(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7706523号
(P7706523)

(45)発行日　令和7年7月11日(2025.7.11)

(24)登録日　令和7年7月3日(2025.7.3)

(51)国際特許分類

Ａ６１Ｋ　40/15　(2025.01)	Ａ６１Ｋ	40/15	
Ａ６１Ｋ　35/17　(2025.01)	Ａ６１Ｋ	35/17	
Ａ６１Ｋ　39/395 (2006.01)	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｄ
Ａ６１Ｋ　40/20　(2025.01)	Ａ６１Ｋ	40/20	
Ａ６１Ｋ　40/31　(2025.01)	Ａ６１Ｋ	40/31	

ＦＩ

請求項の数　18　外国語出願　（全41頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-193959(P2023-193959)
(22)出願日　令和5年11月14日(2023.11.14)
(62)分割の表示　特願2019-570024(P2019-570024)の分割
原出願日　平成30年6月20日(2018.6.20)
(65)公開番号　特開2024-23299(P2024-23299A)
(43)公開日　令和6年2月21日(2024.2.21)
審査請求日　令和5年12月11日(2023.12.11)
(31)優先権主張番号　17305757.1
(32)優先日　平成29年6月20日(2017.6.20)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)

(73)特許権者　506413937
アンスティテュート キュリー
フランス共和国，７５００５ パリ，リュ ダルム ２６
(73)特許権者　511074305
インセルム（インスティチュート ナショナル デ ラ サンテ エ デ ラ リシェルシェ メディカル）
フランス国，エフ－７５０１３ パリ，ルデ トルビアック，１０１
(73)特許権者　506316557
サントル ナショナル ドゥ ラ ルシェルシュ シアンティフィック
フランス国 ７５７９４ パリ セデックス １６、リュ ミシェル－アンジュ、３

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＳＵＶ３９Ｈ１を欠損する免疫細胞

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

がんの養子細胞療法で使用するための組成物であって、操作された免疫細胞を含み、前記免疫細胞は、Ｓｕｖ３９ｈ１を欠損するように操作されたＮＫ細胞又はＮＫ細胞前駆細胞である、組成物。

【請求項２】

前記免疫細胞が、標的抗原に特異的に結合する遺伝子操作された抗原受容体をさらに含む、請求項１に記載の組成物。

【請求項３】

前記標的抗原ががん細胞で発現され、及び／又は普遍的腫瘍抗原である、請求項２に記載の組成物。

【請求項４】

前記遺伝子操作された抗原受容体が、細胞外部分に１つ又は複数の抗原結合分子を含む、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）又はキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）である、請求項２又は３に記載の組成物。

【請求項５】

前記免疫細胞が、少なくとも２つの遺伝子操作された受容体を含み、それぞれの受容体が異なる抗原を認識する、請求項２～４のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項６】

前記免疫細胞が自己由来である、請求項１～５のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項７】
前記免疫細胞が同種異系である、請求項１～５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８】
前記操作された免疫細胞におけるＳｕｖ３９ｈ１の活性及び／又は発現が選択的に阻害又は遮断される、請求項１～７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９】
前記組成物が、免疫チェックポイント分子と組み合わせて投与される、請求項１～８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１０】
前記免疫チェックポイント分子が、ＰＤ－１阻害剤及びＰＤＬ－１阻害剤から選択される、請求項９に記載の組成物。
【請求項１１】
操作された免疫細胞であって、前記免疫細胞は、Ｓｕｖ３９ｈ１を欠損するように操作されたＮＫ細胞又はＮＫ細胞前駆細胞であり、かつ、標的抗原に特異的に結合する遺伝子操作された抗原受容体をさらに含む、操作された免疫細胞。
【請求項１２】
前記標的抗原ががん細胞で発現され、及び／又は普遍的腫瘍抗原である、請求項１１に記載の操作された免疫細胞。
【請求項１３】
前記遺伝子操作された抗原受容体が、細胞外部分に１つ又は複数の抗原結合分子を含む、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）又はキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）である、請求項１１又は１２に記載の操作された免疫細胞。
【請求項１４】
前記免疫細胞が、少なくとも２つの遺伝子操作された受容体を含み、それぞれの受容体が異なる抗原を認識する、請求項１１～１３のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞。
【請求項１５】
前記免疫細胞が自己由来である、請求項１１～１４のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞。
【請求項１６】
前記免疫細胞が同種異系である、請求項１１～１４のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞。
【請求項１７】
前記操作された免疫細胞におけるＳｕｖ３９ｈ１の活性及び／又は発現が選択的に阻害又は遮断される、請求項１１～１６のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞。
【請求項１８】
前記免疫細胞におけるＳｕｖ３９ｈ１の発現及び／又は活性を阻害するステップ、及び、標的抗原に特異的に結合する遺伝子操作された抗原受容体を前記免疫細胞に導入するステップを含む、請求項１１～１７のいずれか一項に記載の遺伝子操作された免疫細胞を産生する方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、養子療法の分野に関する。本発明は、養子移入後の生存、再構成の可能性、及びセントラルメモリー表現型が増強されたＳｕｖ３９ｈ１を欠損する免疫細胞を提供する。
【背景技術】
【０００２】
組換えＴ細胞受容体（ＴＣＲ）及びキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）技術を伴ったＴ細胞を使用する養子Ｔ細胞療法（ＡＴＣＴ）は、いくつかの悪性腫瘍に対する初期臨床試験での活性が非常に有望であることを多くの研究機関が示している（Ｋｅｒｓｈａｗ　ＭＨ、Ｗ

ｅｓｔｗｏｏｄ ＪＡ、Ｄａｒｃｙ ＰＫ．Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｃａｎｃｅｒ．２０１３；１３：５２５～５４１）。

【０００３】

新たに話題になりつつあるテーマは、治療用Ｔ細胞の効果的な移植と長期持続性がプラスの治療効果と相関することである。いくつかの前臨床試験から、ナイーブＴ細胞及び初期分化Ｔ細胞は、増大した長期持続能力を保有すること（Ｂｅｒｇｅｒ Ｃら、Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ．２００８；１１８：２９４～３０５；Ｈｉｎｒｉｃｈｓ ＣＳら、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ２００９；１０６：１７４６９～１７４７４；Ｔａｎｅｌ Ａら、Ｅｘｐｅｒｔ Ｒｅｖ Ｖａｃｃｉｎｅｓ．２００９；８（３）：２９９～３１２）と、強力な抗腫瘍応答を誘発することができること（Ｇａｔｔｉｎｏｎｉ Ｌら、Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔｉｇ．２００５；１１５：１６１６～１６２６；Ｌｕｇｌｉ Ｅら、Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ．２０１３；１２３：５９４～５９９）が明らかになっている。さらに、養子移入された細胞の持続性の増加は、セントラルメモリーＴ細胞（ＴＣＭ）集団の獲得に依存しているようである（Ｐｏｗｅｌｌ ＤＪら、Ｂｌｏｏｄ．２００５；１０５（１）：２４１～５０；Ｈｕａｎｇ Ｊ， Ｋｈｏｎｇ ＨＴら、Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００５；２８：２５８～２６７）。

【０００４】

安定した遺伝子導入は、特にポリクローナルＴ細胞にＣＡＲ（例えば、Ｇｕｅｓｔ ＲＤら、Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ． ２０１４；６３：１３３～１４５を参照）及びこれらの操作された細胞を有するＴＣＲ（特にＪｏｈｎｓｏｎ ＬＡら、Ｂｌｏｏｄ． ２００９；１１４（３）：５３５～４６を参照）を導入するためのガンマレトロウイルスベクターの使用によって、臨床状況で日常的に達成されているが、明らかに有害な安全上の兆候は、ＣＡＲ Ｔ細胞を移植した患者において、１０年を超える期間、示されていない（Ｓｃｈｏｌｌｅｒ Ｊら、Ｓｃｉ Ｔｒａｎｓｌ Ｍｅｄ．２０１２；４：１３２ｒａ１５３）。

【０００５】

レトロウイルスベクター又はレンチウイルスで効果的に形質導入するためには、初代Ｔ細胞は活発に増殖している必要があり（Ｓｔａｃｃｈｉｎｉ Ａら、Ｌｅｕｋ Ｒｅｓ．１９９９；２３：１２７～１３６）、これは一般的には、休止初代Ｔ細胞をマイトジェン刺激することによって達成される。

【０００６】

しかし、活性化の際、Ｔ細胞はエフェクター（ＴＥ）表現型に向けて不可逆的な直線的様式で進行する（Ｍａｈｎｋｅ ＹＤら、Ｅｕｒ Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１３；４３：２７９７～２８０９；Ｆａｒｂｅｒ ＤＬ．Ｓｅｍｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００９；２１：８４～９１）。従って、レトロウイルス又はレンチウイルス形質導入のためのマイトジェン活性化は、Ｔ細胞の分化をナイーブからＴＥ表現型に向けて駆動する。形質導入されたＴ細胞数を臨床での適用に必要とされる数（約10^{9}～10^{11}）まで拡大するｅｘ－ｖｉｖｏ培養プロトコルと組み合わせた場合、Ｔ細胞はより分化した表現型に向けて駆動されるが、これは全身持続性（ｓｙｓｔｅｍｉｃ ｐｅｒｓｉｓｔｅｎｃｅ）にとっては最適とはいえない。

【０００７】

従って、ＣＡＲ Ｔ細胞ベースの治療法を含む養子Ｔ細胞療法は、特に特定の血液がんの処置における著しい治療上の成功が過去数年で知られてきているが、有効性はわずかな血液がんのタイプ及び少数の固形腫瘍のタイプでしか示されていない。処置の有効性が低いのは、養子移入後のＴ細胞の生存が制限されていることによる可能性があると仮説が立てられた。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】

従って、当技術分野では、養子移入後のセントラルメモリー表現型の増強及び生存の増

強を示す改変又は操作されたＴ細胞が依然として必要とされている。特に、有効性があり広範囲のスケールのがん処置をサポートする、養子療法に使用可能な免疫細胞、特にＴ細胞の提供が依然として必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【０００９】

本発明者らは、驚いたことに、Ｓｕｖ３９ｈ１を欠損するＴ細胞が養子移入後にセントラルメモリー表現型の増強及び生存の増強をもたらすことを発見した。特に、本発明者らは、Ｓｕｖ３９ｈ１を欠損するＴ細胞が蓄積し、ＣＤ４４及びＣＤ６２Ｌの両方を発現する長期生存のセントラルメモリーＴ細胞へと高効率で再プログラムされることを明らかにした。従って、本発明は、Ｓｕｖ３９ｈ１が不活性化されている、改変又は操作された免疫細胞、特に改変されたＴ細胞に関する。

【００１０】

従って、前記の改変又は操作された免疫細胞は、養子療法における使用にとって非常に興味がもたれる。従って、本発明は、より詳しくは、標的抗原に特異的に結合する遺伝子操作された抗原受容体を好ましくはさらに含む、Ｓｕｖ３９ｈ１を欠損する操作又は改変された免疫細胞に関する。

【００１１】

典型的には、請求項１に記載の操作された免疫細胞はＴ細胞又はＮＫ細胞であり、特にＣＤ４＋又はＣＤ８＋Ｔ細胞である。好ましい細胞は、T_N細胞、TSC_M、TC_M又はTE_M細胞及びそれらの組合せから選択され得る。

【００１２】

また典型的には、操作された免疫細胞は対象から単離される。前記対象は、がんに罹患しているか、又はがんに罹患するリスクがあることが好ましい。

【００１３】

遺伝子操作された抗原受容体が特異的に結合する標的抗原は、好ましくはがん細胞で発現され、及び／又は普遍的腫瘍抗原である。

【００１４】

遺伝子操作された抗原受容体は、標的抗原に特異的に結合する細胞外抗原認識ドメインを含むキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）であり得る。遺伝子操作された抗原受容体はまた、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）であり得る。

【００１５】

前記の操作された免疫細胞におけるＳｕｖ３９ｈ１の活性及び／又は発現は、選択的に阻害又は遮断されることが好ましい。一実施形態において、前記の操作された免疫細胞は、非機能性Ｓｕｖ３９ｈ１タンパク質をコードするＳｕｖ３９ｈ１核酸を発現する。

【００１６】

本発明はまた、免疫細胞におけるＳｕｖ３９ｈ１の発現及び／又は活性を阻害することからなるステップを含み；任意選択で、標的細胞に特異的に結合する遺伝子操作された抗原受容体を免疫細胞に導入することからなるステップを含む、遺伝子操作された免疫細胞を産生する方法に関する。

【００１７】

Ｓｕｖ３９ｈ１活性及び／又は発現の阻害は、Ｓｕｖ３９ｈ１の発現及び／又は活性を阻害する、並びに／或いはＳｕｖ３９ｈ１遺伝子を破壊する少なくとも１種の薬剤と細胞を接触すること、又は接触させることを含むことが好ましい。前記薬剤は、小分子阻害剤；抗体誘導体、アプタマー、転写若しくは翻訳を遮断する核酸分子、又は遺伝子編集剤から選択することができる。

【００１８】

本発明はまた、養子細胞療法、特にがんの養子療法において使用するための、本明細書に記載の操作された免疫細胞、又は前記操作された免疫細胞を含む組成物に関する。

【図面の簡単な説明】

【００１９】

【図１】セントラルメモリーＣＤ８＋Ｔ細胞の数は、Ｓｕｖ３９ｈ１欠損マウスにおいて増加される。Ａ．ゲートをかけた脾臓ＣＤ８＋Ｔ細胞の代表的なＦＡＣＳドットプロット。Ｂ．セントラルメモリーＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージを異なる造血区画で測定した（黒丸はＳｕｖ３９ｈ１　ＫＯ；白丸：ＷＴ同腹仔）。
【図２】内因性抗原特異的Ｓｕｖ３９ｈ１　ＫＯ　ＣＤ８＋Ｔ細胞における幹細胞性及びメモリーの特性。Ｓｕｖ３９ｈ１欠損Ｋｂ－ＯＶＡ＋ＣＤ８＋Ｔ細胞は、幹細胞様及びメモリー遺伝子の発現特性を有する。遺伝子セット濃縮解析（ＧＳＥＡ）を示す。
【図３】Ｓｕｖ３９ｈ１欠損ＣＤ８Ｔ細胞の生存及び自己再生の増加。Ａ．ＷＴ及びＳｕｖ３９ｈ１　ＫＯ　ＬＭ－ＯＶＡ感染マウスから単離したコンジェニックＣＤ４５．２　Ｋｂ－ＯＶＡペンタマー＋ＣＤ８＋Ｔ細胞の、ナイーブレシピエントＣＤ４５．１マウスへの移入を示す実験のセットアップ（１：ＣＤ８＋Ｔサブセットのソート及び移入（Ｄ０）；２：自己再生及び分化の解析（Ｄ４０～４４））。養子移入の４０日後に、ナイーブレシピエントマウスにＬＭ－ＯＶＡでチャレンジし、４日後にＫｂ－ＯＶＡペンタマー＋ＣＤ８＋Ｔ細胞をＦＡＣＳによって解析した。Ｂ．ドナーＣＤ８＋Ｔ細胞及びレシピエントＣＤ８＋Ｔ細胞の代表的なＦＡＣＳプロットを示す。Ｃ．回収したＣＤ８＋Ｔ細胞の総数を測定した。結果は、２つの独立した実験の結合データである。
【図４】Ｓｕｖ３９ｈ１欠損ＣＤ８＋ＯＴ－１細胞は腫瘍成長を制御する。（Ａ）処理したＩＬ－２／ＯＶＡ　Ｓｕｖ３９ｈ１－ＫＯ　ＣＤ４５．２　ＯＴ－１及び同腹子ＷＴ細胞を、接種の７日後に腫瘍担持レシピエントマウスに静脈注射し、抗ＰＤ－１抗体（ＢｉｏＸ　Ｃｅｌｌ、ＲＭＰ－１４）を腹腔内注射した。腫瘍担持レシピエントマウスに養子移入された、処理したＩＬ－２／ＯＶＡ同腹仔ＷＴ（Ｂ）及びＳｕｖ３９ｈ１－ＫＯ　ＯＴ－１細胞（Ｃ）の腫瘍成長曲線。
【発明を実施するための形態】
【００２０】
定義
本明細書における用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、インタクトな抗体、並びに、抗原結合性断片（Ｆａｂ）断片、Ｆ（ａｂ’）２断片、Ｆａｂ’断片、Ｆｖ断片、組換えＩｇＧ（ｒＩｇＧ）断片を含む機能性（抗原結合性）抗体断片、抗原に特異的に結合可能な可変重鎖（ＶＨ）領域、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）を含む単鎖抗体断片、及び単一ドメイン抗体（例えば、ｓｄＡｂ、ｓｄＦｖ、ナノボディ）断片を含む、ポリクローナル及びモノクローナル抗体を含む。この用語は、遺伝子操作及び／又は他の改変された形態の免疫グロブリン、例えば、イントラボディ、ペプチボディ、キメラ抗体、完全ヒト抗体、ヒト化抗体、及びヘテロコンジュゲート抗体、多重特異性、例えば二重特異性の抗体、ダイアボディ、トリアボディ、及びテトラボディ、タンデムｄｉ－ｓｃＦｖ、タンデムｔｒｉ－ｓｃＦｖを包含する。特に指示のない限り、用語「抗体」とは、その機能性抗体断片を包含すると理解されたい。この用語はまた、ＩｇＧ及びそのサブクラス、ＩｇＭ、ＩｇＥ、ＩｇＡ、及びＩｇＤを含む、任意のクラス又はサブクラスの抗体を含む、インタクトな抗体又は全長の抗体を包含する。
【００２１】
「抗体断片」とは、インタクトな抗体が結合する抗原に結合するインタクトな抗体の部分を含む、インタクトな抗体以外の分子を意味する。抗体断片の例としては、限定するものではないが、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ’－ＳＨ、Ｆ（ａｂ’）２；ダイアボディ；直鎖抗体；可変重鎖（ＶＨ）領域、単鎖抗体分子、例えば、ｓｃＦｖ及び単一ドメインＶＨ単一抗体；並びに抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられる。特定の実施態様では、抗体は、可変重鎖領域及び／又は可変軽鎖領域を含む単鎖抗体断片、例えば、ｓｃＦｖである。
【００２２】
「単一ドメイン抗体」は、抗体の重鎖可変ドメインのすべて若しくは一部、又は軽鎖可変ドメインのすべて若しくは一部を含む抗体断片である。特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、ヒト単一ドメイン抗体である。

【００２３】
本明細書で使用される場合、遺伝子発現の「抑制」とは、細胞内の対象遺伝子によってコードされている１つ又は複数の遺伝子産物の発現が、抑制の非存在下での遺伝子産物の発現レベルと比べて、消失又は低減することを意味する。例示的な遺伝子産物としては、その遺伝子によってコードされているｍＲＮＡ及びタンパク質産物が挙げられる。抑制は、一部の場合では一過性又は可逆的であり、他の場合では恒久的である。抑制は、切断型又は非機能性の産物が生成され得るという事実にもかかわらず、一部の場合では、機能性の若しくは全長のタンパク質又はｍＲＮＡの抑制である。本明細書における一部の実施形態では、発現に対立するものとして、遺伝子の活性又は機能が抑制される。遺伝子抑制は、一般的には、人為的方法によって、即ち、化合物、分子、複合体、若しくは組成物の添加若しくは導入によって、及び／又は遺伝子の核酸若しくは遺伝子に関連する核酸の、例えばＤＮＡレベルでの破壊によって誘導される。遺伝子抑制に関する例示的な方法としては、遺伝子サイレンシング、ノックダウン、ノックアウト、及び／又は遺伝子破壊技術、例えば遺伝子編集が挙げられる。例としては、一般的に発現の一時的低減をもたらすアンチセンス技術、例えば、ＲＮＡｉ、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、及び／又はリボザイム、並びに、標的化遺伝子の不活化又は破壊を、例えば切断及び／又は相同組換えを誘導することによりもたらす遺伝子編集技術が挙げられる。

【００２４】
本明細書で使用される場合、遺伝子の「破壊」とは、ＤＮＡレベルでの遺伝子配列の変化を意味する。例としては、挿入、変異、及び欠失が挙げられる。破壊は、典型的には、遺伝子によってコードされている正常産物又は「野生型」産物の発現の抑制及び／又は消失をもたらす。そのような遺伝子破壊の例は、遺伝子全体の欠失を含む、遺伝子又は遺伝子の一部の挿入、フレームシフト変異及びミスセンス変異、欠失、ノックイン、並びにノックアウトである。そのような破壊は、コード領域において、例えば、１つ又は複数のエクソンにおいて生じ、その結果、例えば、停止コドンの挿入により、全長産物、機能性産物、又は任意の産物が産生できなくなる。そのような破壊はまた、遺伝子の転写を阻止するように、プロモーター又はエンハンサー又は転写の活性化に影響する他の領域の破壊により生じ得る。遺伝子破壊は、相同組換えによる標的遺伝子不活化を含む遺伝子ターゲティングを含む。

【００２５】
本発明の細胞
本発明による細胞は、典型的には、哺乳動物細胞（本発明では動物細胞ともいう）などの真核細胞、例えばヒト細胞である。

【００２６】
より詳しくは、本発明の細胞は、血液、骨髄、リンパ、又はリンパ器官（特に胸腺）に由来し、免疫系の細胞（即ち、免疫細胞）、例えば自然免疫又は適応免疫の細胞、即ち、リンパ球、典型的にはＴ細胞及び／又はＮＫ細胞を含む、骨髄細胞又はリンパ系細胞である。

【００２７】
本発明によれば、細胞は、特に、Ｔ細胞、Ｂ細胞及びＮＫ細胞を含むリンパ球であることが好ましい。

【００２８】
本発明による細胞は、免疫細胞前駆細胞、例えば、リンパ球前駆細胞、より好ましくはＴ細胞前駆細胞であってもよい。

【００２９】
Ｔ細胞前駆細胞は、典型的には、ＣＤ４４、ＣＤ１１７、ＣＤ１３５、及びＳｃａ－１を含むコンセンサスマーカーのセットを発現するが、さらにＰｅｔｒｉｅ ＨＴ、Ｋｉｎｃａｄｅ ＰＷ．Ｍａｎｙ ｒｏａｄｓ、ｏｎｅ ｄｅｓｔｉｎａｔｉｏｎ ｆｏｒ Ｔ ｃｅｌｌ ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒｓ．Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ．２００５；２０２（１）：１１～１３も参照されたい。

