

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7236380号
(P7236380)

(45)発行日 令和5年3月9日(2023.3.9)

(24)登録日 令和5年3月1日(2023.3.1)

(51)国際特許分類	F I
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/09 100
C 12 N 5/10 (2006.01)	C 12 N 5/10
C 12 N 15/55 (2006.01)	C 12 N 15/55 Z N A
C 12 N 15/12 (2006.01)	C 12 N 15/12
C 12 N 15/62 (2006.01)	C 12 N 15/62 Z

請求項の数 24 (全195頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2019-520685(P2019-520685)	(73)特許権者	512213549
(86)(22)出願日	平成29年10月19日(2017.10.19)		セレクティス
(65)公表番号	特表2019-531742(P2019-531742)		C E L L E C T I S
	A)		フランス、75013 パリ、リュ ド ラ
(43)公表日	令和1年11月7日(2019.11.7)		クロワ ジヤリ 8
(86)国際出願番号	PCT/EP2017/076800		8 rue de la Croix Ja
(87)国際公開番号	WO2018/073393		rry, 75013 Paris, F
(87)国際公開日	平成30年4月26日(2018.4.26)	(74)代理人	rance
審査請求日	令和2年10月8日(2020.10.8)	(74)代理人	100102978
(31)優先権主張番号	62/410,187	(74)代理人	弁理士 清水 初志
(32)優先日	平成28年10月19日(2016.10.19)	(74)代理人	100102118
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	弁理士 春名 雅夫
(31)優先権主張番号	PA201770240	(74)代理人	100160923
(32)優先日	平成29年3月31日(2017.3.31)	(74)代理人	弁理士 山口 裕孝
	最終頁に続く	(74)代理人	100119507

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 治療に適したT A L エフェクターヌクレアーゼ (T A L E N) 改変同種異系細胞

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a)ヒト細胞に、

(i)操作されたヌクレアーゼがヒトTCRアルファ定常領域遺伝子内の認識配列の位置で切断を生じ、切断により検出不能なレベルまで -TCRの細胞表面発現の阻害がもたらされる、操作されたヌクレアーゼをコードする第1の核酸配列または操作されたヌクレアーゼタンパク質、

(ii)ゲノムTRACコード配列とインフレームの自己切断ペプチドをコードする核酸配列およびCARまたは組み換えTCRをコードする核酸配列を含む外因性ポリヌクレオチドを含む第2の核酸配列であって、該外因性ポリヌクレオチドがヌクレアーゼ切断部位における細胞ゲノムへの核酸配列の組み換えを促進する5'相同アームおよび3'相同アームをさらに含む、第2の核酸配列

を導入する段階

を含み、

該外因性ポリヌクレオチドの配列が該切断部位で該ヒトTCRアルファ定常領域遺伝子に挿入され、該自己切断ペプチドが2Aペプチド、2A様ペプチド、P2Aペプチド、E2Aペプチド、およびF2Aペプチドから選択され、かつさらに非改変対照細胞と比較した場合に、エンドヌクレアーゼ改変細胞が内因性TCRの細胞表面発現を低減させる、生体外においてエンドヌクレアーゼ改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を產生するための方法。

【請求項 2】

自己切断ペプチドが2Aペプチドである、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

2Aペプチドが配列GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP、GSGATNFSLKQAGDVEENPGP、またはGSGQCTNYALLKLAGDVESNPGPである、請求項2記載の方法。

【請求項 4】

エンドヌクレアーゼ誘導性オンサイトおよびオフサイトを検出する段階をさらに含む、請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5】

操作されたヌクレアーゼが、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALE-ヌクレアーゼ)、CRISPR/Casヌクレアーゼ、またはmegaTALヌクレアーゼである、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。 10

【請求項 6】

操作されたヌクレアーゼがTALE-ヌクレアーゼである、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

【請求項 7】

外因性ポリヌクレオチドが、キメラ抗原受容体をコードする核酸配列を含む、請求項1～6のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8】

キメラ抗原受容体が、細胞外リガンド結合ドメインおよび1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、請求項1～7のいずれか一項記載の方法。 20

【請求項 9】

少なくとも第2の核酸配列が、該第2の核酸配列を含む組み換えアデノ随伴ウイルス(AAV6)ベクターと細胞を接触させることにより該細胞に導入される、請求項1～7のいずれか一項記載の方法。

【請求項 10】

組み換えAAVベクターが自己相補的AAVベクターである、請求項9記載の方法。

【請求項 11】

組み換えAAVベクターが少なくとも部分的にAAV6に由来する自己相補的AAVベクターである、請求項9記載の方法。 30

【請求項 12】

TALE-ヌクレアーゼが、野生型ヒトTCRアルファ定常領域中の配列ttgtcccacagATATCを認識する、請求項6記載の方法。

【請求項 13】

エンドヌクレアーゼが、

5'から3'方向に

TGCTGTGGCCTGGAGCAAC および GACTTGCATGTGCA

を認識しつつAAATCT内で切断するジンクフィンガー；以下の配列：

AGAGTCTCTCAGCTGGTACA, GCACCAAAGCTGCCCTTACC, AAGTCCCTGTGATGTCAAGC, TTGCG- 40

GAACCCAATCACTGAC, GATTAAACCCGGCCACTTTC, CGTCATGAGCAGATTAAACC,

CTCAAGGTTAGATCAGAAG, TAGGCAGACAGACTTGTAC, AACAAATGTGTACAAAGTA, CACCAAA-

GCTGCCCTTACCT, CTGACAGGTTTGAAAGTT, TTCAAAACCTGTCAGTGATT,

CCGAATCCTCCTCTGAAAG, CCACCTTCAGGAGGAGGATT, TAAACCCGGCCACTTCAGG,

TCTCAAACAAATGTGTACAAAGTA, CTTACAATCTTGCAGATCTGGAATG, TTAATCTGCTCATGACGCTG,

GGAGAAGAGGGGCAATGCAG, TCTTCTCCCTCTCCAAACAG, AGCAGCTTCACCTCCTTGG, GTAG-CAGCTTCACCTCCTT, AGTTGGTGGCATTGCCGGGG, TCTGTGATATAACATCAGAATC, TCTGTGATAACACATCAGAATCC, GAGTCTCTCAGCTGGTACACGGC, GAGTCTCTCAGCTGGTACACGGCA, ATTCTCAAACAAATGTGTCACAA, ATTCTCAAACAAATGTGTCACAAA, GTCTGTGATATAACACATCAGAAT, GTCTGTGATATAACACATCAGAATC, GAGAATCAAATCGGTGAATAGG, TGTGCTAGACATGAGGTCTATGG , 10 TCAGGGTTCTGGATATCTGTGGG, GTCAGGGTTCTGGATATCTGTGG, AAAGTCAGATTGTTGCTCCAGG, AACAAATGTGTCACAAAGTAAGG, TGGATTAGAGTCTCTCAGCTGG, TAGGCAGACAGACTTGTCACTGG, AGCTGGTACACGGCAGGGTCAGG, GCTGGTACACGGCAGGGTCAGGG, TCTCTCAGCTGGTACACGGCAGG, AGAGTCTCTCAGCTGGTACACGG, CTCTCAGCTGGTACACGGCAGGG, ACAAAACTGTGCTAGACATGAGG, ATTTGTTGAGAATCAAATCGG, TGGAATAATGCTGTTGAAGG, AGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGG, 20 CTTCTCCCCAGCCCAGGTAAGG, ACACGGCAGGGTCAGGGTCTGG, CTTCAAGAGAACAGTGCTGTGG, CTGGGGAAGAAGGTGTCTTCTGG, TTCTCCCCAGCCCAGGTAAGGG, CTTACCTGGCTGGGAAGAAGG, GACACCTTCTCCCCAGCCCAGG, TTCAAAACCTGTCAGTGATTGGG, CGTCATGAGCAGATTAAACCCGG, TTCGGAACCCAATCACTGACAGG, TAAACCCGGCCACTTCAGGAGG, TTTCAAAACCTGTCAGTGATTGG, GATTAAACCCGGCCACTTCAGG, CTCGACCAGCTGACATCACAGG, AAGTTCTGTGATGTCAAGCTGG ,ATCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGG, TGCTCATGACGCTGCGGCTGTGG, CATCACAGGAACCTTCTAAAAGG, 30 GTCGAGAAAAGCTTGAAACAGG, CCACTTCAGGAGGAGGATTGG, CTGACAGGTTTGAAAGTTAGG, AGCTTGAAACAGGTAAGACAGG, CTGTTGGTCCAGCTGAGGTGAGGG, CTGCGGCTGTGGTCCAGCTGAGG, TGTGGTCCAGCTGAGGTGAGGGG, TCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGG, TTAATCTGCTCATGACGCTGCGG, ACCCGGCCACTTCAGGAGGAGG, GCTGTGGTCCAGCTGAGGTGAGG, CCGAATCCTCCTGAAAGTGG のいずれか1つに相補的な配列を認識するCrispr/Cas 9 ; MegaTAL ; 野生型ヒトTCRアルファ定常領域の残基番号93～208内の認識配列を認識かつ切断するメガヌクレアーゼであり、

組み換えメガヌクレアーゼが第1サブユニットおよび第2サブユニットを含み、該第1サブユニットが、該認識配列の第1の認識半部位に結合しつつ第1の超可変(HVR1)領域を含み、かつ該第2サブユニットが、該認識配列の第2の認識半部位に結合しつつ第2の超可変(HVR2)領域を含む、請求項5記載の方法。

【請求項14】

メガヌクレアーゼが、リンカーを含む一本鎖メガヌクレアーゼであり、該リンカーが第1サブユニットおよび第2サブユニットを共有結合する、請求項13記載の方法。

【請求項15】

請求項1～14のいずれか一項記載の方法によって取得可能なエンドヌクレアーゼ改変内

10

20

30

40

50

因性 -TCR陰性ヒト細胞。

【請求項 16】

TALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞であって、ヒトゲノムTCR遺伝子(ヒトゲノムTRAC遺伝子)の定常領域が、TALENにより生成されかつ内因性アルファベータTCRの細胞表面発現に影響を与える遺伝子改変を含み、該ヒトゲノムTRAC遺伝子が5'から3'方向に、

(a) 該ヒトゲノムTRAC遺伝子上流の5'領域、

(b) TALEN用の第1の認識ドメイン、

(c) アルファベータTCRの細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインの細胞表面発現に影響を与える挿入であって、TRACオープンリーディングフレームとインフレームの自己切断ペプチドをコードする配列、キメラ抗原受容体(CAR)または組み換えTCRをコードする配列、および終結配列を含む外因性ポリヌクレオチドを含む、挿入

(c') 任意で第2のTALEN認識ドメイン、および

(d) 該ヒトゲノムTRAC遺伝子の3'領域、

を含み、

該自己切断ペプチドが2Aペプチド、2A様ペプチド、P2Aペプチド、E2Aペプチド、およびF2Aペプチドから選択される、TALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞。

【請求項 17】

自己切断ペプチドが2Aペプチドである、請求項16記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞。

【請求項 18】

2Aペプチドが配列GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP、GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP、またはGSGQCTNYALLKLAGDVESNPGPである、請求項17記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞。

【請求項 19】

第1の認識ドメインが配列ttgtcccacagATATCを含む、請求項16～18のいずれか一項記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞。

【請求項 20】

CARまたは組み換えTCRが抗原結合ドメインを含み、該抗原結合ドメインがCD19分子(CD19); 膜貫通4-ドメインA1(CD20としても知られるMS4A1); CD22分子(CD22); CD24分子(CD24); CD248分子(CD248); CD276分子(CD276またはB7H3); CD33分子(CD33); CD38分子(CD38); CD44v6; CD70分子(CD70); CD72; CD79a; CD79b; インターロイキン3受容体サブユニット(CD123としても知られるIL3RA); TNF受容体スーパー-ファミリーメンバー8(CD30としても知られるTNFRSF8); KITがん原遺伝子受容体チロシンキナーゼ(CD117); V-setプレB細胞代替軽鎖1(VPREB1またはCD179a); 接着Gタンパク質共役受容体E5(ADGRE5またはCD97); TNF受容体スーパー-ファミリーメンバー17(BCMAとしても知られるTNFRSF17); SLAMファミリーメンバー7(CS1としても知られるSLAMF7); L1細胞接着分子(L1CAM); C型レクチンドメインファミリーメンバーA(CL-L-1としても知られるCLEC12A); 上皮増殖因子受容体の腫瘍特異的変種(EGFRvIII); 甲状腺刺激ホルモン受容体(TSHR); Fms様チロシンキナーゼ3(FLT3); ガングリオシドGD3(GD3); Tn抗原(Tn Ag); リンパ球抗原6ファミリーメンバーG6D(LY6G6D); デルタ様標準Notchリガンド3(DLL3); インターロイキン13受容体サブユニット-2(IL-13RA2); インターロイキン11受容体サブユニット(IL11RA); メソテリン(MSLN); 受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1(ROR1); 前立腺幹細胞抗原(PSCA); erb-b2受容体チロシンキナーゼ2(ERBB2またはHer2/neu); プロテアーゼセリン21(PRSS21); キナーゼ挿入ドメイン受容体(VEGFR2としても知られるKDR); ルイスY抗原(LewisY); 溶質輸送体ファミリー-39メンバー6(SLC39A6); 線維芽細胞活性化タンパク質(FAP); Hsp70ファミリーシャペロン(HSP70); 血小板由来増殖因子受容体(PDGFR-beta); ニコチン様コリン作動性受容体2サブユニット(CHRNA2); 時期特異的胚抗原-4(SSEA-4); ムチン1、細胞表面結合(MUC1); ムチン16、細胞表面結合(MUC16); クローディン18(CLDN18); クローディ

10

20

30

40

50

ン6(CLDN6); 上皮増殖因子受容体(EGFR); 黒色腫において選択的に発現される抗原(PRA ME); 神経細胞接着分子(NCAM); ADAMメタロペプチダーゼドメイン10(ADAM10); 葉酸受容体1(FOLR1); 葉酸受容体(FOLR2); 炭酸脱水酵素IX(CA9); プロテアソームサブユニット9(PSMB9またはLMP2); エフリン受容体A2(EphA2); テトラスパニン10(TSPA N10); フコシルGM1(Fuc-GM1); シアリルルイス接着分子(sLe); TGS5; 高分子量黒色腫関連抗原(HMWMAA); o-アセチル-GD2ガングリオシド(OAcGD2); 腫瘍内皮マーカー7関連(TEM7R); Gタンパク質-共役受容体クラスCグループ5、メンバーD(GPRC5D); 染色体Xオープンリーディングフレーム61(CXORF61); ALK受容体チロシンキナーゼ(ALK); ポリシアル酸; 胎盤特異的1(Placenta-specific 1; PLAC1); globoHグリコセラミド(GloboH)の六糖部分; NY-BR-1抗原; ワロプラキン2(UPK2); ヘパタイティスAウイルス細胞受容体1(HAVCR1); アドレナリン受容体3(ADRB3); パンネキシン3(PANX3); Gタンパク質-共役受容体20(GPR20); リンパ球抗原6ファミリーメンバーK(LY6K); 嗅覚受容体ファミリー51サブファミリーEメンバー2(OR51E2); TCRガンマ代替リーディングフレームタンパク質(TARP); ウィルムス腫瘍タンパク質(WT1); 12;21染色体転座によるETV6-A ML1融合タンパク質(ETV6-AML1); 精子自己抗原タンパク質17(SPA17); X抗原ファミリー、メンバー1E(XAGE1E); TEK受容体チロシンキナーゼ(Tie2); 黒色腫がん精巣抗原1(MAD-CT-1); 黒色腫がん精巣抗原2(MAD-CT-2); Fos関連抗原1; p53変異体; ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT); 肉腫転座切断点; アポトーシスの黒色腫阻害物質(ML-IAP); ERG(膜貫通プロテアーゼ、セリン2(TMPRSS2)ETS融合遺伝子); N-アセチルグルコサミルトランスフェラーゼV(NA17); ペアボックスタンパク質Pax-3(PAX3); アンドロゲン受容体; サイクリンB1; v-mycトリ骨髄細胞腫ウイルスがん遺伝子神経芽腫由来ホモログ(MYCN); RasホモログファミリーメンバーC(RhoC); シトクロムP450 1B 1(CYP1B1); CCTC結合因子(ジンクフィンガータンパク質)様(BORIS); T細胞によって認識される扁平上皮がん抗原3(SART3); ペアボックスタンパク質Pax-5(PAX5); プロアクロシン結合タンパク質sp32(OY-TES1); リンパ球特異的タンパク質チロシンキナーゼ(LCK); Aキナーゼアンカータンパク質4(AKAP-4); 滑膜肉腫、X切断点2(SSX2); 白血球関連免疫グロブリン様受容体1(LAIR1); IgA受容体のFc断片(FCAR); 白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリーAメンバー2(LILRA2); CD300分子様ファミリーメンバーf(CD300LF); 骨髄間質細胞抗原2(BST2); EGF様モジュール含有ムチン様ホルモン受容体様2(EMR2); リンパ球抗原75(LY75); グリピカン-3(GPC3); Fc受容体様5(FCRL5); 免疫グロブリンラムダ様ポリペプチド1(IGLL1)、および熱ショックタンパク質70(HSP70)からなる群より選択される腫瘍抗原に結合する、請求項16～19のいずれか一項記載のTALEN改变内因性-TCR陰性ヒト初代細胞。
10

【請求項21】

組み換えTCRが抗原結合ドメインを含み、該抗原結合ドメインが疾患に関連する腫瘍抗原に結合し、かつ該腫瘍抗原がPCTA-I/ガレクチン8、CD171、TAG72、CEA、EPCAM、PSCA、PRSS21、PDGFR-ベータ、プロスター(Prostase)、PAP、ELF2M、エフリンB2、IGF-I受容体、CAIX, gp100、bcr-abl、チロシナーゼ、GM3、NY-ESO-1、LAG E-1a、MAGE-A1、レグマイン、HPV E6,E7、MAGE AI、プロステイン、サバイビンおよびテロメラーゼ、PCTA-I/ガレクチン8、MelanA/MART1、Ras変異体、TRP-2、RAGE-1、RU1、RU2、ならびに腸管カルボキシルエステラーゼからなる群より選択される、請求項16～19のいずれか一項記載のTALEN改变内因性-TCR陰性ヒト初代細胞。
20

【請求項22】

CARが疾患に関連する腫瘍抗原に結合する抗原結合ドメインを含み、かつ該腫瘍抗原がCD22、CD123、CS-1、CLL-1、CD38、HSP70、MUC-1、CD30、FAP、HER2、CD79aおよびCD79bからなる群より選択される、請求項16～19のいずれか一項記載のTALEN改变内因性-TCR陰性ヒト初代細胞。
30

【請求項23】

外因性ポリヌクレオチドが、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10またはSEQ ID NO:11と少なくとも95%の同一性を有する、抗CD22 CARをコードする配列を含む、請求項16～19

のいすれか一項記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞。

【請求項 24】

外因性ポリヌクレオチドが、SEQ ID NO:12と少なくとも95%の同一性を有する、抗CD 123 CARをコードする配列を含む、請求項16～19のいすれか一項記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、免疫療法、分子生物学および組み換え核酸技術の分野に関する。特に、本発明は、少なくとも、5'から3'方向に、自己切断ペプチド、キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドを含む挿入を有する改変ヒトT細胞受容体アルファ遺伝子を、そのゲノム中に含むTALEN改変ヒト初代細胞に関し、該細胞は、TCR陽性対照細胞と比較して内因性アルファベータT細胞受容体の検出不能な細胞表面発現を有し、かつ病理学的細胞を標的とする受容体を発現し、がんを含む疾患を処置するための該細胞の使用に関する。本発明はさらに、そのようなTALEN改変細胞を産生するための方法に関し、かつそのような操作されたヒト初代細胞または代替のおよび/もしくは追加のレアカット(rare-cutting)エンドヌクレアーゼを用いて得られる他の遺伝子改変ヒト初代細胞を検出するための手段に関する。

10

【背景技術】

20

【0002】

発明の背景

T細胞養子免疫療法は、がん処置のための有望な手法である。この戦略は遺伝的に改変されている、患者自身から通常得られる、単離されたヒトT細胞を利用して特定の腫瘍関連抗原に対するその特異性を増強する。遺伝子改変は、キメラ抗原受容体のまたは外因性T細胞受容体の発現、がん細胞による細胞溶解活性の阻害を防ぐための、特定の細胞表面タンパク質の不活性化、細胞を薬物に対して感受性または耐性にする遺伝子改変を含みうる。

【0003】

外因性T細胞受容体とは対照的に、キメラ抗原受容体はモノクローナル抗体の可変ドメインからその特異性を引き出す。したがって、キメラ抗原受容体を発現するT細胞(CAR T細胞)は、主要組織適合性遺伝子複合体に制限されない方法で腫瘍免疫反応性を誘導する。今日まで、T細胞養子免疫療法は、B細胞悪性腫瘍(例えば、急性リンパ球性白血病(ALL)、B細胞非ホジキンリンパ腫(NHL)、および慢性リンパ性白血病)、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫、神経膠芽腫、進行神経膠腫、卵巣がん、中皮腫、黒色腫、および肺臓がんを含む、いくつかのがんの臨床治療として利用されている。

30

【0004】

CAR T細胞による養子免疫療法は、がん処置としてのその潜在的な有用性にもかかわらず、一部には、細胞表面上の内因性T細胞受容体の発現によって制限されてきた。内因性T細胞受容体を発現するCAR T細胞は、同種異系患者への投与後に主要組織適合抗原および副組織適合抗原を認識する可能性があり、これが移植片対宿主病(GVHD)の発症につながりうる。結果として、臨床試験は、患者のT細胞が単離され、キメラ抗原受容体を組み込むように遺伝子改変され、次いで同じ患者に再注入される自己CAR T細胞の使用に主に焦点を合わせてきた。自己移植の手法は投与されたCAR T細胞に免疫寛容を提供する; しかしながら、この手法は、患者のがんが診断された後に患者特異的CAR T細胞を産生するのに必要な時間と費用の両方によって制約を受ける。

40

【0005】

したがって、内在性T細胞受容体の発現が低減しまたはより良くは、内在性T細胞受容体の発現がなく、投与時にGVHDを起こさない、第三者ドナーからの細胞を用いて調製された「市販のCAR T細胞」またはいわゆる「同種異系CAR T細胞」またはユニバーサルCAR

50

T (UCART)が調製されている。

【0006】

(健常ドナーから単離された)初代T細胞におけるTCRの細胞表面発現を低減または排除するため、さまざまな方法が使用された。

【0007】

ゲノムDNAの遺伝子改変は、関心対象の遺伝子座におけるDNA配列を認識するように操作されている部位特異的なレアカットエンドヌクレアーゼを用いて実施することができる。操作された部位特異的エンドヌクレアーゼを産生するための方法は、当技術分野において公知である。例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)は、ゲノム中の所定の部位を認識かつ切断するように操作することができる。ZFNは、FokI制限酵素のヌクレアーゼドメインに融合したジンクフィンガーDNA結合ドメインを含むキメラタンパク質である。ジンクフィンガードメインを合理的または実験的手段により再デザインして、長さが約18塩基対の所定のDNA配列に結合するタンパク質を産生することができる。この操作されたタンパク質ドメインをFokIヌクレアーゼに融合することにより、ゲノムレベルの特異性でDNA切断を標的とすることが可能である。ZFNは、広範囲の真核生物における遺伝子の付加、除去、および置換を標的とするために広く使用してきた(Durai et al. (2005), Nucleic Acids Res 33, 5978に概説されている)。同様に、TAL-エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)は、ゲノムDNAにおける特定の部位を切断するように生成することができる。ZFNと同様に、TALENは、FokIヌクレアーゼドメインに融合した操作された部位特異的DNA結合ドメインを含む(Mak et al. (2013), Curr Opin Struct Biol. 23:93-9に概説されている)。この場合、DNA結合ドメインはタンデムアレイのTALエフェクタードメインを含み、その各々は単一のDNA塩基対を特異的に認識する。したがって、TALENはヘテロ二量体であるため、細胞内での単一の機能的ヌクレアーゼの産生は、2つのタンパク質の同時発現を必要とし、それを他の技法よりも標的遺伝子座に対してより信頼性が高く特異的にする(測定されるオフサイトが少ない)。コンパクトTALENは、代替のエンドヌクレアーゼ構造を有する(Beurdeley et al. (2013), Nat Commun. 4: 1762)。コンパクトTALENは、I-TevIホーミングエンドヌクレアーゼからのヌクレアーゼドメインに融合した、操作された部位特異的TALエフェクターDNA結合ドメインを含む。FokIとは異なり、I-TevIは二本鎖DNA切断をもたらすために二量体化する必要がないため、コンパクトTALENは単量体として機能的である。

