i P S C に由来する T 細胞である。いくつかの実施形態では、C D 3 8 ヌル i P S C および派生細胞は、h n C D 1 6 発現、C A R 発現、サイトカイン／サイトカイン受容体発現、H L A I および／または H L A I I ノックアウト、ならびに本明細書で提供される追加のモダリティを含むがこれらに限定されない、本明細書に記載の 1 つ以上の追加のゲノム編集を含む。

10

【0160】

別の実施形態では、C D 3 8 の選択された位置に本明細書で提供される 1 つ以上の導入遺伝子を挿入すると同時に C D 3 8 をノックアウトすることは、例えば、C D 3 8 を標的とするノックイン／ノックアウト (C D 3 8 - K I / K O) 構築物によって達成することができる。当該構築物のいくつかの実施形態では、構築物は、C D 3 8 遺伝子座内の位置選択的挿入のための一対の C D 3 8 標的化相同性アームを含む。いくつかの実施形態では、事前に選択された標的化部位は、C D 3 8 のエキソン内にある。本明細書で提供される C D 3 8 - K I / K O 構築物は、導入遺伝子が、C D 3 8 内因性プロモーター下または構築物に含まれる外因性プロモーター下のいずれかで発現することを可能にする。2 つ以上の導入遺伝子が C D 3 8 遺伝子座の選択された位置に挿入される場合、リンカー配列、例えば 2 A リンカーまたは I R E S は、任意の 2 つの導入遺伝子の間に配置される。2 A リンカーは、F M D V、E R A V、P T V - I、および T a V から派生する自己切断ペプチド (それぞれ「F 2 A」、「E 2 A」、「P 2 A」、および「T 2 A」とも称される) をコードし、単一の翻訳から別個のタンパク質を産生できるようにする。いくつかの実施形態では、インスレーターは、導入遺伝子および／または外因性プロモーターサイレンシングのリスクを低減するために構築物に含まれる。C D 3 8 - K I / K O 構築物に含まれる外因性プロモーターは、C A G、または C M V、E F 1 α、P G K、および U B C を含むがこれらに限定されない他の構成的、誘導性、時間特異的、組織特異的、または細胞型特異的プロモーターであり得る。

20

【0161】

3. C D 1 6 ノックイン

C D 1 6 は、F c 受容体 F c γ R I I I a (C D 1 6 a ; N M _ 0 0 0 5 6 9 . 6) および F c γ R I I I b (C D 1 6 b ; N M _ 0 0 0 5 7 0 . 4) の 2 つのアイソフォームとして特定されている。C D 1 6 a は、N K 細胞によって発現される膜貫通タンパク質であり、標的細胞に付着した単量体 I g G に結合して、N K 細胞を活性化し、抗体依存性細胞媒介性細胞毒性 (A D C C) を容易にする。C D 1 6 b はヒト好中球によって排他的に発現される。本明細書で使用される場合、「高親和性 C D 1 6」、「切断不可能な C D 1 6」、または「高親和性の切断不可能な C D 1 6」は、様々な C D 1 6 バリエントを指す。野生型 C D 1 6 は親和性が低く、N K 細胞の活性化により白血球上の様々な細胞表面分子の細胞表面密度を制御するタンパク質分解切断プロセスである外部ドメインシェディングを受ける。F 1 7 6 V (一部の出版物では F 1 5 8 V と呼ばれる) は、高い親和性を有する例示的な C D 1 6 多型バリエントであり、一方、S 1 9 7 P バリエントは、遺伝子操作された例示的な切断不可能なバージョンの C D 1 6 である。F 1 7 6 V および S 1 9 7 P の両方を含む操作された C D 1 6 バリエントは、親和性が高く、切断不可能であり、これは、W O 2 0 1 5 / 1 4 8 9 2 6 により詳細に記載されており、その完全な開示は、参照により本明細書に組み込まれる。加えて、C D 1 6 の外部ドメインが本質的に C D 6 4 外部ドメインの少なくとも一部に置き換えられたキメラ C D 1 6 受容体はまた、A D C C を実施することが可能な C D 1 6 受容体の所望の高親和性および切断不可能な特色を達成することができる。いくつかの実施形態では、キメラ C D 1 6 の置換外部ドメインは、C D 6 4 (U n i P R o t K B _ P 1 2 3 1 4 またはそのアイソフォームもしくは多型バ

30

40

50

リアント) の EC 1、EC 2、および EC 3 エキソンのうちの 1 つ以上を含む。

【0162】

したがって、いくつかの実施形態では、高親和性の切断不可能な CD 16 受容体 (h n CD 16) は、F 176 V および S 197 P の両方を含み、いくつかの実施形態では、F 176 V を含み、切断領域が排除されている。いくつかの他の実施形態では、h n CD 16 は、それぞれ、CD 64 エクトドメインの少なくとも一部を含む、例示的な配列の配列番号 42、43、および 44 のうちのいずれかと比較した場合、少なくとも 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、100%、またはその間の任意のパーセンテージの同一性を有する配列を含む。配列番号 42、43 および 44 は、配列番号 45 ~ 47 を例示することによってそれぞれコードされる。本明細書および本出願全体を通して使用される場合、2 つの配列間の同一性パーセントは、2 つの配列の最適なアラインメントのために導入する必要があるギャップの数および各ギャップの長さを考慮した、配列によって共有される同一位置の数の関数 (すなわち、同一性% = 同一位置の数 / 位置の総数 × 100) である。配列の比較および 2 つの配列間の同一性パーセントの決定は、当技術分野で認識されている数学的アルゴリズムを使用して達成することができる。

10

【配列表 3】

配列番号 42

MWFLTTLLLLWVPVDGQVDTTKAVITLQPPWVSVFQEETVTLHCEVLHLPGSSSTQWFLNGTATQ
TSTPSYRITSASVNDSGEYRCQRGLSGRSDPIQLEIHRGWLLLQVSSRVFTEGEPLALRCHAWK
DKLVYNVLYYRNGKAFKFFHWNSNLTILKTNISHNGTYHCSGMGKHRYTSAGISVTVKELFPAP
VLNASVTSPLLEGNLVTLSCETKLLLQRPGLQLYFSFYMGSKTLRGRNTSSEYQILTARREDSG
LYWCEAATEDGNVLKRSPELELQVLGLQLPTPVWFHYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIR
SSTRDWKDHKFKWRKDPQDK

20

(340 a.a. CD 64 ドメインベースの構築 ; CD16TM; CD16ICD)

【配列表 4】

配列番号 43

MWFLTTLLLLWVPVDGQVDTTKAVITLQPPWVSVFQEETVTLHCEVLHLPGSSSTQWFLNGTATQ
TSTPSYRITSASVNDSGEYRCQRGLSGRSDPIQLEIHRGWLLLQVSSRVFTEGEPLALRCHAWK
DKLVYNVLYYRNGKAFKFFHWNSNLTILKTNISHNGTYHCSGMGKHRYTSAGISVTVKELFPAP
VLNASVTSPLLEGNLVTLSCETKLLLQRPGLQLYFSFYMGSKTLRGRNTSSEYQILTARREDSG
LYWCEAATEDGNVLKRSPELELQVLGLFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSTR
DWKDHKFKWRKDPQDK

30

(336 a.a. CD 64 エキソンベースの構築 ; CD16TM; CD16ICD)

【配列表 5】

配列番号 44

MWFLTTLLLLWVPVDGQVDTTKAVITLQPPWVSVFQEETVTLHCEVLHLPGSSSTQWFLNG
TATQTSTPSYRITSASVNDSGEYRCQRGLSGRSDPIQLEIHRGWLLLQVSSRVFTEGEPL
ALRCHAWKDKLVYNVLYYRNGKAFKFFHWNSNLTILKTNISHNGTYHCSGMGKHRYTSAG
ISVTVKELFPAPVLNASVTSPLLEGNLVTLSCETKLLLQRPGLQLYFSFYMGSKTLRGRN
TSSEYQILTARREDSGLYWCEAATEDGNVLKRSPELELQVLGLFFPPGYQVSFCLVMVLLF
AVDTGLYFSVKTNIRSTRDWKDHKFKWRKDPQDK

40

(335 a.a. CD 64 エキソンベースの構築 ; CD16TM; CD16ICD)

50

【配列表 6】

配列番号 4 5

```

cttggagaca acatgtggtt cttgacaact ctgctccttt gggttccagt tgatgggcaa
gtggacacca caaaggcagt gatcactttg cagcctccat gggtcagcgt gttccaagag
gaaaccgtaa ccttgcattg tgaggtgctc catctgcctg ggagcagctc tacacagtgg
tttctcaatg gcacagccac tcagacctcg acccccagct acagaatcac ctctgccagt
gtcaatgaca gtggtgaata caggtgccag agaggtctct cagggcgaag tgaccccata
cagctggaaa tccacagagg ctggctacta ctgcaggtct ccagcagagt cttcacggaa
ggagaacctc tggccttgag gtgtcatgcg tggaggata agctgggtga caatgtgctt
tactatcgaa atggcaaagc ctttaagttt ttccactgga attctaacct caccattctg
aaaaccaaca taagtcacaa tggcacctac cattgtctcag gcatgggaaa gcatcgctac
acatcagcag gaatatctgt cactgtgaaa gagctatttc cagctccagt gctgaatgca
tctgtgacat cccactcct ggaggggaat ctggtcaccc tgagctgtga aacaaagttg
ctcttgacaga ggcttggttt gcagctttac ttctccttct acatgggcag caagaccctg
cgaggcagga acacatcctc tgaataccaa atactaactg ctagaagaga agactctggg
ttatactggt gcgaggctgc cacagaggat ggaaatgtcc ttaagcgcag ccttgagttg
gagcttcaag tgcttggtct ccagttacca actcctgtct ggtttcatta ccaagtctct
ttctgcttgg tgatggtact cctttttgca gtggacacag gactatattt ctctgtgaag
acaaacattc gaagctcaac aagagactgg aaggaccata aatttaaagt gagaaaggac
cctcaagaca aa

```

10

20

【配列表 7】

配列番号 4 6

```

cttggagaca acatgtggtt cttgacaact ctgctccttt gggttccagt tgatgggcaa
gtggacacca caaaggcagt gatcactttg cagcctccat gggtcagcgt gttccaagag
gaaaccgtaa ccttgcattg tgaggtgctc catctgcctg ggagcagctc tacacagtgg
tttctcaatg gcacagccac tcagacctcg acccccagct acagaatcac ctctgccagt
gtcaatgaca gtggtgaata caggtgccag agaggtctct cagggcgaag tgaccccata
cagctggaaa tccacagagg ctggctacta ctgcaggtct ccagcagagt cttcacggaa
ggagaacctc tggccttgag gtgtcatgcg tggaggata agctgggtga caatgtgctt
tactatcgaa atggcaaagc ctttaagttt ttccactgga attctaacct caccattctg
aaaaccaaca taagtcacaa tggcacctac cattgtctcag gcatgggaaa gcatcgctac
acatcagcag gaatatctgt cactgtgaaa gagctatttc cagctccagt gctgaatgca
tctgtgacat cccactcct ggaggggaat ctggtcaccc tgagctgtga aacaaagttg
ctcttgacaga ggcttggttt gcagctttac ttctccttct acatgggcag caagaccctg

cgaggcagga acacatcctc tgaataccaa atactaactg ctagaagaga agactctggg
ttatactggt gcgaggctgc cacagaggat ggaaatgtcc ttaagcgcag ccttgagttg
gagcttcaag tgcttggttt gttctttcca cctgggtacc aagtctcttt ctgcttggtg
atggtactcc tttttgcagt ggacacagga ctatatttct ctgtgaagac aaacattcga
agctcaacaa gagactggaa ggaccataaa tttaaatgga gaaaggaccc tcaagacaaa

```

30

40

【配列表 8】

50

配列番号 47

```

atgtggtttct tgacaaactct gctccttttgg gttccagttg atgggcaagt ggacaccaca
aaggcagtgga tcaattttgca gctccatgg gtcagcgtgt tccaagagga aaccgtaacc
ttgcactgtg aggtgctcca tctgcttggg agcagctcta cacagtgggt tctcaatggc
acagccactc agacctcgac cccagctac agaatcacct ctgccagtggt caatgacagt
ggtgaataca ggtgccagag aggtctctca gggcgaaagt accccatata gctggaaatc
cacagagggt ggctaactact gcaggtctcc agcagagtct tcacggaagg agaacctctg
gctttgaggt gtcattgctg gaaggataag ctggtgtaca atgtgcttta ctatcgaaat
ggcaaagcct ttaagttttt ccactggaac tctaacctca ccattctgaa aaccaacata
agtcacaatg gcacctacca ttgctcagge atgggaaagg atcgctacac atcagcagga
atatctgtca ctgtgaaaga gctattttca gctccagtgc tgaatgcato tgtgacatcc
ccactcctgg aggggaatct ggtcaccttg agctgtgaaa caaagttgct cttgcagagg
cctggttttg agcttttact ctctttctac atgggcagca agacctgctg aggcaggaac
acatcctctg aataccaaat actaactgct agaagagaag actctgggtt atactgggtg
gaggttgcca cagaggatgg aaatgtcctt aagcgcagcc ctgagttgga gcttcaagtg
cttggctttt ttccacctgg gtaccaagtc tctttctgct tgggtgatgg actccttttt
gcagtgagca caggactata tttctctgtg aagacaaaca ttggaagctc aacaagagac
tggaaggacc ataaatttaa atggagaaag gacctcaag acaaaa

```

10

【0163】

20

したがって、本明細書で企図および記載される他の編集の中でも、高親和性の切断不可能なCD16受容体(hnCD16)を含むように遺伝子操作されたクローンiPSCが本明細書で提供され、遺伝子操作されたiPSCは、iPSCに導入されたhnCD16を含むエフェクター細胞に分化することができる。いくつかの実施形態では、hnCD16を含む由来エフェクター細胞は、NK細胞である。いくつかの実施形態では、hnCD16を含む由来エフェクター細胞は、T細胞である。iPSCまたはその派生細胞で発現する外因性hnCD16は、ADCC抗体またはその断片だけでなく、当該hnCD16のCD16またはCD64の細胞外結合ドメインを認識する二重特異性、三重特異性、または多重特異性のエンゲージャーまたはバインダーへの結合にも高い親和性を示す。二重特異性、三重特異性、または多重特異性のエンゲージャーまたはバインダーについては、

本出願で以下にさらに記載される(下を参照されたい)。このように、本出願は、以下のセクションでさらに詳述する状態、疾患、または感染症の治療における治療用途に十分な量で、派生エフェクター細胞上で発現するhnCD16の細胞外ドメインとの高親和性結合を介して1つ以上の予め選択されたADCC抗体が予めロードされた、派生エフェクター細胞またはその細胞集団を提供し、当該hnCD16は、CD64の、またはF176VおよびS197Pを有するCD16の細胞外結合ドメインを含む。

30

【0164】

いくつかの他の実施形態では、hnCD16の天然のCD16膜貫通ドメインおよび／または細胞内ドメインは、キメラFc受容体(CFcR)が非天然膜貫通ドメイン、非天然刺激ドメイン、および／または非天然シグナル伝達ドメインを含むように産生されるように、さらに改変または置き換えられる。本明細書で使用される場合、「非天然」という用語は、膜貫通ドメイン、刺激ドメイン、またはシグナル伝達ドメインが、細胞外ドメインを提供する受容体以外の異なる受容体に由来することを意味する。ここの図では、CD16またはそのバリエーションに基づくCFcRは、CD16に由来する膜貫通ドメイン、刺激ドメイン、またはシグナル伝達ドメインを有さない。いくつかの実施形態では、外因性hnCD16ベースのCFcRは、CD3D、CD3E、CD3G、CD3ζ、CD4、CD8、CD8a、CD8b、CD27、CD28、CD40、CD84、CD166、4-1BB、OX40、ICOS、ICAM-1、CTLA4、PD1、LAG3、2B4、BTLA、CD16、IL7、IL12、IL15、KIR2DL4、KIR2DS1、NKp30、NKp44、NKp46、NKG2C、NKG2D、T細胞受容体ポリ

40

50

ペプチドに由来する非天然膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、外因性 h n C D 1 6 ベースの C F c R は、C D 2 7、C D 2 8、4-1 B B、O X 4 0、I C O S、P D 1、L A G 3、2 B 4、B T L A、D A P 1 0、D A P 1 2、C T L A 4、または N K G 2 D ポリペプチドに由来する非天然刺激／阻害ドメインを含む。いくつかの実施形態では、外因性 h n C D 1 6 ベースの C F c R は、C D 3 ζ、2 B 4、D A P 1 0、D A P 1 2、D N A M 1、C D 1 3 7 (4 1 B B)、I L 2 1、I L 7、I L 1 2、I L 1 5、N K p 3 0、N K p 4 4、N K p 4 6、N K G 2 C、または N K G 2 D ポリペプチドに由来する非天然シグナル伝達ドメインを含む。h n C D 1 6 の一実施形態では、提供されるキメラ受容体は、膜貫通ドメインおよびシグナル伝達ドメインを含み、両方とも I L 7、I L 1 2、I L 1 5、N K p 3 0、N K p 4 4、N K p 4 6、N K G 2 C、および N K G 2 D ポリペプチドのうちの 1 つに由来する。h n C D 1 6 ベースのキメラ F c 受容体の 1 つの特定の実施形態は、N K G 2 D の膜貫通ドメイン、2 B 4 の刺激ドメイン、および C D 3 ζ のシグナル伝達ドメインを含み、h n C D 1 6 の細胞外ドメインは、C D 6 4 または C D 1 6 の完全長または部分配列の細胞外ドメインに由来し、C D 1 6 の細胞外ドメインは、F 1 7 6 V および S 1 9 7 P を含む。h n C D 1 6 ベースのキメラ F c 受容体の別の実施形態は、C D 3 ζ の膜貫通ドメインおよびシグナル伝達ドメインを含み、h n C D 1 6 の細胞外ドメインは、C D 6 4 または C D 1 6 の完全長または部分配列の細胞外ドメインに由来し、C D 1 6 の細胞外ドメインは、F 1 7 6 V および S 1 9 7 P を含む。

【0165】

上述の h n C D 1 6 ベースのキメラ F c 受容体の様々な実施形態は、高親和性で抗体もしくはその断片の F c 領域に、または二重特異性、三重特異性、もしくは多重特異性エンゲージャーもしくはバインダーの F c 領域に結合することができる。結合すると、キメラ受容体の刺激ドメインおよび／またはシグナル伝達ドメインは、エフェクター細胞の活性化およびサイトカイン分泌、ならびに抗体、または腫瘍抗原結合構成要素ならびに F c 領域を有する当該二重特異性、三重特異性、もしくは多重特異性エンゲージャーもしくはバインダーによって標的とされる腫瘍細胞の殺滅を可能にする。理論に制限されることなく、h n C D 1 6 ベースのキメラ F c 受容体の非天然の膜貫通、刺激および／またはシグナル伝達ドメインを通じて、または外部ドメインへのエンゲージャーの結合を通じて、C F c R はエフェクター細胞の殺滅能力に寄与し、エフェクター細胞の増殖および／または増殖の可能性を増加させる。抗体およびエンゲージャーは、抗原を発現する腫瘍細胞と C F c R を発現するエフェクター細胞を近接させることができ、これも腫瘍細胞の殺滅の増強に寄与する。二重特異性、三重特異性、多重特異性エンゲージャーまたはバインダーの例示的な腫瘍抗原には、B 7 H 3、B C M A、C D 1 0、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、C D 2 4、C D 3 0、C D 3 3、C D 3 4、C D 3 8、C D 4 4、C D 7 9 a、C D 7 9 b、C D 1 2 3、C D 1 3 8、C D 1 7 9 b、C E A、C L E C 1 2 A、C S-1、D L L 3、E G F R、E G F R v I I I、E P C A M、F L T-3、F O L R 1、F O L R 3、G D 2、g p A 3 3、H E R 2、H M 1. 2 4、L G R 5、M S L N、M C S P、M I C A/B、P S M A、P A M A、P-カドヘリン、および R O R 1 が含まれるが、これらに限定されない。腫瘍細胞を攻撃する際に h n C D 1 6 ベースの C F c R を発現するエフェクター細胞を結合させるのに好適ないくつかの非限定的な例示的な二重特異性、三重特異性、多重特異性エンゲージャーまたはバインダーには、C D 1 6 (または C D 6 4) - C D 3 0、C D 1 6 (または C D 6 4) - B C M A、C D 1 6 (または C D 6 4) - I L 1 5 - E P C A M、および C D 1 6 (または C D 6 4) - I L 1 5 - C D 3 3 が含まれる。

【0166】

N K 細胞の活性化後に細胞表面から切断される初代 N K 細胞によって発現される内因性 C D 1 6 受容体とは異なり、派生 N K における C D 1 6 の様々な切断不可能なバージョンは、C D 1 6 のシェディングを回避し、一定の発現を維持する。派生 N K 細胞では、切断不可能な C D 1 6 は、改善された細胞機能を示す T N F α および C D 1 0 7 a の発現を増加させる。切断不可能な C D 1 6 は、抗体依存性細胞媒介性毒性 (A D C C)、および二重特異性、三重特異性、または多重特異性エンゲージャーの結合も増強する。A D C C は

10

20

30

40

50

、抗体でコーティングされた標的細胞へのCD16の結合を介したNK細胞媒介溶解機構である。由来NK細胞における導入されたhncd16の追加の高親和性の特徴により、細胞療法を必要とする対象に細胞を投与する前に、hncd16を介したNK細胞へのADCC抗体のインビトロ充填も可能となる。提供されるように、hncd16は、いくつかの実施形態では、F176VおよびS197Pを含み得るか、または配列番号42、43、もしくは44によって例示されるようにCD64に由来する完全または部分的なエクストドメインを含み得るか、または非天然膜貫通ドメイン、刺激ドメイン、およびシグナル伝達ドメインのうちの少なくとも1つをさらに含み得る。開示されるように、本出願はまた、以下のセクションで詳しく説明するように、状態、疾患、または感染症の治療における治療的使用に十分な量の1つ以上の予め選択されたADCC抗体が予めロードされた、派生NKまたはその細胞集団を提供する。

10

【0167】

初代NK細胞とは異なり、初代供給源（すなわち、末梢血、臍帯血、または他のドナー組織などの天然／天然源）からの成熟T細胞は、CD16を発現しない。発現された外因性の切断不可能なCD16を含むiPSCがT細胞の発生生物学を損なわず、外因性のCD16を発現するだけでなく、獲得ADCC機構を介して機能を実行することができる機能的派生T細胞に分化することができることは予想外であった。派生T細胞におけるこの獲得ADCCは、追加的に、二重標的化のためのアプローチとして、および／またはCAR-T標的化された抗原の発現低減もしくは喪失、またはCAR（キメラ抗原受容体）による認識を回避する変異抗原を伴って腫瘍が再発する、CAR-T細胞療法でしばしば発生する抗原逃避を救済するためのアプローチとして使用できる。当該派生T細胞が外因性CD16発現を介した獲得ADCCを含む場合、および抗体がCARによって標的とされるものとは異なる腫瘍抗原を標的とする場合、抗体を使用して、CAR-T抗原エスケープを救済し、CAR-T治療でよく見られる標的化された腫瘍の再発生または再発を低減または防止することができる。二重標的化を達成しながら抗原エスケープを低減および／または防止するような戦略は、1つ以上のCARを発現するNK細胞にも同様に適用される。この抗原逃避の低減および防止戦略で使用する可以使用様々なCARは、本出願で記載のCARを含む。

20

【0168】

したがって、実施形態では、本発明は、提供される少なくとも1つのCARに加えて、外因性CD16を含む派生T細胞を提供する。さらに提供される実施形態では、本明細書で得られた派生T細胞は、hncd16およびCARの発現に加えて、CD38ノックアウトを含む。いくつかの実施形態では、派生T細胞に含まれるhncd16は、F176VおよびS197Pを含む。いくつかの他の実施形態では、派生T細胞に含まれるhncd16は、配列番号42、43、または44によって例示されるようにCD64に由来する完全または部分的なエクストドメインを含むか、または非天然膜貫通ドメイン、刺激ドメイン、およびシグナル伝達ドメインのうちの少なくとも1つをさらに含み得る。説明されるように、そのような派生T細胞は、抗体の治療効果を増強するためにADCCによって瞑想されたモノクローナル抗体で腫瘍を標的とする獲得機構を有する。開示されるように、本出願はまた、以下のセクションでさらに詳述されるように、状態、疾患、または感染の治療における治療用途に十分な量で、1つ以上の予め選択されたADCC抗体で予め充填された派生T細胞またはその細胞集団を提供する。いくつかの他の実施形態では、提供されるhncd16およびCARを発現する派生T細胞はまた、CD38ヌルであり、その結果、細胞は、腫瘍抗原CD38を標的化する治療薬の存在下にあるときに排除されることを回避できる。一実施形態では、腫瘍抗原CD38を標的化する当該治療薬はCD38抗体である。別の実施形態では、腫瘍抗原CD38を標的とする当該治療薬は、本明細書に記載されるようなエンドドメインを含むCD38-CARである。

30

40

【0169】

4. 外因的に導入されたサイトカインおよび／またはサイトカインシグナル伝達

臨床的に関連するサイトカインの全身的な高用量投与を回避することにより、そのよう

50

な実践による用量制限毒性のリスクが低減される一方で、サイトカインを介した細胞自律性が確立される。可溶性サイトカインを追加投与する必要なしにリンパ球自律性を達成するために、IL2、IL4、IL6、IL7、IL9、IL10、IL11、IL12、IL15、IL18、IL21、および／またはそれらの対応する受容体のうちの1つ以上の部分的または完全なペプチドが細胞に導入されて、サイトカイン自体の発現を伴ってまたは伴わずに、サイトカインのシグナル伝達を可能にし、それによってサイトカインの毒性のリスクを低減して、細胞の増殖（growth）、増殖（proliferation）、増殖（expansion）、および／またはエフェクター機能を維持または改善する。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達のための導入されたサイトカインおよび／またはそのそれぞれの天然または改変された受容体が、細胞表面で発現される。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達は、構成的に活性化される。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達の活性化は、誘導性である。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達の活性化は、一過性および／または一時的である。

【0170】

図1は、IL15を例として使用したいいくつかの構成設計を示す。図1の設計のいずれかの膜貫通（TM）ドメインは、IL15受容体に対して天然であり得るか、または、任意の他の膜結合タンパク質の膜貫通ドメインで改変または置換されている。

【0171】

設計1：IL15およびIL15R α は、IL15のトランス提示を模倣する自己切断ペプチドを使用して、IL15のシス提示を排除することなく共発現される。

【0172】

設計2：IL15R α はリンカーを介してC末端でIL15に融合されており、IL15のシス提示を排除することなくトランス提示を模倣し、IL15の膜結合を確保する。

【0173】

設計3：切断型細胞内ドメインを持つIL15R α は、リンカーを介してC末端でIL15に融合され、IL15のトランス提示を模倣し、IL15の膜結合を維持し、シス提示および／またはその細胞内ドメインを介した正常IL15Rによって媒介される任意の他の潜在的なシグナル伝達経路を排除する。IL15R α の細胞内ドメインは、受容体がIL15応答細胞で発現し、応答細胞が拡大し、機能するために重要であると考えられている。そのような切断型構築物は、配列番号48に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、または99%の同一性のアミノ酸配列を含み、これは、配列番号49によって表される例示的な核酸配列によってコードされ得る。切断型IL15/IL15R α の一実施形態では、構築物は、配列番号48の最後4つのアミノ酸「KSRQ」を含まず、配列番号50に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、または99%の同一性のアミノ酸配列を含む。

【配列表9】

配列番号48

```
MDWTWILFLVAAATRVHSGIHVFILGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDA
TLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLLELQVISLES GDASIHD TVENLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITC
PPPM SVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKC
IRDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLM
PSKSPSTGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTV
LLCGLSAVSL LACYLKSRQ
```

(379のa. a. ; シグナルおよびリンカーヘフチドには下線が引かれている)

【配列表10】

配列番号 49

ATGGACTGGACCTGGATTCTGTTCTGGTTCGCGGCTGCAACGCGAGTCCATAGCGGTATC
CATGTTTTTATTCTTGGGTGTTTTTCTGCTGGGCTGCCTAAGACCGAGGCCAACTGGGTA
AATGTCATCAGTGACCTCAAGAAAATAGAAGACCTTATACAAAGCATGCACATTGATGCT
ACTCTCTACACTGAGTCAGATGTACATCCCTCATGCAAAGTGACGGCCATGAAATGTTTC
CTCCTCGAACTTCAAGTCATATCTCTGGAAAGTGGCGACGCGTCCATCCACGACACGGTC
GAAAACCTGATAATACTCGCTAATAATAGTCTCTCTTCAAATGGTAACGTAACCGAGTCA
GGTTGCAAAGAGTGCGAAGAGTTGGAAGAAAAAACATAAAGGAGTTCCTGCAAAGTTTC
GTGCACATTGTGCAGATGTTTCAATTAATACCTCTAGCGGCGGAGGATCAGGTGGCGGTGGA
AGCGGAGGTGGAGGCTCCGGTGGAGGAGGTAGTGGCGGAGGTTCTCTTCAAATAACTTGT
CCTCCACCGATGTCCGTAGAACATGCGGATATTTGGGTAAAATCCTATAGCTTGTACAGC
CGAGAGCGGTATATCTGCAACAGCGGCTTCAAGCGGAAGGCCGGCACAAGCAGCCTGACC
GAGTGCGTGCTGAACAAGGCCACCAACGTGGCCCACTGGACCACCCCTAGCCTGAAGTGC
ATCAGAGATCCCGCCCTGGTGCATCAGCGGCTGCCCTCCAAGCACAGTGACAACAGCT
GGCGTGACCCCCCAGCCTGAGAGCCTGAGCCCTTCTGGAAAAGAGCCTGCCGCCAGCAGC
CCCAGCAGCAACAATACTGCCGCCACCACAGCCGCCATCGTGCCTGGATCTCAGCTGATG
CCCAGCAAGAGCCCTAGCACCGGCACCACCGAGATCAGCAGCCACGAGTCTAGCCACGGC
ACCCCATCTCAGACCACCGCCAAGAACTGGGAGCTGACAGCCAGCGCCTCTCACCAGCCT
CCAGGCGTGTACCCCTCAGGGCCACAGCGATACCACAGTGGCCATCAGCACCTCCACCGTG
CTGCTGTGTGGACTGAGCGCCGTGTCACTGCTGGCCTGCTACCTGAAGTCCAGACAGTGA
(1140 n. a.)