【００３０】
細胞は、典型的には、初代細胞、例えば、対象から直接単離された細胞、及び／又は対象から単離され凍結された細胞である。
【００３１】
処置しようとする対象に関して、本発明の細胞は、同種異系及び／又は自己由来であり得る。
【００３２】
一部の実施形態では、細胞は、Ｔ細胞又は他の細胞タイプの１つ又は複数のサブセット、例えば、全Ｔ細胞集団、ＣＤ４＋細胞、ＣＤ８＋細胞、及びその部分母集団、例えば、機能、活性化状態、成熟度、分化可能性、増大化、再循環、局在化、及び／又は持続能力、抗原特異性、抗原受容体のタイプ、特定の臓器若しくは区画における存在、マーカー若しくはサイトカイン分泌プロファイル、及び／又は分化の程度によって規定されるものを含む。
【００３３】
Ｔ細胞及び／又はＣＤ４＋Ｔ細胞及び／又はＣＤ８＋Ｔ細胞のサブタイプ及び部分母集団のうち、Ｔ細胞は、ナイーブＴ（T_N）細胞、エフェクターＴ細胞（T_{EFF}）、メモリーＴ細胞及びそのサブタイプ、例えば、幹細胞メモリーＴ（TSC_M）、セントラルメモリーＴ（TC_M）、エフェクターメモリーＴ（T_{EM}）、又は最終分化したエフェクターメモリーＴ細胞、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）、未熟Ｔ細胞、成熟Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、細胞傷害性Ｔ細胞、粘膜関連インバリアントＴ（ＭＡＩＴ）細胞、天然及び適応性の調節性Ｔ（Ｔｒｅｇ）細胞、ヘルパーＴ細胞、例えば、ＴＨ１細胞、ＴＨ２細胞、ＴＨ３細胞、ＴＨ１７細胞、ＴＨ９細胞、ＴＨ２２細胞、濾胞性ヘルパーＴ細胞、アルファ／ベータＴ細胞、並びにデルタ／ガンマＴ細胞である。本発明による細胞は、Ｓｕｖ３９ｈ１の阻害により幹／メモリー特性及びより高い再構成能力を有するT_{EFF}細胞、及びT_N細胞、TSC_M、TC_M、T_{EM}細胞、並びにそれらの組合せであることが好ましい。
【００３４】
一部の実施形態では、Ｔ細胞集団の１つ又は複数は、１つ又は複数の特定のマーカー、例えば表面マーカーが陽性であるか又はそれらを高レベルで発現する細胞、或いは１つ又は複数のマーカーが陰性であるか又はそれらを比較的低レベルで発現する細胞が濃縮又は枯渇されている。一部の場合では、このようなマーカーは、ある特定のＴ細胞の集団（例えば非メモリー細胞）では存在しないか又は比較的低レベルで発現しているが、ある特定の他のＴ細胞集団（例えばメモリー細胞）では存在するか又は比較的高いレベルで発現しているものである。一実施形態では、細胞（例えば、$CD8^+$細胞又はＴ細胞、例えば、$CD3^+$細胞）は、ＣＤ１１７、ＣＤ１３５、ＣＤ４５ＲＯ、ＣＣＲ７、ＣＤ２８、ＣＤ２７、ＣＤ４４、ＣＤ１２７及び／又はＣＤ６２Ｌが陽性であるか又はそれらを高表面レベルで発現する細胞が濃縮（即ち、正に選択）されている、並びに／或いはＣＤ４５ＲＡが陽性であるか又はそれらを高表面レベルのＣＤ４５ＲＡで発現する細胞が枯渇（例えば、負に選択）されている。一部の実施形態では、細胞は、ＣＤ１２２、ＣＤ９５、ＣＤ２５、ＣＤ２７、及び／又はＩＬ７－Ｒａ（ＣＤ１２７）が陽性であるか又はそれらを高表面レベルで発現する細胞が濃縮されているか又は枯渇されている。いくつかの例では、ＣＤ８＋Ｔ細胞は、ＣＤ４５ＲＯ陽性（又はＣＤ４５ＲＡ陰性）及びＣＤ６２Ｌ陽性の細胞が濃縮されている。
【００３５】
例えば、本発明によれば、細胞は、ＣＤ４＋Ｔ細胞集団及び／又はＣＤ８＋Ｔ細胞部分母集団、例えば、セントラルメモリー（T_{CM}）細胞が濃縮された部分母集団を含み得る。或いは、細胞は、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、ＭＡＩＴ細胞、自然リンパ球系細胞（ＩＬＣ）及びＢ細胞を含む他のタイプのリンパ球であり得る。
【００３６】
細胞及び本発明により操作するための細胞を含有する組成物は、試料、特に生体試料、例えば対象から得たか又は対象に由来する生体試料から単離される。典型的には、対象は

、細胞療法（養子細胞療法）を必要としている、及び／又は細胞療法を受けるものである。対象は、哺乳動物、特にヒトであることが好ましい。本発明の一実施形態では、対象はがんを有する。

【００３７】

試料は、対象から直接採取された組織、液体、及び他の試料、並びに１つ又は複数の処理ステップ、例えば、分離、遠心分離、遺伝子操作（例えば、ウイルスベクターによる形質導入）、洗浄、及び／又はインキュベーションから得られた試料を含む。生体試料は、生物源から直接得られた試料であってもよく、処理された試料であってもよい。生体試料は、限定するものではないが、体液、例えば、血液、血漿、血清、脳脊髄液、関節液、尿及び汗、組織及び臓器試料を、これらに由来する処理された試料を含めて含む。細胞が由来する試料又は単離される試料は、血液若しくは血液由来試料であるか、或いはアフェレーシス生成物若しくは白血球除去法生成物であるか、又はこれらに由来することが好ましい。例示的な試料としては、全血、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）、白血球、骨髄、胸腺、組織生検材料、腫瘍、白血病、リンパ腫、リンパ節、消化管関連リンパ系組織、粘膜関連リンパ系組織、脾臓、他のリンパ系組織、及び／又はこれらに由来する細胞が挙げられる。試料は、細胞療法（典型的に養子細胞療法）の状況において、自己由来及び同種異系の供給源に由来する試料を含む。

【００３８】

一部の実施形態では、細胞は細胞株、例えばＴ細胞株に由来する。細胞はまた、異種供給源、例えば、マウス、ラット、非ヒト霊長類、又はブタから得ることができる。細胞は、ヒト細胞であることが好ましい。

【００３９】

<u>Ｓｕｖ３９ｈ１を欠損する細胞</u>

本明細書において、用語「Ｓｕｖ３９ｈ１」又は「Ｈ３Ｋ９－ヒストンメチルトランスフェラーゼＳｕｖ３９ｈ１」は、当技術分野におけるその一般の意義を有し、基質としてモノメチル化Ｈ３－Ｌｙｓ－９を使用してヒストンＨ３のＬｙｓ－９残基を特異的にトリメチル化する、ヒストンメチルトランスフェラーゼ「多様化サプレッサー（ｓｕｐｐｒｅｓｓｏｒ ｏｆ ｖａｒｉｅｇａｔｉｏｎ）３－９ホモログ１（ショウジョウバエ（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ））」を指す（Ａａｇａａｒｄ Ｌ、Ｌａｉｂｌｅ Ｇ、Ｓｅｌｅｎｋｏ Ｐ、Ｓｃｈｍｉｄ Ｍ、Ｄｏｒｎ Ｒ、Ｓｃｈｏｔｔａ Ｇ、Ｋｕｈｆｉｔｔｉｇ Ｓ、Ｗｏｌｆ Ａ、Ｌｅｂｅｒｓｏｒｇｅｒ Ａ、Ｓｉｎｇｈ ＰＢ、Ｒｅｕｔｅｒ Ｇ、Ｊｅｎｕｗｅｉｎ Ｔ（１９９９年６月）「Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｈｏｍｏｌｏｇｕｅｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ ＰＥＶ－ｍｏｄｉｆｉｅｒ Ｓｕ（ｖａｒ）３－９ ｅｎｃｏｄｅ ｃｅｎｔｒｏｍｅｒｅ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｗｈｉｃｈ ｃｏｍｐｌｅｘ ｗｉｔｈ ｔｈｅ ｈｅｔｅｒｏｃｈｒｏｍａｔｉｎ ｃｏｍｐｏｎｅｎｔ Ｍ３ １」ＥＭＢＯ Ｊ １８（７）：１９２３～３８も参照されたい）。前記ヒストンメチルトランスフェラーゼは、ＭＧ４４、ＫＭＴ１Ａ、ＳＵＶ３９Ｈ、ＳＵＶ３９Ｈ１、ヒストン－リシンＮ－メチルトランスフェラーゼＳＵＶ３９Ｈ１、Ｈ３－Ｋ９－ＨＭＴａｓｅ １、ＯＴＴＨＵＭＰ００００００２４２９８、Ｓｕ（ｖａｒ）３－９ホモログ１、リシンＮ－メチルトランスフェラーゼ１Ａ、ヒストンＨ３－Ｋ９メチルトランスフェラーゼ１、位置効果（ｐｏｓｉｔｉｏｎ－ｅｆｆｅｃｔ ｖａｒｉｅｇａｔｉｏｎ）３－９ホモログ、ヒストン－リシンＮ－メチルトランスフェラーゼ又はＨ３リシン－９特異的１としても知られている。ヒトＳｕｖ３９ｈ１メチルトランスフェラーゼはＵＮＩＰＲＯＴでＯ４３４６３と呼ばれ、染色体ｘに位置する遺伝子Ｓｕｖ３９ｈ１（ＮＣＢＩでの遺伝子ＩＤ：６８３９）によってコードされている。本発明による用語Ｓｕｖ３９ｈ１はまた、ＳＵＶ３９Ｈ１のすべてのオルソログ、例えばＳＵ（ＶＡＲ）３－９も包含する。

【００４０】

本明細書で使用される場合、本発明による表現「Ｓｕｖ３９ｈ１を欠損する」とは、本発明による細胞におけるＳｕｖ３９ｈ１活性（即ち、Ｈ３Ｋ９－ヒストンメチルトランス

フェラーゼによるヒストンＨ３のＬｙｓ－９のメチル化）の阻害又は遮断を意味する。
【００４１】
本発明による「Ｓｕｖ３９ｈ１活性の阻害」とは、阻害されていないＳｕｖ３９ｈ１タンパク質の活性又はレベルと比較して、少なくとも３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％又は９９％以上のＳｕｖ３９ｈ１活性の低下を意味する。Ｓｕｖ３９ｈ１活性の阻害によりＳｕｖ３９ｈ１の実質的に検出可能な活性が細胞内に存在しなくなることが好ましい。
【００４２】
Ｓｕｖ３９ｈ１活性の阻害はまた、Ｓｕｖ３９ｈ１遺伝子発現の抑制によって、又はＳｕｖ３９ｈ１遺伝子の破壊によって達成することもできる。本発明によれば、前記抑制は、細胞、特に本発明の免疫細胞におけるＳｕｖ３９ｈ１の発現を、抑制の非存在下での方法によって産生される同一細胞に対して少なくとも５０、６０、７０、８０、９０、又は９５％低下させる。遺伝子破壊はまた、Ｓｕｖ３９ｈ１タンパク質の発現低下、又は非機能性Ｓｕｖ３９ｈ１タンパク質の発現をもたらし得る。
【００４３】
「非機能性」Ｓｕｖ３９ｈ１タンパク質とは、本明細書では、上記のように活性が低下したか、又は検出可能な活性が欠如したタンパク質を意味する。
【００４４】
従って、本発明による細胞におけるＳｕｖ３９ｈ１活性の阻害剤は、天然の、又はＨ３Ｋ９－ヒストンメチルトランスフェラーゼによるヒストンＨ３のＬｙｓ－９のメチル化を阻害する能力若しくはＨ３Ｋ９－ヒストンメチルトランスフェラーゼＳＵＶ３９Ｈ１遺伝子発現を阻害する能力を有さない任意の化合物又は薬剤の中から選択することができる。
【００４５】
本発明による免疫細胞におけるＳｕｖ３９ｈ１の阻害は、永続的であり、不可逆的又は一時的又は可逆的であり得る。しかし、Ｓｕｖ３９ｈ１阻害は、永続的で不可逆であることが好ましい。細胞におけるＳｕｖ３９ｈ１の阻害は、以下に記載のように、標的患者への細胞の注射の前又は後に達成され得る。
【００４６】
<u>本発明による遺伝子操作された細胞</u>
一部の実施形態では、細胞は、１つ又は複数の抗原受容体をコードする遺伝子操作を介して導入された１つ又は複数の核酸を含む。
【００４７】
典型的には、核酸は異種である（即ち、例えば、操作される細胞及び／又はそのような細胞が由来する生物では通常見られない核酸）。一部の実施形態では、複数の異なる細胞型からの様々なドメインをコードする核酸のキメラ的組合せを含めて、核酸は、天然には存在しない。
【００４８】
本発明による抗原受容体の中には、遺伝子操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）及びそれらの成分、並びに機能性非ＴＣＲ抗原受容体、例えばキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）がある。
【００４９】
キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）
一部の実施形態では、操作された抗原受容体は、活性化ＣＡＲ若しくは刺激性ＣＡＲ、共刺激性ＣＡＲ（国際公開第２０１４／０５５６６８号を参照）、及び／又は阻害性ＣＡＲ（ｉＣＡＲ、Ｆｅｄｏｒｏｖら、Ｓｃｉ．Ｔｒａｎｓｌ．Ｍｅｄｉｃｉｎｅ、５（２１５）　２０１３年１２月を参照）を含めた、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含む。
【００５０】
キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）（キメラ免疫受容体、キメラＴ細胞受容体、人工Ｔ細胞受容体としても知られる）は、免疫エフェクター細胞（Ｔ細胞）に任意の特異性を移植する操作された受容体である。典型的には、これらの受容体を使用してモノクローナル抗体の特異性をＴ細胞に移植し、それらのコード配列の転写がレトロウイルスベクターによって

促進される。
【００５１】
ＣＡＲは、一般的に、一部の態様では、リンカー及び／又は膜貫通ドメイン（複数可）を介して、１つ又は複数の細胞内シグナル伝達成分に連結されている細胞外抗原（又はリガンド）結合ドメインを含む。そのような分子は、典型的には、天然抗原受容体を介したシグナル、共刺激受容体と組み合わせたそのような受容体を介したシグナル、及び／又は共刺激受容体のみを介したシグナルを模倣するか、又は似せる。
【００５２】
一部の実施形態では、ＣＡＲは、特定の抗原（又はマーカー若しくはリガンド）、例えば、がんマーカーなどの養子療法により標的化される特定の細胞型で発現される抗原に対する特異性を備えて構築される。従って、ＣＡＲは、典型的には、その細胞外部分に、１つ又は複数の抗原結合分子、例えば、１つ若しくは複数の抗原結合性断片、ドメイン、若しくは部分、又は１つ若しくは複数の抗体可変ドメイン、及び／又は抗体分子を含む。
【００５３】
抗原に結合させるために使用される部分は、３つの一般的なカテゴリー、抗体由来の単鎖抗体断片（ｓｃＦｖ）、ライブラリーから選択されたＦａｂ’、又は（第一世代ＣＡＲに対する）それらの同族受容体に関与する天然リガンドのいずれかに分類される。これらの各カテゴリーでの成功例は、特に、Ｓａｄｅｌａｉｎ Ｍ、 Ｂｒｅｎｔｊｅｎｓ Ｒ、Ｒｉｖｉｅｒｅ Ｉ．Ｔｈｅ ｂａｓｉｃ ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ ｃｈｉｍｅｒｉｃ ａｎｔｉｇｅｎ ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＣＡＲ）ｄｅｓｉｇｎ．Ｃａｎｃｅｒ ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ．２０１３；３（４）：３８８～３９８（特に表１を参照）で報告されており、本願に含まれる。マウス免疫グロブリン由来のｓｃＦｖ’は、十分に特徴付けられたモノクローナル抗体から容易に誘導されるので、一般的に使用されている。
【００５４】
典型的には、ＣＡＲは、抗体分子の１つ又は複数の抗原結合部分、例えば、モノクローナル抗体（ｍＡｂ）の可変重鎖（ＶＨ）及び可変軽鎖（ＶＬ）に由来する単鎖抗体断片（ｓｃＦｖ）を含む。
【００５５】
一部の態様では、ＣＡＲは、標的としようとする細胞若しくは疾患、例えば、腫瘍細胞若しくはがん細胞のがんマーカー若しくは細胞表面抗原などの抗原、例えば本明細書に記載の若しくは当技術分野において周知のいずれかの標的抗原に特異的に結合する抗体重鎖ドメインを含む。
【００５６】
一部の実施形態では、ＣＡＲは、細胞の表面で発現される抗原、例えばインタクトな抗原を特異的に認識する抗体又は抗原結合性断片（例えばｓｃＦｖ）を含む。
【００５７】
一部の実施形態では、ＣＡＲは、ＭＨＣ－ペプチド複合体として細胞表面に提示される細胞内抗原、例えば腫瘍関連抗原を特異的に認識するＴＣＲ様抗体、例えば抗体又は抗原結合性断片（例えばｓｃＦｖ）を含む。一部の態様では、ＭＨＣ－ペプチド複合体を認識する抗体又はその抗原結合部分は、組換え受容体、例えば抗原受容体の一部として細胞で発現させることができる。抗原受容体の中には、機能性非ＴＣＲ抗原受容体、例えばキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）がある。一般的に、ペプチド－ＭＨＣ複合体に対するＴＣＲ様特異性を示す抗体又は抗原結合性断片を含むＣＡＲは、ＴＣＲ様ＣＡＲとも呼ばれ得る。
【００５８】
一部の態様では、抗原特異的結合又は認識成分は、１つ又は複数の膜貫通及び細胞内シグナル伝達ドメインに連結される。一部の実施形態では、ＣＡＲは、ＣＡＲの細胞外ドメインに融合した膜貫通ドメインを含む。一実施形態では、ＣＡＲ内のドメインの１つと自然的に関連する膜貫通ドメインが使用される。一部の場合では、膜貫通ドメインは、アミノ酸置換により選択又は修飾され、同一の又は異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインへのそのようなドメインの結合が回避され、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を

最小限にする。

【００５９】

一部の実施形態における膜貫通ドメインは、天然供給源又は合成供給源のいずれかに由来する。供給源が天然の場合、ドメインは膜結合タンパク質又は膜貫通タンパク質に由来し得る。膜貫通領域は、Ｔ細胞受容体のアルファ、ベータ又はゼータ鎖、ＣＤ２８、ＣＤ３イプシロン、ＣＤ４５、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤＳ、ＣＤ９、ＣＤ１６、ＣＤ２２、ＣＤ３３、ＣＤ３７、ＣＤ６４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ１３４、ＣＤ１３７、ＣＤ１５４に由来する（即ち、それらの少なくとも膜貫通領域（複数可）を含む）ものを含む。膜貫通ドメインはまた、合成であり得る。

【００６０】

一部の実施形態では、短いオリゴペプチドリンカー又はポリペプチドリンカー、例えば、長さが２～１０アミノ酸のリンカーが存在し、ＣＡＲの膜貫通ドメインと細胞質シグナル伝達ドメインの間に連結を形成する。

【００６１】

ＣＡＲは、一般的に、少なくとも１つの細胞内シグナル伝達成分を含む。第一世代ＣＡＲは、典型的には、内因性ＴＣＲからのシグナルの主要な伝達物質であるＣＤ３ζ鎖からの細胞内ドメインを有していた。第二世代ＣＡＲは、典型的には、様々な共刺激タンパク質受容体（例えば、ＣＤ２８、４１ＢＢ、ＩＣＯＳ）からＣＡＲの細胞質側末端までの細胞内シグナル伝達ドメインをさらに含み、Ｔ細胞に追加のシグナルを提供する。前臨床試験では、第二世代がＴ細胞の抗腫瘍活性を改善することが示された。さらに最近、第三世代ＣＡＲは、複数のシグナル伝達ドメインを組み合わせて、例えばＣＤ３ｚ－ＣＤ２８－４１ＢＢ又はＣＤ３ｚ－ＣＤ２８－ＯＸ４０のように、効力を増強させている。

【００６２】

例えば、ＣＡＲは、ＴＣＲ複合体の細胞内成分、例えば、Ｔ細胞活性化及び細胞毒性を媒介するＴＣＲ　ＣＤ３＋鎖、例えばＣＤ３ゼータ鎖を含むことができる。従って、一部の態様では、抗原結合分子は、１つ又は複数の細胞シグナル伝達モジュールに連結される。一部の実施形態では、細胞シグナル伝達モジュールは、ＣＤ３膜貫通ドメイン、ＣＤ３細胞内シグナル伝達ドメイン、及び／又は他のＣＤ膜貫通ドメインを含む。ＣＡＲはまた、１つ又は複数の追加分子、例えばＦｃ受容体γ、ＣＤ８、ＣＤ４、ＣＤ２５、又はＣＤ１６の一部をさらに含むことができる。

【００６３】

一部の実施形態では、ＣＡＲのライゲーションの際、ＣＡＲの細胞質ドメイン又は細胞内シグナル伝達ドメインは、対応する非操作免疫細胞（典型的にはＴ細胞）の正常なエフェクター機能又は応答の少なくとも１つを活性化する。例えば、ＣＡＲは、Ｔ細胞の機能、例えば、細胞溶解活性又はＴヘルパー活性、サイトカイン又は他の因子の分泌を誘導することができる。

【００６４】

一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメイン（複数可）は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）の細胞質配列を含み、一部の態様ではまた、天然の状況において、そのような受容体と協調して作用し、抗原受容体結合後にシグナル伝達を開始する共受容体の細胞質配列、及び／又はそのような分子の任意の誘導体若しくは変異体、及び／又は同じ機能性能力を有する任意の合成配列を含む。

【００６５】

Ｔ細胞活性化は、一部の態様では、次の２つのクラスの細胞質シグナル伝達配列によって媒介されると説明される：ＴＣＲを介して抗原依存的一次活性化を開始するもの（一次細胞質シグナル伝達配列）、及び抗原非依存的に作用して二次シグナル又は共刺激シグナルを提供するもの（二次細胞質シグナル伝達配列）。一部の態様では、ＣＡＲは、そのようなシグナル伝達成分の一方又は両方を含む。

【００６６】

一部の態様では、ＣＡＲは、ＴＣＲ複合体の一次活性化を刺激的方法又は阻害的方法の

いずれかで調節する一次細胞質シグナル伝達配列を含む。刺激的方法で作用する一次細胞質シグナル伝達配列は、免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ又はＩＴＡＭとして知られているシグナル伝達モチーフを含み得る。ＩＴＡＭを含む一次細胞質シグナル伝達配列の例としては、ＴＣＲゼータ、ＦｃＲガンマ、ＦｃＲベータ、ＣＤ３ガンマ、ＣＤ３デルタ、ＣＤ３イプシロン、ＣＤＳ、ＣＤ２２、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、及びＣＤ６６ｄに由来するものが挙げられる。一部の実施形態では、ＣＡＲの細胞質シグナル伝達分子（複数可）は、ＣＤ３ゼータに由来する細胞質シグナル伝達ドメイン、その一部、又は配列を含む。