【0008】

CRISPR/Cas9システムに基づく操作されたエンドヌクレアーゼも当技術分野において公知である(Ran et al. (2013), Nat Protoc. 8:2281-2308; Mali et al. (2013), Nat Methods 10:957-63)。CRISPRエンドヌクレアーゼは、2つの成分: (1) CRISPR関連Protein9、典型的には微生物Cas9; および(2) ヌクレアーゼをゲノム内の関心対象の位置に向ける20ヌクレオチドのターゲティング配列を含む短い「ガイドRNA」を含む。各々が異なるターゲティング配列を有する複数のガイドRNAを同じ細胞内で発現させることにより、ゲノム内の複数の部位にDNA切断を同時に標的とすることができる。CRISPR/Cas9システムの主な欠点は、その報告された高頻度のオフターゲットDNA切断であり、これはヒト患者を処置するためのシステムの有用性を制限しうる(Fu et al. (2013), Nat Biotechnol. 31 :822-6)。

【0009】

ホーミングエンドヌクレアーゼは、植物および真菌のゲノムに一般的に見られる15~40塩基対の切断部位を認識する天然に存在するヌクレアーゼの群である。それらはグループ1自己スプライシングイントロンおよびインテインのような、寄生DNA要素と高い頻度で関連している。それらは、染色体中に二本鎖切断を生じさせることによって宿主ゲノム中の特定の位置で相同組み換えまたは遺伝子挿入を自然に促進し、これによって細胞DNA修復機構が動員される(Stoddard (2006), Q. Rev. Biophys. 38: 49-95)。ホーミングエンドヌクレアーゼは一般に4つのファミリー: LAGLIDADGファミリー、GIY-YIGファミリー、His-CysボックスファミリーおよびHNHファミリーに分類される。これらのファミ

10

20

30

40

50

リーは、触媒活性および認識配列に影響を与える構造モチーフによって特徴付けられる。例えば、LAGLIDADGファミリーのメンバーは、1または2コピーの保存されたLAGLIDADGモチーフを有することによって特徴付けられる(Chevalier et al. (2001), Nucleic Acids Res. 29(18): 3757-3774を参照のこと)。單一コピーのLAGLIDADGモチーフを有するLAGLIDADGホーミングエンドヌクレアーゼはホモ二量体を形成し、一方で2コピーのLAGLIDADGモチーフを有するメンバーは単量体として見出される。

【0010】

I-CreIは、藻類緑藻クラミドモナス(*Chlamydomonas reinhardtii*)の葉緑体染色体中の22塩基対認識配列を認識かつ切断する、ホーミングエンドヌクレアーゼのLAGLIDADGファミリーのメンバーである。遺伝的選択技法を用いて野生型I-CreI切断部位選択性を改変している(Sussman et al. (2004), J. Mol. Biol. 342: 31-41; Chames et al. (2005), Nucleic Acids Res. 33: e178; Seligman et al. (2002), Nucleic Acids Res. 30: 3870-9, Arnould et al. (2006), J. Mol. Biol. 355: 443-58)。哺乳動物、酵母、植物、細菌、およびウイルスゲノム中の部位を含む、広範に異なるDNA部位を標的とするためにI-CreIおよび他のホーミングエンドヌクレアーゼを包括的に再デザインすることができるモノLAGLIDADGホーミングエンドヌクレアーゼを合理的にデザインする方法が記載された(WO 2007/047859)。

【0011】

WO 2009/059195に最初に記載されているように、I-CreIおよびその操作された誘導体は通常二量体であるが、しかし第1サブユニットのC末端を第2サブユニットのN末端に結合する短いペプチドリンクナーを用いて單一のポリペプチドに融合することができる(Li et al. (2009), Nucleic Acids Res. 37: 1650-62; Grizot et al. (2009), Nucleic Acids Res. 37:5405-19)。したがって、機能的「一本鎖」メガヌクレアーゼは單一の転写産物から発現することができる。ヒトT細胞受容体アルファ定常領域においてDNA標的を切断するための操作されたメガヌクレアーゼの使用は、以前に開示されていた(WO 2014/191527)。WO 2014/191527には、TCRアルファ定常領域遺伝子のエクソン1内の認識配列を標的とするように操作されたI-OnuIメガヌクレアーゼの変種が開示されている。WO 2014/191527号公報には、キメラ抗原受容体がTCRノックアウト細胞において発現されうることが論じられているが、著者らは、キメラ抗原受容体コード配列のTCRアルファ定常領域遺伝子中のメガヌクレアーゼ切断部位への挿入について開示していない。

【0012】

内因性TCRの発現を妨害するための他のヌクレアーゼおよび機構の使用も開示されている。例えば、ヒトT細胞中のTCR遺伝子を破壊するためのジンクフィンガーヌクレアーゼの使用は米国特許第8,95,828号および米国特許出願公開第US2014/034902号によって記載された。米国特許出願公開第US2014/0301990号には、ジンクフィンガーヌクレアーゼおよび転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)の使用、ならびに単離されたT細胞におけるTCR遺伝子を標的とするための操作された單一ガイドRNAを伴うCRISPR Casシステムの使用が記載されている。米国特許出願公開第US2012/0321667号には、T細胞中の特定のTCRおよび/またはCD3鎖をコードする核酸を標的とする小型ヘアピンRNAの使用が開示されている。

【0013】

同様に、WO2017062451、WO2015057980、WO2017106528、またはUS7910332 B2には、さまざまな遺伝子編集ツール、特にCrispr/cas 9システム、またはT細胞受容体遺伝子(TRAC遺伝子)の定常領域のさまざまな配列を標的とするメガヌクレアーゼを用いて得られるTCR陰性T細胞が記載されている。

【0014】

各タイプのエンドヌクレアーゼは、最適化された条件において用いられる場合、DNAの二本鎖切断を生じ、挿入部位の新たなDNA配列または欠失のいずれかが生成される。さらに、オフターゲット遺伝子変更の頻度は、使用されるエンドヌクレアーゼに直接関係し、使用されるエンドヌクレアーゼによって結合および切断されるTRAC遺伝子の配列に直接

10

20

30

40

50

関係し、最終製品は医薬として多かれ少なかれ信頼性が高められる。

【0015】

特に免疫療法のため、既製品を、より安定した遺伝子改変で、より少ないオフサイトで、かつ操作された細胞を検出し、そのような製品の品質を測定し、それらの完全性および安定性を同定する手段で提供することが依然として必要とされている。

【0016】

本発明者らは、TCRをコードする遺伝子へのTALEN媒介性の特異的挿入により、CD123またはCD22を標的とするCARが細胞表面に発現されることおよびガイド配列技法によって測定された場合に検出未満のTALEN誘導性のオフサイト標的を可能にするTALEN改変ヒト初代細胞を教示する最初のものである。それらはまた、特にオンサイトおよびオフサイト切断でTCRを切断するようにデザインされた他のエンドヌクレアーゼを用いて操作された細胞よりも、そのような遺伝子改変ヒト初代細胞を検出する手段および方法を報告する最初のものである。

10

【発明の概要】

【0017】

本発明は、ゲノムTCR遺伝子(TRAC遺伝子)の定常領域が、TALENにより生成されかつ内因性アルファベータTCRの細胞表面発現に影響を与える遺伝子改変を含み、該ゲノムTRAC遺伝子が5'から3'方向に、

- (a) 該ヒトゲノムTRAC遺伝子上流の5'領域、
- (b) TALEN用の認識ドメイン、

(c) アルファベータTCRの細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインの細胞表面発現に影響を与える野生型TRAC遺伝子と比較したギャップまたは挿入であって、挿入が、終止コドン、IRES、TRACオープンリーディングフレームとインフレームの自己切断ペプチドをコードする配列のようなコード配列、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする配列、TCRをコードする配列、薬物に対する感受性を付与するタンパク質をコードする配列、薬物に対する耐性を付与するタンパク質をコードする配列、サイトカイン、終結配列、それらの組み合わせのような非コード配列から選択される外因性ポリヌクレオチドを含む、ギャップまたは挿入、

- (c') 任意で第2のTALEN認識ドメイン、
- (d) ゲノムTRAC遺伝子の3'領域

を含む、TALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。

20

【0018】

本発明は、ゲノムTCR遺伝子(TRAC遺伝子)の定常領域が、TALENにより生成されかつ内因性アルファベータTCRの細胞表面発現に影響を与える遺伝子改変を含み、該ゲノムTRAC遺伝子が5'から3'方向に、

- (a) 該ヒトゲノムTRAC遺伝子上流の5'領域、
- (b) TALEN用の認識ドメイン、
- (c) ギャップ
- (c') 任意で第2のTALEN認識ドメイン、
- (d) ゲノムTRAC遺伝子の3'領域

を含む、TALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。

30

【0019】

本発明は、ゲノムTCR遺伝子(TRAC遺伝子)の定常領域が、TALENにより生成されかつ内因性アルファベータTCRの細胞表面発現に影響を与える遺伝子改変を含み、該ゲノムTRAC遺伝子が5'から3'方向に、

- (a) 該ヒトゲノムTRAC遺伝子上流の5'領域、
- (b) TALEN用の認識ドメイン、
- (c) アルファベータTCRの細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインの細胞表面発現に影響を与える野生型TRAC遺伝子と比較した挿入であって、終止コドン、IRES、TRACオープンリーディングフレームとインフレームの自己切断ペプチドをコードする配列のようなコ

40

50

ード配列、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする配列、TCRをコードする配列、薬物に対する感受性を付与するタンパク質をコードする配列、薬物に対する耐性を付与するタンパク質をコードする配列、サイトカイン、終結配列、それらの組み合わせのような非コード配列から選択される外因性ポリヌクレオチドを含む、挿入、

(c') 任意で第2のTALEN認識ドメイン、

(d) ゲノムTRAC遺伝子の3'領域

を含む、TALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。

【0020】

本発明は、ゲノムTCR遺伝子(TRAC遺伝子)の定常領域が、TALENにより生成されかつ内因性アルファベータTCRの細胞表面発現に影響を与える遺伝子改变を含み、該ゲノムTRAC遺伝子が5'から3'方向に、

(a) 該ヒトゲノムTRAC遺伝子上流の5'領域、

(b) TALEN用の認識ドメイン、

(c) アルファベータTCRの細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインの細胞表面発現に影響を与える野生型TRAC遺伝子と比較した挿入であって、TRACオープンリーディングフレームとインフレームの自己切断ペプチドをコードする配列、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする配列、終結配列を含む外因性ポリヌクレオチドを含む、挿入、

(c') 任意で第2のTALEN認識ドメイン、

(d) ゲノムTRAC遺伝子の3'領域

を含む、TALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。

CARはキメラ抗原受容体を意味し、組み換えTCRであってよい。

【0021】

本発明は、ゲノムTCR遺伝子(TRAC遺伝子)の定常領域が、TALENにより生成されかつ内因性アルファベータTCRの細胞表面発現に影響を与える遺伝子改变を含み、該ゲノムTRAC遺伝子が5'から3'方向に、

(a) 該ヒトゲノムTRAC遺伝子上流の5'領域、

(b) TALEN用の認識ドメイン、

(c) アルファベータTCRの細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインの細胞表面発現に影響を与える野生型TRAC遺伝子と比較した挿入であって、IRES、キメラ抗原受容体(CAR)、終結配列、それらの組み合わせを含む、挿入、

(c') 任意で第2のTALEN認識ドメイン、

(d) ゲノムTRAC遺伝子の3'領域

を含む、TALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。

【0022】

本発明は、ゲノムTCR遺伝子(TRAC遺伝子)の定常領域が、TALENにより生成されかつ内因性アルファベータTCRの細胞表面発現に影響を与える遺伝子改变を含み、該ゲノムTRAC遺伝子が5'から3'方向に、

(a) 該ヒトゲノムTRAC遺伝子上流の5'領域、

(b) TALEN用の認識ドメイン、

(c) アルファベータTCRの細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインの細胞表面発現に影響を与える野生型TRAC遺伝子と比較した挿入であって、TRACオープンリーディングフレームとインフレームの自己切断ペプチド、薬物に対する感受性を付与するタンパク質をコードする配列、終結配列を含む、挿入、

(c') 任意で第2のTALEN認識ドメイン、

(d) ゲノムTRAC遺伝子の3'領域

を含む、TALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。

【0023】

本発明は、ゲノムTCR遺伝子(TRAC遺伝子)の定常領域が、TALENにより生成されかつ内因性アルファベータTCRの細胞表面発現に影響を与える遺伝子改变を含み、該ゲノムTRAC遺伝子が5'から3'方向に、

10

20

30

40

50

(a) 該ヒトゲノムTRAC遺伝子上流の5'領域、
 (b) TALEN用の認識ドメイン、
 (c) アルファベータTCRの細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインの細胞表面発現に影響を与える野生型TRAC遺伝子と比較した挿入であって、TRACオープンリーディングフレームとインフレームの自己切断ペプチド、薬物に対する耐性を付与するタンパク質をコードする配列、終結配列を含む、挿入、
 (c') 任意で第2のTALEN認識ドメイン、
 (d) ゲノムTRAC遺伝子の3'領域
 を含む、TALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。

【0024】

10

本発明は、ゲノムTCR遺伝子(TRAC遺伝子)の定常領域が、TALENにより生成されかつ内因性アルファベータTCRの細胞表面発現に影響を与える遺伝子改変を含み、該ゲノムTRAC遺伝子が5'から3'方向に、

(a) 該ヒトゲノムTRAC遺伝子上流の5'領域、
 (b) TALEN用の認識ドメイン、
 (c) アルファベータTCRの細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインの細胞表面発現に影響を与える野生型TRAC遺伝子と比較した挿入であって、TRACオープンリーディングフレームとインフレームの自己切断ペプチド、サイトカインをコードする配列、終結配列を含む、挿入、
 (c') 任意で第2のTALEN認識ドメイン、
 (d) ゲノムTRAC遺伝子の3'領域
 を含む、TALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。

本明細書で「サイトカイン」は、免疫細胞の機能(活性、移動する能力、接着する能力、腫瘍環境に抵抗する能力)に影響を与える任意の因子を包含する。

【0025】

20

1つの局面において、本発明は、ヒト初代細胞がヒト初代T細胞もしくはヒト初代T細胞に由来するヒト初代細胞、またはヒトリンパ系初代細胞、またはヒト初代幹細胞、またはヒト初代前駆細胞である、上記態様に記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。

【0026】

30

1つの局面において、本発明は、ヒト初代細胞がヒト初代T細胞またはヒト初代T細胞の集団である、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。

【0027】

1つの局面において、本発明は、ヒト初代細胞またはその集団がヒト初代CD8 T細胞、ヒト初代CD4 T細胞、それらの組み合わせを含むかまたはそれからなる、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。

【0028】

さらに別の局面において、本発明は、TALEN用の認識ドメインが以下の配列 ttgtccccacagATATC、またはttgtccccacagA-TATCCAG

40

および任意で
 CCGTGTACCAAGCTGAGA

を含む、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。

【0029】

1つの局面において、本発明は、TRAC遺伝子中の、以下の配列:

50

AAGTAGCCCTGCATTCAGGTTCCCTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCAC-

TGAAATCATGGCCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAG-

TCCATCACGAGCAGCTGGTTCTAACAGATGCTATTCCCGTATAAACGATGAGACCCTGACTT-

GCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGG-

CAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCCCTGATCCTTGTCCCACAGATATCCAG-

TCCGGTGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCGGGCCCCGGATCC

コード配列

TCTAGAGGGCCCGTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGA**CTGTGCCCTCTAGTT-**

GCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCCTGACCCCTGGAAGGTGCCAC-

TCCCACTGTCCTTCTAACATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCAATT-

TATTCTGGGGGGTGGGGTGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAA-

TAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGCTCTATGACTAGTGGCGAATTCCCGTGTAC-

CAGCTGAGAGACTCTAACATCCAGTGACAAGTCTGCTGCCTATTACCGATTTGAT-

TCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAATGTGCTA-

GACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAG-

CAACAAATCTGACTTGCATGTGCAAACGCCCTAACACAGCATTATTCCAGAAGACAC-

CTTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTCCCTGCTTCAGGAA

を含む、請求項1～5のいずれか一項記載のTALEN改変内因性-TCR陰性ヒト初代細胞を提供する(配列中で下線を引いた配列は相同性アームを表し、斜体で太字の配列は自己切断ペプチド、好ましくは2Aペプチドを表し、斜体の配列は終結配列(BGHポリA)を表す)。

【0030】

「コード配列」はTRACオープンリーディングフレームとインフレームの自己切断ペプチドをコードする配列、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする配列、TCRをコードする配列、薬物に対する感受性を付与するタンパク質をコードする配列、薬物に対する耐性を付与するタンパク質をコードする配列、サイトカイン、それらの組み合わせのような、タンパク質をコードする配列を表し、好ましくは「コード配列」はキメラ抗原受容体、さらにより好ましくは抗CD22または抗CD123 CAR、さらにより好ましくはSEQ ID NO:9、10、11または12の配列(それぞれ抗CD22 CAR、抗CD22 CAR B-B7 QR3、抗CD22 CAR A-D4 QR3、抗CD123 CARに対応する)を表す。

【0031】

本発明は、リツキシマブ分子抗体(R2)によって認識される2つのエピトープまたはリツキシマブによって認識される3つのエピトープ、およびQBEN(CD34)によって認識される1つ、上記でデザインされたQR3を含むこれらの特定のCARのいずれかを企図する。

【0032】

本発明は、SEQ ID NO:9の配列を含むヒトT初代細胞またはその集団、のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性-TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 3 】

本発明は、SEQ ID NO : 10の配列を含むヒトT初代細胞またはその集団、のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。

【 0 0 3 4 】

本発明は、SEQ ID NO : 11の配列を含むヒトT初代細胞またはその集団、のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。

【 0 0 3 5 】

本発明は、SEQ ID NO : 12の配列を含むヒトT初代細胞またはその集団、のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。

【 0 0 3 6 】

本発明は、SEQ ID NO : 9の配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%～80%の同一性を有する配列を含むヒトT初代細胞またはその集団、のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。

10

【 0 0 3 7 】

本発明は、SEQ ID NO : 10の配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%～80%の同一性を有する配列を含むヒトT初代細胞またはその集団、のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。

【 0 0 3 8 】

本発明は、SEQ ID NO : 11の配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%～80%の同一性を有する配列を含むヒトT初代細胞またはその集団、のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。

20

【 0 0 3 9 】

本発明は、SEQ ID NO : 12の配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%～80%の同一性を有する配列を含むヒトT初代細胞またはその集団、のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。

【 0 0 4 0 】

本発明は、SEQ ID NO : 9の配列を含む上記のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト初代T細胞を提供する。

30

【 0 0 4 1 】

本発明は、SEQ ID NO : 10の配列を含む上記のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト初代T細胞を提供する。

【 0 0 4 2 】

本発明は、SEQ ID NO : 11の配列を含む上記のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト初代T細胞を提供する。

【 0 0 4 3 】

本発明は、SEQ ID NO : 12の配列を含む上記のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト初代T細胞を提供する。

40

【 0 0 4 4 】

本発明は、SEQ ID NO : 9の配列を含むかつ検出不能なレベルのMHC分子を発現する上記のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト初代T細胞を提供する。

【 0 0 4 5 】

本発明は、SEQ ID NO : 10の配列を含むかつ検出不能なレベルのMHC分子を発現する上記のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト初代T細胞を提供する。

【 0 0 4 6 】

本発明は、SEQ ID NO : 11の配列を含むかつ検出不能なレベルのMHC分子を発現する上記のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト初代T細胞を提供する。

50

【 0 0 4 7 】

本発明は、SEQ ID NO : 12の配列を含むかつ検出不能なレベルのMHC分子を発現する上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト初代T細胞を提供する。

【 0 0 4 8 】

1つの局面において、本発明は、CAR配列が抗CD22 CAR配列、抗CD123 CAR配列、抗CD30 CAR配列、抗HSP-70 CAR配列、抗o-アセチル-GD2 CAR配列、抗CS-1 CAR配列、抗CLL-1 CAR配列を含む、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。

【 0 0 4 9 】

1つの局面において、本発明は、CAR配列が抗CD22 CAR配列、抗CD123 CAR配列、抗CD30 CAR配列、抗HSP-70 CAR配列、抗o-アセチル-GD2 CAR配列、抗CS-1 CAR配列、抗CLL-1 CAR配列を含む、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。 10

【 0 0 5 0 】

1つの局面において、本発明は、CAR配列が抗BCMA CAR配列、抗CD33 CAR配列、抗EGFRVIII CAR配列、抗Flt3 CAR配列、抗WT1 CAR配列、抗CD70 CAR配列、抗MUC16 CAR配列、抗PRAME CAR配列、抗TSPAN10 CAR配列、抗CLAUDIN18.2 CAR配列、抗DLL3 CAR配列、抗LY6G6D CAR配列、抗Liv-1 CAR配列、抗CHRNA2 CAR配列、抗ADAM10 CAR配列を含む、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。 20

【 0 0 5 1 】

本発明は、改変されていない(例えば操作されていない)対照細胞と比較して検出不能なレベルのMHC分子およびベータ2ミクログロブリン分子のまたはCIITA分子の細胞表面発現に機能的に影響を与える欠失をさらに含む、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【 0 0 5 2 】

本発明は、挿入が、TCRアルファをコードする遺伝子の不活性化および内因性 -TCRの検出不能な細胞表面発現を陽性対照と比較して、全細胞の少なくとも96%において、全細胞の少なくとも97%において、全細胞の少なくとも98%において、全細胞の少なくとも99%において引き起こした、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。 30

【 0 0 5 3 】

陽性対照は、例えば、アルファTCR、ベータTCR、アルファベータTCRに特異的な抗体を用いるフローサイトメトリーによって検出されうる、検出可能なレベルのアルファベータTCRを表面に発現する非操作成熟T細胞であってよい。

【 0 0 5 4 】

本発明は、TALEN結合ドメインおよびまたはwt TRAC遺伝子に存在するTALEN結合ドメインの上流の配列を含む、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【 0 0 5 5 】

本発明は、TALENが、第1のTALENサブユニット:
SEQ ID NO : 3の 40

MGDPKKRKVIDIADLRTLGYSQQQQEIKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTAHIVALSQHPAALGTVAVK
 YQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLKIAKRGGVTAVEAVHAWRNALTG
 APLNLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGGLTP
 QQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGGLTPEQVVAIA
 SHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGGLTPEQVVAIASNIGGKQ
 10 ALETVQALLPVLCQAHGGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALL
 PVLCQAHGGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHG
 GLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGGLTPQQV
 VVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGGLTPQQVVAIASNG
 GGRPALESIVAQLSRDPALAAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKKGLGDPISRSQVLKSELEEKSELRHKLKYVPHE
 YIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADE
 20 MQRYVEENQTRNKHINPNEWWKVYPSSVTEFKFLVSGHFKGNYKAQLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIGGEMIKA
 GTLTLEEVRRKFNNGEINFAAD