10

20

【配列表 11】

配列番号 50

MDWTWILFLVAAATRVHSGIHVFILGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDA
TLYTESDVHPSCVKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFIN TSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLQITC
PPPM SVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKC
IRDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLM
PSKSPSTGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTV
LLCGLSAVSL LACYL

30

(375のa. a. ; シグナルおよびリンカーヘフチドには下線が引かれている)

【0174】

当業者は、上記のシグナルペプチドおよびリンカー配列が例示的であり、シグナルペプチドまたはリンカーとしての使用に好適なそれらの変形を決して制限しないことを理解するであろう。当業者に既知であり、利用可能な多くの好適なシグナルペプチドまたはリンカー配列が存在する。当業者は、シグナルペプチドおよび／またはリンカー配列が、シグナルペプチドによってもたらされるか、またはリンカーによって連結される機能性ペプチドの活性を改変することなく、別の配列で置換してもよいことを理解する。

40

【0175】

設計4：設計3の構築物はエフェクター細胞の生存と増殖の促進に機能することが示されているため、IL15R α の細胞質ドメインは、このような設計でIL15を備えたエフェクター細胞の自律機能に悪影響を与えずに省略できることを示しており、設計4は、設計3の別の機能する代替案を提供する構築物であり、Sushiドメインを除いて、本質的にIL15R α 全体が削除され、一方の端でIL15と、もう一方の膜貫通ドメイン融合し(mb-Sushi)と、必要に応じて、Sushiドメインと膜貫通ドメインの間のリンカーを含む。融合したIL15/mb-Sushiは、任意の膜結合タンパク質の膜貫通ドメインを介して細胞表面に発現する。設計4などの構築物では、IL15の望

50

ましいトランス提示のみが保持されている場合、シス提示を含む I L 1 5 R α を介した不要なシグナル伝達は排除される。いくつかの実施形態では、S u s h i ドメインと融合した I L 1 5 を含む構成要素は、配列番号 5 1 に対して少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、または 9 9 % の同一性のアミノ酸配列を含み、これは、配列番号 5 2 によって表される例示的な核酸配列によってコードされ得る。

【配列表 1 2】

配列番号 5 1

MDWTWILFLVAAATRVHSGIHVFILGCFESAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDA
 TLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGLDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTES
 GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLQITC
 PPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKC
 IR

10

(2 4 2 の a . , a . ; シグナルおよびリンカーヘフチドには下線が引かれている)

【配列表 1 3】

配列番号 5 2

ATGGACTGGACCTGGATTCTGTTCCCTGGTCGCGGCTGCAACGCGAGTCCATAGCGGTATC
 CATGTTTTTATTCTTGGGTGTTTTTCTGCTGGGCTGCCTAAGACCGAGGCCAACTGGGTA
 AATGTCATCAGTGACCTCAAGAAAATAGAAGACCTTATACAAAGCATGCACATTGATGCT
 ACTCTCTACACTGAGTCAGATGTACATCCCTCATGCAAAGTGACGGCCATGAAATGTTTC
 CTCCTCGAACTTCAAGTCATATCTCTGGAAAGTGCGGACGCGTCCATCCACGACACGGTC
 GAAAACCTGATAATACTCGCTAATAATAGTCTCTCTTCAAATGGTAACGTAACCGAGTCA
 GGTGCAAAGAGTGCGAAGAGTTGGAAGAAAAAACATAAAGGAGTTCCTGCAAAGTTTC
 GTGCACATTGTGCAGATGTTTATTAATACCTCTAGCGGCGGAGGATCAGGTGGCGGTGGA
 AGCGGAGGTGGAGGCTCCGGTGGAGGAGGTAGTGGCGGAGGTCTCTTCAAATAACTTGT
 CCTCCACCGATGTCCGTAGAACATGCGGATATTTGGGTAAAATCCTATAGCTTGTACAGC
 CGAGAGCGGTATATCTGCAACAGCGGCTTCAAGCGGAAGGCCGGCACAAAGCAGCCTGACC
 GAGTGCGTGCTGAACAAGGCCACCAACGTGGCCCACTGGACCACCCCTAGCCTGAAGTGC
 ATCAGA

20

30

(7 2 6 n . a .)

【0 1 7 6】

当業者は、上記のシグナルペプチドおよびリンカー配列が例示的であり、シグナルペプチドまたはリンカーとしての使用に好適なそれらの変形を決して制限しないことを理解するであろう。当業者に既知であり、利用可能な多くの好適なシグナルペプチドまたはリンカー配列が存在する。当業者は、シグナルペプチドおよび／またはリンカー配列が、シグナルペプチドによってもたらされるか、またはリンカーによって連結される機能性ペプチドの活性を改変することなく、別の配列で置換してもよいことを理解する。

40

【0 1 7 7】

設計 5 : 天然または改変された I L 1 5 R β は、リンカーを介して C 末端で I L 1 5 に融合され、構成的シグナル伝達を可能にし、I L 1 5 膜結合およびトランス提示を維持する。

【0 1 7 8】

設計 6 : 天然または改変された共通受容体 γ C は、サイトカインの構成的シグナル伝達および膜結合トランス提示のために、リンカーを介して C 末端で I L 1 5 に融合される。共通受容体 γ C は、共通ガンマ鎖または C D 1 3 2 と呼ばれ、I L 2 受容体サブユニットガンマまたは I L 2 R G としても知られる。 γ C は、I L 2、I L 4、I L 7、I L 9

50

、IL15、およびIL21受容体を含むがこれらに限定されない、多くのインターロイキン受容体の受容体複合体に共通するサイトカイン受容体サブユニットである。

【0179】

設計7：IL15の不在下でホモ二量体を形成する操作されたIL15R β は、サイトカインの構成的シグナル伝達を生成するのに有用である。

【0180】

いくつかの実施形態では、サイトカインIL2、IL4、IL6、IL7、IL9、IL10、IL11、IL12、IL15、IL18およびIL21、および／またはそれらの受容体の1つ以上は、図1の設計の1つ以上を使用してiPSC、およびiPSC分化時のその派生細胞に導入され得る。いくつかの実施形態では、IL2またはIL15細胞表面の発現およびシグナル伝達は、設計1～7のうちのいずれか1つにおける図示される構築物を介する。いくつかの実施形態では、IL4、IL7、IL9、またはIL21細胞表面の発現およびシグナル伝達は、共通の受容体またはサイトカイン特異的受容体のいずれかを使用することにより、設計5、6、または7に図示される構築物を介する。いくつかの実施形態では、IL7表面発現およびシグナル伝達は、共通の受容体またはサイトカイン特異的受容体（IL4受容体など）のいずれかを使用することにより、設計5、6、または7に図示される構築物を介する。図1の設計のいずれかの膜貫通（TM）ドメインは、対応するサイトカイン受容体に対して天然であり得るか、または、任意の他の膜結合タンパク質の膜貫通ドメインで改変または置換されている。

【0181】

CARおよび外因性サイトカインおよび／またはサイトカイン受容体シグナル伝達の両方を含むiPSCおよびそれからの派生細胞において、CARおよびILは、別個の構築物で発現され得るか、またはCARおよびILの両方を含むバイシストロン性構築物において共発現され得る。いくつかのさらなる実施形態では、図1の構築物設計のいずれかによって表される形態のIL15は、例えば、CAR-2A-IL15またはIL15-2A-CARのように例示される自己切断2Aコード配列を介してCAR発現構築物の5'または3'末端のいずれかに連結され得る。したがって、IL15およびCARは、単一のオープンリーディングフレーム（ORF）にある。一実施形態では、CAR-2A-IL15またはIL15-2A-CAR構築物は、図1の設計3のIL15を含む。別の実施形態では、CAR-2A-IL15またはIL15-2A-CAR構築物は、図1の設計3のIL15を含む。さらに別の実施形態では、CAR-2A-IL15またはIL15-2A-CAR構築物は、図1の設計7のIL15を含む。CAR-2A-IL15またはIL15-2A-CARが発現すると、自己切断2Aペプチドにより、発現されたCARおよびIL15が解離し、解離したIL15が細胞表面に提示される。CAR-2A-IL15またはIL15-2A-CARバイシストロン設計により、タイミングおよび量の両方で、および例えば、単一ORFの表現のための誘導性プロモーターを組み込むために選択され得る同じ制御機構の下で、協調されたCARおよびIL15の発現が可能になる。自己切断ペプチドは、口蹄疫ウイルス（FMDV）、ウマ鼻炎Aウイルス（ERAV）、Thosea signaウイルス（TaV）、およびブタデシオウイルス-1（PTV-I）（Donnelly, ML, et al., J. Gen. Virol., 82, 1027-101 (2001)、Ryan, MD, et al., J. Gen. Virol., 72, 2727-2732 (2001)）などの口蹄疫ウイルス、ならびにタイロウイルス（例えば、タイラマウス脳脊髄炎ウイルス）および脳心筋炎ウイルスなどのカルジオウイルスのメンバーにおいて見出される。FMDV、ERAV、PTV-I、およびTaVに由来する2Aペプチドは、それぞれ「F2A」、「E2A」、「P2A」、および「T2A」と称されることもある。

【0182】

IL15について本明細書に開示されるバイシストロン性CAR-2A-IL15またはIL15-2A-CARの実施形態はまた、本明細書で提供される任意の他のサイトカイン、例えば、IL2、IL4、IL6、IL7、IL9、IL10、IL11、IL1

2、IL18、およびIL21の発現も企図する。いくつかの実施形態では、IL2細胞表面発現およびシグナル伝達は、設計1～7のいずれかに図示される構築物を介する。いくつかの実施形態では、IL4、IL7、IL9、またはIL21細胞表面の発現およびシグナル伝達は、共通の受容体および／またはサイトカイン特異的受容体のいずれかを使用して、設計5、6、または7に図示される構築物を介する。

【0183】

5. HLA-IおよびHLA-II欠損

しばしば、同種異系拒絶反応の問題を回避するために、同種異系レシピエントの組織適合性について、複数のHLAクラスIおよびクラスIIタンパク質を一致させる必要がある。HLAクラスIおよびHLAクラスIIタンパク質の両方の発現が排除または実質的に低減したiPSC細胞株およびそれから分化したその派生細胞が本明細書で提供される。HLAクラスI欠損症は、HLAクラスI遺伝子座（染色体6p21）の任意の領域の機能的欠失、またはベータ2ミクログロブリン（B2M）遺伝子、TAP1遺伝子、TAP2遺伝子、およびタパシンを含むが、これらに限定されない、HLAクラスI関連遺伝子の欠失もしくは発現レベルの低減によって達成できる。例えば、B2M遺伝子は、すべてのHLAクラスIヘテロ二量体の細胞表面発現に不可欠な共通のサブユニットをコードする。B2Mヌル細胞はHLA-I欠損である。HLAクラスII欠損は、RFXANK、CIITA、RFX5、およびRFXAPを含むがこれらに限定されないHLA-II関連遺伝子の機能的欠失または低減によって達成できる。CIITAは転写コアクチベーターであり、クラスIIタンパク質の発現に必要な転写因子RFX5の活性化を介して機能する。CIITAヌル細胞はHLA-II欠損である。例えば、B2MおよびCIITA発現の両方を欠くためのHLA-IおよびHLA-II欠損の両方を有するiPSCおよびその派生細胞が本明細書で提供され、得られた派生エフェクター細胞は、MHC（主要組織適合遺伝子複合体）一致の必要性を排除することによって同種異系細胞療法を可能にし、宿主（同種異系）T細胞による認識および殺滅を回避する。

【0184】

しかしながら、一部の細胞型では、クラスIの発現の欠如は、NK細胞による溶解をもたらす。この「自己喪失」応答を克服するために、HLA-Gを任意選択的にノックインして、操作されたiPSCに由来するHLA-I欠損エフェクター細胞のNK細胞の認識および殺滅を回避することができる。一実施形態では、提供されるHLA-I欠損iPSCおよびその派生細胞は、HLA-Gノックインをさらに含む。代替的に、一実施形態では、提供されるHLA-I欠損iPSCおよびその派生細胞は、CD58ノックアウトおよびCD54ノックアウトの一方または両方をさらに含む。CD58（またはLFA-3）およびCD54（またはICAM-1）は、シグナル依存性細胞相互作用を開始し、免疫細胞を含む細胞の遊走を容易にする接着タンパク質である。iPSCにおけるCD58および／またはCD54の破壊が、T細胞およびNK細胞を含む機能的免疫エフェクター細胞へと誘導されるiPSC分化における多能性細胞および発生生物学に影響を与えるかどうか、およびどのように影響するかは、以前は不明であった。また、CD58および／またはCD54ノックアウトがHLA-I欠損iPSC由来のエフェクター細胞の同種異系NK細胞殺滅に対する感受性を効果的および／または十分に低減させることができるかどうか、以前は不明であった。ここでは、CD58ノックアウトはCD54ノックアウトよりも同種異系NK細胞の活性化を低減する効率が低い一方で、CD58およびCD54の両方をダブルノックアウトすると、NK細胞の活性化の低減が最も増強されることが示された。いくつかの観察では、CD58およびCD54ダブルノックアウトは、「自己喪失」効果を克服する上で、HLA-I欠損細胞に対するHLA-G過剰発現よりもさらに効果的である。

【0185】

上記に提供されるように、いくつかの実施形態では、HLA-IおよびHLA-II欠損iPSCならびにその派生細胞は、HLA-Gをコードする外因性ポリヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態では、HLA-IおよびHLA-II欠損iPSCならびに

10

20

30

40

50

その派生細胞は、CD58ヌルである。いくつかの他の実施形態では、HLA-IおよびHLA-II欠損iPSCならびにその派生細胞は、CD54ヌルである。さらにいくつかの他の実施形態では、HLA-IおよびHLA-II欠損iPSCならびにその派生細胞は、CD58ヌルおよびCD54ヌルである。

【0186】

いくつかの実施形態では、HLA-Iおよび／またはHLA-II欠損症のための工学は、アロ拒絶反応を回避するために活性化レシピエント免疫細胞において上方制御された表面タンパク質を標的とする不活性化CARを発現することによってバイパスされ得るか、または無傷に保たれ得る。いくつかの実施形態では、活性化されたレシピエント免疫細胞における当該上方制御された表面タンパク質には、CD38、CD25、CD69、またはCD44が含まれるが、これらに限定されない。細胞がそのような不活化CARを発現する場合、細胞は、CARによって標的とされる同じ表面タンパク質を発現しないか、またはノックアウトしていないことが好ましい。

【0187】

6. 本明細書で提供される遺伝子操作されたiPSCおよび派生細胞

上記に照らして、本出願は、iPSC、iPS細胞株細胞、またはそれらの集団、および当該iPSCを分化させることから得られた派生エフェクター細胞を提供し、各々の細胞は、本明細書に記載されるようにエンドドメインを有する少なくともCARを含む。いくつかの実施形態では、派生エフェクター細胞は、決定的なヘモジェニック内皮（HE）の可能性を有する中胚葉細胞、決定的なHE、CD34造血細胞、造血幹細胞および前駆細胞、造血多能性前駆細胞（MPP）、T細胞前駆細胞、NK細胞前駆細胞、一般的な骨髓性前駆細胞、一般的なリンパ前駆細胞、赤血球、骨髓性細胞、好中球前駆細胞、T細胞、NKT細胞、NK細胞、B細胞、好中球、樹状細胞、マクロファージ、ならびに一次NK、T、および／またはNKT細胞に存在しない1つ以上の機能的特性を有する派生免疫エフェクター細胞を含むが、これらに限定されない。

【0188】

また、CD38-/-（本明細書では「CD38ヌル」またはCD38ノックアウトとも称される）をさらに含むCARが、本明細書で提供され、細胞は、iPSC、iPS細胞株細胞、またはiPSC分化から得られたCARおよびCD38ノックアウトを含む派生機能エフェクター細胞である。いくつかの実施形態では、派生エフェクター細胞は、決定的なヘモジェニック内皮（HE）の可能性を有する中胚葉細胞、決定的なHE、CD34造血細胞、造血幹細胞および前駆細胞、造血多能性前駆細胞（MPP）、T細胞前駆細胞、NK細胞前駆細胞、一般的な骨髓性前駆細胞、一般的なリンパ前駆細胞、赤血球、骨髓性細胞、好中球前駆細胞、T細胞、NKT細胞、NK細胞、B細胞、好中球、樹状細胞、マクロファージ、ならびに一次NK、T、および／またはNKT細胞に存在しない1つ以上の機能的特性を有する派生免疫エフェクター細胞を含むが、これらに限定されない。

【0189】

CARをコードするポリヌクレオチド、および高親和性の切断不可能なCD16（hnCD16）をコードするポリヌクレオチドを含むiPSCが、本明細書でさらに提供され、iPSCは、機能的な派生造血細胞を生成するために分化することができる。CARおよびhnCD16の両方を含む細胞は、CAR結合およびCD16を媒介したADCCによる二重標的化に好適であり、腫瘍標的化の精度を高め、腫瘍の殺滅を促進し、腫瘍抗原逃避の影響を最小限に抑える。さらに、いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるエンドドメインを有するCD38-CARおよびhnCD16を含むiPSCおよび／またはその派生エフェクター細胞はまた、CD38ヌルであり、その結果、CD38抗体を使用してhnCD16媒介増強ADCCを誘導する場合、CD38ノックアウト、CD38-CAR、およびhnCD16-CD38を含むiPSCおよび／またはその派生エフェクター細胞は、エフェクター細胞の排除を引き起こすことなく、それによってiPSCとそのエフェクター細胞の持続性および／または生存を増加させ、CD38発現（腫瘍）細胞および／またはアロ再活性化レシピエント細胞を標的化することができる。いくつか

の実施形態では、エフェクター細胞は、T細胞を含む。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞は、NK細胞を含む。CAR、CD38ヌル、およびh nCD16を含むiPSC由来のT細胞またはNK細胞は、CD38抗体またはCD38 CARの存在下で細胞枯渇の低減を経験し、ADCC（T細胞の場合、ADCCを獲得した）を有し、細胞の持続性が改善されつつ、腫瘍殺滅のさらなる多重機構をもたらす。

【0190】

本明細書で提供される第1のCARを含むiPSCは、第1のCAR以外の標的特異性を有する第2のキメラ抗原受容体（CAR）をコードするポリヌクレオチドを含み得、iPSCは、2つの異なる腫瘍抗原を標的とする2つのCARを有する機能的派生エフェクター細胞を生成するために分化することができる。一実施形態では、iPSCおよびその派生エフェクター細胞に含まれるCARによって標的とされる2つの異なる抗原には、MICA/B、CD19、BCMA、CD20、CD22、CD38、CD123、CD25、CD69、CD44、HER2、CD52、EGFR、GD2、MSLN、VEGFR2、PSMA、およびPDL1が含まれるが、これらに限定されない。一実施形態では、iPSCおよび／またはその派生エフェクター細胞は、CD38、CD25、CD69、またはCD44を標的とするCARを有し、当該細胞はまた、標的とされたタンパク質中のヌルである。

【0191】

本明細書で提供されるCARをコードするポリヌクレオチド、ならびに細胞の生存率、持続性、および／または増殖に寄与するサイトカインシグナル伝達を可能にする少なくとも1つの外因性サイトカインおよび／またはその受容体（IL）をコードするポリヌクレオチドを含むiPSCが、さらに提供され、iPSCは、生存率、持続性、増殖、およびエフェクター細胞機能が改善された機能的派生エフェクター細胞を生成するために分化することができる。外因的に導入されたサイトカインシグナル伝達は、IL2、IL4、IL6、IL7、IL9、IL10、IL11、IL12、IL15、IL18、およびIL21のいずれか1つ、または2つ以上のシグナル伝達を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達のための、サイトカインの導入された部分的または完全なペプチドおよび／またはそのそれぞれの受容体は、細胞表面で発現される。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達は、構成的に活性化される。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達の活性化は、誘導性である。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達の活性化は、一過性および／または一時的である。いくつかの実施形態では、細胞表面サイトカイン／サイトカイン受容体の一過性／一時的発現は、レトロウイルス、センダイウイルス、アデノウイルス、エピソーム、ミニサークル、またはmRNAを含むRNAを介する。いくつかの実施形態では、CARに含まれるiPSCまたはその派生細胞を含有する外因性細胞表面サイトカインおよび／または受容体は、IL7のシグナル伝達を可能にする。いくつかの実施形態では、CARに含まれるiPSCまたはその派生細胞を含有する外因性細胞表面サイトカインおよび／または受容体は、IL10のシグナル伝達を可能にする。いくつかの実施形態では、CARに含まれるiPSCまたはその派生細胞を含有する外因性細胞表面サイトカインおよび／または受容体は、IL15のシグナル伝達を可能にする。当該CAR IL iPSCのいくつかの実施形態では、IL15発現は、図1の構築物3によるものである。当該CAR IL iPSCのいくつかの実施形態では、IL15発現は、図1の構築物4によるものである。上述の実施形態の当該CAR IL iPSCおよびその派生細胞は、インビトロまたはインビボで追加的に供給される可溶性サイトカインに接触することなく、細胞増殖（growth）、増殖（proliferation）、増殖（expansion）、および／またはエフェクター機能を自律的に維持または改善することができる。CAR IL iPSCおよびその派生エフェクター細胞のいくつかの実施形態では、当該細胞はCD38ヌルであり、CD38抗体とともに使用して、エフェクター細胞の排除を引き起こすことなくADCCを誘導し、それによりiPSCおよびそのエフェクター細胞の持続性および／または生存を相乗的に増加させることができる。

10

20

30

40

50

【0192】

提供されるCAR、B2Mノックアウト、およびCITTAノックアウト、ならびに任意選択的にHLA-G過剰発現、CD58ノックアウト、およびCD54ノックアウトのうちの1つを含むiPSCも提供され、iPSCは、機能的な派生造血細胞を生成するために分化することができる。当該CAR B2M^{-/-}CITTA^{-/-}iPSCおよびその派生エフェクター細胞は、HLA-IとHLA-IIの両方が欠損している。さらなる実施形態では、HLA-IおよびHLA-II欠損CAR iPSCおよびその派生エフェクター細胞もまた、CD38ヌルであり、エフェクター細胞の排除を引き起こすことなくADCCを誘導し、それによりiPSCおよびそのエフェクター細胞の持続性および／または生存を増加させるCD38抗体とともに使用することができる。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞は、増加したインビボでの持続性および／または生存を有する。