【００６７】

ＣＡＲはまた、共刺激受容体、例えばＣＤ２８、４－１ＢＢ、ＯＸ４０、ＤＡＰ１０、及びＩＣＯＳのシグナル伝達ドメイン及び／又は膜貫通部分も含むことができる。一部の態様では、同じＣＡＲが活性化成分と共刺激成分の両方を含む；或いは、活性化ドメインは１つがＣＡＲによって提供され、一方、共刺激成分が別の抗原を認識する別のＣＡＲによって提供される。

【００６８】

ＣＡＲ又は他の抗原受容体はまた、阻害性ＣＡＲ（例えば、ｉＣＡＲ）であってもよく、応答、例えば免疫応答を弱化又は抑制する細胞内成分を含む。そのような細胞内シグナル伝達成分の例は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ４、ＬＡＧ３、ＢＴＬＡ、ＯＸ２Ｒ、ＴＩＭ－３、ＴＩＧＩＴ、ＬＡＩＲ－１、ＰＧＥ２受容体、Ａ２ＡＲを含むＥＰ２／４アデノシン受容体を含めた、免疫チェックポイント分子で確認されるものである。一部の態様では、操作された細胞は、そのような阻害分子のシグナル伝達ドメイン、又はそれに由来する阻害性ＣＡＲを含み、その応答を弱化させるように働く。そのようなＣＡＲは、例えば、活性化受容体、例えばＣＡＲにより認識される抗原も正常細胞の表面で発現されるか、又は発現される場合があるオフターゲット効果の可能性を低減するために使用される。

【００６９】

ＴＣＲ

一部の実施形態では、遺伝子操作された抗原受容体は、組換えＴ細胞受容体（ＴＣＲ）及び／又は天然Ｔ細胞からクローニングされたＴＣＲを含む。

【００７０】

「Ｔ細胞受容体」又は「ＴＣＲ」とは、可変ａ鎖及びβ鎖（それぞれ、ＴＣＲａ及びＴＣＲｐとしても知られている）又は可変γ鎖及びδ鎖（それぞれ、ＴＣＲγ及びＴＣＲ５としても知られている）を含み、ＭＨＣ受容体に結合した抗原ペプチドに特異的に結合することができる分子を意味する。一部の実施形態では、ＴＣＲはαβ型である。典型的には、αβ型及びγδ型で存在するＴＣＲは一般に構造的に類似しているが、それらを発現するＴ細胞は異なる解剖学的位置又は機能を有する場合がある。ＴＣＲは、細胞の表面で、又は可溶性形態で確認することができる。一般的に、ＴＣＲはＴ細胞（又はＴリンパ球）の表面で確認され、そこで一般的には主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）分子に結合した抗原を認識する役割を担っている。一部の実施形態では、ＴＣＲはまた、定常ドメイン、膜貫通ドメイン及び／又は短い細胞質側末端を含み得る（例えば、Ｊａｎｅｗａｙら、Ｉｍｍｕｎｏｂｉｏｌｏｇｙ：Ｔｈｅ Ｉｍｍｕｎｅ Ｓｙｓｔｅｍ ｉｎ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｄｉｓｅａｓｅ、第３版、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎｓ、ｐ．４：３３、１９９７を参照）。例えば、一部の態様では、ＴＣＲの各鎖は、１つのＮ末端免疫グロブリン可変ドメイン、１つの免疫グロブリン定常ドメイン、膜貫通領域、及びＣ末端の短い細胞質側末端を保有することができる。一部の実施形態では、ＴＣＲは、シグナル伝達の媒介に関与するＣＤ３複合体のインバリアントタンパク質と関連している。特に明示のない限り、用語「ＴＣＲ」とは、その機能性ＴＣＲ断片を包含するものと理解されたい。この用語はまた、αβ型又はγδ型のＴＣＲを含む、インタクトなＴＣＲ又は全長ＴＣＲも包含する。

【００７１】

従って、本明細書における目的のために、ＴＣＲへの言及は、任意のＴＣＲ又は機能性

断片、例えば、ＭＨＣ分子に結合した特定の抗原ペプチド、即ち、ＭＨＣ－ペプチド複合体に結合するＴＣＲの抗原結合部分を含む。ＴＣＲの「抗原結合部分」又は「抗原結合性断片」は、同義的に使用することができ、ＴＣＲの構造ドメインの一部を含有するが、完全ＴＣＲが結合する抗原（例えばＭＨＣ－ペプチド複合体）に結合する分子を意味する。一部の場合には、抗原結合部分は、特定のＭＨＣ－ペプチド複合体に結合するために結合部位を形成するのに十分な、ＴＣＲの可変ドメイン、例えばＴＣＲの可変ａ鎖及び可変β鎖などを含み、例えば一般的には、各鎖は３つの相補性決定領域を含有する場所である可変ドメインを含有する。

【００７２】

一部の実施形態では、ＴＣＲ鎖の可変ドメインは会合してループ、又は免疫グロブリンに類似した相補性決定領域（ＣＤＲ）を形成し、これらは抗原認識を付与し、ＴＣＲ分子の結合部位を形成することによりペプチド特異性を決定し、ペプチド特異性を決定する。典型的には、免疫グロブリンと同様に、ＣＤＲはフレームワーク領域（ＦＲ）によって分離されている（例えば、Ｊｏｒｅｓら、Ｐｗｃ．Ｎａｔ’ｌＡｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８７：９１３８、１９９０；Ｃｈｏｔｈｉａら、ＥＭＢＯ Ｊ．７：３７４５、１９８８を参照；また、Ｌｅｆｒａｎｃら、Ｄｅｖ．Ｃｏｍｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２７：５５、２００３も参照）。一部の実施形態では、ＣＤＲ３は、処理された抗原の認識に関与する主要なＣＤＲであるが、アルファ鎖のＣＤＲ１もまた抗原ペプチドのＮ末端部分と相互作用するのに対し、ベータ鎖のＣＤＲ１はペプチドのＣ末端部分と相互作用することが明らかにされている。ＣＤＲ２は、ＭＨＣ分子を認識すると考えられる。一部の実施形態では、β鎖の可変領域は、さらなる超可変性（ＨＶ４）領域を含むことができる。

【００７３】

一部の実施形態では、ＴＣＲ鎖は定常ドメインを含む。例えば、免疫グロブリンと同様に、ＴＣＲ鎖（例えば、ａ鎖、β鎖）の細胞外部分は、２つの免疫グロブリンドメイン、Ｎ末端の可変ドメイン（例えば、Ｖａ又はＶｐ；典型的には、Ｋａｂａｔナンバリング、Ｋａｂａｔら、「Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＵＳ Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ、１９９１、第５版に基づいたアミノ酸１～１１６）と、細胞膜に隣接する１つの定常ドメイン（例えば、ａ鎖定常ドメイン又はＣａ、典型的には、Ｋａｂａｔに基づいたアミノ酸１１７～２５９、β鎖定常ドメイン又はＣｐ、典型的には、Ｋａｂａｔに基づいたアミノ酸１１７～２９５）を含み得る。例えば、一部の場合には、２本の鎖によって形成されるＴＣＲの細胞外部分は、２つの膜近位定常定常ドメイン、及びＣＤＲを含有する２つの膜遠位可変ドメインを含む。ＴＣＲドメインの定常ドメインは、システイン残基がジスルフィド結合を形成し、２本の鎖を連結する短い接続配列を含む。一部の実施形態では、ＴＣＲが定常ドメイン内に２つのジスルフィド結合を含有するように、ＴＣＲはさらなるシステイン残基をａ鎖及びβ鎖のそれぞれに有していてもよい。

【００７４】

一部の実施形態では、ＴＣＲ鎖は膜貫通ドメインを含むことができる。一部の実施形態では、膜貫通ドメインは正に帯電している。一部の場合には、ＴＣＲ鎖は細胞質側末端を含む。一部の場合には、この構造により、ＴＣＲはＣＤ３のような他の分子と結合することが可能になる。例えば、定常ドメインと膜貫通領域を含むＴＣＲは、タンパク質を細胞膜に固定し、ＣＤ３シグナル伝達体（ｓｉｇｎａｌｉｎｇ ａｐｐａｒａｔｕｓ）又は複合体のインバリアントサブユニットと会合することができる。

【００７５】

一般的に、ＣＤ３は、哺乳動物での３つの異なる鎖（γ、δ、及びε）並びにζ鎖を保有し得る多タンパク質複合体である。例えば、哺乳動物において、複合体は、ＣＤ３ｙ鎖、ＣＤ３５鎖、２つのＣＤ３ｓ鎖、及びＣＤ３ζ鎖のホモ二量体を含むことができる。ＣＤ３ｙ鎖、ＣＤ３５鎖、及びＣＤ３ｓ鎖は、単一の免疫グロブリンドメインを含有する免

疫グロブリンスーパーファミリーの非常に関連性のある細胞表面タンパク質である。ＣＤ３ｙ鎖、ＣＤ３５鎖、及びＣＤ３ｓ鎖の膜貫通領域は負に荷電しているが、これは、これらの鎖が正に荷電しているＴ細胞受容体鎖と会合するのを可能にすることの特徴である。ＣＤ３ｙ鎖、ＣＤ３５鎖、及びＣＤ３ｓ鎖の細胞内末端は、それぞれ免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ又はＩＴＡＭとして知られている１つの保存モチーフを含有するのに対し、各ＣＤ３ζ鎖は３つの保存モチーフを含有する。一般的に、ＩＴＡＭは、ＴＣＲ複合体のシグナル伝達能力に関与する。これらのアクセサリー分子は、負に荷電した膜貫通領域を有しており、ＴＣＲから細胞へのシグナル伝播の役割を果たす。ＣＤ３－鎖及びζ－鎖は、ＴＣＲと一緒になって、Ｔ細胞受容体複合体として知られているものを形成する。

【００７６】

一部の実施形態では、ＴＣＲは、２つの鎖ａ及びβ（又は任意選択でγ及びδ）のヘテロ二量体であってもよく、又は単鎖ＴＣＲ構築物であってもよい。一部の実施形態では、ＴＣＲは、例えば、１つ又は複数のジスルフィド結合によって連結されている２つの個別の鎖（ａ鎖及びβ鎖又はγ鎖及びδ鎖）を含有するヘテロ二量体である。

【００７７】

ＣＡＲ及び組換えＴＣＲを含む例示的な抗原受容体、並びに受容体を細胞に操作及び導入するための方法としては、例えば、国際特許出願公開の国際公開第２０００１４２５７号、国際公開第２０１３１２６７２６号、国際公開第２０１２／１２９５１４号、国際公開第２０１４０３１６８７号、国際公開第２０１３／１６６３２１号、国際公開第２０１３／０７１１５４号、国際公開第２０１３／１２３０６１号、米国特許出願公開第２００２１３１９６０号、同第２０１３２８７７４８号、同第２０１３０１４９３３７号、米国特許第６，４５１，９９５号、同第７，４４６，１９０号、同第８，２５２，５９２号、同第８，３３９，６４５号、同第８，３９８，２８２号、同第７，４４６，１７９号、同第６，４１０，３１９号、同第７，０７０，９９５号、同第７，２６５，２０９号、同第７，３５４，７６２号、同第７，４４６，１９１号、同第８，３２４，３５３号、及び同第８，４７９，１１８号、並びに欧州特許出願公開第２５３７４１６号に記載のもの、並びに／或いはＳａｄｅｌａｉｎら、Ｃａｎｃｅｒ Ｄｉｓｃｏｖ．２０１３年4月；３（４）：３８８～３９８；Ｄａｖｉｌａら、（２０１３） ＰＬｏＳ ＯＮＥ ８（４）：ｅ６１３３８；Ｔｕｒｔｌｅら、Ｃｕｒｒ． Ｏｐｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１２年１０月；２４（５）：６３３～３９；Ｗｕら、Ｃａｎｃｅｒ、２０１２年３月、１８（２）：１６０～７５に記載のものが挙げられる。一部の態様では、遺伝子操作された抗原受容体としては、米国特許第７，４４６，１９０号に記載のＣＡＲ、及び国際特許出願公開の国際公開第２０１４０５５６６８Ａ１号に記載のＣＡＲが挙げられる。

【００７８】

抗原

遺伝子操作された抗原受容体によって標的化される抗原の中には、養子細胞療法を介して標的化しようとする疾患、状態、又は細胞型の状況で発現されるものがある。疾患及び状態の中には、増殖性、新生物性、及び悪性の疾患及び障害があり、特にがんがある。

【００７９】

がんは、固形がん、又は、特に白血病及びリンパ腫を含む、造血及びリンパ組織の腫瘍としても知られている、「液性腫瘍」、例えば血液、骨髄、リンパ系に影響するがんであり得る。液性腫瘍としては、例えば、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）、及び慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）が挙げられる（マントル細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、腺腫、扁平上皮癌、喉頭癌、胆嚢及び胆管がん、網膜芽細胞腫などの網膜のがんなどの様々なリンパ腫を含む）。

【００８０】

固形がんとしては、特に、結腸、直腸、皮膚、子宮内膜、肺（非小細胞肺がんを含む）、子宮、骨（骨肉腫、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、線維肉腫、巨細胞腫、エナメル上皮腫、及び脊索腫）、肝臓、腎臓、食道、胃、膀胱、膵臓、頸部、脳（例えば、髄膜腫、膠芽

腫、低悪性度星状細胞腫、乏突起膠細胞腫、下垂体腫瘍、シュワン細胞腫、及び転移性脳腫瘍）、卵巣、乳房、頭頸部領域、精巣、前立腺、及び甲状腺からなる群から選択される臓器の１つに影響するがんが挙げられる。

【００８１】

本発明によるがんは、上記の血液、骨髄及びリンパ系に影響するがんであることが好ましい。典型的には、がんは、多発性骨髄腫であるか、又は多発性骨髄腫に関連している。

【００８２】

本発明による疾患はまた、感染症又は状態、例えば、限定するものではないが、ウイルス感染、レトロウイルス感染、細菌感染、及び原虫感染、免疫不全、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、エプスタイン－バーウイルス（ＥＢＶ）、アデノウイルス、ＢＫポリオーマウイルスの感染又は状態；自己免疫性又は炎症性の疾患又は状態、例えば、関節炎、例えば慢性関節リウマチ（ＲＡ）、Ｉ型糖尿病、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、炎症性腸疾患、乾癬、硬皮症、自己免疫性甲状腺疾患、グレーブス病、クローン病、多発性硬化症、喘息、及び／又は移植に随伴する疾患若しくは状態を包含する。

【００８３】

一部の実施形態では、抗原はポリペプチドである。一部の実施形態では、抗原は炭水化物又は他の分子である。一部の実施形態では、抗原は、正常な又は非標的の細胞又は組織と比較して、疾患又は状態の細胞、例えば腫瘍細胞又は病原細胞で選択的に発現又は過剰発現される。他の実施形態では、抗原は正常細胞で発現され、及び／又は操作された細胞で発現される。いくつかのそのような実施形態では、本明細書で提供されるマルチターゲティング方法及び／又は遺伝子破壊方法を使用して、特異性及び／又は有効性を改善する。

【００８４】

一部の実施形態では、抗原は普遍的腫瘍抗原である。用語「普遍的腫瘍抗原」とは、一般的に、腫瘍細胞で非腫瘍細胞よりも高レベルで発現され、また様々な起源の腫瘍で発現される免疫原性分子、例えばタンパク質を意味する。一部の実施形態では、普遍的腫瘍抗原は、ヒトがんの３０％超、４０％超、５０％超、６０％超、７０％超、７５％超、８０％超、８５％超、９０％超、又はそれより多くのヒトがんで発現される。一部の実施形態では、普遍的腫瘍抗原は、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、少なくとも６つ、少なくとも７つ、少なくとも８つ又はそれより多くの異なるタイプの腫瘍で発現される。一部の場合には、普遍的腫瘍抗原は、非腫瘍細胞、例えば正常細胞で発現され得るが、腫瘍細胞で発現されるレベルより低いレベルで発現される。一部の場合には、普遍的腫瘍抗原は、非腫瘍細胞では全く発現されず、例えば、正常細胞では発現されない。例示的な普遍的腫瘍抗原としては、例えば、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素（ｈＴＥＲＴ）、サバイビン、マウス二重微小染色体２ホモログ（ＭＤＭ２）、シトクロムＰ４５０　１Ｂ１（ＣＹＰ１Ｂ）、ＨＥＲ２／ｎｅｕ、Ｗｉｌｍｓ腫瘍遺伝子１（ＷＴ１）、リビン、アルファフェトプロテイン（ＡＦＰ）、癌胎児性抗原（ＣＥＡ）、ムチン１６（ＭＵＣ１６）、ＭＵＣ１、前立腺特異的膜抗原（ＰＳＭＡ）、ｐ５３、又はサイクリン（Ｄｌ）が挙げられる。普遍的腫瘍抗原を含む腫瘍抗原のペプチドエピトープは当技術分野において公知であり、一部の態様では、ＭＨＣ拘束性抗原受容体、例えばＴＣＲ又はＴＣＲ様ＣＡＲを調製するのに使用することができる（例えば、ＰＣＴ出願の国際公開第２０１１００９１７３号又は同２０１２１３５８５４号、及び米国特許出願公開第２０１４００６５７０８号を参照）。

【００８５】

一部の態様では、抗原は多発性骨髄腫で発現され、例えば、ＣＤ３８、ＣＤ１３８、及び／又はＣＳ－１である。他の例示的な多発性骨髄腫抗原としては、ＣＤ５６、ＴＩＭ－３、ＣＤ３３、ＣＤ１２３、及び／又はＣＤ４４が挙げられる。そのような抗原に対して示された抗体又は抗原結合性断片は公知であり、例えば、米国特許第８，１５３，７６５号、同第８，６０３４７７号、同第８，００８，４５０号に記載されているもの；米国特許出願公開第２０１２０１８９６２２号に記載されているもの、及びＰＣＴ出願の国際公開第２００６０９９８７５号、同２００９０８０８２９号、又は同２０１２０９２６１２

号に記載されているものが挙げられる。一部の実施形態では、そのような抗体又はその抗原結合性断片（例えばｓｃＦｖ）を使用してＣＡＲを生成することができる。

【００８６】

一部の実施形態では、抗原は、がん細胞又は腫瘍細胞の表面で発現又はアップレギュレートされるが、これはまた休止Ｔ細胞又は活性化Ｔ細胞などの免疫細胞で発現され得るものであってもよい。例えば、一部の場合には、ｈＴＥＲＴ、サバイビン、及び他の普遍的腫瘍抗原の発現は、活性化Ｔリンパ球を含むリンパ球に存在することが報告されている（例えば、Ｗｅｎｇら、（１９９６）Ｊ Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．、１８３：２４７１～２４７９；Ｈａｔｈｃｏｃｋら、（１９９８）Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ、１６０：５７０２～５７０６；Ｌｉｕら、（１９９９）Ｐｒｏｃ． Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ．９６：５１４７～５１５２；Ｔｕｒｋｓｍａら、（２０１３）Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ、１１：１５２を参照）。同様に、一部の場合には、ＣＤ３８及び他の腫瘍抗原はまた、Ｔ細胞などの免疫細胞で発現され、例えば、活性化Ｔ細胞でアップレギュレートされ得る。例えば、一部の態様では、ＣＤ３８は、公知のＴ細胞活性化マーカーである。

【００８７】

本明細書で提供される一部の実施形態では、発現した遺伝子操作された抗原受容体が免疫細胞自体のその発現の状況において抗原に特異的に結合しないように、免疫細胞、例えばＴ細胞は、免疫細胞の抗原をコードする遺伝子を抑制又は破壊するように操作され得る。従って、一部の態様では、これによって、例えば、養子細胞療法に関連して、免疫細胞における操作されたものの効力を低下させ得る、オフターゲット作用、例えば、操作された免疫細胞同士の結合を回避することができる。

【００８８】

一部の実施形態では、例えば阻害性ＣＡＲの場合、標的はオフターゲットマーカーであり、例えば、疾患細胞又は標的化しようとする細胞では発現されないが、正常細胞又は非疾患細胞で発現される抗原であり、これは操作された同じ細胞において活性化受容体又は刺激受容体によって標的化される疾患特異的標的を発現する。例示的なそのような抗原は、ＭＨＣ分子、例えばＭＨＣクラスＩ分子であって、例えば、疾患又は状態の処置に関連してそのような分子はダウンレギュレートされるが、非標的細胞では発現され続けるものである。

【００８９】

一部の実施形態では、操作された免疫細胞は、１種又は複数の他の抗原を標的化する抗原を含有することができる。一部の実施形態では、１種又は複数の他の抗原は、腫瘍抗原又はがんマーカーである。提供した免疫細胞上の抗原受容体によって標的化される他の抗原としては、一部の実施形態では、オーファンチロシンキナーゼ受容体ＲＯＲ１、ｔＥＧＦＲ、Ｈｅｒ２、Ｌｌ－ＣＡＭ、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、メソテリン、ＣＥＡ、及びＢ型肝炎表面抗原、抗葉酸受容体、ＣＤ２３、ＣＤ２４、ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＤ３８、ＣＤ４４、ＥＧＦＲ、ＥＧＰ－２、ＥＧＰ－４、ＥＰＨａ２、ＥｒｂＢ２、３若しくは４、ＦＢＰ、胎児アセチコリン（ａｃｅｔｈｙｃｈｏｌｉｎｅ）ｅ受容体、ＧＤ２、ＧＤ３、ＨＭＷ－ＭＡＡ、ＩＬ－２２Ｒ－アルファ、ＩＬ－１３Ｒ－アルファ２、ｋｄｒ、カッパ軽鎖、ルイスＹ、Ｌｌ－細胞接着分子、ＭＡＧＥ－Ａ１、メソテリン、ＭＵＣ１、ＭＵＣ１６、ＰＳＣＡ、ＮＫＧ２Ｄリガンド、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＭＡＲＴ－１、ｇｐｌＯＯ、癌胎児性抗原、ＲＯＲ１、ＴＡＧ７２、ＶＥＧＦ－Ｒ２、癌胎児抗原（ＣＥＡ）、前立腺特異的抗原、ＰＳＭＡ、Ｈｅｒ２／ｎｅｕ、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、ｅｐｈｒｉｎＢ２、ＣＤ１２３、ＣＳ－１、ｃ－Ｍｅｔ、ＧＤ－２、及びＭＡＧＥ Ａ３、ＣＥ７、ウィルムス腫瘍１（ＷＴ－１）、サイクリン、例えば、サイクリンＡ１（ＣＣＮＡ１）、並びに／或いはビオチン化分子、並びに／或いはＨＩＶ、ＨＣＶ、ＨＢＶ、又は他の病原体が発現する分子を挙げることができる。