および第2のTALENサブユニット:

MGDPKKRKVIDIADLRTLGYSQQQQEIKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTAHIVALSQHPAALGTVAVKYQDMIA
 ALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLKIAKRGGVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPE
 30 QVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGGLTPEQVVAIASHD
 DGGKQALETVQRLLPVLCQAHGGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGGLTPQQVVAIASNNGGKQALE
 TVQRLLPVLCQAHGGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPV
 CQAHGGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGGLT
 PQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGGLTPEQVVAIAS
 HDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGGLTPEQVVAIASHDGGKQALE
 40 TVQRLLPVLCQAHGGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGGLTPQQVVAIASNGGGRPALESIVAQLSRP
 DPALAAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKKGLGDPISRSQVLKSELEEKSELRHKLKYVPHEYIELIEIARNSTQDRILEM
 KVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRNKHINP
 NEWWKVYPSSVTEFKFLVSGHFKGNYKAQLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIGGEMIAGTLTLEEVRRKFNNGEINF
 AAD

またはSEQ ID NO：4を含む、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0056】

別の態様において、第1のTALENサブユニットは、SEQ ID NO：3と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%～80%の同一性を有する配列を含み、ただし該第1のTALENサブユニットが該TALEN認識ドメインに、好ましくは
ttgtccccacagATATC

に結合することを条件とし、第2のTALENサブユニットは、SEQ ID NO：4と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%～80%の同一性を有する配列を含み、ただし該第2のTALENサブユニットが該第2のTALEN認識ドメインに、好ましくは
CCGTGTACCAAGCTGAGA

に結合することを条件とし、かつただしオフターゲット結合の頻度が検出未満であることを条件とする。

【0057】

非特異性(Off target)は、例えば、TALEN操作細胞に向けてTALENガイド配列のための適合版を用いた「ガイド配列」分析によって測定されうる。

【0058】

本発明は、少なくとも1つの挿入が、(天然TRACに存在する)配列
ttgtccccacagATATC,またはttgtccccacagATATCCAG

のTALEN結合ドメインの下流に位置する外因性ポリヌクレオチド配列を含む、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0059】

別の態様において、本発明は、少なくとも1つの挿入がIRES、キメラ抗原受容体をコードする外因性ポリヌクレオチド配列、ポリアデニル化シグナルの転写終結配列、任意でTALEN結合ドメインを含む、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0060】

本発明は、少なくとも1つの挿入が、ゲノムTRACコード配列とインフレームの自己切斷ペプチドをコードする配列を含む、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0061】

本発明は、少なくとも1つの挿入が、ゲノムTRACコード配列とインフレームの自己切斷ペプチドをコードする配列、薬物に対する耐性を付与する産物をコードする外因性ポリヌクレオチド配列、ポリアデニル化シグナルの転写終結配列、任意でTALEN結合ドメインを含む、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0062】

本発明は、少なくとも1つの挿入が、ゲノムTRACコード配列とインフレームの自己切斷ペプチドをコードする配列、薬物に対する感受性を付与する産物をコードする外因性ポリヌクレオチド配列、ポリアデニル化シグナルの転写終結配列、任意でTALEN結合ドメインを含む、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0063】

本発明は、少なくとも1つの挿入が、ゲノムTRACコード配列とインフレームの自己切斷ペプチドをコードする配列、サイトカインをコードする外因性ポリヌクレオチド配列、ポ

10

20

30

40

50

リアデニル化シグナルの転写終結配列、任意でTALEN結合ドメインを含む、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【 0 0 6 4 】

本発明は、少なくとも1つの挿入が、ゲノムTRACコード配列とインフレームの自己切斷ペプチドをコードする配列、少なくともキメラ抗原受容体をコードする外因性ポリヌクレオチド配列、ポリアデニル化シグナルの転写終結配列、任意でTALEN結合ドメインを含む、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【 0 0 6 5 】

本発明は、少なくとも1つの挿入が、ゲノムTRACコード配列とインフレームの自己切斷ペプチドをコードする配列を含み、該自己切斷ペプチドが2Aペプチド、2A様ペプチド、P 10 2Aペプチド、E2Aペプチド、F2Aペプチド、好ましくは2Aペプチド、より好ましくは配列 GSGEGRGSSLTCGDVEENPGP, GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP, GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP,

GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP, SGEGRGSSLTCGDVEENPGP, SGATNFSLLKQAGDVEENPGP,
SGQCTNYALLKLAGDVESNPGP, SGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

の2Aペプチド、さらにより好ましくは配列
SGEGRGSSLTCGDVEENPGP

の2Aペプチドから選択される自己切斷ペプチドである、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【 0 0 6 6 】

本発明は、少なくとも1つの挿入が、ゲノムTRACコード配列とインフレームの配列によってコードされる配列
SGEGRGSSLTCGDVEENPGP

の2Aペプチドをコードする配列、キメラ抗原受容体をコードする外因性ポリヌクレオチド配列、ポリアデニル化シグナルの転写終結配列、任意でTALEN結合ドメインを含む、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【 0 0 6 7 】

本発明は、外因性ポリヌクレオチド配列が以下の抗原の少なくとも1つに特異的なCAR 30 から選択されるキメラ抗原受容体(CAR)を含む、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。本発明のCAR分子は、抗原結合ドメインが疾患に関連する腫瘍抗原に結合し、かつ該腫瘍抗原が以下からなる群より選択される、抗原結合ドメインを含む: CD19分子(CD19); 膜貫通4-ドメインA1(CD20としても知られるMS4A1); CD22分子(CD22); CD24分子(CD24); CD248分子(CD248); CD276分子(CD 40 276またはB7H3); CD33分子(CD33); CD38分子(CD38); CD44v6; CD70分子(CD70); CD72; CD79a; CD79b; インターロイキン3受容体サブユニット (CD123としても知られるIL3RA); TNF受容体スーパーファミリーメンバー8(CD30としても知られるTNFRSF8); KITがん原遺伝子受容体チロシンキナーゼ(CD117); V-setプレB細胞代替軽鎖1(VPREB 1またはCD179a); 接着Gタンパク質共役受容体E5(ADGRE5またはCD97); TNF受容体スーパーファミリーメンバー17(BCMAとしても知られるTNFRSF17); SLAMファミリーメンバー7(CS1としても知られるSLAMF7); L1細胞接着分子(L1CAM); C型レクチンドメインファミリーメンバーA(CLL-1としても知られるCLEC12A); 上皮増殖因子受容体の腫瘍特異的変種(EGFRvIII); 甲状腺刺激ホルモン受容体(TSHR); Fms様チロシンキナーゼ3(FLT3); ガングリオシドGD3(GD3); Tn抗原(Tn Ag); リンパ球抗原6ファミリーメンバーG6D(LY6G6D); デルタ様標準Notchリガンド3(DLL3); インターロイキン13受容体サブユニット -2(IL-13RA2); インターロイキン11受容体サブユニット (IL11RA); メソテリン(MSLN); 受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1(ROR1); 前立腺幹細胞抗原(P 50

SCA); erb-b2受容体チロシンキナーゼ2(ERBB2またはHer2/neu); プロテアーゼセリン21(PRSS21); キナーゼ挿入ドメイン受容体(VEGFR2としても知られるKDR); ルイスY抗原(LewisY); 溶質輸送体ファミリー39メンバー6(SLC39A6); 線維芽細胞活性化タンパク質(FAP); Hsp70ファミリーシャペロン(HSP70); 血小板由来増殖因子受容体(PDGFR-beta); ニコチン様コリン作動性受容体2サブユニット(CHRNa2); 時期特異的胚抗原-4(SEA-4); ムチン1、細胞表面結合(MUC1); ムチン16、細胞表面結合(MUC16); クローディン18(CLDN18); クローディン6(CLDN6); 上皮増殖因子受容体(EGFR); 黒色腫において選択的に発現される抗原(PRAME); 神経細胞接着分子(NCAM); ADAMメタロペプチダーゼドメイン10(ADAM10); 葉酸受容体1(FOLR1); 葉酸受容体(FOLR2); 炭酸脱水酵素IX(CA9); プロテアソームサブユニット9(PSMB9またはLMP2); エフリン受容体A2(EphA2); テトラスパニン10(TSPAN10); フコシルGM1(Fuc-GM1); シアリルルイス接着分子(sLe); TGS5; 高分子量黒色腫関連抗原(HMWMAA); o-アセチル-GD2ガングリオシド(OAcGD2); 腫瘍内皮マーカー7関連(TEM7R); Gタンパク質-共役受容体クラスCグループ5、メンバーD(GPRC5D); 染色体Xオープンリーディングフレーム61(CXORF61); ALK受容体チロシンキナーゼ(ALK); ポリシアル酸; 胎盤特異的1(Placenta-specific 1; PLAC1); globoHグリコセラミド(GloboH)の六糖部分; NY-BR-1抗原; ウロプラキン2(UPK2); ヘパタイティスAウイルス細胞受容体1(HAVCR1); アドレナリン受容体3(ADRB3); パンネキシン3(PANX3); Gタンパク質-共役受容体20(GPR20); リンパ球抗原6ファミリーメンバーK(LY6K); 嗅覚受容体ファミリー51サブファミリーEメンバー2(OR51E2); TCRガンマ代替リーディングフレームタンパク質(TARP); ウィルムス腫瘍タンパク質(WT1); 12;21染色体転座によるETV6-AML1融合タンパク質(ETV6-AML1); 精子自己抗原タンパク質17(SPA17); X抗原ファミリー、メンバー1E(XAGE1E); TEK受容体チロシンキナーゼ(Tie2); 黒色腫がん精巣抗原1(MAD-CT-1); 黒色腫がん精巣抗原2(MAD-CT-2); Fos関連抗原1; p53変異体; ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT); 肉腫転座切断点; アポトーシスの黒色腫阻害物質(ML-IAP); ERG(膜貫通プロテアーゼ、セリン2(TMPRSS2)ETS融合遺伝子); N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼV(NA17); ペアボックスタンパク質Pax-3(PAX3); アンドロゲン受容体; サイクリンB1; v-mycトリ骨髄細胞腫ウイルスがん遺伝子神経芽腫由来ホモログ(MYCN); RasホモログファミリーメンバーC(RhoC); シトクロムP450 1B 1(CYP1B1); CCCTC結合因子(ジンクフィンガータンパク質)様(BORIS); T細胞によって認識される扁平上皮がん抗原3(SART3); ペアボックスタンパク質Pax-5(PAX5); プロアクロシン結合タンパク質sp32(OY-TES1); リンパ球特異的タンパク質チロシンキナーゼ(LCK); Aキナーゼアンカータンパク質4(AKAP-4); 滑膜肉腫、X切断点2(SSX2); 白血球関連免疫グロブリン様受容体1(LAIR1); IgA受容体のFc断片(FCAR); 白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリーAメンバー2(LILRA2); CD300分子様ファミリーメンバーf(CD300LF); 骨髄間質細胞抗原2(BST2); EGF様モジュール含有ムチン様ホルモン受容体様2(EMR2); リンパ球抗原75(LY75); グリビカン-3(GPC3); Fc受容体様5(FCRL5); 免疫グロブリンラムダ様ポリペプチド1(IGLL1)、および熱ショックタンパク質70(HSP70)。

【 0 0 6 8 】

好ましくは、外因性ポリヌクレオチド配列は、CD22、CD123、CS-1、CLL-1、CD38、HSP70、MUC-1、CD30、o-アセチル-GD2に特異的なCARおよびゲノムTRACコード配列とインフレームの配列SGEGRGSLLTCGDVEENPGP、ポリアデニル化シグナルの転写終結配列を含む。

【 0 0 6 9 】

より好ましくは、外因性ポリヌクレオチド配列は、CD123に特異的なCAR、およびゲノムTRACコード配列とインフレームの配列SGEGRGSLLTCGDVEENPGP

ポリアデニル化シグナルの転写終結配列を含む。

より好ましくは、外因性ポリヌクレオチド配列は、CD22に特異的なCAR、およびゲノムT

10

20

30

40

50

RACコード配列とインフレームの配列
SGEGRGSLLTCDVEENPGP

ポリアデニル化シグナルの転写終結配列を含む。

【0070】

本発明は、(CAR)がモノクローナル抗体に特異的なエピトープを含む細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0071】

本発明は、少なくとも1つの挿入がIRES、キメラ抗原受容体(CAR)を含む外因性ポリヌクレオチド配列、ポリアデニル化シグナルの転写終結配列、任意でTALEN結合ドメインを含む、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0072】

本発明は、キメラ抗原受容体(CAR)がモノクローナル抗体に特異的な少なくとも1つの抗原、好ましくはモノクローナル抗体に特異的な2つの抗原を含む、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0073】

本発明は、外因性ポリヌクレオチドが、RNAポリメラーゼの活性を停止させる転写終結シグナルを含む、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0074】

破壊または不活性化される内因性遺伝子が、TCRの内因性ベータサブユニット遺伝子、内因性サイトカイン誘導性SH2含有(CISH)遺伝子、アデノシンA2a受容体(ADORA)遺伝子、CD276遺伝子、Vセットドメイン含有T細胞活性化阻害物質1(VTCN1)遺伝子、BおよびTリンパ球関連(BTLA)遺伝子、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4(CTLA4)遺伝子、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ1(IDO1)遺伝子、キラー細胞免疫グロブリン様受容体、3ドメイン、長い細胞質尾部1(KIR3DL1)遺伝子、リンパ球活性化遺伝子3(LAG3)遺伝子、プログラム細胞死1(PD-1)遺伝子、A型肝炎ウイルス細胞受容体2(HAVCR2)遺伝子、T細胞活性化Vドメイン免疫グロブリンサプレッサー(VISTA)遺伝子、ナチュラルキラー細胞受容体2B4(CD244)遺伝子、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ1(HPRT)遺伝子、アデノ随伴ウイルス組み込み部位(AAVS1)、ならびにケモカイン(C-Cモチーフ)受容体5(遺伝子/偽遺伝子)(CCR5)遺伝子、それらの組み合わせからなる群より選択される内因性遺伝子における少なくとも1つのさらなる破壊を含む、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0075】

本発明は、MHCまたはTCR分子に関わりなく任意の個体におけるがん、ウイルス感染であり得る病的状態に関与する病的細胞の生存を変化させるように用いるための、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0076】

本発明は、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を含むヒト細胞の集団を提供する。

本発明は、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞または上記態様に記載のヒト細胞の集団および薬学的に許容される賦形剤を含む薬学的組成物を提供する。

【0077】

本発明は、医薬として用いるための上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞または上記態様に記載のヒト細胞の集団または上記態様に記載の薬学的組成物を提供する。

【0078】

10

20

30

40

50

本発明は、がんの処置において用いるための、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性-TCR陰性ヒト細胞または上記態様に記載のヒト細胞の集団または上記に記載の薬学的組成物を提供する。

【0079】

本発明は、がん腫、リンパ腫、肉腫、芽細胞腫、および白血病からなる群より選択されるがんの処置で用いるための上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性-TCR陰性ヒト細胞または上記に記載のヒト細胞の集団または上記に記載の薬学的組成物を提供する。

【0080】

本発明は、B細胞由来のがん、T細胞由来のがん、乳がん、胃がん、神経芽細胞腫、骨肉腫、肺がん、黒色腫、前立腺がん、結腸がん、腎細胞がん、卵巣がん、横紋筋肉腫、白血病、およびホジキンリンパ腫からなる群より選択されるがんの処置で用いるための上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性-TCR陰性ヒト細胞または上記に記載のヒト細胞の集団または上記に記載の薬学的組成物を提供する。 10

【0081】

本発明は、B細胞由来のがんが、B系統急性リンパ芽球性白血病、B細胞慢性リンパ性白血病、およびB細胞非ホジキンリンパ腫からなる群より選択されるがんの処置で用いるための上記のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性-TCR陰性ヒト細胞または上記態様に記載のヒト細胞の集団または上記態様に記載の薬学的組成物を提供する。

【0082】

本発明は、AML、ALL、T細胞リンパ腫、CLLであるがんの処置で用いるための上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性-TCR陰性ヒト細胞または上記態様に記載のヒト細胞の集団または上記態様に記載の薬学的組成物を提供する。 20

【0083】

本発明は、エンドヌクレアーゼ改变内因性TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0084】

より具体的には、本発明は、野生型TRAC遺伝子と比較してエンドヌクレアーゼ改变ゲノムTRAC遺伝子を含む、エンドヌクレアーゼ改变内因性-TCR陰性ヒト細胞を検出するための手段を提供する。

【0085】

有利な態様において、本発明による手段は、5'から3'方向に、野生型TRAC遺伝子と比較したギャップまたは挿入（該挿入は、終止コドン、終結配列、IRES、TRACオープンリーディングフレームとインフレームの自己切断ペプチドのようなタンパク質をコードする配列、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする配列、TCRをコードする配列、薬物に対する感受性を付与するタンパク質をコードする配列、薬物に対する耐性を付与するタンパク質をコードする配列、それらの組み合わせのような、非コード配列から選択される外因性ポリヌクレオチドを含む）を含む改变ヒトゲノムTRAC遺伝子を検出することを可能にする。 30

【0086】

1つの態様において、ギャップまたは挿入は、アルファベータTCRの細胞外ドメインの発現に影響を与えるもの、またはアルファベータTCRの膜貫通ドメインに影響を与えるもの、および最終的にアルファベータTCRの細胞表面発現に影響を与えるものである。 40

【0087】

本発明は、改变ヒトゲノムTRAC遺伝子が5'から3'方向に、

(a) 野生型TRAC遺伝子に存在するレアカットエンドヌクレアーゼ用の認識ドメイン上流のヒトゲノムTRAC遺伝子の5'領域、

(b) アルファベータTCRの細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインの細胞表面発現に影響を与える野生型TRAC遺伝子と比較したギャップまたは挿入であって、挿入が、非コード配列、終止コドン、TRACオープンリーディングフレームとインフレームの自己切断ペプチドをコードする配列、IRES、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする配列、TCRをコードする配列、薬物に対する感受性を付与するタンパク質をコードする配列、薬物に対する耐

性を付与するタンパク質をコードする配列、終結配列、それらの組み合わせから選択される外因性ポリヌクレオチドを含む、ギャップまたは挿入、

(c') 任意で第2のレアカットエンドヌクレアーゼ認識ドメイン、

(d) ゲノムTRAC遺伝子の3'領域

を含む、野生型TRAC遺伝子と比較したエンドヌクレアーゼ改変ゲノムTRAC遺伝子を含むエンドヌクレアーゼ改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を検出するための手段を提供する。

【0088】

本発明は、エンドヌクレアーゼが、Crispr/Cas 9、Cpf1、TALEN、トランスポザーゼ、ZEN、ジンクフィンガーエンドヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、MegaTAL、それらの組み合わせからなる群より選択され、かつ手段が該エンドヌクレアーゼに特異的なエンドヌクレアーゼ改変TRAC遺伝子の配列におよび/または該エンドヌクレアーゼに特異的な配列の上流に結合する、上記に記載の手段を提供する。

【0089】

本発明は、エンドヌクレアーゼが、Crispr/Cas 9、TALEN、ジンクフィンガーエンドヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、MegaTAL、それらの組み合わせからなる群より選択され、かつ手段がヌクレアーゼに特異的であるか、または該エンドヌクレアーゼに特異的な配列の上流に位置する、エンドヌクレアーゼ改変TRACの配列に結合する、上記に記載の手段を提供する。

【0090】

有利な態様において、上記に記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞は、CARをコードする外因性配列が、例えはレンチウイルスベクターまたはAAVベクターのようなベクターを用いてゲノムTCRA遺伝子に組み込まれ、かつゲノム破壊が、CRISPR/CAS9、メガヌクレアーゼ、MegaTAL、Zn Finger、TALEN、それらの組み合わせから選択されるエンドヌクレアーゼを用いて実施された、不活性化ゲノムTCRA遺伝子を含む。

【0091】

本発明は、エンドヌクレアーゼがTALENである上記態様に記載の手段を提供する。

【0092】

本発明は、改変ゲノムTRAC遺伝子中の配列に結合し、好ましくはエンドヌクレアーゼ結合ドメインの上流の改変ゲノムTRAC遺伝子中の配列に結合し、もしくはエンドヌクレアーゼ認識ドメインの位置の改変ゲノムTRAC遺伝子中の配列に結合し、および/またはタグをコードする配列に結合するプローブを含むTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を検出するための上記態様に記載の手段を提供する。

【0093】

本発明は、TALEN改変ゲノムTRAC遺伝子が、

(a) ヒトゲノムTRAC遺伝子の5'領域、

(b) TALEN用の認識ドメイン、好ましくは以下の配列

ttgtcccacagATATC, もしくはttgtcccacagATATCCAG

を含むTALEN用の認識ドメイン、または

(c) アルファベータTCRの細胞外ドメインもしくは膜貫通ドメインの細胞表面発現に影響を与える野生型TRAC遺伝子と比較したギャップもしくは挿入であって、挿入が、終止コドン、TRACオープンリーディングフレームとインフレームの自己切断ペプチドをコードする配列、IRES、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする配列、TCRをコードする配列、薬物に対する感受性を付与するタンパク質をコードする配列、薬物に対する耐性を付与するタンパク質をコードする配列、終結配列、それらの組み合わせから選択される外因性ポリヌクレオチドを含む、ギャップまたは挿入、

(c') 任意で第2のTALEN認識ドメイン、

(d) ゲノムTRAC遺伝子の3'領域

を含み、かつ手段が該TALEN改変ゲノムTRAC遺伝子に特異的に結合する、上記態様に記載の手段を提供する。

10

20

30

40

50

【0094】

本発明は、改変ゲノムTRAC遺伝子中の、配列ttgtcccacagATATC、またはttgtcccaca
gATATCCAGの少なくとも10塩基に結合するプローブを含むTALEN改変内因性-TCR
陰性ヒト細胞を検出するための上記態様のいずれか1つに記載の手段を提供する。

【0095】

本発明は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)またはオフサイト改変により、好ましくはガイド
配列分析によりエンドヌクレアーゼ改変内因性-TCR陰性ヒト細胞を検出するための上
記態様のいずれか1つに記載の手段を提供する。

【0096】

本発明は、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性-TCR陰性ヒト細胞を
検出するための上記態様のいずれか1つに記載の手段を提供する。 10

【0097】

本発明は、外因性コード配列が、1つまたは複数のエンドヌクレアーゼおよび/またはウ
イルスベクターを用いてゲノムTCRA遺伝子に組み込まれた、不活性化ゲノムTCRA遺伝子
を含む上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性-TCR陰性ヒト細胞を提供す
る。

【0098】

本発明は、CARをコードする外因性配列がレンチウイルスベクターまたはAAVベクター
を用いてゲノムTCRA遺伝子に組み込まれ、かつゲノム破壊が、CRISPR/CAS9、メガヌク
レアーゼ、MEGATALまたはTALENエンドヌクレアーゼシステムを用いて行われる、不活
性化ゲノムTCRA遺伝子を含む上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性-TC
R陰性ヒト細胞を提供する。 20