10

【0193】

上述の観点から、本明細書で提供されるのは、CAR、ならびに任意選択的にCD38ノックアウト、hnCD16、第2のCAR、外因性サイトカイン／受容体、およびB2M／CITTAノックアウトのうちの1つ、2つ、3つ、またはそれ以上を含むiPSCを含み、B2Mがノックアウトされると、HLA-Gをコードするポリヌクレオチド、またはCD58およびCD54ノックアウトのうちの少なくとも1つが任意に導入され、iPSCは、機能的な派生造血細胞を生成するために分化することができる。本出願において、CAR、ならびに任意選択的にCD38ノックアウト、hnCD16、B2M／CITTAノックアウト、第2のCAR、および外因性サイトカイン／受容体のうちの1つ、2つ、3つ、またはそれ以上を含む機能的なiPSC派生エフェクター細胞も含まれ、B2Mがノックアウトされる場合、HLA-Gをコードするポリヌクレオチド、または、CD58およびCD54ノックアウトのうちの少なくとも1つが任意に導入され、派生エフェクター細胞には、決定的な造血性内皮（HE）の可能性を有する中胚葉細胞、決定的なHE、CD34造血細胞、造血細胞幹細胞および前駆細胞、造血系多能性前駆細胞（MP）、T細胞前駆細胞、NK細胞前駆細胞、一般的な骨髄性前駆細胞、一般的なリンパ前駆細胞、赤血球、骨髄性細胞、好中球前駆細胞、T細胞、NKT細胞、NK細胞、B細胞、好中球、樹状細胞、マクロファージ、ならびに一次NK、T、および／またはNKT細胞に存在しない1つ以上の機能的特性を有する派生免疫エフェクター細胞が含まれるが、これらに限定されない。

20

30

【0194】

本明細書で提供される別の態様は、IL15およびIL15R α の切断型融合タンパク質を含むiPSCまたはiPSC由来細胞を含み、融合タンパク質は細胞内ドメインを含まない。図1に「IL15R α (Δ ICD) 融合」および「IL5／mb-Sushi」として示されるように、これらの実施形態は、本出願全体を通してさらに集合的にIL15 Δ と略され、表3に示される「IL」の実施形態のうちの1つである。「IL」のいくつかの実施形態では、細胞内ドメインを欠く切断型IL15／IL15R α 融合タンパク質は、配列番号48、51、または50に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、または99%の同一性のアミノ酸配列を含む。「IL」のいくつかの実施形態では、細胞内ドメインを欠く切断型IL15／IL15R α 融合タンパク質は、配列番号48のアミノ酸配列を含む。「IL」のいくつかの実施形態では、細胞内ドメインを欠く切断型IL15／IL15R α 融合タンパク質は、配列番号51のアミノ酸配列を含む。「IL」のいくつかの実施形態では、細胞内ドメインを欠く切断型IL15／IL15R α 融合タンパク質は、配列番号50のアミノ酸配列を含む。細胞内ドメインを欠く切断型IL15／IL15R α 融合タンパク質（IL15 Δ ）を含むiPSCまたはiPSC由来細胞のいくつかの実施形態では、当該細胞は、CAR、ならびに任意選択的に、CD38ノックアウト、hnCD16、第2のCAR、外因性サイトカイン／受容体、およびB2M／CITTAノックアウトのうちの1つ以上をさらに含み、B2Mがノックアウトされると、HLA-GをコードするポリヌクレオチドまたはCD58およびCD54ノックアウトのうちの1つが任意に導入され、iPSCは、機能的な派生エフェクター細胞

40

50

を生成するために分化することができ、派生エフェクター細胞には、決定的な造血性内皮（HE）の可能性を有する中胚葉細胞、決定的なHE、CD34造血細胞、造血細胞幹細胞および前駆細胞、造血系多能性前駆細胞（MPP）、T細胞前駆細胞、NK細胞前駆細胞、一般的な骨髓性前駆細胞、一般的なリンパ前駆細胞、赤血球、骨髓性細胞、好中球前駆細胞、T細胞、NKT細胞、NK細胞、B細胞、好中球、樹状細胞、マクロファージ、ならびに一次NK、T、および／またはNKT細胞に存在しない1つ以上の機能的特性を有する派生免疫エフェクター細胞が含まれるが、これらに限定されない。

【0195】

したがって、本出願は、表2の以下の遺伝子型のうちのいずれか1つを含む、iPSCおよびその機能的な派生造血細胞を提供する。本出願の表2に提供される「CAR（第2）」は、第1のCARとは異なる標的特異性を有するCARを表し、非限定な例としては、CD19、BCMA、CD20、CD22、CD123、HER2、CD52、EGFR、GD2、MSLN、VEGFR2、PSMA、およびPDL1のうちの少なくとも1つを標的とするCARが挙げられる。表2に提供されるように、「IL」は、どの特定のサイトカイン／受容体発現が選択されるかに応じて、IL2、IL4、IL6、IL7、IL9、IL10、IL11、IL12、IL15、IL18、およびIL21のうちの1つを表す。さらに、「IL」はまた、IL15Δの実施形態も包含し、これは、IL15およびIL15Rαの切断型融合タンパク質として上に詳述されているが、細胞内ドメインを含まない。さらに、iPSCおよびその機能的派生造血細胞が、CAR（第1のCARまたは第2のCAR）とILとの両方を含む遺伝子型を有する場合、当該細胞の一実施形態では、CARおよびILは、2A配列を含むバイシストロ性発現カセットに含まれる。比較として、いくつかの他の実施形態では、CARおよびILは、iPSCおよびその機能的な派生造血細胞に含まれる別個の発現カセットにある。特定の一実施形態では、CARとILとの両方を発現するiPSCおよびその機能的派生エフェクター細胞に含まれるのは、図1の構築物3または4におけるIL15であり、IL15構築物は、CARとともに、またはそれと別個に発現カセットに含まれる。

【0196】

10

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表 2：提供される細胞の適用される例示的な遺伝子型

CAR	CD38 ^{-/-}	hnCD16	CAR ^(第2)	IL	B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-}	HLA-G また は(CD58 ^{-/-} CD54 ^{-/-} あり またはなし)	遺伝子型
√							1.CAR
√	√						2.CAR CD38 ^{-/-}
√		√					3.CAR hnCD16
√			√				4.CAR CAR ^(第2)
√				√			5.CAR IL
√					√		6.CAR B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-}
√					√	√	7.CAR B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} 8.CAR B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD54 ^{-/-} 9.CAR B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} CD54 ^{-/-} 10.CAR B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} HLA-G
√	√	√					11.CAR CD38 ^{-/-} hnCD16
√	√		√				12.CAR CD38 ^{-/-} CAR ^(第2)
√	√			√			13.CAR CD38 ^{-/-} IL
√	√				√		14.CAR CD38 ^{-/-} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-}
√	√				√	√	15.CAR CD38 ^{-/-} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} 16.CAR CD38 ^{-/-} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD54 ^{-/-} 17.CAR CD38 ^{-/-} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} CD54 ^{-/-} 18.CAR CD38 ^{-/-} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} HLA-G
√		√	√				19.CAR hnCD16 CAR ^(第2)
√		√		√			20.CAR hnCD16 IL
√		√			√		21.CAR hnCD16 B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-}
√		√			√	√	22.CAR hnCD16 B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} 23.CAR hnCD16 B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD54 ^{-/-} 24.CAR hnCD16 B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} CD54 ^{-/-} 25.CAR hnCD16 B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} HLA-G
√			√	√			26.CAR CAR ^(第2) IL
√			√		√		27.CAR CAR ^(第2) B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-}
√			√		√	√	28.CAR CAR ^(第2) B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} 29.CAR CAR ^(第2) B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD54 ^{-/-} 30.CAR CAR ^(第2) B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} CD54 ^{-/-} 31.CAR CAR ^(第2) B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} HLA-G
√				√	√		32.CAR IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-}
√				√	√	√	33.CAR IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} 34.CAR IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD54 ^{-/-} 35.CAR IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} CD54 ^{-/-} 36.CAR IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} HLA-G
√	√	√	√				37.CAR CD38 ^{-/-} hnCD16 CAR ^(第2)
√	√	√		√			38.CAR CD38 ^{-/-} hnCD16 IL
√	√	√			√		39.CAR hnCD16 B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-}
√	√	√			√	√	40.CAR CD38 ^{-/-} hnCD16 B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} 41.CAR CD38 ^{-/-} hnCD16 B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD54 ^{-/-} 42.CAR CD38 ^{-/-} hnCD16 B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} CD54 ^{-/-} 43.CAR CD38 ^{-/-} hnCD16 B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} HLA-G
√	√		√	√			44.CAR CD38 ^{-/-} CAR ^(第2) IL
√	√		√		√		45.CAR CD38 ^{-/-} CAR ^(第2) IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-}

【 0 1 9 7 】

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

√	√		√		√	√	46.CAR CD38 ⁻ CAR ^(第2) IL B2M ⁻ CIITA ⁻ CD58 ⁻ 47.CAR CD38 ⁻ CAR ^(第2) IL B2M ⁻ CIITA ⁻ CD54 ⁻ 48.CAR CD38 ⁻ CAR ^(第2) IL B2M ⁻ CIITA ⁻ CD58 ⁻ CD54 ⁻ 49.CAR CD38 ⁻ CAR ^(第2) IL B2M ⁻ CIITA ⁻ HLA-G
√	√			√	√		50.CAR CD38 ⁻ IL B2M ⁻ CIITA ⁻
√	√			√	√	√	51.CAR CD38 ⁻ IL B2M ⁻ CIITA ⁻ CD58 ⁻ 52.CAR CD38 ⁻ IL B2M ⁻ CIITA ⁻ CD54 ⁻ 53.CAR CD38 ⁻ IL B2M ⁻ CIITA ⁻ CD58 ⁻ CD54 ⁻ 54.CAR CD38 ⁻ IL B2M ⁻ CIITA ⁻ HLA-G
√		√	√	√			55.CAR hnCD16 CAR ^(第2) IL
√		√	√		√		56.CAR hnCD16 CAR ^(第2) B2M ⁻ CIITA ⁻
√		√	√		√	√	57.CAR hnCD16 CAR ^(第2) B2M ⁻ CIITA ⁻ CD58 ⁻ 58.CAR hnCD16 CAR ^(第2) B2M ⁻ CIITA ⁻ CD54 ⁻ 59.CAR hnCD16 CAR ^(第2) B2M ⁻ CIITA ⁻ CD58 ⁻ CD54 ⁻ 60.CAR hnCD16 CAR ^(第2) B2M ⁻ CIITA ⁻ HLA-G
√		√		√	√		61.CAR hnCD16 IL B2M ⁻ CIITA ⁻
√		√		√	√	√	62.CAR hnCD16 IL B2M ⁻ CIITA ⁻ CD58 ⁻ 63.CAR hnCD16 IL B2M ⁻ CIITA ⁻ CD54 ⁻ 64.CAR hnCD16 IL B2M ⁻ CIITA ⁻ CD58 ⁻ CD54 ⁻ 65.CAR hnCD16 IL B2M ⁻ CIITA ⁻ HLA-G
√			√	√	√		66.CAR CAR ^(第2) hnCD16 IL B2M ⁻ CIITA ⁻
√			√	√	√	√	67.CAR CAR ^(第2) hnCD16 IL B2M ⁻ CIITA ⁻ CD58 ⁻ 68.CAR CAR ^(第2) hnCD16 IL B2M ⁻ CIITA ⁻ CD54 ⁻ 69.CAR CAR ^(第2) hnCD16 IL B2M ⁻ CIITA ⁻ CD58 ⁻ CD54 ⁻ 70.CAR CAR ^(第2) hnCD16 IL B2M ⁻ CIITA ⁻ HLA-G
√	√	√	√	√			71.CAR CD38 ⁻ hnCD16 CAR ^(第2) IL
√	√	√	√		√		72.CAR CD38 ⁻ hnCD16 CAR ^(第2) B2M ⁻ CIITA ⁻
√	√	√	√		√	√	73.CAR CD38 ⁻ hnCD16 CAR ^(第2) B2M ⁻ CIITA ⁻ CD58 ⁻ 74.CAR CD38 ⁻ hnCD16 CAR ^(第2) B2M ⁻ CIITA ⁻ CD54 ⁻ 75.CAR CD38 ⁻ hnCD16 CAR ^(第2) B2M ⁻ CIITA ⁻ CD58 ⁻ CD54 ⁻ 76.CAR CD38 ⁻ hnCD16 CAR ^(第2) B2M ⁻ CIITA ⁻ HLA-G
√	√	√		√	√		77.CAR CD38 ⁻ hnCD16 IL B2M ⁻ CIITA ⁻
√	√	√		√	√	√	78.CAR CD38 ⁻ hnCD16 IL B2M ⁻ CIITA ⁻ CD58 ⁻ 79.CAR CD38 ⁻ hnCD16 IL B2M ⁻ CIITA ⁻ CD54 ⁻ 80.CAR CD38 ⁻ hnCD16 IL B2M ⁻ CIITA ⁻ CD58 ⁻ CD54 ⁻ 81.CAR CD38 ⁻ hnCD16 IL B2M ⁻ CIITA ⁻ HLA-G
√	√		√	√	√		82.CAR CD38 ⁻ CAR ^(第2) IL B2M ⁻ CIITA ⁻
√	√		√	√	√	√	83.CAR CD38 ⁻ CAR ^(第2) IL B2M ⁻ CIITA ⁻ CD58 ⁻ 84.CAR CD38 ⁻ CAR ^(第2) IL B2M ⁻ CIITA ⁻ CD54 ⁻ 85.CAR CD38 ⁻ CAR ^(第2) IL B2M ⁻ CIITA ⁻ CD58 ⁻ CD54 ⁻ 86.CAR CD38 ⁻ CAR ^(第2) IL B2M ⁻ CIITA ⁻ HLA-G
√		√	√	√	√		87.CAR hnCD16 CAR ^(第2) IL B2M ⁻ CIITA ⁻

10

20

30

【 0 1 9 8 】

【表 3 - 3】

√		√	√	√	√	√	88.CAR hnCD16 CAR ^(第2) IL B2M ⁻ CIITA ⁻ CD58 ⁻ 89.CAR hnCD16 CAR ^(第2) IL B2M ⁻ CIITA ⁻ CD54 ⁻ 90.CAR hnCD16 CAR ^(第2) IL B2M ⁻ CIITA ⁻ CD58 ⁻ CD54 ⁻ 91.CAR hnCD16 CAR ^(第2) IL B2M ⁻ CIITA ⁻ HLA-G
√	√	√	√	√	√		92.CAR CD38 ⁻ hnCD16 CAR ^(第2) IL B2M ⁻ CIITA ⁻
√	√	√	√	√	√	√	93.CAR CD38 ⁻ hnCD16 CAR ^(第2) IL B2M ⁻ CIITA ⁻ CD58 ⁻ 94.CAR CD38 ⁻ hnCD16 CAR ^(第2) IL B2M ⁻ CIITA ⁻ CD54 ⁻ 95.CAR CD38 ⁻ hnCD16 CAR ^(第2) IL B2M ⁻ CIITA ⁻ CD58 ⁻ CD54 ⁻ 96.CAR CD38 ⁻ hnCD16 CAR ^(第2) IL B2M ⁻ CIITA ⁻ HLA-G

40

50

【0199】

7. 追加の改変

いくつかの実施形態では、表2の遺伝子型のうちのいずれか1つを含むiPSCおよびその派生エフェクター細胞は、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、RFX5、RFXAP、および染色体6p21領域の任意の遺伝子の少なくとも1つにおける欠失もしくは発現低減をさらに含み得るか、またはHLA-E、41BBL、CD3、CD4、CD8、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、A2AR、抗原特異的TCR、Fc受容体、エンゲージャー、および二重特異性、多重特異性もしくはユニバーサルエンゲージャーと結合するための表面トリガー受容体のうちの少なくとも1つにおける導入されたもしくは増加した発現をさらに含み得る。

10

【0200】

二重特異性または多重特異性エンゲージャーは、異なる抗体の2つ以上の単鎖可変断片(s c F v)からなる融合タンパク質であり、少なくとも1つのs c F vがエフェクター細胞表面分子に結合し、少なくとも別の1つが腫瘍特異的表面分子を介して腫瘍細胞に結合する。二重特異性もしくは多重特異性エンゲージャー認識、または結合に使用できる例示的なエフェクター細胞表面分子または表面トリガー受容体には、CD3、CD28、CD5、CD16、NKG2D、CD64、CD32、CD89、NKG2C、および本明細書に開示されるキメラFc受容体が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、エンゲージャー認識のためにエフェクター細胞の表面で発現されるCD16は、セクションI.2に記載される、CD16(F176Vおよび任意選択的にS197Pを含む)またはCD64細胞外ドメイン、ならびに天然または非天然の膜貫通ドメイン、刺激ドメイン、および／またはシグナル伝達ドメインを含むh n C D 16である。いくつかの実施形態では、エンゲージャー認識のためにエフェクター細胞の表面で発現されるCD16は、h n C D 16ベースのキメラFc受容体(C F c R)である。いくつかの実施形態では、h n C D 16ベースのC F c Rは、NKG2Dの膜貫通ドメイン、2B4の刺激ドメイン、およびCD3ζのシグナル伝達ドメインを含み、h n C D 16の細胞外ドメインは、CD64またはCD16の完全長または部分配列の細胞外ドメインに由来し、CD16の細胞外ドメインは、F176Vおよび任意選択的にS197Pを含む。二重特異性または多重特異性エンゲージャー認識の例示的な腫瘍細胞表面分子には、B7H3、BCMA、CD10、CD19、CD20、CD22、CD24、CD30、CD33、CD34、CD38、CD44、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD179b、CEA、CLEC12A、CS-1、DLL3、EGFR、EGFRvII、EPCAM、FLT-3、FOLR1、FOLR3、GD2、gpA33、HER2、HM1.24、LGR5、MSLN、MCSP、MICA/B、PSMA、PAMA、P-カドヘリン、ROR1が含まれるが、これらに限定されない。一実施形態では、二重特異性抗体は、CD3-CD19である。別の実施形態では、二重特異性抗体は、CD16-CD30またはCD64-CD30である。別の実施形態では、二重特異性抗体は、CD16-BCMAまたはCD64-BCMAである。また別の実施形態では、二重特異性抗体はCD3-CD33である。さらに別の実施形態では、二重特異性抗体はさらに、エフェクター細胞と腫瘍細胞抗原結合ドメインの間にリンカー、例えば、エフェクター細胞増殖を促進するエフェクターNK細胞のリンカーとしての改変されたIL15(いくつかの刊行物では、TriKE、または三重特異性キラーエンゲージャーと呼ばれる)を含む。一実施形態では、TriKEは、CD16-IL15-EPCAMまたはCD64-IL15-EPCAMである。別の実施形態では、TriKEは、CD16-IL15-CD33またはCD64-IL15-CD33である。さらに別の実施形態では、TriKEはNKG2C-IL15-CD33(「2C1533」)である。

20

30

40

【0201】

いくつかの実施形態では、二重特異性または多重特異性のエンゲージャーのための表面トリガー受容体は、時には細胞型に応じて、エフェクター細胞に対して内因性であり得る

50

。他のいくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法および組成物を使用して、すなわち、表2に列記された遺伝子型を含むiPSCをさらに操作し、T細胞、NK細胞、またはソースiPSCと同一の遺伝子型と表面トリガー受容体を含む任意の他のエフェクター細胞へのiPSCの分化を指示し、1つ以上の外因性表面トリガー受容体をエフェクター細胞に導入することができる。

【0202】

8. 免疫療法のための抗体

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるゲノム操作されたエフェクター細胞に加えて、状態、疾患、または適応症に関連する抗原を標的とする抗体または抗体断片を含む追加の治療薬を、組み合わせ療法でこれらのエフェクター細胞とともに使用することができる。いくつかの実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒト化抗体、ヒト化モノクローナル抗体、またはキメラ抗体である。いくつかの実施形態では、抗体または抗体断片は、ウイルス抗原に特異的に結合する。他の実施形態では、抗体または抗体断片は、腫瘍抗原に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、腫瘍またはウイルス特異的抗原は、投与されたiPSC由来エフェクター細胞を活性化して、それらの殺滅能力を増強する。いくつかの実施形態では、投与されたiPSC由来エフェクター細胞に対する追加の治療薬として、組み合わせ治療に好適な抗体としては、CD20抗体（リツキシマブ、ベルツズマブ、オファツムマブ、ウブリツキシマブ、オカラツズマブ、オビヌツズマブ）、HER2抗体（トラスツズマブ、パツズマブ）、CD52抗体（アレムツズマブ）、EGFR抗体（セルツキシマブ）、GD2抗体（ジヌツキシマブ）、PDL1抗体（アベルマブ）、CD38抗体（ダラツムマブ、イサツキシマブ、MOR202）、CD123抗体（7G3、CSL362）、SLAMF7抗体（エロツズマブ）、MICA/B抗体（7C6、6F11、1C2）、およびそれらのヒト化またはFc改変されたバリエーションもしくは断片、またはそれらの機能的同等物およびバイオシミラーが挙げられるがそれらに限定されない。いくつかの実施形態では、iPSC由来エフェクター細胞は、表2に列記される遺伝子型を含む造血系統細胞を含む。いくつかの実施形態では、iPSC由来エフェクター細胞は、表2に列記される遺伝子型を含むNK細胞を含む。いくつかの実施形態では、iPSC由来エフェクター細胞は、表2に列記される遺伝子型を含むT細胞を含む。

【0203】

液体腫瘍または固形腫瘍の治療に有用な組み合わせのいくつかの実施形態では、組み合わせは、予め選択されたモノクローナル抗体と、提供されるエンドドメインを有する少なくともCARを含むiPSC由来のNK細胞またはT細胞と、を含む。液体腫瘍または固形腫瘍の治療に有用な組み合わせのいくつかの実施形態では、組み合わせは、予め選択されたモノクローナル抗体と、少なくともhncd16および提供されるエンドドメインを有するCARを含むiPSC由来のNK細胞またはT細胞と、を含む。液体腫瘍または固形腫瘍の治療に有用な組み合わせのいくつかの実施形態では、組み合わせは、予め選択されたモノクローナル抗体と、少なくともhncd16および提供されるエンドドメインを含むCARを含むiPSC由来のNK細胞またはT細胞と、を含む。理論に制限されることなく、hncd16は、モノクローナル抗体の増強されたADCCを提供するが、CARは特定の腫瘍抗原を標的とするだけでなく、異なる腫瘍抗原を標的とするモノクローナル抗体と組み合わせた二重標的戦略を使用して腫瘍抗原逃避を防ぐ。液体腫瘍または固形腫瘍の治療に有用な組み合わせのいくつかの実施形態では、組み合わせは、本明細書で提供されるエンドドメインを含む少なくともCD38-CAR、CD38ヌルを含むiPSC由来のNK細胞またはT細胞、およびCD38抗体を含む。一実施形態では、組み合わせは、本明細書で提供されるエンドドメインを含む少なくともCD38-CAR、CD38ヌルおよびhncd16を含むiPSC由来のNK細胞、ならびにCD38抗体であるダラツムマブ、イサツキシマブ、およびMOR202のうちの1つを含む。一実施形態では、組み合わせは、本明細書で提供されるエンドドメインを含むCD38-CAR、CD38ヌルおよびhncd16を含むiPSC由来のNK細胞、ならびにダラツムマブを含

む。いくつかのさらなる実施形態では、ダラツムマブとの組み合わせに含まれる i P S C 由来のNK細胞は、CD38-CAR、CD38ヌル、h n C D 1 6、I L 1 5、ならびにM I C A / BまたはC D 1 9、B C M A、C D 2 0、C D 2 2、C D 1 2 3、H E R 2、C D 5 2、E G F R、G D 2、M S L N、V E G F - R 2、P S M A、およびP D L 1のうちの少なくとも1つを標的とするCARを含み、I L 1 5は、CARと共発現または別個に発現され、I L 1 5は、図1の構築物1～7に提示される形態のうちのいずれか1つである。いくつかの特定の実施形態では、I L 1 5は、CARと同時または別個に発現される場合、構築物3、4、または7の形態である。

【0204】

9. チェックポイント阻害剤

チェックポイントは、阻害されていない場合、免疫応答を抑制または下方制御することができる細胞分子、多くの場合細胞表面分子である。腫瘍がある特定の免疫チェックポイント経路を、特に腫瘍抗原に特異的なT細胞に対する免疫耐性の主要機構として利用していることが今では明らかになっている。チェックポイント阻害剤(CI)は、チェックポイント遺伝子発現または遺伝子産物を低減するか、またはチェックポイント分子の活性を減少させ、それによって阻害チェックポイントを遮断し、免疫系機能を回復させることができるアンタゴニストである。PD1/PDL1またはCTLA4を標的とするチェックポイント阻害剤の開発により、腫瘍学の展望が変わり、これらの薬剤は複数の適応症で長期寛解をもたらした。しかしながら、多くの腫瘍サブタイプはチェックポイント遮断療法に耐性があり、再発は依然として重大な懸念事項である。本出願の一態様は、CIとの組み合わせ療法で提供されるようにゲノム操作された機能的派生細胞を含めることにより、CI耐性を克服するための治療アプローチを提供する。組み合わせ療法の一実施形態では、派生細胞はNK細胞である。組み合わせ療法の別の実施形態では、派生細胞はT細胞である。直接的な抗腫瘍能力を呈することに加えて、本明細書で提供される派生NK細胞は、PDL1-PD1媒介阻害に抵抗し、T細胞遊走を増強し、T細胞を腫瘍微小環境に動員し、腫瘍部位でT細胞の活性化を増強する能力を有することが示されている。したがって、機能的に強力なゲノム操作された派生NK細胞によって促進されるT細胞の腫瘍浸潤は、当該NK細胞がチェックポイント阻害剤を含むT細胞標的免疫療法と相乗作用して、局所免疫抑制を緩和し、腫瘍量を低減することができることを示している。

【0205】

一実施形態では、チェックポイント阻害剤の組み合わせ療法のための派生NK細胞は、本明細書で提供されるエンドドメインを含むCAR、ならびに任意選択的にCD38ノックアウト、h n C D 1 6発現、B2M/CIITAノックアウト、第2のCAR、ならびに外因性細胞表面サイトカインおよび/または受容体発現のうちの1つ、2つ、3つ、またはそれ以上を含み、B2Mがノックアウトされる場合、HLA-Gをコードするポリヌクレオチド、またはCD58もしくはCD54ノックアウトのうちの少なくとも1つが、任意選択的に含まれる。いくつかの実施形態では、派生NK細胞は、表2に列記される遺伝子型のうちのいずれか1つを含む。いくつかの実施形態では、上述の派生NK細胞は、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、RFX5、RFXAP、および染色体6p21領域の任意の遺伝子の少なくとも1つにおける欠失もしくは低減された発現をさらに含むか、またはHLA-E、41BBL、CD3、CD4、CD8、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、A2AR、抗原特異的TCR、Fc受容体、エンゲージャー、および二重特異性、多重特異性もしくはユニバーサルエンゲージャーと結合するための表面トリガー受容体のうちの少なくとも1つにおける導入されたもしくは増加した発現をさらに含む。

【0206】

別の実施形態では、チェックポイント阻害剤の組み合わせ療法のための派生T細胞は、本明細書で提供されるエンドドメインを含むCAR、ならびに任意選択的にCD38ノックアウト、h n C D 1 6発現、B2M/CIITAノックアウト、第2のCAR、ならびに外因性細胞表面サイトカインおよび/または受容体発現のうちの1つ、2つ、3つ、ま