【００９０】

一部の実施形態では、ＣＡＲは、病原体特異的抗原に結合する。一部の実施形態では、

ＣＡＲは、ウイルス抗原（例えば、ＨＩＶ、ＨＣＶ、ＨＢＶなど）、細菌抗原、及び／又は寄生虫抗原に特異的である。

【００９１】

一部の実施形態では、本発明の細胞は、２種以上の遺伝子操作された受容体を細胞上に発現するように遺伝子操作され、それぞれの受容体は異なる抗原を認識し、典型的には、それぞれが異なる細胞内シグナル伝達成分を含む。そのようなマルチターゲティング手法は、例えば、国際特許出願の国際公開第２０１４０５５６６８Ａ１号（例えば、オフターゲット細胞、例えば、正常細胞上に個別に存在するが、処置しようとする疾患又は状態の細胞上でしか一緒に存在しない２種の異なる抗原を標的化する、活性化ＣＡＲと共刺激ＣＡＲの組合せを説明）、及びＦｅｄｏｒｏｖら、Ｓｃｉ．Ｔｒａｎｓｌ．Ｍｅｄｉｃｉｎｅ、５（２１５）（２０１３年１２月）（活性化ＣＡＲ及び阻害性ＣＡＲを発現する細胞、例えば、活性化ＣＡＲが正常細胞又は非疾患細胞と、処置しようとする疾患又は状態の細胞の両方で発現される１つの抗原に結合し、阻害性ＣＡＲが、正常細胞又は処置が望まれない細胞でしか発現しない別の抗原に結合するものについて説明）に記載されている。

【００９２】

いくつかの状況では、刺激因子（例えば、リンホカイン又はサイトカイン）の過剰発現が対象にとって毒性である場合がある。従って、いくつかの状況では、操作された細胞は、例えば、養子免疫療法で投与される場合に、ｉｎ ｖｉｖｏで細胞を負の選択に対して感受性にさせる遺伝子セグメントを含む。例えば、一部の態様では、細胞は、投与される患者のｉｎ ｖｉｖｏ状態が変化した結果として排除され得るように操作される。負の選択可能な表現型は、投与される薬剤、例えば、化合物に対する感受性を付与する遺伝子の挿入により得ることができる。負の選択可能な遺伝子としては、ガンシクロビル感受性を付与する単純ヘルペスウイルスＩ型チミジンキナーゼ（ＨＳＶ－Ｉ ＴＫ）遺伝子（Ｗｉｇｌｅｒら、Ｃｅｌｌ ＩＩ：２２３、１９７７）；細胞ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＨＰＲＴ）遺伝子、細胞アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＡＰＲＴ）遺伝子、細菌シトシンデアミナーゼ、（Ｍｕｌｌｅｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．８９：３３（１９９２））が挙げられる。

【００９３】

本発明の他の実施形態では、細胞、例えばＴ細胞は、組換え受容体を発現するように操作されず、むしろ所望の抗原に特異的な天然の抗原受容体、例えば、インキュベーションのステップ（複数可）の間に、ｉｎ ｖｉｔｒｏ又はｅｘ ｖｉｖｏで培養された腫瘍浸潤リンパ球及び／又はＴ細胞などを含み、特定の抗原特異性を有する細胞の増殖を促進する。例えば、一部の実施形態では、細胞は、腫瘍特異的Ｔ細胞、例えば自己由来の腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を単離することによって養子細胞療法のために生成される。自己由来の腫瘍浸潤リンパ球を使用するヒト腫瘍の直接標的化は、一部の場合には、腫瘍退縮を媒介することができる（Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ ＳＡら、（１９８８）Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ．３１９：１６７６～１６８０を参照）。一部の実施形態では、リンパ球は、切除された腫瘍から抽出される。一部の実施形態では、そのようなリンパ球は、ｉｎ ｖｉｔｒｏで増殖される。一部の実施形態では、そのようなリンパ球は、リンホカイン（例えばＩＬ－２）と共に培養される。一部の実施形態では、そのようなリンパ球は、自己由来の腫瘍細胞の特異的溶解を媒介するが、同種異系の腫瘍細胞又は自己由来の正常細胞の特異的溶解は媒介しない。

【００９４】

導入のためのさらなる核酸、例えば遺伝子の中には、例えば、移入された細胞の生存及び／又は機能を促進することにより療法の効力を改善するもの；細胞を選択及び／又は評価するための、例えば、ｉｎ ｖｉｖｏでの生存又は局在化を評価するための遺伝子マーカーを提供する遺伝子；Ｌｕｐｔｏｎ Ｓ．Ｄ．ら、Ｍｏｌ．ａｎｄ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．、１１：６（１９９１）、及びＲｉｄｄｅｌｌら、Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ３：３１９～３３８（１９９２）に記載されているような、例えば、ｉｎ ｖｉｖｏで細胞を負の選択に対して感受性にすることによって、安全性を改善する遺伝子がある；

また、優性の正の選択マーカーを負の選択マーカーと融合することから誘導される二機能性の選択可能な融合遺伝子の使用について説明している、Ｌｕｐｔｏｎらによる国際出願ＰＣＴ／ＵＳ９１／０８４４２及び国際出願ＰＣＴ／ＵＳ９４／０５６０１の公報も参照されたい。例えば、Ｒｉｄｄｅｌｌら、米国特許第６，０４０，１７７号、第１４～１７欄を参照されたい。

【００９５】

本発明による細胞を得るための方法

本発明はまた、免疫細胞におけるＳｕｖ３９ｈ１の発現及び／又は活性を阻害することからなるステップを含む、改変又は操作された免疫細胞を産生する方法に関する。

【００９６】

本発明による細胞を得るための方法は、標的抗原に特異的に結合する遺伝子操作された抗原受容体を前記免疫細胞に導入することからなるステップをさらに含むことが好ましい。

【００９７】

Ｓｕｖ３９ｈ１の発現及び／又は活性の阻害と、免疫細胞における標的抗原に特異的に結合する遺伝子操作された抗原受容体の導入は、同時に、又は任意の順序で連続して実施することができる。

【００９８】

Ｓｕｖ３９ｈ１の阻害

本発明によれば、操作された免疫細胞は、Ｓｕｖ３９ｈ１の発現及び／又は活性を阻害又は遮断する少なくとも１種の薬剤と接触させることができる。

【００９９】

前記薬剤は、次の小分子阻害剤から選択することができる：典型的には、Ｓｕｖ３９ｈ１の発現又は活性を遮断又は阻害する、イントラボディ、ナノボディ、アフィボディなどの抗体誘導体；典型的には、Ｓｕｖ３９ｈ１の発現又は活性を遮断又は阻害するアプタマー；Ｓｕｖ３９ｈ１に相補的なアンチセンス分子などの転写又は翻訳を遮断する核酸分子；ＲＮＡ干渉剤（例えば、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、低分子ヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、又はｐｉｗｉＲＮＡ（ｐｉＲＮＡ）；リボザイム、それらの組合せ。

【０１００】

また少なくとも１種の薬剤は、ａ）Ｓｕｖ３９ｈ１ゲノム核酸配列とハイブリダイズする操作された非天然のクリスパー（Ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ Ｒｅｇｕｌａｒｌｙ Ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ Ｓｈｏｒｔ Ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ Ｒｅｐｅａｔｓ）（ＣＲＩＳＰＲ）ガイドＲＮＡ、及び／又はｂ）ＣＲＩＳＰＲタンパク質（典型的には、ＩＩ型Ｃａｓ９タンパク質）をコードするヌクレオチド配列を含む外因性核酸であってもよく、任意選択で、細胞はＣａｓ９タンパク質を発現するためにトランスジェニックである。また薬剤は、亜鉛フィンガータンパク質（ＺＦＮ）又はＴＡＬタンパク質であり得る。

【０１０１】

用語「有機小分子」は、医薬品において一般に使用される有機分子に匹敵するサイズの分子を指す。この用語は、生物学的高分子（例えば、タンパク質、核酸等）を除外する。好まれる有機小分子は、サイズが、最大約５０００Ｄａ、より好ましくは最大２０００Ｄａ、最も好ましくは最大約１０００Ｄａに及ぶ。

【０１０２】

特定の実施形態では、Ｈ３Ｋ９ヒストンメチルトランスフェラーゼＳＵＶ３９Ｈ１の阻害剤は、Ｇｒｅｉｎｅｒ Ｄ、Ｂｏｎａｌｄｉ Ｔ、Ｅｓｋｅｌａｎｄ Ｒ、Ｒｏｅｍｅｒ Ｅ、Ｉｍｈｏｆ Ａ.「Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ａ ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ ｏｆ ｔｈｅ ｈｉｓｔｏｎｅ ｍｅｔｈｙｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ ＳＵ（ＶＡＲ）３－９」、Ｎａｔ Ｃｈｅｍ Ｂｉｏｌ．２００５年8月；ｌ（３）：１４３～５．；Ｗｅｂｅｒ、Ｈ．Ｐ．ら「Ｔｈｅ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ａｎｄ ａｂｓｏｌｕｔｅ ｃｏｎｆｉｇｕｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｃｈａｅｔｏｃｉｎ」、Ａｃｔａ Ｃｒｙｓｔ、Ｂ２８、２９４５～２９５１（１９７２）；Ｕｄａｇａｗａ、Ｓ

．ら「Ｔｈｅ ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ ｃｈａｅｔｏｇｌｏｂｏｓｉｎｓ，ｓｔｅｒｉｇｍａｔｏｃｙｓｔｉｎ，Ｏ－ｍｅｔｈｙｌｓｔｅｒｉｇｍａｔｏｃｙｓｔｉｎ，ａｎｄ ｃｈａｅｔｏｃｉｎ ｂｙ Ｃｈａｅｔｏｍｉｕｍ ｓｐｐ． ａｎｄ ｒｅｌａｔｅｄ ｆｕｎｇｉ」、Ｃａｎ．Ｊ．ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ、２５、１７０～１７７（１９７９）；及びＧａｒｄｉｎｅｒ、Ｄ．Ｍ．ら「Ｔｈｅ ｅｐｉｐｏｌｙｔｈｉｏｄｉｏｘｏｐｉｐｅｒａｚｉｎｅ（ＥＴＰ）ｃｌａｓｓ ｏｆ ｆｕｎｇａｌ ｔｏｘｉｎｓ：ｄｉｓｔｒｉｂｕｔｉｏｎ，ｍｏｄｅ ｏｆ ａｃｔｉｏｎ，ｆｕｎｃｔｉｏｎｓ ａｎｄ ｂｉｏｓｙｎｔｈｅｓｉｓ」、Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ、１５１、１０２１～１０３２（２００５）に記載されている通り、ケトシン（ｃｈａｅｔｏｃｉｎ）（ＣＡＳ ２８０９７－０３－２）である。例えば、ケトシンは、Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈから市販されている。

【０１０３】

ＳＵＶ３９Ｈ１の阻害剤は、ＥＴＰ６９（Ｒａｃ－（３Ｓ，６Ｓ，７Ｓ，８ａＳ）－６－（ベンゾ［ｄ］［１，３］ジオキソール－５－イル）－２，３，７－トリメチル－１，４－ジオキソヘキサヒドロ－６Ｈ－３，８ａ－エピジチオピロロ［１，２－ａ］ピラジン－７－カルボニトリル）、エピジチオジケトピペラジンアルカロイドケトシンＡのラセミアナログ（国際公開第２０１４０６６４３５号を参照、また、Ｂａｕｍａｎｎ Ｍ、Ｄｉｅｓｋａｕ ＡＰ、Ｌｏｅｒｔｓｃｈｅｒ ＢＭら、Ｔｒｉｃｙｃｌｉｃ Ａｎａｌｏｇｕｅｓ ｏｆ Ｅｐｉｄｉｔｈｉｏｄｉｏｘｏｐｉｐｅｒａｚｉｎｅ Ａｌｋａｌｏｉｄｓ ｗｉｔｈ Ｐｒｏｍｉｓｉｎｇ Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ ａｎｄ Ｉｎ Ｖｉｖｏ Ａｎｔｉｔｕｍｏｒ Ａｃｔｉｖｉｔｙ．Ｃｈｅｍｉｃａｌ ｓｃｉｅｎｃｅ（Ｒｏｙａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｏｆ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ：２０１０）．２０１５；６：４４５１～４４５７及びＳｎｉｇｄｈａ Ｓ、Ｐｒｉｅｔｏ ＧＡ、Ｐｅｔｒｏｓｙａｎ Ａら、Ｈ３Ｋ９ｍｅ３ Ｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ Ｉｍｐｒｏｖｅｓ Ｍｅｍｏｒｙ，Ｐｒｏｍｏｔｅｓ Ｓｐｉｎｅ Ｆｏｒｍａｔｉｏｎ，ａｎｄ Ｉｎｃｒｅａｓｅｓ ＢＤＮＦ Ｌｅｖｅｌｓ ｉｎ ｔｈｅ Ａｇｅｄ Ｈｉｐｐｏｃａｍｐｕｓ．Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ．２０１６；３６（１２）：３６１１～３６２２も参照されたい）となることもできる。

【０１０４】

化合物の阻害活性は、Ｇｒｅｉｎｅｒ Ｄ．ら、Ｎａｔ Ｃｈｅｍ Ｂｉｏｌ．２００５年８月；ｌ（３）：１４３～５又はＥｓｋｅｌａｎｄ、Ｒ．ら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ４３、３７４０～３７４９（２００４）に記載されている様々な方法を使用して決定することができる。

【０１０５】

細胞内のＳｕｖ３９ｈ１の阻害は、標的患者への注射の前又は後に達成することができる。一部の実施形態では、先に定義した阻害は、対象に細胞を投与した後にｉｎ ｖｉｖｏで実施される。典型的には、本明細書で定義したＳｕｖ３９ｈ１阻害剤は、細胞を含有する組成物に含めることができる。またＳｕｖ３９ｈ１は、対象に細胞（複数可）を投与する前に、同時に、又は後に、別々に投与することができる。

【０１０６】

典型的には、本発明によるＳｕｖ３９ｈ１の阻害は、本発明による細胞を、前述の少なくとも１種の薬理学的阻害剤を含む組成物と共にインキュベートすることにより達成され得る。阻害剤は、ｉｎ ｖｉｔｒｏでの抗腫瘍Ｔ細胞の増大化中に含め、これにより、養子移入後のそれらの再構成、生存及び治療効果を変化させる。

【０１０７】

本発明による細胞におけるＳｕｖ３９ｈ１の阻害は、イントラボディを用いて達成され得る。イントラボディは、同じ細胞において産生された後に、その抗原に細胞内で結合する抗体である（概説については、例えば、Ｍａｒｓｃｈａｌｌ ＡＬ、Ｄｕｂｅｌ Ｓ及びＢｏｌｄｉｃｋｅ Ｔ「Ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｉｎ ｖｉｖｏ ｋｎｏｃｋｄｏｗｎ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎ ｆｕｎｃｔｉｏｎ ｂｙ ｉｎｔｒａｂｏｄｉｅｓ」、ＭＡｂｓ．２０１５；７（６）：１０１０～３５を参照、また、Ｖａｎ Ｉｍｐｅ Ｋ、Ｂｅｔｈｕｙｎｅ Ｊ

、Ｃｏｏｌ Ｓ、Ｉｍｐｅｎｓ Ｆ、Ｒｕａｎｏ－Ｇａｌｌｅｇｏ Ｄ、Ｄｅ Ｗｅｖｅｒ Ｏ、Ｖａｎｌｏｏ Ｂ、Ｖａｎ Ｔｒｏｙｓ Ｍ、Ｌａｍｂｅｉｎ Ｋ、Ｂｏｕｃｈｅｒｉｅ Ｃら「Ａ ｎａｎｏｂｏｄｙ ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｔｈｅ Ｆ－ａｃｔｉｎ ｃａｐｐｉｎｇ ｐｒｏｔｅｉｎ ＣａｐＧ ｒｅｓｔｒａｉｎｓ ｂｒｅａｓｔ ｃａｎｃｅｒ ｍｅｔａｓｔａｓｉｓ」、Ｂｒｅａｓｔ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ２０１３；１５：Ｒ１１６；Ｈｙｌａｎｄ Ｓ、Ｂｅｅｒｌｉ ＲＲ、Ｂａｒｂａｓ ＣＦ、Ｈｙｎｅｓ ＮＥ、Ｗｅｌｓ Ｗ.「Ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ａｎｄ ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｉｎｔｅｒａｃｔｉｎｇ ｗｉｔｈ ｔｈｅ ｋｉｎａｓｅ ｄｏｍａｉｎ ｏｆ ｈｕｍａｎ ＥＧＦ ｒｅｃｅｐｔｏｒ」、Ｏｎｃｏｇｅｎｅ ２００３；２２：１５５７～６７；Ｌｏｂａｔｏ ＭＮ、Ｒａｂｂｉｔｔｓ ＴＨ.「Ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ ｃｈａｌｌｅｎｇｅｓ ｆａｃｉｎｇ ｔｈｅｉｒ ｕｓｅ ａｓ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ａｇｅｎｔｓ」、Ｔｒｅｎｄｓ Ｍｏｌ Ｍｅｄ ２００３；９：３９０～６、並びにＤｏｎｉｎｉ Ｍ、Ｍｏｒｅａ Ｖ、Ｄｅｓｉｄｅｒｉｏ Ａ、Ｐａｓｈｋｏｕｌｏｖ Ｄ、Ｖｉｌｌａｎｉ ＭＥ、Ｔｒａｍｏｎｔａｎｏ Ａ、Ｂｅｎｖｅｎｕｔｏ Ｅ.「Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ｓｔａｂｌｅ ｃｙｔｏｐｌａｓｍｉｃ ｉｎｔｒａｂｏｄｉｅｓ ｗｉｔｈ ｄｅｓｉｇｎｅｄ ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ」、Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ.２００３年７月４日；３３０（２）：３２３～３２も参照されたい）。

【０１０８】

イントラボディは、現存するハイブリドーマクローンからそれぞれのｃＤＮＡをクローニングすることにより作製することができる、又はより簡便には、新たなｓｃＦｖ／Ｆａｂを、始めから抗体をコードする必要な遺伝子をもたらすファージディスプレイ等、ｉｎ ｖｉｔｒｏディスプレイ技法から選択し、抗体の精細な特異性をより詳細にあらかじめ設計すること（ｐｒｅｄｅｓｉｇｎ）を可能にすることができる。加えて、細菌、酵母、哺乳動物細胞表面ディスプレイ及びリボソームディスプレイを用いることができる。しかし、特異的抗体の選択のための最も一般的に使用されるｉｎ ｖｉｔｒｏディスプレイ系は、ファージディスプレイである。パニング（親和性選択）と呼ばれる手順において、組換え抗体ファージが、抗原と抗体ファージレパートリーとのインキュベーションによって選択される。このプロセスは、数回反復され、ほぼすべての可能な標的に対する特異的抗原結合剤を含む濃縮された抗体レパートリーをもたらす。現在まで、ｉｎ ｖｉｔｒｏアセンブルされた組換えヒト抗体ライブラリーは、既に、数千種の新規組換え抗体断片を生じた。細胞質のイントラボディによる特異的タンパク質ノックダウンのための必要条件は、抗原が、抗体結合により中和／不活性化されることであることに留意されたい。適した抗体を作製するための５種の異なるアプローチが出現した：１）酵母等の真核生物及び大腸菌等の原核生物における機能的イントラボディのＩｎ ｖｉｖｏ選択（抗原依存的及び非依存的）；２）サイトゾル安定性を改善するための抗体融合タンパク質の作製；３）サイトゾル安定性を改善するための特殊フレームワークの使用（例えば、安定抗体フレームワークにおけるＣＤＲのグラフト又は合成ＣＤＲの導入による）；４）サイトゾル安定性改善のためのシングルドメイン抗体の使用；並びに５）ジスルフィド結合不含安定イントラボディの選択。これらのアプローチは、上述されているＭａｒｓｃｈａｌｌ、Ａ．Ｌら、ｍＡｂｓ ２０１５にとりわけ詳述されている。

【０１０９】

イントラボディに最も一般的に使用されるフォーマットは、完全ＩｇＧ又はＦａｂ分子の２本の抗体鎖を別々に発現及びアセンブリする必要を回避するための、短い可動性リンカー配列（しばしば（Ｇｌｙ４Ｓｅｒ）３）によって一体に保持されるＨ及びＬ鎖可変抗体ドメイン（ＶＨ及びＶＬ）からなるｓｃＦｖである。或いは、重鎖のＣ１ドメイン及び軽鎖の定常領域をさらに含むＦａｂフォーマットが使用されてきた。近年、イントラボディの新たな可能なフォーマットであるｓｃＦａｂについて記載された。ｓｃＦａｂフォーマットは、細胞内発現ベクターへの利用できるＦａｂ遺伝子のより容易なサブクローニングの見込みがあるが、今後の課題としては、十分に確立されたｓｃＦｖフォーマットを上

回る何らかの利点をもたらすものであるかが挙げられる。ｓｃＦｖ及びＦａｂに加えて、イントラボディとして二特異性フォーマットが使用されてきた。ＥＲに標的化された二特異性Ｔｉｅ－２×ＶＥＧＦＲ－２抗体は、単一特異性抗体対応物と比較して延長された半減期を実証した。関連する単一特異性抗体の別個の特色、即ち、自己リン酸化及びリガンド結合の阻害を組み合わせる、上皮増殖因子の細胞内及び細胞外エピトープを同時に認識するための特殊フォーマットとして、二特異性膜貫通イントラボディが開発された。

【０１１０】

細胞質発現に特に適した別のイントラボディフォーマットは、ラクダに由来する、又は１個のヒトＶＨドメイン又はヒトＶＬドメインからなる、シングルドメイン抗体（ナノボディとも呼ばれる）である。このようなシングルドメイン抗体は多くの場合、有利な特性、例えば、高い安定性；優れた溶解性；ライブラリークローニング及び選択の容易さ；大腸菌及び酵母における高い発現収率を有する。

【０１１１】

イントラボディ遺伝子は、発現プラスミドによるトランスフェクション又は組換えウイルスによるウイルス形質導入後に、標的細胞の内側で発現され得る。典型的に、選択は、最適なイントラボディトランスフェクション及び産生レベルの達成を目標とする。トランスフェクション及びその後のイントラボディ産生の成功は、産生された抗体のイムノブロット検出によって解析することができるが、正確なイントラボディ／抗原相互作用の評価のため、対応する抗原及びイントラボディ発現プラスミドを一過的にコトランスフェクトされたＨＥＫ２９３細胞抽出物の共免疫沈降を使用することができる。

