

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-513879

(P2025-513879A)

(43)公表日 令和7年4月30日(2025.4.30)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード(参考)	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	Z N A	4 B 0 6 5
A 6 1 K	35/545 (2015.01)	A 6 1 K	35/545		4 C 0 8 4
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		4 C 0 8 5
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	35/12		4 C 0 8 7
A 6 1 K	35/17 (2025.01)	A 6 1 K	35/17		4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全74頁) 最終頁に続く

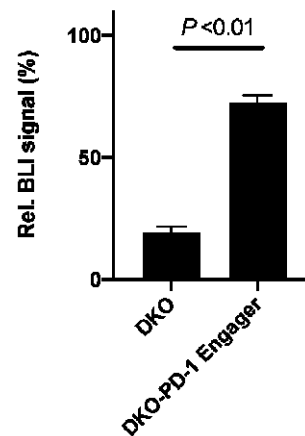
(21)出願番号	特願2024-560636(P2024-560636)	(71)出願人	506115514
(86)(22)出願日	令和5年4月11日(2023.4.11)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシテ
(85)翻訳文提出日	令和6年11月1日(2024.11.1)		ィ オブ カリフォルニア
(86)国際出願番号	PCT/US2023/018189		The Regents of the U
(87)国際公開番号	WO2023/200796		niversity of Califo
(87)国際公開日	令和5年10月19日(2023.10.19)		rnia
(31)優先権主張番号	63/330,539		アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9
(32)優先日	令和4年4月13日(2022.4.13)		4 6 0 7 - 5 2 0 0, オークランド, フ
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		ランクリン ストリート 1 1 1 1, 1 2
			番 フロア
(31)優先権主張番号	63/448,081	(74)代理人	100147485
(32)優先日	令和5年2月24日(2023.2.24)		弁理士 杉村 憲司
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	230118913
			弁護士 杉村 光嗣
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ	(74)代理人	100174001
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 免疫チェックポイントエンゲージャーによる免疫細胞の抑制

(57)【要約】

本発明は、免疫チェックポイントエンゲージメント機能を高めた細胞（免疫チェックポイントエンゲージャー「ICE」細胞）を提供する。一部の実施形態では、ICE細胞はPD-1エンゲージメント機能を有する（PD-1エンゲージャー細胞）。ICE細胞は、対応する未修飾の免疫チェックポイントエンゲージメント機能を有する親細胞と比較して、対象への移植時に適応免疫および自然免疫を緩和する。一部の実施形態では、PD-1エンゲージャー細胞は低免疫性多能性（HIP）細胞である。さらなる実施形態では、HIP細胞は血液型O型（HIPO）、アールエイチ因子（Rh）陰性（HIP-）、またはO型かつRh-（HIPO-）である。他の実施形態では、PD-1エンゲージャー細胞は、HIP細胞、HIP-細胞、またはHIPO-細胞から誘導または分化されたものである。他の実施形態では、ICE細胞は、LILRB1エンゲージャー、LILRB3エンゲージャー、およびTIM3エンゲージャーからなる群から選択される阻害性免疫細胞レセプターに結合するリガンドを発現する。他の実施形態では、ICE細胞

DKO and PD-1 Engager with NK cells



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

免疫チェックポイントエンゲージャー（ICE）細胞であって、エンゲージャー分子が細胞表面に発現され、前記エンゲージャー分子が免疫細胞上の免疫チェックポイント分子とエンゲージし、前記エンゲージャー分子が、少なくとも、前記ICE細胞が前記免疫細胞によって殺傷されないように保護するレベルで発現されている、ICE細胞。

## 【請求項 2】

前記エンゲージャー分子が、前記免疫細胞上のSIRP とエンゲージしないタンパク質である、請求項 1 に記載のICE細胞。

## 【請求項 3】

前記エンゲージャー分子がPD-1 とエンゲージする、請求項 2 に記載のICE細胞。

## 【請求項 4】

前記タンパク質が、PD-1 に結合する免疫グロブリンドメインを含む、請求項 2 に記載のICE細胞。

## 【請求項 5】

前記免疫グロブリンドメインが抗体VHドメインである、請求項 4 に記載のICE細胞。

## 【請求項 6】

前記抗体VHドメインが、配列ID番号1のアミノ酸番号146～264と少なくとも90%の配列同一性を有する、請求項 5 に記載のICE細胞。

## 【請求項 7】

前記抗体VHドメインが、配列ID番号1のアミノ酸番号146～264の配列を含む、請求項 6 に記載のICE細胞。

## 【請求項 8】

前記免疫グロブリンドメインが抗体VLドメインである、請求項 4 に記載のICE細胞。

## 【請求項 9】

前記抗体VLドメインが、配列ID番号1のアミノ酸番号21～130と少なくとも90%の配列同一性を有する、請求項 8 に記載のICE細胞。

## 【請求項 10】

前記抗体VHドメインが、配列ID番号1のアミノ酸番号21～130の配列を含む、請求項 9 に記載のICE細胞。

## 【請求項 11】

前記タンパク質が融合タンパク質である、請求項 2～10のいずれか1項に記載のICE細胞。

## 【請求項 12】

前記融合タンパク質が、配列ID番号2のIL-2シグナルペプチドと少なくとも90%の配列同一性を有する、請求項 11 に記載のICE細胞。

## 【請求項 13】

前記融合タンパク質が、配列ID番号2のIL-2シグナルペプチドを含む、請求項 12 に記載のICE細胞。

## 【請求項 14】

前記融合タンパク質が、配列ID番号3のCD8aヒンジペプチドと少なくとも90%の配列同一性を有する、請求項 11 に記載のICE細胞。

## 【請求項 15】

前記融合タンパク質が、配列ID番号3のCD8aヒンジペプチドを含む、請求項 14 に記載のICE細胞。

## 【請求項 16】

前記融合タンパク質が、配列ID番号4のPDGFR膜貫通ドメイン（TMD）と少なくとも90%の配列同一性を有する、請求項 11 に記載のICE細胞。

10

20

30

40

50

## 【請求項 17】

前記融合タンパク質が配列 I D 番号 4 の P D G F R T M D を含む、請求項 16 に記載の I C E 細胞。

## 【請求項 18】

前記エンゲージャー分子が、配列 I D 番号 1 と少なくとも 90% の配列同一性を有するタンパク質である、請求項 11 に記載の I C E 細胞。

## 【請求項 19】

前記エンゲージャー分子が配列 I D 番号 1 の配列同一性を有する、請求項 18 に記載の I C E 細胞。

## 【請求項 20】

前記エンゲージャー分子が、P D - 1 に結合する抗体 F a b または一本鎖可変フラグメント ( s c F V ) を含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の I C E 細胞。

10

## 【請求項 21】

前記 F a b または s c F V が、解離定数 ( K d ) によって測定される親和性で P D - 1 に結合し、前記 K d が約  $10^{-7}$  ~  $10^{-13}$  である、請求項 20 に記載の I C E 細胞。

## 【請求項 22】

前記エンゲージャー分子が、P D - 1 に結合する 1 つ以上の抗体相補性決定領域 ( C D R ) を含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の I C E 細胞。

## 【請求項 23】

前記 1 つ以上の C D R が、配列 I D 番号 18 ~ 23 のいずれか 1 つと少なくとも 90% の配列同一性を有する、請求項 22 に記載の I C E 細胞。

20

## 【請求項 24】

前記エンゲージャー分子が、異種膜貫通ドメイン ( T M D ) を含む融合タンパク質である、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の P D 1 エンゲージャー細胞。

## 【請求項 25】

前記 T M D が、1 つの ヘリックス、複数の ヘリックス、またはロールアップされたシートを含む、請求項 24 に記載の I C E 細胞。

## 【請求項 26】

前記異種 T M D が、C D 8 5 f、C D 3 4 9、C D 2 8 4、C D 2 6 1、C D 1 7 2 b、C D 2 7 7、C D 1 8 6、C D 1 5 6 c、C D 3 0 4、C D 2 5 4、C D 2 6 3、C D 2 6 7、C D 3 3 7、C D 1 7 0、C D 2 8 3、C D 1 3 3、C D 3 2 7、C D 2 0 5、C D 2 3 2、C D 2 8 2、C D 1 6 b、C D 8 5 i、C D 8 5 a、C D 8 5 c、C D 2 7 5、C D 1 0 8、C D 3 5 8、C D 3 3 5、C D 2 1 8 b、C D 3 5 5、C D 3 3 6、C D 1 6 0、C D 2 5、C D 4、C D 8 a、C D 2 3 5 a、C D 2 3 3、C D 2 3 0、C D 9 0、C D 7 4、C D 3 d、C D 3 4 0、C D 2 3 6、C D 6 1、C D 1 8、C D 5 4、C D 2 9、C D 1 a、C D 5、C D 2 2 0、C D 2、C D 6 6 e、C D 5 1、C D 1 4 1、C D 1 1 5、C D 4 2 b、C D 2 2 1、C D 2 7 1、C D 5 5、C D 2 4 3、C D 9 8、C D 1 0、C D 4 1、C D 1 4、C D 4 5、C D 2 2 8、C D 1 6 a、C D 4 9 e、C D 1 2 6、C D 6 3、C D 4 8、C D 7、C D 1 4 0 b、C D 3 g、C D 1 1 7、C D 2 8、C D 8 b、C D 3 7、C D 1 1 b、C D 1 0 7 a、C D 3 3 1、C D 2 2 2、C D 2 0、C D 7 9 a、C D 3 2、C D 1 4 3、C D 3 2 4、C D 4 2 c、C D 1 0 7 b、C D 5 6、C D 1 0 2、C D 4 9 d、C D 6 6 a、C D 1 4 2、C D 5 9、C D 6 2 L、C D 1 2 1 a、C D 1 2 2、C D 1 3、C D 1 5 5、C D 1 1 9、C D 1 9、C D 1 1 6、C D 4 6、C D 1 e、C D 1 d、C D 2 2 7、C D 4 4、C D 6 2 P、C D 1 0 4、C D 4 3、C D 1 4 0 a、C D 3 1、C D 1 5 2、C D 3 2 6、C D 6 2 E、C D 3 6、C D 1 2 7、C D 4 9 b、C D 1 0 5、C D 3 5、C D 2 2 3、C D 1 3 8、C D 3 2 5、C D 5 8、C D 1 0 6、C D 5 3、C D 1 2 0 a、C D 2 2 4、C D 2 1、C D 3 3、C D 2 2、C D 1 2 0 b、C D 1 1 a、C D 1 1 c、C D 3 6 3、C D 7 3、C D 8 8、C D 2 0 4、C D 3 3 2、C D 9、C D 2 0 3 a、C D 3 3 4、C D 3 3 3、C D 2 0 6、C D 4 9 f、C D 2 3 8、C D 2 5 2、C D 8 9、C D 1 2 4、C D 1 8 1、C D 1 8 2、C

30

40

50

D 2 4、C D 9 5、C D 4 0、C D 4 9 c、C D 1 5 9 a、C D 1 5 9 c、C D 3 1 4、  
 C D 2 7、C D 1 2 3、C D 2 6、C D 8 2、C D 1 2 1 b、C D 3 4、C D 3 8、C D  
 3 0、C D 1 b、C D 1 c、C D 1 5 4、C D 6、C D 5 2、C D 1 3 2、C D 3 2、C  
 D 6 6 b、C D 1 7 1、C D 1 9 1、C D 1 9 7、C D 1 8 5、C D 1 3 1、C D 5 0、  
 C D 7 0、C D 1 5 3、C D 1 4 4、C D 8 0、C D 3 6 2、C D 6 8、C D 3 6 1、C  
 D 1 4 7、C D 3 0 9、C D 1 3 5、C D 2 9 2、C D 1 0 3、C D 1 3 0、C D 4 2 d  
 、C D 6 6 d、C D 6 6 c、C D 9 6、C D 1 1 0、C D 7 9 b、C D 2 0 0、C D 1 9  
 2、C D 2 3 1、C D 8 6、C D 2 1 2、C D 1 1 8、C D 1 4 6、C D 1 3 4、C D 1  
 5 8 a、C D 1 5 8 b 1、C D 1 5 8 b 2、C D 1 5 8 e、C D 1 5 8 k、C D 1 5 8 j  
 、C D 1 5 8 i、C D 1 7 8、C D 2 9 5、C D 1 5 1、C D 9 7、C D 1 8 3、C D 3 10  
 9、C D 2 3 9、C D 1 9 3、C D 1 9 4、C D 1 9 5、C D 1 9 6、C D w 1 9 8、C  
 D w 1 9 9、C D 2 9 6、C D 2 9 8、C D 4 9 a、C D 3 2 2、C D 8 5 g、C D 1 8  
 4、C D 1 7 2 a、C D 1 5 6 a、C D 3 3 9、C D 1 5 6 b、C D 2 1 3 a 1、C D 1  
 2 9、C D 8 3、C D 1 2 5、C D 2 4 1、C D 2 6 9、C D 2 0 2 b、C D 8 7、C D  
 1 6 4、C D 1 3 6、C D 1 3 7、C D 2 4 9、C D 6 9、C D 9 1、C D w 2 1 0 b、  
 C D 1 6 7 a、C D 3 0 0 c、C D 1 5 7、C D 3 1 7、C D 1 4 8、C D 1 6 1、C D  
 2 1 5、C D 1 5 0、C D 1 1 d、C D 2 1 8 a、C D 2 1 0、C D 1 6 6、C D 1 6 2  
 、C D 2 1 3 a 2、C D 2 4 2、C D 1 5 8 g、C D 1 5 8 h、C D 2 7 9、C D 1 1 1  
 、C D 2 8 1、C D 2 2 6、C D 2 3 4、C D 1 6 7 b、C D 3 0 0 e、C D 2 7 6、C  
 D 3 0 5、C D 3 0 0 g、C D 3 0 0 d、C D 1 0 9、C D 2 7 2、C D 1 6 3、C D 3 20  
 0 2、C D 1 5 8 f 1、C D 8 5 h、C D 8 5 d、C D 1 7 7、C D 1 5 8 z、C D 1 5  
 8 f 2、C D 8 5 j、C D 3 0 0 f、C D 9 2、C D 3 5 1、C D 1 1 2、C D 1 0 0、  
 C D 2 7 0、C D 1 0 1、C D 2 9 7、C D 3 1 6、C D 3 5 2、C D 2 1 7、C D 3 0  
 7 b、C D 3 0 7 a、C D 3 0 7 c、C D 3 0 7 d、C D 3 0 7 e、C D 1 1 4、C D 1  
 8 0、C D 1 5 8 d、C D 2 7 3、C D 2 9 0、C D 2 4 4、C D 1 6 9、C D 2 9 9、  
 C D 3 1 8、C D 3 6 0、C D 2 2 9、C 号" D 2 4 8、C D 3 5 4、C D 3 2 0、C D  
 9 3、C D 3 1 9、C D 1 1 3、C D 1 6 3 b、C D 2 8 9、C D 2 8 8、C D 3 2 9、  
 C D 2 7 4、C D 3 5 3、C D 1 7 2 g、C D 3 1 5、C D 2 8 0、C D 2 6 4、C D 3  
 0 0 a、C D 3 1 2、C D 8 4、C D 3 4 4、C D 3 5 0、C D 2 4 6、C D 2 0 1、C  
 D 3 3 8、C D 2 0 8、C D 2 5 7、C D 3 2 8、C D 2 8 6、C D 3 5 7、C D 2 9 4 30  
 、C D 3 2 1、C D 2 6 5、C D 2 7 8、I T G A 7、I T G A 8、I T G A 9、I T G  
 A 1 0、I T G A 1 1、C D 5 1、C D 4 1、C D 2 9、C D 1 8、C D 6 1、C D 1 0  
 4、C D 4 7 ( 配列 I D 番号 5 )、C D 6 4 ( 配列 I D 番号 6 )、および P D G F R ( 配  
 列 I D 番号 4 ) からなる群から選択される、請求項 2 4 に記載の I C E 細胞。

【請求項 2 7】

前記 T M D が、配列 I D 番号 5 または配列 I D 番号 6 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 2 4 に記載の I C E 細胞。

【請求項 2 8】

前記 T M D が、配列 I D 番号 5 または配列 I D 番号 6 の配列を含む、請求項 2 4 に記載の I C E 細胞。

【請求項 2 9】

前記 T M D が 7 回膜貫通タンパク質 ( 7 T M ) または免疫グロブリン細胞表面タンパク質に由来する、請求項 2 4 に記載の I C E 細胞。

【請求項 3 0】

前記エンゲージャー分子が細胞内ドメイン ( I C D ) を持たない、請求項 1 ~ 2 9 のいずれか 1 項に記載の I C E 細胞。

【請求項 3 1】

前記エンゲージャー分子が、C D 1 6、C D 3 2、C D 6 4、C D 8、C D 3、C D 2 8、または C D 1 3 7 由来の細胞内ドメインを有する、請求項 1 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の I C E 細胞。

## 【請求項 3 2】

前記エンゲージャー分子が、E C D配列、T M D配列、またはI C D配列を連結する1つ以上のリンカー領域またはヒンジ領域を有する、請求項 2 または 4 ~ 3 1 のいずれか一項に記載のI C E細胞。

## 【請求項 3 3】

前記タンパク質が、抗体、レセプター、リガンド、または接着タンパク質である、請求項 2 または 4 ~ 3 2 のいずれか一項に記載のI C E細胞。

## 【請求項 3 4】

さらに、H L A - I または H L A - II の発現が低下または消失している、請求項 1 ~ 3 3 のいずれか一項に記載のI C E細胞。

10

## 【請求項 3 5】

前記細胞がA B O血液群O型である、請求項 1 ~ 3 4 のいずれか1項に記載のI C E細胞。

## 【請求項 3 6】

前記細胞がアールエイチ因子陰性(R h -)である、請求項 1 ~ 3 5 のいずれか1項に記載のI C E細胞。

## 【請求項 3 7】

前記細胞が、A 1、A 2 および B からなる群から選択されるA B O血液群抗原が減少または消失している、請求項 1 ~ 3 6 のいずれか1項に記載のI C E細胞。

## 【請求項 3 8】

前記細胞が、R h C抗原、R h E抗原、K e l l K抗原(K E L)、D u f f y (F Y) F y a抗原、D u f f y F y 3抗原、K i d d (J K) J k b抗原、M N S抗原U、およびM N S抗原Sからなる群から選択されるR hタンパク質抗原の発現が低下または消失している、請求項 1 ~ 3 7 のいずれか1項に記載のI C E細胞。

20

## 【請求項 3 9】

前記細胞が、未修飾の親細胞と比較して内因性主要組織適合複合体クラスI(H L A - I)の機能が低下し、かつ未修飾の親細胞と比較して内因性主要組織適合複合体クラスII(H L A - II)の機能が低下している低免疫原性(H I)細胞である、請求項 1 ~ 3 8 のいずれか1項に記載のI C E細胞。

## 【請求項 4 0】

前記エンゲージャー細胞が、H L A - Iヒト白血球抗原、H L A - IIヒト白血球抗原、C D 6 4、C D 4 7、C D 3 8、C C R 5、C X C R 4、N L R C 5、C I I T A、B 2 M、H L A - A、H L A - B、H L A - C、H L A - E、H L A - G、P D - L 1、C T L A - 4 - I g、C D 4 7、C I - i n h i b i t o r、I L - 3 5、R F X - 5、R F X A P、R F X A N K、N F Y - A、N F Y - B、N F Y - C、I R F - 1、O X 4 0、G I T R、4 - 1 B B、C D 2 8、B 7 - 1、B 7 - 2、I C O S、C D 2 7、H V E M、S L A M、C D 2 2 6、P D 1、C T L 4、L A G 3、T I G I T、T I M 3、C D 1 6 0、B T L A、C D 2 4 4、C D 3 0、T L T、V I S T A、B 7 - H 3、P D - L 2、L F A - 1、C D 2、C D 5 8、I C A M - 3、T C R A、T C R B、F O X P 3、H E L I O S、S T 2、P C S K 9、A P O C 3、C D 2 0 0、F A S L G、C L C 2 1、M F G E 8、S E R P I N B 9、T G F、C D 7 3、C D 3 9、L A G 3、I L 1 R 2、A C K R 2、T N F R S F 2 2、T N F R S F 2 3、T N F R S 1 0、D A D 1、P V R、またはI F N R 1 d 3 9の1つ以上の発現が親細胞と比較して調整されており、前記エンゲージャー細胞がA B O血液群O型またはアールエイチ因子陰性(R h -)である、請求項 1 ~ 3 9 のいずれか1項に記載のI C E細胞。

30

## 【請求項 4 1】

前記細胞表面上の抗体Fcレセプターの発現が亢進しており、前記Fcレセプターが、抗体依存性細胞傷害性(A D C C)または補体媒介細胞傷害性(C D C)を回避するのを助ける、請求項 1 ~ 4 0 のいずれか1項に記載のI C E細胞。

## 【請求項 4 2】

40

50

前記Fcレセプターが、CD16、CD32、CD64、または切断型CD64である、請求項41に記載のICE細胞。

【請求項43】

前記細胞が多能性である、請求項1～42のいずれか1項に記載のICE細胞。

【請求項44】

前記細胞が低免疫性多能性(HIP)細胞である、請求項43に記載のICE細胞。

【請求項45】

前記細胞がABO血液型O型(HIPO)を有する低免疫性多能性細胞である、請求項44に記載のICE細胞。

【請求項46】

前記細胞がRh因子陰性(HIP-)である低免疫性多能性細胞である、請求項45に記載のICE細胞。

【請求項47】

前記細胞が、ABO血液型O型を有し、かつRh因子陰性(HIPO-)である低免疫性多能性細胞である、請求項46に記載のICE細胞。

【請求項48】

前記細胞が、多能性(PS C)細胞、誘導PS C(iPS C)細胞、または胚性幹細胞(ESC)である、請求項43～47のいずれか1項に記載のICE細胞。

【請求項49】

前記エンゲージャー細胞が特定の組織型である、請求項1～42のいずれか1項に記載のICE細胞。

【請求項50】

前記細胞が、キメラ抗原レセプター(CAR)細胞、T細胞、NK細胞、内皮細胞、ドーパミン作動性ニューロン、心臓細胞、膵島ベータ細胞、甲状腺上皮細胞、副甲状腺細胞、または網膜色素上皮細胞である、請求項49に記載のICE細胞。

【請求項51】

前記細胞が、CAR-T細胞、CAR-NK細胞、TCR T細胞、またはTCR NK細胞である、請求項49に記載のICE細胞。

【請求項52】

前記エンゲージャー細胞が多能性細胞から分化したものである、請求項1～42または49～51のいずれか1項に記載のICE細胞。

【請求項53】

請求項49～52のいずれか1項に記載のICE細胞と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

【請求項54】

請求項49～52のいずれか1項に記載のICE細胞と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬品。

【請求項55】

対象の疾患を治療する方法であって、請求項49～52のいずれか1項に記載のICE細胞を対象に移植することを含む、方法。

【請求項56】

前記疾患が、1型糖尿病、心疾患、神経疾患、内分泌疾患、がん、失明、または血管疾患である、請求項55に記載の方法。

【請求項57】

対象の疾患を治療するための医薬組成物を調製するための、請求項49～52のいずれか1項に記載のICE細胞の使用。

【請求項58】

対象の疾患を治療するための、請求項49～52のいずれか1項に記載のICE細胞の使用。

【請求項59】

10

20

30

40

50

前記疾患が、1型糖尿病、心疾患、神経疾患、内分泌疾患、がん、失明、または血管疾患である、請求項57または58のいずれか1項に記載の使用。

【請求項60】

前記免疫細胞上のSIRPタンパク質とエンゲージする、前記細胞表面上のシグナル制御タンパク質アルファ(SIRP)エンゲージャー分子をさらに含み、前記SIRPのエンゲージメントは、前記エンゲージャー細胞が前記免疫細胞によって殺傷されないよう保護し、前記SIRPエンゲージャー細胞の表面分子は、機能的細胞内ドメインを欠く、請求項1～52のいずれか一項に記載のICE細胞。

【請求項61】

前記エンゲージャー分子がタンパク質である、請求項60に記載のICE細胞。

10

【請求項62】

前記タンパク質が融合タンパク質である、請求項61に記載のICE細胞。

【請求項63】

前記融合タンパク質がCD47細胞外ドメイン(ECD)を含む、請求項62に記載のICE細胞。

【請求項64】

前記エンゲージャー分子が、免疫グロブリンスーパーファミリドメインを含む、請求項60～63のいずれか一項に記載のICE細胞。

【請求項65】

前記SIRPエンゲージャー分子が、SIRPに結合する1つ以上の抗体相補性決定領域(CDR)を含む、請求項60～64のいずれか一項に記載のICE細胞。

20

【請求項66】

前記CDRが、配列ID番号18～23のいずれか1つと少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、請求項65に記載のICE細胞。

【請求項67】

前記CDRが、配列ID番号18～23の配列のいずれか1つを含む、請求項66に記載のICE細胞。

【請求項68】

前記エンゲージャー分子が、PD-1、TIM3、LILRB3、およびLILRB1からなる群から選択される1つ以上の免疫細胞レセプターとエンゲージする、請求項2に記載のICE細胞。

30

【請求項69】

安全スイッチをさらに含む、請求項1～53または68のいずれか一項に記載のICEセル。

【請求項70】

前記安全スイッチがスーサイド遺伝子である、請求項69に記載のICE細胞。

【請求項71】

前記スーサイド遺伝子が、(a)ガンシクロビルトリガーを有する単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子(HSV-tk)、(b)5-フルオロシトシン(5-FC)トリガーを有する大腸菌シトシンデアミナーゼ遺伝子(EC-CD)、または(c)AP1903トリガーを有する誘導性iCasp9タンパク質である、請求項70に記載のICE細胞。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

I. 関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法第119条(e)により、2022年4月13日出願の米国仮出願第63/330,539号および2023年2月24日出願の米国仮出願第63/448,081号に対する優先権を主張し、これら出願はその全体が参照により本明細書に援用される。

50

## 【 0 0 0 2 】

## II . 技術分野

本発明は、免疫チェックポイントエンゲージメント ( I C E ) 機能を高めた細胞を提供する。一部の実施形態では、この細胞は、プログラム細胞死タンパク質 1 ( P D - 1 ) エンゲージメント機能 ( P D - 1 エンゲージャー細胞 ) を有し、この細胞は、未修飾の P D - 1 エンゲージメント機能を有する親細胞と比較して、対象への移植時に免疫応答に抵抗する。一部の実施形態では、免疫チェックポイントエンゲージャー細胞は低免疫性細胞である。他の実施形態では、細胞は多能性細胞である。他の実施形態では、細胞は胚性幹細胞 ( E S 細胞 ) または人工多能性幹細胞 ( i P S C ) である。他の実施形態では、免疫チェックポイントエンゲージャー細胞は分化した体細胞である。他の実施形態では、免疫チェックポイントエンゲージャー細胞は低免疫性多能性細胞 ( H I P 細胞 ) である。さらなる実施形態では、H I P 細胞は血液型 O 型 ( H I P O )、アールエイチ因子 ( R h ) 陰性 ( H I P - )、または O 型かつ R h - ( H I P O - ) である。他の実施形態では、免疫チェックポイントエンゲージャー細胞は、H I P 細胞、H I P - 細胞、または H I P O - 細胞から誘導または分化されたものである。他の実施形態では、免疫チェックポイントエンゲージャー細胞は、抗体依存性細胞傷害性 ( A D C C ) または補体依存性細胞傷害性 ( C D C ) から保護するための抗体 F c レセプターを含む。他の実施形態では、I C E 細胞は、L I L R B 1 エンゲージャー、L I L R B 3 エンゲージャー、および T I M 3 エンゲージャーからなる群から選択される阻害性免疫細胞レセプターに結合するリガンドを発現する。他の実施形態では、I C E 細胞は、C D 4 7、切断型 C D 4 7、S I R P エンゲージャー、L I L R B 1 エンゲージャー、L I L R B 3 エンゲージャー、および T I M 3 エンゲージャーからなる群から選択される別の阻害性免疫細胞レセプターに結合するリガンドをさらに発現する P D - 1 エンゲージャー細胞である。

10

20

## 【 背景技術 】

## 【 0 0 0 3 】

## III . 背景技術

ナチュラルキラー細胞 ( N K 細胞 ) は、自然免疫系に不可欠な細胞傷害性リンパ球である。N K 細胞が果たす役割は、脊椎動物の適応免疫応答における細胞傷害性 T 細胞と類似している。N K 細胞は、ウイルス感染細胞やがん細胞に対して迅速な応答を示す。通常、N K 細胞は、主要組織適合遺伝子複合体 ( M H C ) のダウンレギュレーションにより標的細胞によって活性化されるが、これは主要な抑制性 N K 細胞シグナルの 1 つである。N K 細胞が活性化するとサイトカインが放出され、溶血またはアポトーシスが起る。N K 細胞は独特であり、他の刺激性 N K 細胞シグナルをアップレギュレーションすることでストレスを受けた細胞を認識し、特定の細胞エピトープへの事前の曝露を必要としない。そのため応答が非常に速い。また、遊離抗体 F c の結合が強力な刺激性 N K 細胞シグナルとなるため、抗体を負荷された細胞にも迅速に応答することができる。N K 細胞は、I L - 2 または I L - 1 5 などの一部のサイトカインへの曝露を除き、M H C クラス 1 の「自己」マーカーが欠如した細胞を殺傷するために大きな活性化を必要としない。この役割は特に重要である。なぜなら、M H C I マーカーがダウンレギュレートされたり欠損したりした有害な細胞は、T リンパ球細胞などの他の免疫細胞によって検出および破壊できないからである。

30

40

## 【 0 0 0 4 】

N K 細胞は、B リンパ球および T リンパ球を生成する共通のリンパ前駆細胞から分化した大きな顆粒状のリンパ球である。N K 細胞は、骨髄、リンパ節、脾臓、扁桃腺、および胸腺で分化および成熟し、循環に入る。

## 【 0 0 0 5 】

P D - 1 と呼ばれるプログラム細胞死タンパク質 1、または C D 2 7 9 ( 分化クラスター 2 7 9 ) は、T 細胞、B 細胞、および一部の N K 細胞の表面に存在するタンパク質であり、免疫系をダウンレギュレーションし、T 細胞の炎症活性を抑制することによって、免疫系の応答を調節し、自己耐性を促進する役割を果たしている。このことは自己免疫疾

50

患を防ぐが、免疫系ががん細胞を殺傷するのを妨げることもある。

【0006】

PD-1は、慢性的な感染症やがんの状況において見られるように、持続的な抗原遭遇の際に高く持続的な発現レベルを示すことが多い。PD-1は免疫チェックポイントであり、2つのメカニズムによって自己免疫を防御する。まず、リンパ節での抗原特異的T細胞のアポトーシス(プログラム細胞死)を促進する。第二に、制御性T細胞(抗炎症性、抑制性T細胞)のアポトーシスを低減させる。

【0007】

PD-1/PD-L1(PD-1のリガンド)に基づく経路は、がんの免疫療法において大きな価値があり、重要な免疫チェックポイントとなっている。PD-1/PD-L1相互作用の抗体インヒビターは、多くの腫瘍で臨床効果を示している。

10

【0008】

ヒトのPD-1タンパク質はPDCD1遺伝子によってコードされている。PD-1は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞表面レセプターで、T細胞およびプロB細胞に発現している。PD-1はPD-L1およびPD-L2の2つのリガンドと結合する。

【0009】

プログラム死リガンド1(PD-L1)は、分化クラスター274(CD274)またはB7ホモログ1(B7-H1)としても知られるタンパク質で、ヒトではCD274遺伝子によってコードされている。PD-L1は40kDaの1型膜貫通タンパク質であり、妊娠、組織移植、自己免疫疾患、および肝炎などの特定の疾患状態の際に免疫系の適応的な働きを抑制する重要な役割を果たすと考えられている。通常、適応免疫系は、外因性または内因性の危険シグナルによる免疫系の活性化に関連した抗原に反応する。その結果、抗原特異的CD8+T細胞および/またはCD4+ヘルパー細胞のクローン性増殖が促進される。PD-L1と抑制性チェックポイント分子PD-1との結合は、イムノレセプター・チロシン・ベースド・スイッチ・モチーフ(ITSM)を介したリン酸化酵素(SHP-1またはSHP-2)との相互作用に基づく抑制シグナルを伝達する。これにより、リンパ節で抗原特異的T細胞の増殖が抑えられると同時に、制御性T細胞(抗炎症性、抑制性T細胞)のアポトーシスも抑えられる。これはさらに、遺伝子Bcl-2の制御低下によって媒介される。