たはそれ以上を含み、B2Mがノックアウトされる場合、HLA-Gをコードするポリヌクレオチド、またはCD58もしくはCD54ノックアウトのうちの1つが、任意選択的に含まれる。いくつかの実施形態では、派生T細胞は、表2に列記される遺伝子型のうちのいずれか1つを含む。いくつかの実施形態では、上述の派生T細胞は、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、RFX5、RFXAP、および染色体6p21領域の任意の遺伝子の少なくとも1つにおける欠失もしくは低減された発現をさらに含むか、またはHLA-E、41BBL、CD3、CD4、CD8、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、A2AR、抗原特異的TCR、Fc受容体、エンゲージャー、および二重特異性、多重特異性もしくはユニバーサルエンゲージャーと結合するための表面トリガー受容体のうちの少なくとも1つにおける導入されたもしくは増加した発現をさらに含む。

【0207】

上述の当該派生NK細胞または派生T細胞は、本明細書で提供されるエンドメインを含むCAR、ならびに任意選択的に、CD38ノックアウト、hnCD16発現、B2M/CITTAノックアウト、第2のCAR、ならびに外因性細胞表面サイトカイン発現のうちの1つ、2つ、3つ、または4つすべてを含むiPSCクローン株を分化させることから得られ、B2Mがノックアウトされる場合、HLA-Gをコードするポリヌクレオチド、またはCD58およびCD54ノックアウトのうちの少なくとも1つが、任意選択的に導入される。いくつかの実施形態では、上述の当該iPSCクローン株は、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、RFX5、RFXAP、および染色体6p21領域の任意の遺伝子の少なくとも1つにおける欠失もしくは低減された発現をさらに含むか、またはHLA-E、41BBL、CD3、CD4、CD8、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、A2AR、抗原特異的TCR、Fc受容体、エンゲージャー、および二重特異性、多重特異性もしくはユニバーサルエンゲージャーと結合するための表面トリガー受容体のうちの少なくとも1つにおける導入されたもしくは増加した発現をさらに含む。

【0208】

本明細書で提供される派生NK細胞またはT細胞との併用療法に好適なチェックポイント阻害剤には、PD1 (Pdcd1、CD279)、PDL-1 (CD274)、TIM3 (Havcr2)、TIGIT (WUCAMおよびVstm3)、LAG3 (Lag3、CD223)、CTLA4 (Ctla4、CD152)、2B4 (CD244)、4-1BB (CD137)、4-1BBL (CD137L)、A2aR、BATE、BTLA、CD39 (Entpd1)、CD47、CD73 (NT5E)、CD94、CD96、CD160、CD200、CD200R、CD274、CEACAM1、CSF-1R、Foxp1、GARP、HVEM、IDO、EDO、TDO、LAIR-1、MICA/B、NR4A2、MAFB、OCT-2 (Pou2f2)、レチノイン酸受容体アルファ (Rara)、TLR3、VISTA、NKG2A/HLA-E、および阻害性KIR (例えば、2DL1、2DL2、2DL3、3DL1、および3DL2) のアンタゴニストが含まれるが、これらに限定されない。

【0209】

いくつかの実施形態では、上記のチェックポイント分子のいずれかを阻害するアンタゴニストは抗体である。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害抗体は、マウス抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダIg、サメ重鎖のみの抗体 (VNAR)、IgNAR、キメラ抗体、組換え抗体、またはそれらの抗体断片であり得る。抗体断片の非限定的な例としては、Fab、Fab'、F(ab)'2、F(ab)'3、Fv、単鎖抗原結合断片 (scFv)、(scFv)2、ジスルフィド安定化Fv (dsFv)、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、単ドメイン抗原結合断片 (sdAb、ナノボディ)、組換え重鎖のみの抗体 (VHH)、および全抗体の結合特異性を維持する他の抗体断片が挙げられ、これらは、産生するのに費用対効果が高いか、使用がより容易であるか、または全抗体よりも感度が高い可能性がある。いくつかの実施形態では、1つ、

2つ、または3つ以上のチェックポイント阻害剤は、アテゾリズマブ（PDL1 mAb）、アベルマブ（PDL1 mAb）、デュルバルマブ（PDL1 mAb）、トレメリマブ（CTLA4 mAb）、イピリムマブ（CTLA4 mAb）、IPH4102（KIR抗体）、IPH43（MICA抗体）、IPH33（TLR3抗体）、リリムマブ（KIR抗体）、モナリズマブ（NKG2A抗体）、ニボルマブ（PD1 mAb）、ペムブロリズマブ（PD1 mAb）、およびそれらの誘導体、機能的同等物、またはバイオシミラーのうちの少なくとも1つを含む。

【0210】

いくつかの実施形態では、多くのmiRNAが免疫チェックポイントの発現を制御する制御因子として見出されるため、上記のチェックポイント分子のいずれかを阻害するアンタゴニストはマイクロRNAベースである（Dragomir et al., Cancer Biol Med. 2018, 15 (2) : 103-115）。いくつかの実施形態では、チェックポイントアンタゴニストmiRNAには、miR-28、miR-15/16、miR-138、miR-342、miR-20b、miR-21、miR-130b、miR-34a、miR-197、miR-200c、miR-200、miR-17-5p、miR-570、miR-424、miR-155、miR-574-3p、miR-513、およびmiR-29cが含まれるが、これらに限定されない。

【0211】

提供される派生NK細胞または派生T細胞との組み合わせ療法のいくつかの実施形態は、少なくとも1つのチェックポイント分子を標的とする少なくとも1つのチェックポイント阻害剤を含み、派生細胞は表2に列記される遺伝子型を有する。提供される派生NK細胞またはT細胞との併用療法のいくつかの他の実施形態は、2つ、3つ以上のチェックポイント分子が標的とされるように、2つ、3つ以上のチェックポイント阻害剤を含む。少なくとも1つのチェックポイント阻害剤および表2に列記された遺伝子型を有する派生細胞を含む組み合わせ療法のいくつかの実施形態では、当該チェックポイント阻害剤は、抗体、またはヒト化もしくはFc改変されたバリエーションもしくは断片、またはそれらの機能的同等物もしくはバイオシミラーであり、当該チェックポイント阻害剤は、当該抗体、またはその断片もしくはバリエーションをコードする外因性ポリヌクレオチド配列を発現することにより、派生細胞により生成される。いくつかの実施形態では、チェックポイントを阻害する抗体またはその断片もしくはバリエーションをコードする外因性ポリヌクレオチド配列は、別個の構築物、またはCARおよび抗体もしくはその断片をコードする配列の両方を含むバイシストロン性構築物のいずれかにおいて、CARと共発現される。いくつかのさらなる実施形態では、抗体またはその断片をコードする配列は、例えば、CAR-2A-CIまたはCI-2A-CARとして図示される自己切断2Aコード配列を介して、CAR発現構築物の5'または3'末端のいずれかに連結され得る。そのため、チェックポイント阻害剤およびCARのコード配列は、単一のオープンリーディングフレーム（ORF）にある。チェックポイント阻害剤が、腫瘍微小環境（TME）に浸潤することが可能な派生エフェクター細胞によってペイロードとして送達、発現、分泌される場合、TMEに結合すると阻害性チェックポイント分子を相殺し、CARまたは活性化受容体などのモダリティを活性化することによってエフェクター細胞の活性化を可能にする。いくつかの実施形態では、CARと共発現されるチェックポイント阻害剤は、チェックポイント分子：PD1、PDL-1、TIM3、TIGIT、LAG3、CTLA4、2B4、4-1BB、4-1BBL、A2aR、BATE、BTLA、CD39（Entpd1）、CD47、CD73（NT5E）、CD94、CD96、CD160、CD200、CD200R、CD274、CEACAM1、CSF-1R、Foxp1、GARP、HVEM、IDO、EDO、TDO、LAIR-1、MICA/B、NR4A2、MAFB、OCT-2（Pou2f2）、レチノイン酸受容体アルファ（Rara）、TLR3、VISTA、NKG2A/HLA-E、および阻害性KIRのうちの少なくとも1つを阻害する。いくつかの実施形態では、表2に列記される遺伝子型を有する派生細胞においてCARと共発現されるチェックポイント阻害剤は、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、ト

10

20

30

40

50

レメリムマブ、イピリムマブ、IPH4102、IPH43、IPH33、リリムマブ、モナリズマブ、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ならびにそれらのヒト化またはFc改変されたバリエーション、断片、およびそれらの機能的同等物またはバイオシミラーを含む群から選択される。いくつかの実施形態では、CARと共発現されるチェックポイント阻害剤は、アテゾリズマブ、またはそのヒト化もしくはFc改変されたバリエーション、断片、またはそれらの機能的同等物もしくはバイオシミラーである。いくつかの実施形態では、CARと共発現されるチェックポイント阻害剤は、ニボルマブ、またはそのヒト化もしくはFc改変されたバリエーション、断片、またはそれらの機能的同等物もしくはバイオシミラーである。いくつかの実施形態では、CARと共発現されるチェックポイント阻害剤は、ペムブロリズマブ、またはそのヒト化もしくはFc改変されたバリエーション、断片、またはそれらの機能的同等物もしくはバイオシミラーである。

10

【0212】

本明細書で提供される派生細胞およびチェックポイント分子を阻害する少なくとも1つの抗体を含む組み合わせ療法はいくつかの他の実施形態では、当該抗体は、派生細胞によって、または派生細胞内で産生されず、表2に列記されている遺伝子型を持つ派生細胞の投与の前、それと同時に、またはその後さらに投与される。いくつかの実施形態では、提供される派生NK細胞またはT細胞との併用療法における1つ、2つ、3つ以上のチェックポイント阻害剤の投与は、同時または連続的である。表2に列記される遺伝子型を有する派生NK細胞またはT細胞を含む併用治療の一実施形態では、治療に含まれるチェックポイント阻害剤は、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、トレメリムマブ、イピリムマブ、IPH4102、IPH43、IPH33、リリムマブ、モナリズマブ、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ならびにそれらのヒト化またはFc改変されたバリエーション、断片、およびそれらの機能的同等物またはバイオシミラーのうちの1つ以上である。表2に列記される遺伝子型を有する由来NK細胞またはT細胞を含む併用治療はいくつかの実施形態では、治療に含まれるチェックポイント阻害剤は、アテゾリズマブ、またはそのヒト化もしくはFc改変されたバリエーション、断片、およびその機能的同等物もしくはバイオシミラーである。表2に列記される遺伝子型を有する由来NK細胞またはT細胞を含む併用治療はいくつかの実施形態では、治療に含まれるチェックポイント阻害剤は、ニボルマブ、あるいはそのヒト化もしくはFc改変されたバリエーション、断片、またはその機能的同等物もしくはバイオシミラーである。表2に列記される遺伝子型を有する由来NK細胞またはT細胞を含む併用治療はいくつかの実施形態では、治療に含まれるチェックポイント阻害剤は、ペムブロリズマブ、あるいはそのヒト化もしくはFc改変されたバリエーション、断片、またはその機能的同等物もしくはバイオシミラーである。

20

30

【0213】

II. iPSCの選択された遺伝子座での標的化されたゲノム編集の方法

本明細書で交換可能に使用されるゲノム編集 (genome editing)、またはゲノム編集 (genomic editing)、または遺伝子編集は、標的化された細胞のゲノムにおいてDNAが挿入される、欠失される、および／または置き換えられる遺伝子操作の一種である。標的化されたゲノム編集 (targeted genome editing) (「標的化されたゲノム編集 (targeted genomic editing)」または「標的化された遺伝子編集」と交換可能) により、ゲノム内の予め選択された部位での挿入、欠失、および／または置換が可能となる。標的化された編集中に挿入部位で内因性配列が欠失されると、影響を受ける配列を含む内因性遺伝子が、配列の欠失によりノックアウトまたはノックダウンされる可能性がある。したがって、標的化された編集を使用して、内因性遺伝子の発現を正確に妨害することもできる。「標的化された組み込み」という用語は、本明細書で同様に使用され、挿入部位での内因性配列の欠失の有無にかかわらず、1つ以上の外因性配列の挿入を伴うプロセスを指す。比較すると、ランダムに組み込まれた遺伝子は、位置効果およびサイレンシングを受け、それらの発現は信頼性がなく、予測できない。例えば、セントロメアおよびサブテロメア領域は、特に導入遺伝子サイレンシングを起こしやすい。相互に、新たに組み込まれた遺伝子は、周囲

40

50

の内因性遺伝子およびクロマチンに影響を及ぼし、細胞の挙動を改変するか、または細胞の形質転換を支持する可能性がある。したがって、セーフハーバー遺伝子座またはゲノムセーフハーバー（GSH）などの予め選択された遺伝子座に外因性DNAを挿入することは、安全性、効率、コピー数制御、および信頼性の高い遺伝子応答制御にとって重要である。代替的に、外因性DNAは、遺伝子座でのノックダウンおよびノックアウトを含む遺伝子発現の破壊が意図されている、予め選択された遺伝子座に挿入され得る。

【0214】

標的化された編集は、ヌクレアーゼに依存しないアプローチ、またはヌクレアーゼに依存するアプローチのいずれかによって達成され得る。ヌクレアーゼに依存しない標的化された編集アプローチでは、相同組換えは、宿主細胞の酵素機構を介して、挿入される外因性ポリヌクレオチドに隣接する相同配列によって誘導される。

【0215】

代替的に、特定のレアカッティング（rare-cutting）エンドヌクレアーゼによる二本鎖切断（DSB）の特異的導入を介して、より高い頻度で標的化された編集を達成することができる。そのようなヌクレアーゼに依存する標的化された編集は、DSBに応答して起こる非相同末端結合（NHEJ）を含むDNA修復機構を利用する。外因性遺伝子材料を含むドナーベクターがないと、NHEJは、多くの場合、少数の内因性ヌクレオチドのランダムな挿入または欠失（イン／デル）をもたらす。比較すると、一对の相同性アームに隣接する外因性遺伝子材料を含むドナーベクターが存在する場合、外因性遺伝子材料は、相同組換えによる相同性指向修復（HDR）中にゲノムに導入され、「標的化された組み込み」をもたらす得る。場合によっては、標的化された組み込み部位が選択された遺伝子のコード領域内にあることが意図されているため、標的化された組み込みが遺伝子発現を妨害し、1回の編集ステップでノックインおよびノックアウト（KI／KO）を同時に果たすことができる。

【0216】

目的の遺伝子座（GOI）の選択された位置に1つ以上の導入遺伝子を挿入して、同時に遺伝子をノックアウトすることが達成され得る。同時ノックインおよびノックアウト（KI／KO）に好適な遺伝子座には、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、CIITA、RFX5、RFXAP、TCR α または β 定常領域、NKG2A、NKG2D、CD38、CD25、CD69、CD44、CD58、CD54、CD56、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、およびTIGITが含まれるが、これらに限定されない。位置選択的挿入のためのそれぞれの部位特異的標的化相同性アームにより、導入遺伝子が、その部位の内因性プロモーターの下、または構築物に含まれる外因性プロモーターの下のいずれかで発現することを可能にする。2つ以上の導入遺伝子がCD38遺伝子座の選択された位置に挿入される場合、リンカー配列、例えば2AリンカーまたはIRESは、任意の2つの導入遺伝子の間に配置される。2Aリンカーは、FMDV、ERAV、PTV-I、およびTaVから派生する自己切断ペプチド（それぞれ「F2A」、「E2A」、「P2A」、および「T2A」とも称される）をコードし、単一の翻訳から別個のタンパク質を産生できるようにする。いくつかの実施形態では、インスレーターは、導入遺伝子および／または外因性プロモーターサイレンシングのリスクを低減するために構築物に含まれる。外因性プロモーターは、CAG、またはCMV、EF1 α 、PGK、およびUBCを含むがこれらに限定されない他の構成的、誘導性、時間特異的、組織特異的、または細胞型特異的プロモーターであり得る。

【0217】

特定のおよび標的化されたDSBを導入することができる利用可能なエンドヌクレアーゼには、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、RNAガイドCRISPR（クラスター化された規則的な配置の回文配列リピート）系が含まれるが、これらに限定されない。加えて、phiC31およびBxb1インテグラーゼを利用するDICE（デュアルインテグラーゼカセット交換

10

20

30

40

50

系も、標的化された組み込みのための有望なツールである。

【0218】

ZFNは、ジンクフィンガーDNA結合ドメインに融合したヌクレアーゼを含む標的化されたヌクレアーゼである。「ジンクフィンガーDNA結合ドメイン」または「ZFB D」とは、1つ以上のジンクフィンガーを介して配列特異的様式でDNAに結合するポリペプチドドメインを意味する。ジンクフィンガーは、ジンクフィンガー結合ドメイン内の約30アミノ酸のドメインであり、その構造は亜鉛イオンの配位により安定化される。ジンクフィンガーの例には、C₂H₂ジンクフィンガー、C₃Hジンクフィンガー、およびC₄ジンクフィンガーが含まれるが、これらに限定されない。「設計された」ジンクフィンガードメインは、その設計／組成が主に合理的な基準、例えば、既存のZFP設計の情報と結合データを格納するデータベースの情報を処理するための置換規則およびコンピュータ化されたアルゴリズムの適用から生じる、自然界では存在しないドメインである。例えば、米国特許第6,140,081号、同第6,453,242号、および同第6,534,261号を参照されたく、また、国際公開第WO98/53058、WO98/53059、WO98/53060、WO02/016536、およびWO03/016496も参照されたい。「選択された」ジンクフィンガードメインは、自然界では見られないドメインであり、その産生は、主にファージディスプレイ、相互作用トラップ、またはハイブリッド選択などの経験的プロセスから生じる。ZFNは、米国特許第7,888,121号および米国特許第7,972,854号により詳細に記載されており、その完全な開示は参照により本明細書に組み込まれる。当技術分野で最も認識されているZFNの例は、FokIヌクレアーゼとジンクフィンガーDNA結合ドメインとの融合である。

【0219】

TALENは、TALEフェクターDNA結合ドメインに融合したヌクレアーゼを含む標的化されたヌクレアーゼである。「転写活性化因子様エフェクターDNA結合ドメイン」、「TALEフェクターDNA結合ドメイン」、または「TALE DNA結合ドメイン」とは、TALEフェクタータンパク質のDNAへの結合に関与するTALEフェクタータンパク質のポリペプチドドメインを意味する。TALEフェクタータンパク質は、感染中にXanthomonas属の植物病原体から分泌される。これらのタンパク質は植物細胞の核に入り、DNA結合ドメインを介してエフェクター特異的DNA配列に結合し、それらのトランス活性化ドメインを介してこれらの配列で遺伝子転写を活性化する。TALEフェクターDNA結合ドメインの特異性は、リピート可変二残基(RVD)と呼ばれる選択リピート位置で多型を含む不完全な34アミノ酸リピートのエフェクター可変数に依存する。TALENは、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願第2011/0145940号により詳細に記載されている。当技術分野で最も認識されているTALENの例は、FokIヌクレアーゼのTALEフェクターDNA結合ドメインへの融合ポリペプチドである。

【0220】

主題の方法で使用が見出される標的化されたヌクレアーゼの別の例は、標的化されたSpo11ヌクレアーゼであり、目的のDNA配列に特異性を有するDNA結合ドメイン、例えば、ジンクフィンガーDNA結合ドメイン、TALEフェクターDNA結合ドメインなどに融合したヌクレアーゼ活性を有するSpo11ポリペプチドを含むポリペプチドである。

【0221】

本発明に好適な標的化されたヌクレアーゼの追加の例には、個々にまたは組み合わせて使用されるかにかかわらず、Bxb1、phiC31、R4、PhiBT1、およびWβ/SPBc/TP901-1が含まれるが、これらに限定されない。

【0222】

標的化されたヌクレアーゼの他の非限定的な例には、天然に存在するヌクレアーゼおよび組換えヌクレアーゼ；cas、cpf、cse、csy、csn、csd、cst、csh、csa、csm、およびcmrを含むファミリーからのCRISPR関連ヌクレア

ーゼ；制限エンドヌクレアーゼ；メガヌクレアーゼ；ホーミングエンドヌクレアーゼなどが含まれる。

【0223】

例としてCas9を使用すると、CRISPR/Cas9は、2つの主要な構成要素：(1) Cas9エンドヌクレアーゼおよび(2) crRNA-tracrRNA複合体を必要とする。共発現されると、2つの構成要素は複合体を形成し、PAMおよびPAM近くのシーディング領域を含む標的DNA配列に動員される。crRNAおよびtracrRNAを組み合わせてキメラガイドRNA (gRNA) を形成し、Cas9を誘導して選択された配列を標的とすることができる。これらの2つの構成要素は、トランスフェクションまたは形質導入を介して哺乳類細胞に送達され得る。

10

【0224】

DICEを介した挿入では、一対のリコンビナーゼ、例えば、phiC31およびBxb1を使用して、各酵素自体の小さなattBおよびattP認識部位に厳密に制限されている外因性DNAの一方向の組み込みを提供する。これらの標的att部位は哺乳類のゲノムには天然に存在しないため、最初に所望の組み込み部位でゲノムに導入する必要がある。例えば、米国公開第2015/0140665号を参照されたく、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0225】

本発明の一態様は、標的化されたゲノム組み込みのための1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を提供する。一実施形態では、構築物は、所望の組み込み部位に特異的な一対の相同アームをさらに含み、標的化された組み込み方法は、細胞に構築物を導入して、細胞宿主酵素機構による部位特異的相同組換えを可能にすることを含む。別の実施形態では、細胞における標的化された組み込み方法は、1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入することと、所望の組み込み部位に特異的なDNA結合ドメインを含むZFN発現カセットを細胞に導入して、ZFNを介した挿入を可能にすることを含む。さらに別の実施形態では、細胞における標的化された組み込み方法は、1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入することと、所望の組み込み部位に特異的なDNA結合ドメインを含むTALEN発現カセットを細胞に導入して、TALENを介した挿入を可能にすることを含む。別の実施形態では、細胞における標的化された組み込み方法は、1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入することと、Cas9発現カセットを導入することと、所望の組み込み部位に特異的なガイド配列を含むgRNAを細胞に導入して、Cas9を介した挿入を可能にすることを含む。また別の実施形態では、細胞における標的化された組み込み方法は、一対のDICEリコンビナーゼの1つ以上のatt部位を含む構築物を細胞の所望の組み込み部位に導入することと、1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入することと、DICEリコンビナーゼの発現カセットを導入して、DICEを介した標的化された組み込みを可能にすることを含む。

20

30

【0226】

標的化された組み込みのための有望な部位には、ヒトのゲノムの遺伝子内または遺伝子外領域であり、理論的には、宿主細胞または生物に悪影響を与えることなく、新たに組み込まれたDNAの予測可能な発現に対応できる、セーフハーバー遺伝子座またはゲノムセーフハーバー(GSH)が含まれるか、これらに限定されない。有用なセーフハーバーは、ベクターにコードされたタンパク質または非コードRNAの所望のレベルを得るのに十分な導入遺伝子の発現を可能にする必要がある。セーフハーバーはまた、細胞を悪性形質転換させやすくしてはならず、また細胞機能を改変してはならない。組み込み部位が可能性のあるセーフハーバー遺伝子座となるために、理想的には、以下を含むがこれらに限定されない基準を満たす必要がある：配列アノテーションによって判断される制御要素もしくは遺伝子の破壊がない；遺伝子の密集した領域内の遺伝子間領域であるか、または反対方向に転写された2つの遺伝子間の収束位置である；ベクターにコードされた転写活性化因子と隣接する遺伝子、特にがん関連遺伝子およびマイクロRNA遺伝子のプロモーター

40

50

との間の長距離にわたる相互作用の可能性を最小限に抑えるために距離を保つ；かつユビキタスな転写活性を示す広範な空間的および時間的発現配列タグ（EST）発現パターンに反映されるように、明らかにユビキタスな転写活性を有する。この後者の特徴は、分化中にクロマチンリモデリングが、典型的にはいくつかの遺伝子座のサイレンシングおよび他の遺伝子座の潜在的な活性化をもたらす幹細胞において特に重要である。外因性挿入に好適な領域内で、挿入のために選択された正確な遺伝子座は、反復要素および保存された配列を欠き、相同アーム増幅のためのプライマーを容易に設計することができるはずである。

【0227】

ヒトゲノム編集、または具体的には標的化された組み込みに好適な部位には、アデノ随伴ウイルス部位1（AAVS1）、ケモカイン（CCモチーフ）受容体5（CCR5）遺伝子座、およびマウスROSA26遺伝子座のヒトオルソログが含まれるが、これらに限定されない。加えて、マウスH11遺伝子座のヒトオルソログもまた、本明細書に開示される組成物および標的化された組み込み方法を使用する挿入に好適な部位であり得る。さらに、コラーゲンおよびHTRP遺伝子座は、標的化された組み込みのためのセーフハーバーとしても使用され得る。しかしながら、選択された各部位の検証は、特に特定の組み込み事象のための幹細胞が必要であることが示されており、プロモーターの選択、外因性遺伝子の配列および配置、ならびに構築物の設計を含む挿入戦略の最適化がしばしば必要である。

【0228】

標的化されたイン／デルの場合、編集部位は、その発現および／または機能が妨害されることを意図している内因性遺伝子に含まれることが多い。一実施形態では、標的化されたイン／デルを含む内因性遺伝子は、免疫応答の制御および調節に関連している。いくつかの他の実施形態では、標的化されたイン／デルを含む内因性遺伝子は、標的化モダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬物標的候補、免疫応答制御および調節、または幹細胞および／もしくは前駆細胞、ならびにその由来細胞の生着、輸送、ホーミング、生存能、自己再生、持続性、および／または生存を抑制するタンパク質に関連する。

【0229】

したがって、本発明の一態様は、ゲノムセーフハーバーを含む選択された遺伝子座、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、GAPDH、またはRUNX1などの連続的または一時的な遺伝子発現に安全であり、十分に制御されていることが既知のまたは証明されている予め選択された遺伝子座、またはゲノムセーフハーバーの基準を満たす他の遺伝子座における標的化された組み込み方法を提供する。いくつかの実施形態では、標的化された組み込みは、組み込みの結果としての遺伝子のノックダウンまたはノックアウトが所望される遺伝子座のうちの1つにあり、そのような遺伝子座としては、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、CIITA、RFX5、RFXAP、TCR α または β 定常領域、NKG2A、NKG2D、CD38、CD25、CD69、CD44、CD58、CD54、CD56、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、およびTIGITが挙げられるが、これらに限定されない。

【0230】

一実施形態では、細胞における標的化された組み込み方法は、1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入することと、所望の組み込み部位に特異的な一対の相同アームおよび1つ以上の外因性配列を含む構築物を導入して、細胞宿主酵素機構による部位特異的相同組換えを可能にすることとを含み、所望の組み込み部位は、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、GAPDH、RUNX1、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、CIITA、RFX5、RFXAP、TCR α もしくは β 定常領域、NKG2A、NKG2D、CD38、CD38、CD25、CD69、CD44、CD58、CD54、CD56、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、または