【0099】

特定の局面の下で、本発明は、それを必要とする患者を処置するための方法であって、
前記態様のいずれか1つに記載の細胞を投与する段階を含む該方法を提供する。

【0100】

特定の局面の下で、本発明は、ゲノムTRAC遺伝子に結合する少なくとも1つのTALEN
、ならびに内因性サイトカイン誘導性SH2含有(CISH)、アデノシンA2a受容体(ADORA)
、CD276、Vセットドメイン含有T細胞活性化阻害物質1(VTCN1)、BおよびTリンパ球関
連(BTLA)、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4(CTLA4)、インドールアミン2,3-ジオ
キシゲナーゼ1(IDO1)、キラー細胞免疫グロブリン様受容体、3ドメイン、長い細胞質尾部
1(KIR3DL1)、リンパ球活性化遺伝子3(LAG3)、プログラム細胞死1(PD-1)遺伝子、A型
肝炎ウイルス細胞受容体2(HAVCR2)、T細胞活性化Vドメイン免疫グロブリンサブレッサ
ー(VISTA)、ナチュラルキラー細胞受容体2B4(CD244)、ヒポキサンチンホスホリボシリ
トランスフェラーゼ1(HPRT)、アデノ随伴ウイルス組み込み部位(AAVS部位(例えばAAVS
1、AAVS2など))、またはケモカイン(C-Cモチーフ)受容体5(遺伝子/偽遺伝子)(CCR5)か
ら選択される産物の1つをコードする遺伝子に結合するTALENを含むキットを提供する。 30

【0101】

本発明は、エンドヌクレアーゼ改変内因性-TCR陰性ヒト細胞を產生する方法を提供
し、本方法は、 40

(a) ヒト細胞に、

(i) 操作されたヌクレアーゼをコードする第1の核酸配列；または操作されたヌクレア
ーゼタンパク質；任意で該エンドヌクレアーゼをガイドする核酸(操作されたヌクレア
ーゼがヒトTCRアルファ定常領域遺伝子内の認識配列の位置で切断を生じ、切断が適切な対
照(例えば操作されていない免疫T細胞)と比較して、検出不能なレベルまで-TCRの
細胞表面発現の阻害をもたらす)、

(ii) CARをコードする外因性ポリヌクレオチドを含む第2の核酸配列、

(iii) 任意でプローブ

を導入する段階

を含み、

40

50

該外因性ポリヌクレオチドの配列が、相同組み換え(HR)により該切断部位で該ヒトTCRアルファ定常領域遺伝子に挿入され、かつさらに非改変対照細胞と比較した場合に、該遺伝子改変細胞が内因性TCRの細胞表面発現を低減させる。

【0102】

特定の態様において、本発明は、配列がHRによって挿入されない限り、プローブがエンドヌクレアーゼと同時にヒト細胞に導入され、その結果、該プローブが任意のdsDNA切断部位に挿入されうる、エンドヌクレアーゼ改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を產生する方法を提供する。これはエンドヌクレアーゼの任意のオフサイト切断を同定するための内部対照としてのT細胞の製造と並行してまたはその製造中に行われる。

【0103】

プローブのゲノムへの組み込みの閾値を超えると、エンドヌクレアーゼ改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞は免疫療法に使用されない可能性がある。

【0104】

本発明は、エンドヌクレアーゼ誘導性オンサイトおよびオフサイトを、好ましくはpcrによっておよび/またはガイド配列によって検出する段階を含む、上記態様のいずれか1つに記載のエンドヌクレアーゼ改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を產生するための方法を提供する。

【0105】

本発明は、操作されたヌクレアーゼがメガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、CRISPR/Casヌクレアーゼ、またはmegaTALヌクレアーゼである、上記態様のいずれか1つに記載の方法を提供する。

【0106】

本発明は、以下の段階:

本発明による細胞および対照細胞を提供する段階、

ヌクレアーゼの混合物を用いてDNAおよびRNAを除去する段階、

ゲノムDNA (gDNA)を抽出する段階、

フォワードプライマー、リバースプライマーおよびプローブとともにgDNAをインキュベートする段階、

45秒を超える、好ましくは60秒を超える、より好ましくは90秒を超えるアニーリング/伸長時間でPCRを実施する段階

を含む、上記態様のいずれか1つに記載のエンドヌクレアーゼ改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を產生するための方法を提供する。

対照細胞は、操作されていないT細胞であってよい。

【0107】

本発明による細胞を提供する段階は、以下の段階を含む:

初代細胞を提供する段階、

エンドヌクレアーゼをコードするmRNAおよび/またはゲノムDNA中の切断部位に対する特異性を付与するガイド(エンドヌクレアーゼそれ自体および/またはポリヌクレオチドであってよい)を導入する段階であって、該切断部位がTRAC遺伝子のKOおよび検出不能なレベルのアルファベータTCR細胞表面発現をもたらす、段階、

少なくとも自己切断ペプチドまたはIRES、CARをコードする遺伝子、KOとなるべき遺伝子との配列相同性を含むポリヌクレオチドを導入する段階であって、TRAC遺伝子のKIによるKOおよびTCR陰性CAR陽性細胞の產生をもたらす、段階、

得られたTCR陰性CAR陽性細胞を精製する段階、

本発明による得られたTCR陰性CAR陽性細胞および対照細胞を提供する段階、

ヌクレアーゼの混合物を用いてDNAおよびRNAを除去する段階、

ゲノムDNA (gDNA)を抽出する段階、

フォワードプライマー、リバースプライマーおよびプローブとともにgDNAをインキュベートする段階、

10

20

30

40

50

45秒を超える、好ましくは60秒を超える、より好ましくは90秒を超えるアニーリング/伸長時間でPCRを実施する段階、

エンドヌクレアーゼ特異的なオンサイトおよびオフサイト切断を検出する段階。

【0108】

好ましい態様において、

ゲノムDNA中の切断部位に対する特異性を付与するエンドヌクレアーゼをコードするmRNA A (エンドヌクレアーゼそれ自体および/またはポリヌクレオチドであってよい)を導入する段階であって、該切断部位がTRAC遺伝子のKOおよび検出不能なレベルのアルファベータTCR細胞表面発現をもたらす、段階は、ゲノムDNA中の切断部位に対する特異性を付与するTALENをコードするmRNA (エンドヌクレアーゼそれ自体および/またはポリヌクレオチドであってよい)を導入する段階であって、該切断部位がTRAC遺伝子のKOおよび検出不能なレベルのアルファベータTCR細胞表面発現をもたらす、段階である。

【0109】

同じ方法が、KOであるよう意図され、かつ外因性コード配列が導入される任意の遺伝子に適用される。その態様において、

エンドヌクレアーゼをコードするmRNAおよび/またはゲノムDNA中の切断部位に対する特異性を付与するガイド(エンドヌクレアーゼそれ自体および/またはポリヌクレオチドであってよい)を導入する段階であって、該切断部位がTRAC遺伝子のKOおよび検出不能なレベルのアルファベータTCR細胞表面発現をもたらす、段階は、

該エンドヌクレアーゼをコードするmRNAおよび/またはゲノムDNA中の切断部位に対する特異性を付与するガイド(エンドヌクレアーゼそれ自体および/またはポリヌクレオチドであってよい)を導入する段階であって、該切断部位が該遺伝子のKOおよび該遺伝子によってコードされる産物の検出不能なレベルの発現をもたらす、段階に一般化される。

【0110】

本発明は同様に、

本発明による細胞、対照細胞を提供する段階、

ベンゾナーゼを用いてDNAおよびRNAを除去する段階、

ゲノムDNA (gDNA)を抽出する段階、

フォワードプライマー、リバースプライマーおよびプローブとともにgDNAをインキュベートする段階、

2だけ増えたアニーリング/伸長時間でPCRを実施する段階

を含む、上記態様のいずれか1つに記載のエンドヌクレアーゼ改变内因性-TCR陰性ヒト細胞を検出するための方法を提供する。

【0111】

本発明は、

本発明による細胞、対照細胞を提供する段階、

ベンゾナーゼのような、ヌクレアーゼの混合物を用いてDNAおよびRNAを除去する段階、

ゲノムDNA (gDNA)を抽出する段階、

300 nMのフォワードプライマー、900 nMのリバースプライマーおよび220 nMのプローブとともにgDNA 20~30 ngをインキュベートする段階、

2だけ増えた、好ましくは45秒を超えるアニーリング/伸長時間でPCRを実施する段階を含む、上記態様のいずれか1つに記載のエンドヌクレアーゼ改变内因性-TCR陰性ヒト細胞を検出するための方法を提供する。

【0112】

本発明は、

本発明による細胞、対照細胞を提供する段階、

ベンゾナーゼを用いてDNAおよびRNAを除去する段階、

ゲノムDNA (gDNA)を抽出する段階、

10

20

30

40

50

SEQ ID NO : 5のフォワードプライマー、SEQ ID NO : 6のリバースプライマーおよびSEQ ID NO : 7のプローブとともにgDNAをインキュベートする段階、

2だけ増えたアニーリング/伸長時間でPCRを実施する段階
を含む、上記態様のいずれか1つに記載のエンドヌクレアーゼ改変内因性-TCR陰性ヒト細胞を検出するための方法を提供する。

【0113】

本発明は、エンドヌクレアーゼがTALENである、上記態様において開示される方法を提供する。

【0114】

本発明は、外因性ポリヌクレオチドが自己切断ペプチドおよびキメラ抗原受容体をコードする核酸配列を含む、上記態様において開示される方法を提供する。 10

【0115】

本発明は、キメラ抗原受容体が細胞外リガンド結合ドメインおよび1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、上記態様において開示される方法を提供する。

【0116】

本発明は、キメラ抗原受容体が細胞外リガンド結合ドメインおよび1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインおよび共刺激ドメインを含む、上記態様において開示される方法を提供する。

【0117】

本発明は、外因性ポリヌクレオチドが、該外因性ポリヌクレオチドの発現を駆動する第1のプロモーター配列を含む、上記態様において開示される方法を提供する。 20

【0118】

本発明は、少なくとも第2の核酸配列が、該第2の核酸配列を含む組み換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターと細胞を接触させることによって導入される、上記態様において開示される方法を提供する。

【0119】

本発明は、組み換えAAVベクターが自己相補的AAVベクターである、上記態様のいずれか1つに記載の方法を提供する。

【0120】

組み換えAAVベクターが少なくとも部分的にAAV6に由来する、上記のいずれか1つに記載の方法が提供される。 30

【0121】

組み換えAAVベクターがAAV6/AAV2粒子に由来する、上記のいずれか1つに記載の方法。

【0122】

組み換えAAVベクターが、AAV6粒子およびAAV2由来の逆方向末端反復(LTR)間のDNA配列を含む、上記のいずれか1つに記載の方法。

【0123】

組み換えTALENが第1サブユニットおよび第2サブユニットを含み、該第1サブユニットが第1の認識半部位に結合し、かつ該第2サブユニットが第2の認識半部位に結合する、上記のいずれか1つに記載の方法。 40

【0124】

組み換えTALENが野生型ヒトTCRアルファ定常領域中の配列
ttgtcccacagATATCCAG

を認識する、上記のいずれか1つに記載の方法が提供される。

【0125】

本発明はさらに、メガヌクレアーゼが野生型ヒトTCRアルファ定常領域の残基番号93～208内の認識配列を認識および切断し、組み換えメガヌクレアーゼが第1サブユニットおよび第2サブユニットを含み、該第1サブユニットが該認識配列の第1の認識半部位に結合

10

20

30

40

50

し、第1の超可変(HVR1)領域を含み、かつ該第2サブユニットが該認識配列の第2の認識半部位に結合し、第2の超可変(HVR2)領域を含む、上記の一般的な方法としての方法を提供する。

【0126】

本発明は、メガヌクレアーゼが、リンカーを含む一本鎖メガヌクレアーゼであり、該リンカーが第1サブユニットおよび第2サブユニットを共有結合する、上記のいずれか1つに記載の方法を提供する。

【0127】

本発明は概して、上記の方法のいずれか1つによって得られた細胞の検出手段を提供する。

10

【0128】

他の態様

本発明は、腫瘍微小環境(TME)によって影響される内因性T細胞プロモーターの制御下で外因性の遺伝属性/回路を統合することにより、CAR T細胞(TCRneg, CAR+)療法の治療結果を改善するのに有用である。非限定的な例として、アルギニン、システイン、トリプトファンおよび酸素欠乏ならびに細胞外アシドーシス(乳酸蓄積)を含むTMEの特徴は、特定の内因性遺伝子を上方制御することが知られている。本発明によれば、内因性遺伝子の上方制御を「ハイジャック」し、関連する外因性コード配列を再発現させて、ある種の腫瘍微小環境におけるCAR T細胞の抗腫瘍活性を改善することができる。

【0129】

20

好ましい態様において、本発明の方法は、AAV6に基づくベクター中に設定されることが好ましいDNA修復マトリックスの存在下で、非限定的な例としてTALEN、ZFNまたはRNAガイドエンドヌクレアーゼのような、配列特異的ヌクレアーゼ試薬を発現させることにより、腫瘍微小環境下で高度に転写される遺伝子座に二本鎖切断を生成する段階を含む。このDNAドナー錫型は通常、本明細書において外因性コード配列といわれる、固有または複数のオーブンリーディングフレームおよび調節性の遺伝要素(終止コドンおよびポリA配列)を埋め込んだ2つの相同性アームを含む。

【0130】

別の局面において、遺伝子不活性化が遺伝子組み換えと組み合わされるように、遺伝子座に存在する内因性コード配列を欠失または修飾すること(ノックアウト・ノックイン)によって、外因性配列がゲノム中に導入される。

30

【0131】

標的となる遺伝子座および免疫細胞活性のその関与に応じて、標的とされる内因性遺伝子は不活性化されるかまたはその本来の機能が維持されうる。標的とされる遺伝子が免疫細胞活性に必須であるならば、この挿入手順は遺伝子不活性化なしにシングルノックイン(KI)を生成することができる。反対に、標的とされる遺伝子が免疫細胞の阻害/消耗に関与していると考えられるならば、挿入手順は、導入された外因性コード配列の発現を可能にしながら、好ましくは内因性配列をノックアウトすることにより、内因性遺伝子の発現を防ぐようにデザインされる。

【0132】

40

より具体的な局面において、本発明は、種々の動力学を用い、非限定的な例として、PD1、PDL1、CTLA-4、TIM3、LAG3、TNFアルファまたはIFNガンマのような特定の遺伝子座での標的化組み込みによる(天然の遺伝子破壊の有無にかかわらず)CARシグナル伝達経路の活性化時の標的遺伝子発現を上方制御することに依存する。

【0133】

さらにより具体的な局面において、PD1、CD25またはCD69内因性遺伝子座の位置に発現のためこれらの遺伝子座に存在する内因性プロモーターの制御下に組み込まれる、IL-15またはIL-12ポリペプチドをコードする外因性配列を含む、操作された免疫細胞、および好ましくは患者への注入用の初代免疫細胞が本明細書において記載される。

【0134】

50

さらにより具体的な局面において、

IL2
IL12
IL15
IL15_IL15R
Tbet
CTLA4 AB 可溶性
PD1 AB 可溶性
CD40L (CD154)
NGR-TNF

10

20

IL-7、抗体、好ましくは中和抗体をコードする外因性配列を含む、操作された免疫細胞、および好ましくは患者への注入用の初代免疫細胞が本明細書において記載される。

【 0 1 3 5 】

本発明による免疫細胞は、治療適応症およびレシピエント患者に応じて、[CAR]陽性、[CAR]陰性、[TCR]陽性、または[TCR]陰性であってよい。1つの好ましい局面において、免疫細胞は同種異系移植についてさらに[TCR]陰性にされる。これは、特にTRAC (TCRアルファをコードする遺伝子座)のようなTCRの少なくとも1つの構成要素をコードする少なくとも1つの内因性配列の遺伝的破壊によって、好ましくはキメラ抗原受容体(CAR)もしくは組み換えTCR、またはその構成要素をコードする外因性配列の組み込みによって達成することができる。

30

【 0 1 3 6 】

本発明のさらなる局面によれば、免疫細胞は、変異GP130のような、IL-6受容体ファミリーのサイトカイン受容体と会合し、好ましくはそれを妨げうるポリペプチドをコードする外因性配列でトランスフェクションされる。特に、本発明は、インターロイキン-6 (IL-6)シグナル伝達を妨害すること、および理想的には遮断することにより、サイトカイン放出症候群(CRS)を軽減させることを目的とする、可溶性変異GP130を分泌する免疫細胞、好ましくはT細胞を提供する。CRSは、形質導入された免疫細胞がインビボで活性化し始めるときに現れる自己免疫につながる細胞免疫療法の周知の合併症である。IL-6のその受容体IL-6Rへの結合後、複合体はGP130サブユニットと会合し、シグナル伝達および炎症応答のカスケードを開始する。特定の局面によれば、IgG1抗体のFc部分に融合されたGP130の細胞外ドメインを含む二量体タンパク質(sgp130Fc)が、操作された免疫細胞において発現されて可溶性IL-R/IL-6複合体に特異的に結合しIL-6トランスシグナル伝達の部分的または完全遮断を達成する。本発明はしたがって、免疫細胞がsgp130Fcのような、IL-6受容体ファミリーのサイトカイン受容体と会合し、好ましくはそれを妨げうる可溶性ポリ

40

50

ペプチドを発現するように遺伝的に修飾される、免疫療法においてCRSを制限するための方法に言及する。好ましい局面によれば、IL-6受容体ファミリーのサイトカイン受容体と会合し、好ましくはそれを妨げうる可溶性ポリペプチドをコードするこの配列は、内因性プロモーターの制御下に、好ましくは以下の表から選択されるもの、より具体的にはPD1、CD25またはCD69のような、T細胞活性化に応答する1つの遺伝子座の位置に組み込まれる。ベクターのポリヌクレオチド配列、外因性コード配列および/または内因性遺伝子座に相同的な配列を含むドナー鋳型、得られた操作細胞に関する配列、ならびに該操作細胞の検出を可能にするものは全て本開示の一部である。

【0137】

本発明は、ゲノムTCR遺伝子(TRAC遺伝子)の定常領域が、レアカットエンドヌクレアーゼにより生成されかつアルファベータTCRの細胞表面発現に影響を与える遺伝子改変を含み、該ゲノムTRAC遺伝子が5'から3'方向に、

- (a) 該ヒトゲノムTRAC遺伝子上流の5'領域、
- (b) レアカットエンドヌクレアーゼ用の認識ドメイン、
- (c) アルファベータTCRの細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインの細胞表面発現に影響を与える野生型TRAC遺伝子と比較したギャップまたは挿入であって、挿入が、終止コドン、IRES、TRACオーブンリーディングフレームとインフレームの自己切断ペプチドをコードする配列のようなコード配列、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする配列、TCRをコードする配列、薬物に対する感受性を付与するタンパク質をコードする配列、薬物に対する耐性を付与するタンパク質をコードする配列、サイトカイン、終結配列、それらの組み合わせのような非コード配列から選択される外因性ポリヌクレオチドを含む、ギャップまたは挿入、
- (c') 任意で第2のレアカットエンドヌクレアーゼ認識ドメイン、
- (d) ゲノムTRAC遺伝子の3'領域

をさらに含む、エンドヌクレアーゼ改変内因性-TCR陰性ヒト細胞を提供する。
TCRはT細胞受容体を意味する。TRACはT細胞受容体アルファ定常領域を意味する。

【0138】

本発明によれば、エンドヌクレアーゼ改変内因性-TCR陰性ヒト細胞(以後、「細胞」または「ヒト細胞」)は、「ヒト細胞の集団」、好ましくは、初代細胞もしくはヒト初代細胞の集団、より好ましくは初代エンドヌクレアーゼ改変内因性-TCR陰性ヒト細胞もしくは初代エンドヌクレアーゼ改変内因性-TCR陰性ヒト細胞の集団であってよい。特定の態様において、本発明の細胞は、初代エンドヌクレアーゼ改変内因性-TCR陰性ヒト細胞または初代エンドヌクレアーゼ改変内因性-TCR陰性ヒトT細胞の集団である。

【0139】

本発明は、ゲノムTCR遺伝子(TRAC遺伝子)の定常領域が、TALENにより生成されかつアルファベータTCRの細胞表面発現に影響を与える遺伝子改変を含み、該ゲノムTRAC遺伝子が5'から3'方向に、

- (a) 該ヒトゲノムTRAC遺伝子上流の5'領域、
- (b) TALEN用の認識ドメイン、
- (c) アルファベータTCRの細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインの細胞表面発現に影響を与える野生型TRAC遺伝子と比較したギャップまたは挿入であって、挿入が、終止コドン、IRES、TRACオーブンリーディングフレームとインフレームの自己切断ペプチドをコードする配列のようなコード配列、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする配列、TCRをコードする配列、薬物に対する感受性を付与するタンパク質をコードする配列、薬物に対する耐性を付与するタンパク質をコードする配列、サイトカイン、終結配列、それらの組み合わせのような非コード配列から選択される外因性ポリヌクレオチドを含む、ギャップまたは挿入、
- (c') 任意で第2のTALEN認識ドメイン、
- (d) ゲノムTRAC遺伝子の3'領域

を含む、TALEN改変内因性-TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。

10

20

30

40

50

【0140】

特定の態様において、得られるTALEN改变内因性 -TCR陰性初代ヒト細胞は、適応されたガイド配列技法を用いて判定された場合に検出不能なレベルのオフサイト切断および以下の配列:

TTGTCCCACAGA-TATCCagaaccctgaccctgCCGTGTACCAAGCTGAGAGA

へのTALEN結合を含む。

【0141】

本発明は、ゲノムTCR遺伝子(TRAC遺伝子)の定常領域が、TALENにより生成されかつアルファベータTCRの細胞表面発現に影響を与える遺伝子改变を含み、該ゲノムTRAC遺伝子が5'から3'方向に、

(a) 該ヒトゲノムTRAC遺伝子上流の5'領域、

(b) 以下の配列

ttgtcccacagATATC, または ttgtcccacagATATCCAG

を含むTALEN用の認識ドメイン、

(c) アルファベータTCRの細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインの細胞表面発現に影響を与える野生型TRAC遺伝子と比較したギャップまたは挿入であって、挿入が、終止コドン、IRES、TRACオープンリーディングフレームとインフレームの自己切断ペプチドをコードする配列のようなコード配列、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする配列、TCRをコードする配列、薬物に対する感受性を付与するタンパク質をコードする配列、薬物に対する耐性を付与するタンパク質をコードする配列、サイトカイン、終結配列、それらの組み合わせのような非コード配列から選択される外因性ポリヌクレオチドを含む、ギャップまたは挿入、

(c') 任意で以下の配列

CCGTGTAC-CAGCTGAGA

を含む第2のTALEN認識ドメイン、

(d) ゲノムTRAC遺伝子の3'領域

を含む、TALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。

【0142】

本発明は、ゲノムTCR遺伝子(TRAC遺伝子)の定常領域が、TALENにより生成されかつアルファベータTCRの細胞表面発現に影響を与える挿入を含み、該ゲノムTRAC遺伝子が5'から3'方向に、

(a) 該ヒトゲノムTRAC遺伝子上流の5'領域、

(b) 以下の配列

ttgtcccacagATATC, または ttgtcccacagATATCCAG

を含むTALEN用の認識ドメイン、

(c) アルファベータTCRの細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインの細胞表面発現に影響を与える野生型TRAC遺伝子と比較した挿入であって、終止コドン、IRES、TRACオープンリーディングフレームとインフレームの自己切断ペプチドをコードする配列のようなコード配列、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする配列、TCRをコードする配列、薬物に対する感受性を付与するタンパク質をコードする配列、薬物に対する耐性を付与するタンパク質をコードする配列、サイトカイン、終結配列、それらの組み合わせのような非コード配列から選択される外因性ポリヌクレオチドを含む、挿入、

(c') 任意で以下の配列

CCGTGTAC-CAGCTGAGA

を含む第2のTALEN認識ドメイン、

10

20

30

40

50

(d) ゲノムTRAC遺伝子の3'領域
を含む、TALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。