20

30

【0010】

プログラム細胞死1リガンド2(PD-L2、B7-DCとしても知られる)は、ヒトではPDCD1LG2遺伝子によってコードされるタンパク質である。PDCD1LG2はCD273(分化クラスター273)としても知られる。PDCD1LG2は免疫チェックポイントレセプターのリガンドであり、適応免疫応答の負の制御に関与している。PD-L2は、プログラム細胞死タンパク質1(PD-1)のリガンドとして知られている2つのうちの1つである。

【0011】

SIRPはシグナル制御タンパク質(SIRP)ファミリーのメンバーであり、免疫グロブリンスーパーファミリーにも属する。SIRPファミリーメンバーは、レセプター型膜貫通糖タンパク質であり、レセプターチロシンキナーゼ共役シグナル伝達過程の負の制御に関与することが知られている。SIRPは、チロシンキナーゼによってリン酸化される。リン酸化されたチロシン残基はSH2ドメイン含有チロシンホスファターゼ(PTP)をリクルートし、その基質となる。SIRPは、さまざまな成長因子レセプターを介したシグナル伝達に関与している。

40

【0012】

CD47はSIRPのリガンドである。CD47は「自己のマーカ-」タンパク質であり、腫瘍の種類を問わず広く過剰発現することができる。これは、がん免疫療法の新たな強力なマクロファージ免疫チェックポイントとして注目されている。腫瘍細胞のCD47は、マクロファージの食作用を抑制する「食べないで」というシグナルを送る。これは

50

、CD47インヒビターにとって、血液がんおよび固形腫瘍に対する単剤療法および併用療法の両方として、機会および課題となる。これらの薬剤のいくつかは、現在臨床試験中である。

#### 【0013】

CD47の細胞質シグナル伝達は、その細胞内ドメイン(ICD)を介して行われる可能性があるが、CD47の細胞質テールと直接相互作用するタンパク質は今のところほとんど同定されていない(Lamy L., J Biol Chem. 278:23915-21 (2003); Wu A.L., Mol Cell. 4:619-25 (1999))。ユビキリン-1は、そのような結合パートナーの1つであり、G に結合し、それによってヘテロ三量体Gタンパク質をCD47に繋ぎとめる(N'Diaye E.N., J Cell Biol. 163:1157-65 (2003))。この文脈において、ユビキリン-1はGi共役型レセプターCXCR4によってシグナル伝達される遊走を抑制する(Sick E., Glia. 59:308-19 (2011))。前述の文献は、その全体を参照により本明細書に援用する。

10

#### 【0014】

ヒト初代NK細胞は刺激によりSIRP を発現し、CD47に結合することが示された。これにより、CD47発現細胞に対する殺傷効果を低減させる。(PCT/US20/39220参照。その全体を参照により本明細書に援用する)。

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0015】

【非特許文献1】Lamy L., J Biol Chem. 278:23915-21 (2003)

【非特許文献2】Wu A.L., Mol Cell. 4:619-25 (1999)

【非特許文献3】N'Diaye E.N., J Cell Biol. 163:1157-65 (2003)

【非特許文献4】Sick E., Glia. 59:308-19 (2011)

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0016】

自家誘導多能性幹細胞(iPSC)は、理論的には患者特異的な細胞ベースの臓器修復戦略において無限の細胞源となる。しかし、その生成には技術および製造上の課題があり、長時間のプロセスであり、概念上は急性期の治療を妨げる。同種iPS細胞を用いた治療法や胚性幹細胞を用いた治療は、製造の観点からは容易であり、十分にスクリーニングされ標準化された高品質の細胞製品の作製が可能となる。多能性幹細胞は3つの生殖細胞層のどの細胞タイプにも分化できるため、幹細胞治療の応用の可能性は幅広い。分化は、移植部位の臓器環境で分化および成熟を続ける前駆細胞を移植することにより*ex vivo*または*in vivo*で行うことができる。*ex vivo*分化では、研究者や臨床医が手順を詳細に監視し、移植前に適切な細胞集団の生成を確認することができる。しかし、このような細胞は同種由来であるため、拒絶反応を起こす可能性がある。

30

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0017】

#### IV. 発明の概要

本発明は、免疫チェックポイントエンゲージメント機能を高めた細胞(免疫チェックポイントエンゲージャー「ICE」細胞)を提供する。一部の実施形態では、ICE細胞はPD-1エンゲージメント機能を有する(PD-1エンゲージャー細胞)。ICE細胞は、対応する未修飾の免疫チェックポイントエンゲージメント機能を有する親細胞と比較して、対象への移植時に適応免疫および自然免疫を緩和する。一部の実施形態では、PD-1エンゲージャー細胞は低免疫性多能性(HIP)細胞である。さらなる実施形態では、HIP細胞は血液型O型(HIPO)、アールエイチ因子(Rh)陰性(HIP-)、またはO型かつRh-(HIPO-)である。他の実施形態では、PD-1エンゲージャー細胞は、HIP細胞、HIP-細胞、またはHIPO-細胞から誘導または分化されたものである。

40

50

## 【 0 0 1 8 】

したがって、本発明は、免疫チェックポイントエンゲージャー（ICE）細胞を提供し、エンゲージャー分子が細胞表面に発現され、前記エンゲージャー分子が免疫細胞上の免疫チェックポイント分子とエンゲージし、前記エンゲージャー分子が、少なくとも、ICE細胞が免疫細胞によって殺傷されないように保護するレベルで発現されている。一部の態様では、エンゲージャー分子は、免疫細胞上のSIRPとエンゲージしないタンパク質である。他の態様では、エンゲージャー分子はPD-1とエンゲージする。

## 【 0 0 1 9 】

本発明の他の態様では、タンパク質は、PD-1に結合する免疫グロブリンドメインを含む。他の態様では、免疫グロブリンドメインは抗体VHドメインである。他の態様では、抗体VHドメインは、配列ID番号1のアミノ酸番号146～264と少なくとも90%の配列同一性を有する。好ましい態様では、抗体VHドメインは、配列ID番号1のアミノ酸番号146～264の配列を含む。他の態様では、免疫グロブリンドメインは抗体VLドメインである。他の態様では、抗体VLドメインは、配列ID番号1のアミノ酸番号21～130と少なくとも90%の配列同一性を有する。好ましい態様では、抗体VHドメインは、配列ID番号1のアミノ酸番号21～130の配列を含む。

10

## 【 0 0 2 0 】

本発明の一部の態様では、ICE細胞は融合タンパク質であるタンパク質を発現する。他の態様では、融合タンパク質は、配列ID番号2のIL-2シグナルペプチドと少なくとも90%の配列同一性を有する。好ましい態様では、融合タンパク質は配列ID番号2のIL-2シグナルペプチドを含む。他の態様では、融合タンパク質は配列ID番号3のCD8aヒンジペプチドと少なくとも90%の配列同一性を有する。好ましい態様では、融合タンパク質は配列ID番号3のCD8aヒンジペプチドを含む。一部の態様では、融合タンパク質は、配列ID番号4のPDGFR膜貫通ドメイン（TMD）と少なくとも90%の配列同一性を有する。好ましい態様では、融合タンパク質は配列ID番号4のPDGFR TMDを含む。

20

## 【 0 0 2 1 】

本発明の一部の態様では、エンゲージャー分子は、配列ID番号1と少なくとも90%の配列同一性を有するタンパク質である。好ましい態様では、エンゲージャー分子は配列ID番号1の配列同一性を有する。

30

## 【 0 0 2 2 】

本発明の一部の態様では、エンゲージャー分子は、PD-1に結合する抗体Fabまたは一本鎖可変フラグメント（scFV）を含む。他の態様では、FabまたはscFVは、解離定数（Kd）によって測定される親和性でPD-1に結合し、Kdは約 $10^{-7}$ ～ $10^{-13}$  Mである。他の態様では、エンゲージャー分子は、PD-1に結合する1つ以上の抗体相補性決定領域（CDR）を含む。他の態様では、1つ以上のCDRが、配列ID番号18～23のいずれか1つと少なくとも90%の配列同一性を有する。他の態様では、1つ以上のCDRが配列ID番号18～23のいずれか1つの配列を含む。

## 【 0 0 2 3 】

本発明の一部の態様では、エンゲージャー分子は、異種膜貫通ドメイン（TMD）を含む融合タンパク質である。他の態様では、TMDは、1つのヘリックス、複数のヘリックス、またはロールアップされたシートを含む。他の態様では、異種TMDは、CD85f、CD349、CD284、CD261、CD172b、CD277、CD186、CD156c、CD304、CD254、CD263、CD267、CD337、CD170、CD283、CD133、CD327、CD205、CD232、CD282、CD16b、CD85i、CD85a、CD85c、CD275、CD108、CD358、CD335、CD218b、CD355、CD336、CD160、CD25、CD4、CD8a、CD235a、CD233、CD230、CD90、CD74、CD3d、CD340、CD236、CD61、CD18、CD54、CD29、CD1a、CD5、CD220、CD2、CD66e、CD51、CD141、CD115、CD42b

40

50

、CD 2 2 1、CD 2 7 1、CD 5 5、CD 2 4 3、CD 9 8、CD 1 0、CD 4 1、CD 1 4、CD 4 5、CD 2 2 8、CD 1 6 a、CD 4 9 e、CD 1 2 6、CD 6 3、CD 4 8、CD 7、CD 1 4 0 b、CD 3 g、CD 1 1 7、CD 2 8、CD 8 b、CD 3 7、CD 1 1 b、CD 1 0 7 a、CD 3 3 1、CD 2 2 2、CD 2 0、CD 7 9 a、CD 3 2、CD 1 4 3、CD 3 2 4、CD 4 2 c、CD 1 0 7 b、CD 5 6、CD 1 0 2、CD 4 9 d、CD 6 6 a、CD 1 4 2、CD 5 9、CD 6 2 L、CD 1 2 1 a、CD 1 2 2、CD 1 3、CD 1 5 5、CD 1 1 9、CD 1 9、CD 1 1 6、CD 4 6、CD 1 e、CD 1 d、CD 2 2 7、CD 4 4、CD 6 2 P、CD 1 0 4、CD 4 3、CD 1 4 0 a、CD 3 1、CD 1 5 2、CD 3 2 6、CD 6 2 E、CD 3 6、CD 1 2 7、CD 4 9 b、CD 1 0 5、CD 3 5、CD 2 2 3、CD 1 3 8、CD 3 2 5、CD 5 8、CD 1 0 6、CD 5 3、CD 1 2 0 a、CD 2 2 4、CD 2 1、CD 3 3、CD 2 2、CD 1 2 0 b、CD 1 1 a、CD 1 1 c、CD 3 6 3、CD 7 3、CD 8 8、CD 2 0 4、CD 3 3 2、CD 9、CD 2 0 3 a、CD 3 3 4、CD 3 3 3、CD 2 0 6、CD 4 9 f、CD 2 3 8、CD 2 5 2、CD 8 9、CD 1 2 4、CD 1 8 1、CD 1 8 2、CD 2 4、CD 9 5、CD 4 0、CD 4 9 c、CD 1 5 9 a、CD 1 5 9 c、CD 3 1 4、CD 2 7、CD 1 2 3、CD 2 6、CD 8 2、CD 1 2 1 b、CD 3 4、CD 3 8、CD 3 0、CD 1 b、CD 1 c、CD 1 5 4、CD 6、CD 5 2、CD 1 3 2、CD 3 2、CD 6 6 b、CD 1 7 1、CD 1 9 1、CD 1 9 7、CD 1 8 5、CD 1 3 1、CD 5 0、CD 7 0、CD 1 5 3、CD 1 4 4、CD 8 0、CD 3 6 2、CD 6 8、CD 3 6 1、CD 1 4 7、CD 3 0 9、CD 1 3 5、CD 2 9 2、CD 1 0 3、CD 1 3 0、CD 4 2 d、CD 6 6 d、CD 6 6 c、CD 9 6、CD 1 1 0、CD 7 9 b、CD 2 0 0、CD 1 9 2、CD 2 3 1、CD 8 6、CD 2 1 2、CD 1 1 8、CD 1 4 6、CD 1 3 4、CD 1 5 8 a、CD 1 5 8 b 1、CD 1 5 8 b 2、CD 1 5 8 e、CD 1 5 8 k、CD 1 5 8 j、CD 1 5 8 i、CD 1 7 8、CD 2 9 5、CD 1 5 1、CD 9 7、CD 1 8 3、CD 3 9、CD 2 3 9、CD 1 9 3、CD 1 9 4、CD 1 9 5、CD 1 9 6、CD w 1 9 8、CD w 1 9 9、CD 2 9 6、CD 2 9 8、CD 4 9 a、CD 3 2 2、CD 8 5 g、CD 1 8 4、CD 1 7 2 a、CD 1 5 6 a、CD 3 3 9、CD 1 5 6 b、CD 2 1 3 a 1、CD 1 2 9、CD 8 3、CD 1 2 5、CD 2 4 1、CD 2 6 9、CD 2 0 2 b、CD 8 7、CD 1 6 4、CD 1 3 6、CD 1 3 7、CD 2 4 9、CD 6 9、CD 9 1、CD w 2 1 0 b、CD 1 6 7 a、CD 3 0 0 c、CD 1 5 7、CD 3 1 7、CD 1 4 8、CD 1 6 1、CD 2 1 5、CD 1 5 0、CD 1 1 d、CD 2 1 8 a、CD 2 1 0、CD 1 6 6、CD 1 6 2、CD 2 1 3 a 2、CD 2 4 2、CD 1 5 8 g、CD 1 5 8 h、CD 2 7 9、CD 1 1 1、CD 2 8 1、CD 2 2 6、CD 2 3 4、CD 1 6 7 b、CD 3 0 0 e、CD 2 7 6、CD 3 0 5、CD 3 0 0 g、CD 3 0 0 d、CD 1 0 9、CD 2 7 2、CD 1 6 3、CD 3 0 2、CD 1 5 8 f 1、CD 8 5 h、CD 8 5 d、CD 1 7 7、CD 1 5 8 z、CD 1 5 8 f 2、CD 8 5 j、CD 3 0 0 f、CD 9 2、CD 3 5 1、CD 1 1 2、CD 1 0 0、CD 2 7 0、CD 1 0 1、CD 2 9 7、CD 3 1 6、CD 3 5 2、CD 2 1 7、CD 3 0 7 b、CD 3 0 7 a、CD 3 0 7 c、CD 3 0 7 d、CD 3 0 7 e、CD 1 1 4、CD 1 8 0、CD 1 5 8 d、CD 2 7 3、CD 2 9 0、CD 2 4 4、CD 1 6 9、CD 2 9 9、CD 3 1 8、CD 3 6 0、CD 2 2 9、CD 2 4 8、CD 3 5 4、CD 3 2 0、CD 9 3、CD 3 1 9、CD 1 1 3、CD 1 6 3 b、CD 2 8 9、CD 2 8 8、CD 3 2 9、CD 2 7 4、CD 3 5 3、CD 1 7 2 g、CD 3 1 5、CD 2 8 0、CD 2 6 4、CD 3 0 0 a、CD 3 1 2、CD 8 4、CD 3 4 4、CD 3 5 0、CD 2 4 6、CD 2 0 1、CD 3 3 8、CD 2 0 8、CD 2 5 7、CD 3 2 8、CD 2 8 6、CD 3 5 7、CD 2 9 4、CD 3 2 1、CD 2 6 5、CD 2 7 8、ITGA 7、ITGA 8、ITGA 9、ITGA 10、ITGA 11、CD 5 1、CD 4 1、CD 2 9、CD 1 8、CD 6 1、およびCD 1 0 4 からなる群から選択される。他の態様では、融合タンパク質のTMDは、CD 4 7 (配列ID番号5)、CD 6 4 (配列ID番号6)、またはPDGFR (配列ID番号4) に由来する。

【0024】

他の態様では、TMDは、配列ID番号5または配列ID番号6と少なくとも90%の

配列同一性を有する配列を含む。好ましい態様では、TMDは、配列ID番号5または配列ID番号6の配列を含む。他の態様では、TMDは7回膜貫通タンパク質(7TM)または免疫グロブリン細胞表面タンパク質に由来する。

【0025】

本発明の一部の態様では、エンゲージャー分子は細胞内ドメイン(ICD)を持たない。他の態様では、エンゲージャー分子は、CD16、CD32、CD64、CD8、CD3、CD28、またはCD137由来の細胞内ドメインを有する。

【0026】

本発明の一部の態様では、エンゲージャー分子は、ECD配列、TMD配列、またはICD配列を連結する1つ以上のリンカー領域またはヒンジ領域を有する。

10

【0027】

他の態様では、タンパク質は、抗体、レセプター、リガンド、または接着タンパク質である。

【0028】

本発明の一部の態様では、本明細書に記載のICE細胞は、さらに、HLA-IまたはHLA-IIの発現が低下または消失している。他の態様では、細胞はABO血液群O型である。他の態様では、細胞はアールエイチ因子陰性(Rh-)である。他の態様では、細胞は、RhC抗原、RhE抗原、KellK抗原(KEL)、Duffy(FY)Fya抗原、DuffyFy3抗原、Kidd(JK)Jkb抗原、MNS抗原U、およびMNS抗原Sからなる群から選択されるRhタンパク質抗原の発現が低下または消失している。

20

【0029】

一部の態様では、本発明のICE細胞は、未修飾の親細胞と比較して内因性主要組織適合複合体クラスI(HLA-I)の機能が低下し、かつ未修飾の親細胞と比較して内因性主要組織適合複合体クラスII(HLA-II)の機能が低下している低免疫原性(HI)細胞である。

【0030】

他の態様では、エンゲージャー細胞は、HLA-Iヒト白血球抗原、HLA-IIヒト白血球抗原、CD64、CD47、CD38、CCR5、CXCR4、NLRC5、CITTA、B2M、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-G、PD-L1、CTLA-4-Ig、CD47、CI-インヒビター、IL-35、RFX-5、RFXAP、RFXANK、NFY-A、NFY-B、NFY-C、IRF-1、OX40、GITR、4-1BB、CD28、B7-1、B7-2、ICOS、CD27、HVEM、SLAM、CD226、PD1、CTL4、LAG3、TIGIT、TIM3、CD160、BTLA、CD244、CD30、TLT、VISTA、B7-H3、PD-L2、LFA-1、CD2、CD58、ICAM-3、TCRA、TCRB、FOXP3、HELIOS、ST2、PCSK9、APOC3、CD200、FASLG、CLC21、MFG8、SERPINB9、TGF、CD73、CD39、LAG3、IL1R2、ACKR2、TNFRSF22、TNFRSF23、TNFRSF10、DAD1、PVR、またはIFN R1 d39の1つ以上の発現が親細胞と比較して調整されており、エンゲージャー細胞がABO血液群O型またはアールエイチ因子陰性(Rh-)である。

30

40

【0031】

他の態様では、本発明のICE細胞は、細胞表面上の抗体Fcレセプターの発現が亢進しており、Fcレセプターは、抗体依存性細胞傷害性(ADCC)または補体媒介細胞傷害性(CDC)を回避するのを助ける。他の態様では、FcレセプターはCD16、CD32、CD64、または切断型CD64である。

【0032】

一部の態様では、本発明のICE細胞は多能性である。他の態様では、細胞は低免疫性多能性(HIP)細胞である。他の態様では、細胞はABO血液型O型(HIPO)を有

50

する低免疫性多能性細胞である。他の態様では、細胞はRh因子陰性(HIP-)である低免疫性多能性細胞である。他の態様では、細胞はABO血液型O型を有し、かつRh因子陰性(HIPO-)である低免疫性多能性細胞である。他の態様では、細胞は、多能性(PSC)細胞、誘導PSC(iPSC)細胞、または胚性幹細胞(ESC)である。

【0033】

本発明の一部の態様では、本明細書に記載のICE細胞は特定の組織型である。他の態様では、細胞は、キメラ抗原レセプター(CAR)細胞、T細胞、NK細胞、内皮細胞、ドーパミン作動性ニューロン、心臓細胞、膵島ベータ細胞、マクロファージ、甲状腺上皮細胞、副甲状腺細胞、または網膜色素上皮細胞である。他の態様では、本発明のICE細胞は、CAR-T細胞、CAR-NK細胞、TCR-T細胞、またはTCR-NK細胞である。他の態様では、エンゲージャー細胞は多能性細胞から分化したものである。

10

【0034】

本発明は、本明細書に記載のICE細胞と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を提供する。

【0035】

本発明は、本明細書に記載のICE細胞と、薬学的に許容される担体とを含む医薬品を提供する。

【0036】

本発明は、本明細書に記載のICE細胞を対象に移植することを含む、対象の疾患を治療する方法を提供する。他の態様では、疾患は1型糖尿病、心疾患、神経疾患、内分泌疾患、がん、失明、または血管疾患である。

20

【0037】

本発明は、対象の疾患を治療するための医薬組成物を調製するための、本明細書に記載のICE細胞の使用を提供する。他の態様では、疾患は1型糖尿病、心疾患、神経疾患、内分泌疾患、がん、失明、または血管疾患である。

【0038】

本発明の一部の態様では、本明細書に記載のICE細胞は、免疫細胞上のSIRPタンパク質とエンゲージする、細胞表面上のシグナル制御タンパク質アルファ(SIRP)エンゲージャー分子をさらに含み、SIRPのエンゲージメントは、エンゲージャー細胞が免疫細胞によって殺傷されないよう保護し、SIRPエンゲージャー細胞の表面分子は、機能的細胞内ドメインを欠く。他の態様では、エンゲージャー分子はタンパク質である。他の態様では、タンパク質は融合タンパク質である。他の態様では、融合タンパク質はCD47細胞外ドメイン(ECD)を含む。他の態様では、エンゲージャー分子は免疫グロブリンスーパーファミリドメインを含む。他の態様では、SIRPエンゲージャー分子は、SIRPに結合する1つ以上の抗体相補性決定領域(CDR)を含む。他の態様では、CDRは、配列ID番号18~23のいずれか1つと少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。他の態様では、CDRは、配列ID番号18~23の配列のいずれか1つを含む。

30

【0039】

本発明は、本明細書に開示のICE細胞であって、前記エンゲージャー分子が、PD-1、TIM3、LILRB3、およびLILRB1からなる群から選択される1つ以上の免疫細胞レセプターとエンゲージする、ICE細胞を提供する。

40

【0040】

本発明は、安全スイッチをさらに含む、本明細書に開示のICE細胞を提供する。一部の態様では、安全スイッチはスーサイド遺伝子である。他の態様では、スーサイド遺伝子は、ガンシクロビルトリガーを有する単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子(HSV-tk)である。他の態様では、スーサイド遺伝子は、5-フルオロシトシン(5-FU)トリガーを有する大腸菌シトシンデアミナーゼ遺伝子(EC-CO)である。他の実施形態では、安全スイッチは、細胞表面に発現されたタンパク質タグであり、臨床的抗体によって認識され、細胞を破壊の標的とする。

50

## 【図面の簡単な説明】

【0041】

【図1】iPSC由来内皮細胞(iEC)の生物発光イメージング(BLI)によるNK細胞キリングアッセイを示す。ナチュラルキラー細胞(NK細胞)をIL-2で72時間刺激した。このNK細胞を、FLuc<sup>+</sup>B2M<sup>-/-</sup>CIITA<sup>-/-</sup>(HLAクラスIおよびHLAクラスIIのダブルノックアウト、DKO)、ならびにPD-1エンゲージヤーをさらに発現しているB2M<sup>-/-</sup>CIITA<sup>-/-</sup>iEC(DKO PD-1エンゲージヤーiEC)に添加した。4時間後にBLIシグナルの低下を評価した(平均値±標準偏差、各群3回の独立実験、双方向スチューデントt検定)。PD-1エンゲージヤー分子は、NK細胞による殺傷からiECの保護をもたらした。

10

【図2】iEC BLI CD8<sup>+</sup>T細胞キリングアッセイを示す。末梢血単核球(PBMC)を*in vitro*でwt iECでプライミングし、ソーティングしたCD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞をこのアッセイのエフェクター細胞として用いた。その後、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞をFLuc<sup>+</sup>wtおよびwt PD-1エンゲージヤーiECに添加した。4時間後にBLIシグナルの低下を評価した(平均値±標準偏差、各群3回の独立実験、双方向スチューデントt検定)。PD-1エンゲージヤー分子はCD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞の殺傷からiECを保護した。

【図3】*in vitro*でのインピーダンスキリングアッセイを示す。標的細胞はHLA-A2陽性のヒト膵臓ベータ細胞である。図3Aおよび図3Bの上図では、ベータ細胞は未修飾である。図3Aおよび図3Bの下図では、ベータ細胞はPD-1エンゲージヤーを発現している。末梢血単核球(PBMC)を*in vitro*でHLA-A2陽性wt iECでプライミングし、ソーティングした。このアッセイではCD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞をエフェクター細胞として用いた。時点0でプライミングしたCD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞をアッセイに加えたところ、未修飾のベータ細胞は死滅したが、PD-1エンゲージヤーを発現させたヒト膵臓ベータ細胞は生存した(平均値±標準偏差、時点ごとに独立した3回の実験)。

20

【図4】組換えPD-1とDKO PD-1エンゲージヤーiECとの結合を示す。フローサイトメトリーはPD-1と二次抗体との特異的結合を示す。陰性コントロールとして二次抗体のみを用いた。

【図5】ホタルルシフェラーゼを発現し、さらにB2MおよびCIITAのダブルノックアウト(DKO)を含むヒト人工多能性幹細胞(iPSC)由来内皮細胞(iEC)を作製した。赤色蛍光タンパク質(RFP)タグを連結した例示的なTIM3エンゲージヤータンパク質を、レンチウイルス粒子を用いてこれらの細胞に導入した。これらをフローサイトメトリーで分析した。ヒストグラムは、形質導入していないiEC DKO(左のピーク)、および形質導入されたiEC DKO+TIM3-E(右のピーク)のRFPシグナルを示し、TIM3エンゲージヤーの発現が確認された。

30

【図6】初代ヒト末梢血NK細胞およびマクロファージでのTIM3表面発現のフローサイトメトリー解析である。NK細胞の96.6%がTIM3陽性であり(図6A)、マクロファージの67.2%がTIM3陽性であった(図6B)。

【図7】NK細胞による2時間のBLIキリングアッセイである。ホタルルシフェラーゼを発現し、さらにB2MおよびCIITAのダブルノックアウト(DKO)を含むヒト人工多能性幹細胞(iPSC)由来内皮細胞(iEC)を作製した。これらの細胞をiEC DKO+TIM3-Eとプレティングし、16時間接着させた。次に、ヒト末梢血NK細胞をウェルに加え、2時間培養した。培養後のBLIシグナルのパーセントを示す。iEC DKOのBLIシグナルは完全に消失した(図7A)。iEC DKO+TIM3-EのBLIシグナルは2時間安定していた(図7B)。

40

【図8】マクロファージによる2時間のBLIキリングアッセイである。ホタルルシフェラーゼを発現したヒトiEC DKOおよびiEC DKO+TIM3-Eをプレティングし、16時間付着させた。次に、ヒト末梢血マクロファージをウェルに加え、2時間培養した。培養後のBLIシグナルのパーセントを示す。iEC DKOのBLIシグナ

50

ルは完全に消失した(図8A)。iEC DKO+TIM3-EのBLISIGNALは2時間安定していた(図8B)。

【図9】NK細胞による24時間のBLIキリングアッセイである。ホタルルシフェラーゼを発現したヒトiEC DKOおよびiEC DKO+TIM3-EをプレATINGし、16時間付着させた。次に、ヒト末梢血NK細胞をウェルに加え、24時間培養した。NK培養24時間後のBLISIGNALのパーセントを示す。iEC DKOのBLISIGNALは完全に消失した(図9A)。iEC DKO+TIM3-EのBLISIGNALは24時間安定していた(図9B)。

【図10】マクロファージによる24時間のBLIキリングアッセイである。ホタルルシフェラーゼを発現したヒトiEC DKOおよびiEC DKO+TIM3-EをプレATINGし、16時間付着させた。次に、ヒト末梢血マクロファージをウェルに加え、24時間培養した。マクロファージ培養24時間後のBLISIGNALのパーセントを示す。iEC DKOのBLISIGNALは完全に消失した(図10A)。iEC DKO+TIM3-EのBLISIGNALは24時間安定し、若干増加さえした(図10B)。

【図11】ホタルルシフェラーゼを発現し、さらにB2MおよびCIITAのダブルロックアウト(DKO)を含むヒト人工多能性幹細胞(iPSC)由来内皮細胞(iEC)を作製した。赤色蛍光タンパク質(RFP)タグに連結した例示的なLILRB3エンゲージャータンパク質を、レンチウイルス粒子を用いてこれらの細胞に導入した。これらをフローサイトメトリーで分析した。ヒストグラムは、形質導入していないiEC DKO(左のピーク)および形質導入されたiEC DKO+LILRB3-E(右のピーク)のRFPシグナルを示し、LILRB3エンゲージャーの発現が確認された。

【図12】初代ヒト末梢血NK細胞およびマクロファージでのLILRB3表面発現のフローサイトメトリー解析である。NK細胞の17.8%がLILRB3陽性であり(図12A)、マクロファージの95.3%がLILRB3陽性であった(図12B)。

【図13】NK細胞による2時間のBLIキリングアッセイである。ホタルルシフェラーゼを発現し、さらにB2MおよびCIITAのダブルロックアウト(DKO)を含むヒト人工多能性幹細胞(iPSC)由来内皮細胞(iEC)を作製した。これらの細胞をプレATINGし、さらにLILRB3エンゲージャーを発現したiEC DKO+LILRB3-EもプレATINGした。細胞を16時間接着させた。次に、ヒト末梢血NK細胞をウェルに加え、2時間培養した。培養後のBLISIGNALのパーセントを示す。iEC DKOのBLISIGNALは完全に消失した(図13A)。iEC DKO+LILRB3-EのBLISIGNALは、2時間で顕著な低下が少なかった(図13B)。

【図14】マクロファージによる2時間のBLIキリングアッセイである。ホタルルシフェラーゼを発現したヒトiEC DKOおよびiEC DKO+LILRB3-EをプレATINGし、16時間付着させた。次に、ヒト末梢血マクロファージをウェルに加え、2時間培養した。培養後のBLISIGNALのパーセントを示す。iEC DKOのBLISIGNALは完全に消失した(図14A)。iEC DKO+LILRB3-EのBLISIGNALは、2時間で顕著な低下が少なかった(図14B)。

【図15】NK細胞による24時間のBLIキリングアッセイである。ホタルルシフェラーゼを発現したヒトiEC DKOおよびiEC DKO+LILRB3-EをプレATINGし、16時間付着させた。次に、ヒト末梢血NK細胞をウェルに加え、24時間培養した。NK培養24時間後のBLISIGNALのパーセントを示す。iEC DKOのBLISIGNALは完全に消失した(図15A)。iEC DKO+LILRB3-EのBLISIGNALは、24時間で顕著な低下が少なかった(図15B)。

【図16】マクロファージによる24時間のBLIキリングアッセイである。ホタルルシフェラーゼを発現したヒトiEC DKOおよびiEC DKO+LILRB3-EをプレATINGし、16時間付着させた。次に、ヒト末梢血マクロファージをウェルに加え、24時間培養した。マクロファージ培養24時間後のBLISIGNALのパーセントを示す。iEC DKOのBLISIGNALは完全に消失した(図16A)。iEC DKO+LILRB3-EのBLISIGNALは、24時間で顕著な低下が少なく、若干増加さえし