TIGITを含む。

【0231】

別の実施形態では、細胞における標的化された組み込み方法は、1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入することと、所望の組み込み部位に特異的なDNA結合ドメインを含むZFN発現カセットを細胞に導入して、ZFNを介した挿入を可能にすることとを含み、所望の組み込み部位は、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、GAPDH、RUNX1、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、CIITA、RFX5、RFXAP、TCR α もしくは β 定常領域、NKG2A、NKG2D、CD38、CD25、CD69、CD44、CD58、CD54、CD56、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、またはTIGITを含む。さらに別の実施形態では、細胞における標的化された組み込み方法は、1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入することと、所望の組み込み部位に特異的なDNA結合ドメインを含むTALEN発現カセットを細胞に導入して、TALENを介した挿入を可能にすることとを含み、所望の組み込み部位は、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、GAPDH、RUNX1、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、CIITA、RFX5、RFXAP、TCR α もしくは β 定常領域、NKG2A、NKG2D、CD38、CD25、CD69、CD44、CD58、CD54、CD56、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、またはTIGITを含む。別の実施形態では、細胞における標的化された組み込み方法は、1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入することと、CRISPRヌクレアーゼ発現カセットおよび所望の組み込み部位に特異的なガイド配列を含むgRNAを細胞に導入して、CRISPRヌクレアーゼを介した挿入を可能にすることとを含み、所望の組み込み部位は、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、GAPDH、RUNX1、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、CIITA、RFX5、RFXAP、TCR α もしくは β 定常領域、NKG2A、NKG2D、CD38、CD25、CD69、CD44、CD58、CD54、CD56、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、またはTIGITを含む。また別の実施形態では、細胞における標的化された組み込み方法は、一対のDICEリコンビナーゼの1つ以上のatt部位を含む構築物を、細胞の所望の組み込み部位に導入することと、1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入することと、DICEリコンビナーゼの発現カセットを導入して、DICEを介した標的化された組み込みを可能にすることとを含み、所望の組み込み部位は、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、GAPDH、RUNX1、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、CIITA、RFX5、RFXAP、TCR α もしくは β 定常領域、NKG2A、NKG2D、CD38、CD25、CD69、CD44、CD58、CD54、CD56、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、またはTIGITを含む。

【0232】

さらに、本明細書で提供されるように、セーフハーバーにおける標的化された組み込みのための上記の方法は、目的の任意のポリヌクレオチド、例えば、安全スイッチタンパク質、標的化モダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬学的に活性なタンパク質およびペプチド、薬物標的候補、ならびに幹細胞および／または前駆細胞の生着、輸送、ホーミング、生存能、自己複製、持続性、および／または生存を促進するタンパク質をコードするポリヌクレオチドを挿入するために使用される。いくつかの他の実施形態では、1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物は、1つ以上のマーカー遺伝子をさらに含む。一実施形態では、本発明の構築物における外因性ポリヌクレオチドは、安全スイッチタンパク質をコードする自殺遺伝子である。誘導された細胞死に好適な自殺遺伝子系には、カスパーゼ9（またはカスパーゼ3もしくは7）およびAP1903；チミジンキ

10

20

30

40

50

ナーゼ（TK）およびガンシクロビル（GCV）；シトシンデアミナーゼ（CD）および5-フルオロシトシン（5-FC）が含まれるが、これらに限定されない。加えて、一部の自殺遺伝子系は細胞型特異的であり、例えば、B細胞分子CD20でのTリンパ球の遺伝子改変により、mAbリツキシマブの投与によりそれらを排除することができる。さらに、セツキシマブによって認識される改変されたEGFR含有エピトープは、細胞がセツキシマブに曝露されたときに遺伝子操作された細胞を枯渇させるために使用することができる。したがって、本発明の一態様は、カスパーゼ9（カスパーゼ3または7）、チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、改変されたEGFR、およびB細胞CD20から選択される安全スイッチタンパク質をコードする1つ以上の自殺遺伝子の標的化された組み込み方法を提供する。

10

【0233】

いくつかの実施形態では、本明細書の方法によって組み込まれる1つ以上の外因性ポリヌクレオチドは、標的化された組み込みのための構築物に含まれる作動可能に連結された外因性プロモーターによって駆動される。プロモーターは、誘導性または構成的であってもよく、時間特異的、組織特異的、または細胞型特異的であってもよい。本発明の方法に好適な構築的プロモーターには、サイトメガロウイルス（CMV）、伸長因子1 α （EF1 α ）、ホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK）、ハイブリッドCMVエンハンサー／ニワトリ β -アクチン（CAG）、およびユビキチンC（UBC）プロモーターが含まれるが、これらに限定されない。一実施形態では、外因性プロモーターはCAGである。

【0234】

本明細書の方法によって組み込まれる外因性ポリヌクレオチドは、組み込み部位で、宿主ゲノムの内因性プロモーターによって駆動され得る。一実施形態では、本発明の方法は、細胞のゲノムのAAVS1遺伝子座での1つ以上の外因性ポリヌクレオチドの標的化された組み込みのために使用される。一実施形態では、少なくとも1つの組み込まれたポリヌクレオチドは、内因性AAVS1プロモーターによって駆動される。別の実施形態では、本発明の方法は、細胞のゲノムのROSA26遺伝子座での標的化された組み込みのために使用される。一実施形態では、少なくとも1つの組み込まれたポリヌクレオチドは、内因性ROSA26プロモーターによって駆動される。また別の実施形態では、本発明の方法は、細胞のゲノムのH11遺伝子座での標的化された組み込みのために使用される。一実施形態では、少なくとも1つの組み込まれたポリヌクレオチドは、内因性H11プロモーターによって駆動される。別の実施形態では、本発明の方法は、細胞のゲノムのコラーゲン遺伝子座での標的化された組み込みのために使用される。一実施形態では、少なくとも1つの組み込まれたポリヌクレオチドは、内因性コラーゲンプロモーターによって駆動される。また別の実施形態では、本発明の方法は、細胞のゲノムのHTRP遺伝子座での標的化された組み込みのために使用される。一実施形態では、少なくとも1つの組み込まれたポリヌクレオチドは、内因性HTRPプロモーターによって駆動される。理論的には、所望の位置への正しい挿入のみが、内因性プロモーターによって駆動される外因性遺伝子の遺伝子発現を可能にするであろう。

20

30

【0235】

いくつかの実施形態では、標的化された組み込み方法のための構築物に含まれる1つ以上の外因性ポリヌクレオチドは、1つのプロモーターによって駆動される。いくつかの実施形態では、構築物は、部分間の物理的分離を広げ、酵素機構へのアクセスを最大にするために、同じプロモーターによって駆動される2つの隣接するポリヌクレオチド間に1つ以上のリンカー配列を含む。リンカー配列のリンカーペプチドは、部分（外因性ポリヌクレオチド、および／またはそれからコードされるタンパク質またはペプチド）間の物理的分離を、関連する機能に応じてより柔軟にまたはより堅固にするように選択されたアミノ酸からなり得る。リンカー配列は、別個の部分を生じさせるために、プロテアーゼによって切断可能であるか、または化学的に切断可能であり得る。リンカーにおける酵素的切断部位の例には、エンテロキナーゼ、第Xa因子、トリプシン、コラゲナーゼ、およびトロンビンなどのタンパク質分解酵素による切断のための部位が含まれる。いくつかの実施形

40

50

態では、プロテアーゼは、宿主によって自然に産生されるか、または外因的に導入されるものである。代替的に、リンカーにおける切断部位は、選択された化学物質、例えば、臭化シアン、ヒドロキシルアミン、または低 pH への曝露時に切断が可能な部位であり得る。任意選択のリンカー配列は、切断部位を提供する以外の目的を果たし得る。リンカー配列は、部分が適切に機能するために、別の隣接する部分に対する部分の効果的な配置を可能にするべきである。リンカーはまた、部分間の立体障害を防ぐのに十分な長さの単純なアミノ酸配列であり得る。加えて、リンカー配列は、例えば、リン酸化部位、ビオチン化部位、硫酸化部位、γ-カルボキシル化部位などを含むがこれらに限定されない、翻訳後改変を提供し得る。いくつかの実施形態では、リンカー配列は、生物学的に活性なペプチドを単一の望ましくない立体構造に保持しないように柔軟である。リンカーは、柔軟性を提供するために、グリシン、アラニン、およびセリンなどの小さな側鎖を有するアミノ酸から主に構成され得る。いくつかの実施形態では、リンカー配列の約 80 または 90 パーセント以上は、グリシン、アラニン、またはセリン残基、特にグリシンおよびセリン残基を含む。いくつかの実施形態では、G4S リンカーペプチドは、融合タンパク質の末端プロセシングドメインおよびエンドヌクレアーゼドメインを分離する。他の実施形態では、2A リンカー配列は、2つの別個のタンパク質が単一の翻訳から産生されることを可能にする。好適なリンカー配列は、経験的に容易に特定することができる。加えて、リンカー配列の好適なサイズおよび配列もまた、従来のコンピューターモデリング技法によって決定することができる。一実施形態では、リンカー配列は、自己切断ペプチドをコードする。一実施形態では、自己切断ペプチドは 2A である。いくつかの他の実施形態では、リンカー配列は、内部リボソーム侵入配列 (IRES) を提供する。いくつかの実施形態では、任意の 2つの連続するリンカー配列は異なる。

【0236】

標的化された組み込みのための外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入する方法は、それ自体が知られている細胞への遺伝子移入の方法を使用して達成することができる。一実施形態では、構築物は、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、センダイウイルスベクターなどのウイルスベクターの骨格を含む。いくつかの実施形態では、プラスミドベクターは、外因性ポリヌクレオチドを標的細胞（例えば、pAL-11、pXT1、pRC/CMV、pRC/RSV、pCDNA1/Neo）などに送達および／または発現するために使用される。いくつかの他の実施形態では、エピソームベクターは、外因性ポリヌクレオチドを標的細胞に送達するために使用される。いくつかの実施形態では、組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) を遺伝子操作のために使用して、相同組換えを介して挿入、欠失、または置換を導入することができる。レンチウイルスとは異なり、rAAV は宿主ゲノムに組み込まれない。加えて、エピソーム rAAV ベクターは、従来の標的化プラスミドのトランスフェクションと比較して、はるかに高い割合で相同性指向遺伝子標的化を媒介する。いくつかの実施形態では、AAV6 または AAV2 ベクターは、iPSC のゲノムの標的部位に挿入、欠失または置換を導入するために使用される。いくつかの実施形態では、本明細書の方法および組成物を使用して得られたゲノム改変された iPSC およびその派生細胞は、表 2 に列記される少なくとも 1つの遺伝子型を含む。

【0237】

III. ゲノム操作された iPSC を得て維持する方法

本発明は、1つ以上の所望の部位で 1つ以上の標的化された編集を含むゲノム操作された iPSC を得て維持する方法を提供し、標的化された編集は、拡大されたゲノム操作された iPSC または iPSC 由来非多能性細胞において、それぞれの選択した編集部位で無傷および機能的であり続ける。標的化された編集は、iPSC およびそれからの派生細胞のゲノムに、挿入、欠失、および／または置換、すなわち、選択した部位での標的化された組み込みおよび／またはイン／デルを導入する。患者由来の末梢血由来の一次エフェクター細胞を直接操作する場合と比較して、ここで提供されるように iPSC を編集および分化させることによりゲノム操作された派生細胞を得ることの多くの利点には、以下

が含まれるが、これらに限定されない：設計されたエフェクター細胞の無制限のソース；特に複数の設計されたモダリティが含まれる場合、エフェクター細胞を繰り返し操作する必要がない；取得されたエフェクター細胞は、伸長したテロメアを有し、消耗が少ないために若返っている；主に本明細書で提供される操作されたiPSCでのクローン選択が可能であることに起因して、エフェクター細胞集団は、編集部位、コピー数、および対立遺伝子変形、無作為変異、発現多様性がないという点で均一である。

【0238】

特定の実施形態では、1つ以上の選択された部位での1つ以上の標的化された編集を含むゲノム操作されたiPSCは、運命維持培地(FMM)として表3に示される細胞培養培地において、単一細胞として長期間維持、継代、および拡大され、iPSCは、選択された部位で標的化された編集および機能的改変を保持する。培地の組成は、表3に示される最適範囲内の量で培地中に存在し得る。FMMで培養されたiPSCは、未分化で、基底またはナイーブなプロファイル、培養物を洗浄または選択する必要なくゲノム安定性を維持し続けることが示されており、3つすべての体細胞系統、胚様体または単層(胚様体の形成なし)を介したインビトロ分化、および奇形腫形成によるインビボ分化を容易に生じさせる。例えば、国際公開第WO2015/134652号を参照されたく、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0239】

【表4】

表3：iPSCの再プログラミングおよび維持のための例示的な培地

従来の hESC 培地(Conv.)	運命再プログラミング培地(FRM)	運命維持培地(FMM)
DMEM/F12	DMEM/F12	DMEM/F12
ノックアウト血清交換(20%)	ノックアウト血清交換(20%)	ノックアウト血清交換(20%)
	N2	
	B27	
グルタミン	グルタミン	グルタミン(1x)
非必須アミノ酸(1x)	非必須アミノ酸(1x)	非必須アミノ酸(1x)
β -メルカプトエタノール(100 μ M)	β -メルカプトエタノール(100 μ M)	β -メルカプトエタノール(100 μ M)
bFGF(0.2~50ng/mL)	bFGF(2~500ng/mL)	bFGF(2~500ng/mL)
	LIF(0.2~50ng/mL)	LIF(0.2~50ng/mL)
	チアゾピビン(0.1~25 μ M)	チアゾピビン(0.1~25 μ M)
	PD0325901(0.005~2 μ M)	PD0325901(0.005~2 μ M)
	CHIR99021(0.02~5 μ M)	CHIR99021(0.02~5 μ M)
	SB431542(0.04~10 μ M)	
MEF フィーダー細胞との組み合わせ	Matrigel(商標)またはビトロネクチンと組み合わせたフィーダーフリー	

【0240】

いくつかの実施形態では、1つ以上の標的化された組み込みおよび／またはイン／デルを含むゲノム操作されたiPSCは、MEK阻害剤、GSK3阻害剤、およびROCK阻

害剤を含み、TGFβ受容体／ALK5阻害剤を含まないか、または本質的に含まない培地中で維持、継代、拡大され、iPSCは、選択された部位において無傷で機能的な標的化された編集を保持する。

【0241】

本発明の別の態様は、iPSCの標的化された編集を通じて、または最初に標的化された編集によりゲノム操作された非多能性細胞を生成し、次に選択／単離されたゲノム操作された非多能性細胞を再プログラミングして、非多能性細胞と同じ標的化された編集を含むiPSCを得ることを通じて、ゲノム操作されたiPSCを生成する方法を提供する。本発明のさらなる態様は、標的化された組み込みおよび／または標的化されたイン／デルを細胞に導入することによって同時に再プログラミングを受けているゲノム操作された非多能性細胞を提供し、接触した非多能性細胞は再プログラミングに十分な条件下にあり、再プログラミングの条件は、非多能性細胞を1つ以上の再プログラミング因子および小分子と接触させることを含む。同時のゲノム操作および再プログラミングのための方法の様々な実施形態では、非多能性細胞を1つ以上の再プログラミング因子および任意選択的に小分子と接触させることにより再プログラミングを開始する前に、または本質的に同時に、標的化された組み込みおよび／または標的化されたイン／デルを非多能性細胞に導入することができる。

10

【0242】

いくつかの実施形態では、非多能性細胞を同時にゲノム操作および再プログラミングするために、標的化された組み込みおよび／またはイン／デルはまた、非多能性細胞を1つ以上の再プログラミング因子および小分子と接触させることによって再プログラミングの複数日のプロセスが開始された後に非多能性細胞に導入されてもよく、再プログラミング細胞がSSEA4、Tra181、およびCD30を含むがこれらに限定されない1つ以上の内因性多能性遺伝子の安定した発現を示す前に、構築物を担持するベクターが導入される。

20

【0243】

いくつかの実施形態では、再プログラミングは、非多能性細胞を少なくとも1つの再プログラミング因子、ならびに任意選択的にTGFβ受容体／ALK阻害剤、MEK阻害剤、GSK3阻害剤、およびROCK阻害剤の組み合わせ（FRM；表3）と接触させることによって開始される。いくつかの実施形態では、上述の任意の方法によるゲノム操作されたiPSCは、MEK阻害剤、GSK3阻害剤、およびROCK阻害剤の組み合わせを含む混合物（FMM；表3）を使用してさらに維持および拡大される。

30

【0244】

ゲノム操作されたiPSCを生成する方法のいくつかの実施形態では、方法は、iPSCに1つ以上の標的化された組み込みおよび／またはイン／デルを導入することによりiPSCをゲノム操作し、表2に列記される少なくとも1つの遺伝子型を有するゲノム操作されたiPSCを得ることを含む。代替的に、ゲノム操作されたiPSCを生成する方法は、（a）1つ以上の標的化された編集を非多能性細胞に導入して、選択した部位で標的化された組み込みおよび／またはイン／デルを含むゲノム操作された非多能性細胞を得ることと、（b）ゲノム操作された非多能性細胞を、1つ以上の再プログラミング因子、ならびに任意選択的にTGFβ受容体／ALK阻害剤、MEK阻害剤、GSK3阻害剤、および／またはROCK阻害剤を含む小分子組成物と接触させて、選択された部位で標的化された組み込みおよび／またはイン／デルを含むゲノム操作されたiPSCを得ることと、を含む。代替的に、ゲノム操作されたiPSCを生成する方法は、（a）非多能性細胞を1つ以上のリプログラミング因子、および任意選択的にTGFβ受容体／ALK阻害剤、MEK阻害剤、GSK3阻害剤、および／またはROCK阻害剤を含む小分子組成物と接触させて非多能性細胞のリプログラミングを開始することと、（b）1つ以上の標的化組み込みおよび／またはイン／デルを、ゲノム操作のためのリプログラミング非多能性細胞に導入することと、（c）選択された部位で標的化組み込みおよび／またはイン／デルを含む、クローンゲノム操作されたiPSCを得ることと、を含む。

40

50

【0245】

再プログラミング因子は、PCT／US2015／018801およびPCT／US16／57136に開示される（これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）、OCT4、SOX2、NANOG、KLF4、LIN28、C-MYC、ECAT1、UTF1、ESRRB、SV40LT、HESRG、CDH1、TDGF1、DPPA4、DNMT3B、ZIC3、L1TD1、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。1つ以上の再プログラミング因子は、ポリペプチドの形態であり得る。再プログラミング因子はまた、ポリヌクレオチドの形態であり得るため、レトロウイルス、センダイウイルス、アデノウイルス、エピソード、プラスミド、およびミニサークルなどのベクターによって非多能性細胞に導入される。特定の実施形態では、少なくとも1つの再プログラミング因子をコードする1つ以上のポリヌクレオチドは、レンチウイルスベクターによって導入される。いくつかの実施形態では、1つ以上のポリヌクレオチドは、エピソードベクターによって導入される。様々な他の実施形態では、1つ以上のポリヌクレオチドは、センダイウイルスベクターによって導入される。いくつかの実施形態では、1つ以上のポリヌクレオチドは、様々な再プログラミング因子の化学量論考慮に入れたプラスミドの組み合わせによって導入される。例えば、国際公開第WO2019／075057号を参照されたく、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0246】

いくつかの実施形態では、非多能性細胞は、同じまたは異なる選択された部位での標的化された組み込みのための複数のベクターによって、異なる外因性ポリヌクレオチドおよび／または異なるプロモーターを含む複数の構築物で移入される。これらの外因性ポリヌクレオチドは、自殺遺伝子、または標的化モダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬学的に活性なタンパク質およびペプチド、薬物標的候補、またはiPSCもしくはその派生細胞の生着、輸送、ホーミング、生存能力、自己複製、持続性、および／または生存を促進するタンパク質をコードする遺伝子を含み得る。いくつかの実施形態では、外因性ポリヌクレオチドは、siRNA、shRNA、miRNA、およびアンチセンス核酸を含むがこれらに限定されないRNAをコードする。これらの外因性ポリヌクレオチドは、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、時間特異的プロモーター、および組織または細胞型特異的プロモーターからなる群から選択される1つ以上のプロモーターによって駆動され得る。したがって、ポリヌクレオチドは、プロモーターを活性化する条件下で、例えば、誘導剤の存在下で、または特定の分化した細胞型において発現可能である。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、iPSCおよび／またはiPSCから分化した細胞において発現される。一実施形態では、1つ以上の自殺遺伝子は、構成的プロモーター、例えば、CAGによって駆動されるカパーゼ9によって駆動される。異なる外因性ポリヌクレオチドおよび／または異なるプロモーターを含むこれらの構築物は、同時にまたは連続してのいずれかで非多能性細胞に移入することができる。複数の構築物の標的化された組み込みに供される非多能性細胞は、1つ以上の再プログラミング因子に同時に接触させて、ゲノム操作と同時に再プログラミングを開始でき、それにより、同じ細胞のプールにおいて複数の標的化された組み込みを含むゲノム操作されたiPSCを得ることができる。このように、この堅牢な方法により、同時再プログラミングおよび操作戦略が、1つ以上の選択された標的部位に組み込まれた複数のモダリティを有するクローンゲノム操作されたhiPSCを導くことを可能にする。いくつかの実施形態では、本明細書の方法および組成物を使用して得られたゲノム改変されたiPSCおよびその派生細胞は、表2に列記される少なくとも1つの遺伝子型を含む。

【0247】

IV. ゲノム操作されたiPSCを分化させることおよびiPSC分化プラットフォームを使用したCARエンドドメインスクリーニングにより遺伝子操作されたエフェクター細胞を得る方法

本発明のさらなる態様は、奇形腫形成によるゲノム操作されたiPSCのインビボでの分化の方法を提供し、ゲノム操作されたiPSCに由来するインビボ分化細胞は、所望の

部位で標的化された組み込みおよび／またはイン／デルを含む無傷で機能的な標的化された編集を保持する。いくつかの実施形態では、奇形腫を介してゲノム操作されたiPSCからインビボで派生した分化細胞は、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、ベクター2ミクログロブリン、GAPDH、TCR、もしくはRUNX1、またはゲノムセーフハーバーの基準を満たす他の遺伝子座を含む、1つ以上の望ましい部位に組み込まれた1つ以上の誘導性自殺遺伝子を含む。いくつかの他の実施形態では、奇形腫を介してゲノム操作されたiPSCに由来するインビボ分化細胞は、標的化モダリティをコードするポリヌクレオチド、または幹細胞および／または前駆細胞の輸送、ホーミング、生存能、自己複製、持続性、および／または生存を促進するタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の誘導性自殺遺伝子を含む奇形腫を介してゲノム操作されたiPSCに由来するインビボ分化細胞は、免疫応答の制御および媒介に関連する内因性遺伝子の1つ以上のイン／デルをさらに含む。いくつかの実施形態では、イン／デルは、1つ以上の内因性チェックポイント遺伝子に含まれる。いくつかの実施形態では、イン／デルは、1つ以上の内因性T細胞受容体遺伝子に含まれる。いくつかの実施形態では、イン／デルは、1つ以上の内因性MHCクラスIIサプレッサー遺伝子に含まれる。いくつかの実施形態では、イン／デルは、主要組織適合遺伝子複合体に関連する1つ以上の内因性遺伝子に含まれる。いくつかの実施形態では、イン／デルは、B2M、PD1、TAP1、TAP2、タパシン、TCR遺伝子を含むがこれらに限定されない1つ以上の内因性遺伝子に含まれる。一実施形態では、選択された部位に1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含むゲノム操作されたiPSCは、B2M（ベクター2-ミクログロブリン）をコードする遺伝子における標的化された編集をさらに含む。

【0248】

特定の実施形態では、本明細書で提供される1つ以上の遺伝子改変を含むゲノム操作されたiPSCを使用して、インビトロで造血細胞系統または任意の他の特定の細胞型を導き、由来非多能性細胞は、選択された部位で標的化された編集を含む機能的遺伝子改変を保持する。一実施形態では、ゲノム操作されたiPSC由来細胞には、決定的な造血内皮（HE）の可能性を有する中胚葉細胞、決定的なHE、CD34造血細胞、造血幹細胞および前駆細胞、造血多能性前駆細胞（MPP）、T細胞前駆細胞、NK細胞前駆細胞、一般的な骨髄性前駆細胞、一般的なリンパ前駆細胞、赤血球、骨髄性細胞、好中球前駆細胞、T細胞、NK細胞、NK細胞、B細胞、好中球、樹状細胞、およびマクロファージを含むが、これらに限定されず、ゲノム操作されたiPSCに由来するこれらの細胞は、所望の部位で標的化された編集を含む機能的な遺伝子改変を保持する。

【0249】

iPSC由来の造血細胞系統を得るための適用される分化方法および組成物には、例えば、国際公開第WO2017/078807号に示されているものが含まれ、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。提供されるように、造血細胞系統を生成するための方法および組成物は、無血清、フィーダーフリー、および／または間質を含まない条件下で、またスケラブルで単層のEB形成を必要としない培養プラットフォームにおいて、hiPSCを含む、多能性幹細胞に由来する二次造血内皮（HE）を介する。提供された方法に従って分化され得る細胞は、多能性幹細胞から、特定の最終分化細胞および分化転換細胞にコミットされた前駆細胞、ならびに多能性中間体を經由せずに造血運命に直接移行した様々な系統の細胞にまで及ぶ。同様に、幹細胞を分化させることによって産生される細胞は、多分化能幹細胞または前駆細胞から、最終分化細胞、および介在するすべての造血細胞系統にまで及ぶ。

【0250】

単層培養において造血系統の細胞を多能性幹細胞から分化および拡大する方法は、多能性幹細胞をBMP経路活性化因子、および任意選択的にbFGFと接触させることを含む。提供されるように、多能性幹細胞由来の中胚葉細胞は、多能性幹細胞から胚様体を形成することなく得られ、拡大される。次いで、中胚葉細胞をBMP経路活性化因子、bFG

F、およびWNT経路活性化因子と接触させて、多能性幹細胞から胚様体を形成することなく、二次造血性内皮（HE）の可能性を有する拡大された中胚葉細胞を得る。その後のbFGF、ならびに任意選択的にROCK阻害剤および／またはWNT経路活性化因子との接触により、二次HEの可能性を有する中胚葉細胞は、二次HE細胞に分化し、これも分化中に拡大される。

【0251】

造血系統の細胞を得るために本明細書で提供される方法は、EB形成が中程度から最小の細胞拡大をもたらす、均質な拡大を必要とする多くの用途に重要である単層培養、および集団内の細胞の均質な分化を可能にせず、困難で、効率が低いため、EBを介した多能性幹細胞分化よりも優れている。