【０１１２】

本発明による細胞におけるＳｕｖ３９ｈ１の阻害はまた、Ｓｕｖ３９ｈ１の発現又は活性を阻害又は遮断するアプタマーを用いて達成され得る。アプタマーは、分子認識の観点から抗体の代替を表す分子のクラスである。アプタマーは、高い親和性及び特異性で、標的分子の実質的にいかなるクラスも認識する能力を有するオリゴヌクレオチド（ＤＮＡ若しくはＲＮＡ）又はオリゴペプチド配列である。

【０１１３】

オリゴヌクレオチドアプタマーは、Ｔｕｅｒｋ　Ｃ．及びＧｏｌｄ　Ｌ、１９９０に記載されている通り、ランダム配列ライブラリーの試験管内進化法（Ｓｙｓｔｅｍａｔｉｃ　Ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｌｉｇａｎｄｓ　ｂｙ　Ｅｘｐｏｎｅｎｔｉａｌ　ｅｎｒｉｃｈｍｅｎｔ（ＳＥＬＥＸ））によって単離することができる。ランダム配列ライブラリーは、ＤＮＡのコンビナトリアル化学合成によって得ることができる。このライブラリーにおいて、各メンバーは、最終的に化学修飾されている、特有の配列の直鎖状オリゴマーである。分子のこのクラスの可能な修飾、使用及び利点は、Ｊａｙａｓｅｎａ　Ｓ．Ｄ．１９９９に概説されている。

【０１１４】

ペプチドアプタマーは、ツーハイブリッド方法によってコンビナトリアルライブラリーから選択される大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）チオレドキシンＡ等、プラットフォームタンパク質によってディスプレイされる立体構造的に制約された抗体可変領域からなる（Ｃｏｌａｓ　Ｐ、Ｃｏｈｅｎ　Ｂ、Ｊｅｓｓｅｎ　Ｔ、Ｇｒｉｓｈｉｎａ　Ｉ、ＭｃＣｏｙ　Ｊ、Ｂｒｅｎｔ　Ｒ.「Ｇｅｎｅｔｉｃ　ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ　ｏｆ　ｐｅｐｔｉｄｅ　ａｐｔａｍｅｒｓ　ｔｈａｔ　ｒｅｃｏｇｎｉｚｅ　ａｎｄ　ｉｎｈｉｂｉｔ　ｃｙｃｌｉｎ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　ｋｉｎａｓｅ　２」、Ｎａｔｕｒｅ．１９９６年４月１１日；３８０（６５７４）：５４８～５０）。

【０１１５】

本発明による細胞におけるＳｕｖ３９ｈ１の阻害はまた、アフィボディ分子を用いて達成され得る。アフィボディは、多数の標的タンパク質又はペプチドに高親和性で結合するように操作された低分子タンパク質であり、モノクローナル抗体を模倣しているため、抗体模倣物のファミリーのメンバーである（概説については、Ｌｏｆｂｌｏｍ　Ｊ、Ｆｅｌｄｗｉｓｃｈ　Ｊ、Ｔｏｌｍａｃｈｅｖ　Ｖ、Ｃａｒｌｓｓｏｎ　Ｊ、Ｓｔａｈｌ　Ｓ、Ｆ

ｒｅｊｄ ＦＹ．Ａｆｆｉｂｏｄｙ ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ：ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｆｏｒ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ，ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ ａｎｄ ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｃａｌ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ．ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．２０１０年６月 １８；５８４（１２）：２６７０～８０を参照）。アフィボディ分子は、ブドウ球菌プロテインＡの免疫グロブリン結合領域内のＢドメインの操作された変異体（Ｚドメイン）に基づいており、理論上、所定の標的に対して特異的に結合する。アフィボディ分子ライブラリーは、一般的には、Ｚドメインの元のＦｃ結合表面を構成するヘリックス１及び２のアミノ酸１３位のコンビナトリアルランダム化によって構築される。ライブラリーは、典型的には、ファージ上に提示され、続いて、所望の標的に対してバイオパニングが行われている。プライマリーの親和性を増加させる場合には、親和性成熟は、一般的には、バインダーの改善をもたらし、ヘリックスシャッフリング又は配列アラインメントのいずれかと指向性コンビナトリアル変異誘発とによって達成され得る。変化した結合表面を持つ新しく同定された分子は、興味深い特性を有する特異な例外も報告されているが、一般的には、元のらせん構造並びに高い安定性を維持する。アフィボディ分子は、サイズが小さく折り畳み特性が速やかであるため、化学ペプチド合成により生成することができる。

【０１１６】

本発明の他の実施形態では、Ｓｕｖ３９ｈ１活性の阻害は、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）、例えば、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）低分子ヘアピン型ＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）又はリボザイムを使用する遺伝子ノックダウンによる遺伝子抑止（ｒｅｐｒｅｓｓｉｏｎ）／抑制（ｓｕｐｐｒｅｓｓｉｏｎ）によって達成することができる。ｓｉＲＮＡ技術は、遺伝子から転写されるｍＲＮＡのヌクレオチド配列と相同な配列、及びヌクレオチド配列に相補的な配列を有する二本鎖ＲＮＡ分子を利用するＲＮＡｉに基づくものを含む。ｓｉＲＮＡは、一般的には、遺伝子から転写されるｍＲＮＡの１つの領域と相同／相補的であるか、又は異なる領域と相同／相補的である複数のＲＮＡ分子を含むｓｉＲＮＡであり得る。

【０１１７】

アンチセンスＲＮＡ分子及びアンチセンスＤＮＡ分子を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドは、Ｈ３Ｋ９－ヒストンメチルトランスフェラーゼＳｕｖ３９ｈ１の翻訳を直接的に遮断するように作用し、よって、タンパク質翻訳を防止し又はｍＲＮＡ分解を増加させ、よって、Ｈ３Ｋ９－ヒストンメチルトランスフェラーゼＳＵＶ３９Ｈ１のレベル、よって、細胞におけるその活性を減少させるであろう。例えば、少なくとも約１５塩基の、Ｈ３Ｋ９－ヒストンメチルトランスフェラーゼＳＵＶ３９Ｈ１をコードするｍＲＮＡ転写物配列の特有の領域に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを、例えば、従来ホスホジエステル技法により合成し、例えば、静脈内注射又は注入により投与することができる。その配列が公知である遺伝子の遺伝子発現を特異的に阻害するためのアンチセンス技法を使用するための方法は、当技術分野で周知である（例えば、米国特許第６，５６６，１３５号；同第６，５６６，１３１号；同第６，３６５，３５４号；同第６，４１０，３２３号；同第６，１０７，０９１号；同第６，０４６，３２１号；及び同第５，９８１，７３２号を参照）。

【０１１８】

本明細書で使用される場合の「ＲＮＡ干渉剤」は、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）によって標的バイオマーカー遺伝子の発現を干渉又は阻害する任意の薬剤として定義される。そのようなＲＮＡ干渉剤としては、限定するものではないが、本発明の標的遺伝子（例えばＳｕｖ３９ｈ１）に相同であるＲＮＡ分子を含む核酸分子、又はその断片、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、及びＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）によって標的核酸の発現を干渉又は阻害する小分子が挙げられる。

【０１１９】

低分子阻害性ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）も、本発明における使用のための発現の阻害剤として機能することができる。Ｈ３Ｋ９－ヒストンメチルトランスフェラーゼＳＵＶ３９Ｈ１遺伝子発現が特異的に阻害されるように、低分子二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）又は低分子二本鎖ＲＮＡの産生を引き起こすベクター若しくは構築物と対象又は細胞を接触させるこ

とにより、Ｈ３Ｋ９－ヒストンメチルトランスフェラーゼＳＵＶ３９Ｈ１遺伝子発現を低下させることができる（即ち、ＲＮＡ干渉又はＲＮＡｉ）。適切なｄｓＲＮＡ又はｄｓＲＮＡコードベクターを選択するための方法は、その配列が公知である遺伝子に関して、当技術分野で周知である（例えば、Ｔｕｓｃｈｌ、Ｔ．ら（１９９９）；Ｅｌｂａｓｈｉｒ、Ｓ．Ｍ．ら（２００１）；Ｈａｎｎｏｎ、ＧＪ．（２００２）；ＭｃＭａｎｕｓ、ＭＴ．ら（２００２）；Ｂｒｕｍｍｅｌｋａｍｐ、ＴＲ．ら（２００２）；米国特許第６，５７３，０９９号及び同第６，５０６，５５９号；並びに国際特許公開番号、国際公開第０１／３６６４６号、国際公開第９９／３２６１９号及び国際公開第０１／６８８３６号を参照）。本発明のｓｉＲＮＡのホスホジエステル結合の全体又は部分は、有利に保護される。この保護は一般に、当技術分野で公知の方法を使用した化学的経路により実行される。ホスホジエステル結合は、例えば、チオール若しくはアミン官能基により又はフェニル基により保護され得る。本発明のｓｉＲＮＡの５’及び／又は３’端も、例えば、ホスホジエステル結合を保護するための上述の技法を使用して、有利に保護される。ｓｉＲＮＡ配列は、少なくとも１２個の近接ジヌクレオチド又はその誘導体を有利に含む。

【０１２０】

本明細書において、本核酸配列に関する用語「ｓｉＲＮＡ誘導体」は、エリスロポエチン又はその断片と少なくとも９０％、好ましくは、少なくとも９５％、例として、少なくとも９８％、より好ましくは、少なくとも９８％の同一性のパーセンテージを有する核酸を指す。

【０１２１】

本明細書において、２種の核酸配列の間の表現「同一性のパーセンテージ」は、前記配列の最良のアライメントにより得られる、比較されるべき２種の配列の間の同一核酸のパーセンテージを意味し、このパーセンテージは、純粋に統計的であり、これら２種の配列の間の差は、核酸配列にわたってランダムに拡散される。本明細書において、「最良のアライメント」又は「最適なアライメント」は、決定される同一性のパーセンテージ（後述を参照）が最高であるアライメントを意味する。２種の核酸配列の間の配列比較は通常、最良のアライメントに従って以前に整列されたこれらの配列を比較することにより実現される；この比較は、類似性の局所的領域を同定及び比較するために、比較のセグメントにおいて実現される。比較を行うための最良の配列アライメントは、手作業の他に、ＳＭＩＴＨ及びＷＡＴＥＲＭＡＮ（Ａｄ．Ａｐｐ．Ｍａｔｈ．２巻、４８２頁、１９８１年）によって開発された全般的相同性アルゴリズムを使用することにより、ＮＥＤＤＬＥＭＡＮ及びＷＵＮＳＣＨ（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ、４８巻、４４３頁、１９７０年）によって開発された局所的相同性アルゴリズムを使用することにより、ＰＥＡＲＳＯＮ及びＬＩＰＭＡＮ（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８５巻、２４４４頁、１９８８年）によって開発された類似性の方法を使用することにより、かかるアルゴリズム（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓソフトウェアパッケージ、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ、５７５ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｄｒ．Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ ＵＳＡにおけるＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＢＬＡＳＴ Ｐ、ＢＬＡＳＴ Ｎ、ＦＡＳＴＡ、ＴＦＡＳＴＡ）を使用したコンピュータソフトウェアを使用することにより、ＭＵＳＣＬＥ多重アライメントアルゴリズム（Ｅｄｇａｒ、Ｒｏｂｅｒｔ Ｃ、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ、３２巻、１７９２頁、２００４年）を使用することにより、実現することができる。最良の局所的アライメントを得るために、ＢＬＡＳＴソフトウェアを使用し得ることが好ましい。核酸の２種の配列の間の同一性パーセンテージは、最適に整列されたこれら２種の配列を比較することにより決定され、これら２種の配列の間の最適なアライメントを得るために、核酸配列は、参照配列に対する付加又は欠失を含むことができる。同一性のパーセンテージは、これら２種の配列の間の同一位置の数を決定し、この数を比較される位置総数で割り、得られた結果に１００を掛けて、これら２種の配列の間の同一性のパーセンテージを得ることにより計算される。

【０１２２】

ｓｈＲＮＡ（低分子ヘアピン型ＲＮＡ）も、本発明における使用のための発現の阻害剤

として機能することができる。ｓｈＲＮＡは、典型的には、短い（例えば１９～２５ヌクレオチド）アンチセンス鎖、それに続く５～９ヌクレオチドループ、及び類似のセンス鎖から構成される。或いは、センス鎖はヌクレオチドループ構造に先行していてもよく、アンチセンス鎖は後続していてもよい。

【０１２３】

リボザイムも、本発明における使用のための発現の阻害剤として機能することができる。リボザイムは、ＲＮＡの特異的切断を触媒することができる酵素的ＲＮＡ分子である。リボザイム作用の機構は、相補的標的ＲＮＡへのリボザイム分子の配列特異的ハイブリダイゼーションと、それに続くヌクレオチド鎖切断が関与する。Ｈ３Ｋ９－ヒストンメチルトランスフェラーゼＳＵＶ３９Ｈ１　ｍＲＮＡ配列のヌクレオチド鎖切断を特異的に且つ効率的に触媒する、操作されたヘアピン又はハンマーヘッド型モチーフリボザイム分子は、これにより、本発明の範囲内で有用である。いずれかの潜在的ＲＮＡ標的内の特異的リボザイム切断部位は、最初に、次の配列、ＧＵＡ、ＧＵＵ及びＧＵＣを典型的に含むリボザイム切断部位に関して標的分子をスキャンすることにより同定される。同定されると、切断部位を含有する標的遺伝子の領域に対応する約１５～２０個のリボヌクレオチドの間の短いＲＮＡ配列は、オリゴヌクレオチド配列を不適なものとし得る二次構造等の予測される構造的特色に関して評価することができる。

【０１２４】

発現の阻害剤として有用なアンチセンスオリゴヌクレオチド及びリボザイムの両方は、公知方法によって調製することができる。そのようなものは、例えば、固相ホスホラミダイト（ｐｈｏｓｐｈｏｒａｍａｄｉｔｅ）化学合成による等、化学合成のための技法を含む。或いは、アンチセンスＲＮＡ分子は、ＲＮＡ分子をコードするＤＮＡ配列のｉｎ　ｖｉｔｒｏ又はｉｎ　ｖｉｖｏ転写によって作製することができる。かかるＤＮＡ配列は、Ｔ７又はＳＰ６ポリメラーゼプロモーター等の適したＲＮＡポリメラーゼプロモーターを取り込む多種多様なベクターに取り込むことができる。本発明のオリゴヌクレオチドに対する様々な修飾は、細胞内安定性及び半減期を増加させる手段として導入することができる。可能な修飾として、分子の５’及び／又は３’端へのリボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドの隣接配列の付加、又はオリゴヌクレオチド骨格内のホスホジエステラーゼ連結ではなくホスホロチオエート又は２’－０－メチルの使用が挙げられるがこれらに限定されない。

【０１２５】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ及びリボザイムは、単独で、又はベクターと関連させてｉｎ　ｖｉｖｏで送達することができる。その最も広い意味では、「ベクター」は、細胞、好ましくは、Ｈ３Ｋ９－ヒストンメチルトランスフェラーゼＳＵＶ３９Ｈ１を発現する細胞へのアンチセンスオリゴヌクレオチド、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ又はリボザイム核酸の移入を容易にすることができるいずれかの媒体である。好ましくは、ベクターは、ベクターの非存在下で生じるであろう分解の程度と比べて低下した分解で、細胞に核酸を輸送する。一般に、本発明において有用なベクターとして、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ又はリボザイム核酸配列の挿入又は取り込みによって操作された、プラスミド、ファージミド、ウイルス、ウイルス又は細菌供給源に由来する他の媒体が挙げられるがこれらに限定されない。ウイルスベクターは、好まれる型のベクターであり、そのようなものとして、次のウイルス由来の核酸配列が挙げられるがこれらに限定されない：モロニーマウス白血病ウイルス、ハーベイマウス肉腫ウイルス、マウス乳房腫瘍ウイルス及びラウス肉腫ウイルス等のレトロウイルス；アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス；ＳＶ４０型ウイルス；ポリオーマウイルス；エプスタイン・バーウイルス；パピローマウイルス；ヘルペスウイルス；ワクシニアウイルス；ポリオウイルス；並びにレトロウイルス等のＲＡウイルス。名を挙げられていないが当技術分野で公知の他のベクターを容易に用いることができる。

【０１２６】

好まれるウイルスベクターは、非必須遺伝子が目的の遺伝子に置き換えられた、非細胞

壊死性真核生物ウイルスに基づく。非細胞壊死性ウイルスは、レトロウイルス（例えば、レンチウイルス）を含み、その生活環は、ゲノムウイルスＲＮＡからＤＮＡへの逆転写と、宿主細胞ＤＮＡへのその後のプロウイルス組み込みが関与する。レトロウイルスは、ヒト遺伝子療法治験に承認されている。複製欠損（即ち、所望のタンパク質の合成を方向付けることができるが、感染粒子を製造することができない）であるレトロウイルスが最も有用である。かかる遺伝的に変更されたレトロウイルス発現ベクターは、ｉｎ ｖｉｖｏでの遺伝子の高効率形質導入のための一般用途を有する。複製欠損レトロウイルスを産生するための標準プロトコル（プラスミドへの外因的遺伝的材料の取り込み、プラスミドによるパッケージング細胞株のトランスフェクション、パッケージング細胞株による組換えレトロウイルスの産生、組織培養培地からのウイルス粒子の収集、及びウイルス粒子による標的細胞の感染のステップを含む）は、Ｋｒｉｅｇｌｅｒ、１９９０及びＭｕｒｒｙ、１９９１）に提供されている。

【０１２７】

ある特定の適用に好まれるウイルスは、遺伝子療法におけるヒト使用に既に承認された二本鎖ＤＮＡウイルスである、アデノウイルス及びアデノ随伴（ＡＡＶ）ウイルスである。実際、それぞれ異なる組織指向性を有する、１２種の異なるＡＡＶ血清型（ＡＡＶ１～１２）が公知である（Ｗｕ、Ｚ Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ ２００６；１４：３１６～２７）。組換えＡＡＶは、依存性パルボウイルスＡＡＶ２に由来する（Ｃｈｏｉ、ＶＷ Ｊ Ｖｉｒｏｌ ２００５；７９：６８０１～０７）。アデノ随伴ウイルス１～１２型は、複製欠損となるように操作することができ、広範囲の細胞型及び種に感染することができる（Ｗｕ、Ｚ Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ ２００６；１４：３１６～２７）。これは、熱及び脂質溶媒安定性；造血細胞を含む多様な系列の細胞における高い形質導入頻度；並びに重感染阻害の欠如、よって、複数系列の形質導入を可能にすること等の利点をさらに有する。報告によれば、アデノ随伴ウイルスは、部位特異的方法でヒト細胞ＤＮＡに組み込み、これにより、レトロウイルス感染に特徴的な挿入突然変異誘発の可能性及び挿入遺伝子発現の可変性を最小化することができる。加えて、野生型アデノ随伴ウイルス感染は、選択圧の非存在下で１００を超える継代の間、組織培養において追跡され、アデノ随伴ウイルスゲノム組み込みが、相対的に安定な事象であることを暗示する。アデノ随伴ウイルスは、染色体外方法で機能することもできる。

【０１２８】

他のベクターは、プラスミドベクターを含む。プラスミドベクターは、当技術分野で広範に記載されており、当業者にとって周知である。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、１９８９を参照されたい。ここ数年間、プラスミドベクターは、ｉｎ ｖｉｖｏで細胞に抗原コード遺伝子を送達するためのＤＮＡワクチンとして使用されてきた。プラスミドベクターは、ウイルスベクターの多くの場合と同じ安全性懸念がないため、この用途に特に有利である。しかし、宿主細胞と適合性のプロモーターを有するこのようなプラスミドは、プラスミド内に作動可能にコードされる遺伝子からペプチドを発現することができる。一部の一般的に使用されるプラスミドは、ｐＢＲ３２２、ｐＵＣ１８、ｐＵＣ１９、ｐＲＣ／ＣＭＶ、ＳＶ４０及びｐＢｌｕｅＳｃｒｉｐｔを含む。他のプラスミドは、当業者にとって周知である。その上、プラスミドは、ＤＮＡの特異的断片を除去及び付加するための制限酵素及びライゲーション反応を使用して注文設計することができる。プラスミドは、種々の非経口的、粘膜及び外用経路によって送達することができる。例えば、ＤＮＡプラスミドは、筋肉内、皮内、皮下又は他の経路によって注射することができる。これは、鼻腔内スプレー又は液滴、直腸坐薬及び経口によって投与することもできる。これは、遺伝子銃を使用して上皮又は粘膜表面に投与することもできる。プラスミドは、水溶液中で、乾燥させて金粒子表面に、又はリポソーム、デンドリマー、渦巻形（ｃｏｃｈｌｅａｔｅ）送達媒体及びマイクロカプセル化が挙げられるがこれらに限定されない、別のＤＮＡ送達系と関連させて与えることができる。

【０１２９】

本発明に係るアンチセンスオリゴヌクレオチド、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ又はリボザイ

ム核酸配列は一般に、異種調節性領域、例えば、異種プロモーターの制御下に置かれる。プロモーターは、ミュラーグリア細胞、マイクログリア細胞、内皮細胞、ペリサイト細胞及びアストロサイトに特異的であり得る。例えば、ミュラーグリア細胞における特異的発現は、適したグルタミンシンテターゼ遺伝子のプロモーターにより得ることができる。プロモーターは、例として、ＣＭＶプロモーター等のウイルスプロモーター、又はいずれかの合成プロモーターとなることもできる。

【０１３０】

Ｓｕｖ３９ｈ１の遺伝子抑制又は破壊

本発明による細胞におけるＳｕｖ３９ｈ１の阻害はまた、例えば欠失、例えば遺伝子全体、エクソン若しくは領域の欠失、及び／又は外因性配列との置換え、及び／又は変異、例えば遺伝子内、典型的には遺伝子のエクソン内のフレームシフト変異若しくはミスセンス変異によって、Ｓｕｖ３９ｈ１遺伝子を抑制又は破壊することにより達成され得る。一部の実施形態では、Ｓｕｖ３９ｈ１タンパク質が発現されないように、又は非機能性であるように、破壊により未成熟終止コドンが遺伝子に組み込まれる。破壊は、一般的には、ＤＮＡレベルで実施される。破壊は、一般的には、永続的、不可逆的であるか、又は一時的ではない。

【０１３１】

一部の実施形態では、遺伝子破壊又は抑制は、遺伝子編集剤、例えば、遺伝子に特異的に結合又はハイブリダイズするＤＮＡターゲティング分子、例えば、ＤＮＡ結合タンパク質又はＤＮＡ結合核酸、又はそれを含む複合体、化合物、又は組成物を使用して達成される。一部の実施形態では、ＤＮＡターゲティング分子は、ＤＮＡ結合ドメイン、例えば、ジンクフィンガータンパク質（ＺＦＰ）ＤＮＡ結合ドメイン、転写活性化因子様タンパク質（ＴＡＬ）又はＴＡＬエフェクター（ＴＡＬＥ）ＤＮＡ結合ドメイン、ＣＲＩＳＰＲＤＮＡ結合ドメイン、又はメガヌクレアーゼからのＤＮＡ結合ドメインを含む。