10

20

30

40

50

た（図16B）。

【図17】ホタルルシフェラーゼを発現し、さらにB2MおよびCIIITAのダブルノックアウト（DKO）を含むヒト人工多能性幹細胞（iPSC）由来内皮細胞（iEC）を作製した。赤色蛍光タンパク質（RFP）タグに連結した例示的なLILRB1エンゲージータンパク質を、レンチウイルス粒子を用いてこれらの細胞に導入した。これらをフローサイトメトリーで分析した。ヒストグラムは、形質導入していないiEC DKO（左のピーク）および形質導入されたiEC DKO + LILRB1 - E（右のピーク）のRFPシグナルを示し、LILRB1エンゲージータンパク質の発現が確認された。

【図18】初代ヒト末梢血NK細胞およびマクロファージでのLILRB1表面発現のフローサイトメトリー解析である。NK細胞の75.8%がLILRB1陽性であり（図18A）、マクロファージの99.9%がLILRB1陽性であった（図18B）。

【図19】NK細胞による2時間のBLIキリングアッセイである。ホタルルシフェラーゼを発現し、さらにB2MおよびCIIITAのダブルノックアウト（DKO）を含むヒト人工多能性幹細胞（iPSC）由来内皮細胞（iEC）を作製した。これらの細胞をプレATINGし、さらにLILRB1エンゲージータンパク質を発現したiEC DKO + LILRB1 - EもプレATINGした。細胞を16時間接着させた。次に、ヒト末梢血NK細胞をウェルに加え、2時間培養した。培養後のBLIシグナルのパーセントを示す。iEC DKOのBLIシグナルは完全に消失した（図19A）。iEC DKO + LILRB1 - EのBLIシグナルは、2時間安定していた。

【図20】マクロファージによる2時間のBLIキリングアッセイである。ホタルルシフェラーゼを発現したヒトiEC DKOおよびiEC DKO + LILRB1 - EをプレATINGし、16時間付着させた。次に、ヒト末梢血マクロファージをウェルに加え、2時間培養した。培養後のBLIシグナルのパーセントを示す。iEC DKOのBLIシグナルは完全に消失した（図20A）。iEC DKO + LILRB1 - EのBLIシグナルは2時間安定していた（図20B）。

【図21】NK細胞による24時間のBLIキリングアッセイである。ホタルルシフェラーゼを発現したヒトiEC DKOおよびiEC DKO + LILRB1 - EをプレATINGし、16時間付着させた。次に、ヒト末梢血NK細胞をウェルに加え、24時間培養した。NK培養24時間後のBLIシグナルのパーセントを示す。iEC DKOのBLIシグナルは完全に消失した（図21A）。iEC DKO + LILRB1 - EのBLIシグナルは24時間安定していた（図21B）。

【図22】マクロファージによる24時間のBLIキリングアッセイである。ホタルルシフェラーゼを発現したヒトiEC DKOおよびiEC DKO + LILRB1 - EをプレATINGし、16時間付着させた。次に、ヒト末梢血マクロファージをウェルに加え、24時間培養した。マクロファージ培養24時間後のBLIシグナルのパーセントを示す。iEC DKOのBLIシグナルは完全に消失した（図22A）。iEC DKO + LILRB1 - EのBLIシグナルは24時間安定し、若干増加さえした（図22B）。

【図23】PD-1エンゲージータンパク質の導入遺伝子の発現が分化中も維持されたことを示す。iPSC DKOを、レンチウイルス粒子を用いて形質導入し、PD-1エンゲージータンパク質を発現させた（iPSC DKO + PD-1 - E）。フローサイトメトリーから、強い発現が得られることが示される（図23A）。iPSC DKO + PD-1 - EをiEC DKO + PD-1 - Eに分化させても、導入遺伝子の発現は安定したままであった（図23B）。

【図24】TIM3エンゲージータンパク質導入遺伝子の発現が分化中も維持されることを示す。iPSC DKOを、レンチウイルス粒子を用いて形質導入し、TIM3エンゲージータンパク質を発現させた（iPSC DKO + TIM3 - E）。フローサイトメトリーから、強い発現が得られることが示される（図24A）。iPSC DKO + TIM3 - EをiEC DKO + TIM3 - Eに分化させても、導入遺伝子の発現は安定したままであった（図24B）。

【図25】LILRB3エンゲージータンパク質導入遺伝子の発現が分化中も維持されることを示

10

20

30

40

50

す。iPSC DKOを、レンチウイルス粒子を用いて形質導入し、LILRB3エンゲージャーを発現させた(iPSC DKO + LILRB3 - E)。フローサイトメトリーから、強い発現が得られることが示される(図25A)。iPSC DKO + LILRB3 - EをiEC DKO + LILRB3 - Eに分化させても、導入遺伝子の発現は安定したままであった(図25B)。

【図26】LILRB1エンゲージャー導入遺伝子の発現が分化中も維持されることを示す。iPSC DKOを、レンチウイルス粒子を用いて形質導入し、LILRB1エンゲージャーを発現させた(iPSC DKO + LILRB1 - E)。フローサイトメトリーから、強い発現が得られることが示される(図26A)。iPSC DKO + LILRB1 - EをiEC DKO + LILRB1 - Eに分化させても、導入遺伝子の発現は安定したままであった(図26B)。

10

【図27】NK細胞による殺傷から細胞を保護するために必要なTIM3 - E発現の閾値を示す。NK細胞による殺傷からの保護効果を発揮するためのTIM3 - E発現の機能的閾値の有無を評価するために、TIM3 - E導入遺伝子を持つレンチウイルス粒子を用いてiEC DKOを導入した。3日後、導入したiECのプールを、TIM3 - Eの発現に基づいて3つの集団にソーティングした。3つの集団を、iEC DKO + TIM3 - E高、中、低で示す(図27A)。これらの集団のそれぞれをNK細胞と2時間培養し、続いてBLIキリングアッセイを行った(図27B)。すべての標的細胞がルシフェラーゼ陽性であった。2時間のNKインキュベーション後のBLIシグナルのパーセントを示す。iEC DKOのBLIシグナルは完全に消失した。iEC DKO + TIM3 - E高および中のBLIシグナルは安定していたが、iEC DKO + TIM3 - E低のBLIシグナルもバックグラウンドまで低下した。これらの結果は、TIM3 - Eの機能的閾値が低発現レベルと中発現レベルの間にあることを示す。

20

【図28】NK細胞による殺傷から細胞を保護するために必要なLILRB1 - E発現の閾値を示す。NK細胞による殺傷からの保護効果を発揮するためのLILRB1 - E発現の機能的閾値の有無を評価するために、LILRB1 - E導入遺伝子を持つレンチウイルス粒子を用いてiEC DKOを導入した。3日後、導入したiECのプールを、LILRB1 - Eの発現に基づいて3つの集団にソーティングした。3つの集団を、iEC DKO + LILRB1 - E高、中、低で示す(図28A)。これらの集団のそれぞれをNK細胞と2時間培養し、続いてBLIキリングアッセイを行った(図28B)。すべての標的細胞がルシフェラーゼ陽性であった。2時間のNKインキュベーション後のBLIシグナルのパーセントを示す。iEC DKOのBLIシグナルは完全に消失した。iEC DKO + LILRB1 - E高および中のBLIシグナルは安定していたが、iEC DKO + LILRB1 - E低のBLIシグナルもバックグラウンドまで低下した。これらの結果は、LILRB1 - Eの機能的閾値が低発現レベルと中発現レベルの間にあることを示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0042】

VI. 発明を実施するための形態

本発明は、親細胞と比較して、対象への移植時に免疫を低下させる免疫チェックポイントエンゲージメント(ICE)細胞を提供する。一部の実施形態では、ICE細胞は、未修飾のPD - 1エンゲージメント機能を有する親細胞と比較して、対象への移植時に免疫を低下させる、プログラム細胞死タンパク質1(PD - 1)エンゲージメント機能(PD - 1エンゲージャー細胞)が亢進している。一部の実施形態では、PD - 1エンゲージャー細胞は低免疫性細胞である。他の実施形態では、細胞は多能性細胞である。他の実施形態では、細胞は胚性幹細胞(ES細胞)または人工多能性幹細胞(iPSC)である。他の実施形態では、PD - 1エンゲージャー細胞は分化した体細胞である。他の実施形態では、PD - 1エンゲージャー細胞は低免疫性多能性(HIP)細胞である。さらなる実施形態では、HIP細胞は血液型O型(HIPO)、アールエイチ因子(Rh)陰性(HIP -)、またはO型かつRh - (HIPO -)である。他の実施形態では、PD - 1エン

40

50

ゲージャー細胞は、H I P細胞、H I P - 細胞、またはH I P O - 細胞から誘導または分化されたものである。他の実施形態では、P D - 1エンゲージャー細胞は、抗体依存性細胞傷害性( A D C C )または補体依存性細胞傷害性( C D C )から保護するための抗体F cレセプターを含む。他の実施形態では、I C E細胞は、L I L R B 1エンゲージャー、L I L R B 3エンゲージャー、およびT I M 3エンゲージャーからなる群から選択される阻害性免疫細胞レセプターに結合するリガンドを発現する。他の実施形態では、I C E細胞は、C D 4 7、切断型C D 4 7、L I L R B 1エンゲージャー、L I L R B 3エンゲージャー、S I R P エンゲージャー、およびT I M 3エンゲージャーからなる群から選択される別の阻害性免疫細胞レセプターに結合するリガンドをさらに発現するP D - 1エンゲージャー細胞である。

10

**【0043】**

P D - 1、T I M 3、L I L R B 3、およびL I L R B 1のアゴニストがすべて免疫エフェクター細胞を抑制し、治療用の細胞を細胞死から保護したことは意外であった。このように、本発明は、免疫チェックポイントエンゲージャーが、個々のメンバーだけでなく、クラスとして、免疫エフェクター細胞を阻害するアゴニストの有効な標的であることを認識している。さらに本発明は、免疫細胞による殺傷からI C E細胞を保護するためには、このクラスのアゴニストが閾値レベルで発現していなければならないことを認識した。

**【0044】**

本発明は、宿主対移植片の拒絶反応を減少させる再生医療や免疫腫瘍学における細胞治療法を生み出すために、免疫エフェクター細胞を阻害するP D - 1アゴニストの組成物および使用を提供する。一部の実施形態では、P D - 1アゴニスト抗体の配列フラグメント(米国特許第10,493,148号明細書、その全体を参照により本明細書に援用する)を取り出し、新たに設計された融合タンパク質(配列I D番号1)に導入した。本実施形態の融合タンパク質は、( I L - 2またはC D 8 )シグナルペプチド - V L - ( G G G G S ) 3リンカー - V H - C D 8 aヒンジ - P D G F R T M D部分を含む。

20

**【0045】**

他の実施形態では、P D - 1エンゲージャー細胞は前述の細胞から誘導または分化されたものである。一例として、分化したP D - 1エンゲージャー細胞は、内皮細胞、心筋細胞、肝細胞、ドーパミン作動性ニューロン、膵島細胞、網膜色素上皮細胞、ならびに移植および医学的治療に使用される他の細胞タイプであってもよい。これには、C A R - T細胞、T C R T細胞、N K細胞、およびC A R - N K細胞などのキメラ抗原レセプター( C A R )細胞およびT細胞レセプター改変細胞が含まれてよい。

30

**【0046】**

本明細書において、「対象」または「患者」という用語は、家畜、動物園の動物、またはヒトなどのあらゆる動物を指す。「対象」または「患者」は、イヌ、ネコ、鳥、家畜またはヒトなどの哺乳類である。「対象」および「患者」の具体例として、肝臓、心臓、肺、腎臓、膵臓、脳、神経組織、血液、骨、骨髄などに関連する疾患または障害を有する個体(特にヒト)が挙げられるが、これらに限定されない。

**【0047】**

哺乳類細胞はヒト由来でもヒト以外の哺乳類由来でもよい。ヒト以外の哺乳類の例として、マウス、ラット、ネコ、イヌ、ウサギ、モルモット、ハムスター、ヒツジ、ブタ、ウマ、およびヒト以外の霊長類(例えば、チンパンジー、マカク、および類人猿)が挙げられるが、これらに限定されない。

40

**【0048】**

本明細書において「低免疫原性」細胞、「低免疫性」細胞、または「H I」細胞とは、同種の宿主に移入されると免疫学的拒絶反応を低下させる細胞を意味する。好ましい実施形態では、H I細胞は免疫応答を起ささない。したがって、「低免疫原性」とは、免疫操作前の親(すなわち「w t」)細胞の免疫応答と比較して、免疫応答が著しく低下または消失していることを指す。

**【0049】**

50

「低免疫原性細胞 O - 」 「低免疫原性細胞 ORh - 」細胞または「HIO - 」細胞とは、本明細書において、ABO血液群 O でかつアールエイチ因子 Rh - でもある HI 細胞も意味する。HIO - 細胞は、O - 細胞から生成されたものであり、酵素により O - に修飾されたもの、あるいは遺伝子工学により O - に改変されたものである。

【0050】

本明細書において「HLA」または「ヒト白血球抗原」複合体とは、ヒトの主要組織適合複合体 (MHC) タンパク質をコードする遺伝子複合体を意味する。HLA 複合体を構成するこれらの細胞表面タンパク質は、抗原に対する免疫応答を制御する役割を担っている。ヒトでは、クラス I およびクラス II、つまり「HLA - I」および「HLA - II」の 2 つの MHC がある。HLA - I には HLA - A、HLA - B、HLA - C などがある。これらは細胞内部からペプチドを提示し、HLA - I 複合体によって提示された抗原はキラー T 細胞 (CD8 + T 細胞または細胞傷害性 T 細胞としても知られる) を引き寄せる。HLA - I タンパク質は  $\beta$  2 ミクログロブリン (B2M) と関連している。HLA - II には HLA - DP、HLA - DM、HLA - DOB、HLA - DQ、HLA - DR などがあり、細胞外からの抗原を T リンパ球に提示する。これにより CD4 + 細胞 (T ヘルパー細胞としても知られる) が刺激される。「MHC」または「HLA」のいずれかの使用は、遺伝子が、ヒト由来 (HLA) であるかヒト以外の由来 (MHC) であるかにより決まるため、限定するものではないことを理解されたい。したがって、哺乳動物細胞に関する限り、本明細書中でこれらの用語は互換的に使用される。

10

【0051】

本明細書において「遺伝子ノックアウト」とは、特定の遺伝子が存在する宿主細胞において、その遺伝子を不活性化するプロセスを意味し、その結果、目的のタンパク質が産生されないか、不活性型となる。当業者には理解され、さらに後述するように、これは、遺伝子から核酸配列を除去する、配列を他の配列で中断させる、読み枠を変更する、または核酸の調節コンポーネントを変更するなど、多くの異なる方法で行うことができる例えば、目的の遺伝子のコード領域の全部または一部を除去するか「ナンセンス」配列に置き換えたり、プロモーターなどの調節配列の全部または一部を除去または置き換えたり、翻訳開始配列を除去または置き換えたりすることができる。

20

【0052】

本明細書において「遺伝子ノックイン」とは、宿主細胞に遺伝子機能を付加するプロセスを意味する。これにより、コードされたタンパク質のレベルが上昇する。当業者には理解されるように、これは宿主細胞に遺伝子のコピーを 1 つ以上追加したり、内在性遺伝子の調節コンポーネントを変更してタンパク質の発現を増加させるなど、いくつかの方法で行うことができる。これは、プロモーターの修飾、異なるプロモーターの追加、エンハンサーの追加、または他の遺伝子発現配列の修飾によって行われてよい。「 $\beta$  2 ミクログロブリン」または「B2M」または「B2M」タンパク質は、後述するアミノ酸配列および核酸配列を有するヒト  $\beta$  2 M タンパク質を指し、ヒト遺伝子は、アクセッション番号 RefSeq NM\_004048.4 を有する。

30

【0053】

「CD47 タンパク質」タンパク質とは、後述するアミノ酸配列および核酸配列を有するヒト CD47 タンパク質を指し、ヒト遺伝子のアクセッション番号は RefSeq NM\_001777.4 を有する。

40

【0054】

PD - 1 レセプターにライゲーションすると、細胞上に発現している天然のリガンド PD - L1 または PD - L2 が細胞内で下流のシグナル伝達を開始し、その生理機能に好ましくない影響を与える可能性がある。免疫細胞の殺傷のみを保護するために、本発明の一部の態様は、本明細書に記載するような PD - 1 エンゲージャーを用いて、改変細胞での細胞外 PD - 1 結合機能を細胞内シグナル伝達から分離する。他の態様は、本発明は、アゴニスト様の PD - 1 結合活性を有するが、改変細胞では望ましくない細胞内シグナル伝達を欠く PD - 1 エンゲージャー融合タンパク質を提供する。他の態様は、PD - L1 ま

50

たはPD-L2細胞外ドメイン(ECD)を含むPD-1エンゲージャー融合タンパク質を提供する。本発明の一部の態様では、このような融合タンパク質は、相同または異種の細胞内ドメインを有するであろう。他の態様では、融合タンパク質は細胞内ドメインが切断されているか、または細胞内ドメインを持たない。

本発明は、改変細胞上に発現され、免疫細胞上のPD-1にアゴニスト様に結合してPD-1シグナル伝達を活性化するように設計されたPD-1エンゲージャー融合タンパク質を提供する。エフェクター免疫細胞は、PD-1を発現する免疫細胞であればどのようなものでもよく、骨髄系(単球、マクロファージ、多形核細胞など)でも、リンパ系(リンパ球、T細胞、B細胞、またはNK細胞など)でもよい。

【0055】

PD-1/PD-L1経路は確立された免疫チェックポイントである。標的細胞にPD-L1を強制的に過剰発現させると、免疫エフェクター細胞において抑制シグナルを効果的に誘導することができるが、PD-L1は改変細胞内で望ましくないシグナル伝達を誘導する可能性がある。本発明は、改変細胞の生理機能を乱すことなく、この免疫チェックポイントを利用する新規な戦略を提供する。本明細書に開示のPD-1エンゲージャータンパク質は、細胞内シグナル伝達ドメインを持たない。

【0056】

したがって、一部の実施形態では、本明細書で提供される融合タンパク質は、細胞外ドメイン(ECD)および膜貫通ドメイン(TMD)を含み、細胞内ドメイン(ICD)を含んでも含まなくてもよい。融合タンパク質は通常ICDを持たず、ECDおよびTMDに限定される。

【0057】

一部の態様では、ECDは、PD-L1またはPD-L2 ECD、アゴニスト抗PD-1抗体の相補性決定領域(CDR)、またはアゴニスト抗PD-1抗体の単鎖可変フラグメント(scFv)を含む。ECD上の目的領域には少なくとも1つのCDR配列が含まれ、CDRは3、4、5、6、7、8、9、10、11、12またはそれ以上のアミノ酸である。あるいは、目的のECDは複数の抗体可変領域を含む。抗PD-1抗体のCDRは、例えば米国特許第10,493,148号明細書に開示されており、その全体を参照により本明細書に援用する。

【0058】

一部の態様では、配列の1つ以上の残基が変更または修飾され、結合のオンレート、オフレート、またはその両方をより好ましいものに調整し、結合を最適化されたものとする。

【0059】

他の態様では、ECDは、提供された配列をTMDに、または互いに接続するリンカー領域またはヒンジを含む。他の態様では、融合タンパク質のPD-1との結合親和性を失わない範囲で、リンカー領域またはヒンジ領域の1つ以上に修飾がなされる。

【0060】

一部の態様では、ECDは、配列ID番号1に示す配列中に、少なくとも約10アミノ酸、少なくとも約15アミノ酸、少なくとも約20アミノ酸、少なくとも約25アミノ酸、少なくとも約30アミノ酸の連続した配列、最大で提供された完全な領域までの配列を有する。また、ECDは、配列ID番号1に示すアミノ酸配列と比較して、最大1、2、3、4、5、6またはそれ以上のアミノ酸が異なる配列を含む。他の実施形態では、ECDは、配列ID番号1に示すアミノ酸配列と少なくとも約80%、85%、90%、95%、または約99%の配列同一性を有する。

【0061】

一般に、PD-1エンゲージャー融合タンパク質の膜貫通ドメイン(TMD)は特定のTMD配列に限定されない。好ましくは、TMDは、融合タンパク質を発現する細胞(例えば、内皮細胞、心筋細胞、膵臓ベータ細胞、T細胞、NK細胞、または造血細胞など)の膜に融合タンパク質を安定的に固定できるようにするTMDは、さらにECDとPD-

10

20

30

40

50

1 とを結合できるようにする。一部の態様では、融合タンパク質は I C D を含み、P D - 1 に結合することで I C D を介したシグナル伝達が可能となる。このようなシグナル伝達が細胞本来の機能を高めるのであれば、改変細胞にとって有益となり得る。機能の向上は、例えば、インテグリンの活性化による接着力の強化によって実現することができる。他の態様では、融合タンパク質は I C D を含まず、T M D の後で切断されている。後者の場合、融合タンパク質が P D - 1 に結合しても、改変細胞の細胞内シグナル伝達は起こらない。

#### 【 0 0 6 2 】

T M D は、単一の ヘリックスとして、複数の ヘリックスとして、あるいはロールアップされた シートとして、細胞膜脂質二重層を横切って延在する。これらの「シングルパス」および「マルチパス」タンパク質の中には、共有結合で結合した脂肪酸鎖が細胞質脂質単分子層に挿入されているものがある。他の膜タンパク質は、膜の片側にしか露出していない。これらのうちのいくつかは、両親媒性の ヘリックスによって細胞質側の表面に固定されており、このヘリックスの疎水性の面を介して脂質二重層の細胞質側の単一層に挿入される。また、細胞質側単分子層内の脂肪酸鎖もしくはプレニル基のいずれか、またはオリゴ糖リンカーを介して非細胞質側単分子層のホスファチジルイノシトールに共有結合した脂質鎖のみによって二重層に結合されているものもある。(Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al., *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; ISBN-10:0-8153-3218-1 (2002))。

10

#### 【 0 0 6 3 】

一部の態様では、免疫チェックポイントエンゲージャー分子の例示的な T M D は、C D 8 5 f、C D 3 4 9、C D 2 8 4、C D 2 6 1、C D 1 7 2 b、C D 2 7 7、C D 1 8 6、C D 1 5 6 c、C D 3 0 4、C D 2 5 4、C D 2 6 3、C D 2 6 7、C D 3 3 7、C D 1 7 0、C D 2 8 3、C D 1 3 3、C D 3 2 7、C D 2 0 5、C D 2 3 2、C D 2 8 2、C D 1 6 b、C D 8 5 i、C D 8 5 a、C D 8 5 c、C D 2 7 5、C D 1 0 8、C D 3 5 8、C D 3 3 5、C D 2 1 8 b、C D 3 5 5、C D 3 3 6、C D 1 6 0、C D 2 5、C D 4、C D 8 a、C D 2 3 5 a、C D 2 3 3、C D 2 3 0、C D 9 0、C D 7 4、C D 3 d、C D 3 4 0、C D 2 3 6、C D 6 1、C D 1 8、C D 5 4、C D 2 9、C D 1 a、C D 5、C D 2 2 0、C D 2、C D 6 6 e、C D 5 1、C D 1 4 1、C D 1 1 5、C D 4 2 b、C D 2 2 1、C D 2 7 1、C D 5 5、C D 2 4 3、C D 9 8、C D 1 0、C D 4 1、C D 1 4、C D 4 5、C D 2 2 8、C D 1 6 a、C D 4 9 e、C D 1 2 6、C D 6 3、C D 4 8、C D 7、C D 1 4 0 b、C D 3 g、C D 1 1 7、C D 2 8、C D 8 b、C D 3 7、C D 1 1 b、C D 1 0 7 a、C D 3 3 1、C D 2 2 2、C D 2 0、C D 7 9 a、C D 3 2、C D 1 4 3、C D 3 2 4、C D 4 2 c、C D 1 0 7 b、C D 5 6、C D 1 0 2、C D 4 9 d、C D 6 6 a、C D 1 4 2、C D 5 9、C D 6 2 L、C D 1 2 1 a、C D 1 2 2、C D 1 3、C D 1 5 5、C D 1 1 9、C D 1 9、C D 1 1 6、C D 4 6、C D 1 e、C D 1 d、C D 2 2 7、C D 4 4、C D 6 2 P、C D 1 0 4、C D 4 3、C D 1 4 0 a、C D 3 1、C D 1 5 2、C D 3 2 6、C D 6 2 E、C D 3 6、C D 1 2 7、C D 4 9 b、C D 1 0 5、C D 3 5、C D 2 2 3、C D 1 3 8、C D 3 2 5、C D 5 8、C D 1 0 6、C D 5 3、C D 1 2 0 a、C D 2 2 4、C D 2 1、C D 3 3、C D 2 2、C D 1 2 0 b、C D 1 1 a、C D 1 1 c、C D 3 6 3、C D 7 3、C D 8 8、C D 2 0 4、C D 3 3 2、C D 9、C D 2 0 3 a、C D 3 3 4、C D 3 3 3、C D 2 0 6、C D 4 9 f、C D 2 3 8、C D 2 5 2、C D 8 9、C D 1 2 4、C D 1 8 1、C D 1 8 2、C D 2 4、C D 9 5、C D 4 0、C D 4 9 c、C D 1 5 9 a、C D 1 5 9 c、C D 3 1 4、C D 2 7、C D 1 2 3、C D 2 6、C D 8 2、C D 1 2 1 b、C D 3 4、C D 3 8、C D 3 0、C D 1 b、C D 1 c、C D 1 5 4、C D 6、C D 5 2、C D 1 3 2、C D 3 2、C D 6 6 b、C D 1 7 1、C D 1 9 1、C D 1 9 7、C D 1 8 5、C D 1 3 1、C D 5 0、C D 7 0、C D 1 5 3、C D 1 4 4、C D 8 0、C D 3 6 2、C D 6 8、C D 3 6 1、C D 1 4 7、C D 3 0 9、C D 1 3 5、C D 2 9 2、C D 1 0 3、C D 1 3 0、C D 4 2 d、C D 6 6 d、C D 6 6 c、C D 9 6、C D 1 1 0、C D 7 9 b、C D 2 0 0、C D 1 9 2、C D 2 3 1、C D 8 6

20

30

40

50

、CD 2 1 2、CD 1 1 8、CD 1 4 6、CD 1 3 4、CD 1 5 8 a、CD 1 5 8 b 1、  
 CD 1 5 8 b 2、CD 1 5 8 e、CD 1 5 8 k、CD 1 5 8 j、CD 1 5 8 i、CD 1 7  
 8、CD 2 9 5、CD 1 5 1、CD 9 7、CD 1 8 3、CD 3 9、CD 2 3 9、CD 1 9  
 3、CD 1 9 4、CD 1 9 5、CD 1 9 6、CD w 1 9 8、CD w 1 9 9、CD 2 9 6、  
 CD 2 9 8、CD 4 9 a、CD 3 2 2、CD 8 5 g、CD 1 8 4、CD 1 7 2 a、CD 1  
 5 6 a、CD 3 3 9、CD 1 5 6 b、CD 2 1 3 a 1、CD 1 2 9、CD 8 3、CD 1 2  
 5、CD 2 4 1、CD 2 6 9、CD 2 0 2 b、CD 8 7、CD 1 6 4、CD 1 3 6、CD  
 1 3 7、CD 2 4 9、CD 6 9、CD 9 1、CD w 2 1 0 b、CD 1 6 7 a、CD 3 0 0  
 c、CD 1 5 7、CD 3 1 7、CD 1 4 8、CD 1 6 1、CD 2 1 5、CD 1 5 0、CD  
 1 1 d、CD 2 1 8 a、CD 2 1 0、CD 1 6 6、CD 1 6 2、CD 2 1 3 a 2、CD 2 10  
 4 2、CD 1 5 8 g、CD 1 5 8 h、CD 2 7 9、CD 1 1 1、CD 2 8 1、CD 2 2 6  
 、CD 2 3 4、CD 1 6 7 b、CD 3 0 0 e、CD 2 7 6、CD 3 0 5、CD 3 0 0 g、  
 CD 3 0 0 d、CD 1 0 9、CD 2 7 2、CD 1 6 3、CD 3 0 2、CD 1 5 8 f 1、C  
 D 8 5 h、CD 8 5 d、CD 1 7 7、CD 1 5 8 z、CD 1 5 8 f 2、CD 8 5 j、CD  
 3 0 0 f、CD 9 2、CD 3 5 1、CD 1 1 2、CD 1 0 0、CD 2 7 0、CD 1 0 1、  
 CD 2 9 7、CD 3 1 6、CD 3 5 2、CD 2 1 7、CD 3 0 7 b、CD 3 0 7 a、CD  
 3 0 7 c、CD 3 0 7 d、CD 3 0 7 e、CD 1 1 4、CD 1 8 0、CD 1 5 8 d、CD  
 2 7 3、CD 2 9 0、CD 2 4 4、CD 1 6 9、CD 2 9 9、CD 3 1 8、CD 3 6 0、  
 CD 2 2 9、CD 2 4 8、CD 3 5 4、CD 3 2 0、CD 9 3、CD 3 1 9、CD 1 1 3  
 、CD 1 6 3 b、CD 2 8 9、CD 2 8 8、CD 3 2 9、CD 2 7 4、CD 3 5 3、CD 20  
 1 7 2 g、CD 3 1 5、CD 2 8 0、CD 2 6 4、CD 3 0 0 a、CD 3 1 2、CD 8 4  
 、CD 3 4 4、CD 3 5 0、CD 2 4 6、CD 2 0 1、CD 3 3 8、CD 2 0 8、CD 2  
 5 7、CD 3 2 8、CD 2 8 6、CD 3 5 7、CD 2 9 4、CD 3 2 1、CD 2 6 5、C  
 D 2 7 8、ITGA 7、ITGA 8、ITGA 9、ITGA 10、ITGA 11、CD 5  
 1、CD 4 1、CD 2 9、CD 1 8、CD 6 1、およびCD 1 0 4に由来する。他の態様  
 では、融合タンパク質のTMDはCD 4 7（配列ID番号5）、CD 6 4（配列ID番号  
 6）、またはPDGFR（配列ID番号4）に由来する。

【0064】

他の態様では、PD-1エンゲージャー融合タンパク質は、改変細胞内でのシグナル伝  
 達を回避するために細胞内ドメイン（ICD）を持たない。しかし、有益であると考えら  
 れる場合、融合タンパク質のICDは、CD 1 6、CD 3 2、CD 6 4、CD 8、CD 3  
 、CD 2 8、またはCD 1 3 7に由来するICDとすることができる。

【0065】

「CIITAタンパク質」タンパク質とは、後述するアミノ酸配列および核酸配列を有  
 するヒトCIITAタンパク質を指し、ヒト遺伝子はRefSeqアクセッション番号NM\_000246.4を有する。

【0066】

細胞の文脈における「野生型」とは、自然界に存在する細胞を意味する。しかしながら  
 、本明細書で用いられる細胞治療の文脈では、細胞が初期化後に不死化や脱分化した状態  
 をもたらず核酸の変化を含む場合があることを意味し、低免疫原性の達成、抗体回避能力  
 の獲得、または免疫チェックポイントエンゲージャーの発現を目的とした本発明の免疫編  
 集手法を経ていないことも指している。

【0067】

本明細書において「同系（syngeneic）」とは、宿主生物と細胞移植片との遺伝的類  
 似性または同一性を指し、免疫学的適合性があることを意味し、例えば、免疫応答が引き  
 起こされない場合を指す。

【0068】

本明細書において「同種（allogeneic）」とは、免疫応答が生じる宿主生物と細胞移  
 植片との遺伝的異同を指す。

【0069】

本明細書において「B2M - / -」とは、二倍体細胞においてB2M遺伝子が両方の染色体で不活性化された状態を意味する。本明細書に記載されているように、これはさまざまな方法で行うことができる。

【0070】

本明細書において「PD - 1 t g」、「PD - 1 導入遺伝子」、または「PD - 1 +」とは、宿主細胞がPD - 1を発現していることを意味し、場合によってはPD - 1 遺伝子またはPD - 1 融合タンパク質遺伝子の少なくとも1つのコピーを追加で有することによって、PD - 1を発現している。

【0071】

本明細書において「CIITA - / -」とは、二倍体細胞が両方の染色体においてCIITA 10  
CIITA 遺伝子を不活性化していることを意味する。本明細書に記載されているように、これはさまざまな方法で行うことができる。