【0252】

提供される単層分化プラットフォームは、造血幹細胞およびT細胞、B細胞、NK細胞、NK細胞などの分化した子孫の派生をもたらす、二次造血内皮への分化を容易にする。単層分化戦略は、増強された分化効率と大規模な拡大を組み合わせ、様々な治療用途のための多能性幹細胞由来エフェクター細胞の治療上適切な数の送達を可能にする。さらに、本明細書で提供される方法を使用する単層培養は、インビトロ分化、エクスピボ調節、ならびにインビボ長期造血自己再生、再構成、および生着の全範囲を可能にする機能的な造血系統細胞をもたらす。提供されるように、iPSC由来造血系統細胞には、二次造血内皮、造血多分化能前駆細胞、造血幹細胞および前駆細胞、T細胞前駆細胞、NK細胞前駆細胞、T細胞、NK細胞、NK細胞、B細胞、マクロファージ、ならびに好中球が含まれるが、これらに限定されない。

【0253】

多能性幹細胞の二次造血系統の細胞への分化を指向する方法であって、方法は、(i) 多能性幹細胞をBMP活性化因子および任意選択的にbFGFを含む組成物と接触させて、多能性幹細胞から中胚葉細胞の分化および拡大を開始することと、(ii) 中胚葉細胞をBMP活性化因子、bFGF、およびGSK3阻害剤を含む組成物（組成物は、任意選択的にTGFβ受容体／ALK阻害剤を含まない）と接触させて、中胚葉細胞から二次HEの可能性を有する中胚葉細胞の分化および拡大を開始することと、(iii) 二次HEの可能性を有する中胚葉細胞を、ROCK阻害剤；bFGF、VEGF、SCF、IGF、EPO、IL6、およびIL11からなる群から選択される1つ以上の成長因子およびサイトカイン、ならびに任意選択的にWnt経路活性化因子を含む組成物（組成物は、任意選択的にTGFβ受容体／ALK阻害剤を含まない）と接触させて、二次造血内皮の可能性を有する多能性幹細胞由来中胚葉細胞から二次造血内皮の分化および拡大を開始することと、を含む。

【0254】

いくつかの実施形態では、方法は、多能性幹細胞を、MEK阻害剤、GSK3阻害剤、およびROCK阻害剤を含む組成物（組成物はTGFβ受容体／ALK阻害剤を含まない）と接触させて、多能性幹細胞を播種および拡大することをさらに含む。いくつかの実施形態では、多能性幹細胞は、iPSC、またはナイーブiPSC、または1つ以上の遺伝子インプリントを含むiPSCであり、iPSCに含まれる1つ以上の遺伝子インプリントは、それから分化したエフェクター細胞に保持される。多能性幹細胞の造血系統の細胞への分化を指向する方法のいくつかの実施形態では、多能性幹細胞の造血系統の細胞への分化は、胚様体の生成を欠き、単層培養形態である。

【0255】

上記の方法のいくつかの実施形態では、得られた多能性幹細胞由来の二次造血内皮細胞は、CD34+である。いくつかの実施形態では、得られた二次造血内皮細胞は、CD34+CD43-である。いくつかの実施形態では、二次造血内皮細胞は、CD34+CD43-CXCR4-CD73-である。いくつかの実施形態では、二次造血内皮細胞は、CD34+CXCR4-CD73-である。いくつかの実施形態では、二次造血内皮細胞は、CD34+CD43-CD93-である。いくつかの実施形態では、二次造血内皮細胞

10

20

30

40

50

胞は、CD34+CD93-である。

【0256】

上記の方法のいくつかの実施形態では、方法は、(i) 多能性幹細胞由来の二次造血性内皮を、ROCK阻害剤；VEGF、bFGF、SCF、Flt3L、TPO、およびIL7からなる群から選択される1つ以上の成長因子およびサイトカイン；ならびに任意選択的にBMP活性化因子を含む組成物と接触させて、二次造血内皮のプレT細胞前駆細胞への分化を開始することと、任意選択的に、(ii) プレT細胞前駆細胞を、SCF、Flt3L、およびIL7からなる群から選択される1つ以上の成長因子およびサイトカインを含むが、VEGF、bFGF、TPO、BMP活性化因子、およびROCK阻害剤のうちの1つ以上を含まない組成物と接触させて、プレT細胞前駆細胞のT細胞前駆細胞またはT細胞への分化を開始することとをさらに含む。この方法のいくつかの実施形態では、多能性幹細胞由来のT細胞前駆細胞は、CD34+CD45+CD7+である。この方法のいくつかの実施形態では、多能性幹細胞由来のT細胞前駆細胞は、CD45+CD7+

10

【0257】

多能性幹細胞の造血系統の細胞への分化を指向するための上記の方法のさらにいくつかの実施形態では、方法は、(i) 多能性幹細胞由来の二次造血性内皮を、ROCK阻害剤；VEGF、bFGF、SCF、Flt3L、TPO、IL3、IL7、およびIL15からなる群から選択される1つ以上の成長因子およびサイトカインを含む組成物と接触させて、二次造血内皮のプレNK細胞前駆細胞への分化を開始することと、任意選択的に、(ii) 多能性幹細胞由来のプレNK細胞前駆細胞を、SCF、Flt3L、IL3、IL7、およびIL15からなる群から選択される1つ以上の成長因子およびサイトカインを含む組成物（培地は、VEGF、bFGF、TPO、BMP活性化因子、およびROCK阻害剤のうちの1つ以上を含まない）と接触させて、プレNK細胞前駆細胞のNK細胞前駆細胞またはNK細胞への分化を開始することとをさらに含む。いくつかの実施形態では、多能性幹細胞由来のNK細胞前駆細胞は、CD3-CD45+CD56+CD7+である。いくつかの実施形態では、多能性幹細胞由来のNK細胞は、CD3-CD45+CD56+であり、任意選択的に、NKp46+、CD57+、およびCD16+によってさらに定義される。

20

【0258】

したがって、上記の分化方法を使用して、以下のiPSC由来の造血細胞のうちの1つ以上の集団を得ることができる：(i) iMPP-A、iTc-A2、iTc-B2、iNK-A2、およびiNK-B2から選択される1つ以上の培養培地を使用したCD34+HE細胞(iCD34)、(ii) iMPP-A、iTc-A2、iTc-B2、iNK-A2、およびiNK-B2から選択される1つ以上の培養培地を使用した二次造血内皮(iHE)、(iii) iMPP-A、iTc-A2、iTc-B2、iNK-A2、およびiNK-B2から選択される1つ以上の培養培地を使用した二次HSC、(iv) iMPP-Aを使用した多分化能前駆細胞(iMPP)、(v) iTc-A2およびiTc-B2から選択される1つ以上の培養培地を使用したT系統細胞前駆細胞(ipro-T)、(vi) iTc-B2を使用したT系統細胞(iTC)、(vii) iNK-A2およびiNK-B2から選択される1つ以上の培養培地を使用したNK系統細胞前駆細胞(ipro-NK)、ならびに／または(viii) NK系統細胞(iNK)、およびiNK-B2。いくつかの実施形態では、培地は以下である：

30

a. iCD34-Cは、ROCK阻害剤、bFGF、VEGF、SCF、IL6、IL11、IGF、およびEPOからなる群から選択される1つ以上の成長因子およびサイトカイン、ならびに任意選択的にWnt経路活性化因子を含み、TGFβ受容体／ALK阻害剤を含まない、

b. iMPP-Aは、BMP活性化因子、ROCK阻害剤、ならびにTPO、IL3、GMCSF、EPO、bFGF、VEGF、SCF、IL6、Flt3L、およびIL11からなる群から選択される1つ以上の成長因子およびサイトカインを含む；

40

50

c. iTC-A2は、ROCK阻害剤；SCF、Flt3L、TPO、およびIL7からなる群から選択される1つ以上の成長因子およびサイトカイン、ならびに任意選択的に、BMP活性化因子を含む、

d. iTC-B2は、SCF、Flt3L、およびIL7からなる群から選択される1つ以上の成長因子およびサイトカインを含む；

e. iNK-A2は、ROCK阻害剤、ならびにSCF、Flt3L、TPO、IL3、IL7、およびIL15からなる群から選択される1つ以上の成長因子およびサイトカインを含む；ならびに

f. iNK-B2は、SCF、Flt3L、IL7、およびIL15からなる群から選択される1つ以上の成長因子およびサイトカインを含む。

10

【0259】

いくつかの実施形態では、上記の方法から得られるゲノム操作iPSC派生細胞は、AVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、GAPDH、RUNX1、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、CIITA、RFX5、RFXAP、TCR α もしくは β 定常領域、NKG2A、NKG2D、CD38、CD25、CD69、CD44、CD58、CD54、CD56、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、またはTIGITを含む1つ以上の所望の組み込み部位で組み込まれた1つ以上の誘導性自殺遺伝子を含む。いくつかの他の実施形態では、ゲノム操作されたiPSC由来細胞は、安全スイッチタンパク質、標的化モダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬学的に活性なタンパク質およびペプチド、薬物標的候補、または幹細胞および／もしくは前駆細胞の輸送、ホーミング、生存能、自己再生、持続性、および／または生存を促進するタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の自殺遺伝子を含むゲノム操作されたiPSC由来細胞は、チェックポイント遺伝子、内因性T細胞受容体遺伝子、およびMHCクラスI抑制遺伝子を含むがこれに限定されない、免疫応答の制御および媒介に関連する1つ以上の内因性遺伝子に含まれる1つ以上のイン／デルをさらに含む。一実施形態では、1つ以上の自殺遺伝子を含むゲノム操作されたiPSC由来細胞は、B2M遺伝子にイン／デルをさらに含み、B2Mはノックアウトされている。

20

【0260】

加えて、第1の運命のゲノム操作された造血細胞から第2の運命のゲノム操作された造血細胞を得るための適用される脱分化方法および組成物は、例えば、国際公開第WO2011/159726号に示されるものを含み、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。その中で提供される方法および組成物は、再プログラミング中に内因性Nanog遺伝子の発現を制限することによって、開始非多能性細胞を非多能性中間細胞に部分的に再プログラミングし、非多能性中間細胞を、中間細胞を所望の細胞型に分化させるための条件に供することを可能にする。いくつかの実施形態では、本明細書の方法および組成物を使用して得られたゲノム改変されたiPSCおよびその派生細胞は、表2に列記される少なくとも1つの遺伝子型を含む。

30

【0261】

V. 遺伝子操作されたiPSCから分化された外因性機能的モダリティを有する派生免疫細胞の治療用途

本発明は、いくつかの実施形態では、開示される方法および組成物を使用してゲノム操作されたiPSCから分化された機能的に増強された派生免疫細胞の単離された集団または亜集団を含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、iPSCは、iPSC派生免疫細胞に保持可能な1つ以上の標的化遺伝子編集を含み、遺伝子操作されたiPSCおよびその派生細胞は、細胞ベースの養子療法に好適である。一実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞の単離された集団または亜集団は、iPSC由来CD34細胞を含む。一実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞の単離された集団または亜集団は、iPSC由来HSC細胞を含む。一実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞の単離された集団また

40

50

は亜集団は、i P S C由来p r o TまたはT系統細胞を含む。一実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞の単離された集団または亜集団は、i P S C由来p r o N KまたはN K系統細胞を含む。一実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞の単離された集団または亜集団は、i P S C由来免疫制御細胞または骨髄由来サプレッサー細胞（M D S C）を含む。いくつかの実施形態では、i P S C由来の遺伝子操作された免疫細胞は、改善された治療可能性のためにエクスピボでさらに調節される。一実施形態では、i P S Cに由来する遺伝子操作された免疫細胞の単離された集団または亜集団は、ナイーブT細胞、幹細胞メモリーT細胞、および／またはセントラルメモリーT細胞の数または比率の増加を含む。一実施形態では、i P S Cに由来する遺伝子操作された免疫細胞の単離された集団または亜集団は、I型N K T細胞の数または比率の増加を含む。別の実施形態では、i P S Cに由来する遺伝子操作された免疫細胞の単離された集団または亜集団は、適応N K細胞の数または比率の増加を含む。いくつかの実施形態では、i P S Cに由来する遺伝子操作されたC D 3 4細胞、H S C細胞、T系統細胞、N K系統細胞、または骨髄由来サプレッサー細胞の単離された集団または亜集団は、同種異系である。いくつかの他の実施形態では、i P S Cに由来する遺伝子操作されたC D 3 4細胞、H S C細胞、T細胞、N K細胞、N K T細胞、またはM D S Cの単離された集団または亜集団は、自家性である。

【0262】

いくつかの実施形態では、分化のためのi P S Cは、エフェクター細胞において望ましい治療属性を伝えるために選択された遺伝子インプリントを含むが、但し、分化中の細胞発生生物学が破壊されず、当該i P S Cに由来する分化したエフェクター細胞において遺伝子インプリントが保持され、機能的であることを条件とする。

【0263】

いくつかの実施形態では、多能性幹細胞の遺伝子インプリントは、(i) 非多能性細胞をi P S Cに再プログラミングする間もしくはその後多能性細胞のゲノムにおけるゲノム挿入、欠失、もしくは置換により得られる1つ以上の遺伝子改変されたモダリティ、または(ii) ドナー特異的、疾患特異的、もしくは治療応答特異的である供給源特異的免疫細胞の1つ以上の保持可能な治療属性を含み、多能性細胞が供給源特異的免疫細胞から再プログラミングされ、i P S Cは、i P S C由来造血系統細胞にも含まれる供給源の治療属性を保持する。

【0264】

いくつかの実施形態では、遺伝子改変されたモダリティは、安全スイッチタンパク質、標的化モダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬学的に活性なタンパク質およびペプチド、薬物標的候補、あるいは、i P S Cまたはその派生細胞の生着、輸送、ホーミング、生存能力、自己複製、持続性、免疫応答の調節と調整、および／または生存を促進するタンパク質の1つ以上を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子改変されたi P S Cおよびその派生細胞は、表2に列記された遺伝子型を含む。他のいくつかの実施形態では、表2に列記された遺伝子型を含む遺伝子改変されたi P S Cおよびその派生細胞は、(1) T A P 1、T A P 2、タパシン、N L R C 5、P D 1、L A G 3、T I M 3、R F X A N K、C I I T A、R F X 5、またはR F X A P、および染色体6 p 2 1領域の任意の遺伝子の1つ以上の欠失または発現低減、ならびに(2) H L A - E、4 1 B B L、C D 3、C D 4、C D 8、C D 4 7、C D 1 1 3、C D 1 3 1、C D 1 3 7、C D 8 0、P D L 1、A 2 A R、C A R、抗原特異的T C R、F c受容体、または二重特異性または多重特異性またはユニバーサルエンゲージャーと結合するための表面トリガー受容体の導入されたまたは増加した発現を含む追加の遺伝子改変されたモダリティをさらに含む。

【0265】

またいくつかの他の実施形態では、造血系統細胞は、(i) 1つ以上の抗原標的化受容体の発現、(ii) 改変されたH L A、(iii) 腫瘍微小環境に対する耐性、(iv) バイスタンダー免疫細胞の動員および免疫調節、(v) 腫瘍外効果の低減による改善された標的特異性、および(v) 改善されたホーミング、持続性、細胞毒性、または抗原エスケープ救済、のうちの少なくとも2つの組み合わせに関する供給源特異的免疫細胞の治

療属性を含む。

【0266】

いくつかの実施形態では、表2に列記された遺伝子型を含むiPSC派生エフェクター細胞、および当該細胞は、IL2、IL4、IL6、IL7、IL9、IL10、IL11、IL12、IL15、IL18、またはIL21を含む少なくとも1つのサイトカインおよび／もしくはその受容体、またはその任意の改変されたタンパク質を発現し、少なくともCARを発現する。いくつかの実施形態では、サイトカインおよびCARの操作された発現は、NK細胞特異的である。いくつかの他の実施形態では、サイトカインおよびCARの操作された発現は、T細胞特異的である。一実施形態では、CARは、MICA／B結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、iPSC派生造血エフェクター細胞は、抗原特異的である。いくつかの実施形態では、抗原特異的派生エフェクター細胞は、液性腫瘍を標的とする。いくつかの実施形態では、抗原特異的派生エフェクター細胞は、固形腫瘍を標的とする。いくつかの実施形態では、抗原特異的iPSC派生造血エフェクター細胞は、腫瘍抗原エスケープを救済することができる。

【0267】

養子細胞療法に好適な対象に本発明の免疫細胞を導入することにより、様々な疾患を回復させることができる。いくつかの実施形態では、提供されるiPSC派生エフェクター細胞は、同種異系養子細胞療法のためのものである。加えて、本発明は、いくつかの実施形態では、養子細胞療法に好適な対象に組成物を導入することによって、上記の治療組成物の治療用途を提供し、対象は、自己免疫障害、血液悪性腫瘍、固形腫瘍、または、HIV、RSV、EBV、CMV、アデノウイルス、もしくはBKポリオマウイルスに関連する感染を有する。血液悪性腫瘍の例には、急性および慢性白血病（急性骨髄性白血病（AML）、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性骨髄性白血病（CML）、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（NHL）、ホジキン病、多発性骨髄腫、および骨髄異形成症候群が含まれるが、これらに限定されない。固形がんの例には、脳、前立腺、乳房、肺、結腸、子宮、皮膚、肝臓、骨、脾臓、卵巣、精巣、膀胱、腎臓、頭、首、胃、子宮頸部、直腸、喉頭、および食道のがんが含まれるが、これらに限定されない。様々な自己免疫障害の例には、円形脱毛症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、皮膚筋炎、糖尿病（1型）、若年性特発性関節炎のいくつかの形態、糸球体腎炎、グレーブス病、ギランバレー症候群、特発性血小板減少性紫斑病、重症筋無力症、心筋炎のいくつかの形態、多発性硬化症、類天疱瘡／類天疱瘡、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性筋炎、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、リウマチ様関節炎、強皮症／全身性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデス、甲状腺炎のいくつかの形態、ブドウ膜炎のいくつかの形態、白斑、多発血管炎を伴う肉芽腫症（ウェゲナー病）が含まれるが、これらに限定されない。ウイルス感染の例には、HIV－（ヒト免疫不全ウイルス）、HSV－（単純ヘルペスウイルス）、KSHV－（カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス）、RSV－（呼吸器合胞体ウイルス）、EBV－（エプスタイン－バーウイルス）、CMV－（サイトメガロウイルス）、VZV（水痘帯状疱疹ウイルス）、アデノウイルス－、レンチウイルス－、BKポリオマウイルス関連障害）が含まれるが、これらに限定されない。

【0268】

本明細書に開示される実施形態の由来造血系統細胞を使用する治療は、症状に応じて、または再発防止のために実施され得る。「治療すること」、「治療」などの用語は、本明細書では、一般に、所望の薬理学的および／または生理学的効果を得ることを意味するために使用される。効果は、疾患を完全にまたは部分的に予防するという点で予防的であり得、かつ／または疾患および／もしくは疾患に起因する有害作用の部分的または完全な治癒に関して治療的であり得る。本明細書で使用される場合「治療」は、対象における疾患のあらゆる介入を網羅し、以下を含む：疾患にかかりやすいが、まだそれを有していると診断されていない対象において疾患が生じることを予防すること、疾患を阻害すること、すなわちその発症を阻止すること、または疾患を緩和する、すなわち疾患を後退させること。治療薬または組成物は、疾患または傷害の発症前、発症中、または発症後に投与す

ることができる。治療が患者の望ましくない臨床症状を安定化または低減する進行中の疾患の治療もまた、特に関心がある。特定の実施形態では、治療を必要とする対象は、細胞療法によって少なくとも1つの関連する症状を抑制し、回復させ、かつ／または改善することができる疾患、状態、および／または傷害を有する。ある特定の実施形態は、細胞療法を必要とする対象が、骨髄または幹細胞移植の候補、化学療法または放射線療法を受けた対象、過剰増殖性障害またはがん、例えば、造血系の過剰増殖性障害もしくはがんを有するかまたはそのリスクがある対象、腫瘍、例えば固形腫瘍を有するかまたはそれを発達させるリスクがある対象、ウイルス感染またはウイルス感染に関連する疾患を有するかまたはそのリスクがある対象を含むが、これらに限定されないことを企図する。

【0269】

本明細書に開示される実施形態の由来造血系統細胞を含む治療に対する応答性を評価する場合、応答は、臨床的有益率、死亡までの生存、病理学的完全応答、病理学的応答の半定量的測定、臨床的完全寛解、臨床的部分寛解、臨床的安定疾患、無再発生存、無転移生存、無病生存、循環腫瘍細胞減少、循環マーカー応答、およびRECIST（固形腫瘍における応答評価基準）基準のうちの少なくとも1つを含む基準によって測定され得る。

【0270】

開示される由来造血系統細胞を含む治療組成物は、他の治療の前、治療中、および／または治療後に対象に投与され得る。したがって、組み合わせ療法の方法は、追加の治療薬の使用前、使用中、および／または使用後に、iPSC由来免疫細胞の投与または調製を伴い得る。上記に提供されるように、1つ以上の追加の治療薬は、ペプチド、サイトカイン、チェックポイント阻害剤、マイトジェン、成長因子、小RNA、dsRNA（二本鎖RNA）、単核血液細胞、フィーダー細胞、フィーダー細胞構成要素もしくはその置換因子、目的の1つ以上のポリ核酸を含むベクター、抗体、化学療法剤もしくは放射性部分、または免疫調節薬（IMiD）を含む。iPSC由来免疫細胞の投与は、追加の治療薬の投与から、時間、日、さらには週単位の時間で分離することができる。加えて、または代替的に、投与は、限定されないが、抗腫瘍剤、外科手術などの非薬物療法などの他の生物学的に活性な薬剤またはモダリティと組み合わせることができる。

【0271】

組み合わせ細胞療法のいくつかの実施形態では、治療的組み合わせは、本明細書で提供されるiPSC由来造血系統細胞と、抗体または抗体断片である追加の治療薬とを含む。いくつかの実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒト化抗体、ヒト化モノクローナル抗体、またはキメラ抗体であり得る。いくつかの実施形態では、抗体または抗体断片は、ウイルス抗原に特異的に結合する。他の実施形態では、抗体または抗体断片は、腫瘍抗原に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、腫瘍またはウイルス特異的抗原は、投与されたiPSC由来造血系統細胞を活性化して、それらの殺滅能力を増強する。いくつかの実施形態では、投与されたiPSC由来造血系統細胞に対する追加の治療薬として、組み合わせ治療に好適な抗体としては、CD20抗体（例えば、リツキシマブ、ベルツズマブ、オファツムマブ、ウブリツキシマブ、オカラツズマブ、オビヌツズマブ）、HER2抗体（例えば、トラスツズマブ、パーツマブ）、CD52抗体（例えば、アレムツズマブ）、EGFR抗体（例えば、セルツキシマブ）、GD2抗体（例えば、ジヌツキシマブ）、PDL1抗体（例えば、アベルマブ）、CD38抗体（例えば、ダラツムマブ、イサツキシマブ、MOR202）、CD123抗体（例えば、7G3、CSL362）、SLAMF7抗体（エロツズマブ）、MICA／B抗体（7C6、6F11、1C2）、およびそれらのヒト化またはFc改変されたバリアントもしくは断片、またはそれらの機能的同等物およびバイオシミラーが挙げられるがそれらに限定されない。

【0272】

いくつかの実施形態では、追加の治療薬は、1つ以上のチェックポイント阻害剤を含む。チェックポイントは、阻害されていない場合、免疫応答を抑制または下方制御することができる細胞分子、多くの場合細胞表面分子である。チェックポイント阻害剤は、チェッ

10

20

30

40

50

クポイント遺伝子発現または遺伝子産物を低減するか、またはチェックポイント分子の活性を減少させることができるアンタゴニストである。本明細書で提供される、NK細胞またはT細胞を含む派生エフェクター細胞との併用療法に好適なチェックポイント阻害剤には、PD1 (Pdcd1、CD279)、PDL-1 (CD274)、TIM3 (Havcr2)、TIGIT (WUCAMおよびVstm3)、LAG3 (Lag3、CD223)、CTLA4 (Ctla4、CD152)、2B4 (CD244)、4-1BB (CD137)、4-1BBL (CD137L)、A2aR、BATE、BTLA、CD39 (Entpd1)、CD47、CD73 (NT5E)、CD94、CD96、CD160、CD200、CD200R、CD274、CEACAM1、CSF-1R、Foxp1、GARP、HVEM、IDO、EDO、TDO、LAIR-1、MICA/B、NR4A2、MAFB、OCT-2 (Pou2f2)、レチノイン酸受容体アルファ (Rara)、TLR3、VISTA、NKG2A/HLA-E、および阻害性KIR (例えば、2DL1、2DL2、2DL3、3DL1、および3DL2) のアンタゴニストが含まれるが、これらに限定されない。

【0273】

提供される派生エフェクター細胞を含む併用療法のいくつかの実施形態は、チェックポイント分子を標的とする少なくとも1つの阻害剤をさらに含む。提供される派生エフェクター細胞との併用療法のいくつかの他の実施形態は、2つ、3つ以上のチェックポイント分子が標的とされるように、2つ、3つ以上の阻害剤を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される併用療法のためのエフェクター細胞は、提供される派生NK細胞である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される併用療法のためのエフェクター細胞は、派生T細胞である。いくつかの実施形態では、併用療法のための派生NK細胞またはT細胞は、本明細書に提供されるように機能的に増強される。いくつかの実施形態では、2つ、3つ以上のチェックポイント阻害剤は、派生エフェクター細胞の投与とともに、投与前、または投与後に併用療法で投与され得る。いくつかの実施形態では、2つ以上のチェックポイント阻害剤は、同時に、または一度に1つ（連続的に）投与される。

【0274】

いくつかの実施形態では、上記のチェックポイント分子のいずれかを阻害するアンタゴニストは抗体である。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害抗体は、マウス抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダIg、サメ重鎖のみの抗体 (VNAR)、IgNAR、キメラ抗体、組換え抗体、またはそれらの抗体断片であり得る。抗体断片の非限定的な例としては、Fab、Fab'、F(ab)'2、F(ab)'3、Fv、単鎖抗原結合断片 (scFv)、(scFv)2、ジスルフィド安定化Fv (dsFv)、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、単ドメイン抗原結合断片 (sdAb、ナノボディ)、組換え重鎖のみの抗体 (VHH)、および全抗体の結合特異性を維持する他の抗体断片が挙げられ、これらは、産生するのに費用対効果が高いか、使用がより容易であるか、または全抗体よりも感度が高い可能性がある。いくつかの実施形態では、1つ、または2つ、または3つ以上のチェックポイント阻害剤は、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、イピリムマブ、IPH4102、IPH43、IPH33、リリムマブ、モナリズマブ、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、およびそれらの誘導体または機能的同等物のうちの少なくとも1つを含む。