【０１３２】

ジンクフィンガー、ＴＡＬＥ、及びＣＲＩＳＰＲシステムの結合ドメインは、あらかじめ決定したヌクレオチド配列に結合するように「操作」することができる。

【０１３３】

一部の実施形態では、ＤＮＡターゲティング分子、複合体、又は組合せは、ＤＮＡ結合分子と、１種又は複数の追加ドメイン、例えば、遺伝子の抑制又は破壊を促進するエフェクタードメインを含む。例えば、一部の実施形態では、遺伝子破壊は、ＤＮＡ結合タンパク質及び異種調節ドメイン又はその機能性断片を含む融合タンパク質によって実施される。

【０１３４】

典型的には、追加ドメインはヌクレアーゼドメインである。従って、一部の実施形態では、遺伝子破壊は、操作されたタンパク質、例えば、ヌクレアーゼ及びヌクレアーゼ含有複合体、又はヌクレアーゼなどの非特異的ＤＮＡ切断分子と融合又は複合体化した配列特異的ＤＮＡ結合ドメインで構成される融合タンパク質を使用する、遺伝子編集又はゲノム編集によって促進される。

【０１３５】

これらの標的キメラヌクレアーゼ又はヌクレアーゼ含有複合体は、標的二本鎖切断又は一本鎖切断を誘導し、エラーを起こしやすい非相同末端結合（ＮＨＥＪ）及び相同組換え修復（ＨＤＲ）を含む細胞ＤＮＡ修復メカニズムを刺激することによって、正確な遺伝的改変を実施する。一部の実施形態では、ヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼ、例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、ＴＡＬＥヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、ＲＮＡ誘導エンドヌクレアーゼ（ＲＧＥＮ）、例えば、ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）タンパク質、又はメガヌクレアーゼである。そのようなシステムは当技術分野において周知である（例えば、米国特許第８，６９７，３５９号；Ｓａｎｄｅｒ及びＪｏｕｎｇ（２０１４）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．３２：３４７～３５５；Ｈａｌｅら、（２００９）Ｃｅｌｌ １３９：９４５～９５６；Ｋａｒｇｉｎｏｖ及びＨａｎｎｏｎ（２０１０）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ ３７：７；米国特許出願公開第２０１４／００８７４２６号及び同２０１２／０１

７８１６９号；Ｂｏｃｈら、（２０１１）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．２９：１３５～１３６；Ｂｏｃｈら、（２００９）Ｓｃｉｅｎｃｅ ３２６：１５０９～１５１２；Ｍｏｓｃｏｕ及びＢｏｇｄａｎｏｖｅ（２００９）Ｓｃｉｅｎｃｅ ３２６：１５０１；Ｗｅｂｅｒら、（２０１１）ＰＬｏＳ Ｏｎｅ ６：ｅｌ９７２２；Ｌｉら、（２０１１）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．３９：６３１５～６３２５；Ｚｈａｎｇら、（２０１１）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．２９：１４９～１５３；Ｍｉｌｌｅｒら、（２０１１）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．２９：１４３～１４８；Ｌｉｎら、（２０１４）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．４２：ｅ４７を参照）。そのような遺伝子学的戦略は、当技術分野で周知の方法に従って、構成的発現系又は誘導性発現系を使用することができる。

【０１３６】

ＺＦＰ及びＺＦＮ；ＴＡＬ、ＴＡＬＥ、ＴＡＬＥＮ

一部の実施形態では、ＤＮＡターゲティング分子は、エフェクタータンパク質、例えばエンドヌクレアーゼに融合されたＤＮＡ結合タンパク質、例えば、１種又は複数のジンクフィンガータンパク質（ＺＦＰ）又は転写アクチベーター様タンパク質（ＴＡＬ）を含む。例としては、ＺＦＮ、ＴＡＬＥ及びＴＡＬＥＮが挙げられる。Ｌｌｏｙｄら、Ｆｒｏｎｔｉｅｒｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、４（２２１）、１～７（２０１３）を参照されたい。

【０１３７】

一部の実施形態では、ＤＮＡターゲティング分子は、配列特異的方法でＤＮＡに結合する１種又は複数のジンクフィンガータンパク質（ＺＦＰ）又はそのドメインを含む。ＺＦＰ又はそのドメインは、亜鉛イオンの配位によって構造が安定化される結合ドメイン内のアミノ酸配列の１種又は複数のジンクフィンガー領域を介して配列特異的方法でＤＮＡに結合する、タンパク質又はより大きなタンパク質内ドメインである。一般的に、ＺＦＰの配列特異性は、ジンクフィンガー認識ヘリックス上の４つのヘリックス位置（－１、２、３、及び６）でアミノ酸置換を行うことにより改変され得る。従って、一部の実施形態では、ＺＦＰ又はＺＦＰ含有分子は非天然であり、例えば、選択の標的部位に結合するように操作される。例えば、Ｂｅｅｒｌｉら、（２００２）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０：１３５～１４１；Ｐａｂｏら、（２００１）Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．７０：３１３～３４０；Ｉｓａｌａｎら、（２００１）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９：６５６～６６０；Ｓｅｇａｌら、（２００１）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１２：６３２～６３７；Ｃｈｏｏら、（２０００）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．１０：４１１～４１６を参照されたい。

【０１３８】

一部の実施形態では、ＤＮＡターゲティング分子は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）を形成するようにＤＮＡ切断ドメインに融合されたジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメインであるか、又はそれを含む。一部の実施形態において、融合タンパク質は、少なくとも１つのＩＩＳ型制限酵素由来の切断ドメイン（又は切断ハーフドメイン）と１つ又は複数のジンクフィンガー結合ドメインを含み、これらは操作されていても、操作されていなくてもよい。一部の実施形態では、切断ドメインは、ＩＩＳ型制限エンドヌクレアーゼＦｏｋ Ｉに由来する。例えば、米国特許第５，３５６，８０２号；同第５，４３６，１５０号及び同第５，４８７，９９４号；並びにＬｉら、（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：４２７５～４２７９；Ｌｉら、（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：２７６４～２７６８；Ｋｉｍら、（１９９４ａ）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：８８３～８８７；Ｋｉｍら、（１９９４ｂ）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９：３１，９７８～３１，９８２を参照されたい。

【０１３９】

一部の態様では、ＺＦＮは、例えば、標的遺伝子（即ちＳｕｖ３９ｈ１）のコード領域の所定の部位で、二本鎖切断（ＤＳＢ）を効率的に生成する。典型的な標的遺伝子領域は、エクソン、Ｎ末端領域をコードする領域、第１のエクソン、第２のエクソン、及びプロ

モーター又はエンハンサー領域を含む。一部の実施形態では、ＺＦＮの一過性発現は、操作された細胞における標的遺伝子の高効率的で永続的な破壊を促進する。特に、一部の実施形態では、ＺＦＮの送達により、５０％を超える効率で遺伝子が永続的に破壊される。多くの遺伝子特異的な操作されたジンクフィンガーが市販されている。例えば、Ｓａｎｇａｍｏ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｒｉｃｈｍｏｎｄ、ＣＡ、ＵＳＡ）は、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ、ＵＳＡ）との共同で、研究者がジンクフィンガーの構築と検証をすべて回避することができるジンクフィンガー構築用プラットフォーム（ＣｏｍｐｏＺｒ）を開発しており、何千ものタンパク質に対して特異的に標的化されたジンクフィンガーを提供する。Ｇａｊら、Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、２０１３、３１（７）、３９７～４０５。一部の実施形態では、市販のジンクフィンガーが使用されるか、又はカスタム設計される。（例えば、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈのカタログ番号ＣＳＴＺＦＮＤ、ＣＳＴＺＦＮ、ＣＴＩ１－１ＫＴ、及びＰＺＤ００２０を参照）。

【０１４０】

一部の実施形態では、ＤＮＡターゲティング分子は、天然の又は操作された（非天然の）転写活性化因子様タンパク質（ＴＡＬ）ＤＮＡ結合ドメイン、例えば、転写活性化因子様タンパク質エフェクター（ＴＡＬＥ）タンパク質を含む。例えば、米国特許出願第２０１１０３０１０７３号を参照されたい。一部の実施形態では、分子はＤＮＡ結合エンドヌクレアーゼであり、例えばＴＡＬＥ－ヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）である。一部の態様では、ＴＡＬＥＮは、ＴＡＬＥに由来するＤＮＡ結合ドメイン及び核酸標的配列を切断するヌクレアーゼ触媒ドメインを含む融合タンパク質である。一部の実施形態では、ＴＡＬＥ ＤＮＡ結合ドメインは、標的抗原及び／又は免疫抑制分子をコードする遺伝子内の標的配列に結合するように操作されている。例えば、一部の態様では、ＴＡＬＥ ＤＮＡ結合ドメインは、ＣＤ３８及び／又はアデノシン受容体、例えばＡ２ＡＲを標的とすることができる。

【０１４１】

一部の実施形態では、ＴＡＬＥＮは、遺伝子内の標的配列を認識し切断する。一部の態様では、ＤＮＡの切断により二本鎖の切断が生じる。一部の態様では、切断は、相同組換え又は非相同末端結合（ＮＨＥＪ）の率を刺激する。一般的に、ＮＨＥＪは、切断部位のＤＮＡ配列に変化が生じることが多い不完全な修復プロセスである。一部の態様では、修復メカニズムは、直接的な再ライゲーションを介して（Ｃｒｉｔｃｈｌｏｗ及びＪａｃｋｓｏｎ、Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｓｃｉ．１９９８ Ｏｃｔ；２３（１０）：３９４～８）、又はいわゆるマイクロホモロジー媒介型末端結合を介して、２つのＤＮＡ末端に残っているものが再連結することを含む。一部の実施形態では、ＮＨＥＪを介した修復により小さな挿入又は欠失が生じ、それを使用して遺伝子を破壊し、それにより抑制することができる。一部の実施形態では、改変は、少なくとも１つのヌクレオチドの置換、欠失、又は付加であり得る。一部の態様では、切断誘発性突然変異生成事象、即ちＮＨＥＪ事象に連続する突然変異生成事象が生じた細胞は、当技術分野で周知の方法によって同定及び／又は選択することができる。

【０１４２】

ＴＡＬＥリピートは、Ｓｕｖ３９ｈ１遺伝子を特異的に標的とするように構築することができる（Ｇａｊら、Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、２０１３、３１（７）、３９７～４０５）。１８，７４０個のヒトタンパク質コード遺伝子を標的とするＴＡＬＥＮのライブラリーが構築されている（Ｋｉｍら、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ．３１、２５１～２５８（２０１３））。カスタム設計されたＴＡＬＥアレイがＣｅｌｌｅｃｔｉｓ Ｂｉｏｒｅｓｅａｒｃｈ（Ｐａｒｉｓ、Ｆｒａｎｃｅ）、Ｔｒａｎｓｐｏｓａｇｅｎ Ｂｉｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ（Ｌｅｘｉｎｇｔｏｎ、ＫＹ、ＵＳＡ）、及びＬｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ、ＵＳＡ）から市販されている。特に、ＣＤ３８を標的とするＴＡＬＥＮが市販されている（ワールドワイドウェブ上のｗｗｗ．ｇｅｎｅｃｏｐｏｅｉａ．ｃｏｍ／ｐｒｏｄ

ｕｃｔ／ｓｅａｒｃｈ／ｄｅｔａｉｌ．ｐｈｐ？ｐｒｔ＝２６＆ｃｉｄ＝＆ｋｅｙ＝ＨＴＮ２２２８７０から入手可能なＧｅｎｃｏｐｏｅｉａ、カタログ番号ＨＴＮ２２２８７０－１、ＨＴＮ２２２８７０－２、及びＨＴＮ２２２８７０－３を参照）。例示的な分子は、例えば、米国特許出願第２０１４／０１２０６２２号及び同第２０１３／０３１５８８４号に記載されている。

【０１４３】

一部の実施形態では、ＴＡＬＥＮは、１種又は複数のプラスミドベクターによってコードされている導入遺伝子として導入される。一部の態様では、プラスミドベクターは、前記ベクターを受け取った細胞の同定及び／又は選択を提供する選択マーカーを含むことができる。

【０１４４】

ＲＧＥＮ（ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステム）

遺伝子抑制は、１種又は複数のＤＮＡ結合核酸を使用して、例えば、ＲＮＡガイドエンドヌクレアーゼ（ＲＧＥＮ）を介した破壊、又は別のＲＮＡガイドエフェクター分子による他の形態の抑制により実施することができる。例えば、一部の実施形態では、遺伝子抑制は、クリスパー（ＣＲＩＳＰＲ）及びＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質を使用して実施することができる。Ｓａｎｄｅｒ ａｎｄ Ｊｏｕｎｇ、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、３２（４）：３４７～３５５を参照されたい。

【０１４５】

一般的に、「ＣＲＩＳＰＲシステム」とは、Ｃａｓ遺伝子をコードする配列、ｔｒａｃｒ（トランス活性化ＣＲＩＳＰＲ）配列（例えば、ｔｒａｃｒＲＮＡ若しくは活性の部分的なｔｒａｃｒＲＮＡ）、ｔｒａｃｒ－ｍａｔｅ配列（内因性ＣＲＩＳＰＲシステムの状況において「ダイレクトリピート」及びｔｒａｃｒＲＮＡで処理した部分的ダイレクトリピート）、ガイド配列（内因性ＣＲＩＳＰＲシステムの状況においては「スペーサー」とも呼ばれる）、並びに／或いはＣＲＩＳＰＲ遺伝子座に由来する他の配列及び転写物を含む、ＣＲＩＳＰＲ関連（「Ｃａｓ」）遺伝子の発現に関与するか、又はその活性を誘導する転写物及び他のエレメントを包括的に意味する。

【０１４６】

典型的には、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓヌクレアーゼ又はＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓヌクレアーゼシステムは、ＤＮＡに配列特異的に結合する非コーディングＲＮＡ分子（ガイド）ＲＮＡ、及びヌクレアーゼ機能（例えば、２種のヌクレアーゼドメイン）を有するＣＲＩＳＰＲタンパク質を含む。ＣＲＩＳＰＲシステムの１種又は複数のエレメントは、Ｉ型、ＩＩ型、又はＩＩＩ型のＣＲＩＳＰＲシステム、例えばＣａｓヌクレアーゼに由来し得る。ＣＲＩＳＰＲタンパク質は、ｃａｓ酵素、例えば９であることが好ましい。Ｃａｓ酵素は、この分野では周知である。例えば、化膿性連鎖球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）Ｃａｓ９タンパク質のアミノ酸配列は、ＳｗｉｓｓＰｒｏｔデータベースにおいてアクセッション番号Ｑ９９ＺＷ２で確認することができる。一部の実施形態では、ＣａｓヌクレアーゼＣａｓ及びｇＲＮＡは細胞に導入される。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲシステムは、本明細書で論じているように、標的部位でのＤＳＢと、その後の破壊を誘導する。他の実施形態では、「ニッカーゼ」と考えられるＣａｓ９変異体を使用して、標的部位で一本鎖にニックを入れることができる。ペアのニッカーゼもまた、例えば、特異性を改善するために使用され、それぞれ、一対の異なるｇＲＮＡ標的配列により指示される。さらに別の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９を異種エフェクタードメイン、例えば転写リプレッサーに融合させて遺伝子発現に影響を及ぼすことができる。

【０１４７】

一般的に、ＣＲＩＳＰＲシステムは、標的配列の部位でＣＲＩＳＰＲ複合体の形成を促進するエレメントを特徴とする。典型的には、ＣＲＩＳＰＲ複合体の形成の状況において、「標的配列」は、一般的には、ガイド配列が相補性を有するように設計される配列を意味し、そこでは、標的配列とガイド配列の間のハイブリダイゼーションによりＣＲＩＳＰＲ複合体の形成が促進される。ハイブリダイゼーションを引き起こし、ＣＲＩＳＰＲ複合

体の形成を促進するのに十分な相補性があれば、必ずしも完全な相補性は必要とされない。標的配列は、任意のポリヌクレオチド、例えばＤＮＡ又はＲＮＡポリヌクレオチドなどを含んでいてもよい。一般的に、標的配列を含む標的遺伝子座への組換えに使用することができる配列又はテンプレートは、「編集テンプレート」又は「編集ポリヌクレオチド」又は「編集配列」と呼ばれる。一部の態様では、外因性テンプレートポリヌクレオチドは、編集テンプレートと呼ぶことができる。一部の態様では、組換えは相同組換えである。

【０１４８】

一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲシステムの要素の発現が１つ又は複数の標的部位でのＣＲＩＳＰＲ複合体の形成を指示するように、ＣＲＩＳＰＲシステムの１種又は複数のエレメントの発現を駆動する１種又は複数のベクターが細胞に導入される。例えば、Ｃａｓ酵素、ｔｒａｃｒ－ｍａｔｅ配列に連結されたガイド配列、及びｔｒａｃｒ配列は、それぞれ、別々のベクター上の別々の調節エレメントに作動可能に連結させることができる。或いは、同一の又は異なる調節エレメントから発現される２種以上のエレメントを単一のベクター内で組み合わせ、１種又は複数の追加のベクターが第１のベクターに含まれないＣＲＩＳＰＲシステムの任意の成分を提供することができる。一部の実施形態では、単一のベクター内で組み合わされるＣＲＩＳＰＲシステムエレメントは、任意の適切な配向で配置され得る。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素、ガイド配列、ｔｒａｃｒ ｍａｔｅ配列、及びｔｒａｃｒ配列は、同一のプロモーターに作動可能に連結され、発現される。一部の実施形態では、ベクターは、Ｃａｓタンパク質などのＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に連結された調節エレメントを含む。

【０１４９】

一部の実施形態では、ガイド配列と組み合わせた（任意選択で複合体化した）ＣＲＩＳＰＲ酵素が細胞に送達される。典型的には、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９技術を使用して、操作された細胞におけるＳｕｖ３９ｈ１の遺伝子発現をノックダウンすることができる。例えば、Ｃａｓ９ヌクレアーゼ及びＳｕｖ３９ｈ１遺伝子に特異的なガイドＲＮＡは、例えば、レンチウイルス送達ベクター又は細胞に導入するための多くの公知の送達方法若しくはビヒクルのいずれか、例えば、Ｃａｓ９分子及びガイドＲＮＡを送達するための多くの公知の方法又はビヒクルのいずれかを使用して、細胞に導入することができる（以下も参照されたい）。

【０１５０】

遺伝子破壊分子及び複合体をコードする核酸の送達

一部の実施形態では、ＤＮＡ標的化分子、複合体、又は組合せをコードする核酸が細胞に投与又は導入される。典型的には、ウイルス及び非ウイルス系遺伝子導入方法を使用して、ＣＲＩＳＰＲ、ＺＦＰ、ＺＦＮ、ＴＡＬＥ、及び／又はＴＡＬＥＮシステムの成分をコードする核酸を培養中の細胞に導入することができる。

【０１５１】

一部の実施形態では、ポリペプチドは、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの細胞への導入の結果として、細胞においてｉｎ ｓｉｔｕで合成される。一部の態様では、ポリペプチドは細胞外で産生され、次いでそこに導入され得る。

【０１５２】

ポリヌクレオチド構築物を動物細胞に導入する方法は公知であり、非限定的な例としては、ポリヌクレオチド構築物が細胞のゲノムに組み込まれる安定形質転換法、ポリヌクレオチド構築物が細胞のゲノムに組み込まれない一過性形質転換法、及びウイルス媒介法が挙げられる。

【０１５３】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、例えば、組換えウイルスベクター（例えば、レトロウイルス、アデノウイルス）、リポソームなどにより細胞に導入され得る。一過性形質転換法としては、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、又は微粒子銃が挙げられる。核酸は、発現ベクターの形態で投与される。発現ベクターは、レトロウイルス発現ベクター、アデノウイルス発現ベクター、ＤＮＡプラスミド発現ベクター、

又はＡＡＶ発現ベクターであることが好ましい。

【０１５４】

核酸の非ウイルス送達方法としては、リポフェクション、ヌクレオフェクション、マイクロインジェクション、バイオリスティック、ビロソーム、リポソーム、イムノリポソーム、ポリカチオン又は脂質：核酸コンジュゲート、ネイキッドＤＮＡ、人工ビリオン、及び薬剤により増強されたＤＮＡの取り込みが挙げられる。リポフェクションは、例えば、米国特許第５，０４９，３８６号、同第４，９４６，７８７号、及び同第４，８９７，３５５号に記載されており、またリポフェクション試薬は市販されている（例えば、Ｔｒａｎｓｆｅｃｔａｍ（商標）及びＬｉｐｏｆｅｃｔｉｎ（商標））。ポリヌクレオチドの効果的な受容体認識リポフェクションに適したカチオン性脂質及び中性脂質は、Ｆｅｌｇｎｅｒ、国際公開第９１／１７４２４号；国際公開第９１／１６０２４号のものが挙げられる。送達は、細胞への送達（例えばｉｎ ｖｉｔｒｏ若しくはｅｘ ｖｉｖｏ投与）又は標的組織への送達（例えばｉｎ ｖｉｖｏ投与）であり得る。

【０１５５】

ＲＮＡ又はＤＮＡウイルス系システムは、遺伝子導入用のレトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴及び単純ヘルペスウイルスベクターを含む。

【０１５６】

遺伝子療法手順の総説については、Ａｎｄｅｒｓｏｎ、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５６：８０８～８１３（１９９２）；Ｎａｂｅｌ ＆ Ｆｅｌｇｎｅｒ、ＴＩＢＴＥＣＨ １１：２１１～２１７（１９９３）；Ｍｉｔａｎｉ ＆ Ｃａｓｋｅｙ、ＴＩＢＴＥＣＨ １１：１６２～１６６（１９９３）；Ｄｉｌｌｏｎ．ＴＩＢＴＥＣＨ １１：１６７～１７５（１９９３）；Ｍｉｌｌｅｒ、Ｎａｔｕｒｅ ３５７：４５５～４６０（１９９２）；Ｖａｎ Ｂｒｕｎｔ、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ６（１０）：１１４９～１１５４（１９８８）；Ｖｉｇｎｅ、Ｒｅｓｔｏｒａｔｉｖｅ Ｎｅｕｒｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ ８：３５～３６（１９９５）；Ｋｒｅｍｅｒ ＆ Ｐｅｒｒｉｃａｕｄｅｔ、Ｂｒｉｔｉｓｈ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｂｕｌｌｅｔｉｎ ５１（１）：３１～４４（１９９５）；Ｈａｄｄａｄａら、Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ ＩｍｍｕｎｏｌｏｇｙのＣｕｒｒｅｎｔ Ｔｏｐｉｃｓ、Ｄｏｅｒｆｌｅｒ及びＢｏｈｍ（編）（１９９５）；並びにＹｕら、Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ １：１３～２６（１９９４）を参照されたい。