【0072】

本明細書において、「PD - L1 t g」、「PD - L1 導入遺伝子」、または「PD - L1 +」とは、宿主細胞がPD - L1を発現していることを意味し、一部の様態では、PD - L1 遺伝子またはPD - L1 融合タンパク質遺伝子の少なくとも1つの追加コピーを有することによって、PD - L1を発現している。

【0073】

本明細書において、「PD - L2 t g」、「PD - L2 導入遺伝子」、または「PD - L2 +」とは、宿主細胞がPD - L2を発現していることを意味し、一部の様態では、PD - L2 遺伝子またはPD - L2 融合タンパク質遺伝子の少なくとも1つの追加コピーを有することによって、PD - L2を発現している。 20

【0074】

本明細書において「CD47 t g」、「CD47 導入遺伝子」、「CD47 +」とは、宿主細胞がCD47を発現していることを意味する。

【0075】

「同一性 (identity)」パーセントという用語は、2つ以上の核酸またはポリペプチド配列の文脈において、記載された割合のヌクレオチドまたはアミノ酸残基が同一である2つ以上の配列またはサブシーケンスを指すものであり、最大限の一致を得るために比較およびアラインメントされ、以下に示す配列比較アルゴリズムの1つ（例えば、BLASTPやBLASTN、または当業者が利用可能なその他のアルゴリズム）を使用するか、または目視によって測定される。用途によっては、「同一性」パーセントは、比較対象の配列の領域、例えば、機能ドメイン全体に存在しても、あるいは、比較対象の2つの配列の全長にわたって存在してもよい。配列の比較では、通常1つの配列が参照配列とされ、これとテスト配列とが比較される。配列比較アルゴリズムを使用する場合、テスト配列と参照配列とをコンピュータに入力し、必要に応じて部分配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。次に、配列比較アルゴリズムが、指定されたプログラムパラメータに基づいて、参照配列に対するテスト配列の配列同一性パーセントを計算する。 30

【0076】

比較のための配列の最適なアラインメントは、例えば、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)の局所相同性アルゴリズム、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)の相同性アラインメントアルゴリズム、Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)の類似性検索法、これらのアルゴリズムのコンピュータによる実装 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis. のGAP, BESTFIT, FASTA, TFASTA)、または目視検査によって実行することができる (一般的にAusubel et al., infraを参照)。 40

【0077】

配列同一性パーセントおよび配列類似性を決定するのに適したアルゴリズムの一例は、 50

B L A S Tアルゴリズムであり、これはAltschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)に記載されている。B L A S T解析を行うためのソフトウェアは、米国国立生物工学情報センター (www.ncbi.nlm.nih.gov/) により一般に公開されている。

【0078】

「インヒビター」、「アクチベーター」、「レギュレーター」は、生物学的に関連する分子の機能や発現に影響を与える。「モジュレーター」という用語には、インヒビターとアクチベーターとの両方が含まれる。これらは、標的分子の発現または活性について *in vitro* および *in vivo* のアッセイを用いて同定することができる。

【0079】

「インヒビター」とは、例えば、発現を阻害したり、標的分子またはタンパク質に結合したりする薬剤のことである。これらは部分的または全体的に刺激を遮断するか、プロテアーゼ阻害活性を有する。これらは、記載された標的タンパク質の活性化を抑制、減少、予防、または遅延させることがあり、これには不活性化、脱感作、または活性のダウンレギュレーションが含まれる。モジュレーターは、標的分子やタンパク質のアнтаゴニストであってよい。

10

【0080】

「アクチベーター」とは、標的分子またはタンパク質の機能または発現を、例えば、誘導または活性化する薬剤である。これらは、標的分子に結合したり、これを刺激したり、増加させたり、開いたり、活性化したり、活性を促進したりする。アクチベーターは、標的分子またはタンパク質のアゴニストであってよい。

20

【0081】

「ホモログ」とは、ヌクレオチド配列、ペプチド配列、機能的または構造的レベルで参照分子と類似している生物活性分子である。ホモログには、参照配列と一定のパーセント同一性を共有する配列誘導体が含まれてよい。したがって、一実施形態では、相同配列または誘導体配列は、少なくとも70%の配列同一性を共有する。具体的な実施形態では、相同配列または誘導体配列は、少なくとも80%または85%の配列同一性を共有する。具体的な実施形態では、相同配列または誘導体配列は、少なくとも90%の配列同一性を共有する。具体的な実施形態では、相同配列または誘導体配列は、少なくとも95%の配列同一性を共有する。より具体的な実施形態では、相同配列または誘導体配列は、少なくとも50、55、60、65、70、75、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%の配列同一性を共有する。相同核酸配列または誘導体核酸配列は、高ストリンジエンシーハイブリダイゼーション条件下で参照核酸配列に結合し続ける能力によって定義されてもよい。参照分子と構造的または機能的類似性を有するホモログは、参照分子の化学的誘導体であってよい。構造的および機能的ホモログ、ならびに誘導体を検出、生成、スクリーニングする方法は当該技術分野で公知である。

30

【0082】

「ハイブリダイゼーション」は、一般に、変性したDNAが、相補的な鎖が融解温度以下の環境に存在する場合に再アニーリングする能力に依存する。プローブとハイブリダイズ可能な配列との間で求められる相同性の程度が高いほど、使用できる相対的な温度も高くなる。その結果、相対温度が高いほど反応条件は厳しくなり、低いほど反応条件は緩やかになる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジエンシーの詳細および説明については、その全体を参照により本明細書に援用する Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers (1995) を参照されたい。

40

【0083】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジエンシー」は当業者であれば容易に決定でき、一般的にはプローブの長さ、洗浄温度、および塩濃度に依存する経験的計算値である。一般的に、プローブが長い場合、適切なアニーリングのために温度を高くする必要があり、プローブが短い場合、温度を低くする必要がある。

【0084】

50

本明細書において定義される「ストリンジェントな条件」または「高ストリンジェント条件」は、以下の条件によって定義することができる。(1)洗浄には低イオン強度および高温を使用する。例えば、0.015 M塩化ナトリウム/0.0015 Mクエン酸ナトリウム/0.1%ドデシル硫酸ナトリウム、50。(2)ハイブリダイゼーション中は変性剤を使用する。例えば、0.1%ウシ血清アルブミンを含有する50%(v/v)ホルムアミド/0.1%フィコール/0.1%ポリビニルピロリドン/pH6.5の50 mMリン酸ナトリウム緩衝液、750 mM塩化ナトリウム、75 mMクエン酸ナトリウムを含む溶液を42で使用する。(3)50%ホルムアミド、5×SSC(0.75 M塩化ナトリウム、0.075 Mクエン酸ナトリウム)、50 mMリン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1%ピロリン酸ナトリウム、5×デナード溶液、超音波処理したサケ精子DNA(50 μl/ml)、0.1%SDS、および10%デキストラン硫酸を含む溶液で、42で一晩ハイブリダイゼーションを行い、その後、42で0.2×SSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)で10分間洗浄し、続けて55でEDTAを含む0.1×SSCによる高ストリンジェンシー洗浄を10分間行う。

10

#### 【0085】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」または「治療的に有効な担体」とは、水性または非水性(固体)、例えばアルコール性または油性、またはそれらの混合物であり、界面活性剤、エモリエント、潤滑剤、安定剤、着色剤、香料、防腐剤、pH調整用の酸もしくは塩基、溶媒、乳化剤、ゲル化剤、保湿剤、安定剤、湿潤剤、徐放剤、湿潤剤、または特定の製剤形態の医薬組成物に一般的に含まれる他の成分を含むことができる。薬学的に許容される担体は当該技術分野で公知であり、例えば、水または生理的緩衝生理食塩水などの水溶液や、グリコール、グリセロール、オリーブ油等の油などの他の溶媒またはビヒクルが挙げられる。薬学的に許容される担体は、例えば、グルコース、スクロースまたはデキストランなどの炭水化物、アスコルビン酸またはグルタチオンなどの抗酸化剤、キレート剤、低分子量タンパク質または他の安定化剤または賦形剤など、特定のインヒビターの安定化または吸収の増加に作用する生理学的に許容される化合物を含んでよい。

20

#### 【0086】

医薬組成物は、例えば、滅菌注射可能な水性懸濁液または油状懸濁液として、滅菌された注射可能な製剤の形態であってもよい。この懸濁液は、適切な分散剤または湿潤剤(例えば、Tween 80など)および懸濁化剤を用いて、当該技術分野で公知の技術に従って配合することができる。また、滅菌された注射可能な製剤は、例えば1,3-ブタンジオール中の溶液などの、非毒性の非経口的に許容される希釈剤または溶媒中の滅菌された注射可能な溶液または懸濁液であってもよい。使用可能な許容される担体および溶媒には、マンニトール、水、リンガー液、等張塩化ナトリウム溶液が含まれる。さらに、溶媒または懸濁媒体として、滅菌された固定油が従来から使用されている。この目的のために、合成モノグリセリドまたはジグリセリドを含む、どのような銘柄の固定油を使用してもよい。オレイン酸およびそのグリセリド誘導体などの脂肪酸は注射剤の調製に有用であり、オリーブ油またはヒマシ油などの薬学的に許容される天然油、特にポリオキシエチル化されたものも有用である。これらの油溶液または懸濁液は、スイス薬局方または類似のアルコールなどの長鎖アルコール希釈剤または分散剤を含んでもよい。

30

40

#### 【0087】

本明細書にわたり記載されるすべての最大値の数値限定は、その下限の数値限定が明示的に本明細書に記載されているのと同様に、すべての下限の数値限定を含むことを意図している。本明細書にわたり記載されるすべての最小値の数値限定は、その上限の数値限定が明示的に本明細書に記載されているのと同様に、すべての上限の数値限定を含むことを意図している。本明細書にわたり記載されるすべての数値範囲は、その狭い数値範囲がすべて明示的に本明細書に記載されているのと同様に、より広い数値範囲内に含まれるすべての狭い数値範囲を含むことを意図している。

#### 【0088】

50

本明細書で使用する「修飾」という用語は、修飾された分子を親分子から物理的に区別する改変を指す。一部の実施形態では、PD-1エンゲージャーまたはSIRPエンゲージャータンパク質での挿入、欠失、置換、または他のタイプのアミノ酸変化が挙げられる。一部の実施形態では、修飾は、PD-1、PD-L1、PD-L2、SIRP、CD47、CD16、CD32、CD64、切断型CD64、HSVtk、EC-CD、またはicasp9バリエーションポリペプチドにおいて、本明細書に記載され、当該分野で公知の方法に従って調製される。このような修飾は、野生型タンパク質、天然に存在する変異型タンパク質、またはこのような変異型ポリペプチドの修飾を含まない他の改変タンパク質など、本明細書に記載の方法に従って修飾されていない対応する親タンパク質と区別する。他の実施形態では、変異型ポリペプチドは、変異型ポリペプチドの機能を非修飾ポリペプチドと区別する1つ以上の修飾を含む。例えば、変異型ポリペプチド中のアミノ酸の変更は、そのレセプター結合プロファイルに影響を与える。他の実施形態では、変異型ポリペプチドは置換、欠失、挿入修飾、またはそれらの組合せを含む。他の実施形態では、変異型ポリペプチドは、非修飾ポリペプチドの親和性に比べてレセプターに対する親和性を増加させる1つ以上の修飾を含む。

10

#### 【0089】

一実施形態では、変異体ポリペプチドは、対応するネイティブな配列すなわち親配列に対して1つ以上の置換、挿入、または欠失を含む。特定の実施形態では、変異型ポリペプチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31~40、41~50、または51以上の修飾を含む。

20

#### 【0090】

本明細書において「エピソームベクター」とは、細胞の細胞質内で自律的に存在し、複製することができる遺伝子ベクターを指す。例えば、それは宿主細胞のゲノムDNAに組み込まれていない。多くのエピソームベクターが当技術分野で公知であり、後述される。

#### 【0091】

遺伝子の文脈における「ノックアウト」とは、ノックアウトを保有する宿主細胞が、その遺伝子の機能的タンパク質産物を産生しないことを意味する。本明細書で概説するように、ノックアウトは、コード配列の全部または一部の除去、機能的タンパク質が産生されないようなフレームシフト変異の導入（切断された配列またはナンセンス配列のいずれか）、遺伝子が転写されないような調節コンポーネント（例えばプロモーター）の除去または改変、mRNAへの結合による翻訳の阻止など、さまざまな方法で行うことができる。一般に、ノックアウトはゲノムDNAレベルで行われ、細胞の子孫も永久的にノックアウトを受け継ぐ。

30

#### 【0092】

遺伝子の文脈における「ノックイン」とは、ノックインを保有する宿主細胞が細胞内でより多くの機能的なタンパク質を活性化していることを意味する。本明細書で概説するように、ノックインはさまざまな方法で行うことができ、通常はタンパク質をコードする導入遺伝子（tg）の少なくとも1コピーを細胞に導入することによって行うが、例えば内因性遺伝子に構成性プロモーターを加えるなど、調節コンポーネントを置換することによっても行うことができる。一般に、ノックイン技術では、導入遺伝子の余分なコピーが宿主細胞に組み込まれる。

40

#### 【0093】

### VII. 本発明の細胞

本発明はICE細胞を提供する。一部の実施形態では、これらはPD-1エンゲージャー細胞である。他の実施形態では、これらは低免疫性細胞である。低免疫性細胞には、HIP細胞、HIPO細胞、HIPO-細胞などがある。他の実施形態では、PD-1エンゲージャー細胞は分化した体細胞である。他の実施形態では、PD-1エンゲージャー細胞は低免疫性多能性（HIP）細胞である。さらなる実施形態では、HIP細胞は血液型O型（HIPO）、アールエイチ因子（Rh）陰性（HIP-）、またはO型かつRh-

50

(HIPO-)である。他の実施形態では、PD-1エンゲージャー細胞は、HIP細胞、HIP-細胞、またはHIPO-細胞から誘導または分化されたものである。他の実施形態では、PD-1エンゲージャー細胞は、抗体依存性細胞傷害性(ADCC)または補体依存性細胞傷害性(CDC)から保護するための抗体Fcレセプターを含む。

#### 【0094】

本発明は、PD-1エンゲージャー細胞を作製するための組成物および方法を提供する。一部の態様では、細胞は低免疫性細胞である。他の態様では、細胞は分化した体細胞である。他の態様では、細胞はHIP細胞、HIP-細胞、HIPO-細胞などの多能性細胞である。他の態様では、PD-1エンゲージャー細胞は、移植および/または分化に適した多能性(PSC)細胞である。PSC細胞には、人工PSC細胞(iPSC)または胚性幹細胞(ESC)が含まれる。他の態様では、細胞は特定の組織型であり、前述のPD-1エンゲージャー細胞から分化したものである。一例として、分化したPD-1エンゲージャー細胞は、内皮細胞、心筋細胞、肝細胞、ドーパミン作動性ニューロン、膵島細胞、網膜色素上皮細胞、ならびに移植および医学的治療に使用される他の細胞タイプであってもよい。これには、CAR-T細胞、CAR-NK細胞、TCR T細胞、TCR NK細胞、TCR自然リンパ球(ILC)や、その他の改変細胞集団などのキメラ抗原レセプター(CAR)細胞が含まれる。国際公開第2018/132783号、国際公開第2020/018620号、国際公開第2020/018615号、国際出願第PCT/US2020/032272号、米国出願第16/870,959号、および同第16/870,960号参照。その全体を参照により本明細書に援用する。

10

20

#### 【0095】

本発明は、T細胞、NK細胞、およびその他の免疫細胞の表面でPD-1と相互作用する、PD-1エンゲージャータンパク質を有するPD-1エンゲージャー細胞を提供する。免疫チェックポイントエンゲージャー分子は細胞死を防ぎ、適応免疫および自然免疫を緩和する。一部の実施形態では、PD-1エンゲージャータンパク質は、PD-1エンゲージャー細胞の表面に繋ぎ止められた抗PD-1抗体である。一部の実施形態では、抗PD-1抗体は、そのフラグメント結晶化可能(Fc)部分を介して細胞表面に繋ぎ止められる。他の実施形態では、抗PD-1抗体(scFv)の抗原結合部分は、膜貫通ドメイン(TMD)を介して細胞表面に結合する。好ましい実施形態では、TMDは1つ以上のヘリックスを含む。他の好ましい実施形態では、TMDは7回膜貫通タンパク質(7TM)に由来する。他の好ましい実施形態では、TMDは免疫グロブリン細胞表面タンパク質に由来する。より好ましい実施形態では、免疫グロブリン細胞表面タンパク質は、抗体、レセプター、リガンド、または接着タンパク質である。一部の実施形態では、PD-1エンゲージャー細胞は、細胞表面にアンカリングされたPD-L1またはPD-L2融合タンパク質から生成される。

30

#### 【0096】

PD-1エンゲージャータンパク質の発現は、当業者には理解されるように、「ノックイン」またはトランスジェニック技術を用いて、いくつかの方法で行われてよい。一部の態様では、PD-1エンゲージャータンパク質の発現は、1つ以上の導入遺伝子により生じる。

40

#### 【0097】

したがって、一部の実施形態では、PD-1エンゲージャータンパク質発現遺伝子の1つ以上のコピーが、誘導性プロモーターまたは構成性プロモーターの制御下でPD-1エンゲージャー細胞に付加されるが、後者が好ましい。一部の実施形態では、本明細書に記載されるか、または当技術分野で公知のようにレンチウイルスコンストラクトが採用される。遺伝子は、当技術分野で公知のように、適切なプロモーターの制御下で宿主細胞のゲノムに組み込まれる。

#### 【0098】

一部の実施形態では、遺伝子の発現は、例えば、内因性プロモーターを構成性プロモーターに、または異なる誘導性プロモーターに交換することによって、内因性遺伝子座の調

50

節配列を変化させることにより増加させることができる。これは一般に、C R I S P Rなどの公知の技術を用いて行うことができる。

【0099】

ひとたび変化させると、十分なPD-1エンゲージャータンパク質の発現の存在は、適切な抗体を用いたウェスタンブロット、ELISAアッセイまたはFACSアッセイなど、実施例に記載されているような公知の技術を用いてアッセイすることができる。一般に、この文脈における「十分」とは、細胞表面上のPD-1エンゲージャータンパク質の発現が増加し、NK細胞による殺傷が抑制されることを意味する。

【0100】

また、抗体であるポリペプチドも本発明の範囲内である。抗体という用語には、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト化抗体、抗体フラグメント（例えば、Fcドメイン）、Fabフラグメント、一本鎖抗体、二重または多重特異性抗体、ラマ抗体、ナノ抗体、ダイアボディ、アフィボディ、Fv、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、scFv、scFv-Fcなどが含まれる。また、Igキメラなどの抗体融合タンパク質もこの用語に含まれる。好ましい抗体には、ヒト化抗体もしくは完全ヒトモノクローナル抗体またはそのフラグメントが含まれる。

10

【0101】

「抗体」および「免疫グロブリン」という用語は、モノクローナル抗体（例えば、全長モノクローナル抗体またはインタクトなモノクローナル抗体）、ポリクローナル抗体、一価抗体、多価抗体、多重特異性抗体（例えば、所望の生物学的活性を示す限り、二重特異性抗体）を含んでよく、また、特定の抗体フラグメント（本明細書により詳細に記載される）を含んでよい。抗体は、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、および/またはアフィニティー成熟抗体でもよい。

20

【0102】

本明細書において、「全長抗体」、「インタクト抗体」、「全抗体」という用語は、以下に定義する抗体フラグメントではなく、実質的にインタクトな形態の抗体を指すために互換的に使用される。この用語は特に、Fc領域を含む重鎖を持つ抗体を指す。「抗体フラグメント」とは、インタクト抗体の一部を含み、好ましくはその抗原結合領域を含む。抗体フラグメントの例として、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fvフラグメント；ダイアボディ；直鎖抗体；一本鎖抗体分子；および抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体などが挙げられる。本明細書で使用する「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体を指す。すなわち、その集団を含む個々の抗体は、自然発生的な変異等の可能な変異が微量に存在する場合を除いて同一である。したがって、「モノクローナル」という修飾語は、その抗体の性質が、異なる抗体の混合物ではないことを示す。

30

【0103】

特定の実施形態では、このようなモノクローナル抗体は、典型的には、標的に結合するポリペプチド配列を含む抗体を含み、この標的結合ポリペプチド配列は、複数のポリペプチド配列から単一の標的結合ポリペプチド配列を選択することを含むプロセスによって得られたものである。例えば、この選択プロセスでは、ハイブリドーマクローン、ファージクローン、組換えDNAクローンのプールなどの複数のクローンからユニークなクローンを選択するものであってよい。なお、選択された標的結合配列を、例えば、標的に対する親和性を改善する、標的結合配列をヒト化する、細胞培養での産生を改善する、in vivoでの免疫原性を低下させる、多特異性抗体を作製するなどのためさらに改変してもよく、改変された標的結合配列を含む抗体も本発明のモノクローナル抗体である。通常、異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体製剤とは異なり、モノクローナル抗体製剤の各モノクローナル抗体は、抗原上の1つの決定基を標的とする。モノクローナル抗体製剤は、その特異性に加えて、通常、他の免疫グロブリンに汚染されていないという点で有利である。

40

【0104】

50

ある抗原に特異的に結合する抗体は、その抗原に対して高い親和性を持つ。抗体の親和性は解離定数 ( $K_d$ ) によって測定することができる。特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、約  $100\text{ nM}$ 、 $10\text{ nM}$ 、 $1\text{ nM}$ 、 $0.1\text{ nM}$ 、 $0.01\text{ nM}$ 、または  $0.001\text{ nM}$  以下の解離定数 ( $K_d$ ) を有する (例えば  $10^{-7}\text{ M}$  以下、 $10^{-7}\text{ M} \sim 10^{-13}\text{ M}$ 、 $10^{-8}\text{ M} \sim 10^{-13}\text{ M}$ 、または  $10^{-9}\text{ M} \sim 10^{-13}\text{ M}$ )。

#### 【0105】

一実施形態では、 $K_d$  は、下記のアッセイによって説明されるように、目的の抗体の Fab 型およびその抗原を用いて実施される放射性標識抗原結合アッセイ (RIA) によって測定される。抗原に対する Fab の溶液結合親和性は、非標識抗原の滴定を繰り返しながら、最小濃度の ( $^{125}\text{I}$ ) 標識抗原で Fab を平衡化し、結合した抗原を抗 Fab 抗体コートプレートで捕捉することにより測定される (例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999) 参照)。アッセイ条件を確立するため、MICROTITER (登録商標) マルチウェルプレート (Thermo Scientific 社) を、 $50\text{ mM}$  炭酸ナトリウム ( $\text{pH } 9.6$ ) 中、 $5\text{ }\mu\text{g/ml}$  の捕捉抗 Fab 抗体 (Cappel Labs 社) で一晚コートし、その後、 $2\%$  ( $\text{w/v}$ ) ウシ血清アルブミンを含む PBS 中で  $2 \sim 5$  時間室温 (約  $23^\circ\text{C}$ ) でブロックする。非吸着性プレート (Nunc # 269620) において、 $100\text{ }\mu\text{M}$  または  $26\text{ }\mu\text{M}$  の [ $^{125}\text{I}$ ] 抗原を、(例えば、Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997) の抗 VEGF 抗体 Fab-12 の評価に従って) 目的の Fab の連続希釈液と混合する。その後、目的の Fab を一晚インキュベートするが、確実に平衡に達するよう、インキュベーションの時間を延長 (例えば、約  $65$  時間) してもよい。その後、混合物をキャプチャープレートに移し、室温でインキュベートする (例えば、 $1$  時間)。その後、溶液を除去し、 $0.1\%$  ポリソルベート 20 を含む PBS (TWEEN-20 (登録商標)) でプレートを 8 回洗浄する。プレートが乾燥したら、シンチラント (MICROSCINT-20 (商標); Packard 社) を 1 ウェルにつき  $150\text{ }\mu\text{l}$  加え、TOPCOUNT (商標) ガンマカウンター (Packard 社) で 10 分間カウントする。競合結合アッセイで使用するために、各 Fab の濃度は最大結合の  $20\%$  以下の結合を示すものを選択する。

#### 【0106】

他の実施形態によれば、 $K_d$  を、BIACORE (登録商標) - 2000 または BIACORE (登録商標) - 3000 (BIACORE 社、ニュージャージー州ピスカタウェイ) を使用した表面プラズモン共鳴アッセイにより、 $25^\circ\text{C}$  で測定する。例えば、約  $10$  レスポンスユニット (RU) の固定化抗原 CM5 チップを使用する。簡単に説明すると、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ (CM5、BIACORE 社) を、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (EDC) および N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) で活性化する。抗原を、注入前に  $10\text{ mM}$  酢酸ナトリウム ( $\text{pH } 4.8$ ) で  $5\text{ }\mu\text{g/ml}$  (約  $0.2\text{ }\mu\text{M}$ ) に希釈し、 $5\text{ }\mu\text{l}$  / 分の流速で注入して、約  $10$  レスポンスユニット (RU) の結合タンパク質を得る。抗原の注入後、 $1\text{ M}$  のエタノールアミンを注入して未反応基をブロックする。動態測定のために、Fab の 2 倍逐次希釈液 ( $0.78\text{ nM} \sim 500\text{ nM}$ ) を、 $0.05\%$  ポリソルベート 20 (TWEEN-20 (商標)) 界面活性剤を含む PBS (PBST) 中で  $25^\circ\text{C}$ 、約  $25\text{ }\mu\text{l}$  / 分の流速で注入する。単純な 1 対 1 のランジュバン結合モデル (BIACORE (登録商標) 評価ソフトウェアバージョン 3.2) を使用し、結合および解離センサーグラムを同時にフィッティングして結合速度 ( $K_{on}$ ) および解離速度 ( $K_{off}$ ) を計算する。平衡解離定数 ( $K_d$ ) を、 $k_{off}/k_{on}$  として計算する。(Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999) 等を参照)。上記の表面プラズモン共鳴アッセイによってオンレートが  $10^6\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$  を超える場合、蛍光消光技術を使用してオンレートを測定できる。この技術では、 $25^\circ\text{C}$  で、PBS ( $\text{pH } 7.2$ ) 中の  $20\text{ nM}$  の抗抗原抗体 (Fab の形態) の蛍光発光強度の増加または減少 (励起 =  $295\text{ nm}$ 、発光 =  $340\text{ nm}$ 、 $16\text{ nm}$  バンドパス) を、抗原の濃度を増加させながら測定する。測定には、ストップフロー機能付き分光光度計 (Aviv Instruments 製) や、

攪拌セルを備えた8000シリーズSLM-AMINCO(商標)分光光度計(ThermoSpectronic製)などの分光計を使用する。当業者には理解されるように、上記のアミンカップリング法(CM5チップ)の代わりに、標的抗原とチップ表面との他のカップリング化学反応(例えば、ストレプトアビジン/ビオチン、疎水性相互作用、またはジスルフィド化学反応)も容易に利用できる。

【0107】

「モノクローナル」という修飾語は、実質的に均質な抗体の集団から得られるという抗体の特徴を示すものであり、特定の方法による抗体の産生を必要とすると解釈されるものではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法(例えば、Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975); Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* pp. 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981))、組換えDNA法(例えば、米国特許第4,816,567号明細書)、ファージディスプレイ技術(例えば、Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.*, 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.*, 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(34): 12467-12472 (2004); およびLee et al., *J. Immunol. Methods*, 284(1-2): 119-132 (2004))、または、ヒト免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子座もしくは遺伝子の一部もしくは全体を持つ動物において、ヒトもしくはヒト様抗体を産生する技術(例えば、国際公開第98/24893号; 国際公開第96/34096; 国際公開第96/33735号; 国際公開第91/10741号; Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.*, 7:33 (1993); 米国特許第5,545,807号明細書; 同第5,545,806号明細書; 同第5,569,825号明細書; 同第5,625,126号明細書; 同第5,633,425号明細書; 同第5,661,016号明細書; Marks et al., *Bio. Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature*, 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368:812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnol.*, 14:845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.*, 14:826 (1996); および Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995))など、さまざまな技術によって作製することができる。上記の特許、出版物、引用文献は、その全体が参照により援用される。

【0108】

ヒト以外の(例えばマウス)抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小限の配列を含むキメラ抗体である。一実施形態では、ヒト化抗体とは、ヒト免疫グロブリン(受容抗体)であり、受容体の高可変領域の残基が、マウス、ラット、ウサギ、または非ヒト霊長類などの非ヒト種(供与抗体)の高可変領域の残基に置き換えられ、これにより望ましい特異性、親和性、または能力を有するものである。一部の形態では、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基が、対応するヒト以外の残基で置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にもない残基を含むことがある。これらの修飾は、抗体の性能をさらに向上させるために行われる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、通常は2つの可変ドメインの大部分を含み、その中で高可変ループのすべて、またはほとんどすべてが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FRのすべて、またはほとんどすべてがヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体は、任意に、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部、通常はヒト免疫グロブリンの定常領域も含む。詳細については、Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); およびPresta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)を参照されたい。また、以下の総括論文およびそれらに引用されている引用文献も参照のこと。Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy*, A

sthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23: 1035-1038 (1995); Hurle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994)。前述の引用文献は、その全体が参照により援用される。

【0109】

「ヒト抗体」とは、ヒトが産生する抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を含む抗体、および/または、本明細書に開示するヒト抗体の作製技術のいずれかを用いて作製された抗体である。このような技術としては、ヒト由来の組換えライブラリー、例えばファージディスプレイライブラリーのスクリーニング（例えば、Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)およびHoogenboom et al., Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137 (1991)を参照）、ヒトミエローマおよびマウス - ヒトヘテロミエローマ細胞株を使用したヒトモノクローナル抗体の生成（例えば、Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 55-93 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); およびBoerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991)を参照）、ならびに内在性免疫グロブリン産生がない状態でヒト抗体の全レパートリーを産生可能なトランスジェニック動物（例えば、マウス）でのモノクローナル抗体の生成（例えば、Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362: 255 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol., 7: 33 (1993)を参照）が挙げられる。このヒト抗体の定義では、ヒト以外の動物由来の抗原結合残基を含むヒト化抗体は特に除外される。

10

20

【0110】

A. 遺伝子改変の方法

本発明は、細胞内または無細胞条件下で核酸配列を修飾してPD-1エンゲージャー細胞を作製する方法を含む。技術の例としては、相同組換え、ノックイン、ZFN（ジンクフィンガーヌクレアーゼ）、TALEN（転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ）、CRISPR（clustered regularly interspaced short palindromic repeats）/ Cas9、およびその他の部位特異的ヌクレアーゼ技術が挙げられる。これらの技術を用いて、目的の遺伝子座部位で二本鎖DNAを切断できる。このように制御された二本鎖切断により、特定の遺伝子座部位での相同組換えが促進される。このプロセスは、エンドヌクレアーゼが特定の配列を認識して結合し、核酸分子に二本鎖切断を引き起こすことで、染色体などの特定の核酸分子配列を標的とすることに焦点を当てている。この二本鎖の切断は、エラーが起こりやすい非相同末端結合（NHEJ）か、相同組換え（HR）によって修復される。

30

【0111】

当業者には理解されるように、本発明の修飾細胞を作製するために、さまざまな技術が使用可能であり、また、それらを本明細書に記載されたとおり低免疫原性にするための技術も用いることができる。

【0112】

一般的に、これらの技術は個別に、あるいは組み合わせて使うことができる。例えば、PD-1エンゲージャー細胞の作製では、CRISPRを用いて、抗PD-1免疫グロブリンなどのPD-1エンゲージャータンパク質を発現させることができる。別の例では、ウイルス技術（例えばレンチウイルス）を用いてPD-1エンゲージャータンパク質を発現させることができる。

40

【0113】

a. CRISPR技術

一実施形態では、当該技術分野で公知のように、clustered regularly interspaced short palindromic repeats / Cas（「CRISPR」）技術を用いて細胞を操作する。CRISPRを用いてPD-1エンゲージャー細胞を作製することができる。CRISPRに基づく技術は数多くあり、例えば、参照により本明細書に援用されるDoudna and Charpentier, Science doi:10.1126/science.1258096を参照されたい

50

。CRISPR技術およびキットは市販されている。

【0114】

b. TALEN技術

一部の実施形態では、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) の方法を用いて本発明の細胞を作製する。TALENは、制限酵素とヌクレアーゼとを組み合わせたもので、ほぼどのようなDNA配列にも結合して切断するように設計することができる。TALENキットは市販されている。