【0143】

本発明は、ゲノムTCR遺伝子(TRAC遺伝子)の定常領域が、TALENにより生成されかつアルファベータTCRの細胞表面発現に影響を与える挿入を含み、該ゲノムTRAC遺伝子が5'から3'方向に、

- (a) 該ヒトゲノムTRAC遺伝子上流の5'領域、
- (b) 以下の配列

ttgtcccacagATATC, または ttgtcccacagATATCCAG

10

を含むTALEN用の認識ドメイン、

(c) アルファベータTCRの細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインの細胞表面発現に影響を与える野生型TRAC遺伝子と比較した挿入であって、IRES、キメラ抗原受容体(CAR)をコードするコード配列、終結配列を含む外因性ポリヌクレオチドを含む、挿入、

- (c') 任意で以下の配列

CCGTGTAC-CAGCTGAGA

を含む第2のTALEN認識ドメイン、

(d) ゲノムTRAC遺伝子の3'領域
を含む、TALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。

20

【0144】

本発明は、ゲノムTCR遺伝子(TRAC遺伝子)の定常領域が、TALENにより生成されかつアルファベータTCRの細胞表面発現に影響を与える挿入を含み、該ゲノムTRAC遺伝子が5'から3'方向に、

- (a) 該ヒトゲノムTRAC遺伝子上流の5'領域、
- (b) 以下の配列

ttgtcccacagATATC, または ttgtcccacagATATCCAG

を含むTALEN用の認識ドメイン、

(c) アルファベータTCRの細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインの細胞表面発現に影響を与える野生型TRAC遺伝子と比較した挿入であって、TRACオープンリーディングフレームとインフレームの自己切断ペプチド、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする配列、終結配列を含む、挿入、

30

- (c') 任意で以下の配列

CCGTGTAC-CAGCTGAGA

を含む第2のTALEN認識ドメイン、

(d) ゲノムTRAC遺伝子の3'領域
を含む、TALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。

40

【0145】

より具体的には、本発明は、ゲノムTRAC遺伝子中に以下の配列の1つを含むTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を提供する：

50

AAGTAGCCCTGCATTCAGGTTCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGCCGTGAACTTCACTGAAATCATGGCC
TCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTCTAAGATGCTAT
TTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTGTCCATCACTGGCATCTGGAC
TCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCCCTGATCCTTTGTCCCACAGATATCCAG
TCCGGTGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCGGGCCCCGGATCCコード

10

配列 TCTAGAGGGCCCGTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCCTTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTT
CCCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGACCCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTCTAACAAAATGAGGAAATTGCA
TCGCATTGTCAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGG
AAGACAATAGCAGGCATGCTGGGATGCGGTGGCTATGACTAGTGGCGAATTCCCGTGTACAGCTGAGAG
ACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGCTGCCTATTACCGATTTGATTCTAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGA
TTCTGATGTGTATATCACAGACAAACTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTGTC
CTGGAGCAACAAATCTGACTTGCATGTGCAAACGCCCTCAACAAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTCCCC
AGCCCAGGTAAGGGCAGCTTGGTGCCTCGCAGGCTGTTCTGCTTCAGGAA

20

配列中で下線を引いた配列は相同組み換えに用いられる内因性ゲノムTRAC遺伝子の配列であり、太字で斜体の配列は自己切断ペプチドをコードする配列に対応し、斜体の配列はポリA配列のような終結シグナルに対応し、コード配列は、タンパク質をコードする少なくとも1つのオープンリーディングフレームに対応し、該タンパク質は、例えばキメラ抗原受容体(CAR)であってよい;

30

40

50

AAGTAGCCCTGCATTCAGGTTCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCGTGAACGTTACTGAAATCATGGCC
TCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTCTAAGATGCTAT
TTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTACTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTGTCATCACTGGCATCTGGAC
TCCAGCCTGGGTTGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGCTTAACCTGATCCTTGTCCCACAGATATCCAG
TCCGGTGAGGGCAGAGGAAGTCTCTAACATCGGTGACGTGGAGGAGAATCGGGCCCCGGATCCGCTCTG
 CCCGTACCGCTCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGCACGCAGCAAGACCAGGAGGGGAGGCAGCTGCC
 CCTACAGCAACCCAGCCTGTGCAGCGGAGGCAGCGCAGCGCGGAGGGGTTAGCCAGGTGCAGCTGCAG
 CAGAGCGGCCCTGGCTGGTAAGCCAAGCCAGACACTGCTCTGACCTGCGCCATCAGCGCGATTCCGTGA
 GCTCCAACCTCGCCGCCTGGAATTGGATCAGGCAGTCCCTCTGGGCTGGAGTGGCTGGAAAGGACATAC
 TATCGGTCTAAGTGGTACAACGATTATGCCGTCTGTGAAGAGCAGAATACAATCAACCTGACACCTCAAAG
 AATCAGTTCTCTGCAGCTGAATAGCGTACACCAGAGGACACCGCCGTGTACTATTGCCAGGGAGGTGAC
 CGCGACCTGGAGGATGCCTTGACATCTGGGCCAGGGCACAATGGTACCGTGTAGCGGAGGAGGAGG
 ATCCGGAGGAGGAGGATCTGGCGCGCGCAGCGATATCCAGATGACACAGTCCCCATCCTCTGAGCGCCT
 CCGTGGCGACAGAGTGACAATCACCTGTAGGGCCTCCAGACCATCTGGTCTTACCTGAACGGTATCAGCAG
 AGGCCGGCAAGGCCCTAACCTGATCTACGCAGCAAGCTCCCTGCAGAGCGGAGTGCACAGATTCT
 GGCAGGGGCTCGGCACAGACTCACCTGACCATCTAGCCTGCAGGCCAGGGACTCGCCACCTACTATTGC
 CAGCAGTCTTATAGCATCCCCAGACATTGGCCAGGGACCAAGCTGGAGATCAAGGGAAAGCGGAGGGGAG
 GCAGCTGCCCTACAGCAACCCAGCCTGTGCAGCGGAGGCAGCGAGCTGCCACCCAGGGCACCT
 CTCCAACGTGTCCACCAACGTGAGCCAGCCAAGCCCACCCACCGCCTGTCCTTATTCAATCCTCCCTGT
 GCTCCACCAACCCAGCACCAAGGCCACCTACACCTGCACCAACCATGCCTCTCAGCCCTGAGCCTGAGA
 CCTGAGGCATGTAGGCCAGCAGCAGCAGGAGGAGCAGTCCATACAAGGGGCTGGATTTGCATGCGACATCTACAT
 CTGGGCACCTCTGGCAGGAACATGTGGCGTCTCTGCTCAGCCTGGTCATCACCTGACTGCAAGAGAGGCA
 GGAAGAAGCTGCTGTATCTCAAGCAGCCCTCATGCCCGTGCAGACAACCCAGGAGGAGGATGGCTGC
 TCCGTAGGTTCCAGAAGAGGGAGGAGGAGGATGTGAGCTGCGCGTGAAGTTCCGGTCTGCCGACGCAC

10

20

30

40

50

CTGCATACCAGCAGGCCAGAACAGCTGTATAACGAGCTGAATCTGGGCCGGAGAGAGGAGTACGATGTGCT
GGACAAGAGGCGCGCAGAGATCCAGAGATGGCGGCAAGCCCCGGAGAAAGAACCTCAGGAGGGCCTGT
ACAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCGAGGCCTATTCTGAGATCGGCATGAAGGGAGAGAGGCGCCGG
GCAAGGGACACGACGGACTGTACCAGGGACTGAGCACGCCACCAAGGATACTATGACGCCCTGCATATGCAG
GCACTGCCTCCAAGGTGATCTAGAGGGCCCGTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTAGTTGCCAG
CCATCTGTTGTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCCTGACCCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCCCTTCTAATAAAAT
GAGGAAATTGCATGCATTGTCAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGG
GGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGATGCGGTGGCTATGACTAGTGGGAATTCCCGTGT
ACCAAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGCTGCCTATTCACCGATTTGATTCTAAACAAATGTGTC
ACAAAGTAAGGATTCTGATGTATATCACAGACAAACTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAA
CAGTGCTGTGCCCTGGAGCAACAAATCTGACTTGCATGTGCAAACGCCTCAACAAACAGCATTATTCCAGAAGA
CACCTTCTTCCCCAGCCAGGTAAGGGCAGCTTGGTGCCTCGCAGGCTGTTCTGCTTCAGGAA

、(またはSEQ ID NO:9)、
(CD22 B-B7 QR3)

10

20

30

40

50

AAGTAGCCCTGCATTCAGGTTCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCGTGAACGTTACTGAAATCATGGCC
TCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTCTAAGATGCTAT
TTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTGTCCATCACTGGCATCTGGAC
TCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCTAACCTGATCCTGTCCCACAGATATCCAG
TCCGGTGAGGGCAGAGGAAGTCTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCGGGCCCCGGATCCGCTCTG
 CCCGTACCGCTCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGCACGCCGCCAGACCCGGGGAGGAGGCTTGCAGCTGCAGCA
 CTACAGCAACCCAGCCTGTGCTCTGGCGGCCGGCAGCGGAGGCGGGCTCCAGGTGCAGCTGCAGCA
 GAGCGGCCCTGGCTGGAGCCAAGCCAGACACTGTCCCTGACCTGCCATCTGGCACAGCGTGAGC
 TCCAACAGCGCCGCATGGAATTGGATCAGGCAGTCCCCATCTGGGCTGGAGTGGCTGGCAGAACATACTA
 TAGGTCCACCTGGTACAACGACTATGCCGGCTCGTGAAGTCTCGCATCACAAATCAACCCGATACCAGCAAGAA
 TCAGTTCTCCCTGCAGCTGACATCTGTGACCCCTGAGGACACAGCGTGTACTATTGCACCAGAACAGCAGGACAA
 TACATTGGGAATGGACGTGTGGGACAGGGCACACTGGTGACCGTGAGCGGAGGAGGAGGATCCGGCG
 20 AGGAGGCTCTGGCGGCCGGCAGCGACATCCAGCTGACCCAGTCCCTCTAGCCTGAGCGCCTCGTGGC
 GATAGAGTACAATCACCTGTAGGGCTCTCAGAGCATCTCCTTACCTGAACGGTATCAGCAGAACAGCCGG
 AAGGCCCTAACGCTGCTACGAGCAAGCTCCCTGCAGCTGGAGTGCAAGCAGATTCTCCGGCTCTGG
 CAGCGGCACCGACTTACACTGACCATCTAGCCTGCAGCCTGAGGATTGCCACATACTATTGCCAGCAGTCC
 TATTCTACACCACTGACCTTGGCGGCCGACCAAGGTGGAGATCAAGGGAAAGCGGCCGGCGGAAGTTGTC
 CATATTCAAACCCAAAGTCTGTGCAGCGGCCGGAGGAGGAAGCGAACTGCCTACTCAGGGAACCTCAGCAACGT
 30 GTCCACCAATGTGAGCCCAGCAAAGCTTACCAACCGCATGCCACTCTAACCCAGCCTGTGCACAACCA
 ACCAGCACCCAGGCCCTACCCCTGCACCAACAATGCCCTCCAGCCTCTGCGGCCAGAGGCCCTGCAG
 ACCCGCCGCCGGCGGAGCAGTCACACACGGGCCTGGACTTGCCTGTGATATCTATCTGGCACCAACTGG
 CCGGAACATGTGGCGTGTGCTGTCAGTGTACTGGTATTACACTGTACTGTAAGCGAGGCCGGAAGAAACTGCTGT
 ATATTTCAAACAGCCTTATGAGACCTGTGCAGACTACCCAGGAGGAAGACGGCTGCAGCTGTAGGTTCCCG
 AGGAAGAGGAAGGCAGGGTGTGAGCTGAGGGCAAGTTAGCCCTCCGCAGATGCCCTGCTTACCAAGCAGG
 GGCAGAACATCAGCTGTATAACGAGCTGAATCTGGGACGGAGAGAGGAATACGACGTGCTGGATAAAAGGCGCG
 40

GAGAGACCCGAAATGGGAGGCAGGCCACGACGGAAAAACCCCAGGAGGGCCTGTACAATGAACGTGAGAA
 GGACAAAATGGCAGAGGCCTATAGTGAATCGGGATGAAGGGAGAGAGAAGGCAGGCAAAGGGCACGATG
 GCCTGTACCAGGGGCTGTCTACTGCCACCAAGGACACCTATGATGCTCTGCATATGCAGGCAGTGCCTCAAGGT
 GATCTAGAGGGCCCGTTAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCC
 CTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCCTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGC
 ATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGAAAGA
 CAATAGCAGGCATGCTGGGATCGGGTGGCTATGACTAGTGGCGAATTCCCGTGTACAGCTGAGAGACTCT
AAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTACCGATTGATTCTAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCTG
ATGTGTATATCACAGACAAAATGTGCTAGACATGAGGTCTATGACTCAAGAGCAACAGTGTGTCAGCCTGGGA
GCAACAAATCTGACTTGCATGTCAAACGCCCTCAACACAGCATTATTCCAGAAGACACCTCTCCCCAGCCC
AGGTAAGGGCAGCTTGGTGCCTCGCAGGCTGTTCTGCTTCAGGAA, (SEQ ID N° 10)

(CD 22 A-D 4 QR 3)
AAGTAGCCCTGCATTCAGGTTCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCGAACGTTACTGAAATCATGGCC
TCTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTCTAAGATGCTAT
TTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTGTCCATCACTGGCATCTGGAC
TCCAGCCTGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCCGTGATCCTTGTCCCACAGATATCCAG
TCCGGTGAGGGCAGAGGAAGTCTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCGGGCCCCGGATCCGCTCTG
CCCGTCACCGCTCTGCTGCCACTGCCCTGCTGCACGCCGCCAGACCCGGCGGAGGAGGCTTGGCC
CTACAGCAACCCAGCCTGTGCTCTGGCGCGCGCAGCGGAGGCGGCTCCAGGTGCAGCTGCAGCA
GAGCGGCCCCGGCTGGTAAGCCTAGCCAGACACTGTCCTGACCTGCGCAATCTCCGGCGACAGCGTGTCCG
GAAACAGGGCCACATGGAATTGGATCAGACAGTCTCCAAGCAGGGCCTGGAGTGGCTGGAAAGGACCTACTA
TCGGTCCGCTGGTACAACGACTATGCCGTGTGAAGGGCCGATCACATTCAACCCAGATAACCAGCAAGAA
TCAGTTTCCCTGCAGCTGAATTCTGTGACACCCGAGGATACCGCCGTGTACTATTGCGCCAGAGGCGAGAGCG
GAGCAGCAGCAGACGCCCTCGATATCTGGGGCCAGGGCACCACAGTGACAGTGAGCGGAGGAGGAGGATCCG
CGGGAGGAGGCTCTGGCGCGCGCAGCGACATCCAGCTGACCCAGAGCCCACCTCCCTGTCTGCCAGCGT

10

20

30

40

50

GGGCGATCGCGTACAATCACCTGTCGGGCCTCCAGTCTATCAGCTCCTACCTGAACGGTATCAGCAGAAGCC
 AGGCAAGGCCCCAAGCTGCTGATCTACGCAGCATCTGCAGCTGCAGTCTGGAGTGCCAAGCAGATTAGCGGAT
 CGGGATTGGCACAGACTTACACTGACCATCTCCTCTGCAGCCGAGGATTCGCCACCTACTATTGCCAGCA
 GTCTTATAGCACACCTCAGACCTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGACATCAAGGGAAGTGGAGGAGGAGGAAG
 TTGTCCTACTCAAACCCATCTGTGCTCAGGAGGAGGAAGTGAACGCCTACTCAGGGAACATTAGCA
 10 ACGTGTCCACCAATGTGAGCCCAGCAAAGCCTACCACAACCGATGCCATACTCTAACCCAGCCTGTGCACAA
 CCACACCAGCACCCAGGGCCCTACCCCTGCACCAACAATGCCTCCCAGCCTGTCTGCCAGAGGCCT
 GCAGACCCGCCGGAGCAGTGCACACACGGGCTGGACTTGCCGTGATATCTATATCTGGCACCA
 CTGGCCGGAACATGTGGCGTGCTGCTGTCACTGGCATTACACTGTACTGTAAGCGAGGCCGAAGAAACT
 GCTGTATTTCAAACAGCCTTATGAGACCTGTGCAGACTACCCAGGAGGAAGACGGCTGCAGCTGTAGGTT
 20 CCCCGAGGAAGAGGAAGGCCGGGTGAGCTGAGGGTCAAGTTAGCCGCTCCGAGATGCCCTGCTTACCA
 CAGGGGCAGAACATCAGCTGTATAACGAGCTGAATCTGGGACGGAGAGAGGAATACGACGTGCTGGATAAAAGGC
 GCAGGGAGAGACCCGAAATGGGAGGCAAGCCACGACGGAAAAACCCCAAGGAGGGCTGTACAATGAACG
 AGAAGGACAAATGGCAGAGGCCTAGTGAATCGGGATGAAGGGAGAGAGAAGGCGGGCAAAGGGCAC
 GATGGCCTGTACCAGGGCTGTACTGCCACCAAGGACACCTATGATGCTCTGCATATGCAGGCACGCC
 AGGTGATCTAGAGGGCCGTTAAACCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCCTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTT
 30 GCCCCTCCCCGTGCCTCCTGACCCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCCCTCTAATAAAATGAGGAATTGCA
 TCGCATTGCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGG
 AAGACAATAGCAGGCATGCTGGGATGCGGTGGCTCTATGACTAGTGGCAATTCCGTGTACAGCTGAGAG
ACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGCTGCCTATTACCGATTGATTCTAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGA
TTCTGATGTATATCACAGACAAACTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGC
CTGGAGCAACAAATCTGACTTGCATGTGCAAACGCCTCAACAAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTCTTCCC
AGCCCAGGTAAGGGCAGCTTGGCCTCGCAGGCTGTTCTGCTCAGGAA

、(またはSEQ ID NO: 11);

(CD123 K43 QR3)

AAGTAGCCCTGCATTCAGGTTCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCGTGAACGTTACTGAAATCATGGCC

TCTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGCCCTGAGTCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTCTAAGATGCTAT

10

20

30

40

50

TTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTGTCCATCACTGGCATCTGGAC

TCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCTAACCTGATCCTTGTCCCACAGATATCCAG

TCCGGTGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCGGGCCCCGGATCCGCTCTG

CCCGTCACCGCTCTGCTGCTGCCCTGCCCTGCTGCACGCAGCCAGACCAGGGCGGAGGAGGCTCTGAGGTGAAGCTGGTGG

TTACTCTAACCAAGCCTGTGCTCGGAGGAGGAGTCCGGGGAGGAGGCTCTGAGGTGAAGCTGGTGG

GAGCGGAGGAGGCCTGGTCAGCCTGGCGCTCCCTGCTCTGAGCTGCGCAGCATCCGGCTTACCTTACAG

ACTACTATATGTCTGGGTGAGACAGCCCCCTGGCAAGGCCCTGGAGTGGCTGGCCCTGATCAGGTCCAAGGCC

GATGGCTACACCACAGAGTATTCCGCCTGTGAAGGGCAGATTCACCTGTCTAGGGACGATAGCCAGTCCATC

CTGTACCTGCAGATGAATGCACTGCGCCCCGAGGACAGCGCCACATACTATTGTGCCAGAGACGCCGCCTACTAT

TCTTACTATAGCCCTGAGGGCGCTATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCTCCGTGACAGTGAGCTCCGGAGGAGG

AGGAAGCGGAGGAGGAGGAGGCTCCGGCGCGCGCTATGGCCACTATAAGGATATCGTATGACCCAGAGC

CACAAGTTATGTCTACAAGCGTGGCGACCGCGTGAACATCACCTGAAGGCCAGCCAGAATGTGGATTCCGC

CGTGGCCTGGTACCGAGCAGAAGCCTGGCCAGAGCCCTAACGGCCCTGATCTATTCCGCCTTACCGGTATAGCGG

AGTGCCTGACCGCTTACCGGAAGGGATCCGGAACAGACTTCACCTGACAATCTCTAGCGTGCAGGCCAG

GATCTGGCCGTGTACTATTGTCAGCAGTACTATAGCACCCCTGGACCTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGGAGATC

AAGAGAGGACTGGAGGAGGAGGAAGCTGCCACTTCAACCCCTCTGTGCAGCGGAGGAGGAGGAGGATCTG

AGCTGCCAACCCAGGGCACATTCCAACGTGTCTACAAATGTGAGCCCAGCAAAGCCAACCACAACCGCATGC

CCTTATAGCAATCCATCCCTGTGCACAACCACACCTGCACCAAGACCACCAACCCAGCACCTACAATGCCCTCTC

AGCCACTGAGCCTGCGCCCCGAGGCATGCCGCCTGCAGCAGCGCGCCGTGACACCAGGGCTGGACTT

CGCCTGCGATATCTACATCTGGCACCTCTGGCAGGAACCTGTGGCGTGTGCTGCTGAGCCTGGTATCACCCT

GTACTGCAAGAGAGGCAGGAAGAAGCTGCTGTATCTCAAGCAGCCCTTATGCGCCCTGTGAGACACCAC

AGGAGGAGGACGGCTGCAGCTGCGTCCCAGAAGAGGAGGAGGGCGGCTGTGAGCTGAGAGTGAAGTT

AGCAGGTCCGCCGATGCACCAAGCATACAGCAGGGACAGAACCCAGCTGTATAACGAGCTGAATCTGGCCGGA

GAGAGGAGTACGACGTGCTGGATAAGAGGAGGGGAAGGGACCCGAGATGGGAGGCAAGCCACGGAGAAA

GAACCCCCAGGAGGGCCTGTACAATGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTTACCGCCACAAAGGACACC

AAGGGAGAGAGGCGCCGGGCAAGGGACACGATGGCCTGTACCGAGGCCTGTCTACCGCCACAAAGGACACC

10

20

30

40

50

TATGATGCCCTGCATATGCAGGCACTGCCTCCAAGGTGATCTAGAGGGCCCGTTAAACCCGCTGATCAGCCTCG
 ACTGTGCCTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCCGTGCCTCCTGACCCCTGGAAGGTGCCACTCC
 CACTGTCCTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGG
 GTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGATGCGGTGGCTATG
 ACTAGTGGCGAATTCCGTGTACAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGCTGCCTATTACCGATTT
 TGATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTATATCACAGACAAACTGTGCTAGACATGAGG
TCTATGGACTTCAAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTGCATGTGCAAACGCCTCAAC
AAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTGGTGCCTCGCAGGCTGTTCC
 CTTGCTTCAGGAA, SEQ ID N° 12

◦

【0146】

挿入は、SEQ ID NO : 9と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%～80%の同一性を有する配列を含みうる。

【0147】

挿入は、SEQ ID NO : 10と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%～80%の同一性を有する配列を含みうる。

【0148】

挿入は、SEQ ID NO : 11と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%～80%の同一性を有する配列を含みうる。

【0149】

挿入は、SEQ ID NO : 12と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%～80%の同一性を有する配列を含みうる。