【0275】

派生エフェクター細胞と、1つ以上のチェック阻害剤とを含む併用療法は、皮膚T細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫 (NHL)、菌状息肉腫、パジェット細網症、セザリー症候群、肉芽腫性弛緩性皮膚、リンパ腫様丘疹症、慢性苔癬状皰癬疹、急性痘瘡状苔癬状ひこう疹、CD30+皮膚T細胞リンパ腫、続発性皮膚CD30+大細胞リンパ腫、非菌状息肉腫CD30皮膚大T細胞リンパ腫、多形性T細胞リンパ腫、レナートリンパ腫、皮下T細胞リンパ腫、血管中心性リンパ腫、芽球性NK細胞リンパ腫、B細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫 (HL)、頭頸部腫瘍、扁平上皮がん、横紋筋肉腫、ルイス肺がん (LLC)、非小細胞肺がん、食道扁平上皮がん、食道腺がん、腎細胞がん (RCC)、結腸直

10

20

30

40

50

腸がん（CRC）、急性骨髄性白血病（AML）、乳がん、胃がん、前立腺小細胞神経内分泌がん（SCNC）、肝臓がん、神経膠芽腫、肝臓がん、口腔扁平上皮がん、膵臓がん、甲状腺乳頭がん、肝内胆管細胞がん、肝細胞がん、骨がん、転移、および鼻咽頭がんを含むがこれらに限定されない液性および固形がんの治療に適用される。

【0276】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される派生エフェクター細胞以外に、治療用途の組み合わせは、化学療法剤または放射性部分を含む1つ以上の追加の治療薬を含む。化学療法剤とは、細胞毒性抗腫瘍剤、すなわち、腫瘍細胞を優先的に殺滅するか、急速に増殖する細胞の細胞周期を破壊するか、または幹がん細胞を根絶することが見出され、腫瘍性細胞の成長を防止または低減するために治療的に使用される化学剤を指す。化学療法剤はまた、抗腫瘍性または細胞毒性の薬物または薬剤と称されることもあり、当技術分野で周知である。

【0277】

いくつかの実施形態では、化学療法剤は、アントラサイクリン、アルキル化剤、スルホン酸アルキル、アジリジン、エチレンイミン、メチルメラミン、ナイトロジェンマスタード、ニトロソ尿素、抗生物質、代謝拮抗剤、葉酸類似体、プリン類似体、ピリミジン類似体、酵素、ポドフィロトキシン、白金含有薬剤、インターフェロン、およびインターロイキンを含む。例示的な化学療法剤には、アルキル化剤（シクロホスファミド、メクロレタミン、メファリン、クロランブシル、ヘアメチルメラミン、チオテパ、ブスルファン、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン）、アニメタボライト（メトトレキサート、フルオロウラシル、フロクスウリジン、シタラビン、6-メルカプトプリン、チオグアニン、ペントスタチン）、ピンカアルカロイド（ピンクリスチン、ピンブラスチン、ビンデシン）、エピポドフィロトキシン（エトポシド、エトポシドオルトキノン、およびテニポシド）、抗生物質（ダウノルビシン、ドキソルビシン、ミトキサントロン、ピサントレン、アクチノマイシンD、プリカマイシン、ピューロマイシン、およびグラミシジンD）、パクリタキセル、コルヒチン、サイトカラシンB、エメチン、メイタンシン、およびアムサクリンが含まれるが、これらに限定されない。追加の薬剤には、アミングルテチミド、シスプラチン、カルボプラチン、マイトマイシン、アルトレタミン、シクロホスファミド、ロムスチン（CCNU）、カルムスチン（BCNU）、イリノテカン（CPT-11）、アレムツザマブ、アルトレタミン、アナストロゾール、L-アスパラギナーゼ、アザシチジン、ベバシズマブ、ベキサロテン、ブレオマイシン、ボルテゾミブ、ブスルファン、カルステロン、カベシタビン、セレコキシブ、セツキシマブ、クラドリビン、クロフラビン、シタラビン、ダカルバジン、デニロイキンジフチトクス、ジエチルスチルベストロール、ドセタキセル、ドロモスタノロン、エピルビシン、エルロチニブ、エストラムスチン、エトポシド、エチニルエストラジオール、エキセメスタン、フロクスウリジン、5-フルオロウラシル、フルダラビン、フルタミド、フルベストラント、ゲフィチニブ、ゲムシタビン、ゴセレリン、ヒドロキシ尿素、イブリツモマブ、イダルビシン、イフォスファミド、イマチニブ、インターフェロンアルファ（2a、2b）、イリノテカン、レトロゾール、ロイコボリン、ロイプロリド、レバミソール、メクロレタミン、メゲストロール、メルファリン、メルカプトプリン、メトトレキサート、メトキサレン、ミトマイシンC、ミトタン、ミトキサントロン、ナンドロロン、ノフェツモマブ、オキサリプラチン、パクリタキセル、パミドロネート、ペメトレキセド、ペガデマラーゼ、ペグアスパラガーゼ、ペントスタチン、ピボプロマン、プリカマイシン、ポリフェプロサン、ポルフィマー、プロカルバジン、キナクリン、リツキシマブ、サルグラモスチム、ストレプトゾシン、タモキシフェン、テモゾロミド、テニポシド、テストラクトン、チオグアニン、チオテパ、トペテカン、トレミフェン、トシツモマブ、トラスツズマブ、トレチノイン、ウラシルマスタード、バルルビシン、ビノレルビン、およびゾレドロン酸が含まれる。他の好適な薬剤は、化学療法剤または放射線療法剤として承認され、当技術分野で知られているものを含む、ヒトでの使用が承認されている薬剤である。そのような薬剤は、いくつかの標準的な医師および腫瘍学者の参考文献のいずれか（例えば、Goodman & Gilman's The

10

20

30

40

50

Pharmacological Basis of Therapeutics, Ninth Edition, McGraw-Hill, N. Y., 1995) または National Cancer Institute のウェブサイト (fda.gov/cder/cancer/druglistfrarne.htm) を通じて参照することができ、両方とも随時更新される。

【0278】

サリドマイド、レナリドマイド、およびボマリドマイドなどの免疫調節薬 (IMiD) は、NK細胞およびT細胞の両方を刺激する。本明細書で提供されるように、IMiDは、がん治療のためのiPSC由来の治療用免疫細胞とともに使用され得る。

【0279】

治療組成物に含まれるiPSC由来造血系統細胞の単離された集団以外に、患者への投与に好適な組成物は、1つ以上の薬学的に許容される担体 (添加剤) および／もしくは希釈剤 (例えば、薬学的に許容される培地、例えば、細胞培養培地)、または他の薬学的に許容される構成要素をさらに含み得る。薬学的に許容される担体および／または希釈剤は、部分的には、投与される特定の組成物によって、ならびに治療組成物を投与するために使用される特定の方法によって決定される。したがって、本発明の治療組成物の多種多様な好適な製剤が存在する (例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed. 1985を参照されたく、その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

【0280】

一実施形態では、治療組成物は、本明細書に開示される方法および組成物によって作製された多能性細胞由来のT細胞を含む。一実施形態では、治療組成物は、本明細書に開示される方法および組成物によって作製された多能性細胞由来のNK細胞を含む。一実施形態では、治療組成物は、本明細書に開示される方法および組成物によって作製された多能性細胞由来のCD34+HE細胞を含む。一実施形態では、治療組成物は、本明細書に開示される方法および組成物によって作製された多能性細胞由来のHSCを含む。一実施形態では、治療組成物は、本明細書に開示される方法および組成物によって作製された多能性細胞由来のMDS細胞を含む。本明細書に開示されるiPSC由来造血系統細胞の集団を含む治療組成物は、静脈内、腹腔内、経腸、または気管投与法によって別個に、または他の好適な化合物と組み合わせて投与して、所望の治療目標に影響を及ぼすことができる。

【0281】

これらの薬学的に許容される担体および／または希釈剤は、治療組成物のpHを約3～約10の間に維持するのに十分な量で存在することができる。したがって、緩衝剤は、全組成物の重量対重量ベースで約5%ほどであり得る。限定されないが、塩化ナトリウムおよび塩化カリウムなどでの電解質もまた、治療組成物に含まれ得る。一態様では、治療組成物のpHは、約4～約10の範囲である。代替的に、治療組成物のpHは、約5～約9、約6～約9、または約6.5～約8の範囲である。別の実施形態では、治療組成物は、当該pH範囲のうちの1つのpHを有する緩衝液を含む。別の実施形態では、治療組成物は、約7のpHを有する。代替的に、治療組成物は、約6.8～約7.4の範囲のpHを有する。さらに別の実施形態では、治療組成物は、約7.4のpHを有する。

【0282】

本発明はまた、部分的に、本発明の特定の組成物および／または培養物における薬学的に許容される細胞培養培地の使用を提供する。そのような組成物は、ヒト対象への投与に好適である。一般的に言えば、本発明の実施形態によるiPSC由来免疫細胞の維持、成長、および／または健康を支持する任意の培地は、医薬細胞培養培地としての使用に好適である。特定の実施形態では、薬学的に許容される細胞培養培地は、無血清および／またはフィーダーフリー培地である。様々な実施形態では、無血清培地は動物質を含まず、任意選択的にタンパク質を含まなくてもよい。任意選択的に、培地は、生物学的製剤に許容される組換えタンパク質を含み得る。動物質を含まない培地とは、構成要素が動物以外の供給源に由来する培地を指す。組換えタンパク質は、動物質を含まない培地で天然の動物

10

20

30

40

50

性タンパク質に取って代わり、栄養素は、合成、植物、または微生物源から得られる。対照的に、タンパク質を含まない培地は、実質的にタンパク質を含まないと定義される。当業者は、上記の培地の例が例示的であり、本発明での使用に好適な培地の配合を決して制限するものではなく、当業者に既知の利用可能な多くの好適な培地があることを理解するであろう。

【0283】

単離された多能性幹細胞由来造血系統細胞は、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、または99%のT細胞、NK細胞、NKT細胞、proT細胞、proNK細胞、CD34+HE細胞、HSC、B細胞、骨髄由来サプレッサー細胞(MDSC)、制御性マクロファージ、制御性樹状細胞、または間葉系間質細胞を有し得る。いくつかの実施形態では、単離された多能性幹細胞由来造血系統細胞は、約95%〜約100%のT細胞、NK細胞、proT細胞、proNK細胞、CD34+HE細胞、または骨髄由来サプレッサー細胞(MDSC)を有する。いくつかの実施形態では、本発明は、細胞療法を必要とする対象を治療するための、約95%のT細胞、NK細胞、proT細胞、proNK細胞、CD34+HE細胞、または骨髄由来サプレッサー細胞(MDSC)の単離された集団を有する組成物などの、精製されたT細胞またはNK細胞を有する治療組成物を提供する。

【0284】

一実施形態では、組み合わせ細胞療法は、治療用タンパク質またはペプチド、および表2に列記される遺伝子型を含むゲノム操作されたiPSCに由来するNK細胞の集団を含み、派生NK細胞は、提供されるエンドドメインを有するCARを含む。別の実施形態では、組み合わせ細胞療法は、抗原特異的な治療用タンパク質またはペプチド、および表2に列記される遺伝子型を含むゲノム操作されたiPSCに由来するT細胞の集団を含み、派生T細胞は、CD38ヌルおよび提供されるエンドドメインを有するCARを含む。いくつかの実施形態では、組み合わせ細胞療法は、ダラツムマブ、イサツキシマブ、またはMOR202、および表2に列挙された遺伝子型を含むゲノム操作されたiPSCに由来するNK細胞またはT細胞の集団を含み、派生NK細胞またはT細胞は、提供されるエンドドメインを有するCAR、CD38ヌル、およびhnCD16を含む。さらにいくつかの他の実施形態では、組み合わせ細胞療法は、ダラツムマブ、および表2に列記された遺伝子型を含むゲノム操作されたiPSCに由来するNK細胞またはT細胞の集団を含み、派生NK細胞またはT細胞は、提供されるエンドドメインを有する第1のCAR、CD38ヌル、hnCD16、および第2のCARを含み、第1および／または第2のCARは、CD19、BCMA、CD20、CD22、CD38、CD123、HER2、CD52、EGFR、GD2、MSLN、VEGFR2、PSMA、およびPDL1のうちの少なくとも1つを標的とし、第1および第2のCARは、異なる抗原を標的とする。さらにいくつかの追加の実施形態では、組み合わせ細胞療法は、ダラツムマブ、イサツキシマブ、またはMOR202、および表2に列挙された遺伝子型を含むゲノム操作されたiPSCに由来するNK細胞またはT細胞の集団を含み、派生NK細胞またはT細胞は、提供されるエンドドメインを有する第1のCAR、CD38ヌル、hnCD16、第2のCAR、および1つ以上の外因性のサイトカインを含む。さらに別の一実施形態では、組み合わせ細胞療法は、治療用タンパク質またはペプチド、および表2に列挙された遺伝子型を含むゲノム操作されたiPSCに由来するNK細胞の集団を含み、派生NK細胞は、提供されるエンドドメインを有する第1のCAR、CD38ヌル、hnCD16、第2のCAR、および1つ以上の外因性のサイトカイン、ならびにHLA-G過剰発現またはCD58ノックアウトおよびCD54ノックアウトのうちの少なくとも1つを含むB2M^{-/-}CIITA^{-/-}を含む。

【0285】

当業者が理解するように、本明細書の方法および組成に基づいてiPSCに由来する自家および同種異系の造血系統細胞の両方を、上述の細胞治療に使用することができる。自家移植の場合、由来造血系統細胞の単離された集団は、患者と完全または部分的にHLA

10

20

30

40

50

一致する。別の実施形態では、由来造血系統細胞は、対象とHLAが一致せず、由来造血系統細胞は、HLA IおよびHLA IIを有するNK細胞またはT細胞である。

【0286】

いくつかの実施形態では、治療組成物中の由来造血系統細胞の数は、用量当たり少なくとも 0.1×10^5 細胞、少なくとも 1×10^5 細胞、少なくとも 5×10^5 細胞、少なくとも 1×10^6 細胞、少なくとも 5×10^6 細胞、少なくとも 1×10^7 細胞、少なくとも 5×10^7 細胞、少なくとも 1×10^8 細胞、少なくとも 5×10^8 細胞、少なくとも 1×10^9 細胞、または少なくとも 5×10^9 細胞である。いくつかの実施形態では、治療組成物中の由来造血系統細胞の数は、用量当たり約 0.1×10^5 細胞～約 1×10^6 細胞、用量当たり約 0.5×10^6 細胞～約 1×10^7 細胞、用量当たり約 0.5×10^7 細胞～約 1×10^8 細胞、用量当たり約 0.5×10^8 細胞～約 1×10^9 細胞、用量当たり約 1×10^9 細胞～約 5×10^9 細胞、用量当たり約 0.5×10^9 細胞～約 8×10^9 細胞、用量当たり約 3×10^9 細胞～約 3×10^{10} 細胞、またはその間の任意の範囲である。一般に、60kgの患者の場合、 1×10^8 細胞/用量は、 1.67×10^6 細胞/kgに変換される。

【0287】

一実施形態では、治療組成物中の由来造血系統細胞の数は、血液の部分的または単一の臍帯中の免疫細胞の数であるか、または少なくとも 0.1×10^5 細胞/kg体重、少なくとも 0.5×10^5 細胞/kg体重、少なくとも 1×10^5 細胞/kg体重、少なくとも 5×10^5 細胞/kg体重、少なくとも 10×10^5 細胞/kg体重、少なくとも 0.75×10^6 細胞/kg体重、少なくとも 1.25×10^6 細胞/kg体重、少なくとも 1.5×10^6 細胞/kg体重、少なくとも 1.75×10^6 細胞/kg体重、少なくとも 2×10^6 細胞/kg体重、少なくとも 2.5×10^6 細胞/kg体重、少なくとも 3×10^6 細胞/kg体重、少なくとも 4×10^6 細胞/kg体重、少なくとも 5×10^6 細胞/kg体重、少なくとも 10×10^6 細胞/kg体重、少なくとも 15×10^6 細胞/kg体重、少なくとも 20×10^6 細胞/kg体重、少なくとも 25×10^6 細胞/kg体重、少なくとも 30×10^6 細胞/kg体重、 1×10^8 細胞/kg体重、 5×10^8 細胞/kg体重、または 1×10^9 細胞/kg体重である。

【0288】

一実施形態では、ある用量の由来造血系統細胞が対象に送達される。例示的な一実施形態では、対象に提供される細胞の有効量は、少なくとも 2×10^6 細胞/kg、少なくとも 3×10^6 細胞/kg、少なくとも 4×10^6 細胞/kg、少なくとも 5×10^6 細胞/kg、少なくとも 6×10^6 細胞/kg、少なくとも 7×10^6 細胞/kg、少なくとも 8×10^6 細胞/kg、少なくとも 9×10^6 細胞/kg、または少なくとも 10×10^6 細胞/kg、またはそれ以上の細胞/kgであり、介在するすべての細胞用量を含む。

【0289】

別の例示的な実施形態では、対象に提供される細胞の有効量は、約 2×10^6 細胞/kg、約 3×10^6 細胞/kg、約 4×10^6 細胞/kg、約 5×10^6 細胞/kg、約 6×10^6 細胞/kg、約 7×10^6 細胞/kg、約 8×10^6 細胞/kg、約 9×10^6 細胞/kg、もしくは約 10×10^6 細胞/kg、またはそれ以上の細胞/kg（介在するすべての細胞用量を含む）である。

【0290】

別の例示的な実施形態では、対象に提供される細胞の有効量は、約 2×10^6 細胞/kg～約 10×10^6 細胞/kg、約 3×10^6 細胞/kg～約 10×10^6 細胞/kg、約 4×10^6 細胞/kg～約 10×10^6 細胞/kg、約 5×10^6 細胞/kg～約 10×10^6 細胞/kg、 2×10^6 細胞/kg～約 6×10^6 細胞/kg、 2×10^6 細胞/kg～約 7×10^6 細胞/kg、 2×10^6 細胞/kg～約 8×10^6 細胞/kg、 3×10^6 細胞/kg～約 6×10^6 細胞/kg、 3×10^6 細胞/kg～約 7×10^6 細胞/kg、 3×10^6 細胞/kg～約 8×10^6 細胞/kg、 4×10^6 細胞/kg～約 6×10^6 細胞/kg、 4×10^6 細胞/kg～約 7×10^6 細胞/kg、 4×10^6 細胞/kg～約 8×10^6 細胞/kg、

$\times 10^6$ 細胞/kg、 5×10^6 細胞/kg～約 6×10^6 細胞/kg、 5×10^6 細胞/kg～約 7×10^6 細胞/kg、 5×10^6 細胞/kg～約 8×10^6 細胞/kg、または 6×10^6 細胞/kg～約 8×10^6 細胞/kg（介在するすべての細胞用量を含む）である。

【0291】

いくつかの実施形態では、由来造血系統細胞の治療用途は、単回投与治療である。いくつかの実施形態では、由来造血系統細胞の治療用途は、複数回投与治療である。いくつかの実施形態では、複数回投与治療は、毎日、3日ごと、7日ごと、10日ごと、15日ごと、20日ごと、25日ごと、30日ごと、35日ごと、40日ごと、45日ごと、もしくは50日ごと、またはその間の任意の日数に1回の投与である。

10

【0292】

本発明の由来造血系統細胞の集団を含む組成物は、無菌であり得、ヒト患者への投与に好適であり、投与の準備ができています（すなわち、さらに処理することなく投与することができる）。投与の準備ができています細胞ベースの組成物は、組成物が、対象への移植または投与の前に、任意のさらなる処理または操作を必要としないことを意味する。他の実施形態では、本発明は、1つ以上の薬剤を投与する前に拡大および／または調節される、由来造血系統細胞の単離された集団を提供する。組換えTCRまたはCARを発現するように遺伝子操作された由来造血系統細胞の場合、例えば、米国特許第6,352,694号に記載される方法を使用して、細胞を活性化および拡大することができる。

【0293】

ある特定の実施形態では、由来造血系統細胞の一次刺激シグナルおよび共刺激シグナルは、異なるプロトコルによって提供され得る。例えば、各シグナルを提供する薬剤は、溶液中にあるか、または表面に結合され得る。表面に結合される場合、薬剤は同じ表面（つまり、「シス」形成で）、または別個の表面に（つまり、「トランス」形成で）結合され得る。代替的に、一方の薬剤を表面に結合させ、もう一方の薬剤を溶液中に存在させることもできる。一実施形態では、共刺激シグナルを提供する薬剤は、細胞表面に結合され得、一次活性化シグナルを提供する薬剤は、溶液中にあるか、または表面に結合される。ある特定の実施形態では、両方の薬剤は、溶液中にあり得る。別の実施形態では、薬剤は、可溶性形態であり、次いで、Fc受容体を発現する細胞、または本発明の実施形態においてTリンパ球を活性化および拡大する際に使用することが企図されている人工抗原提示細胞（aAPC）について米国特許出願公開第2004/0101519号および同第2006/0034810号などに開示される薬剤に結合する抗体もしくは他の結合剤などの表面に架橋され得る。

20

30

【0294】

投与量、頻度、およびプロトコルのある程度の変動は、治療される対象の状態に応じて必然的に発生する。投与の責任者は、いずれにしても、個々の対象に適切な用量、頻度、およびプロトコルを決定する。

【実施例】

【0295】

以下の実施例は、例示のために提供され、限定のためではない。

40

【0296】

実施例1—材料および方法

様々なプロモーターの制御下で、異なるセーフハーバー遺伝子座組み込み戦略と組み合わせさせて自殺系を効果的に選択し、試験するために、単一細胞の継代および高スループットの96ウェルプレートベースのフローサイトメトリー選別を可能にする、出願人独自のhiPSCプラットフォームを使用し、単一または複数の遺伝子調節によるクローンhiPSCの誘導を可能にする。

【0297】

小分子培養におけるhiPSCの維持：培養のコンフルエンスが75%～90%に達すると、hiPSCが単一細胞として日常的に継代された。単一細胞の解離では、hiP

50

SCをPBS (Mediatech) で1回洗浄し、アキュターゼ (Millipore) で37℃で3～5分間処理した後、ピペティングして単一細胞の解離を確実にした。次いで、単一細胞懸濁液を従来の培地と等量で混合し、225×gで4分間遠心分離し、FMMに再懸濁し、マトリゲルでコーティングした表面にプレーティングした。継代は、典型的には、1:6～1:8で、37℃で2～4時間、マトリゲルで前もってコーティングした組織培養プレートに移し、2～3日ごとにFMMを供給した。細胞培養は、37℃および5%CO₂に設定された加湿インキュベーターで維持された。

【0298】

ZFNによるヒトのiPSC操作、目的のモダリティの標的化された編集のためのCRISPR: 例としてROSA26標的化された挿入を使用して、ZFNを介したゲノム編集では、AAVS1標的化された挿入のために、2.5ugのZFN-L (FTV893)、2.5ugのZFN-R (FTV894)、および5ugのドナー構築物の混合物を200万個のiPSCにトランスフェクトした。CRISPRを介したゲノム編集では、ROSA26標的化された挿入のために、5ugのROSA26-gRNA/Cas9 (FTV922) および5ugのドナー構築物の混合物を200万個のiPSCにトランスフェクトした。トランスフェクションは、パラメーター1500V、10ms、3パルスを使用して、Neonトランスフェクションシステム (Life Technologies) を使用して行われた。トランスフェクション後の2日目または3日目に、プラスミドに人工プロモータードライバGFPおよび/またはRFP発現カセットが含まれている場合、フローサイトメトリーを使用してトランスフェクション効率を測定した。トランスフェクション後の4日目に、ピューロマイシンを最初の7日間は0.1ug/mlの濃度で、7日後は0.2ug/mlの濃度で培地に添加して、標的化された細胞を選択した。ピューロマイシンの選択中、細胞は10日目にマトリゲルでコーティングされた新しいウェルに継代された。ピューロマイシン選択の16日目以降に、生存細胞をGFP+iPSC細胞の割合についてフローサイトメトリーで分析した。

【0299】

ゲノム編集されたiPSCのバルク選別およびクローン選別: ZFNまたはCRISPR-Cas9を使用したゲノム標的化された編集を伴うiPSCは、ピューロマイシン選択の20日後に、GFP+SSEA4+TRA181+iPSCのバルク選別およびクローン選別された。単一細胞で解離した標的化されたiPSCプールを、最適な性能のために新しく作製された、ハンクス平衡塩溶液 (Mediatech)、4%ウシ胎仔児血清 (Invitrogen)、1xペニシリン/ストレプトマイシン (Mediatech)、および10mMのHepes (Mediatech) を含む冷却染色緩衝液に再懸濁した。SSEA4-PE、TRA181-Alexa Fluor-647 (BD Biosciences) を含む、コンジュゲートされた一次抗体を細胞溶液に添加し、氷上で15分間インキュベートした。すべての抗体は、100万個の細胞当たり100μLの染色緩衝液に7μLで使用された。溶液を染色緩衝液で1回洗浄し、225gで4分間スピンドウンし、10μMのチアゾピブンを含む染色緩衝液に再懸濁し、フローサイトメトリー選別のために氷上で維持した。フローサイトメトリー選別は、FACS Aria II (BD Biosciences) で行った。バルク選別では、GFP+SSEA4+TRA181+細胞をゲーティングし、7mLのFMMで満たされた15mLの標準チューブに選別した。クローン選別では、選別された細胞を、ウェル当たり3イベントの濃度で、100μMのノズルを使用して96ウェルプレートに直接排出した。各ウェルには、5μg/mLのフィブロネクチンおよび1xペニシリン/ストレプトマイシン (Mediatech) を補充した200μLのFMMを予め充填し、5xマトリゲルで前もって一晚コーティングした。5xマトリゲルプレコーティングには、1アリコートのマトリゲルを5mLのDMEM/F12に添加し、次いで、適切な再懸濁を可能にするために4℃で一晚インキュベートし、最後にウェル当たり50μLで96ウェルプレートに添加した後、37℃で一晚インキュベートすることが含まれる。5xマトリゲルは、各ウェルに培地を添加する直前に吸引される。選別が完了したら、インキュベーションの前に、96ウェル