【0115】

c. ズンクフィンガー技術

一実施形態では、Znフィンガーヌクレアーゼ技術を用いて細胞を操作する。Znフィンガーヌクレアーゼは、DNA切断ドメインにズンクフィンガーDNA結合ドメインを融合させることによって作られた人工制限酵素である。ズンクフィンガードメインは特定のDNA配列を標的とするように設計することができ、これによりズンクフィンガーヌクレアーゼは複雑なゲノム内の特定の配列を標的とすることができる。これらの試薬は、内在するDNA修復機構を利用することで、CRISPRおよびTALENと同様に、高等生物のゲノムを正確に改変するために使用することができる。

【0116】

d. ウイルスベースの技術

本発明のPD-1エンゲージャー細胞の一部の実施形態を作製するために使用できるさまざまなウイルス技術が存在し、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、センダイウイルスベクターの使用などが挙げられるが、これらに限定されない細胞の作製に使用されるエピソームベクターを以下に挙げる。

【0117】

これらの技術のすべてにおいて、公知の組換え技術を用いて、本明細書で概説する組換え核酸を生成する。特定の実施形態では、抗PD-1免疫グロブリンなどの、PD-1エンゲージャータンパク質をコードする組換え核酸が、発現コンストラクト内で1つ以上の調節ヌクレオチド配列に機能可能に連結されてよい。調節ヌクレオチド配列は一般に、宿主細胞および治療対象に適したものとなる。さまざまな宿主細胞のための多くの種類の適切な発現ベクターと適した調節配列とが、この分野で公知である。典型的には、1つ以上の調節ヌクレオチド配列は、プロモーター配列、リーダー配列またはシグナル配列、リボソーム結合部位、転写開始配列および終結配列、翻訳開始配列および終結配列、ならびにエンハンサー配列またはアクチベーター配列を含んでよいが、これらに限定されない。当該技術分野で公知のように、構成性プロモーターまたは誘導性プロモーターも考慮される。プロモーターは、天然に存在するプロモーターであっても、複数のプロモーターの要素を組み合わせたハイブリッドプロモーターであってもよい。発現コンストラクトは、細胞内でプラスミドなどのエピソーム上に存在してもよいし、発現コンストラクトを染色体に挿入してもよい。具体的な実施形態では、発現ベクターは形質転換された宿主細胞を選択できるようにする選択マーカー遺伝子を含む。特定の実施形態は、少なくとも1つの調節配列に作動可能に連結された変異型ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む。本明細書で使用する調節配列には、プロモーター、エンハンサー、および他の発現制御エレメントが含まれる。特定の実施形態では、発現ベクターは、形質転換する宿主細胞の選択、発現させたい特定の変異型ポリペプチド、ベクターのコピー数、そのコピー数を制御する能力、または抗生物質マーカーなどのベクターによってコードされる他のタンパク質の発現のために設計される。

【0118】

適切な哺乳類プロモーターの例には、ハムスターのユビキチン/S27aプロモーター (国際公開第97/15664号)、サル液胞化ウイルス40 (SV40) 初期プロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター、マウスメタロチオネイン-Iプロモーター、ルース肉腫ウイルス (RSV) の長末端反復配列領域、マウス乳腺腫瘍ウイルスプロモーター (MMTV)、モロニー Maus 白血病ウイルスの長末端反復領域、ヒトサイトメガ

10

20

30

40

50

ロウイルス (CMV) の初期プロモーター、真核生物翻訳伸長因子 1 (EF-1)、および CMV 初期エンハンサーと結合したニワトリ - アクチンプロモーター (CAG) の遺伝子からのプロモーターが含まれる。他の異種哺乳動物プロモーターの例は、アクチン、免疫グロブリン、または熱ショックプロモーターである。

【0119】

さらなる実施形態では、哺乳動物宿主細胞で使用するためのプロモーターは、ポリオマウイルス、ファウルポックスウイルス (1989年7月5日公開の英国特許第2,211,504号)、ウシ乳頭腫ウイルス、鳥肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、および B 型肝炎ウイルス、およびシミアンウイルス 40 (SV40) から得ることができる。さらなる実施形態では、異種哺乳動物プロモーターが使用される。例としては、アクチンプロモーター、免疫グロブリンプロモーター、熱ショックプロモーターなどが挙げられる。SV40 プロモーターの初期プロモーターおよび後期プロモーターは、SV40 ウイルス複製起点を含む SV40 制限フラグメントとして簡便に入手できる。Fiers et al., *Nature* 273: 113-120 (1978)。ヒトサイトメガロウイルスの即時初期プロモーターは、ハインド III E 制限酵素フラグメントとして簡便に得られる。Greenaway, P. J. et al., *Gene* 18:355-360 (1982)。前述の引用文献は、その全体が参照により援用される。

10

【0120】

一部の実施形態では、PD-1 エンゲージャー細胞は幹細胞に由来する。

【0121】

「多能性細胞」という用語は、未分化のまま自己複製と増殖が可能で、適切な条件下で特殊な細胞型に分化誘導できる細胞を指す。本明細書で用いられる「多能性細胞」という用語は、胚性幹細胞 (ESC)、および胎児性幹細胞、羊膜幹細胞、体性幹細胞を含む他のタイプの幹細胞を包含する。例示的なヒト幹細胞株には、H9 ヒト胚性幹細胞株が含まれる。幹細胞株のさらなる例としては、米国国立衛生研究所ヒト胚性幹細胞レジストリおよびハワード・ヒューズ医学研究所の HUES コレクションを通じて利用可能なものが挙げられる (Cowan, C. A. et al., *New England J. Med.* 350:13 (2004) に記載のとおりであり、その全体を参照により本明細書に援用する)。

20

【0122】

本明細書で用いる「多能性幹細胞」は、内胚葉 (例えば、胃内壁、消化管、肺など)、中胚葉 (例えば、筋肉、骨、血液、泌尿生殖器組織など)、外胚葉 (例えば、表皮組織、神経系組織など) の 3 種類の生殖細胞層のいずれかに分化する可能性を有する。本明細書で用いる「多能性幹細胞」という用語は、非多能性細胞から誘導された多能性幹細胞の一種である「人工多能性幹細胞」または「iPSC」も包含する。親細胞の例としては、さまざまな方法で多能性未分化表現型を誘導するように初期化された体細胞が挙げられる。このような「iPS」細胞または「iPSC」細胞は、特定の制御遺伝子の発現を誘導するか、または特定のタンパク質を外因的に適用することによって作製することができる。iPS 細胞を誘導する方法は当技術分野で公知であり、以下にさらに記載される。(例えば、Zhou et al., *Stem Cells* 27 (11): 2667-74 (2009); Huangfu et al., *Nature Biotechnol.* 26 (7): 795 (2008); Woltjen et al., *Nature* 458 (7239): 766-770 (2009); and Zhou et al., *Cell Stem Cell* 8:381-384 (2009) 参照; これらそれぞれの全体を参照により本明細書に援用する)。人工多能性幹細胞 (iPSC) の作製について以下に概説する。本明細書において、「hiPSC」はヒト人工多能性幹細胞であり、「miPSC」はマウス人工多能性幹細胞である。

30

40

【0123】

「多能性幹細胞の特徴」とは、多能性幹細胞を他の細胞から区別する細胞の特徴を指す。適切な条件下で、3 種類の生殖細胞層 (内胚葉、中胚葉、および外胚葉) のすべてに由来する細胞系譜に関連する特徴をあわせて示す細胞型に分化する子孫を生み出す能力は、多能性幹細胞の特徴である。特定の分子マーカーの組み合わせの発現または非発現も、多能性幹細胞の特徴である。例えば、ヒト多能性幹細胞は、限定するものではないが、少な

50

くとも SSEA - 3、SSEA - 4、TRA - 1 - 60、TRA - 1 - 81、TRA - 2 - 49 / 6E、ALP、Sox2、E-カドヘリン、UTF - 1、Oct4、Rex1、および Nanog のうちのいくつかのマーカー、または一部の実施形態ではすべてのマーカーを発現する。多能性幹細胞に関連する細胞形態は、多能性幹細胞の特徴でもある。本明細書に記載するように、細胞を内胚葉前駆細胞および / または肝細胞に初期化するために、多能性を経る必要はない。

【0124】

B. 低免疫原性 PD - 1 エンゲージャー細胞の作製

HI 細胞の生成は、わずかに 3 つの遺伝子変化で行われ、細胞活動への影響を最小限に抑えつつ、細胞に免疫抑制機能を付与する。この技術は、国際公開第 2018 / 13278 3号、国際公開第 2020 / 018620号、国際公開第 2020 / 018615号、国際出願第 PCT / US 2020 / 032272号、および米国出願第 16 / 870, 959号、および米国出願第 16 / 870, 960号に開示され、これらの全体を参照により本明細書に援用する。以下にその手法を簡単に説明する。

【0125】

本明細書で論じるように、一実施形態は、MHC I および MHC II (細胞がヒトの場合は HLA I および HLA II) のタンパク質活性の低下または失活を利用する。これは、そのコンポーネントをコードする遺伝子を変化させることを行うことができる。一実施形態では、CRISPR を用いて遺伝子のコード領域または制御配列を破壊する。他の実施形態では、干渉 RNA 技術を用いて遺伝子の翻訳を抑制する。他の実施形態は、マクロファージの貪食感受性を制御する遺伝子の変化である。これはウイルス技術を使った遺伝子の「ノックイン」であってよい。

【0126】

1. HLA - I の低下

本発明の HI PD - 1 エンゲージャー細胞は、MHC I 機能 (ヒト細胞由来の場合は HLA I) の低下を含む。

【0127】

当業者には理解されるように、機能低下は、遺伝子から核酸配列を除去する、配列を他の配列で中断する、核酸の調節コンポーネントを変化させるなど、多くの方法で行うことができる。例えば、目的の遺伝子のコード領域の全部または一部を除去したり、「ナンセンス」配列に置き換えたり、フレームシフト変異を起こしたり、プロモーターなどの調節配列の全部または一部を除去するか置き換えたり、翻訳開始配列を除去するか置き換えたりすることができる。

【0128】

当業者には理解されるように、PD - 1 エンゲージャー細胞における MHC I 機能 (細胞がヒト細胞由来である場合には HLA I) が適切に低下したことは、当技術分野で公知の技術を用いて、後述のように測定することができる。例えば、HLA 複合体に結合する標識抗体を用いた FACS 技術 ; 例えば、ヒト主要組織適合性 HLA クラス I 抗原の鎖に結合する市販の HLA - A、HLA - B、HLA - C 抗体を用いるなどである。

【0129】

a. 2M の改変

一実施形態では、HLA - I 活性の低下は、本明細書に開示するように、HI PD - 1 エンゲージャー細胞中の - 2 ミクログロブリン遺伝子の発現を妨害することによって行う。この改変は、本明細書では一般に遺伝子の「ノックアウト」と呼ばれ、本発明の細胞では宿主細胞の対立遺伝子の両方に対して行う。一般的に、両方を妨害する手法は同じである。

【0130】

特に有用な実施形態では、CRISPR 技術を用いて遺伝子を妨害する。別の実施形態では、CRISPR ベースのエピゲノム編集によるプログラム可能な転写記憶を用いる (Nunez JK, Cell. 184:2503-2519 (2021)、その全体を参照により本明細書に援用

10

20

30

40

50

する)。一部の様態では、C R I S P R技術を使って遺伝子のコード領域に小さな欠失/挿入を導入し、機能的なタンパク質が作られないようにする。多くの場合、フレームシフト変異の結果、切断された機能しないタンパク質が作られるようにストップコドンが生成される。

#### 【0131】

したがって、有用な技術は、マウスのB2M遺伝子またはヒトのB2M遺伝子のコード配列を標的とするように設計されたC R I S P R配列を使用することである。遺伝子の編集後、トランスフェクトしたPD-1エンゲージャー細胞培養物を単一細胞に解離させる。単一細胞をフルサイズのコロニーに増殖させ、C R I S P Rによる切断部位からの異常配列の存在をスクリーニングして、C R I S P R編集をテストする。対立遺伝子の両方に欠失を持つクローンを選択する。このようなクローンは、B2Mを発現しないことがPCRによって確認され、HLA-Iを発現していないことがFACS分析によって確認された。

10

#### 【0132】

B2M遺伝子が不活性化されているかどうかをテストするためのアッセイは公知であり、本明細書に記載されている。一実施形態では、アッセイは、B2Mタンパク質に対する抗体でプローブされた細胞溶解物のウェスタンブロットである。他の実施形態では、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(r t - P C R)によって不活性化改変体の存在を確認する。

#### 【0133】

さらに、細胞をテストして、HLA I複合体が細胞表面に発現していないことを確認することもできる。これは、上述したように、1つ以上のHLA細胞表面コンポーネントに対する抗体を用いたFACS分析によってアッセイすることができる。

20

#### 【0134】

##### 2. HLA-IIの低下

一実施形態では、本発明のHI PD-1エンゲージャー細胞は、HLA Iの低下に加えて、MHC II機能(ヒト由来細胞由来のHLA II)も欠いてよい。

#### 【0135】

当業者には理解されるように、機能低下は、遺伝子から核酸配列を除去する、遺伝子に核酸配列を付加する、読み枠を破壊する、配列を他の配列で中断する、核酸の調節コンポーネントを変化させるなど、多くの方法で行うことができる。一実施形態では、目的の遺伝子のコード領域の全部または一部を除去するか、「ナンセンス」配列に置き換えることができる。他の実施形態では、プロモーターなどの調節配列を削除または置換してもよく、翻訳開始配列を削除または置換してもよい。

30

#### 【0136】

PD-1エンゲージャー細胞またはその誘導体におけるMHC II(HLA II)機能の適切な低下は、タンパク質に対する抗体を用いたウェスタンブロットティング、FACS技術、r t - P C R技術などの当該技術分野で公知の技術を用いて測定することができる。

#### 【0137】

##### a. C I I T A 改変

一実施形態では、HLA-II活性の低下は、本明細書で示すように、PD-1エンゲージャー細胞におけるC I I T A遺伝子の発現を妨害することによって行われる。この改変は、本明細書では一般に遺伝子の「ノックアウト」と呼ばれ、本発明のPD-1エンゲージャー細胞では宿主細胞の対立遺伝子の両方で行われる。

40

#### 【0138】

C I I T A遺伝子が不活性化されているかどうかをテストするアッセイは公知であり、本明細書に記載されている。一実施形態では、アッセイは、C I I T Aタンパク質に対する抗体でプローブされた細胞溶解物のウェスタンブロットである。他の実施形態では、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(r t - P C R)によって不活性化改変体の存在を確認す

50

る。

【0139】

さらに、細胞をテストして、HLA II複合体が細胞表面に発現していないことを確認することもできる。分析の例としては、以下に概説するように、ヒトHLAクラスII HLA-DR、DP、およびほとんどのDQ抗原に結合する市販の抗体を用いたウェスタンブロットまたはFACS分析が挙げられる。

【0140】

特に有用な実施形態では、CRISPR技術を用いてCIITA遺伝子を妨害する。CRISPRを、すべてのMHC II分子に必須の転写因子であるCIITA遺伝子のコード配列を標的とするように設計する。遺伝子の編集後、トランスフェクトした細胞培養物を単一細胞に解離させる。これらをフルサイズのコロニーに増殖させ、CRISPRによる切断部位からの異常配列の存在をスクリーニングして、CRISPR編集が成功したかどうかをテストする。CIITAを発現しない欠失を有するクローンを、PCRによって決定し、MHC II/HLA-IIを発現しないことをFACS分析によって確認する。他の実施形態では、CRISPRベースのエピゲノム編集によるプログラム可能な転写記憶を用いる。

10

【0141】

3. 血液型O型、Rh陰性細胞

血液生成物は、人の体内のすべての赤血球の表面にある抗原の有無（ABO血液型）によって、異なるグループに分類することができる。赤血球の糖タンパク質上のオリゴ糖の配列によって、A抗原、B抗原、AB抗原およびA1抗原が決定される。血液群抗原群の遺伝子は、抗原タンパク質を作るための命令を与える。血液型抗原タンパク質は、赤血球の細胞膜内でさまざまな機能を果たしている。これらのタンパク質の機能として、細胞内外への他のタンパク質および分子の輸送、細胞構造の維持、他の細胞および分子との接着、化学反応への参加などが挙げられる。

20

【0142】

アールエイチ因子（Rh）血液群は、ABO血液群系に次いで重要な血液群系である。Rh式血液群系は49の決められた血液群抗原で構成され、そのうちD、C、c、E、eの5つの抗原が最も重要である。個体のRh（D）の状態は通常、ABO型の後に陽性または陰性の接尾辞をつけて表記される。「Rh因子」、「Rh陽性」、「Rh陰性」という用語は、Rh（D）抗原のみを指す。Rh抗原に対する抗体は溶血性輸血反応に關与する可能性があり、Rh（D）およびRh（c）抗原に対する抗体は胎児および新生児の溶血性疾患の重大なリスクをもたらす。ABO抗体はすべてのヒトにおいて、幼少期に発現する。しかし、Rh-のヒトのアールエイチ抗体は感作されて初めて発症する。これは、Rh+の新生児を出産するか、Rh+の輸血を受けることによって起こる。

30

【0143】

本発明は、移植および/または分化に適したABO血液型O型および/またはアールエイチ因子陰性（O-）の多能性（PSCO-）細胞集団を有するPD-1エンゲージャー細胞を提供する。PSCO-細胞には、誘導iPSC（iPSCO-）、胚性ESC（ESCO-）、およびそれらの細胞から分化した細胞が含まれ、O-内皮細胞、O-心筋細胞、O-肝細胞、O-ドーパミン作動性ニューロン、O-膵島細胞、O-網膜色素上皮細胞、ならびに移植および医学的治療に使用されるその他のO-細胞タイプが含まれる。これには、CAR-T細胞、CAR-NK細胞などのO-キメラ抗原レセプター（CAR）細胞や、その他の改変細胞集団が含まれ得る。一部の実施形態では、細胞は造血幹細胞ではない。本発明はさらに、特定の組織および器官を生成または再生するための、普遍的に許容される「すぐに利用できる」ESCO-sおよびPSCO-sならびにその誘導体を提供する。

40

【0144】

本発明の他の態様は、移植用のPSCO-、iPSCO-、ESCO-および他のO-細胞の集団を作製する方法を提供する。また、本発明は、多能性細胞または分化細胞の移

50

植から利益を得る疾患、障害、および状態の治療法も提供する。

【0145】

本発明の一部の実施形態では、A B O血液群O型は、A B O血液型タンパク質の発現が低下していることに起因する。他の態様では、A B O血液群は内因的にO型である。本発明の一部の態様では、H I P O - 細胞は、A B O遺伝子のヒトエクソン7の妨害に起因するA B O血液群O型を有する。一部の実施形態では、A B O遺伝子のエクソン7の対立遺伝子の両方が妨害されている。一部の実施形態では、A B O遺伝子のエクソン7の対立遺伝子の両方の妨害は、対立遺伝子の両方を妨害するClustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (C R I S P R) / C a s 9反応によって生じる。他の実施形態では、C R I S P Rベースのエピゲノム編集によるプログラム可能な転写記憶を用いて、この遺伝子を不活性化する。

10

【0146】

他の態様では、A B O血液群O型は、細胞表面のA B O遺伝子の生成物の酵素的修飾に起因する。好ましい態様では、酵素的修飾によりA B O遺伝子の生成物から炭水化物を除去する。別の好ましい態様では、酵素的修飾はA B O A 1抗原、A 2抗原、またはB抗原から炭水化物を除去する。

【0147】

本発明の一部の実施形態では、R h血液群は内因性R h - 型である。他の態様では、R h - 血液群は、R hタンパク質の発現の低下または消失によって生じる。他の態様では、R h - 型は、R h C抗原、R h E抗原、K e l l K抗原 (K E L)、D u f f y (F Y) F y a抗原、D u f f y F y 3抗原、K i d d (J K) J k b抗原、または/およびK i d d S L C 1 4 A 1をコードする遺伝子の妨害に起因する。一部の実施形態では、妨害は、R h C抗原、R h E抗原、K e l l K抗原 (K E L)、D u f f y (F Y) F y a抗原、D u f f y F y 3抗原、K i d d (J K) J k b抗原、または/およびK i d d S L C 1 4 A 1をコードする遺伝子の対立遺伝子の両方を妨害するC R I S P R / C a s 9反応から生じる。

20

【0148】

本発明の一部の実施形態では、本発明のO - 細胞 (例えば、P S C O -、i P S C O -、E S C O - およびそれらに由来する細胞) は哺乳動物由来であり、例えば、ヒト、ウシ、ブタ、ニワトリ、シチメンチョウ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ロバ、ラバ、アヒル、ガチョウ、バッファロー、ラクダ、ヤク、ラマ、アルパカ、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ハムスター、またはモルモットに由来する。

30

【0149】

具体的な実施形態では、本発明は、宿主同種免疫系による拒絶反応を回避し、血液抗原型拒絶反応を回避するA B O血液型O型アールエイチ因子陰性 (H I P O -) 細胞を有する低免疫性P D - 1エンゲージャー細胞を提供する。一部の実施形態では、H I P O - 細胞は、H L A - IおよびH L A - IIの発現を低減または除去し、マクロファージによる貪食に対する多能性細胞の感受性を低下させる内因性タンパク質の発現を増加させるように操作され、万能血液群O R h - (「O -」) 血液型を含む。万能血液型は、A B O血液群A抗原およびB抗原およびR h因子の発現を除去することによって、あるいはO - 細胞株から開始することによって得られる。これらの新規のH I P O - 細胞は、抗原提示能が損なわれており、自然免疫クリアランスから保護され、血液群による拒絶反応がないため、宿主の免疫拒絶反応を回避する。

40

【0150】

4. スーサイド遺伝子

一部の実施形態では、本発明は、「スーサイド遺伝子」または「スーサイドスイッチ」を含むH I P D - 1エンゲージャー細胞を提供する。これらは「安全スイッチ」として機能するように組み込まれており、細胞が好ましくない方法で増殖および分裂した場合に死滅させることができる。「スーサイド遺伝子」アブレーションアプローチは、特定の化合物によって活性化された場合にのみ細胞を死滅させるタンパク質をコードするスーサイ

50

ド遺伝子を遺伝子導入ベクター中に含む。スーサイド遺伝子は、毒性のない化合物を毒性の高い代謝産物に選択的に変換する酵素をコードするものであってよい。その結果、酵素を発現している細胞が特異的に除去される。一部の実施形態では、スーサイド遺伝子はヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ (HSV-tk) 遺伝子であり、トリガーはガンシクロビルである。他の実施形態では、スーサイド遺伝子は大腸菌サイトシンデアミナーゼ (EC-CD) 遺伝子であり、トリガーは5-フルオロシトシン (5-FC) である (Barese et al., Mol. Therap. 20(10):1932-1943 (2012), Xu et al., Cell Res. 8:73-8 (1998)、いずれもその全体を参照により本明細書に援用する。)

#### 【0151】

他の実施形態では、スーサイド遺伝子は誘導性カスパーゼタンパク質である。誘導性カスパーゼタンパク質は、アポトーシスを誘導することができるカスパーゼタンパク質の少なくとも一部を含む。好ましい実施形態では、誘導性カスパーゼタンパク質は iCasp9 である。これは、F36V変異を持つヒトFK506結合タンパク質FKBP12の塩基配列を含み、一連のアミノ酸を介してヒトカスパーゼ9をコードする遺伝子と連結されている。FKBP12-F36Vは低分子二量体化剤AP1903と高い親和性で結合する。したがって、本発明におけるiCasp9のスーサイド遺伝子は、化学的二量体化誘導剤(CID)の投与によって引き起こされる。一部の実施形態では、CIDは低分子薬剤AP1903である。二量体化はアポトーシスの急速な誘導を引き起こす。(国際公開第2011/146862号; Stasi et al, N. Engl. J. Med 365;18 (2011); Tey et al., Biol. Blood Marrow Transplant. 13:913-924 (2007)参照。これらそれぞれの全体を参照により本明細書に援用する)。

#### 【0152】

他の実施形態では、安全戦略として、既存のCAR T細胞に対する結合エピトープが、エンゲージャー細胞の細胞外構造に含まれる。このような結合エピトープは、CD19、CD19エクトドメイン、または例えばCAR T細胞FMC63、4G7-2E3もしくは3B10由来の特異的抗CD19結合領域であってよい。(Klesmith JR, et al., Biochemistry. 3;58(48):4869-4881 (2019)参照、その全体を参照により本明細書に援用する)。PD-1-エンゲージャー細胞を排除するために、組み込まれた抗CD19結合領域を標的とするCAR T細胞を使用する。CAR T細胞は組み込まれた結合エピトープを検出し、エンゲージャー細胞を殺傷する。結合領域は、CD20、CD22、CD38、CD123、CS1、CD171、BCMA、MUC16、ROR1、AXL2、B7-H3、CD147、CD171、CD20、CD44v6、CD70、CEA、CLDN18.2、CLDN6、DLL3、DR5、EGFR、EGFRvII、EpCAM、ErbB、FR、GD2、gp100、GPC3、HER2、IL-13R2、LFA1、MMP2、MSLN、MUC1、MUC1\*、MUC16ecto、NECTIN4、NKG2D、NKG2DL、PSCA、PSMA、ROR2、TM4SF1、TnMUC1、またはWT1などの他のCAR T細胞標的から選択することができる。

#### 【0153】

##### 5. Fc 隔離 (Fc Sequestration)

抗体がそのFab領域を介して保護されていない細胞に結合すると、Fcは(主にCD16レセプターを介して)NK細胞、(主にCD16、CD32、もしくはCD64を介して)マクロファージ、(主にCD32を介して)B細胞、または(主にCD16、CD32、もしくはCD64を介して)顆粒球によって結合されてよい。これらは抗体依存性細胞傷害性(ADCC)を媒介することができる。補体がFcに結合すると、補体依存性細胞傷害(CDC)を引き起こす。

#### 【0154】

一部の実施形態では、本発明のPD-1エンゲージャー細胞は、IgGのFc部分を認識するレセプターのレベルが高い。IgGのFc部分を認識するレセプターは、FcRI(CD64)、FcRII(CD32)、FcRIII(CD16)、およびFc

R I Vの4つの異なるクラスに分けられる。これにより、細胞移植片レシピエントの免疫系が同種物質を拒絶する傾向が減少する。C D 1 6、C D 3 2、C D 6 4、または切断型C D 6 4の発現が高い細胞はA D C CまたはC D Cを回避する。F c 隔離は、国際公開第2 0 2 1 / 0 7 6 4 2 7号に開示されており、その全体を参照により本明細書に援用する。

【0 1 5 5】

#### 6 . S I R P エンゲージャー細胞

一部の実施形態では、本発明の細胞は、さらに、未修飾のS I R P エンゲージメント機能を有する親細胞と比較して、対象への移植時に自然免疫に抵抗するシグナル調節タンパク質アルファ ( S I R P ) エンゲージメント機能 ( P D - 1 / S I R P エンゲージャー細胞 ) が増大している。一部の実施形態では、P D - 1 / S I R P エンゲージャー細胞は低免疫性細胞である。他の実施形態では、P D - 1 / S I R P エンゲージャー細胞は分化した体細胞である。他の実施形態では、P D - 1 / S I R P エンゲージャー細胞は多能性細胞または低免疫性多能性 ( H I P ) 細胞である。さらなる実施形態では、H I P 細胞は血液型O型 ( H I P O )、アールエイチ因子 ( R h ) 陰性 ( H I P - )、またはO型かつR h - ( H I P O - ) である。他の実施形態では、P D - 1 / S I R P エンゲージャー細胞は、H I P 細胞、H I P - 細胞、またはH I P O - 細胞から誘導または分化されたものである。他の実施形態では、P D - 1 / S I R P エンゲージャー細胞は、抗体依存性細胞傷害性 ( A D C C ) または補体依存性細胞傷害性 ( C D C ) から保護するための抗体F c レセプターを含む。S I R P エンゲージャー細胞は国際出願第P C T / U S 2 1 / 6 2 0 0 8号に記載されており、その全体を参照により本明細書に援用する。

【0 1 5 6】

#### 7 . H I 表現型のアッセイ

H I 細胞が生成されると、本明細書に一般的に記載されているようにその低免疫原性をアッセイすることができる。

【0 1 5 7】

例えば、低免疫原性は多くの技術を用いてアッセイできる。技術の一例として、同種の宿主への移植およびH I P D - 1 エンゲージャー細胞の生存のモニタリングが挙げられる。ルシフェラーゼを発現するように細胞を形質導入し、生物発光イメージングを用いて追跡することができる。同様に、H I P D - 1 エンゲージャー細胞に対する宿主動物のT細胞またはB細胞の反応をテストして、宿主動物で免疫応答を引き起こさないことを確認する。T細胞機能はE l i s p o t、E l i s a、F A C S、P C R、またはマスサイトメトリー ( C Y T O F ) によりアッセイする。B細胞反応または抗体反応は、F A C Sまたはルミネックスを用いてアッセイする。上記に加えて、あるいは上記に替えて、細胞について自然免疫応答、例えばNK細胞による殺傷を回避する能力をアッセイしてもよい。NK細胞の細胞溶解活性は、当分野において公知の技術を用いてi n v i t r oまたはi n v i v oで、アッセイする。

【0 1 5 8】

#### C . 低免疫性 ( H I ) O - P D - 1 エンゲージャー細胞の作製

本発明の一部の態様では、上記のように生成したP D - 1 エンゲージャー細胞は、O型の血液型を持つNK細胞から手順を開始したため、すでにA B O血液群OかつR h 因子陰性 ( - ) の細胞となる。

【0 1 5 9】

本発明の他の態様には、A抗原およびB抗原の酵素的変換が含まれる。好ましい態様では、B抗原が酵素を用いてOに変換される。より好ましい態様では、酵素は - ガラクトシダーゼである。この酵素はB抗原の末端ガラクトース残基を除去する。本発明の他の態様では、A抗原およびB抗原を酵素により変換する。好ましい態様では、A抗原が - N - アセチルガラクトサミニダーゼを用いてOに変換される。酵素による変換については、例えば、Olsson et al., Transfusion Clinique et Biologique 11:33-39 (2004); 米国特許第4,427,777号明細書、同第5,606,042号明細書、同第

5, 633, 130号明細書、同第5, 731, 426号明細書、同第6, 184, 017号明細書、同第4, 609, 627号明細書、および同第5, 606, 042号明細書；ならびに国際公開第99/23210号に記載されており、これらそれぞれの全体を参照により本明細書に援用する）。

【0160】

本発明の他の実施形態は、ABO遺伝子のエクソン7をロックアウトするか、SLC14A1(JK)遺伝子をサイレンシングすることで、細胞を遺伝子工学的に操作することを含む。本発明の他の実施形態は、Rh血液群系(RH)のC抗原およびE抗原、Kell系(KEL)のK、Duffy系(FY)のFyaおよびFy3、Kidd系(JK)のJkb、またはMNS血液群系のUおよびSをロックアウトすることを含む。CRISPR、talen、相同組換えなど、当該技術分野で公知である、または本明細書に記載されているロックアウト方法論を採用することができる。

低免疫性ABO血液群O Rh因子(-)細胞を作製する技術は、米国仮出願第62/846,399号に記載されており、その全体を参照により本明細書に援用する。

【0161】

D. 本発明の実施形態

本発明のPD-1エンゲージャー細胞、またはその誘導体は、例えば1型糖尿病、心疾患、神経疾患、がん、失明、血管疾患、および再生医学的治療に反応するその他の疾患/障害の治療に使用することができる。特に、本発明は、PD-1エンゲージャー細胞を使用して、あらゆる細胞型に分化させることを想定している。したがって、本明細書において、多能性を示すが、ヒト患者などの同種の宿主に移植した場合に宿主免疫応答が生じないか、または免疫応答が著しく緩和されている、iPSC、ESC、HIP、iPSCO、ESCO、HIPO、iPSCO-、ESCO-、およびHIPO-PD-1エンゲージャー細胞、またはその誘導体もしくは分化細胞が提供される。