【０１５７】

グルタチオン－５－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）、ベーターガラクトシダーゼ、ベーターグルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、ＨｃＲｅｄ、ＤｓＲｅｄ、シアン蛍光タンパク質（ＣＦＰ）、黄色蛍光タンパク質（ＹＦＰ）、及び青色蛍光タンパク質（ＢＦＰ）を含む自家蛍光タンパク質を含むが、これらに限定されないレポーター遺伝子を細胞に導入し、遺伝子産物の発現の変化又は改変を測定するためのマーカーとして機能する遺伝子産物をコードすることができる。

【０１５８】

<u>細胞調製</u>

細胞の単離は、当技術分野で周知の技術による１種又は複数の調製及び／又は非親和性系の細胞分離ステップを含む。一部の例では、１種又は複数の試薬の存在下で細胞を洗浄、遠心分離、及び／又はインキュベートして、例えば、望ましくない成分を除去し、所望の成分を濃縮し、特定の試薬に対して感受性のある細胞を溶解又は除去する。一部の例では、細胞は、１つ又は複数の特性、例えば、密度、付着特性、サイズ、感受性、及び／又は特定の成分に対する耐性に基づいて分離される。

【０１５９】

一部の実施形態では、細胞調製は、単離、インキュベーション、及び／又は操作の前又は後のいずれかに、細胞を凍結するための、例えば凍結保存するためのステップを含む。一部の態様では、様々な公知の凍結溶液及びパラメーターのうちのいずれかを使用することができる。

【０１６０】
典型的には、細胞は、遺伝子操作及び／又はＳｕｖ３９ｈ１阻害の前に、又はそれに関連してインキュベートされる。
【０１６１】
インキュベーションステップは、培養、インキュベーション、刺激、活性化、増大化及び／又は増殖を含み得る。
【０１６２】
本発明によるＳｕｖ３９ｈ１の阻害はまた、標的患者への細胞の注射の後にｉｎ　ｖｉｖｏで達成することができる。典型的には、ｓｕｖ３９ｈ１の阻害は、前述のような薬理学的阻害剤を使用して実施される。
【０１６３】
前述の方法によるＳｕｖ３９ｈ１の阻害はまた、刺激、活性化、及び／又は増大化のステップ中に実施することもできる。例えば、ＰＢＭＣ、又は精製Ｔ細胞、又は精製ＮＫ細胞、又は精製リンパ前駆細胞は、患者への養子移入の前に、Ｓｕｖ３９ｈ１の薬理学的阻害剤の存在下で、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで増大化させる。一部の実施形態では、組成物又は細胞は、刺激条件又は刺激剤の存在下でインキュベートされる。そのような条件としては、集団内の細胞の増殖、増大化、活性化、及び／又は生存を誘発するように、抗原曝露を模倣するように、並びに／或いは遺伝子操作のために、例えば遺伝子操作された抗原受容体の導入のために細胞を刺激するように設計された条件が挙げられる。
【０１６４】
インキュベーション条件は、特定の培地、温度、酸素含有量、二酸化炭素含有量、時間、薬剤、例えば栄養素、アミノ酸、抗生物質、イオン、及び／又は刺激因子、例えばサイトカイン、ケモカイン、抗原、結合パートナー、融合タンパク質、組換え可溶性受容体、並びに細胞を活性化するように設計された他の薬剤のうちの１種又は複数を含むことができる。
【０１６５】
一部の実施形態では、刺激条件又は薬剤は、ＴＣＲ複合体の細胞内シグナル伝達ドメインを活性化することが可能な１種又は複数の薬剤、例えばリガンドを含む。一部の態様では、薬剤は、Ｔ細胞においてＴＣＲ／ＣＤ３細胞内シグナル伝達カスケードをオンにするか又は開始する。そのような薬剤は、抗体、例えばＴＣＲ成分及び／又は共刺激受容体に特異的な抗体、例えばビーズなどの固相担体に結合された抗ＣＤ３、抗ＣＤ２８、及び／又は１種若しくは複数のサイトカインを含むことができる。任意選択で、増大化方法は、抗ＣＤ３及び／又は抗ＣＤ２８抗体を培地に（例えば、少なくとも約０．５ｎｇ／ｍＬの濃度で）添加するステップをさらに含むことができる。一部の実施形態では、刺激剤は、ＩＬ－２及び／又はＩＬ－１５、例えば、少なくとも約１０単位／ｍＬのＩＬ－２濃度を含む。
【０１６６】
一部の態様では、インキュベーションは、Ｒｉｄｄｅｌｌらへの米国特許第６，０４０，１７７号、Ｋｌｅｂａｎｏｆｆら、Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２０１２；３５（９）：６５１～６６０、Ｔｅｒａｋｕｒａら、Ｂｌｏｏｄ．２０１２；１：７２～８２、及び／又はＷａｎｇら、Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２０１２、３５（９）：６８９～７０１に記載されているような技術に従って実施される。
【０１６７】
一部の態様では、Ｔ細胞は、培養開始組成物にフィーダー細胞、例えば非分裂末梢血単核球（ＰＢＭＣ）を（例えば、得られた細胞集団が、増大させようとする初期集団内でそれぞれのＴリンパ球につき少なくとも約５個、１０個、２０個、若しくは４０個又はそれより多くのＰＢＭＣフィーダー細胞を含有するように）添加し；培養物を（例えば、Ｔ細胞の数を増大させるのに十分な時間）インキュベートすることによって増大される。一部の態様では、非分裂フィーダー細胞は、ガンマ線照射ＰＢＭＣフィーダー細胞を含むことができる。一部の実施形態では、ＰＢＭＣは約３０００～３６００ｒａｄの範囲のガンマ

線が照射され、細胞分裂が遮断される。一部の態様では、フィーダー細胞は、Ｔ細胞の集団を添加する前に培地に添加される。

【０１６８】

一部の実施形態では、刺激条件は、ヒトＴリンパ球の成長に適した温度、例えば、少なくとも約２５℃、一般に少なくとも約３０℃、一般に３７℃又は約３７℃を含む。任意選択で、インキュベーションは、非分裂ＥＢＶ形質転換リンパ芽球細胞（ＬＣＬ）をフィーダー細胞として添加することをさらに含んでいてもよい。ＬＣＬは、約６０００～１０，０００ｒａｄの範囲のガンマ線が照射され得る。一部の態様におけるＬＣＬフィーダー細胞は、任意の適切な量で、例えば、少なくとも約１０：１の、ＬＣＬフィーダー細胞の初期Ｔリンパ球に対する比で提供される。

【０１６９】

実施形態では、抗原特異的Ｔ細胞、例えば、抗原特異的ＣＤ４＋及び／又はＣＤ８＋Ｔ細胞は、ナイーブ又は抗原特異的Ｔリンパ球を抗原で刺激することにより得られる。例えば、サイトメガロウイルス抗原に対する抗原特異的Ｔ細胞株又はクローンは、感染した対象からＴ細胞を分離し、細胞を同一抗原でｉｎ　ｖｉｔｒｏで刺激することにより産生され得る。

【０１７０】

一部の態様では、方法は、操作された細胞又は操作されている細胞の表面での１種又は複数のマーカーの発現を評価することを含む。一実施形態では、方法は、養子細胞療法により標的化されることが求められる１種又は複数の標的抗原（例えば、遺伝子操作された抗原受容体によって認識される抗原）の表面発現を、例えば、親和性に基づく検出方法により、例えばフローサイトメトリーにより評価することを含む。

【０１７１】

<u>細胞遺伝子操作のためのベクター及び方法</u>

一部の態様では、遺伝子操作は、遺伝子操作された成分又は細胞に導入するための他の成分をコードする核酸、例えば、遺伝子破壊タンパク質又は核酸をコードする成分の導入を包含する。

【０１７２】

一般的に、ＣＡＲの免疫細胞（例えばＴ細胞）への操作は、形質導入及び増大化が可能なように細胞を培養することが必要である。形質導入は各種方法を利用することができるが、クローン化により増大し、生存し続ける操作された細胞でＣＡＲの発現を持続させるためには安定した遺伝子導入が必要とされる。

【０１７３】

一部の実施形態では、遺伝子導入は、細胞成長、例えばＴ細胞の成長、増殖、及び／又は活性化を最初に刺激し、続いて活性化された細胞の形質導入、並びに臨床での適用に十分な数への培養の増大化によって達成される。

【０１７４】

遺伝子操作された成分、例えば抗原受容体、例えばＣＡＲを導入するための各種方法は周知であり、提供した方法及び組成物を用いて使用することができる。例示的な方法としては、ウイルス、例えばレトロウイルス又はレンチウイルス、形質導入、トランスポゾン、及びエレクトロポレーションを介したものを含む、受容体をコードする核酸の移入のための方法が挙げられる。

【０１７５】

一部の実施形態では、組換え核酸は、組換え感染性ウイルス粒子、例えば、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）に由来するベクターを使用して細胞に移入される。一部の実施形態では、組換え核酸は、組換えレンチウイルスベクター又はレトロウイルスベクター、例えばガンマレトロウイルスベクターを使用してＴ細胞に移入される（例えば、Ｋｏｓｔｅら（２０１４）Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ　２０１４年4月　３．；Ｃａｒｌｅｎｓら（２０００）Ｅｘｐ　Ｈｅｍａｔｏｌ　２８（１０）：１１３７～４６；Ａｌｏｎｓｏ－Ｃａｍｉｎｏら（２０１３）Ｍｏｌ　Ｔｈ

ｅｒ Ｎｕｃｌ Ａｃｉｄｓ ２、ｅ９３；Ｐａｒｋら、Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１１年１１月；２９（１１）：５５０～５５７を参照）。

【０１７６】

一部の実施形態では、レトロウイルスベクター、例えば、モロニーマウス白血病ウイルス（ＭｏＭＬＶ）、骨髄増殖性肉腫ウイルス（ＭＰＳＶ）、マウス胚性幹細胞ウイルス（ＭＥＳＶ）、マウス幹細胞ウイルス（ＭＳＣＶ）、脾フォーカス形成ウイルス（ＳＦＦＶ）、又はアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）に由来するレトロウイルスベクターは、長い末端リピート配列（ＬＴＲ）を有する。ほとんどのレトロウイルスベクターは、マウスレトロウイルスに由来する。一部の態様では、レトロウイルスは、任意の鳥類又は哺乳動物の細胞供給源に由来するものを含む。レトロウイルスは、典型的には両種指向性であり、両種指向性とは、レトロウイルスが、ヒトを含めたいくつかの種の宿主細胞に感染することができることを意味する。一実施形態では、発現させようとする遺伝子は、レトロウイルスｇａｇ配列、ｐｏｌ配列、及び／又はｅｎｖ配列に置き換わる。多数の例示的なレトロウイルス系が記載されている（例えば、米国特許第５，２１９，７４０号；同第６，２０７，４５３号；同第５，２１９，７４０号；Ｍｉｌｌｅｒ及びＲｏｓｍａｎ、（１９８９）ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ７：９８０～９９０；Ｍｉｌｌｅｒ，Ａ．Ｄ．、（１９９０）Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ １：５～１４；Ｓｃａｒｐａら、（１９９１）Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １８０：８４９～８５２；Ｂｕｒｎｓら、（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：８０３３～８０３７；及びＢｏｒｉｓ－Ｌａｗｒｉｅ及びＴｅｍｉｎ（１９９３）Ｃｕｒ．Ｏｐｉｎ．Ｇｅｎｅｔ．Ｄｅｖｅｌｏｐ．３：１０２～１０９）。

【０１７７】

レンチウイルス形質導入法もまた公知である。例示的な方法は、Ｗａｎｇら、（２０１２）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．３５（９）：６８９～７０１；Ｃｏｏｐｅｒら、（２００３）Ｂｌｏｏｄ．１０１：１６３７～１６４４；Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎら、（２００９）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．５０６：９７～１１４；及びＣａｖａｌｉｅｒｉら、（２００３）Ｂｌｏｏｄ．１０２（２）：４９７～５０５に記載されている。

【０１７８】

一部の実施形態では、組換え核酸は、エレクトロポレーションを介してＴ細胞に移入される（例えば、Ｃｈｉｃａｙｂａｍら、（２０１３）ＰＬｏＳ ＯＮＥ ８（３）：ｅ６０２９８、及びＶａｎ Ｔｅｄｅｌｏｏら、（２０００）Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ７（１６）：１４３１～１４３７を参照）。一部の実施形態では、組換え核酸は、転位を介してＴ細胞に移入される（例えば、Ｍａｎｕｒｉら、（２０１０）Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ ２１（４）：４２７～４３７；Ｓｈａｒｍａら、（２０１３）Ｍｏｌｅｃ Ｔｈｅｒ Ｎｕｃｌ Ａｃｉｄｓ ２、ｅ７４、及びＨｕａｎｇら、（２００９）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ５０６：１１５～１２６を参照）。免疫細胞において遺伝物質を導入及び発現する他の方法としては、リン酸カルシウムトランスフェクション（例えば、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ．Ｎ．Ｙ．に記載）、プロトプラスト融合、カチオン性リポソーム媒介性トランスフェクション；タングステン粒子促進性微粒子銃（Ｊｏｈｎｓｔｏｎ、Ｎａｔｕｒｅ、３４６：７７６～７７７（１９９０））；及びリン酸ストロンチウムＤＮＡ共沈殿（Ｂｒａｓｈら、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．７：２０３１～２０３４（１９８７））が挙げられる。

【０１７９】

遺伝子操作された産物をコードする遺伝子操作された核酸を移入するための他のアプローチ及びベクターは、例えば、国際特許出願の国際公開第２０１４０５５６６８号及び米国特許第７，４４６，１９０号に記載されているものである。

【０１８０】

本発明の組成物

本発明はまた、本明細書に記載された細胞及び／又は提供した方法により産生された細

胞を含有する組成物を含む。典型的には、前記組成物は、養子細胞療法などの投与のための医薬組成物及び製剤である。

【０１８１】

本発明の医薬組成物は、一般的に、本発明の少なくとも１つの操作された免疫細胞及び薬学的に許容される担体を含む。

【０１８２】

本明細書において、言葉「薬学的に許容できる担体」は、医薬品投与と適合性の、生理食塩水、溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌及び抗真菌剤、等張及び吸収遅延剤その他を含む。

【０１８３】

補充活性化合物を組成物にさらに組み込むことができる。一部の態様では、医薬組成物の担体の選択は、特定の遺伝子操作されたＣＡＲ若しくはＴＣＲ、ベクター、又はＣＡＲ若しくはＴＣＲを発現する細胞によって、並びにＣＡＲを発現するベクター又は宿主細胞を投与するために使用される特定の方法によって部分的に決定される。従って、様々な適切な製剤がある。例えば、医薬組成物は防腐剤を含むことができる。適切な防腐剤としては、例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸ナトリウム、及び塩化ベンザルコニウムを挙げることができる。一部の態様では、２種以上の防腐剤の混合物が使用される。防腐剤又はその混合物は、典型的には、全組成物の約０．０００１～約２重量％の量で存在する。

【０１８４】

医薬組成物は、その意図される投与経路と適合性となるように製剤化される。

【０１８５】

治療方法

本発明はまた、養子療法（特に養子Ｔ細胞療法）、典型的には、それを必要とする対象におけるがんの処置におけるそれらの使用について前に定義した細胞に関する。

【０１８６】

本明細書で使用される場合の「処置」又は「処置すること」は、がんなどの疾患、又は疾患（例えばがん）のいずれかの症状を治癒する、治す、軽減する、緩和する、変更する、是正する、寛解する、改善する、又は影響を与える目的での、それを必要とする患者への本発明による細胞又はその細胞を含む組成物の適用又は投与として定義される。特に、用語「処置する」又は「処置」とは、がんなどの疾患に関連する少なくとも１種の有害臨床症状、例えば、疼痛、腫大、低血球数等を低下又は軽減することを意味する。

【０１８７】

がん処置に関して、用語「処置する」又は「処置」はまた、新生物的な制御されない細胞の増殖の進行を遅くする又は反転することを意味し、即ち、現存する腫瘍を縮小する及び／又は腫瘍成長を停止すること意味する。用語「処置する」又は「処置」はまた、対象におけるがん又は腫瘍細胞におけるアポトーシスを誘導することを意味する。

【０１８８】

本発明の対象（即ち患者）は、哺乳動物、典型的に霊長類、例えばヒトである。一部の実施形態では、霊長類はサル又は類人猿である。対象は男性であっても女性であってもよく、乳児、年少者、青年、成人、及び老人の対象を含む、任意の適切な年齢であり得る。一部の実施形態では、対象は非霊長類哺乳動物、例えばげっ歯類である。一部の例では、患者又は対象は、疾患、養子細胞療法のための、及び／又はサイトカイン放出症候群（ＣＲＳ）などの毒性結果を評価するための検証済み動物モデルである。本発明の一部の実施形態では、前記対象は、がんを有するか、がんを有するリスクがあるか、又はがんの寛解にある。

【０１８９】

がんは、固形がん、又は「液性腫瘍」、例えば、血液、骨髄、リンパ系に影響を及ぼすがんであり、特に白血病及びリンパ腫を含む、造血組織及びリンパ組織の腫瘍としても知られている。液性腫瘍としては、例えば、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、慢性骨髄性白血

病（ＣＭＬ）、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）、及び慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）が挙げられる（マントル細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、腺腫、扁平上皮癌、喉頭癌、胆嚢及び胆管がん、網膜芽細胞腫などの網膜のがんなどの様々なリンパ腫を含む）。

【０１９０】

固形がんは、結腸、直腸、皮膚、子宮内膜、肺（非小細胞肺癌を含む）、子宮、骨（骨肉腫、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、線維肉腫、巨細胞腫瘍、アダマンチノーマ及び脊索腫等）、肝臓、腎臓、食道、胃、膀胱、膵、子宮頸部、脳（髄膜腫、グリオブラストーマ、低悪性度アストロサイトーマ、オリゴデンドロサイトサイトーマ（Ｏｌｉｇｏｄｅｎｄｒｏｃｙｔｏｍａ）、下垂体腫瘍、シュワン腫及び転移性脳がん等）、卵巣、乳房、頭頸部領域、精巣、前立腺及び甲状腺からなる群から選択される臓器のうちの１種に罹患するがんをとりわけ含む。

【０１９１】

本発明によるがんは、上記のように血液、骨髄及びリンパ系に影響を及ぼすがんであることが好ましい。典型的に、がんは多発性骨髄腫であるか、又は多発性骨髄腫に関連している。

【０１９２】

一部の実施形態では、対象は、感染症又は感染状態、例えば、限定するものではないが、ウイルス感染、レトロウイルス感染、細菌感染、及び原虫感染、免疫不全、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、エプスタイン－バーウイルス（ＥＢＶ）、アデノウイルス、ＢＫポリオーマウイルスに罹患しているか、又はそれらのリスクがある。一部の実施形態では、疾患若しくは状態は、自己免疫性又は炎症性の疾患又は状態、例えば、関節炎、例えば、慢性関節リウマチ（ＲＡ）、Ｉ型糖尿病、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、炎症性腸疾患、乾癬、硬皮症、自己免疫性甲状腺疾患、グレーブス病、クローン病、多発性硬化症、喘息、及び／又は移植に随伴する疾患若しくは状態である。

【０１９３】

本発明はまた、それを必要とする対象に前述の組成物を投与することを含む、処置の方法、特に養子細胞療法、好ましくは養子Ｔ細胞療法である。

【０１９４】

一部の実施形態では、細胞又は組成物は、対象、例えば、上記のがん又は疾患のいずれかを有するか、又はそのリスクがある対象に投与される。一部の態様では、方法は、操作された細胞によって認識される抗原を発現するがんの腫瘍負荷を軽減することにより、例えばがんに関する疾患又は状態の１つ又は複数の症状をそれにより処置する、例えば回復させる。

【０１９５】

養子細胞療法のために細胞を投与する方法は公知であり、提供した方法及び組成物に関連して使用することができる。例えば、養子Ｔ細胞療法は、例えば、Ｇｒｕｅｎｂｅｒｇらへの米国特許出願第２００３／０１７０２３８号；Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇへの米国特許第４，６９０，９１５号；Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ（２０１１）Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｃｌｉｎ Ｏｎｃｏｌ．８（１０）：５７７～８５に記載されている。例えば、Ｔｈｅｍｅｌｉら、（２０１３）Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．３１（１０）：９２８～９３３；Ｔｓｕｋａｈａｒａら、（２０１３）Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ ４３８（１）：８４～９；Ｄａｖｉｌａら、（２０１３）ＰＬｏＳ ＯＮＥ ８（４）：ｅ６１３３８を参照されたい。

【０１９６】

一部の実施形態では、細胞療法、例えば養子細胞療法、例えば養子Ｔ細胞療法は、自己移植により実施され、その場合、細胞は、細胞移植を受ける対象から、又はそのような対象に由来する試料から単離及び／又は調製される。従って、一部の態様では、細胞は、処置を必要とする対象、例えば患者に由来し、細胞は単離及び処理後に同じ対象に投与される。