【0150】

挿入は、SEQ ID NO : 9と少なくとも80%の同一性を有する配列を含みうる。

【0151】

挿入は、SEQ ID NO : 10と少なくとも80%の同一性を有する配列を含みうる。

【0152】

挿入は、SEQ ID NO : 11と少なくとも80%の同一性を有する配列を含みうる。

【0153】

挿入は、SEQ ID NO : 12と少なくとも80%の同一性を有する配列を含みうる。

【0154】

挿入は、SEQ ID NO : 9と少なくとも90%の同一性を有する配列を含みうる。

【0155】

挿入は、SEQ ID NO : 10と少なくとも90%の同一性を有する配列を含みうる。

【0156】

挿入は、SEQ ID NO : 11と少なくとも90%の同一性を有する配列を含みうる。

【0157】

挿入は、SEQ ID NO : 12と少なくとも90%の同一性を有する配列を含みうる。

10

20

30

40

50

【0158】

挿入は、SEQ ID NO：9と少なくとも95%の同一性を有する配列を含みうる。

【0159】

挿入は、SEQ ID NO：10と少なくとも95%の同一性を有する配列を含みうる。

【0160】

挿入は、SEQ ID NO：11と少なくとも95%の同一性を有する配列を含みうる。

【0161】

挿入は、SEQ ID NO：12と少なくとも95%の同一性を有する配列を含みうる。

【0162】

特定の態様において、挿入は、CARの所望の機能、すなわち本明細書において列挙される標的のいずれか1つ、好ましくは疾患に直接的または間接的に関与する病的細胞の表面で発現される抗原への結合を有するCARをコードする配列を含みうる。

10

【0163】

細胞

細胞とは、任意の真核生細胞、任意の初代細胞または細胞株を意図する。

【0164】

「初代細胞」とは、集団倍加をほとんど受けていない、それゆえ、連続的な腫瘍形成性のまたは人工的に不死化された細胞株と比較して、それらが由来する組織の主な機能的成分および特徴をいっそう表す、生きた組織(すなわち血液を含む生検材料)から採取(単離)され、増殖のために樹立された細胞、細胞の均質集団を意図する。

20

【0165】

上記態様のいずれか1つに記載の本発明の細胞(すなわち、TALEN改变内因性 -TCR 陰性ヒト初代細胞)は、ヒトT細胞、ヒトT細胞に由来するヒト細胞、ヒトリンパ系細胞、ヒト幹細胞、ヒト前駆細胞、ヒト人工多能性幹細胞(iPSC)、ヒト胚性幹細胞、ヒト間葉系幹細胞(MSC)、ヒト造血幹細胞(HSC)であってよい。

【0166】

好ましくは、本発明の態様のいずれかに記載の細胞(TALEN改变内因性 -TCR 陰性ヒト初代細胞)は、(最終的には)ヒトT細胞、より好ましくはヒトリンパ系T細胞、ヒト前駆T細胞、ヒトCD4+ T細胞、ヒトCD8+ T細胞、ヒト調節性T細胞、ヒトNKT細胞、ヒトナイーブT細胞、ヒト記憶T細胞、ヒトTIL、それらの組み合わせであってよい。

30

【0167】

好ましい態様において、本発明の細胞またはヒト細胞は、TALEN改变内因性 -TCR 陰性ヒト初代細胞である。

【0168】

より好ましい態様において、本発明の細胞またはヒト細胞は、TALEN改变内因性 -TCR 陰性ヒト初代T細胞である。

【0169】

本発明のヒト細胞は、さらにより好ましくは、血液もしくは組織から単離された初代ヒトT細胞または血液もしくは組織から単離され、操作される前および/もしくは操作された後の数回の継代の間にインビトロで培養された初代ヒトT細胞の集団であってよい。

40

【0170】

特定の態様において、本発明のヒトT細胞は、ヒトT細胞株、初代ヒトT細胞株であってよく、初代ヒトT細胞株は1つのヒト初代細胞またはヒト初代細胞の均質集団に由来することを意味する。

【0171】

特定の態様において、本発明のヒト細胞は、該ヒト細胞を含むヒト細胞の集団の一部である。

【0172】

特定の態様において、本発明のヒト細胞は、ヒト細胞の集団、好ましくはヒト免疫細胞の均質集団、より好ましくはヒトT細胞の均質集団、さらにより好ましくは細胞溶解活性

50

を有するヒト細胞の均質集団である。

【0173】

特定の態様において、本発明のヒト細胞は、ヒト初代細胞の集団、好ましくはヒト免疫初代細胞の均質集団、より好ましくはヒト初代T細胞の均質集団、さらにより好ましくは細胞溶解活性を有するヒト初代T細胞の均質集団である。

【0174】

本発明のヒト細胞は操作されており、これは、該ヒト細胞がエンドヌクレアーゼ、好ましくはレアカットエンドヌクレアーゼ、より好ましくはTALEN、CRISPR CAS9、メガヌクレアーゼ、MegaTAL、Zn Finger、またはそれらの組み合わせから選択されるレアカットエンドヌクレアーゼにより、さらにより好ましくは少なくともTALENにより誘導される、ゲノムDNAへの、遺伝子改変、特に外因性ポリヌクレオチドの挿入を含むことを意味する。

10

【0175】

好ましい態様において、本発明のヒト細胞は操作されており、これは、該ヒト細胞が少なくとも1つの遺伝子改変、好ましくはTRAC遺伝子に影響を与える挿入であって、CARをコードする外因性ポリヌクレオチドを含む該挿入を含み、該細胞がCARを細胞表面に、および検出不能なレベルのアルファベータTCRを細胞表面に発現することを意味する。

【0176】

好ましい態様において、本発明のヒト細胞は操作されており、これは、該ヒト細胞が少なくとも1つの遺伝子改変、好ましくはTRAC遺伝子に影響を与える挿入であって、TCRをコードする外因性ポリヌクレオチド(ここでは外因性TCR)を含む該挿入を含み、該細胞が該外因性TCRを細胞表面に、および検出不能なレベルのアルファベータTCRを細胞表面に発現することを意味する。

20

【0177】

特定の態様において、本発明のヒト細胞は操作されており、これは、該ヒト細胞が少なくとも1つの遺伝子改変、好ましくはTRAC遺伝子内の挿入であって、タグまたはタンパク質をコードする外因性ポリヌクレオチドを含む該挿入を含み、該挿入は内因性TCRが翻訳および形質導入され、細胞表面で発現されるのを妨げず、該細胞が該内因性TCRを細胞表面で発現することを意味する。

【0178】

30

1. ゲノムTCR遺伝子(TRAC遺伝子)の定常領域が、TALENにより生成されかつ内因性アルファベータTCRの細胞表面発現に影響を与える遺伝子改変を含み、該ゲノムTRAC遺伝子が5'から3'方向に、

(a) 該ヒトゲノムTRAC遺伝子上流の5'領域、

(b) 半TALEN用の認識ドメイン、

(c) アルファベータTCRの細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインの細胞表面発現に影響を与える野生型TRAC遺伝子と比較したギャップまたは挿入であって、挿入が、終止コドン、IRES、TRACオープンリーディングフレームとインフレームの自己切断ペプチドをコードする配列のようなコード配列、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする配列、TCRをコードする配列、薬物に対する感受性を付与するタンパク質をコードする配列、薬物に対する耐性を付与するタンパク質をコードする配列、サイトカイン、終結配列、それらの組み合わせのような非コード配列から選択される外因性ポリヌクレオチドを含む、ギャップまたは挿入、

40

(c') 任意でもう一方の半TALEN用の認識ドメイン、

(d) ゲノムTRAC遺伝子の3'領域

を含む、TALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞。

【0179】

ガイド配列分析による検出未満のレベルのオフターゲット切断を含む請求項1記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞が提供される。

【0180】

50

2. ヒト初代細胞がヒト初代T細胞、またはヒトリンパ系初代細胞、またはヒト初代幹細胞、またはヒト初代前駆細胞である、請求項1記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞。

【0181】

3. ヒト初代細胞がヒト初代T細胞またはヒト初代T細胞の集団である、請求項1～2のいずれか一項記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞。

【0182】

4. ヒトT初代細胞またはその集団がヒト初代CD8 T細胞、ヒト初代CD4 T細胞、それらの組み合わせを含むかまたはそれからなる、請求項1～3のいずれか一項記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞。

【0183】

5. TALEN用の認識ドメインが以下の配列
ttgtcccacagATATC, またはttgtcccacagATATCCAG

および任意で

CCGTGTACCAAGCTGAGA

を含む、請求項1～4のいずれか一項記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞

。

【0184】

6. TRAC遺伝子中の以下の配列:

AAGTAGCCCTGCATTCAGGTTCCCTGAGTGGCAGGCCAGGCCGTGAACTGTTCACTGAAATCATGGCC
TCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTCTAAGATGCTAT
TCCTCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTGTCCATCACTGGCATCTGGAC
TCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCTGATCCTTGTCCCACAGATATCCAG
TCCGGTGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAACCGGGCCCCGGATCC コード

配列 TCTAGAGGGCCCGTTAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTT

GCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCCTGACCCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCCCTTCTAACAAAATGAGGAAATTGCA

TCGCATTGTCAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGG

AAGACAATAGCAGGCATGCTGGGATGCGGTGGCTATGACTAGTGGCGAATTCCGTGTACAGCTGAGAG

ACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGCTGCCTATTACCGATTTGATTCTAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGA

TTCTGATGTGTATATCACAGACAAAATGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGC

CTGGAGCAACAAATCTGACTTGCATGTGCAAACGCCTCAACAAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTCCCC

AGCCCAGGTAAGGGCAGCTTGGTGCCTCGCAGGCTGTTCCCTGCTTCAGGAA

を含む、請求項1～5のいずれか一項記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞

。

【0185】

TALEN用の認識ドメインが相同性アーム、TRACオープンリーディングフレームとイン

10

20

30

40

50

フレームの自己切断ペプチド、好ましくは2Aペプチドをコードする配列のような、タンパク質をコードする配列；キメラ抗原受容体(CAR)、好ましくはCAR、より好ましくは抗CD123 CARまたは抗CD22 CARをコードする配列；TCRをコードする配列、薬物に対する感受性を付与するタンパク質をコードする配列、薬物に対する耐性を付与するタンパク質をコードする配列、サイトカイン、終結配列を含む、請求項1～5のいずれか一項記載のTALEN改变内因性-TCR陰性ヒト初代細胞。

【0186】

好ましい態様において、コード配列の後にはBGHポリAのような終結配列が続く。

【0187】

7. CAR配列が抗CD22 CAR配列、抗CD123 CAR配列、抗CD30 CAR配列、抗HSP-70 CAR配列、抗 α -アセチル-GD2 CAR配列、抗CS-1 CAR配列、抗CLL-1 CAR配列、抗CD38 CAR配列、抗5T4 CAR配列、抗MUC1 CAR配列、抗FAP CAR配列、抗HER2 CAR配列、抗CD79a CAR配列、抗CD79b CARを含む、請求項1～6のいずれか一項記載のTALEN改变内因性-TCR陰性ヒト初代細胞。

【0188】

ポリヌクレオチド配列が以下の配列：SEQ ID NO：9、SEQ ID NO：10、SEQ ID NO：11、SEQ ID NO：12の1つを含む、請求項1～7のいずれか一項記載のTALEN改变内因性-TCR陰性ヒト初代細胞。

【0189】

ポリヌクレオチド配列が、それぞれ：

AAGTAGCCCTGCATTCAGGTTCCCTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACTGAAATCATGGCC
TCTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTCTAAGATGCTAT
TTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTGTCCATCACTGGCATCTGGAC
TCCAGCCTGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCTGATCCTTGTCCCACAGATATCCAG
TCCGGTGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCGGGCCCCGGATCCGCTCTG
CCCGTCACCGCTTGCTGCCACTGGCCCTGCTGCACGCAGCAAGACCAGGAGGGGGAGGCAGCTGCC
CCTACAGCAACCCCAGCCTGTGCAGCGGAGGCAGCGGGAGGGGGTAGCCAGGTGCAGCTGCAG
CAGAGCGGCCCTGGCCTGGTAAGCCAAGCCAGACACTGTCCTGACCTGCGCCATCAGCGCGATTCCGTGA
GCTCCAACCTCGCCGCCTGGAATTGGATCAGGCAGTCCCTCTGGGGCCTGGAGTGGCTGGGAAGGACATAC
TATCGGTCTAAGTGGTACAACGATTATGCCGTCTGTGAAGAGCAGAATCACAATCAACCTGACACCTCCAAG
AATCAGTTCTCTGCAGCTGAATAGCGTGACACCAGAGGACACCGCCGTGACTATTGCGCCAGGGAGGTGAC
CGGCGACCTGGAGGATGCCTTGACATCTGGGCCAGGGCACAATGGTGACCGTGTAGCGGAGGAGGAGG

10

20

30

40

50

ATCCGGAGGAGGAGGATCTGGCGGCGGCGGAGCGATATCCAGATGACACAGTCCCCATCCTCTGAGCGCCT
 CCGTGGCGACAGAGTGACAATCACCTGTAGGGCTCCAGACCATCTGGTCTACCTGAACAGTGGTACAGCAG
 AGGCCCCGCAAGGCCCCTAATCTGCTGATCTACGAGCAAGCTCCCTGCAGAGCGGAGTGCACAGATTCTC
 GGCAGGGGCTCCGGCACAGACTTCACCCCTGACCATCTAGCCTGCAGGCCAGGACTTCGCCACCTACTATTG
 CAGCAGTCTTATGCATCCCCAGACATTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGGGAAAGCGGAGGGGAG
 GCAGCTGCCCTACAGCAACCCAGCCTGTGCAGCGGAGGCCAGCGAGCTGCCACCCAGGGCACCT
 CTCCAACGTGTCCACCAACGTGAGCCAGCCAAGCCCACCAACCGCCTGCTTATTCAATCCTCCGTGT
 GCTCCCACCAACCCAGCACCAAGGCCACCTACACCTGCACCAACCATGCCCTCAGCCCTGAGCCTGAGA
 CCTGAGGCATGTAGGCCAGCAGCAGGAGGAGCAGTCATACAAGGGTCTGGATTTGCATGCGACATCTACAT
 CTGGCACCTCTGGCAGGAACATGTGGCGTGCCTGCTCAGCCTGGTCATCACCTGTACTGCAAGAGAGGCA
 GGAAGAAGCTGCTGTATATCTCAAGCAGCCCTCATGCGCCCCGTGCAGACAACCCAGGAGGAGGATGGCTGC
 TCCTGTAGGTTCCAGAAGAGGAGGAGGAGGATGTGAGCTGCGCGTGAAGTTTCCGGTCTGCCACGCAC
 CTGCATACCAGCAGGGCCAGAACCCAGCTGTATAACGAGCTGAATCTGGCCGGAGAGAGGAGTACGATGTGCT
 GGACAAGAGGCCGGCAGAGATCCAGAGATGGCGCAAGCCCCGGAGAAAGAACCTCAGGAGGGCCTGT
 ACAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCGAGGCCTATTCTGAGATCGGCATGAAGGGAGAGAGGCCGGG
 GCAAGGGACACGACGGACTGTACCAGGGACTGAGCACAGCCACCAAGGATAACCTATGACGCCCTGCATATGCAG
 GCACTGCCTCCAAGGTGATCTAGAGGGCCGTTAAACCCGCTGATCAGCCTGACTGTGCCCTAGTTGCCAG
 CCATCTGTTGTTGCCCTCCCCGTGCCCTTGAACCTGGAAAGGTGCCACTCCACTGTCCTTCTAATAAAAT
 GAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGG
 GGGAGGATTGGAAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGATGCGGTGGCTATGACTAGTGGCAATTCCGTGT
ACCAAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGCTGCCATTACCGATTGATTCTCAAACAAATGTGTC
ACAAAGTAAGGATTCTGATGTATATCACAGACAAACTGTGCTAGACATGAGGTCTATGACTCAAGAGCAA
CAGTGCCTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTGCATGTGCAAACGCCCTCAACAAACAGCATTATCCAGAAGA
CACCTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTGGTGCCTCGCAGGCTTGCAGGAA,
 AAGTAGCCCTGCATTCAAGGTTCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCGTGAACGTTACTGAAATCATGCC
 TCTGGCCAAGATTGATAGCTGTGCCTGCCCAGTCCAGTCAACGAGCTGGTTCTAAGATGCTAT

10

20

30

40

50

TTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTGTCCATCACTGGCATCTGGAC
 TCCAGCCTGGTTGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCTAACCTGATCCTTGTCCCACAGATATCCAG
 TCCGGTAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCGGCCCGGATCCGCTCTGC
 CCGTCACCGCTCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGCTGACGCCAGACCCGGCGGAGGAGGCTTGGCCCC
 TACAGCAACCCAGCTGTGCTCTGGGGCGGCAGCGGAGGCGGCCAGCTCCAGGTGCAGCTGCAGCAG
 AGCGGCCCTGGCTGGTGGAGCCAAGCCAGACACTGTCCCTGACCTGCGCCATCTGGCGACAGCGTGAGCTC
 CAACAGCGCCGATGGAATTGGATCAGGCAGTCCCCATCTCGGGCCTGGAGTGGCTGGCAGAACATACTATA
 GGTCCACCTGGTACAACGACTATGCCGGCTCCGTGAAGTCTCGCATCACAATCAACCCGATACCAGCAAGAAC
 AGTTCTCCCTGCAGCTGACATCTGTGACCCCTGAGGACACAGCCGTACTATTGCACCAGAACAGCAGGACA
 CATTTCGGGAATGGACGTGTGGGACAGGGCACACTGGTGACCGTGAGCGGAGGAGGAGGATCCGGCGGA
 GGAGGCTCTGGCGGCGGCCAGCGACATCCAGCTGACCCAGTCCCCTCTAGCCTGAGCGCCTCCGTGGCG
 ATAGAGTGACAATCACCTGTAGGGCCTCTAGAGCATCTCTTACCTGAACGGTATCAGCAGAACCCGGCA
 AGGCCCTAAGCTGCTGATCTACGCAAGCTCCCTGCAGTCTGGAGTGCCAAGCAGATTCTCCGGCTCTGGC
 AGCGGCACCGACTTACACTGACCATCTAGCCTGCAGCCTGAGGATTCGCCACATACTATTGCCAGCAGTC
 ATTCTACACCACTGACCTTGGCGGCGCACCAAGGTGGAGATAAGGAAGCGCGGGCGGAGGAAAGTTGTCC
 ATATTCAAACCCAAGTCTGTGCAGCGCGGAGGAGGAAGCGAAGTGCCTACTCAGGGAACCTTCAGCAACGTG
 TCCACCAATGTGAGCCCAGCAAAGCCTACCAACCGCATGCCACTCTAACCCAGCCTGTGCACAACCACA
 CCAGCACCCAGGCCCCCTACCCCTGCACCAACAATGCCCTCCAGCCTCTGCGGCCAGAGGCCCTGCAGA
 CCCGCCGCCGGAGCAGTCACACACGGGCCTGGACTTGCCTGTGATATCTATCTGGCACCACTGGC
 CGAACATGTGGCGTGTGCTGTCACTGGTCAATTACACTGTACTGTAAGCGAGGCCGAAGAAACTGCTGTA
 TATTTCAAACAGCCTTATGAGACCTGTGAGACTACCCAGGAGGAAGACGGCTGCAGCTGTAGGTTCCCCG
 AGGAAGAGGAAGGCGGGTGTGAGCTGAGGGTCAAGTTAGCCGCTCCGAGATGCCCTGCTTACCGAGG
 GGCAGAACATCAGCTGTATAACGAGCTGAATCTGGACGGAGAGAGGAATACGACGTGCTGGATAAAAGGCG
 GAGAGACCCGAAATGGGAGGCAAGCCACGACGGAAAAACCCCAGGAGGGCCTGTACAATGAACACTGCAGA
 GGACAAAATGGCAGAGGCCATAGTGAATCGGGATGAAGGGAGAGAGAAGGCGCGGAAAGGGCACGATG
 GCCTGTACCAAGGGCTGTACTGCCACCAAGGACACCTATGATGCTCTGCATATGCAGGCACTGCCTCCAAGGT

10

20

30

40

50

GATCTAGAGGGCCCGTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCCTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCC

CTCCCCCGTGCCTTCCTGACCTGGAAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGC

ATTTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGA

CAATAGCAGGCATGCTGGGGATCGGGTGGCTATGACTAGTGGCAATTCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCT

AAATCCAGTGACAAGTCTGCTGCCTATTACCGATTGATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTG

ATGTGTATATCACAGACAAAATGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTGTGGCCTGGA

GCAACAAATCTGACTTGCATGTGCAAACGCCTCAACAAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTCCCCAGCCC

AGGTAAGGGCAGCTTGGTGCCTCGCAGGCTGTTCTGCTTCAGGAA,

AAGTAGCCCTGCATTTCAGGTTCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCCTGGCGTAACGTTACTGAAATCATGGCC

TCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGCCCTGAGTCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTCTAAGATGCTAT

TTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTGTCCATCACTGGCATCTGGAC

TCCAGCCTGGTTGGGCAAAGAGGAAATGAGATCATGCTTAACCTGATCCTCTGTCCCACAGATATCCAG

TCCGGTGAGGGCAGAGGAAGTCTTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCGGGCCCCGGATCCGCTCTGC

CCGTCACCGCTCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGTCACGCCAGACCCGGCGAGGGAGGCTTGGCC

TACAGCAACCCCAGCCTGTGCTCTGGCGGCCGGCAGCGGAGGCAGGCTCCAGGTGCAGCTGCAGCAG

AGCGGGCCCCGGCCTGGTAAGCCTAGCCAGACACTGCTCCCTGACCTGCGCAATCTCCGGGACAGCGTGTCCG

AAACAGGGCCACATGGAATTGGATCAGACAGTCTCCAAGCAGGGCCTGGAGTGGCTGGGAAGGACCTACTAT

CGGTCCGCCTGGTACAACGACTATGCCGTGTGTAAGGGCCGATCACATTCAACCCAGATAACCAGAAGAAT

CAGTTTCCCTGCAGCTGAATTCTGTGACACCCGAGGATACGCCGTGTACTATTGCGCCAGAGGCGAGAGCGG

AGCAGCAGCAGACGCCCTCGATATCTGGGCCAGGGCACCACAGTGACAGTGAGCGGAGGAGGAGGATCCGG

CGGAGGAGGCTTGGCGGCCGGCAGCGACATCCAGCTGACCCAGAGCCCACCTTCCCTGTCTGCCAGCGTG

GGCGATCGCGTACAATCACCTGCGGCCCTCCAGTCTATCAGCTCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCA

GGCAAGGCCCCAAGCTGCTGATCTACGAGCATCTAGCTGAGTGGAGTGCCAAGCAGATTAGCGGATC

CGGATTGGCACAGACTTACACTGACCATCTCTCTGAGCCGAGGATTCGCCACCTACTATTGCCAGCAG

TCTTATAGCACACCTCAGACCTTGGCCAGGGACCAAGGTGGACATCAAGGGAAGTGGAGGAGGAGGAAGTT

GTCCCTACTCAAACCCATCTGTGCTCAGGAGGAGGAGGAAGTGAACCGCCTACTCAGGGAACATTAGCAAC

10

20

30

40

50

GTGTCCACCAATGTGAGCCCAGCAAAGCCTACCAACCGCATGCCATACTCTAACCCAGCCTGTGCACAACC
ACACCAGCACCCAGGCCCCCTACCCCTGCACCAACAATGCCTCCAGCCTGTCTGCGGCCAGAGGCCTGC
AGACCCGCCGCCGGAGCAGTGCACACACGGGCCTGGACTTGCCTGTGATATCTATCTGGCACCACT
GGCGGAACATGTGGCGTGTGCTGTCACTGGCATTACACTGTACTGTAAGCGAGGCCGGAGAAACTGC
TGTATATTCAAACAGCCTTATGAGACCTGTGCAGACTACCCAGGAGGAAGACGGCTGCAGCTGTAGGTTCC
CCGAGGAAGAGGAAGGCGGGTGTGAGCTGAGGGTCAAGTTAGCCGCTCCGCAGATGCCCTGCTTACCAAGCA
GGGGCAGAACATCAGCTGTATAACGAGCTGAATCTGGACGGAGAGAGGAATACGACGTGCTGGATAAAAGGCGC
GGGAGAGACCCCGAAATGGGAGGCAAGCCACGACGGAAAAACCCCCAGGAGGGCTGTACAATGAACGTGAG
AAGGACAAAATGGCAGAGGCCTAGTGAAATCGGATGAAGGGAGAGAGAAGGCGCGCAAAGGGCACGAT
GGCCTGTACCGGGCTGTCTACTGCCACCAAGGACACCTATGTCATGCTGCAGGCACTGCCTCCAAGG
TGATCTAGAGGGCCCGTTAAACCCGCTGATCAGCCTGACTGTGCCCTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCC
CCTCCCCCGTGCCTTCCCTGACCCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGCTCTCTAATAAAATGAGGAATTGCATCG

CATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAG
ACAATAGCAGGCATGCTGGGATGCGGTGGGCTCTATGACTAGTGGCGAATTCCCGTGTACCAGCTGAGAGACT
CTAAATCCAGTGACAAGTCTGCTGCCTATTACCGATTGATTCTAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCT
GATGTGTATATCACAGACAAACTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGG
AGCAACAAATCTGACTTGCATGTGCAAACGCCTCAACAAACAGCATTATCCAGAAGACACCTTCTCCCCAGCC
CAGGTAAGGGCAGCTTGGTGCCTCGCAGGCTGTTCCCTGCTTCAGGAA, または

AAGTAGCCCTGCATTCAGGTTCCCTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTACTGAAATCATGGCC
TCTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTCAAGATGCTAT
TTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGAATTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTGTCCATCACTGGCATCTGGAC
TCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCTAACCTGATCCTCTGTCCCACAGATATCCAG
TCCGGTGAGGGCAGAGGAAGTCTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCGGGCCCCGGATCCGCTCTGC
CCGTACCGCTCTGCTGCTGCCCTGGCCCTGCTGCACGCAGCCAGACCAGGCGGAGGAGGCTCTGCCCT
TACTCTAACCCAAGCCTGTGCTCCGGAGGAGGAGGATCCGGCGGAGGAGGCTTGAGGTGAAGCTGGTGGAG
AGCGGAGGAGGCGTGGTGCAGCCTGGCGGCCCTGTCTGAGCTGCGCAGCATCCGGCTTACCTTACAGA

CTACTATATGTCTGGGTGAGACAGCCCCCTGGCAAGGCCCTGGAGTGGCTGGCCCTGATCAGGTCCAAGGCCG

ATGGCTACACCACAGAGTATTCCGCCTCTGTGAAGGGCAGATTACCCCTGTCTAGGGACGATGCCAGTCCATCC

TGTACCTGCAGATGAATGCACTGCGCCCCGAGGACAGCGCCACATACTATTGTGCCAGAGACGCCCTACTATT

CTTACTATAGCCCTGAGGGCGCTATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCTCCGTACAGTGAGCTCCGGAGGAGG

AGGAAGCGGAGGGAGGAGGCTCCGGCGGCCGGCTATGGCGACTATAAGGATATCGTATGACCCAGAGC

CACAAGTTATGTCTACAAGCGTGGCGACCGCGTGAACATCACCTGCAAGGCCAGCCAGAATGTGGATTCCGC

CGTGGCCTGGTACCGAGCAGAACGCTGGCCAGAGCCTAACGCCCTGATCTATTCCGCCTTACCGGTATAGCGG

AGTGCCTGACCGCTTACCGGAAGGGATCCGAACAGACTTCACCCGTACAATCTAGCGTGCAGGCCAG

GATCTGGCCGTGTACTATTGTCAGCAGTACTATAGCACCCCTGGACCTCGGCCGGAGGAACCAAGCTGGAGATC

AAGAGAGGACTGGAGGAGGAGGAAGCTGCCACTTCAACCCCTCTGTGCAGCGGAGGAGGAGGAGGATCTG

AGCTGCCAACCCAGGGCACATTCCAACGTGTCTACAAATGTGAGCCCAGCAAAGCCAACCACAACCGCATGC

CCTTATAGCAATCCATCCCTGTGCACAACCACACCTGCACCAAGACCACCAACCCAGCACCTACAATGCCCTC

AGCCACTGAGCCTGCGCCCCGAGGCATGCCGCCTGCAGCAGGCCCGCCGTGCACACCAGGGCTGGACTT

CGCCTGCGATATCTACATCTGGCACCTCTGGCAGGAACCTGTGGCGTGTGCTGAGCCTGGTCATCACCCT

GTACTGCAAGAGAGGCAGGAAGAAGCTGCTGTATATCTCAAGCAGCCCTTATGCGCCCTGTGCAGACCACAC

AGGAGGAGGACGGCTGCAGTCGTTCCCAGAAGAGGAGGGAGGGCGGCTGTGAGCTGAGAGTGAAGTT

AGCAGGTCCGCCGATGCACCACTACAGCAGGGACAGAACAGCTGTATAACGAGCTGAATCTGGCCGG

GAGAGGAGTACGACGTGCTGGATAAGAGGAGGGGAAGGGACCCCGAGATGGAGGCAAGCCACGGAGAAA

GAACCCCCAGGAGGGCCTGTACAATGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTATTCCGAGATCGGCATG

AAGGGAGAGAGGCGCCGGGCAAGGGACACGATGGCCTGTACCGAGGCCTGTCTACCGCCACAAAGGACACC

TATGATGCCCTGCATATGCAGGCACTGCCCTCAAGGTGATCTAGAGGGCCGTTAAACCGCTGATCAGCCTG

ACTGTGCCCTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCCCGTGCCTCCCTGACCTGGAAAGGTGCCACTCC

CACTGTCCCTTCTAATAAAATGAGGAAATTGATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGG

GTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCCGTGGCTATG

ACTAGTGGCGAATTCCGTGTACCAAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTGCCTATTACCGATT

TGATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTATATCACAGACAAAATGTGCTAGACATGAGG

TCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTGCATGTGCAAACGCCCTCAAC

AACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTCCCCAGCCAGGTAAAGGGCAGCTTGGTGCCTCGCAGGCTGTT

CTTGCTTCAGGAA

である以下の配列: SEQ ID NO : 9、SEQ ID NO : 10、SEQ ID NO : 11、SEQ ID NO : 12の1つを含む、請求項1～7のいずれか一項記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞。

10

20

30

40

50

【0190】

8. 改変されていない対照細胞と比較して検出不能なレベルのMHC分子およびベータ2ミクログロブリン分子のまたはCIITA分子の細胞表面発現に機能的に影響を与える欠失をさらに含む、請求項1～7のいずれか一項記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞。

【0191】

9. 挿入が、TCRアルファをコードする遺伝子の不活性化および内因性 -TCRの検出不能な細胞表面発現を、全細胞の少なくとも96%において、全細胞の少なくとも97%において、全細胞の少なくとも98%において、全細胞の少なくとも99%において引き起こした、請求項1～8のいずれか一項記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞。

【0192】

10.

第1のTALEN結合ドメインがttgtcccacagATATCに結合することを条件として、SEQ ID NO:3と少なくとも100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%～80%の同一性を有する配列を有する、第1の半TALEN、および

第2の半TALENが

CCGTGTACCAAGCTGAGA

に結合し、かつ該TALENのオフターゲット切断の頻度が検出未満であることを条件として、SEQ ID NO:4と少なくとも100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%～80%の同一性を有する配列を有する、第2の半TALEN

を含む、請求項1～9のいずれか一項記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞。

【0193】

11. 少なくとも1つの挿入がwt TRACに存在する、配列
ttgtcccacagATATC, またはttgtcccacagATATCCAG

のTALEN結合ドメインの下流に位置する外因性ポリヌクレオチド配列を含む、請求項1～10のいずれか一項記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞。

【0194】

12. 少なくとも1つの挿入が、2Aペプチド、2A様ペプチド、P2Aペプチド、E2Aペプチド、F2Aペプチド、好ましくは2Aペプチド、より好ましくは配列
GSGEGRGSLLTCDVEENPGP, GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP, GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP,

GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP, SGEGRGSLLTCDVEENPGP, SGATNFSLLKQAGDVEENPGP,

SGQCTNYALLKLAGDVESNPGP, SGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

の2Aペプチド、さらにより好ましくは配列

SGEGRGSLLTCDVEENPGP

の2Aペプチドから選択されるゲノムTRACコード配列とインフレームの自己切断ペプチドをコードする配列を含む、請求項1～11のいずれか一項記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞。

【0195】

13. 少なくとも1つの挿入が、ゲノムTRACコード配列とインフレームの配列
SGEGRGSLLTCDVEENPGP

の、2Aペプチドをコードする配列、キメラ抗原受容体をコードする外因性ポリヌクレオチド配列、ポリアデニル化シグナルの転写終結配列、任意でTALEN結合ドメインを含む、請

10

20

30

40

50

求項1～12のいずれか一項記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞。

【0196】

14. 外因性ポリヌクレオチド配列が、以下の抗原: 好ましくはCD22、CD123、CS-1、CLL-1、CD38、HSP70、MUC-1、CD30、 α -アセチル-GD2の少なくとも1つに特異的なCARから選択されるキメラ抗原受容体(CAR)およびゲノムTRACコード配列とインフレムの配列
SGEGRGSLLTCGDVEENPGP

、ポリアデニル化シグナルの転写終結配列を含む、請求項1～13のいずれか一項記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞。

【0197】

15. (CAR)が、細胞外リガンド結合ドメイン、モノクローナル抗体に特異的なエピトープ、膜貫通ドメイン、および1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、請求項1～14のいずれか一項記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞。

【0198】

16. 少なくとも1つの挿入が、IRES、キメラ抗原受容体(CAR)を含む外因性ポリヌクレオチド配列、ポリアデニル化シグナルの転写終結配列、任意でTALEN結合ドメインを含む、請求項1～10のいずれか一項記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞。

【0199】

17. キメラ抗原受容体(CAR)が、モノクローナル抗体に特異的な少なくとも1つの抗原、好ましくはモノクローナル抗体に特異的な2つの抗原を含む、請求項1～15のいずれか一項記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞。

【0200】

18. 外因性ポリヌクレオチドが、RNAポリメラーゼの活性を停止させる転写終結シグナルを含む、請求項1～12のいずれか一項記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞。

【0201】

19. CD52、dCK GR、TCRのベータサブユニット遺伝子(TCRB1またはTCRB2)、サイトカイン誘導性SH2含有(CISH)遺伝子、アデノシンA2a受容体(ADORA)遺伝子、CD276遺伝子、Vセットドメイン含有T細胞活性化阻害物質1(VTCN1)遺伝子、BおよびTリンパ球関連(BTLA)遺伝子、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4(CTLA4)遺伝子、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ1(IDO1)遺伝子、キラー細胞免疫グロブリン様受容体、3ドメイン、長い細胞質尾部1(KIR3DL1)遺伝子、リンパ球活性化遺伝子3(LAG3)遺伝子、プログラム細胞死1(PD-1)遺伝子、A型肝炎ウイルス細胞受容体2(HAVCR2)遺伝子、T細胞活性化Vドメイン免疫グロブリンサプレッサー(VISTA)遺伝子、ナチュラルキラー細胞受容体2B4(CD244)遺伝子、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ1(HPRT)遺伝子、ならびにケモカイン(C-Cモチーフ)受容体5(遺伝子/偽遺伝子)(CCR5)遺伝子、CXCR4、それらの組み合わせからなる群より選択される内因性遺伝子における、少なくとも1つのさらなる破壊を含む、請求項1～18のいずれか一項記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞。

【0202】

20. 請求項1～19のいずれか一項記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を含む、ヒト細胞の集団。

【0203】

21. 請求項1～19のいずれか一項記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞または請求項20記載のヒト細胞の集団および薬学的に許容される賦形剤を含む、薬学的組成物。

【0204】

22. 医薬として用いるための、請求項1～19のいずれか一項記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞または請求項20記載のヒト細胞の集団または請求項21記載の薬学的組成物。

10

20

30

40

50

【0205】

23. がんの処置で用いるための、請求項1～19のいずれか一項記載のTALEN改変内因性

-TCR陰性ヒト細胞または請求項19記載のヒト細胞の集団または請求項21記載の薬学的組成物。

【0206】

24. がん腫、リンパ腫、肉腫、芽細胞腫、および白血病からなる群より選択されるがんの処置で用いるための、請求項1～19のいずれか一項記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞または請求項20記載のヒト細胞の集団または請求項21記載の薬学的組成物。

【0207】

25. B細胞由来のがん、T細胞由来のがん、乳がん、胃がん、神経芽細胞腫、骨肉腫、肺がん、黒色腫、前立腺がん、結腸がん、腎細胞がん、卵巣がん、横紋筋肉腫、白血病、およびホジキンリンパ腫からなる群より選択されるがんの処置で用いるための、請求項1～19のいずれか一項記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞または請求項20記載のヒト細胞の集団または請求項21記載の薬学的組成物。 10

【0208】

26. B細胞由来のがんが、B系統急性リンパ芽球性白血病、B細胞慢性リンパ性白血病、およびB細胞非ホジキンリンパ腫からなる群より選択されるがんの処置で用いるための、請求項1～19のいずれか一項記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞または請求項20記載のヒト細胞の集団または請求項21記載の薬学的組成物。

【0209】

27. AML、ALL、T細胞リンパ腫、CLLであるがんの処置で用いるための、請求項1～19のいずれか一項記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞または請求項20記載のヒト細胞の集団または請求項21記載の薬学的組成物。 20

【0210】

28. 改変ヒトゲノムTRAC遺伝子が、5'から3'方向に、

(a) 野生型TRAC遺伝子に存在するレアカットエンドヌクレアーゼ用の認識ドメイン上流のヒトゲノムTRAC遺伝子の5'領域、

(b) アルファベータTCRの細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインの細胞表面発現に影響を与える野生型TRAC遺伝子と比較したギャップまたは挿入であって、挿入が、非コード配列、終止コドン、TRACオープンリーディングフレームとインフレームの自己切断ペプチドをコードする配列、IRES、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする配列、TCRをコードする配列、薬物に対する感受性を付与するタンパク質をコードする配列、薬物に対する耐性を付与するタンパク質をコードする配列、サイトカインをコードする配列、終結配列、それらの組み合わせから選択される外因性ポリヌクレオチドを含む、ギャップまたは挿入、

(c') 任意で第2のレアカットエンドヌクレアーゼ認識ドメイン、

(d) ゲノムTRAC遺伝子の3'領域

を含む、野生型TRAC遺伝子と比較したエンドヌクレアーゼ改変ゲノムTRAC遺伝子を含むエンドヌクレアーゼ改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を検出するための手段。

【0211】

29. エンドヌクレアーゼが、CRISPR/Cas 9、CRISPR/Cpf1、TALEN、トランスポザーゼ、ZEN、ジンクフィンガーエンドヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、またはMegaTAからなる群より選択され、かつ手段が該ヌクレアーゼに特異的なエンドヌクレアーゼ改変TRACの配列におよび/または該ヌクレアーゼに特異的な該配列の上流に結合する、請求項28記載の手段。 40

【0212】

30. エンドヌクレアーゼがTALENである、請求項28または29記載の手段。

【0213】

31. エンドヌクレアーゼ結合ドメインもしくはエンドヌクレアーゼ認識ドメインの上流の改変ゲノムTRAC遺伝子中の配列におよび/またはタグをコードする配列に結合する、プローブ

を含むTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を検出するための、請求項30記載の手段。
。

【0214】

32. TALEN改変ゲノムTRAC遺伝子が、

(a) ヒトゲノムTRAC遺伝子の5'領域、

(b) (半?) TALEN用の認識ドメイン、好ましくは以下の配列

ttgtccccacagATATC, もしくはttgtccccacagATATCCAG

を含む(半?) TALEN用の認識ドメイン、または

(c) アルファベータTCRの細胞外ドメインもしくは膜貫通ドメインの細胞表面発現に影響を与える野生型TRAC遺伝子と比較したギャップもしくは挿入であって、挿入が、非コード配列、終止コドン、TRACオープンリーディングフレームとインフレームの自己切断ペプチドをコードする配列、IRES、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする配列、TCRをコードする配列、薬物に対する感受性を付与するタンパク質をコードする配列、薬物に対する耐性を付与するタンパク質をコードする配列、終結配列、それらの組み合わせから選択される外因性ポリヌクレオチドを含む、ギャップもしくは挿入、

(c') 任意で第2の(半?) TALEN認識ドメイン、

(d) ゲノムTRAC遺伝子の3'領域

を含み、かつ手段が該TALEN改変ゲノムTRAC遺伝子に特異的に結合する、請求項30または31記載の手段。

【0215】

33. 改変ゲノムTRAC遺伝子中の、配列

ttgtccccacagATATC, またはttgtccccacagATATCCAG

の少なくとも10塩基に結合するプローブを含むTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を検出するための、請求項30～32のいずれか一項記載の手段。

【0216】

34. ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)または潜在的なオフサイト改変により、好ましくはガイド配列によりエンドヌクレアーゼ改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を検出するための、請求項30～33のいずれか一項記載の手段。

【0217】

35. 請求項1～19のいずれか一項記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を検出するための、請求項30～34のいずれか一項記載の手段。

【0218】

36.

不活性化ゲノムTCRA遺伝子を含み、

CARをコードする外因性配列が、レンチウイルスベクターまたはAAVベクターを用いてゲノムTCRA遺伝子に組み込まれ、かつゲノム破壊が、CRISPR/CAS9、CRISPR/Cpf1 メガヌクレアーゼ、MegaTAL、ZFN、TALEN、それらの組み合わせから選択されるエンドヌクレアーゼを用いて行われた、

請求項1～15のいずれか一項記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞。

【0219】

37. エンドヌクレアーゼ改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を產生するための方法であつて、

(a) ヒト細胞に、

(i) 操作されたヌクレアーゼをコードする第1の核酸配列または操作されたヌクレアーゼタンパク質(操作されたヌクレアーゼがヒトTCRアルファ定常領域遺伝子内の認識配列の位置で切断を生じ、切断が検出不能なレベルまで -TCRの細胞表面発現の阻害をもたらす)、

(ii) CARをコードする外因性ポリヌクレオチドを含む第2の核酸配列、

10

20

30

40

50

(iii) 任意でプローブ
を導入する段階
を含み、
該外因性ポリヌクレオチドの配列が該切断部位で該ヒトゲノムTCRアルファ定常領域遺伝子に挿入され；かつさらに非改変対照細胞と比較した場合に、該遺伝子改変細胞が内因性TCRの細胞表面発現を低減させる、方法。

【0220】

38. エンドヌクレアーゼ誘導性オンサイトおよびオフサイトを、好ましくはpcrによっておよび/またはガイド配列によって検出する段階を含む、請求項37記載のエンドヌクレアーゼ改変内因性-TCR陰性ヒト細胞を產生するための方法。 10

【0221】

39. 操作されたヌクレアーゼが、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、CRISPR/Casヌクレアーゼ、またはmegaTALヌクレアーゼである、請求項37～38のいずれか一項記載の方法。

【0222】

40. 操作されたヌクレアーゼがTALENである、請求項37～39記載の方法。

【0223】

41. 外因性ポリヌクレオチドが、自己切断ペプチドおよびキメラ抗原受容体をコードする核酸配列を含む、請求項37～40記載の方法。 20

【0224】

42. キメラ抗原受容体が、細胞外リガンド結合ドメインおよび1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、請求項37～41のいずれか一項記載の方法。

【0225】

43. 外因性ポリヌクレオチドが、該外因性ポリヌクレオチドの発現を駆動するプロモーター配列を含む、請求項37～42のいずれか一項記載の方法。

【0226】

44. 少なくとも第2の核酸配列が、該第2の核酸配列を含む組み換えアデノ随伴ウイルス(AAV6)ベクターと細胞を接触させることにより該細胞に導入される、請求項37～43のいずれか一項記載の方法。 30

【0227】

45. 組み換えAAVベクターが自己相補的AAVベクターである、請求項39～44のいずれか一項記載の方法。

【0228】

46. 組み換えAAVベクターが少なくとも部分的にAAV6に由来する、請求項39～45のいずれか一項記載の方法。

【0229】

47. 組み換えTALENが第1サブユニットおよび第2サブユニットを含み、該第1サブユニットが第1の認識半部位に結合し、かつ該第2サブユニットが第2の認識半部位に結合する、請求項39～46記載の方法。 40

【0230】

48. 組み換えTALENが野生型ヒトTCRアルファ定常領域中の配列
ttgtcccacagATATC

を認識する、請求項39～47記載の方法。

【0231】

49. エンドヌクレアーゼが、
5'から3'方向に
TGCTGTGGCCTGGAGCAAC および GACTTGCATGTGCA

を認識しかつAAATCT内で切断するジンクフィンガー、以下の配列：

10

20

30

40

50

AGAG-

TCTCTCAGCTGGTACA, GCACCAAAGCTGCCCTTACC,
AAGTTCCCTGTGATGTCAAGC , TTCGGAACCCAATCACTGAC, GAT-
TAAACCCGGCCACTTTC, CGTCATGAGCAGATTAAACC,
CTCAAGGTTCAGATCAGAAG, TAGGCAGACAGACTTGTAC, 10
AACAAATGTGTCACAAAGTA, CACCAAAGCTGCCCTTACCT, CTGACAGGTTT-

10

20

30

40

50

GAAAGTTT, TTCAAAACCTGTCAGTGATT, CCGAATCCTCCTCCTGAAAG, CCAC-

TTTCAGGAGGAGGATT, TAAACCCGGCCACTTCAGG,

TCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTA, CTTACAATCTGAGATCTGGAATG,

TTAATCTGCTCATGACGCTG, GGAGAAGAGGGGCAATGCAG,

TCTTCTCCCTCTCCAAACAG, AGCAGCTTCACCTCCTTGG, GTAGCAGCTTCAC-

CTCCTT, AGTTGGTGGCATTGCCGGG, TCTGTGATATACACATCAGAAC, 10

TCTGTGATATACACATCAGAAC, GAGTCTCTCAGCTGGTACACGGC, GAG-

TCTCTCAGCTGGTACACGGCA, ATTCTCAAACAAATGTGTCACAA,

ATTCTCAAACAAATGTGTCACAA, GTCTGTGATATACACATCAGAAC,

GTCTGTGATATACACATCAGAAC, GAGAATCAAACAAATCGGTGAATAGG,

TGTGCTAGACATGAGGTCTATGG, TCAGGGTTCTGGATATCTGTGGG,

GTCAGGGTTCTGGATATCTGTGG, AAAGTCAGATTGTTGCTCCAGG,

AACAAATGTGTCACAAAGTAAGG, TGGATTAGAGTCTCTCAGCTGG,

TAGGCAGACAGACTTGTCACTGG, AGCTGGTACACGGCAGGGTCAGG, GCTGG-

TACACGGCAGGGTCAGGG, TCTCTCAGCTGGTACACGGCAGG, AGAG-

TCTCTCAGCTGGTACACGG, CTCTCAGCTGGTACACGGCAGGG,

ACAAAACGTGCTAGACATGAGG, ATTTGTTGAGAACAAATCGG, TGGAA-

TAATGCTGTTGAAGG, AGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGG,

CTTCTTCCCCAGCCCAGGTAAAGG, ACACGGCAGGGTCAGGGTTCTGG, CTTCAA-

GAGCAACAGTGCTGTGG, CTGGGAAGAAGGTGTCTTCTGG,

TTCTTCCCCAGCCCAGGTAAAGG, CTTACCTGGCTGGGAAGAAGG, GACAC-

CTTCTTCCCCAGCCCAGG, TTCAAAACCTGTCAGTGATTGG, CGTCATGAG-

CAGATTAAACCCGG, TTCGGAACCCAATCACTGACAGG, TAAACCCGGCCAC-

TTTCAGGAGG, TTTCAAAACCTGTCAGTGATTGG, GATTAAACCCGGCCAC-

TTTCAGG, CTCGACCAAGCTTGACATCACAGG, AAGTTCCCTGTGATGTCAAGCTGG 40

10

20

30

40

50

,ATCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGG, TGCTCATGACGCTGCAGCTGTGG,
 CATCACAGGAACCTTCTAAAAGG, GTCGAGAAAAGCTTGAAACAGG, CCAC-
 TTTCAGGAGGAGGATTCGG, CTGACAGGTTTGAAAGTTAGG, AGCTTT-
 GAAACAGGTAAGACAGG, CTGTGGTCCAGCTGAGGTGAGGG,
 CTGCGGCTGTGGTCCAGCTGAGG, TGTGGTCCAGCTGAGGTGAGGG,
 TCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGGG, TTAATCTGCTCATGACGCTGCAGG,
 ACCCGGCCACTTCAGGAGGAGG, GCTGTGGTCCAGCTGAGGTGAGG,
 CCGAATCCTCCTCCTGAAAGTGG