【0162】

一態様では、本発明は、キメラ抗原レセプター(CAR)をコードする核酸を含む、PD-1エンゲージャー細胞、またはその誘導体を提供し、内因性-2ミクログロブリン(B2M)遺伝子活性および内因性クラスIIトランスアクチベーター(CIITA)遺伝子活性が失活され、PD-1エンゲージャー分子が細胞表面に提供されている。CARは、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含んでよい。一部の実施形態では、細胞外ドメインは、CD19、CD20、CD22、CD38、CD123、CS1、CD171、BCMA、MUC16、ROR1、WT1、AXL2、B7-H3、CD147、CD171、CD20、CD44v6、CD70、CEA、CLDN18.2、CLDN6、DLL3、DR5、EGFR、EGFRvIII、EPCAM、Erbb、FR、GD2、gp100、GPC3、HER2、IL-13R2、LFA1、MMP2、MSLN、MUC1、MUC1\*、MUC16ecto、NECTIN4、NKG2D、NKG2DL、PSCA、PSMA、ROR2、TM4SF1、およびTnMUC1からなる群から選択された抗原に結合する。特定の実施形態では、細胞外ドメインは、単鎖可変フラグメント(scFv)を含む。一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、CD3、CD4、CD8、CD28、4-1BB、OX40、ICOS、CTLA-4、PD-1、LAG-3、CD64、PDGF、およびBTLAを含む。特定の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3、CD28、4-1BB、OX40、ICOS、CTLA-4、PD-1、LAG-3、およびBTLAを含む。

【0163】

特定の実施形態では、CARは、抗CD19 scFvドメイン、CD28膜貫通ドメイン、およびCD3ゼータシグナリング細胞内ドメインを含む。一部の実施形態では、CARは、抗CD19 scFvドメイン、CD28膜貫通ドメイン、4-1BBシグナル伝達細胞内ドメイン、およびCD3ゼータシグナル伝達細胞内ドメインを含む。

【0164】

10

20

30

40

50

本発明の他の態様では、本明細書に記載の多能性細胞のいずれか1つを *in vitro* で分化させることにより産生される、単離されたPD-1エンゲージャーCAR-T細胞または低免疫性CAR-T細胞が提供される。一部の実施形態では、CAR-T細胞は細胞傷害性HIPO-CAR-T細胞である。

【0165】

一部の態様では、本発明はPD-1エンゲージャーNK細胞もしくはCAR-NK細胞、またはiPSC由来NK細胞を提供する。

【0166】

種々の実施形態では、*in vitro*分化は、CARコンストラクトを有するPD-1エンゲージャー細胞またはその誘導体を、bFGF、EPO、Flt3L、IGF、IL-3、IL-6、IL-15、GM-CSF、SCF、およびVEGFからなる群から選択される1つ以上の成長因子またはサイトカインを含む培養培地で培養することを含む。一部の実施形態では、培養培地は、BMPアクチベーター、GSK3インヒビター、ROCKインヒビター、TGFレセプター/ALKインヒビター、およびNOTCHアクチベーターからなる群から選択される1つ以上の成長因子またはサイトカインをさらに含む。

10

【0167】

特定の実施形態では、単離されたPD-1エンゲージャーCAR-T細胞またはCAR-NK細胞は、CAR-Tコンストラクトを有するiPSC、ESC、HIP、iPSCO、ESCO、HIPO、iPSCO-、ESCO-、またはHIPO-PD-1エンゲージャー細胞のいずれか1つの*in vitro*分化によって産生される。他の実施形態では、これらは、がんの治療に使用される。

20

【0168】

本発明の他の態様では、本明細書に記載の単離されたPD-1エンゲージャーCAR-T CAR-NK細胞のいずれかを治療有効量含む組成物を投与することを含む、がん患者を治療する方法が提供される。一部の実施形態では、組成物は、治療的に有効な担体をさらに含む。

【0169】

一部の実施形態では、投与するステップは、静脈内投与、皮下投与、結節内投与、腫瘍内投与、髄腔内投与、胸膜内投与、および腹腔内投与を含む。一部の様態では、投与はさらに、ボラス投与または持続灌流を含む。

30

【0170】

一部の実施形態では、がんは、白血病、リンパ腫、および骨髄腫からなる群から選択される血液がんである。さまざまな実施形態では、がんは固形腫瘍がんまたは液状腫瘍がんである。

【0171】

他の態様では、本発明は、本明細書に記載の単離されたPD-1エンゲージャーCAR-T細胞、CAR-NK細胞のいずれか1つを作製する方法を提供する。この方法は、本発明のiPSC、ESC、HIP、iPSCO、ESCO、HIPO、iPSCO-、ESCO-、またはHIPO-PD-1エンゲージャー細胞のいずれか1つを*in vitro*で分化させることを含む。*in vitro*分化は、bFGF、EPO、Flt3L、IGF、IL-2、IL-3、IL-6、IL-7、IL-15、GM-CSF、SCF、およびVEGFからなる群から選択される1つ以上の成長因子またはサイトカインを含む培養培地で細胞を培養することを含んでよい。一部の実施形態では、培養培地は、BMPアクチベーター、GSK3インヒビター、ROCKインヒビター、TGFレセプター/ALKインヒビター、およびNOTCHアクチベーターからなる群から選択される1つ以上の成長因子またはサイトカインをさらに含む。

40

【0172】

一部の実施形態では、*in vitro*分化は、iPSC、ESC、HIP、iPSCO、ESCO、HIPO、iPSCO-、ESCO-、またはHIPO-PD-1エン

50

ゲージャー細胞をフィーダー細胞上で培養することを含む。さまざまな実施形態では、*in vitro*での分化は、模擬微小重力下での培養を含む。一部の様態では、模擬微小重力下での培養は少なくとも72時間である。

【0173】

一部の様態では、本明細書において、*iPSC*、*ESC*、*HIP*、*iPSCO*、*ESCO*、*HIPO*、*iPSCO-*、*ESCO-*、または*HIPO-PD-1*エンゲージャー細胞から分化した、単離・操作された低免疫性心臓細胞（低免疫原性心臓細胞）、例えば心筋細胞が提供される。

【0174】

心筋細胞はABO血液群抗原を持たないと以前は考えられていた。ABO血液群B型ヒト胚性幹細胞株を心筋細胞様細胞に分化させると、B抗原が消失することが観察された。このことは、この抗原の消失がヒト胚発生の初期に起こる可能性を示唆している。例えば、Molne et al., *Transplantation*, 86(10):1407-13 (2008)参照、その全体を参照により本明細書に援用する。また、他の研究でも、人工ヒト多能性幹細胞を心筋細胞様細胞に分化させると、その細胞でABO血液群A型抗原が次第に消失することが報告されている。例えば、Saljo et al., *Scientific Reports*, 13072: 1-14 (2017)参照。しかし、本発明者らは、意外なことに、心筋細胞がABO血液群抗原を発現しており、適合しないレシピエントで拒絶反応を引き起こす可能性があることを突き止めた。

【0175】

したがって、一部の様態では、本明細書において、心臓の状態または疾患に罹患している患者を治療する方法が提供される。この方法は、本明細書に記載の*iPSC*、*ESC*、*HIP*、*iPSCO*、*ESCO*、*HIPO*、*iPSCO-*、*ESCO-*、または*HIPO-PD-1*エンゲージャー細胞由来の単離されたPD-1エンゲージャー心臓細胞のいずれか1つの集団を治療有効量含む組成物を投与することを含む。一部の実施形態では、組成物は、治療的に有効な担体をさらに含む。

【0176】

一部の実施形態では、投与は、患者の心臓組織への移植、静脈内注射、動脈内注射、冠動脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、心筋内注射、経心内膜注射、経心外膜注射、またはインフュージョンを含む。

【0177】

一部の実施形態では、一部の実施形態では、心臓の状態または疾患は、小児心筋症、加齢性心筋症、拡張型心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症、慢性虚血性心筋症、出産後心筋症、炎症性心筋症、その他の心筋症、心筋炎、心筋虚血再灌流障害、心室機能障害、心不全、うっ血性心不全、冠動脈疾患、末期心疾患、動脈硬化、虚血、高血圧、再狭窄、狭心症、リウマチ性心疾患、動脈炎症、または心血管疾患からなる群から選択される。

【0178】

一部の様態では、本明細書において、*in vitro*分化によってPD-1エンゲージャー細胞の集団から心臓細胞の集団を産生する方法であって、内因性B2ミクログロブリン(B2M)遺伝子活性および内因性クラスIIトランスアクチベーター(CIITA)遺伝子活性が失活され、PD-1エンゲージャー分子が細胞表面に提供されている方法が提供される。この方法は、(a)GSKインヒビターを含む培地でPD-1エンゲージャー細胞の集団を培養する工程と；(b)WNTアンタゴニストを含む培地でPD-1エンゲージャー細胞の集団を培養し、前心臓細胞集団を産生する工程と；(c)インスリンを含む培地で前心臓細胞集団を培養し、O-低免疫性心筋細胞集団を産生する工程とを含む。一部の実施形態では、GSKインヒビターは、CHIR-99021、その誘導体、またはその変異体である。一部の様態では、GSKインヒビターの濃度は約2μM~約10μMである。一部の実施形態では、WNTアンタゴニストは、IWR1、その誘導体、またはその変異体である。一部の様態では、WNTアンタゴニストの濃度は、約2μM~約10μMの範囲である。

【0179】

10

20

30

40

50

一部の態様では、本明細書において、iPSC、ESC、HIP、iPSCO、ESCO、HIPO、iPSCO-、ESCO-、またはHIPO-PD-1エンゲージャー細胞から分化した、単離・操作されたPD-1エンゲージャー内皮細胞が提供される。他の態様では、単離・操作されたO-またはO-低免疫性内皮細胞は、毛細血管内皮細胞、血管内皮細胞、大動脈内皮細胞、脳内皮細胞、および腎内皮細胞からなる群から選択される。

【0180】

一部の態様では、本明細書において、血管の状態または疾患に罹患している患者を治療する方法が提供される。一部の実施形態では、この方法は、単離・操作されたPD-1エンゲージャー内皮細胞の集団を治療有効量含む組成物を投与することを含む。

10

【0181】

一部の実施形態では、この方法は、本明細書に記載の単離・操作されたPD-1エンゲージャー内皮細胞のいずれか1つの集団を治療上有効量含む組成物を投与することを含む。一部の実施形態では、組成物は、治療的に有効な担体をさらに含む。一部の実施形態では、投与は、患者の心臓組織への移植、静脈内注射、動脈内注射、冠動脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、心筋内注射、経心内膜注射、経心外膜注射、またはインフュージョンを含む。

【0182】

一部の実施形態では、血管の状態または疾患は、血管傷害、心血管疾患、血管疾患、虚血性疾患、心筋梗塞、うっ血性心不全、高血圧、虚血性組織傷害、四肢虚血、脳卒中、ニューロパチー、および脳血管疾患からなる群から選択される。

20

【0183】

一部の態様では、本明細書において、*in vitro*分化により、iPSC、ESC、HIP、iPSCO、ESCO、HIPO、iPSCO-、ESCO-、またはHIPO-PD-1エンゲージャー細胞の集団からPD-1エンゲージャー内皮細胞の集団を産生する方法であって、内因性-2ミクログロブリン(B2M)遺伝子活性および内因性クラスIIトランスアクチベーター(CIITA)遺伝子活性が失活され、PD-1エンゲージャー分子が細胞表面に提供されている方法が提供される。この方法は、(a)GSKインヒビターを含む第1の培地で細胞を培養することと；(b)VEGFおよびbFGFを含む第2の培地で細胞集団を培養し、前内皮細胞集団を産生することと；(c)ROCKインヒビターおよびALKインヒビターを含む第3の培地で前内皮細胞集団を培養し、低免疫性内皮細胞集団を産生することを含む。

30

【0184】

一部の実施形態では、GSKインヒビターは、CHIR-99021、その誘導体、またはその変異体である。一部の態様では、GSKインヒビターの濃度は約1 $\mu$ M~約10 $\mu$ Mである。一部の実施形態では、ROCKインヒビターは、Y-27632、その誘導体、またはその変異体である。一部の態様では、ROCKインヒビターの濃度は約1 $\mu$ M~約20 $\mu$ Mの範囲である。一部の実施形態では、ALKインヒビターは、SB-431542、その誘導体、またはその変異体である。一部の態様では、ALKインヒビターの濃度は約0.5 $\mu$ M~約10 $\mu$ Mの範囲である。

40

【0185】

一部の実施形態では、第1の培地は2 $\mu$ M~約10 $\mu$ MのCHIR-99021を含む。一部の実施形態では、第2の培地は50ng/mlのVEGFおよび10ng/mlのbFGFを含む。他の実施形態では、第2の培地は、Y-27632およびSB-431542をさらに含む。種々の実施形態では、第3の培地は、10 $\mu$ MのY-27632および1 $\mu$ MのSB-431542を含む。特定の実施形態では、第3の培地は、VEGFおよびbFGFをさらに含む。特に、第1の培地および/または第2の培地はインスリンを含まない。

【0186】

一部の態様では、本明細書において、PD-1エンゲージャー細胞から分化した、単離

50

・操作されたPD-1エンゲージードーパミン作動性ニューロン(DN)が提供され、内因性-2ミクログロブリン(B2M)遺伝子活性および内因性クラスIIトランスアクチベーター(CIITA)遺伝子活性が失活され、PD-1エンゲージャー分子が細胞表面に提供され、ニューロンは血液型O型かつRh-である。

【0187】

一部の実施形態では、単離されたPD-1エンゲージードーパミン作動性ニューロンは、ニューロン幹細胞、ニューロン前駆細胞、未成熟ドーパミン作動性ニューロン、および成熟ドーパミン作動性ニューロンからなる群から選択される。

【0188】

一部の態様では、本明細書において、神経変性疾患または状態に罹患している患者を治療する方法が提供される。一部の実施形態では、この方法は、単離されたPD-1エンゲージードーパミン作動性ニューロンのいずれか1つの集団を治療有効量含む組成物を投与することを含む。一部の実施形態では、組成物は、治療的に有効な担体をさらに含む。一部の実施形態では、単離された低免疫性ドーパミン作動性ニューロンの集団は、生分解性足場上に配置される。一部の実施形態では、投与は移植または注射を含む。一部の実施形態では、神経変性疾患または状態は、パーキンソン病、ハンチントン病、および多発性硬化症からなる群から選択される。

10

【0189】

一部の態様では、本明細書において、PD-1エンゲージャー細胞の集団から*in vitro*分化によってPD-1エンゲージードーパミン作動性ニューロンの集団を産生する方法であって、内因性-2ミクログロブリン(B2M)遺伝子活性および内因性クラスIIトランスアクチベーター(CIITA)遺伝子活性が失活され、PD-1エンゲージャー分子が細胞表面に提供され、血液群がOかつRh-である方法が提供される。一部の実施形態では、この方法は、(a)ソニックヘッジホッグ(SHH)、BDNF、EGF、bFGF、FGF8、WNT1、レチノイン酸、GSK3インヒビター、ALKインヒビター、およびROCKインヒビターからなる群から選択される1つ以上の因子を含む第1の培地で細胞集団を培養して、未成熟ドーパミン作動性ニューロンの集団を産生することと；(b)未成熟ドーパミン作動性ニューロンの集団を、第1の培地とは異なる第2の培地で培養して、ドーパミン作動性ニューロンの集団を産生することを含む。

20

【0190】

一部の実施形態では、GSKインヒビターはCHIR-99021、その誘導体、またはその変異体である。一部の態様では、GSKインヒビターの濃度は約2μM~約10μMの範囲である。一部の実施形態では、ALKインヒビターは、SB-431542、その誘導体、またはその変異体である。一部の態様では、ALKインヒビターの濃度は約1μM~約10μMの範囲である。一部の実施形態では、第1の培地および/または第2の培地は動物血清を含まない。

30

【0191】

一部の実施形態では、この方法は、非ドーパミン作動性ニューロンから低免疫性ドーパミン作動性ニューロンの集団を単離することも含む。一部の実施形態では、この方法は、単離された低免疫性ドーパミン作動性ニューロンの集団を凍結保存することをさらに含む。

40

【0192】

一部の態様では、本明細書において、PD-1エンゲージャー細胞から分化した単離されたPD-1エンゲージャー低免疫性膵島細胞が提供され、内因性-2ミクログロブリン(B2M)遺伝子活性および内因性クラスIIトランスアクチベーター(CIITA)遺伝子活性が失活され、PD-1エンゲージャー分子が細胞表面に提供され、血液型がO型かつRh-である。

【0193】

一部の実施形態では、単離されたPD-1エンゲージャー膵島細胞は、膵島前駆細胞、未成熟膵島細胞、および成熟膵島細胞からなる群から選択される。

50

## 【 0 1 9 4 】

一部の態様では、本明細書において、糖尿病に罹患している患者を治療する方法が提供される。この方法は、本明細書に記載の単離されたPD-1エンゲージャー膵島細胞のいずれか1つの集団を治療有効量含む組成物を投与することを含む。一部の実施形態では、組成物は、治療的に有効な担体をさらに含む。一部の実施形態では、単離された低免疫性膵島細胞の集団は、生分解性足場上に配置される。一部の態様では、投与は移植または注射を含む。

## 【 0 1 9 5 】

一部の態様では、本明細書において、*in vitro*分化によってHIPO-細胞の集団からPD-1エンゲージャー膵島細胞の集団を産生する方法であって、内因性-2ミクログロブリン(B2M)遺伝子活性および内因性クラスIIトランスアクチベーター(CIITA)遺伝子活性が失活され、PD-1エンゲージャー分子が細胞表面に提供され、HIPO-細胞において血液型がO型かつRh-である方法が提供される。この方法は、(a)インスリン様成長因子(IGF)、トランスフォーミング成長因子(TGF)、線維芽細胞成長因子(EGF)、上皮成長因子(EGF)、肝細胞成長因子(HGF)、ソニックヘッジホッグ(SHH)、血管内皮成長因子(VEGF)、トランスフォーミング成長因子-(TGF)スーパーファミリー、骨形成タンパク質-2(BMP2)、骨形成タンパク質-7(BMP7)、GSK3阻害剤、ALK阻害剤、BMPタイプ1レセプター阻害剤、およびレチノイン酸からなる群から選択される1つ以上の因子を含む第1の培地でPD-1エンゲージャー細胞の集団を培養して、未成熟膵島細胞の集団を産生することと；(b)未成熟膵島細胞集団を、第1の培地とは異なる第2の培地で培養して、低免疫性膵島細胞集団を産生することを含む。

## 【 0 1 9 6 】

一部の実施形態では、GSKインヒビターは、CHIR-99021、その誘導体、またはその変異体である。一部の態様では、GSKインヒビターの濃度は約2μM~約10μMである。一部の実施形態では、ALKインヒビターは、SB-431542、その誘導体、またはその変異体である。一部の態様では、ALKインヒビターの濃度は約1μM~約10μMの範囲である。一部の実施形態では、第1の培地および/または第2の培地は動物血清を含まない。

## 【 0 1 9 7 】

一部の実施形態では、この方法は、PD-1エンゲージャー膵島細胞の集団を非膵島細胞から分離することを含む。一部の実施形態では、この方法は、単離された低免疫性膵島細胞の集団を凍結保存することをさらに含む。

## 【 0 1 9 8 】

一部の態様では、本明細書において、PD-1エンゲージャー細胞から分化した、単離・操作されたPD-1エンゲージャー網膜色素上皮(RPE)細胞が提供され、内因性-2ミクログロブリン(B2M)遺伝子活性および内因性クラスIIトランスアクチベーター(CIITA)遺伝子活性が失活され、PD-1エンゲージャー分子が細胞表面に提供され、血液型がO型かつRh-である。

## 【 0 1 9 9 】

一部の実施形態では、単離されたPD-1エンゲージャー細胞RPE細胞は、RPE前駆細胞、未成熟RPE細胞、成熟RPE細胞、および機能的RPE細胞からなる群から選択される。

## 【 0 2 0 0 】

一部の態様では、本明細書において、眼の状態に罹患している患者を治療する方法が提供される。この方法は、本明細書に記載の単離されたPD-1エンゲージャー細胞RPE細胞の集団のいずれか1つを治療有効量含む組成物を投与することを含む。一部の実施形態では、組成物は、治療的に有効な担体をさらに含む。一部の実施形態では、単離された低免疫性RPE細胞の集団は生分解性足場上に配置される。一部の実施形態では、投与は患者の網膜への移植または注射を含む。一部の実施形態では、眼の状態は、湿性黄斑変性

10

20

30

40

50

、乾性黄斑変性、若年性黄斑変性、レーバー先天性黒内障、網膜色素変性、および網膜剥離からなる群から選択される。

【0201】

一部の態様では、本明細書において、PD-1エンゲージャー細胞の集団から *in vitro* 分化によってPD-1エンゲージャー網膜色素上皮 (RPE) 細胞の集団を産生する方法であって、内因性 - 2ミクログロブリン (B2M) 遺伝子活性および内因性クラスIIトランスアクチベーター (CIITA) 遺伝子活性が失活され、PD-1エンゲージャー分子が細胞表面に提供されている方法が提供される。この方法は、(a) アクチビンA、bFGF、BMP4/7、DKK1、IGF1、ノギン、BMPインヒビター、ALKインヒビター、ROCKインヒビター、およびVEGFRインヒビターからなる群から選択されるいずれか1つの因子を含む第1の培地でPD-1エンゲージャー細胞の集団を培養して、プレRPE細胞の集団を産生することと；(b) 第1の培地とは異なる第2の培地でプレRPE細胞の集団を培養して、低免疫性RPE細胞の集団を産生することを含む。

10

【0202】

一部の実施形態では、ALKインヒビターは、SB-431542、その誘導体、またはその変異体である。一部の様態では、ALKインヒビターの濃度は約2 μM ~ 約10 μMの範囲である。一部の実施形態では、ROCKインヒビターは、Y-27632、その誘導体、またはその変異体である。一部の様態では、ROCKインヒビターの濃度は約1 μM ~ 約10 μMの範囲である。

20

【0203】

一部の実施形態では、第1の培地および/または第2の培地は動物血清を含まない。

【0204】

一部の実施形態では、この方法は、PD-1エンゲージャーRPE細胞の集団を非RPE細胞から分離することをさらに含む。一部の実施形態では、この方法は、単離された低免疫性RPE細胞の集団を凍結保存することをさらに含む。

【0205】

E. HIPD-1エンゲージャー細胞の移植

当業者には理解されるように、HIPD-1エンゲージャー細胞は、当該技術分野で公知の技術を用いて移植される。一般に、本発明のHIPD-1エンゲージャー細胞を、経静脈的にまたは注射によって患者の特定の場所に移植する。特定の場所に移植した際、細胞が定着する間、分散を防ぐためにゲルマトリックスに懸濁させてよい。

30

【0206】

本明細書に記載する発明をより完全に理解するために、以下の実施例を示す。これらの実施例は例示を目的としたものであり、本発明をいかなる形でも限定するものとして解釈されるものではないことを理解されたい。

【実施例】

【0207】

実施例1：改変細胞に発現させたPD-1エンゲージャーはNK細胞による殺傷を阻害する

40

B2M-/- CIITA-/- iPSC由来内皮細胞(DKO iEC)は、IL-2で活性化させたNK細胞によってすぐに死滅された。PD-1エンゲージャーを、レンチウイルスを用いてB2M-/- CIITA-/- iECに発現させた。生物発光免疫(BLI)キリングアッセイにより、B2M-/- CIITA-/- PD-1エンゲージャートランスジェニックiEC(DKO-PD-1エンゲージャー)の殺傷は有意に軽減されたことが示された。(図1。)

【0208】

実施例2：改変細胞に発現させたPD-1エンゲージャーはCD8 T細胞による殺傷を阻害する

HLA-A2陰性の同種の健常人ドナーのPBMCを、HLA-A2陽性の野生型(W

50

t) i P S 細胞由来内皮細胞 ( i E C ) とともに 1 4 日間培養した。細胞を採取し、フローサイトメトリーで C D 3 + C D 8 + T 細胞をソーティングした。W t i E C は T 細胞により殺傷された。P D - 1 エンゲージャーを、レンチウイルスを用いて w t i E C に発現させた。B L I キリングアッセイにより、w t P D - 1 エンゲージートランスジェニック i E C の殺傷が有意に緩和されたことが示された。( 図 2 。 )

【 0 2 0 9 】

実施例 3 : 人工ヒト膵臓ベータ細胞に発現させた P D - 1 エンゲージャーは C D 8 T 細胞の殺傷を抑制する

H L A - A 2 陰性の同種の健常人ドナーの P B M C を、H L A - A 2 陽性の野生型 ( w t ) i P S 細胞由来内皮細胞 ( i E C ) とともに 1 4 日間培養した。細胞を採取し、フローサイトメトリーで C D 3 + C D 8 + T 細胞をソーティングした。H L A - A 2 陽性のヒト膵臓ベータ細胞を i n v i t r o インピーダンスアッセイ E プレート上に培養した。上図では、ベータ細胞は未修飾である。下図では、ベータ細胞は P D - 1 エンゲージャーを発現していた。P D - 1 エンゲージャーをレンチウイルス導入を用いて発現させた。フローサイトメトリーでの検出のため、C D 8 a シグナルペプチド ( 配列 I D 番号 2 5 ) と m y c タグ ( 配列 I D 番号 2 6 ) とを持つ P D - 1 エンゲージ配列 ( 配列 I D 番号 2 4 ) を用いた。未修飾のベータ細胞は T 細胞により殺傷された。P D - 1 エンゲージートランスジェニックのベータ細胞は生存した。( 図 3 A , 3 B )

10

【 0 2 1 0 】

実施例 4 : P D - 1 エンゲージャー細胞は組換え P D - 1 に結合する

20

B 2 M - / - C I I T A - / - P D - 1 エンゲージートランスジェニック i E C ( D K O - P D - 1 エンゲージャー ) を、組換えヒト P D - 1 および二次抗体と培養した。フローサイトメトリーのヒストグラムは、組換えヒト P D - 1 が D K O - P D - 1 エンゲージャー細胞に特異的に結合したことを示す。( 図 4 。 )

【 0 2 1 1 】

実施例 5 : T I M 3 エンゲージャー細胞の作製

レンチウイルスの調製。T I M 3 エンゲージャー ( 配列 I D 番号 2 7 ) を、強化型 E F 1 プロモーター下で発現させた。これは、C D 8 a シグナルペプチド ( 配列 I D 番号 2 8 ) 、 m y c タグ ( 配列 I D 番号 2 6 ) 、抗 T I M 3 抗体重鎖可変領域 ( 配列 I D 番号 2 9 ) 、 ( G G G G ) <sub>3</sub> リンカー ( 配列 I D 番号 3 0 ) 、抗 T I M 3 抗体軽鎖可変領域 ( 配列 I D 番号 3 1 ) 、 C D 8 a ヒンジ ( 配列 I D 番号 3 ) 、および血小板由来成長因子レセプター ( P D G F R ) 膜貫通ドメイン ( 配列 I D 番号 4 ) を含むものである。R F P - プラスチジン二重融合マーカーを R S V プロモーター下で発現させた。

30

【 0 2 1 2 】

発現レンチベクターを、レンチウイルスパッケージングプラスミド ( カタログ番号 : H T - p a c k 、 G e n t a r g e t 社、サンディエゴ ) とともに、レンチウイルス生産細胞株 ( カタログ番号 : T L V - C 、 G e n t a r g e t 社 ) に共トランスフェクションした。G e n T a r g e t 社のウイルス産生プロトコルに従い、レンチウイルスを、1 0 % 血清入り D M E M 培地でパッケージングした。その後、レンチウイルスを濃縮して目的のウイルス力価を得た。キットの産生に従って E L I S A P 2 4 アッセイでウイルス力価を測定した。

40

【 0 2 1 3 】

T I M 3 エンゲージャーのレンチウイルス導入。プレコートした 1 2 ウェルプレートに、B 2 M と C I I T A とのダブルノックアウト ( i E C D K O ) を持つヒト人工多能性幹細胞 ( i P S C ) 由来内皮細胞 ( i E C ) を上記のレンチウイルスで導入した。5 × 1 0 <sup>4</sup> の濃度でプレーティングし、3 7 ° C 、 5 % C O <sub>2</sub> で一晩培養した。翌日、強化型 E F 1 プロモーター ( G e n t a r g e t 社、特注品 ) 下で、T I M 3 エンゲージャーの導入遺伝子を持つレンチウイルス粒子とともに、3 7 ° C 、 5 % C O <sub>2</sub> で細胞を一晩培養した。レンチウイルスは R F P 選択マーカーをさらに含み、4 の感染多重度で使用した。ポリブレン ( 8 μ g / m l 、 M i l l i p o r e 社 ) を培地に加え、プレートを 8 0 0 g で 3 0

50

分間遠心分離したのち一晚培養した。細胞集団を、RFPタグを用いてFACS Aria (BD Biosciences社)でソーティングした。

【0214】

フローサイトメトリー解析により、形質導入DKO誘導胚性幹細胞(iEC)においてTIM3エンゲージャータンパク質(potein)が発現していることが示された。赤色蛍光タンパク質(RFP)タグに連結させたTIM3エンゲージャー導入遺伝子を、フローサイトメトリーで定量した。ヒストグラムは、形質導入していないiEC DKO(左のピーク)、および形質導入されたiEC DKO+TIM3-E(右のピーク)のRFPシグナルを示し、TIM3エンゲージャーの発現が確認された。(図5。)

【0215】

実施例6：TIM3のエンゲージメントは免疫細胞による殺傷から細胞を保護する

初代ヒト末梢血NK細胞およびマクロファージでのTIM3表面発現をフローサイトメトリーで解析した結果、TIM3のエンゲージメントがNK細胞およびマクロファージ細胞から細胞を保護することが示された。

【0216】

図6Aは、NK細胞の96.6%がTIM3陽性であることを示し、図3Bは、マクロファージの67.2%がTIM3陽性であることを示す(図6B)。

【0217】

NK細胞によるBLIキリングアッセイを2時間調べた。ホタルルシフェラーゼを発現するiEC DKOまたはホタルルシフェラーゼを発現するiEC DKO+TIM3エンゲージャー(TIM3-E)をプレーティングし、16時間付着させた。次に、ヒト末梢血NK細胞をウェルに加え、2時間培養した。培養後のBLIシグナルのパーセントを示す。iEC DKOのBLIシグナルは完全に消失した(図7A)。iEC DKO+TIM3-EのBLIシグナルは2時間安定していた(図7B)。

【0218】

図8A, 図8Bは、マクロファージによる2時間のBLIキリングアッセイである。ホタルルシフェラーゼを発現したヒトiEC DKOまたはiEC DKO+TIM3-Eをプレーティングし、16時間付着させた。次に、ヒト末梢血マクロファージをウェルに加え、2時間培養した。培養後のBLIシグナルのパーセントを示す。iEC DKOのBLIシグナルは完全に消失した(図8A)。iEC DKO+TIM3-EのBLIシグナルは2時間安定していた(図8B)。

【0219】

図9A, 9Bは、NK細胞による24時間のBLIキリングアッセイである。ホタルルシフェラーゼを発現したヒトiEC DKOまたはiEC DKO+TIM3-Eをプレーティングし、16時間付着させた。次に、ヒト末梢血NK細胞をウェルに加え、24時間培養した。NK培養24時間後のBLIシグナルのパーセントを示す。iEC DKOのBLIシグナルは完全に消失した(図9A)。iEC DKO+TIM3-EのBLIシグナルは24時間安定していた(図9B)。

【0220】

図10A, 10Bは、マクロファージによる24時間のBLIキリングアッセイである。ホタルルシフェラーゼを発現したヒトiEC DKOおよびiEC DKO+TIM3-Eをプレーティングし、16時間付着させた。次に、ヒト末梢血マクロファージをウェルに加え、24時間培養した。マクロファージ培養24時間後のBLIシグナルのパーセントを示す。iEC DKOのBLIシグナルは完全に消失した(図10A)。iEC DKO+TIM3-EのBLIシグナルは24時間安定し、若干増加さえした(図10B)。