【０１９７】
一部の実施形態では、細胞療法、例えば養子細胞療法、例えば養子Ｔ細胞療法は、同種異系移植によって実施され、その場合、細胞は、細胞療法を受ける対象以外の対象から、又は最終的に細胞療法を受ける対象、例えば第１の対象から単離及び／又は調製される。そのような実施形態では、次いで、細胞は、同一種の異なる対象、例えば第２の対象に投与される。一部の実施形態では、第１の対象と第２の対象は遺伝的に同一である。一部の実施形態では、第１の対象と第２の対象は遺伝的に類似している。一部の実施形態では、第２の対象は、第１の対象と同じＨＬＡクラス又はスーパータイプを発現する。
【０１９８】
それを必要とする対象への本発明による少なくとも１つの細胞の投与は、同時又は任意の順序で連続して、１種又は複数のさらなる治療薬と組み合わせるか又は別の治療的介入を伴うように組み合わせることができる。一部の状況において、細胞は、細胞集団が１種又は複数の追加の治療薬の効果を増強するように、又はその逆であるように、別の療法と時間的に十分に近接して同時投与される。一部の実施形態では、細胞集団は、１種又は複数の追加の治療薬の前に投与される。一部の実施形態では、細胞集団は、１種又は複数の追加の治療薬の後に投与される。
【０１９９】
がん処置に関して、組み合わせたがん処置としては、限定するものではないが、化学療法剤、ホルモン剤、抗血管新生剤、放射性標識化合物、免疫療法、手術、凍結療法、及び／又は放射線療法が挙げられる。
【０２００】
免疫療法としては、限定するものではないが、免疫チェックポイントモジュレーター（即ち、阻害剤及び／又はアゴニスト）、モノクローナル抗体、がんワクチンが挙げられる。
【０２０１】
本発明による養子Ｔ細胞療法における細胞の投与は、免疫チェックポイントモジュレーターの投与と組み合わせることが好ましい。免疫チェックポイントモジュレーターは、抗ＰＤ－１及び／又は抗ＰＤＬ－１阻害剤を含むのが最も好ましい。
【０２０２】
本発明はまた、対象におけるがん、感染症若しくは状態、自己免疫疾患若しくは状態、又は炎症性疾患若しくは状態を処置するための医薬を製造するための本明細書に記載されている操作された免疫細胞を含む組成物の使用に関する。
【実施例】
【０２０３】
〔結果〕
材料及び方法：
同腹子及びＳｕｖ３９ｈ１－ＫＯマウスを５×１０^{3}ＣＦＵで静脈感染させ、ＯＶＡを発現する２×１０^{6}ＣＦＵの組換えリステリア・モノサイトゲネ（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ）（ＬＭ－ＯＶＡ、野生型１４０４０３ｓ株に由来する）で４０日後にチャレンジした。細菌を対数期初期までＴＳＢ培地（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）で増殖させ、それらの増殖をＯＤ$_{600}$の光度計で評価した。ナイーブ、ｄｕｍｐ$^{-}$ＣＤ４４^{ｈｉｇｈ} Ｋ^{ｂ}－ＯＶＡ$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞及び関連のサブセットをＦＡＣＳソートした。解析したサブセットごとに、本発明者らは３又は４個の生物学的複製を回収した。ＲＮＡは、Ｒｎｅａｓｙ Ｍｉｃｒｏ Ｋｉｔ（ＱＵＩＧＥＮ）を使用して、製造元のプロトコルに従って抽出した。カラムＤＮＡｓｅ処理が含まれていた（ＱＵＩＧＥＮ）。各条件について、ＲＮＡを使用して、標準のＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘプロトコルに従ってｃＤＮＡを合成した。標識したＤＮＡをＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘマウスＧｅｎｅ ２．１ ＳＴでハイブリダイズさせ、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ ＧｅｎｅＴｉｔａｎデバイスで処理した。
【０２０４】
マイクロアレイデータ解析：
マイクロアレイデータは、Ｂｉｏｃｏｎｄｕｃｔｏｒ製のパッケージを使用して、Ｒ（

バージョン３．０．０）に処理した。生データＣＥＬファイルを使用し、品質管理解析はＡｒｒａｙＱｕａｌｉｔｙＭｅｔｒｉｃｓパッケージを使用して実施した。生データは、ｏｌｉｇｏパッケージで利用可能なＲＭＡ法を使用して前処理した。アノテーションなしのプローブは、解析から除いた。モデレートしたｔ検定はｌｉｍｍａパッケージを使用して実施し、Ｂｅｎｊａｍｉｎｉ　Ｈｏｃｈｂｅｒｇ法を用いる複数の検定を使用してｐ値を調整した。最終的に、本発明者らは、調整したｐ値が５％未満の場合には統計的に有意であると考えた。

【０２０５】

遺伝子セットエンリッチメント解析。

遺伝子セットエンリッチメント解析（ＧＳＥＡ）は、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｓｉｇｎａｔｕｒｅｓ　ＤａｔａＢａｓｅ（ＭＳｉｇＤＢデータベースｖ５．１、ｈｔｔｐ：／／ｓｏｆｔｗａｒｅ．ｂｒｏａｄｉｎｓｔｉｔｕｔｅ．ｏｒｇ／ｇｓｅａ／ｍｓｉｇｄｂ／ｉｎｄｅｘ．ｉｓｐ）の免疫学的特性（Ｃ７）を有する遺伝子及びＣ２（精選）遺伝子セットを用いて実施した。ＧＭＴファイルは、遺伝子記号情報と共にダウンロードした。ＧＣＴファイルは合計４１３４５のプローブで構成されており、ＧＳＥＡにインポートした。ＧＳＥＡは、順列の数（ｎ＝１００００）を除き、デフォルトパラメーターで実行した。ＢｕｂｂｌｅＧＵＭ解析は、前述のように実施した。

【０２０６】

Ｓｕｖ３９ｈ１欠損ＣＤ８＋ＯＴ－１細胞における腫瘍成長の解析は以下のように実施した：

オスＳｕｖ３９ｈ１－ＫＯ　ＣＤ４５．２　ＯＴ－１（Ｈ２－Ｋｂ　ＭＨＣクラスＩコンテキストのＯＶＡ２５７－２６４ペプチドＳＩＩＮＦＥＫＬに特異的）及び同腹仔ＷＴマウス由来の総脾臓及びリンパ節を完全培地（１０％ＦＢＳ、ペニシリン－ストレプトマイシン、及びＬ－グルタミンを補充したＲＰＭＩ　１６４０）で３日間培養し、次いで、１００ＵＩ／ｍｌ　ＩＬ－２及び１ｕｇ／ｍｌ　ＯＶＡ２５７－２６４ペプチドでさらに３日間活性化した。

【０２０７】

腫瘍接種のため、１×１０^{6}個のＥＬ４－ＯＶＡリンパ腫細胞をＣＤ４５．１／Ｃ５７ＢＬ／６オスマウスの右脇腹に皮下注射し、７日後、マウスに２×１０^{6}個のＩＬ－２／ＯＶＡで処理したＳｕｖ３９ｈ１－ＫＯ　ＣＤ４５．２　ＯＴ－１又は同腹子ＷＴ細胞を静脈注射した。

【０２０８】

マウスに、２週間、週２回の用量あたり７．５ｍｇ／Ｋｇ体重の用量で投与される抗ＰＤ１（Ｂｉｏ　Ｘ　Ｃｅｌｌ、ＲＭＰ－１４）を腹腔内注射した。腫瘍成長は、手作業でノギスを使用して測定した。

【０２０９】

結果：

１）本発明者らの結果は、Ｓｕｖ３９ｈ１－ＫＯマウスから得た細胞集団において、「幹細胞様」表現型の初期前駆細胞が蓄積し、野生型マウスから得た細胞集団と比較して、ＣＤ４４及びＣＤ６２Ｌの両方を発現する長期生存のセントラルメモリーＴ細胞へと高効率で再プログラムされることを示している。図１に示すように、セントラルメモリーＴ細胞（ＣＤ４４及びＣＤ６２Ｌの両方を発現）の割合及び数は、両方とも、Ｓｕｖ３９ｈ１欠損マウスで増加している。

【０２１０】

２）トランスクリプトーム解析を使用して、この特有の表現型のメカニズムを推察した：

野生型及びＳｕｖ３９ｈ１欠損マウスを、ＯＶＡを発現するリステリア・モノサイトゲネで免疫し、ＯＶＡ特異的Ｔ細胞を免疫後７日目にソーティングフローサイトメトリーを使用して単離した。

【０２１１】

細胞をＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘ解析した後、本発明者らは、Ｓｕｖ３９ｈ１からのエフェ

クターＴ細胞が高レベルの幹細胞細胞関連タンパク質をコードするｍＲＮＡを発現することを確認した（ＣＤ８＋Ｔ幹細胞様メモリー特性（８６遺伝子）：Ａｂｃｂ１ａ　Ｉｒｆ８　Ｒｅｓｔ　Ａｂｃｂ１ｂ　Ｊａｒｉｄ２　Ｒｉｆ１　Ａｌｐｌ　Ｋａｔ６ａ　Ｒｎｆ１３８　Ａｎｔｘｒ２　Ｋｌｆ４　Ｒｒａｓ　Ａｒｌ４ｃ　Ｌｄｈａ　Ｓａｌｌ４　Ａｔｒ　Ｌｄｈｂ　Ｓａｔｂ１　Ｂａａｌｃ　Ｌｄｈｃ　Ｓｅｔｂｐ１　Ｂａｓｐ１　Ｌｄｈｄ　Ｓｅｔｄｂ１　Ｂｃｌ６　Ｌｅｃｔ１　Ｓｋｉｌ　Ｂｕｂ１　Ｌｐｉｎ１　Ｓｍａｒｃａｄ１　Ｃｃｒ７　Ｌｙ６ａ　Ｓｏｘ２　Ｃｃｒ９　Ｌｙ６ｅ　Ｓｐｏｎ１　Ｃｄ２７　Ｍａｐ３ｋ８　Ｓｔａｔ３　Ｃｘｃｒ６　Ｍａｐｋ１２　Ｔｂｘ３　Ｄｏｃｋ９　Ｍｃｍ３ａｐ　Ｔｃｆ３　Ｄｕｓｐ９　Ｍｃｏｌｎ２　Ｔｃｌ１　Ｅｏｍｅｓ　Ｍｙｃ　Ｔｄｇｆ１　Ｅｓｒｒｂ　Ｎａｎｏｇ　Ｔｅｒｔ　Ｅｖｌ　Ｎｃｏｒ２　Ｔｉｇｉｔ　Ｆａｓ　Ｎｒ０ｂ１　Ｔｎｆａｉｐ２　Ｆｇｆ２　Ｎｒ１ｄ２　Ｔｎｆｒｓｆ１ｂ　Ｆｕｔ４　Ｐ２ｒｙ１４　Ｔｒａｆ１　Ｇｚｍｋ　Ｐａｘ６　Ｔｒａｆ４　Ｈａｎｄ１　Ｐｃｇｆ２　Ｔｒｉｂ２　Ｈｅｓｘ１　Ｐｌｅｋｈａ５　Ｔｘｎｉｐ　Ｉｅｒ３　Ｐｏｄｘｌ　Ｚｆｐ４２　Ｉｌ２ｒｂ　Ｐｏｕ５ｆ１　Ｚｆｘ　Ｉｌ７ｒ　Ｐｏｕ６ｆ１　Ｚｉｃ３　Ｉｒｆ４　Ｐｒｋｃｅ）。

【０２１２】

本発明者らは、リステリア・モノサイトゲネ感染後に刺激されたＳｕｖ３９ｈ１欠損マウスからのＯＶＡ特異的Ｔ細胞が「幹細胞」様ｍＲＮＡシグネチャーを発現すると結論付けた。

【０２１３】

３）Ｓｕｖ３９ｈ１欠損ＣＤ８＋Ｔ細胞は、ｉｎ　ｖｉｖｏで生存及び自己再生の増加を示す。

【０２１４】

ＷＴ及びＳｕｖ３９ｈ１　ＫＯ　ＬＭ－ＯＶＡ感染マウスから単離した、コンジェニックＣＤ４５．２　Ｋｂ－ＯＶＡペンタマー＋ＣＤ８＋Ｔ細胞を、ナイーブレシピエントＣＤ４５．１マウスに移入した。養子移入の４０日後、ナイーブレシピエントマウスをＬＭ－ＯＶＡでチャレンジし、４日後にＫｂ－ＯＶＡペンタマー＋ＣＤ８＋Ｔ細胞をＦＡＣＳにより解析した。

【０２１５】

図３に示すように、結果は、Ｓｕｖ３９ｈ１欠損細胞が「幹細胞様」特性のレベルを増加させて発現することを示している。Ｓｕｖ３９ｈ１欠損細胞はまた、良好に生存し、養子移入後の野生型マウスに効果的に再配置される。

【０２１６】

４）Ｓｕｖ３９ｈ１欠損ＣＤ８＋ＯＴ－１細胞はｉｎ　ｖｉｖｏで腫瘍成長を制御する

図４Ｂ及び図４Ｃは、Ｓｕｖ３９ｈ１－ＫＯ　ＯＴ－１細胞を養子移入し、抗ＰＤ１モノクローナル抗体で処理したマウスが、ＷＴ　ＯＴ－１細胞を用いること以外は同様の処理を受けたマウスよりも腫瘍成長をより良好に制御したことを示している。注目すべきことに、腫瘍注射後３０日までに、５匹のうち４匹のＷＴ　ＯＴ－１移植マウスが腫瘍成長を示したのに対し、Ｓｕｖ３９ｈ１－ＫＯ　ＯＴ－１細胞を注射した５匹のうち腫瘍成長を示したのは１匹のマウスのみであった。

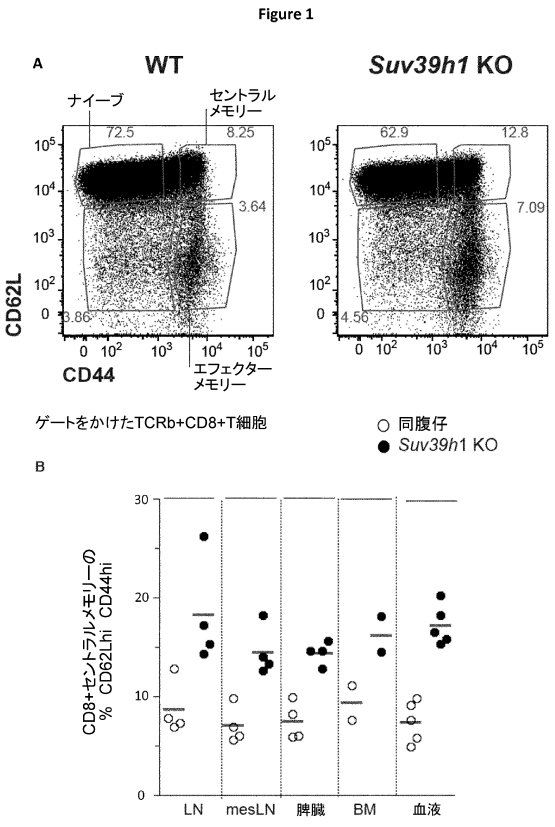
【０２１７】

結論

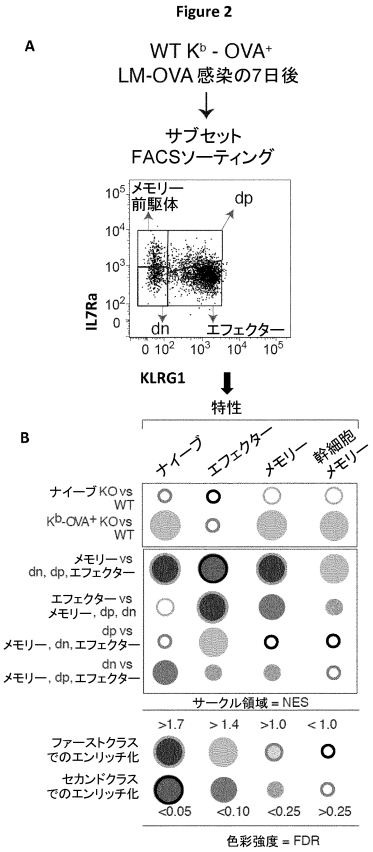
ＣＤ８＋Ｔ細胞のＳｕｖ３９ｈ１活性の欠如は、養子Ｔ細胞移入に基づく治療アプローチにおける良好な抗腫瘍効果と関係している。

【図面】

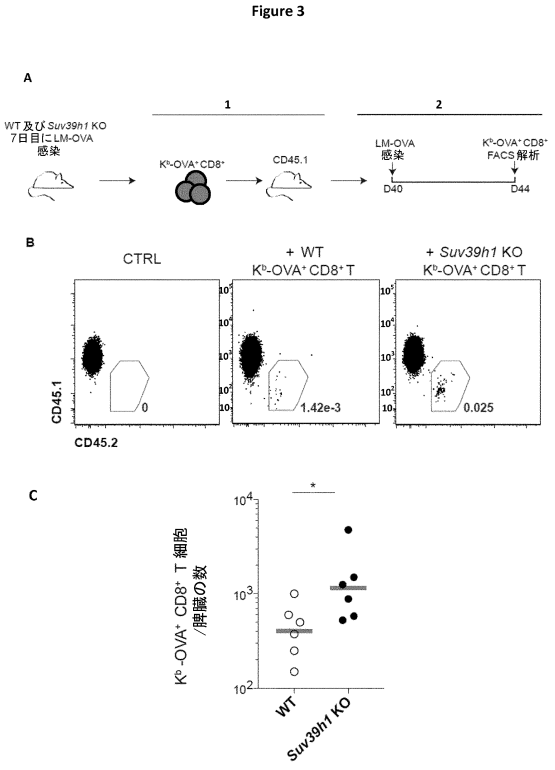
【図１】


Figure 1
A
WT
Suv39h1 KO
ナイーブ
セントラルメモリー
72.5
8.25
3.64
3.86
62.9
12.8
7.09
4.56
CD62L
CD44
エフェクターメモリー
ゲートをかけたTCRb+CD8+T細胞
同腹仔
Suv39h1 KO
B
CD8+セントラルメモリーの % CD62LhiCD44hi
LN
mesLN
脾臓
BM
血液

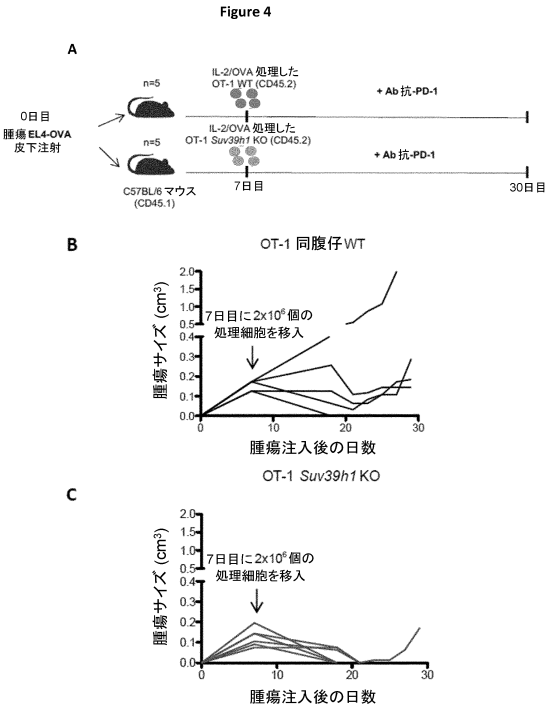
【図２】


Figure 2
A
WT Kb - OVA+
LM-OVA 感染の7日後
サブセット
FACSソーティング
メモリー前駆体
dp
dn
エフェクター
IL7Ra
KLRG1
特性
B
ナイーブ
エフェクター
メモリー
幹細胞メモリー
ナイーブ KO vs WT
Kb-OVA+ KO vs WT
メモリー vs dn, dp, エフェクター
エフェクター vs メモリー, dp, dn
dp vs メモリー, dn, エフェクター
dn vs メモリー, dp, エフェクター
サークル領域 = NES
>1.7
> 1.4
>1.0
< 1.0
ファーストクラスでのエンリッチ化
セカンドクラスでのエンリッチ化
<0.05
<0.10
<0.25
>0.25
色彩強度 = FDR

【図３】


Figure 3
A
WT 及び Suv39h1 KO
7日目にLM-OVA
感染
Kb-OVA+CD8+
CD45.1
LM-OVA
感染
Kb-OVA+CD8+
FACS 解析
D40
D44
B
CTRL
+ WT
Kb-OVA+CD8+T
+ Suv39h1 KO
Kb-OVA+CD8+T
CD45.1
CD45.2
0
1.42e-3
0.025
C
Kb-OVA+CD8+T細胞 /脾臓の数
WT
Suv39h1 KO

【図４】


Figure 4
A
0日目
腫瘍 EL4-OVA
皮下注射
C57BL/6 マウス
(CD45.1)
n=5
n=5
IL-2/OVA 処理した
OT-1 WT (CD45.2)
IL-2/OVA 処理した
OT-1 Suv39h1 KO (CD45.2)
+ Ab 抗-PD-1
+ Ab 抗-PD-1
7日目
30日目
B
OT-1 同腹仔WT
腫瘍サイズ (cm3)
7日目に2x10^6個の
処理細胞を移入
腫瘍注入後の日数
C
OT-1 Suv39h1 KO
腫瘍サイズ (cm3)
7日目に2x10^6個の
処理細胞を移入
腫瘍注入後の日数

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		
A61K 40/32 (2025.01)		A61K	40/32	
A61K 40/42 (2025.01)		A61K	40/42	
A61K 40/50 (2025.01)		A61K	40/50	
A61K 45/00 (2006.01)		A61K	45/00	
A61P 35/00 (2006.01)		A61P	35/00	
A61P 37/04 (2006.01)		A61P	37/04	
A61P 43/00 (2006.01)		A61P	43/00	105
C12N 5/0783(2010.01)		A61P	43/00	121
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/0783	
C12N 15/12 (2006.01)		C12N	5/10	
C12N 15/13 (2006.01)		C12N	15/12	
C12N 15/62 (2006.01)		C12N	15/13	
C07K 14/705 (2006.01)		C12N	15/62	Z
C07K 16/30 (2006.01)		C07K	14/705	
C07K 19/00 (2006.01)		C07K	16/30	
		C07K	19/00	

(74)代理人 100107456
弁理士 池田 成人
(74)代理人 100162352
弁理士 酒巻 順一郎
(74)代理人 100123995
弁理士 野田 雅一
(72)発明者 アミゴレナ， セバスチャン
フランス， ７５０１３ パリ， リュ ドゥ コルドリエ ３２
(72)発明者 ピアッジョ， エリアーヌ
フランス， ７５０２０ パリ， リュ ドゥ ラ マレ ７７
(72)発明者 グード， クリステル
フランス， ９３１５０ ル ブラン メニル， アヴニュ イヴ カリウー １８
(72)発明者 パーチェ， ルイージャ
イタリア， １０１００ トリノ， イタリアン インスティトゥート フォー ジェノミック メディシン （アイアイジーエム） ヴィア ニッツァ ５２
(72)発明者 アルムーズニ， ジュヌヴィエーヴ
フランス， ９２２００ ヌイイ シュル セーヌ， リュ ドゥ エグリーズ ３０
(72)発明者 ニボルスキ， レティシア
フランス， ７５０１８ パリ， プレイス チャールズ ダブリン ８
審査官 原 大樹

(56)参考文献 特表２０１４－５２８９５９（ＪＰ，Ａ）
特表２０１４－５２８４３２（ＪＰ，Ａ）
Ｎａｔｕｒｅ，2012年07月12日，４８７（７４０６），ｐ２４９－２５３
ＡＩＤＳ，2012年12月31日，２６（１２），ｐ１４７３－１４８２

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ
Ａ６１Ｐ
Ｃ１２Ｎ
ＭＥＤＬＩＮＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＥＭＢＡＳＥ／ＣＡｐｌｕｓ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）