プレートを225 gで1～2分間遠心分離した。プレートを7日間静置した。7日目に、150 μ Lの培地を各ウェルから除去し、100 μ LのFMMと交換した。選別後10日目に、ウェルに追加の100 μ LのFMMを再供給した。コロニー形成は早くも2日目に検出され、ほとんどのコロニーは選別後7～10日で拡大した。最初の継代では、ウェルをPBSで洗浄し、30 μ Lのアキュターゼで、37℃で約10分間解離させた。アキュターゼ処理の延長の必要性は、長期間培養でアイドリング状態にあったコロニーのコンパクトさを反映している。細胞が解離していることが認められた後、200 μ LのFMMを各ウェルに添加し、数回ピペッティングしてコロニーを破壊する。解離したコロニーを、5 x マトリゲルで前もってコーティングした96ウェルプレートの別のウェルに移し、次いでインキュベーション前に225 gで2分間遠心分離する。この1：1の継代は、拡大する前に初期のコロニーを広げるために行われる。その後の継代は、3～5分間のアキュターゼ処理、およびFMM中の1 x マトリゲルで前もってコーティングされたより大きなウェルへの75～90%のコンフルエンスでの1：4～1：8の拡大で日常的に行われた。各クローン細胞株は、GFP蛍光レベルおよびTRA1-81発現レベルについて分析された。100%に近いGFP+およびTRA1-81+のクローン株を、さらなるPCRスクリーニングおよび分析のために選択した。フローサイトメトリー分析は、Guava EasyCyte 8 HT (Millipore)で行われ、FlowJo (FlowJo, LLC)を使用して分析された。

【0300】

実施例2-CAR候補の機能プロファイリング、および新規エンドドメインを含むCARを発現する派生NKまたはT細胞

機能的なキメラ抗原受容体(CAR)をスクリーニングするために、同じ抗原特異性を有するが、それらのエンドドメインおよび／または膜貫通ドメインが異なる候補CAR(CAR_{ネオ})の一群を、各々、細胞特異的表面発現プロフィールを調べるために、初代NK細胞およびT細胞で発現させる。図2A～Cに示されるように、これらの29の構築物は、同一のscFvおよびCD8ヒンジ領域を有し、エンドドメインを含むシグナル伝達構成要素のみが異なる。同じ特定の抗原を標的とするこれらの29の異なるCAR構築物の発現プロファイルと比較することにより、このアッセイを実施して、どの構築物、より具体的には、どのエンドドメイン構成要素が細胞表面で効率的かつ検出可能なCAR発現を与えるかを判定した。一例では、すべての候補CARは、MICA/Bに特異的であるように構築されている。同様に、機能スクリーニングはまた、例えば、CAR特異性のためにCD19 scFvを利用することもできる。派生NK系統細胞は、それぞれのCAR構築物を運ぶレンチウイルスで形質導入された。図2A～Cの各CAR構築物は、C末端にThy1.1マーカーを含み、これは、P2Aペプチド(図示せず)によって構築物から分離されている。形質導入から約10日後、形質導入された細胞を、FACSによってCARおよびThy1.1発現についてアッセイした。首尾よく形質導入された細胞は、Thy1.1の発現に基づいて選別されるが、CAR染色は、CARのscFv領域に特異的な抗体を使用して行われた。図3A～Iに示されるように、結果は、アッセイの時点で明確であるが変化するCAR発現パターンを示し、ある特定の膜貫通領域(すなわち、CD28、CD8)は、増強されたCAR発現を一見与える。しかしながら、構築物3および23は、その時点で細胞表面で検出できず、これは、構築物の細胞段階および／または生物学に起因し得る。

【0301】

CAR候補によって媒介される抗原特異的殺傷を示すために、MICA/B-CAR_{ネオ} NKまたはT細胞は、MICA/Bを発現するか、MICA/Bがヌルまたは低である腫瘍細胞と共培養される。MICA/B-CD28-CD3z1XXCARを発現するT細胞およびMICA/B-NKG2D-2B4-CD3z CARを発現するNK細胞、ならびにCARを含まないT細胞およびNK細胞は、陽性および陰性対照として使用される。次いで、特定の殺滅能力を示す各MICA/B-CAR_{ネオ}が、iPSCに形質導入される。すべてのCAR_{ネオ}-iPSC株は、CARの発現、核型の異常、およびゲノムの

安定性について検査される。iPSCでの発現の有無にかかわらず、各CARネオ-iPSC株は、本明細書に記載の方法に従って、T細胞およびNK細胞の両方の分化のために継続される。10日目、20日目の中間細胞、および分化中の他の時点の細胞は、マーカー発現プロファイルおよび細胞増殖について特徴付けられる。重要な時点および分化プロセスの終了時の細胞増殖も評価される。

【0302】

MICA/B-CARネオ候補者を発現する派生NKまたはT細胞の機能プロファイルを決定するために、MICA/B-CARネオによる細胞表面MICA/Bの安定化が、検査される。

【0303】

MICA/B-CARネオを発現するiPSC由来NK細胞(MICA/B-CARネオiNK)およびMICA/Bを発現する腫瘍細胞株細胞(標的細胞)を含む共培養システムを使用する。結果として生じるMICA/B-CARネオiNKの活性化および機能の増強も、この共培養システムを使用して試験される。MICA/B陽性腫瘍とMICA/B-CARネオiNKの共培養は、ELISAを使用して培養上清に放出された可溶性MICA/Bのレベルについて調べられる。未改変NK細胞との共培養と比較して、標的細胞をMICA/B-CARネオiNKと共培養すると、培養上清に放出される可溶性MICA/Bの低減は、腫瘍細胞表面MICA/B安定化の発見を裏付ける。この試験の陽性対照は、標的細胞とmAb7C6の共培養を使用する。

【0304】

同じ共培養条件下で、MICA/B-CARネオiNK細胞の活性化は、サイトカインIFN γ およびTNF α の産生、表面CD107aの評価による脱顆粒、およびカスパーゼベースのフローアッセイを使用した標的細胞株の直接殺滅によって調べられる。MICA/B陰性と共培養した場合の活性の観察された違いはないことと比較して、サイトカインおよび脱顆粒のレベルの増加、およびMICA/B陽性標的細胞に応答した未改変NK細胞に対するMICA/B-CARネオiNK細胞による直接殺滅の増加は、MICA/B細胞表面抗原の存在下でMICA/B-CARネオiNK細胞の活性化を示す。

【0305】

MICA/B-CARネオの発現が標的細胞株上のMICA/Bの表面密度を増加させるかどうかを調べるために、MICA/B-CARネオは、標的細胞を殺滅することができない非NK細胞株で発現され、結果として生じる細胞はMICA/B陽性標的と共培養された。共培養後、標的細胞上のMICA/Bのレベルをフローサイトメトリーで評価する。非改変NK細胞との共培養と比較して、MICA/B-CARネオを発現する非NK細胞との共培養後の標的細胞におけるMICA/Bのレベルの増加は、提供されたMICA/B-CARネオの標的細胞株におけるMICA/Bの表面密度に対する肯定的な影響を示す。

【0306】

表面MICA/Bのレベルの増加に応じたNK細胞活性に関連する遺伝子発現のレベルの増加は、MICA/B陽性標的細胞とMICA/B-CARネオiNKとのインビトロ共培養、またはインビボ実験、スフェロイド、オルガノイド、または3D共培養実験に由来する組織サンプルのいずれかに由来する、サンプルNK細胞の一細胞RNA配列決定によって試験される。当該共培養または組織に由来するサンプルにおける、パーフォリン、グランザイムAおよびBの上昇制御、ならびにCD62Lなどの未成熟マーカーの下方制御は、細胞のMICA/B-CARネオ発現に関連するNK細胞活性の増加を示す。

【0307】

MICA/B-CARネオのインビボ機能は、腫瘍細胞標的としてヒトMICAを発現するマウス黒色腫細胞を使用して、または内因性MICA/Bを発現するヒト細胞株を使用して評価される。インビボ評価では、マウスまたはヒトのT細胞にMICA/B-CARネオを形質導入し、MICA/B-CARネオiPSC由来NK細胞(MICA/B-CARネオiNK)に加えてエフェクターとして使用する。

【0308】

MICA/B-CARネオの有効性は、マウス黒色腫モデルで評価される。マウスメラノーマ細胞株B16F10にヒトMICA (B16F10-MICA) を形質導入し、これらの細胞を免疫コンピテントなC57BL/6または免疫無防備状態のNSGマウスに静脈内 (IV) または皮下 (SC) で移植する。B16F10-MICA腫瘍細胞の静脈内注射は、C57BL/6で肺転移を引き起こし、NSGマウスで肺と肝臓の転移を引き起こし、皮下移植は両方のマウス系統で単一の固形腫瘍を引き起こす。C57BL/6マウスでは、B16F10-MICA細胞のIV移植後に肺腫瘍結節 (転移) が計数される。腫瘍移植後のMICA/B-CARネオ-T細胞の養子移入は、これらの動物で発生する腫瘍結節の数を低減するこれらの細胞の能力を評価するために実行される。腫瘍結節は、組織切片の顕肉眼的形態および微鏡検査によってさらに評価される。皮下B16-F10-MICAモデルでは、腫瘍の進行は腫瘍サイズのキャリパー測定によってモニターされる。模擬形質導入T細胞によるマウス治療と比較した肺の腫瘍結節数および/またはサイズの低減は、マウスMICA/B-CARネオ-T細胞を使用してB16F10-MICA細胞をIV移植したC57BL/6マウスの治療の存在する腫瘍結節の数を低減する有効性を反映する。同様に、B16-F10-MICA腫瘍増殖のSCモデルでは、腫瘍の進行を遅らせ、生存を延長し、腫瘍の退縮を誘発するか、または上記の組み合わせも、MICA/B-CARネオ-T細胞治療の有効性を示す。

10

【0309】

NSGマウスでは、肺腫瘍結節と肝臓腫瘍結節の両方がカウントされ、模擬形質導入T細胞で治療されたマウスは、各臓器の結節数を低減する能力についてMICA/Bネオ-CAR形質導入T細胞と比較される。マウスとヒトの両方のMICA/B-CARネオT細胞を、NSGマウスにおいて腫瘍増殖を制御する能力について評価する。ヒトまたはマウスのいずれかの供給源からのMICA/B-CARネオ-T細胞をIV移植したNSGマウスの肺および肝臓における腫瘍結節の数およびサイズの低減は、治療の有効性を反映し、マウスの生存期間の延長と相関する。同様の試験が、MICA/B-CARネオiNK細胞を用いたB16-F10-MICA担がんNSGマウスを使用して実施される。

20

【0310】

ヒト腫瘍細胞株に対するMICA/B-CARネオの機能も評価される。A2058、U266、およびA375を含むMICAおよび/またはMICBを発現するヒト細胞株を、免疫無防備状態のNSGマウスに移植する。ヒトMICA/B-CARネオ-T細胞またはMICA/B-CARネオiNK細胞のいずれかを使用して、これらの腫瘍タイプのいずれかを担持するNSGマウスの治療において、腫瘍進行の遅延、腫瘍退縮の誘発、および生存期間の延長を評価する。

30

【0311】

機能的なCARネオ候補は、例示として本明細書に記載されているもの以外の他の任意の抗原特異性を使用して確認することができる。図4A及び図4Bに示されるとおり、多発性骨髄腫抗原に対する結合ドメインを含む、示される各CAR構築物に対する抗原特異的細胞障害アッセイを行い、各CARを含むCAR-iNK細胞の機能的な能力を調査した。Rd2D7において、Thy1.1-富化iNK細胞を、標識化腫瘍抗原発現MM.1S標的細胞と、示したE:T比(.5:1から8:1)で4時間インキュベートした。4時間のインキュベーションの最後に、カスパーゼ3/7活性をサイトフローメトリーにより検出した。これは標的細胞の特異的殺滅を示す。細胞障害性曲線は、全ての試験したCARにおいて、E:T比 (図4A) が高くなるほどMM.1S標的細胞の増大した殺滅を示している。1/EC50値をプロットした (図4B)。この値が高いほど、MM.1S標的細胞を効率的に殺滅する構築物であることを示しており、全ての示したCAR構築物は、抗原特異的標的殺滅力を有していた。これらのデータにより、開示したCAR構築物が機能的CARシグナル伝達及び標的細胞の特異的殺滅をもたらすことが確認された。残るCARもまた、抗原特異的腫瘍細胞殺滅及び1/EC50値を調べるために同じアッセイを行った。

40

【0312】

50

加えて、テロメアの短縮は細胞の老化とともに起こり、幹細胞の機能不全および細胞老化に関連している。ここでは、成熟 i N K 細胞が、成体末梢血 N K 細胞と比較してより長いテロメアを維持することが示される。テロメアの長さは、1301 T 細胞白血病株を対照（100%）として使用し、G₀/1 細胞の DNA インデックスを補正して、フローサイトメトリーにより、i P S C、成体末梢血 N K 細胞、および i P S C 由来 N K 細胞について決定された。図 5 に示すように、i P S C 由来 N K 細胞は、成体末梢血 N K 細胞と比較して有意に長いテロメア長を維持し（ $p = 0.105$ 、ANOVA）、i P S C 由来 N K 細胞における増殖、生存、および持続の可能性が高いことを示す。

【0313】

当業者は、本明細書に記載の方法、組成物、および産生物が例示的な実施形態の代表であり、本発明の範囲に対する限定として意図されていないことを容易に理解するであろう。本発明の範囲および趣旨から逸脱することなく、本明細書に開示される本開示に対して様々な置換および修正を行うことができることは当業者には容易に明らかであろう。

【0314】

本明細書で言及されるすべての特許および刊行物は、本開示が属する当業者のレベルを示している。すべての特許および刊行物は、個々の刊行物が参照により組み込まれるものとして具体的かつ個別に示された場合と同じ程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【0315】

本明細書に例示的に記載されている本開示は、本明細書に具体的に開示されていない任意の要素、制限がなくても実施することができる。したがって、例えば、本明細書の各場合において、「含む」、「本質的にからなる」、および「からなる」という用語のいずれかを、他の2つの用語のいずれかで置き換えることができる。使用されている用語および表現は、説明の用語として使用され、限定ではなく、そのような用語および表現の使用において、示され説明された特色またはその一部の同等物を除外する意図はないが、特許請求される本開示の範囲内で様々な修正が可能であると認識される。したがって、本開示は、好ましい実施形態および任意選択の特色によって具体的に開示されているが、本明細書に開示される概念の修正および変形は、当業者によって想到され得、そのような修正および変形は、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲内であると考えられると理解されるべきである。

10

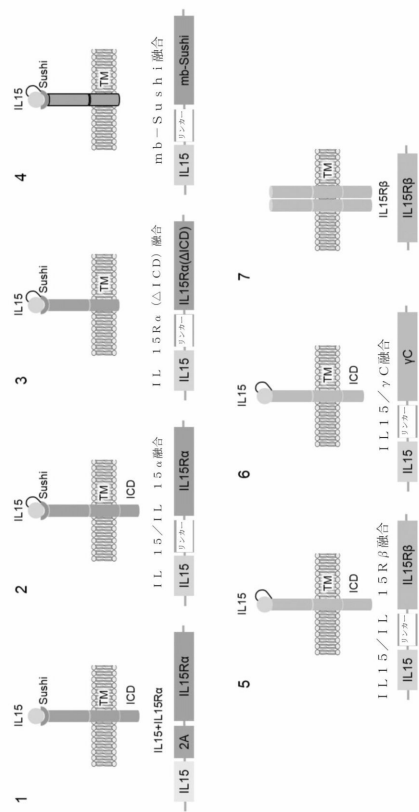
20

30

40

50

【図面】
【図 1】



【図 2 A】

1	scFv	リンカー	CD28 TM+ICD	1X	CD3z
2	scFv	リンカー	CD28 TM+ICD	CD3z	CD3z
3	scFv	リンカー	IKG2D TM	2B4	CD3z
4	scFv	リンカー	IKG2D TM	2B4	CD3z
5	scFv	リンカー	CD3 TM	4-1BB	CD3z
6	scFv	リンカー	CD3 TM	4-1BB	1X
7	scFv	リンカー	CD28 TM+ICD	2B4	CD3z
8	scFv	リンカー	CD28 TM+ICD	CD3z	CD3z
9	scFv	リンカー	DNAM-1 TM+ICD	CD3z	CD3z
10	scFv	リンカー	DAP10 EC+TM+ICD	CD3z	CD3z

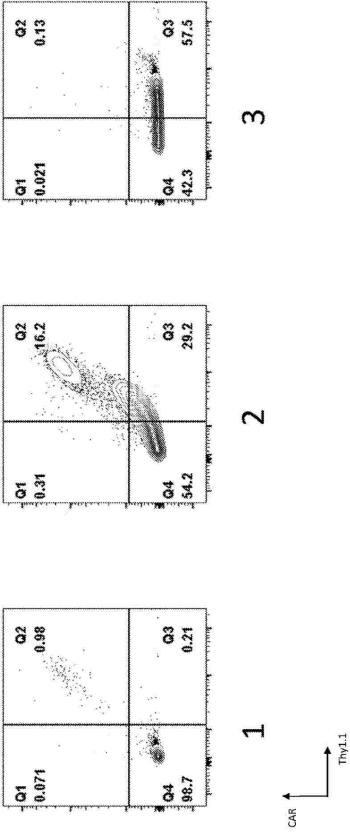
【図 2 B】

11	scFv	リンカー	KR2DS2 TM+ICD	CD3z	CD3z
12	scFv	リンカー	KR2DS2 TM+ICD	DAP10	CD3z
13	scFv	リンカー	KR2DS2 TM+ICD	2B4	CD3z
14	scFv	リンカー	CD16 TM+ICD	2B4	CD3z
15	scFv	リンカー	CD16 TM+ICD	DNAM-1	CD3z
16	scFv	リンカー	IKG2D TM+ICD	2B4	CD3z
17	scFv	リンカー	IKG2D TM+ICD	2B4	CD3z
18	scFv	リンカー	IKG2D TM+ICD	CD3z	CD3z
19	scFv	リンカー	CD2 TM+ICD	CD3z	CD3z
20	scFv	リンカー	2B4 TM+ICD	CD3z	CD3z

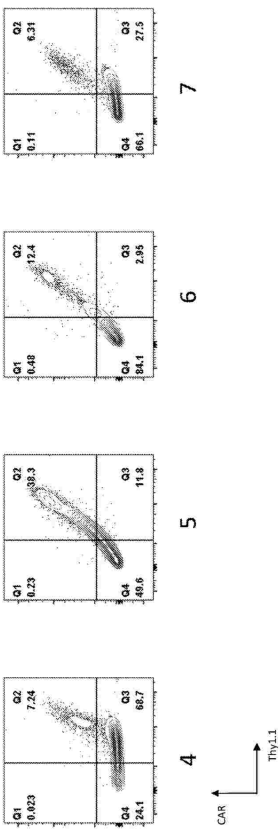
【図 2 C】

21	scFv	リンカー	2B4 TM+ICD	FEERtg	CD3z
22	scFv	リンカー	CS1 TM+ICD	CD3z	CD3z
23	scFv	リンカー	IKG2D TM	CS1	CD3z
24	scFv	リンカー	IKG2D TM	2B4	CD3z
25	scFv	リンカー	IKG2D TM	2B4	CD3z
26	scFv	リンカー	CD28 TM+ICD	2B4	CD3z
27	scFv	リンカー	CD28 TM+ICD	2B4	CD3z
28	scFv	リンカー	DNAM-1 TM+ICD	CS1	CD3z
29	scFv	リンカー	KR2DS2 TM+ICD	DAP10	CD3z

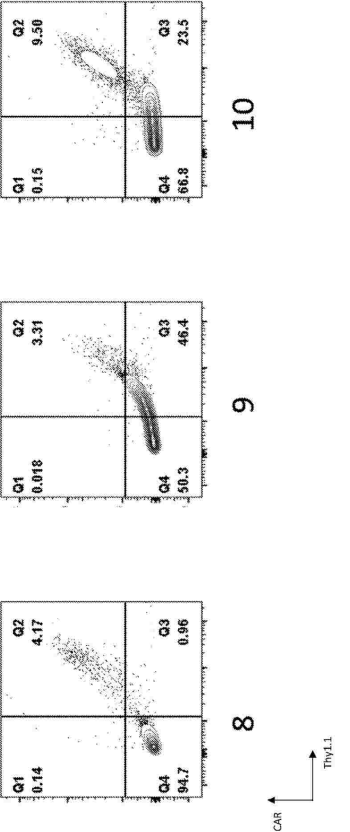
【図 3 A】



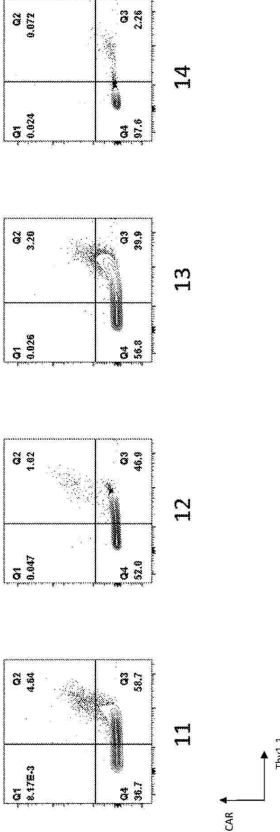
【図 3 B】



【図 3 C】



【図 3 D】



10

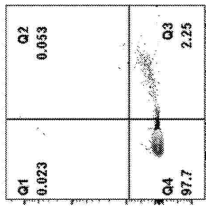
20

30

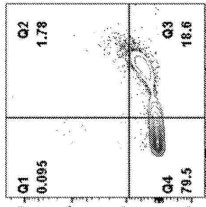
40

50

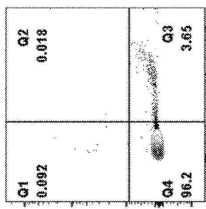
【図 3 E】



17



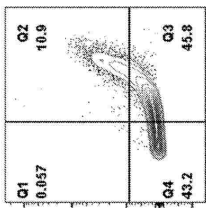
16



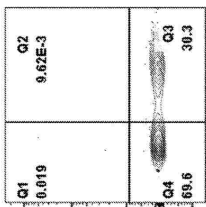
15



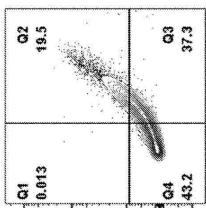
【図 3 G】



24



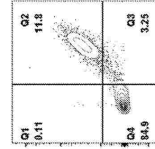
23



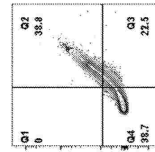
22



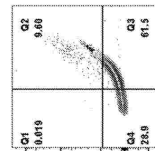
【図 3 F】



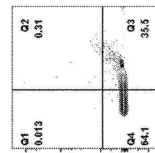
21



20



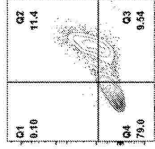
19



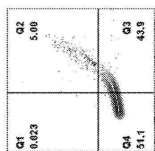
18



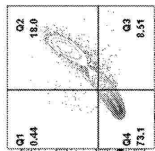
【図 3 H】



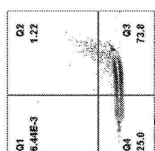
28



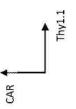
27



26



25



10

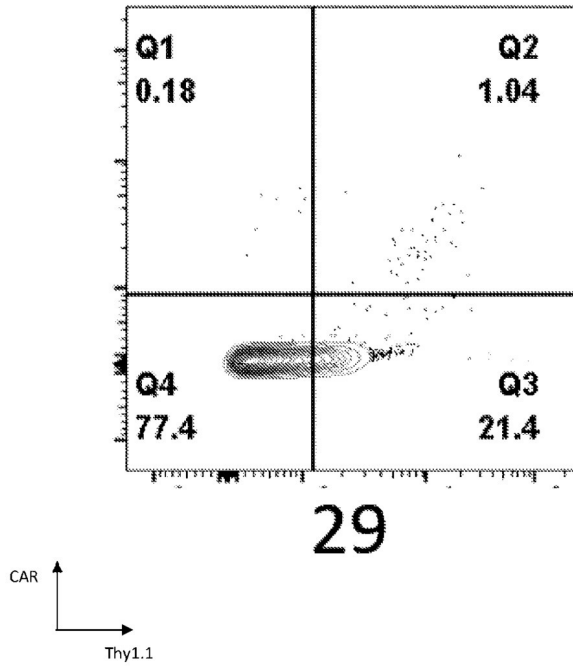
20

30

40

50

【図 3 I】



【図 4】

図 4 A

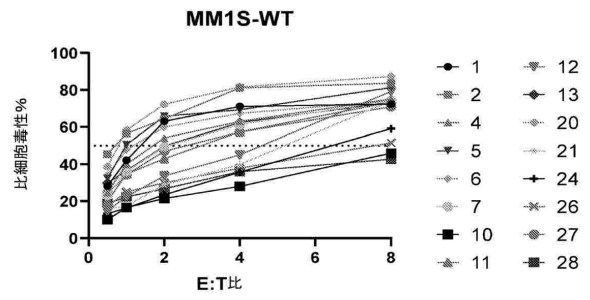
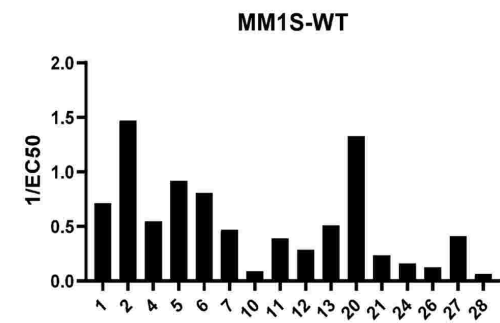
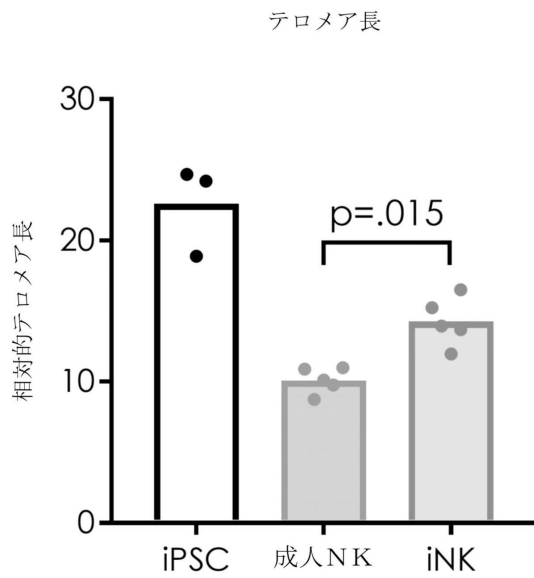


図 4 B



【図 5】



【配列表】

0007664913000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

F I

C 1 2 N 15/62

Z Z N A

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

ニア州, サン ディエゴ, スイート 200, ジェネラル アトミクス コート 3535

(72)発明者 リー, トム, トング

アメリカ合衆国 92121 カリフォルニア州, サン ディエゴ, スイート 200, ジェネラル
アトミクス コート 3535

(72)発明者 グッドリッジ, ジョーデ

アメリカ合衆国 92121 カリフォルニア州, サン ディエゴ, スイート 200, ジェネラル
アトミクス コート 3535

審査官 長谷川 強

(56)参考文献 国際公開第2019/191495 (WO, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 14/705

A 6 1 K 40/31

C 0 7 K 19/00

C 1 2 N 5/078

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 15/62

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)