【0221】

実施例7：LILRB3エンゲージャー細胞の作製

レンチウイルスの調製。LILRB3エンゲージャー(配列ID番号32)を、強化型EF1プロモーター下で発現させた。これは、CD8aシグナルペプチド(配列ID番

10

20

30

40

50

号28)、mycタグ(配列ID番号26)、抗LILRB3抗体重鎖可変領域(配列ID番号33)、(GGGG)<sub>3</sub>リンカー(配列ID番号30)、抗LILRB3抗体軽鎖可変領域(配列ID番号34)、CD8aヒンジ(配列ID番号3)、および血小板由来成長因子レセプター(PDGF $\alpha$ R)膜貫通ドメイン(配列ID番号4)を含むものである。RFP-プラスチジン二重融合マーカーをRSVプロモーター下で発現させた。

#### 【0222】

発現レンチベクターを、レンチウイルスパッケージングプラスミド(カタログ番号:HT-pack、Gentarget社、サンディエゴ)とともに、レンチウイルス生産細胞株(カタログ番号:TLV-C、Gentarget社)に共トランスフェクションした。Gentarget社のウイルス産生プロトコルに従い、レンチウイルスを、10%血清入りDMEM培地でパッケージングした。その後、レンチウイルスを濃縮して目的のウイルス力価を得た。キットの産生に従ってELISA P24アッセイでウイルス力価を測定した。

10

#### 【0223】

LILRB3エンゲージャーのレンチウイルス導入。プレコートした12ウェルプレートに、B2MとCIITAとのダブルノックアウト(iEC DKO)を持つヒト人工多能性幹細胞(iPSC)由来内皮細胞(iEC)を上記のレンチウイルスで導入した。5 $\times$ 10<sup>4</sup>の濃度でプレティングし、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>で一晩培養した。翌日、強化型EF1プロモーター(Gentarget社)下でLILRB3エンゲージャーの導入遺伝子を持つレンチウイルス粒子とともに、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>で一晩培養した。レンチウイルスはRFP選択マーカーをさらに含み、4の感染多重度で使用した。ポリブレン(8 $\mu$ g/ml、Millipore社)を培地に加え、プレートを800gで30分間遠心分離したのち一晩培養した。細胞集団を、RFPタグを用いてFACS Aria(BD Biosciences社)でソーティングした。

20

#### 【0224】

フローサイトメトリー解析により、形質導入DKO誘導胚性幹細胞(iEC)においてLILRB3エンゲージャータンパク質(potein)が発現していることが示された。赤色蛍光タンパク質(RFP)タグに連結したLILRB3エンゲージャー導入遺伝子を、フローサイトメトリーによって定量した。ヒストグラムは、形質導入していないiEC DKO(左のピーク)および形質導入されたiEC DKO+LILRB3-E(右のピーク)のRFPシグナルを示し、LILRB3エンゲージャーの発現が確認された(図11)。

30

#### 【0225】

実施例8:LILRB3のエンゲージメントは免疫細胞による殺傷から細胞を保護する初代ヒト末梢血NK細胞およびマクロファージでのLILRB3の表面発現をフローサイトメトリーで解析した結果、LILRB3は一部のNK細胞およびマクロファージの大半に発現していることが示された。

#### 【0226】

図12Aは、NK細胞の17.8%がLILRB3陽性であることを示し、図12Bは、マクロファージの95.36%がLILRB3陽性であることを示す。

40

#### 【0227】

NK細胞によるBLIキリングアッセイを2時間調べた。ホタルルシフェラーゼを発現するiEC DKOまたはホタルルシフェラーゼを発現するiEC DKO+LILRB3-Eをプレティングし、16時間附着させた。次に、ヒト末梢血NK細胞をウェルに加え、2時間培養した。培養後のBLIシグナルのパーセントを示す。iEC DKOのBLIシグナルは完全に消失した(図13A)。iEC DKO+LILRB3-EのBLIシグナルは、2時間で顕著な低下が少なかった(図13B)。

#### 【0228】

図14A, 14Bは、マクロファージによる2時間のBLIキリングアッセイである。ホタルルシフェラーゼを発現したヒトiEC DKOまたはiEC DKO+LILRB

50

3 - E をプレATINGし、16時間付着させた。次に、ヒト末梢血マクロファージをウェルに加え、2時間培養した。培養後のBLIシグナルのパーセントを示す。iEC DKOのBLIシグナルは完全に消失した(図14A)。iEC DKO + LILRB3 - EのBLIシグナルは、2時間で顕著な低下が少なかった(図4B)。

#### 【0229】

図15A, 15Bは、NK細胞による24時間のBLIキリングアッセイである。ホタルルシフェラーゼを発現したヒトiEC DKOまたはiEC DKO + LILRB3 - EをプレATINGし、16時間付着させた。次に、ヒト末梢血NK細胞をウェルに加え、24時間培養した。NK培養24時間後のBLIシグナルのパーセントを示す。iEC DKOのBLIシグナルは完全に消失した(図15A)。iEC DKO + LILRB3 - EのBLIシグナルは、24時間で顕著な低下が少なかった(図15B)。

10

#### 【0230】

図16A, 16Bは、マクロファージによる24時間のBLIキリングアッセイである。ホタルルシフェラーゼを発現したヒトiEC DKOおよびiEC DKO + LILRB3 - EをプレATINGし、16時間付着させた。次に、ヒト末梢血マクロファージをウェルに加え、24時間培養した。マクロファージ培養24時間後のBLIシグナルのパーセントを示す。iEC DKOのBLIシグナルは完全に消失した(図16A)。iEC DKO + LILRB3 - EのBLIシグナルは、24時間で顕著な低下が少なく、若干増加さえした(図16B)。

#### 【0231】

20

実施例9：LILRB1エンゲージャー細胞の作製

レンチウイルスの調製。LILRB1エンゲージャー(配列ID番号35)を、強化型EF1プロモーター下で発現させ、RFP-プラスチジン二重融合マーカートをRSVプロモーター下で発現させた。これは、CD8aシグナルペプチド(配列ID番号28)、mycタグ(配列ID番号26)、抗LILRB1抗体重鎖可変領域(配列ID番号36)、(GGGG)<sub>3</sub>リンカー(配列ID番号30)、抗LILRB1抗体軽鎖可変領域(配列ID番号37)、CD8aヒンジ(配列ID番号3)、および血小板由来成長因子レセプター(PDGF $\alpha$ R)膜貫通ドメイン(配列ID番号4)を含むものである。RFP-プラスチジン二重融合マーカートをRSVプロモーター下で発現させた。

#### 【0232】

30

発現レンチベクターを、レンチウイルスパッケージングプラスミド(カタログ番号：HT-pack, Gentarget社、サンディエゴ)とともに、レンチウイルス生産細胞株(カタログ番号：TLV-C, Gentarget社)に共トランスフェクションした。Gentarget社のウイルス産生プロトコルに従い、レンチウイルスを、10%血清入りDMEM培地でパッケージングした。その後、レンチウイルスを濃縮して目的のウイルス力価を得た。キットの産生に従ってELISA P24アッセイでウイルス力価を測定した。

#### 【0233】

LILRB1エンゲージャーのレンチウイルス導入。プレコートした12ウェルプレートに、B2MとCIITAとのダブルノックアウト(iEC DKO)を持つヒト人工多能性幹細胞(iPSC)由来内皮細胞(iEC)を上記のレンチウイルスで導入した。5 × 10<sup>4</sup>の濃度でプレATINGし、37、5%CO<sub>2</sub>で一晩培養した。翌日、強化型EF1プロモーター(Gentarget社)下でLILRB1エンゲージャーの導入遺伝子を持つレンチウイルス粒子とともに、37、5%CO<sub>2</sub>で一晩培養した。レンチウイルスはRFP選択マーカートをさらに含み、4の感染多重度で使用した。ポリブレン(8 μg/m, Millipore社)を培地に加え、プレートを800gで30分間遠心分離したのち一晩培養した。細胞集団を、RFPタグを用いてFACS Aria(BD Biosciences社)でソーティングした。

40

#### 【0234】

フローサイトメトリー解析により、形質導入DKO誘導胚性幹細胞(iEC)において

50

L I L R B 1 エンゲージャータンパク質 (potein) が発現していることが示された。赤色蛍光タンパク質 (RFP) タグに連結した L I L R B 1 エンゲージャー導入遺伝子を、フローサイトメトリーにより定量した。ヒストグラムは、形質導入していない i E C D K O (左のピーク) および形質導入された i E C D K O + L I L R B 1 - E (右のピーク) の RFP シグナルを示し、L I L R B 1 エンゲージャーの発現が確認された (図 17)。

**【0235】**

実施例 10 : L I L R B 1 のエンゲージメントは免疫細胞による殺傷から細胞を保護する初代ヒト末梢血 NK 細胞およびマクロファージでの L I L R B 1 の表面発現をフローサイトメトリーで解析した結果、L I L R B 1 は多くの NK 細胞およびマクロファージの大半に発現していることが示された。

10

**【0236】**

図 18 A は、NK 細胞の 75.8% が L I L R B 1 陽性であることを示し、図 18 B は、マクロファージの 99.96% が L I L R B 1 陽性であることを示す。

**【0237】**

NK 細胞による B L I キリングアッセイを 2 時間調べた。ホタルルシフェラーゼを発現する i E C D K O またはホタルルシフェラーゼを発現する i E C D K O + L I L R B 1 - E をプレATINGし、16 時間付着させた。次に、ヒト末梢血 NK 細胞をウェルに加え、2 時間培養した。培養後の B L I シグナルのパーセントを示す。i E C D K O の B L I シグナルは完全に消失した (図 19 A)。i E C D K O + L I L R B 1 - E の B L I シグナルは 2 時間安定していた (図 19 B)。

20

**【0238】**

図 20 A , 20 B は、マクロファージによる 2 時間の B L I キリングアッセイである。ホタルルシフェラーゼを発現したヒト i E C D K O または i E C D K O + L I L R B 1 - E をプレATINGし、16 時間付着させた。次に、ヒト末梢血マクロファージをウェルに加え、2 時間培養した。培養後の B L I シグナルのパーセントを示す。i E C D K O の B L I シグナルは完全に消失した (図 20 A)。i E C D K O + L I L R B 1 - E の B L I シグナルは 2 時間安定していた (図 20 B)。

**【0239】**

図 21 A , 21 B は、NK 細胞による 24 時間の B L I キリングアッセイである。ホタルルシフェラーゼを発現したヒト i E C D K O または i E C D K O + L I L R B 1 - E をプレATINGし、16 時間付着させた。次に、ヒト末梢血 NK 細胞をウェルに加え、24 時間培養した。NK 培養 24 時間後の B L I シグナルのパーセントを示す。i E C D K O の B L I シグナルは完全に消失した (図 21 A)。i E C D K O + L I L R B 1 - E の B L I シグナルは 24 時間安定していた (図 21 B)。

30

**【0240】**

図 22 A , 22 B は、マクロファージによる 24 時間の B L I キリングアッセイである。ホタルルシフェラーゼを発現したヒト i E C D K O および i E C D K O + L I L R B 1 - E をプレATINGし、16 時間付着させた。次に、ヒト末梢血マクロファージをウェルに加え、24 時間培養した。マクロファージ培養 24 時間後の B L I シグナルのパーセントを示す。i E C D K O の B L I シグナルは完全に消失した (図 22 A)。i E C D K O + L I L R B 1 - E の B L I シグナルは 24 時間安定し、若干増加させた (図 22 B)。

40

**【0241】**

実施例 11 : 免疫チェックポイントエンゲージャーは分化後も安定的に発現する

P D - 1 エンゲージャー導入遺伝子の発現は分化中も維持される。i P S C D K O を、レンチウイルス粒子を用いて形質導入し、P D - 1 エンゲージャーを発現させた (i P S C D K O + P D - 1 - E)。フローサイトメトリーから、強い発現が得られることが示される (図 23 A)。i P S C D K O + P D - 1 - E を i E C D K O + P D - 1 - E に分化させても、導入遺伝子の発現は安定したままであった (図 23 B)。

50

## 【0242】

TIM3エンゲージャー導入遺伝子の発現は分化中も維持される。iPSC DKOを、レンチウイルス粒子を用いて形質導入し、TIM3エンゲージャーを発現させた(iPSC DKO+TIM3-E)。フローサイトメトリーから、強い発現が得られることが示される(図24A)。iPSC DKO + TIM3-EをiEC DKO + TIM3-E iECに分化させても、導入遺伝子の発現は安定したままであった(図24B)。

## 【0243】

LILRB3エンゲージャー導入遺伝子の発現は分化中も維持される。iPSC DKOを、レンチウイルス粒子を用いて形質導入し、LILRB3エンゲージャーを発現させた(iPSC DKO+LILRB3-E)。フローサイトメトリーから、強い発現が得られることが示される(図25A)。iPSC DKO + LILRB3-EをiEC DKO + LILRB3-Eに分化させても、導入遺伝子の発現は安定したままであった(図25B)。

10

## 【0244】

LILRB1エンゲージャー導入遺伝子の発現は分化中も維持される。iPSC DKOを、レンチウイルス粒子を用いて形質導入し、LILRB1エンゲージャーを発現させた(iPSC DKO+LILRB1-E)。フローサイトメトリーから、強い発現が得られることが示される(図26A)。iPSC DKO + LILRB1-EをiEC DKO + LILRB1-Eに分化させても、導入遺伝子の発現は安定したままであった(図26B)。

20

## 【0245】

実施例12：保護に必要な免疫チェックポイントエンゲージャーの閾値レベル

図27Aおよび27Bは、NK細胞による殺傷から細胞を保護するために必要なTIM3-E発現の閾値を示す。NK細胞による殺傷からの保護効果を発揮するためのTIM3-E発現の機能的閾値の有無を評価するために、TIM3-E導入遺伝子を持つレンチウイルス粒子を用いてiEC DKOを導入した。3日後、導入したiECのプールを、TIM3-Eの発現に基づいて3つの集団にソーティングした。3つの集団を、iEC DKO + TIM3-E高、中、低で示す(図27A)。これらの集団のそれぞれをNK細胞と2時間培養し、続いてBLIキリングアッセイを行った(図27B)。すべての標的細胞がルシフェラーゼ陽性であった。2時間のNKインキュベーション後のBLIシグナルのパーセントを示す。iEC DKOのBLIシグナルは完全に消失した。iEC DKO+TIM3-E高および中のBLIシグナルは安定していたが、iEC DKO+TIM3-E低のBLIシグナルもバックグラウンドまで低下した。これらの結果は、TIM3-Eの機能的閾値が低発現レベルと中発現レベルの間にあることを示す。

30

## 【0246】

図28A, 28Bは、NK細胞による殺傷から細胞を保護するために必要なLILRB1-E発現の閾値を示す。NK細胞による殺傷からの保護効果を発揮するためのLILRB1-E発現の機能的閾値の有無を評価するために、LILRB1-E導入遺伝子を持つレンチウイルス粒子を用いてiEC DKOを導入した。3日後、導入したiECのプールを、LILRB1-Eの発現に基づいて3つの集団にソーティングした。3つの集団を、iEC DKO+LILRB1-E高、中、低で示す(図28A)。これらの集団のそれぞれをNK細胞と2時間培養し、続いてBLIキリングアッセイを行った(図28B)。すべての標的細胞がルシフェラーゼ陽性であった。2時間のNKインキュベーション後のBLIシグナルのパーセントを示す。iEC DKOのBLIシグナルは完全に消失した。iEC DKO+LILRB1-E高および中のBLIシグナルは安定していたが、iEC DKO+LILRB1-E低のBLIシグナルもバックグラウンドまで低下した。これらの結果は、LILRB1-Eの機能的閾値が低発現レベルと中発現レベルの間にあることを示す。

40

## 【0247】

50

方法：

NK細胞の培養。ヒト初代NK細胞を、Stemcell Technologies社(70036、カナダ国バンクーバー)から購入し、10% FCS hiおよび1% ペニシリン/ストレプトマイシンを添加したRPMI-1640で培養したのち、アッセイを行った。

【0248】

ホタルルシフェラーゼを発現するヒトiPSC細胞の培養および形質導入。ヒトwtまたはB2M-/- CIITA-/- iPSCを、希釈したフィーダーフリーマトリゲル(hESC対応、BD Biosciences社、カリフォルニア州サンノゼ)をコートした10cmディッシュで、Essential 8 Flex培地(Thermo Fisher Scientific社)を用いて培養した。培地は24時間ごとに交換し、細胞の継代にはVersene(Gibco)を1:6の割合で使用した。ルシフェラーゼの形質導入のために、 $1 \times 10^5$ のiPSCを1つの6ウェルにプレATINGし、37、5%CO<sub>2</sub>で一晩培養した。翌日、培地を交換し、再改変したEF1プロモーター(Gen Target社、カリフォルニア州サンディエゴ)下でルシフェラーゼII遺伝子を発現するFlucレンチウイルス粒子1バイアルを1.5ml培地に加えた。36時間後、細胞培地1mlを加えた。24時間後、培地を完全に交換した。2日後、D-ルシフェリン(Promega社、ウィスコンシン州マディソン)を添加してルシフェラーゼの発現を確認した。シグナルをp/s/cm<sup>2</sup>/srで定量した。

10

【0249】

iPSC由来内皮細胞(iEC)の分化。Fluc+ wtまたはB2M-/- CIITA-/- iECを、Fluc+ B2M-/- CIITA-/- iPSCから以下のように分化させた。分化プロトコルは、iPSCが60%のコンフルエンスに達した時点で開始した。培地を、RPMI-1640に2%のB-27(インスリンなし)(いずれもThermo Fisher Scientific社のブランドであるGibco社)および5μMのCHIR-99021(Selleckchem社、ドイツ国ミュンヘン)を含むものに変更した。2日目に、培地をRPMI-1640(Gibco社)に2%のB-27(インスリンなし)および2μMのCHIR-99021(Selleckchem社)を含む減量培地に変更した。培養の4日目から7日目に、細胞を、RPMI-1640 EC培地、RPMI-1640に2%のB-27(インスリンなし)、50ng/mlのヒト血管内皮細胞増殖因子(VEGF; R&D Systems社、ミネソタ州ミネアポリス)、10ng/mlのヒト塩基性線維芽細胞増殖因子(FGFb; R&D Systems社)、10μMのY-27632(Sigma-Aldrich社)、および1μMのSB 431542(Sigma-Aldrich社、ミズーリ州セントルイス)を含む培地にさらした。7日目から内皮細胞のクラスターが目視で確認できた。細胞を、Endothelial Cell Basal Medium 2(PromoCell社、ドイツ国ハイデルベルク)にサプリメント、10%のFCS hi(Gibco社)、1%のペニシリン/ストレプトマイシン、25ng/ml VEGF、2ng/ml FGFb、10μMのY-27632(Sigma-Aldrich社)、および1μM SB 431542(Sigma-Aldrich社)を添加した培地で維持した。分化プロトコルを14日後に終了した。未分化細胞は分化過程で剥離した。TrypLE Express(Gibco社)を用いて、3~4日ごとに1:3の割合で細胞を継代した。

20

30

40

【0250】

PBMCからのマクロファージの分化。PBMCを新鮮な血液からフィコール分離によって単離し、10% FCS HIおよび1%ペニシリン-ストレプトマイシンを含むRPMI-1640(すべてGibco社)に再懸濁した。細胞を、24ウェルプレートに1ミリリットル当たり $1 \times 10^6$ の濃度でプレATINGした。 $10 \text{ ng ml}^{-1}$ のヒトM-CSF(PeproTech社)を培地に加えた。培地は1日おきに交換した。6日目以降、アッセイを行う前に、 $1 \mu \text{g ml}^{-1}$ のヒトIL-2(PeproTech社

50

)を培地に24時間添加した。

【0251】

PD-1エンゲージャーのレンチウイルス導入。プレコートした12ウェルプレートに、iECを $5 \times 10^4$ の濃度でプレーティングし、37℃、5%CO<sub>2</sub>で一晩培養した。翌日、強化型EF1プロモーター(Gentarget社、特注品)下でPD-1エンゲージャーの導入遺伝子を持つレンチウイルス粒子とともに、37℃、5%CO<sub>2</sub>で細胞を一晩培養した。レンチウイルスはRFP選択マーカーをさらに含み、4の感染多重度で使用した。ポリブレン(8μg/ml、Millipore社)を培地に加え、プレートを800gで30分間遠心分離したのち一晩培養した。細胞集団を、RFPタグを用いてFACS Aria(BD Biosciences社)でソーティングした。

10

【0252】

iEC BLI NK細胞のキリングアッセイ。Fluc+ B2M-/- CIITA-/- (DKO) iECおよびB2M-/- CIITA-/- (DKO) PD-1エンゲージャートランスジェニックiECをカウントし、96ウェルあたり $1 \times 10^3$ 細胞の濃度でプレーティングした。その後、すべての標的細胞を初代ヒトNK細胞とE:T比10:1で混合した。すべてのNK細胞を、ヒトIL-2(Life Technologies社)と1μg/mlの濃度で72時間プレインキュベーションした。4時間後、BLIキリングアッセイでD-ルシフェリン(Promega社)を添加してルシフェラーゼ発現を検出した。コントロールとして、標的細胞を未処理のままにするか、細胞特異的培地に2%Triton X-100を添加して処理した。Ami HT(Spectral Instruments Imaging社)を用いてp/s/cm<sup>2</sup>/sr単位でシグナルを定量し、未処理の標的細胞と比較した相対的なBLI強度を測定した。

20

【0253】

ex vivoでのT細胞のプライミング。HLA-A2陰性ドナーの血液を採取し、フィコール分離後にPBMCを得た。PBMCを、 $5 \times 10^5$ のHLA-A2陽性wt iEC細胞および $1 \times 10^6$ のPBMCをゼラチンコートしたフラスコで共培養してプライミングした。内皮細胞培地とPBMC培地とを1:1で混合した培地を3日ごとに交換した。14日後、懸濁液中の細胞を収穫し、APCマウス抗ヒトCD3抗体(クローンSP34-2、カタログ番号557597、BD Biosciences社)およびそのアイソタイプコントロールであるAPCマウスIgG1抗体(クローンMOPC-21、カタログ番号550854、BD Biosciences社)、さらにBV421マウス抗ヒトCD8抗体(クローンSK1、カタログ番号344748、Biolegend社)およびそのアイソタイプコントロールであるマウスIgG1抗体(クローンMOPC-21、カタログ番号400157、Biolegend社)を用いてソーティングした。CD3+CD8+細胞をFACS Ariaフローサイトメーター(BD Biosciences社)を用いてソーティングし、CD8 T細胞キリングアッセイに用いた。

30

【0254】

iEC BLI CD8 T細胞のキリングアッセイ。Fluc+ wt iECおよびwt PD-1エンゲージャートランスジェニックiECをカウントし、96ウェルあたり $1 \times 10^3$ 細胞の濃度でプレーティングした。その後、すべての標的細胞を、ex vivoでプライミングしたCD8 T細胞とE:T比10:1で混合した。4時間後、BLIキリングアッセイでD-ルシフェリン(Promega社)を添加してルシフェラーゼ発現を検出した。コントロールとして、標的細胞を未処理のままにするか、細胞特異的培地に2%Triton X-100を添加して処理した。Ami HT(Spectral Instruments Imaging)を用いてp/s/cm<sup>2</sup>/sr単位でシグナルを定量した。

40

【0255】

ヒト膵臓ベータ細胞。ヒトiPSC由来膵臓ベータ細胞をタカラバイオ株式会社から購入し(ChiPSC22、カタログ番号Y10106)、Cellartis hiPS Beta Cell Media Kit(タカラバイオ株式会社、カタログ番号Y10

50

108) で培養した。メーカーのプロトコルに従って細胞を12ウェルプレートにプレートの一部に、PD-1エンゲージャーレンチウイルス粒子 (GenTarget) を用いて形質導入を行った。

【0256】

その後、PD-1エンゲージャーを発現している脾臓細胞 (脾臓ベータ細胞) と発現していない脾臓細胞とをXCelligenceプラットフォームにプレートの一部に、プラスチック製のディッシュに付着したが、クラスターも形成し、細胞指数は時間とともに増加し続けた。クラスター化した増殖パターンにもかかわらず、アッセイは、非常に高感度で標的細胞の死滅を検出した。脾臓細胞はHLA A2型を示した。そこで、エフェクター細胞として、上記のように作製したプライミングされたCD3+CD8+ T細胞を用いた。未編集の脾臓細胞は、プライミングされたT細胞により、典型的なT細胞のキリング動態で殺傷された。これに対し、PD-1エンゲージャーを発現している脾臓ベータ細胞は、プライミングされたT細胞による殺傷から保護された。

10

【0257】

DKO PD-1エンゲージャー iECのPD-1への結合を示すために、組換えヒトPD-1タンパク質 (Fc Chimera Active, ab221398, Abcam社、0.1ug/mL) を、マウス抗ヒトIgG Fc二次抗体 (3D3cc, Novus Biologicals社、アロフィコシアニン、1:200) と用いた。LSRII (BD Biosciences社) でフローサイトメトリーを行った。

【0258】

20

配列例：

【化1】

配列ID番号1：IL-2シグナルペプチドを持つPD-1エンゲージャー

MYRMQLLSICIALSLALVTNSDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQASQSPNNLLAWYQQKPGK  
APKLLIYGASDLPSGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLOPEDFATYYCONNYYVGPVSYAFGGG  
TKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGYSLSKYDMSWVRQAP  
GKGLEWMIYTSYTDYAQKFOGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGNPYIT  
NGFNNSWGQGLTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAAVHTRGLDFACDAV  
LVLLVIVIIISLIVLVVIW

配列ID番号2：IL-2シグナルペプチド

MYRMQLLSICIALSLALVTNS

30

配列ID番号3：CD8aヒンジ

TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAAVHTRGLDFACD

配列ID番号4：血小板由来成長因子レセプター (PDGFR) 膜貫通ドメイン (TMD)

AAVLVLLVIVIIISLIVLVVIW

40

50

【化 2】

配列 I D 番号 5 : CD 4 7 膜貫通ドメイン (TMD)

NILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYS  
LKNATGLGLIVTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAIYILAVVGLSLCIAACIP  
MHGPLLISGLSILALAQLLGLVYM

配列 I D 番号 6 : CD 6 4 膜貫通ドメイン (TMD)

VLFYLAVGIMFLVNTVLWVTI

配列 I D 番号 7 : CD 4 7 細胞内ドメイン (ICD)

KFVASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMNDE

10

配列 I D 番号 8 : ヒト SIRP $\alpha$

>NP\_001317657.1 チロシン-タンパク質リン酸化酵素  
非レセプター型基質 1 アイソフォーム 2 前駆体 [ホモ・サピエンス]

MEPAGPAPGRGLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEELQVIQPKSVLVAAGETATLRCTATSLIP  
VGPIQWFRGAGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYICVKF  
RKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAARATPQHTVVSFTCESHGFS PRDITLKWFK  
NGNELSDPQTNVDPVGEVSYSIHSTAKVVLTRDVDHSQVICEVAHVTLQGDPLRGTANLSE  
TIRVPPTELEVTQQPVRAENQVNVTCQVRKFPQRLQLTWLENGVSRTEASTVTENKDGTY  
NWMSWLLVNVSAHRDDVKLTQVEHDGQPAVSKSHDLKVS AHPKEQGSNTAAENTGSNERNI  
YIVVGVVCTLLVALLMAALYLVRIRQKKAQGSTSSTRLHEPEKNAREITQVQSLDNDITYA  
DLNLPKGGKPPAPQAAEPNNHTEYASIQTSPPASEDTLTYADLDMVHLNRTPKQPAPKPEPS  
FSEYASVQVPRK

20

配列 I D 番号 9 : ヒト CD 4 7

>NP\_001768.1 白血球表面抗原 CD 4 7 アイソフォーム 1 前駆体  
[ホモ・サピエンス]

MWPLVAALLLGSACCGSAQLL FNKTKSVEFTFCNDTVVIPC FVTNMEAQNTTEVYVKKWFKG  
RDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKM DKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGE  
TIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVI  
TVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIA  
YILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVEEPL  
NAFKESKGMNDE

配列 I D 番号 10 : CD 4 7 細胞外ドメイン (ECD)

QLL FNKTKSVEFTFCNDTVVIPC FVTNMEAQNTTEVYVKKWFKGRDIYTFDGALNKSTVPTD  
FSSAKIEVSQLLKGDASLKM DKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELKYRVVSWFSPNE

30

配列 I D 番号 11 : CD 4 7 免疫グロブリンスーパーファミリドメイン

QLL FNKTKSVEFTFCNDTVVIPC FVTNMEAQNTTEVYVKKWFKGRDIYTFDGALNKSTVPTD  
FSSAKIEVSQLLKGDASLKM DKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELKYRVV

配列 I D 番号 12 : P-D-1 (アイソフォーム 1)

MRI FAVFI FMTYWHLLNAFTVTPKDLVYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAA\_IVYWEMEDKNI IQFVHG EEDLK  
VQHSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDVPTSE  
HELTCQAE GYPKAEVIWTS SDHQVLSGKT TTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTNEI FYCTFRRLDPEENHTAELV  
IPELPLAHPNERTHLVILGAILLCIGVALTFI FRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET

40

50

【化 3】

配列 I D 番号 13 : PD-L1 (アイソフォーム 2)

MRIFAVFIFMTYWHLLNAPYNKINQRI L V V D P V T S E H E L T C Q A E G Y P K A E V I W T S S D H Q V L S G K T T T T N S K R E E K  
L E N V T S T L R I N T T T N E I F Y C T F R R L D P E E N H T A E L V I P E L P L A H P P N E R T H L V I L G A I L L C L G V A L T F I F R L R K G  
R M M D V K K C G I Q D T N S K K Q S D T H L E E T

配列 I D 番号 14 : PD-L1 (アイソフォーム 3)

MRIFAVFIFMTYWHLLNAPYNKINQRI L V V D P V T S E H E L T C Q A E G Y P K A E V I W T S S D H Q V L S G K T T T T N S K R E E K  
V Q H S S Y R Q R A R L L K D Q L S L G N A A L Q I T D V K L Q D A G V Y R C M I S Y G G A D Y K R I T V K V N A P Y N K I N Q R I L V V D P V T S E  
H E L T C Q A E G Y P K A E V I W T S S D H Q V L S G D

10

配列 I D 番号 15 : PD-L2 (アイソフォーム 1)

M I F L L L M L S L E L Q L H Q I A A L F T V T V P K E L Y I I E H G S N V T L E C N F D T G S H V N L G A I T A S L Q K V E N D T S P H R E R A T L  
L E E Q L P L G K A S F H I P Q V Q V R D E G Q Y Q C I I I Y G V A W D Y K Y L T L K V K A S Y R K I N T H I L K V P E T D E V E L T C Q A T G Y P L  
A E V S W P N V S V P A N T S H S R T P E G L Y Q V T S V L R L K P P P G R N F S C V F W N T H V R E L T L A S I D L Q S Q M E P R T H P T W L L H I  
F I P F C I I A F I F I A T V I A L R K Q L C Q K L Y S S K D T T K R P V T T T K R E V N S A I

配列 I D 番号 16 : PD-L2 (アイソフォーム 2)

M I F L L L M L S L E L Q L H Q I A A L F T V T V P K E L Y I I E H G S N V T L E C N F D T G S H V N L G A I T A S L Q K V E N D T S P H R E R A T L  
L E E Q L P L G K A S F H I P Q V Q V R D E G Q Y Q C I I I Y G V A W D Y K Y L T L K V K G Q M E P R T H P T W L L H I F I P F C I I A F I F I A T V  
I A L R K Q L C Q K L Y S S K D T T K R P V T T T K R E V N S A I

配列 I D 番号 17 : PD-L2 (アイソフォーム 3)

M I F L L L M L S L E L Q L H Q I A A L F T V T V P K E L Y I I E H G S N V T L E C N F D T G S H V N L G A I T A S L Q K V E N D T S P H R E R A T L  
L E E Q L P L G K A S F H I P Q V Q V R D E G Q Y Q C I I I Y G V A W D Y K Y L T L K V K D G T Q D P S N L A A S H F H P L L H H C F H F H S H S D S  
P K K T T L S K A V F F K R H N K K T C H H N K E G S E Q C Y L

20

配列 I D 番号 18 : 抗体 1 重鎖 C D R 1

KVSGYSLSKYDMS

配列 I D 番号 19 : 抗体 1 重鎖 C D R 2

IIYTSGYTDYAQKFQG

配列 I D 番号 20 : 抗体 1 重鎖 C D R 3

ATGN?YYTNGFNS

配列 I D 番号 21 : 抗体 1 軽鎖 C D R 1

QASQSPNNLLA

配列 I D 番号 22 : 抗体 1 軽鎖 C D R 2

YGASDLPS

30

配列 I D 番号 23 : 抗体 1 軽鎖 C D R 3

QNNYYVGPVSYA

配列 I D 番号 24 : CD8 a シグナルペプチドおよびmyc タグを持つ PD-1 エンゲージャー

MALPVTALLLPLALLLHAARPEQKLISEEDLDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCQASQS  
PNNLLAWYQKPGKAPKLLIYGASDLPSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATY  
YCONNYYVGPVSYAFGGGKTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGA  
SVKVSCKVSGYSLSKYDMSWVRQAPGKGLEWMGHIYTSGYTDYAQKFOGRVTMTTE  
DTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCATGNPYTNGFNSWGQGLVTVSSTTTPAPRPP  
TPAPTIASQPLSLRPEACRPAAAVHTRGLDFACDAAVLVLLVIVIIISLIVLVVIV

40

50

【化4】

配列ID番号25 : CD8aシグナルペプチド  
MALPVTALLLPLALLLHAARP

配列ID番号26 : mycタグ  
EQKLISEEDL

配列ID番号27 : TIM3エンゲージャータンパク質  
MALPVTALLLPLALLLHAARPEQKLISEEDLQMLVQSGGEVKKPGASVKVSCKTSGYRFTS  
YGISWVRQAPGQGLEWMGWIISGYNGETNYAETLQGRLLTDTSTSTAYMELGSLRPDDTAV  
YYCTRDRGHSFYFDYWGQGLVTVVSSGGGGSGGGSGGGGSQAVLTQPASVSGSPGQSVTISC  
TGTSSDVGGYNYVSWYQHPGKAPKLMIEVSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIISRVEAGD  
EADYYCQVWDSSSHWFVFRGRTKLTVLTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAAVHT  
RGLDFACDAAVLVLLVIVIIISLIVLVVIW

10

配列ID番号28 : CD8aシグナルペプチド  
MALPVTALLLPLALLLHAARP

配列ID番号29 : 重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>)  
QMLVQSGGEVKKPGASVKVSCKTSGYRFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWIISGYNGETNYAE  
TLQGRLLTDTSTSTAYMELGSLRPDDTAVYYCTRDRGHSFYFDYWGQGLVTVVSS

配列ID番号30 : (GGGG)<sub>3</sub>リンカー  
GGGGSGGGSGGGGS

配列ID番号31 : 軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>)  
QAVLTQPASVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQHPGKAPKLMIEVSKRPSGIPER  
FSGSNSGNTATLTIISRVEAGDEADYYCQVWDSSSHWFVFRGRTKLTVL

20

配列ID番号32 : LILRB3エンゲージャータンパク質  
MALPVTALLLPLALLLHAARPEQKLISEEDLEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSACAASGFTFSS  
YAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAV  
YYCARRKKRERGFSGNDPVGAI DVWGQGLVTVVSSGGGGSGGGSGGGGSQSVLTQPASAG  
TPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNTNRPSGVPDRFSGSKSGTSAS  
LAISGLRSEDEADYYCSAWDDSLSGVVFVGGGKLTVLGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRP  
EACRPAAAVHTRGLDFACDAAVLVLLVIVIIISLIVLVVIW

配列ID番号33 : 重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSACAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGGSTYYAD  
SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRKKRERGFSGNDPVGAI DVWGQGLV  
TVSS

30

配列ID番号34 : 軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>)  
QSVLTQPASAGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNTNRPSGVPD  
RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCSAWDDSLSGVVFVGGGKLTVLG

配列ID番号35 : LILRB1エンゲージャータンパク質  
MALPVTALLLPLALLLHAARPEQKLISEEDLEQSLLESGGGLVKPGASLTVTCAVSGFSLNS  
YAITWVRQAPGKLEYIGYIDTASITDYASWAKGRFTISKTSSTTVTLEMTSLTDADTATY  
FCARGFSMFKLWPGTLVTISSGGGGSGGGSGGGGSELDLTQTPSSVSAAVGGTVTISCQA  
SQSVYGNRLAWYHQKPGQPPKRLIYLASTLDSGVPSRFKAGSGTQFTLTISDLECDAAAT  
YYCAGGYAGNFNFAFGGTEVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAAVHTRGLD  
FACDAAVLVLLVIVIIISLIVLVVIW

40

【化5】

配列ID番号36：重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>)

EQSLEESGGGLVKPGASLTVTCAVSGFSLNSYAITWVRQAPGKGLYIGYIDTGASITDYAS  
WAKGRFTISKTSSTTVTLEMTSLTDADTATYFCARGFSMFKLWGPGLVTISS

配列ID番号37：軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>)

ELDLTQTPSSVSAAVGGTVTISQASQSVYGNRLAWYHQKPGQPPKRLIYLASTLD SGVPS  
RFKGAGSGTQFTLTISDLECDAAATYYCAGGYAGNFNAFGGGTEVEIK

10

【0259】

本明細書に開示または引用したすべての刊行物および特許文献は、その全体が参照により援用される。前述の説明は、例示および説明のみを目的として示したものである。本明細書は、本発明を開示した厳密な形態に限定することを意図するものではない。本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によって規定されることが意図される。

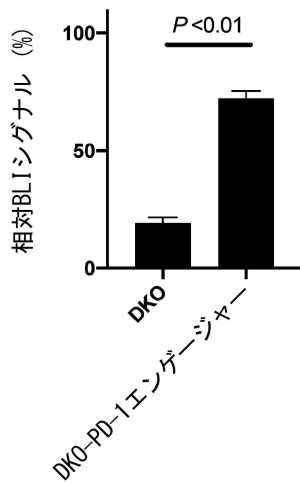
【図面】

【図1】

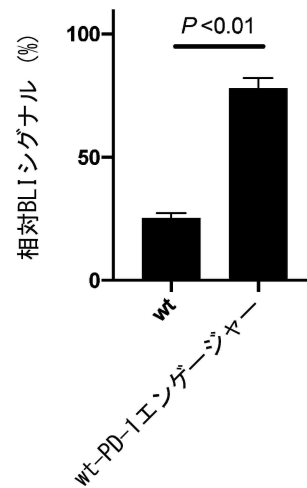
【図2】

20

DKOおよびPD-1エンゲージャーとNK細胞



wtおよびPD-1エンゲージャーとCD8細胞

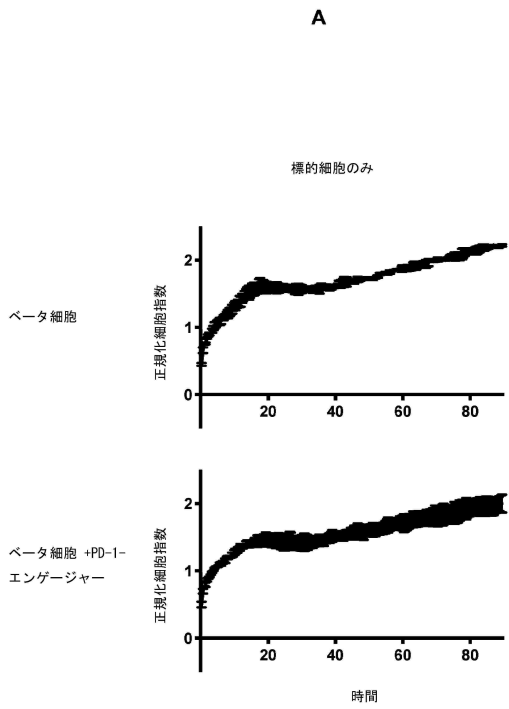


30

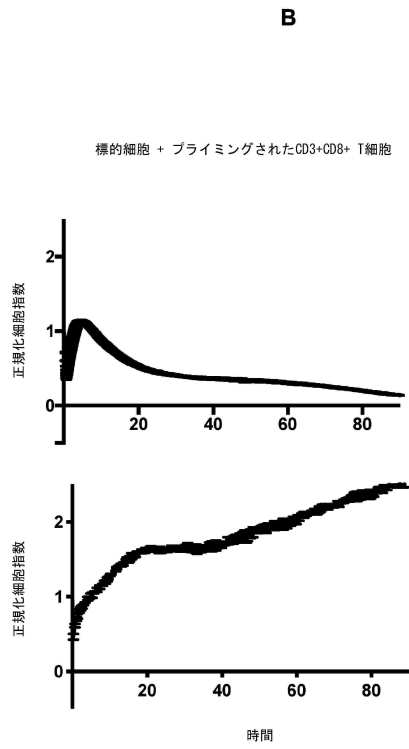
40

50

【 図 3 A 】



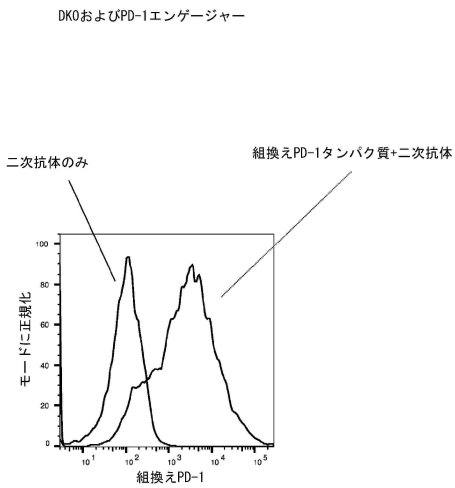
【 図 3 B 】



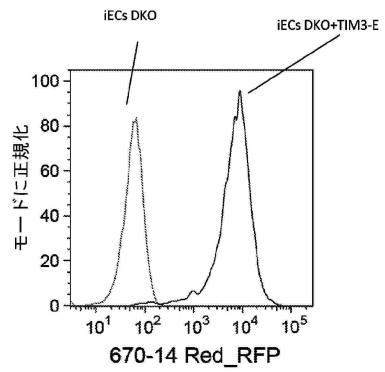
10

20

【 図 4 】



【 図 5 】

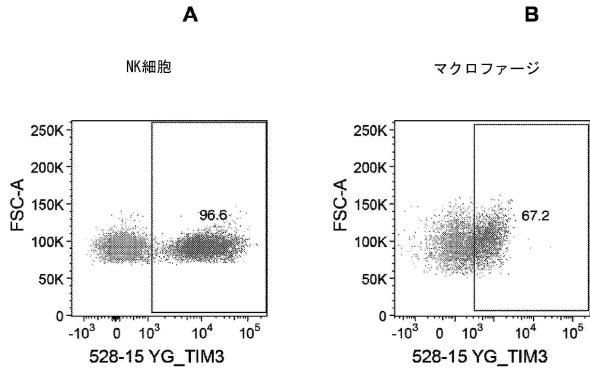


30

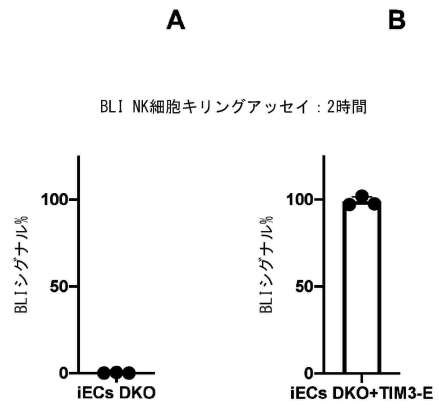
40

50

【 図 6 】

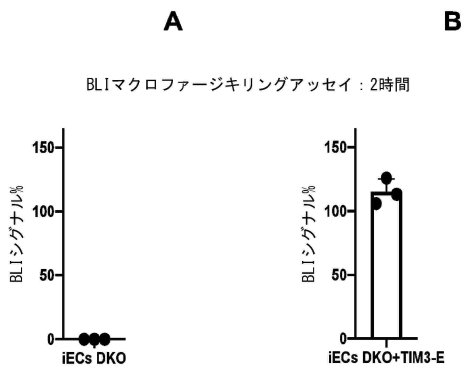


【 図 7 】

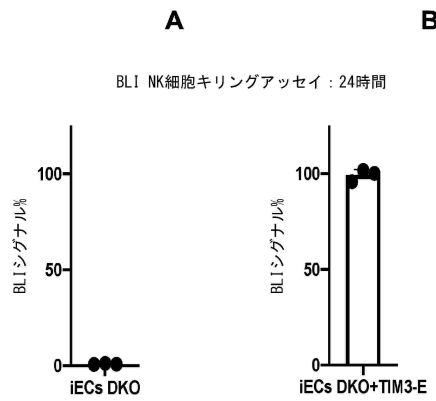


10

【 図 8 】



【 図 9 】



20

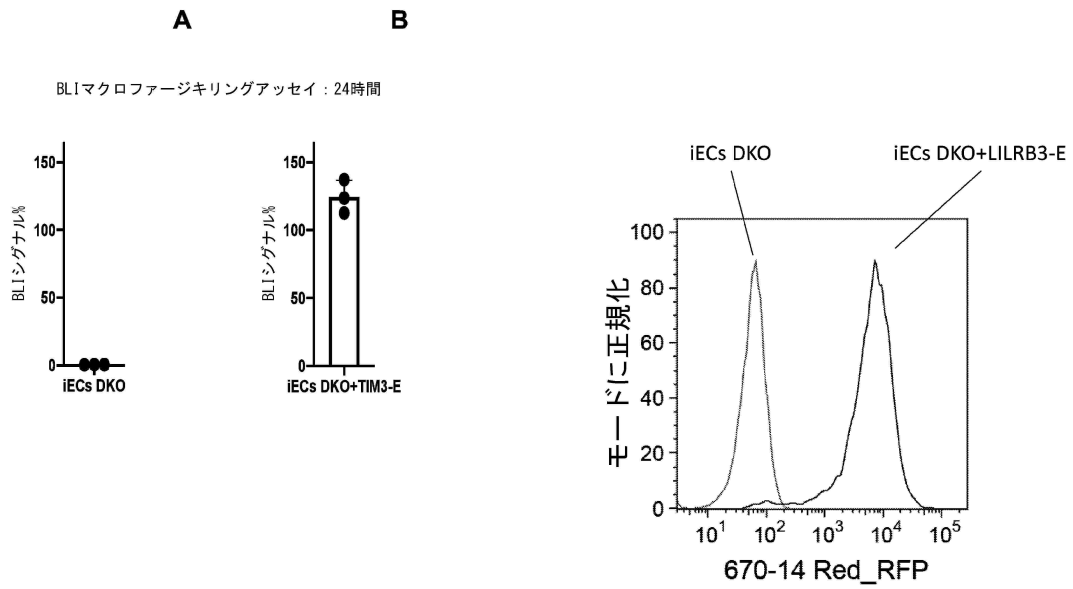
30

40

50

【 図 1 0 】

【 図 1 1 】

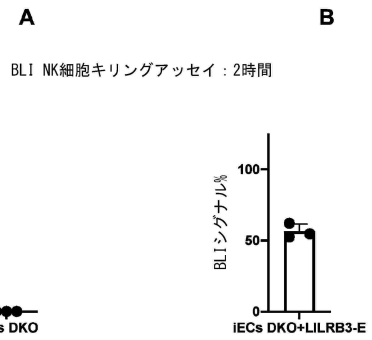
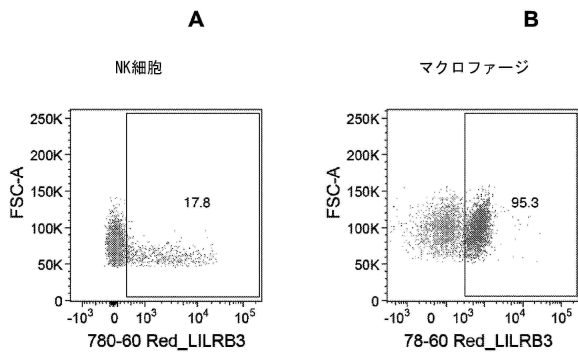


10

20

【 図 1 2 】

【 図 1 3 】

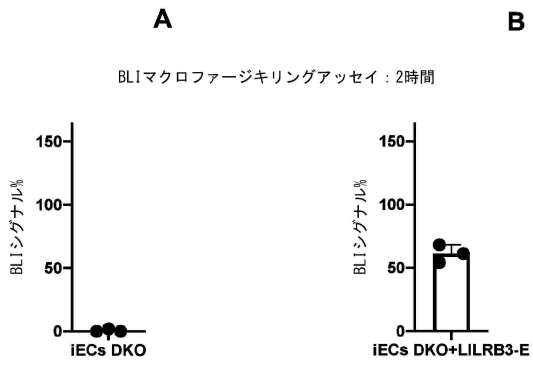


30

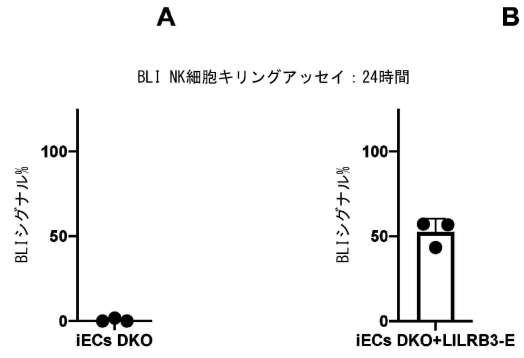
40

50

【 図 1 4 】

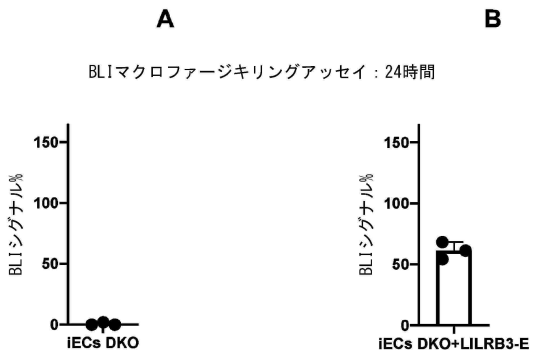


【 図 1 5 】

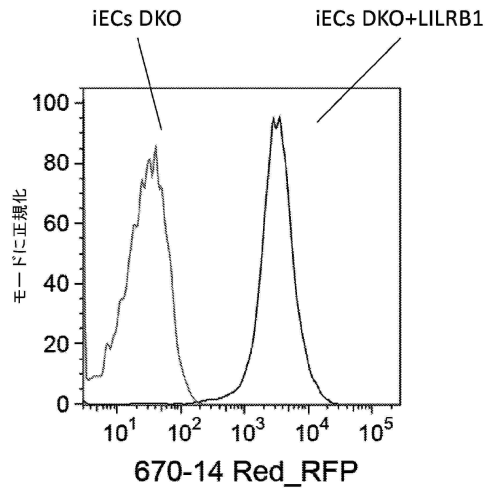


10

【 図 1 6 】



【 図 1 7 】



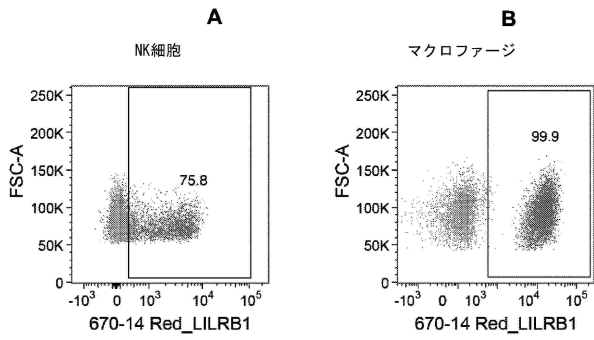
20

30

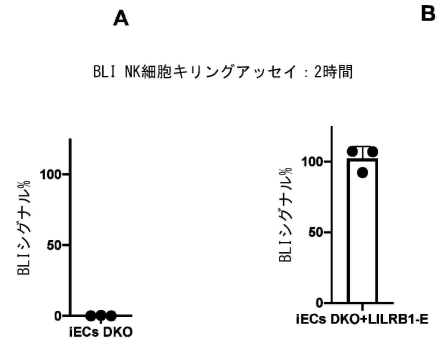
40

50

【 図 1 8 】

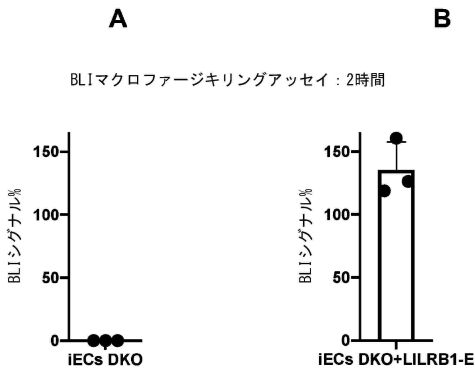


【 図 1 9 】

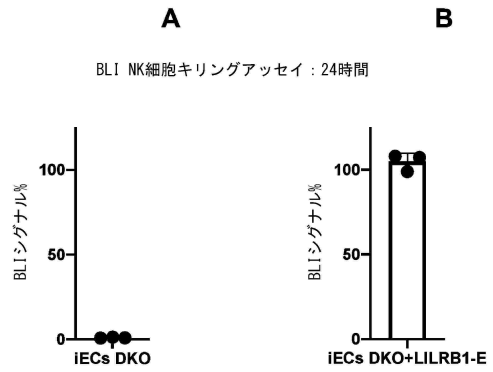


10

【 図 2 0 】



【 図 2 1 】



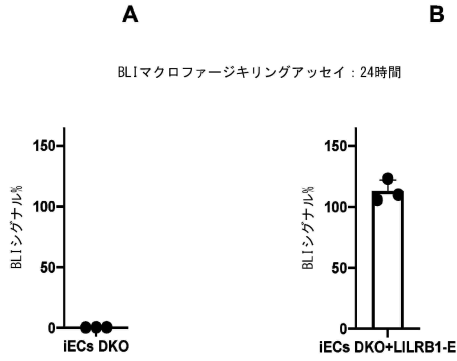
20

30

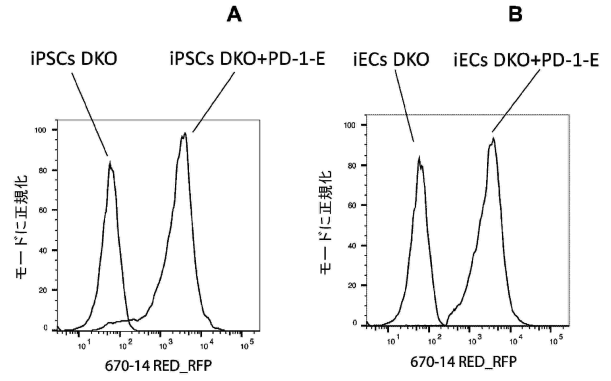
40

50

【 図 2 2 】



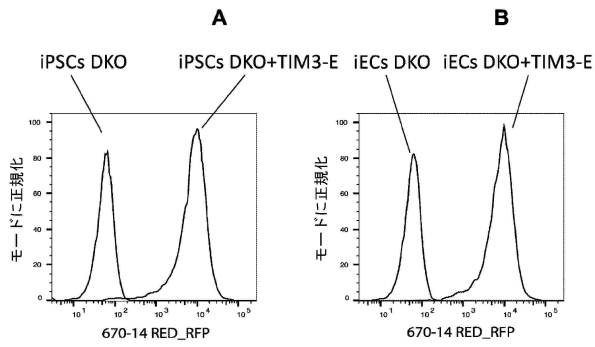
【 図 2 3 】



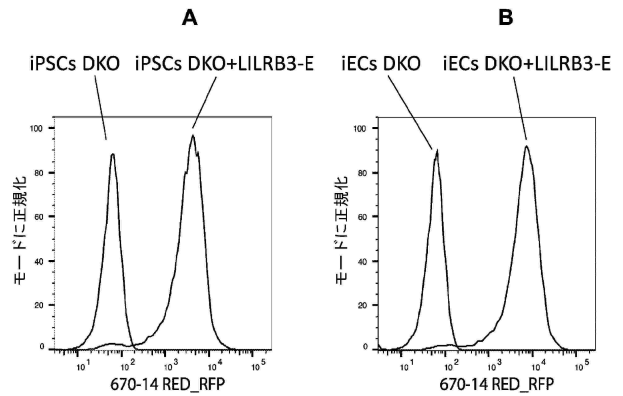
10

20

【 図 2 4 】



【 図 2 5 】

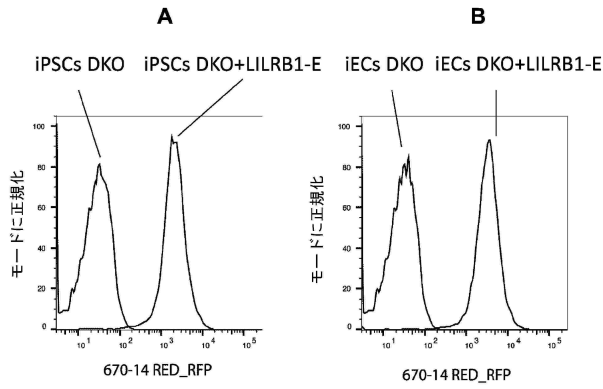


30

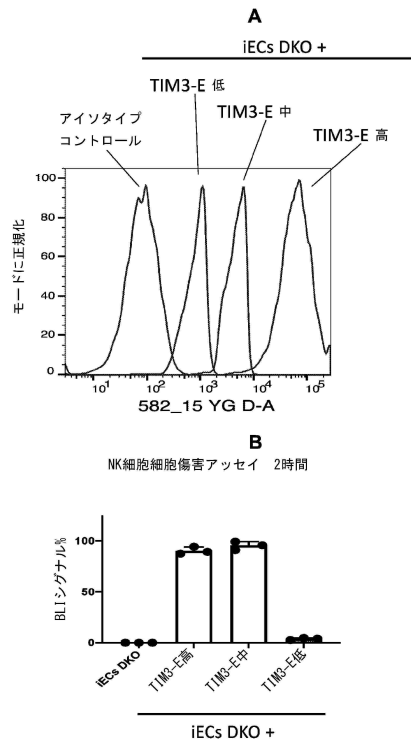
40

50

【 図 2 6 】



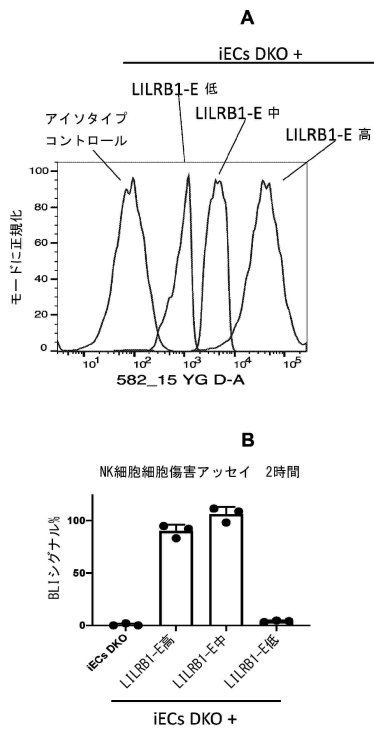
【 図 2 7 】



10

20

【 図 2 8 】



30

40

50

【配列表】

2025513879000001.xml

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US23/18189

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>	
IPC - INV. A61K 39/395; C07K 16/28 (2023.01) ADD. CPC - INV. A61K 39/395; A61K 39/39558; C07K 16/28  ADD. C07K 16/2818	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>	
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document	
Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used) See Search History document	
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
X — — A	US 2019/0270818 A1 (Eli Lilly and Company) 05 September 2019; paragraphs [0001], [0003], [0007], [0008], [0012]-[0015], [0077], [0087]; SEQ ID NOs: 2, 4
Y — A	WO 2016/146262 A1 (Amal Therapeutics SA) 22 September 2016; page 133, lines 24-29; page 167, lines 30-31
Y — A	US 2020/0299349 A1 (The Board of Trustees of the Leland Stanford Junior University) 24 September 2020; paragraphs [0043], [0105]; SEQ ID NO: 17
Y — A	US 2022/0049004 A1 (Gracell Biotechnologies Co., Ltd.) 17 February 2022; paragraphs [0067]; [0302]; Table 1; SEQ ID NO: 38
Y — A	US 2006/0084142 A1 (Heinrich, MC, et al.) 20 April 2006; paragraphs [0034], [0135], [0136], [0205]; SEQ ID NO: 12
A	WO 2018/148183 A1 (Memorial Sloan Kettering Cancer Center) 16 August 2018; abstract; paragraphs [0002], [0015]
Y —	Paluch, C et al. Immune Checkpoints as Therapeutic Targets in Autoimmunity. <i>Frontiers in Immunology</i> ; 08 October 2018; Vol. 9; Article 2306; pages 1-11; abstract; page 3, Table 1, first
	Relevant to claim No. 1 — 2-14, 16-19, 68 — 15 — 11-14, 16-19 — 15 — 12, 13 — 14 — 15 — 16, 17 — 15 — 2-14, 16-19, 68 —
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.	
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 15 August 2023 (15.08.2023)	Date of mailing of the international search report <b>SEP 11 2023</b>
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer <b>Shane Thomas</b> Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

10

20

30

40

50

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/US23/18189

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	column; page 3, first column, second paragraph; page 4, Table 3; page 5, first column, first paragraph	15

10

20

30

40

50

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US23/18189

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

- 1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed.
  - b.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),  
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
- 2.  -With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
- 3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US23/18189

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

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

- 1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
- 2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3.  Claims Nos.: 20-67, 69-71  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

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

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

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

20

30

Remark on Protest

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

40

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K	40/11	(2025.01)	A 6 1 K	40/11
A 6 1 K	40/15	(2025.01)	A 6 1 K	40/15
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10
A 6 1 P	9/04	(2006.01)	A 6 1 P	9/04
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	5/00	(2006.01)	A 6 1 P	5/00
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02
A 6 1 P	9/14	(2006.01)	A 6 1 P	9/14
A 6 1 K	35/34	(2015.01)	A 6 1 K	35/34
A 6 1 K	35/30	(2015.01)	A 6 1 K	35/30
A 6 1 K	35/39	(2015.01)	A 6 1 K	35/39
A 6 1 K	35/44	(2015.01)	A 6 1 K	35/44
A 6 1 K	40/33	(2025.01)	A 6 1 K	40/33
A 6 1 K	40/31	(2025.01)	A 6 1 K	40/31
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395
C 1 2 N	15/62	(2006.01)	A 6 1 K	39/395
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	A 6 1 K	39/395
C 0 7 K	14/705	(2006.01)	A 6 1 K	39/395
C 0 7 K	14/725	(2006.01)	C 1 2 N	15/62
C 1 2 N	5/0783	(2010.01)	C 0 7 K	19/00
C 1 2 N	5/0735	(2010.01)	C 0 7 K	16/28
			C 0 7 K	14/705
			C 0 7 K	14/725
			C 1 2 N	5/0783
			C 1 2 N	5/0735

N  
T  
D  
E  
U  
Z

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T R I T O N

弁理士 結城 仁美

(72)発明者

トバイアス デュース

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 6 0 7 オークランド フランクリン ストリート 1 1 1 1  
トゥエルフス フロア ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア内

F ターム (参考)

- 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 AC20 BA01 CA24 CA25 CA44
- 4C084 AA13 NA05 NA14 ZA02 ZA33 ZA36 ZA44 ZB07 ZB26 ZB27  
ZC02 ZC35
- 4C085 AA13 AA14 AA16 BB31 CC22 CC23 DD62 EE01
- 4C087 AA01 AA02 BB45 BB47 BB51 BB56 BB57 BB62 BB65 NA05  
NA14 ZA02 ZA33 ZA36 ZA44 ZB07 ZB26 ZB27 ZC02 ZC35
- 4H045 AA11 AA30 BA41 CA40 DA50 DA76 EA20 FA74

【要約の続き】

---

は、CD47、切断型CD47、LILRB1エンゲージャー、LILRB3エンゲージャー、およびTIM3エンゲージャーからなる群から選択される別の阻害性免疫細胞レセプターに結合するリガンドをさらに発現するPD-1エンゲージャー細胞である。