のいずれか1つに相補的な配列を認識するCrispr/Cas 9、MegaTAL、野生型ヒトTCRアルファ定常領域の残基番号93～208内の認識配列を認識かつ切断するメガヌクレアーゼであり、組み換えメガヌクレアーゼが第1サブユニットおよび第2サブユニットを含み、該第1サブユニットが該認識配列の第1の認識半部位に結合し、第1の超可変(HVR1)領域を含み、かつ該第2サブユニットが該認識配列の第2の認識半部位に結合し、第2の超可変(HVR2)領域を含む、請求項37～39記載の方法。

【0232】

50. メガヌクレアーゼが、リンカーを含む一本鎖メガヌクレアーゼであり、該リンカーが第1サブユニットおよび第2サブユニットを共有結合する、請求項49のいずれか一項記載の方法。

【0233】

51. 請求項37～50の方法のいずれか1つによって得られた細胞を検出するための手段。

【0234】

52. SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、それらの組み合わせまたは任意の縮重されたSEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、それらの組み合わせの配列から選択される請求項51記載の手段。

【0235】

53. エンドヌクレアーゼによるオンサイトおよび/またはオフサイト切断を検出するための請求項51記載の手段。

【0236】

54. SEQ ID NO:13～22のいずれか1つ、それらの組み合わせを有するエンドヌクレアーゼによるオンサイトおよび/またはオフサイト切断を検出するための請求項53記載の手段。

【0237】

10

20

30

40

50

GAGAATCAAATCGGTGAATAGG, TTCAAAACCTGTCAGTGATTGGG,
 TGTGCTAGACATGAGGTCTATGG, CGTCATGAGCAGATTAAACCCGG, TCAGGGTTCTGGATATCTGTGGG,
 GTCAGGGTTCTGGATATCTGTGG, TTCGGAACCCAATCACTGACAGG, TAAACCCGGCCACTTCAGGAGG,
 AAAGTCAGATTGTTGCTCCAGG, AACAAATGTGTCACAAAGTAAGG, TGGATTAGAGTCTCTCAGCTGG,
 TAGGCAGACAGACTTGTCACTGG, AGCTGGTACACGGCAGGGTCAGG, GCTGGTACACGGCAGGGTCAGGG,
 10 TCTCTCAGCTGGTACACGGCAGG, TTTCAAAACCTGTCAGTGATTGG, GATTAAACCCGGCCACTTCAGG,
 CTCGACCAGCTTGACATCACAGG, AGAGTCTCTCAGCTGGTACACGG, CTCTCAGCTGGTACACGGCAGGG,
 AAGTTCCCTGTGATGTCAAGCTGG, ATCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGG, TGCTCATGACGCTGCGGCTGTGG,
 ACAAAAACGTGCTAGACATGAGG, ATTTGTTGAGAATCAAATCGG,
 CATCACAGGAACCTTCTAAAAGG, GTCGAGAAAAGCTTGAAACAGG, CCACTTCAGGAGGAGGATTGG,
 20 CTGACAGGTTTGAAAGTTAGG, AGCTTGAAACAGGTAAGACAGG, TGGAATAATGCTGTTGTTGAAGG,
 AGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGG, CTGTGGTCCAGCTGAGGTGAGGG, CTGCGGCTGTGGCCAGCTGAGG,
 TGTGGTCCAGCTGAGGTGAGGGG, CTTCTCCCCAGCCCAGGTAAGG, ACACGGCAGGGTCAGGGTTCTGG,
 CTTCAAGAGAACAGTGCTGTGG, CTGGGGAAAGAAGGTGCTTCTGG, TCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGGG,
 TTAATCTGCTCATGACGCTGCGG, ACCCGGCCACTTCAGGAGGAGG, TTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGGG,
 CTTACCTGGGCTGGGAAGAAGG, GACACCTTCTCCCCAGCCCAGG, GCTGTGGTCCAGCTGAGGTGAGG,
 30 CCGAATCCTCCTGAAAGTGG

のいずれか1つ、その相補配列から選択される配列を含むTALENによるオンサイトおよび/またはオフサイト切断を検出するための請求項53記載の手段であり；該手段は、例えばペプチド2A配列のCAR配列に結合し、かつ本発明によるPCRを可能にする手段に関連しうる。

【 0 2 3 8 】

55. 以下の配列：

AGAGTCTCTCAGCTGGTACA, GCACCAAAGCTGCCCTTACC,
AAGTCCTGTGATGTCAAGC , TTCGGAACCCAATCACTGAC, GAT-
TAAACCCGGCCACTTTC, CGTCATGAGCAGATTAAACC,
CTCAAGGTTCAGATCAGAAG, TAGGCAGACAGACTTGTAC,
AACAAATGTGTCACAAAGTA, CACCAAAGCTGCCCTACCT, CTGACAGGTTT-
10 GAAAGTTT, TTCAAAACCTGTCAGTGATT, CCGAATCCTCCTGAAAG, CCAC-
TTTCAGGAGGAGGATT, TAAACCCGGCCACTTCAGG,

10

20

30

40

50

TCTCAAACAAATGTGTACAAAGTA, CTTACAATCTGCAGATCTGGAATG,
 TTAATCTGCTCATGACGCTG, GGAGAAGAGGGCAATGCAG,
 TCTTCTCCCTCTCCAAACAG, AGCAGCTTCACCTCCTTGG, GTAGCAGCTTCAC-
 CTCCTT, AGTTGGTGGCATTGCCGGG, TCTGTGATATAACATCAGAACATC,
 TCTGTGATATAACACATCAGAACATCC, GAGTCTCTCAGCTGGTACACGGC, GAG-
 TCTCTCAGCTGGTACACGGCA, ATTCTCAAACAAATGTGTACAA, 10
 ATTCTCAAACAAATGTGTACAAA, GTCTGTGATATAACACATCAGAACAT,
 GTCTGTGATATAACACATCAGAACATC, GAGAATCAAAATCGGTGAATAGG,
 TGTGCTAGACATGAGGTCTATGG, TCAGGGTTCTGGATATCTGTGGG,
 GTCAGGGTTCTGGATATCTGTGG, AAAGTCAGATTGTTGCTCCAGG,
 AACAAATGTGTACAAAGTAAGG, TGGATTAGAGTCTCTCAGCTGG,
 TAGGCAGACAGACTTGTCACTGG, AGCTGGTACACGGCAGGGTCAGG, GCTGG-
 TACACGGCAGGGTCAGGG, TCTCTCAGCTGGTACACGGCAGG, AGAG-
 TCTCTCAGCTGGTACACGG, CTCTCAGCTGGTACACGGCAGGG,
 ACAAAACTGTGCTAGACATGAGG, ATTTGTTGAGAATCAAAATCGG, TGGAA-
 TAATGCTGTTGTTGAAGG, AGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGG,
 CTTCTCCCCAGCCCAGGTAAGG, ACACGGCAGGGTCAGGGTCTGG, CTTCAA-
 GAGAACACAGTGCTGTGG, CTGGGAAGAAGGTGTCTCTGG,
 TTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGG, CTTACCTGGCTGGGAAGAAGG, GACAC-
 CTTCTCCCCAGCCCAGG, TTCAAAACCTGTCAGTGATTGGG, CGTCATGAG-
 CAGATTAAACCCGG, TTCGGAACCCAATCACTGACAGG, TAAACCCGGCCAC-
 TTTCAGGAGG, TTTCAAAACCTGTCAGTGATTGG, GATTAAACCCGGCCAC-
 TTTCAGG, CTCGACCAGCTGACATCACAGG, AAGTTCTGTGATGTCAAGCTGG
 ,ATCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGG, TGCTCATGACGCTGCGGCTGTGG,
 CATCACAGGAACCTTCTAAAAGG, GTCGAGAAAGCTTGAAACAGG, CCAC-
 40

TTTCAGGAGGAGGATTCGG, CTGACAGGTTTGAAAGTTAGG, AGCTTT-
GAAACAGGTAAGACAGG, CTGTGGTCCAGCTGAGGTGAGGG,
CTGCGGCTGTGGTCCAGCTGAGG, TGTGGTCCAGCTGAGGTGAGGGG,
TCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGGG, TTAATCTGCTCATGACGCTGCGG,
ACCCGGCCACTTCAGGAGGAGG, GCTGTGGTCCAGCTGAGGTGAGG,
CCGAATCCTCCTCCTGAAAGTGG

の少なくとも1つを含む配列およびそのいずれか1つの相補配列を含む手段。

【 0 2 3 9 】

56. 本発明は同様に、細胞免疫療法のための操作された初代免疫細胞を調製するための方法を提供し、本方法は、

(内因性TCRアルファ遺伝子内に本明細書において記載されるCARのいずれか1つをコードする挿入を含む)上記のように初代CAR陽性(CAR+) TCR陰性(TCR-)免疫細胞の集団を提供する段階、

該CAR+TCR-初代免疫細胞に、

該免疫細胞集団の治療可能性を改善する少なくとも1つの分子をコードするよう内因性遺伝子座に組み込まれる外因性ヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの核酸:

該選択された内因性遺伝子座を特異的に標的とする少なくとも1つの配列特異的試薬を導入する段階を含み

該外因性ヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列が、該遺伝子座に存在する内因性プロモーターの転写制御下で外因性コード配列を形成するように、標的とされる遺伝子組み込みによって該内因性遺伝子座に挿入される。

【 0 2 4 0 】

57. 第1項記載の方法において、配列特異的試薬はヌクレアーゼ、好ましくはCrispr/Cas 9、TALEN、ジンクフィンガーエンドヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、MegaTAL、それらの組み合わせからなる群より選択されるエンドヌクレアーゼである。

【 0 2 4 1 】

58. したがって、標的とされる遺伝子組み込みは、CAR+TCR-初代免疫細胞への相同組み換えまたはNHEJにより操作される。第1項または第2項記載の方法。

【 0 2 4 2 】

59. 本発明は、内因性プロモーターがCAR+TCR-初代免疫細胞活性化の間に活性であるように選択される。第1項～第3項のいずれか一項記載の方法を提供する。

[0 2 4 3]

60. 本発明は、外因性コード配列によってコードされる分子が、RNAiのような、RNA転写産物、または機能性タンパク質のような、ポリペプチドである、第1項～第4項のいずれか一項記載の方法を提供する。

[0 2 4 4]

61. 本発明は、CAR+TCR-初代免疫細胞の集団または治療潜在活性を改善する分子が、薬物に対するCAR+TCR-免疫細胞の耐性を付与し、CAR+TCR-免疫細胞の持続性(インビボもしくはインビボでの)またはその安全性を高める、第1項～第5項のいずれか一項記載の方法を提供する。

【0245】

6.2. 本発明は、CAR+TCR-初代免疫細胞の持続性を増強する分子が、サイトカイン受容

体、薬物に対する耐性を付与するタンパク質または阻害ペプチドもしくはタンパク質に対して作製された分泌抗体から選択される、第6項記載の方法を提供する。

【0246】

63. 本発明は、外因性コード配列がIL-2、IL-12またはIL-15受容体をコードする、第1項～第6項のいずれか一項記載の方法を提供する。

【0247】

64. 本発明は、薬物耐性を付与する外因性コード配列が、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)、イノシンーリン酸デヒドログナーゼ2 (IMPDH2)、カルシニューリンまたはメチルグアニントランスフェラーゼ(MGMT)、mTORmutおよびLckmutをコードする、第1項～第6項のいずれか一項記載の方法を提供する。

【0248】

65. 本発明は、外因性配列がIL-2、IL-12およびIL-15のような、ケモカインまたはサイトカインをコードする、第1項～第6項のいずれか一項記載の方法を提供する。

【0249】

66. 本発明は、治療活性を増強する外因性配列がFOXP3の阻害物質をコードする、第1項～第6項のいずれか一項記載の方法を提供する。

【0250】

67. 本発明は、CAR+TCR-初代T細胞の治療活性を増強する外因性配列が、CCR2/CCL2中和剤のような、腫瘍関連マクロファージ(TAM)の分泌阻害物質をコードする、第1項～第6項のいずれか一項記載の方法を提供する。

【0251】

68. 本発明は、CAR+TCR-初代免疫細胞の安全性を増強する外因性配列がキメラ抗原受容体(CAR)の構成要素をコードする、第1項～第6項のいずれか一項記載の方法を提供する。

【0252】

69. 本発明は、CARが所与の細胞型に対するCAR+TCR-免疫細胞の特異性の改善に寄与する阻害性CARである、第13項記載の方法を提供する。

【0253】

70. 本発明は、CAR+TCR-初代免疫細胞の安全性を増強する外因性配列が、直接的に、他の化合物との組み合わせで、または他の化合物を活性化することによって細胞を死滅させる能力を有する因子をコードする、第1項～第6項のいずれか一項記載の方法を提供する。

【0254】

71. 本発明は、CAR+TCR-初代免疫細胞の安全性を増強する外因性配列が、アポトーシスCARの構成要素をコードする、第1項～第6項のいずれか一項記載の方法を提供する。

【0255】

72. 本発明は、アポトーシスCARがFasL (CD95)を含む、第16項記載の方法を提供する。

【0256】

73. 本発明は、CAR+TCR-初代免疫細胞の安全性を増強する外因性配列が、シクロホスファミドおよび/またはイソホスファミドのような、薬物に対する該免疫細胞の過敏性を付与する、シトクロムP450、CYP2D6-1、CYP2D6-2、CYP2C9、CYP3A4、CYP2C19またはCYP1A2をコードする、第1項～第6項のいずれか一項記載の方法を提供する。

【0257】

本発明は、CAR+TCR-初代免疫細胞の安全性を増強する外因性配列が、シクロホスファミドおよび/またはイソホスファミドのような、薬物に対する該免疫細胞の過敏性を付与する、シトクロムP450、CYP2D6-1、CYP2D6-2、CYP2C9、CYP3A4、CYP2C19またはCYP1A2をコードする、第1項～第6項のいずれか一項記載の方法を提供する。

【0258】

74. 本発明は、遺伝子が、CAR+TCR-免疫細胞活性化の間に常に活性である内因性プロ

10

20

30

40

50

モーターの転写制御下にある、第1項～第18項のいずれか一項記載の方法を提供する。

【0259】

75. 本発明は、遺伝子がCD3G、Rn28s1、Rn18s、Rn7sk、Actg1、2m、Rpl18a、Pabpc1、Gapdh、Rpl17、Rpl19、Rplp0、Cfl1およびPfn1から選択される、第19項記載の方法を提供する。

【0260】

76. 本発明は、内因性プロモーターの転写活性が安定であり、かつ免疫細胞活性化に依存しない、第19項記載の方法を提供する。

【0261】

77. 本発明は、CAR+TCR-免疫細胞活性化に依存しないおよび安定な内因性プロモーターの制御下の遺伝子がCD3である、第21項記載の方法を提供する。 10

【0262】

78. 本発明は、遺伝子に導入された配列が、任意でポリペプチドCD3、CD28または4-1BBと融合した、TCR結合ドメインをコードする、第22項記載の方法を提供する。

【0263】

79. 本発明は、CAR+TCR-免疫細胞活性化に依存しないおよび安定な活性で内因性プロモーターの制御下の遺伝子に導入されたコード配列が、サイトカイン、ケモカイン受容体、産物に対する耐性を付与する分子、4-1BRLおよびOX40Lのような、共刺激リガンド、または分泌抗体をコードする、第21項記載の方法を提供する。

【0264】

80. 本発明は、内因性プロモーターの転写活性が免疫細胞活性化に依存する、第1項～第18項のいずれか一項記載の方法を提供する。 20

【0265】

81. 本発明は、内因性プロモーターの転写活性がCAR+TCR-免疫細胞活性化の際に一過性である、第25項記載の方法を提供する。

【0266】

82. 本発明は、内因性プロモーターの転写活性が上方制御される、第25項記載の方法を提供する。

【0267】

83. 本発明は、転写活性が強く上方制御される、第27項記載の方法を提供する。 30

【0268】

84. 本発明は、転写活性が上方制御される遺伝子に導入される外因性配列が、より具体的には、サイトカイン、免疫原性ペプチドまたは抗IDO1抗体、抗IL10抗体、抗PD1抗体、抗PDL1抗体、抗IL6抗体もしくは抗PGE2抗体のような、分泌抗体をコードする、第28項記載の方法を提供する。

【0269】

85. 本発明は、転写活性が弱く上方制御される、第27項記載の方法を提供する。

【0270】

86. 本発明は、転写活性が一過性に上方制御される遺伝子に導入される配列が、より具体的には、阻害性CARまたはアポトーシス性CARの構成要素をコードして免疫細胞の安全性の特異性を改善する、第30項記載の方法を提供する。 40

【0271】

87. 本発明は、プロモーターが免疫細胞活性化の際に12時間未満にわたって上方制御される、第26項記載の方法を提供する。

【0272】

上方制御されると、遺伝子発現が非活性化T細胞と比較して少なくとも2倍増加されることを意味する。

【0273】

88. 本発明は、遺伝子がSpata6、Itga6、Rcbtb2、Cd1d1、St8sia4、ItgaeおよびFam214aから選択される、第32項記載の方法を提供する。

10

20

30

40

50

【0274】

89. 本発明は、プロモーターが、免疫細胞活性化の際に24時間未満にわたって上方制御される、第26項記載の方法を提供する。

【0275】

90. 本発明は、遺伝子が、IL3、IL2、Ccl4、IL21、Gp49a、Nr4a3、Lilrb4、Cd200、Cdkn1a、Gzmc、Nr4a2、Cish、Ccr8、Lad1およびCrabp2から選択される、第34項記載の方法を提供する。

【0276】

91. 本発明は、遺伝子がCAR+TCR-免疫細胞活性化の際に24時間超にわたって上方制御される、第26項記載の方法を提供する。

10

【0277】

92. 本発明は、遺伝子がGzmb、Tbx21、Plek、Chek1、Slamf7、Zbtb32、Tigit、Lag3、Gzma、Wee1、IL12rb2、Eea1およびDtlから選択される、第36項記載の方法を提供する。

【0278】

93. 本発明は、改変型TCRがトランスフェクトされた免疫細胞において独立して発現されている、第1項～第37項のいずれか一項記載の方法を提供する。

【0279】

94. 本発明は、CARがCD22抗原に対するものである、第42項記載の方法を提供する。

【0280】

95. 本発明は、内因性プロモーター活性が、トランスフェクトされた免疫細胞に発現されるCARに依存する、第38項または第39項記載の方法を提供する。

20

【0281】

96. 本発明は、特定のエンドヌクレアーゼ試薬が、RNAもしくはDNAガイドエンドヌクレアーゼ、例えばCas9もしくはCpf1、RNAもしくはDNAガイド、TALエンドヌクレアーゼ、ジングフィンガーヌクレアーゼ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、またはその任意の組み合わせから選択される、第1項～第40項のいずれか一項記載の方法を提供する。

【0282】

97. 本発明は、特定のエンドヌクレアーゼ試薬が、エレクトロポレーションによりポリペプチドとして、または細胞中へ翻訳されるmRNAの下で導入される、第1項～第41項のいずれか一項記載の方法を提供する。

30

【0283】

98. 本発明は、コード配列を含む外因性核酸がDNAベクターに含まれる、第42項記載の方法を提供する。

【0284】

99. 本発明は、DNAベクターがAAVベクターのようなウイルスベクターである、第43項記載の方法を提供する。

【0285】

100. 本発明は、配列特異的エンドヌクレアーゼ試薬をコードする核酸および外因性核酸が両方ともDNAベクター中に含まれる、第43項記載の方法を提供する。

40

【0286】

101. 本発明は、CAR+TCR-免疫細胞に導入される遺伝子配列の前または後に、内因性遺伝子の少なくとも一部とともに該遺伝子配列の転写を可能にする2Aペプチドをコードする配列が続く、第1項～第45項のいずれか一項記載の方法を提供する。

【0287】

102. 本発明は、遺伝子配列が、該遺伝子中に最初に存在する少なくとも1つの内因性ゲノム配列の発現を不活性化する効果を伴って導入される、第1項～第46項のいずれか一項記載の方法を提供する。

【0288】

103. 本発明は、内因性プロモーターがTCR遺伝子の転写活性を制御しない、第1項～第

50

47項のいずれか一項記載の方法を提供する。

【0289】

104. 本発明は、不活性化されている内因性ゲノム配列が抑制性サイトカイン、キナーゼまたはその受容体、例えばTGFb、TGFbR、IL-10、IL-10R、GCN2またはPRDM1をコードする、第47項記載の方法を提供する。

【0290】

105. 本発明は、不活性化されている内因性ゲノム配列がPD1、PDL1、CTLA4、TIM3またはLAG3のような、免疫チェックポイントとして作用するタンパク質をコードする、第49項記載の方法を提供する。

【0291】

106. 本発明は、不活性化されている内因性ゲノム配列がDCK、HPRTまたはGGHのような、プロドラッグを活性化する酵素を発現する、第47項記載の方法を提供する。

【0292】

本発明は、不活性化されている内因性ゲノム配列がCD25、CD95またはPD1である、第47項記載の方法を提供する。

【0293】

107. 本発明は、不活性化されている内因性ゲノム配列がグルココルチコイド受容体およびCD52のような、免疫枯渇処置に対する受容体を発現する、第47項記載の方法を提供する。

【0294】

108. 本発明は、不活性化されている内因性ゲノム配列がCAR+TCR-免疫細胞または該免疫細胞集団由来の別のCAR+TCR-免疫細胞によって発現されるCARと親和性を有する表面抗原を発現する、第47項記載の方法を提供する。

【0295】

109. 本発明は、CAR+TCR-免疫細胞が造血幹細胞HSCである、第1項～第53項のいずれか一項記載の方法を提供する。

【0296】

110. 本発明は、免疫細胞がCAR+TCR-T細胞またはCAR+TCR-NKT細胞である、第1項～第53項のいずれか一項記載の方法を提供する。

【0297】

111. 本発明は、第1項～第55項のいずれかに記載の方法により得られる操作された初代免疫細胞を提供する。

【0298】

112. 本発明は、内因性遺伝子プロモーターの転写制御下の外因性コード配列を含む、操作された初代免疫CAR+TCR-細胞を提供する。

【0299】

113. 本発明は、内因性遺伝子プロモーターが免疫細胞の活性化の間に活性である、第59項または第60項に記載の操作された初代免疫CAR+TCR-細胞を提供する。

【0300】

114. 本発明は、内因性遺伝子プロモーターが免疫細胞の活性化に応答性であり、好ましくは上方制御される、第59項～第61項のいずれか一項記載の操作された初代免疫CAR+TCR-細胞を提供する。

【0301】

115. 本発明は、内因性遺伝子が本明細書において以下に列挙されるものの中から選択される、第59項～第62項のいずれか一項記載の操作された初代免疫CAR+TCR-細胞を提供する。

【0302】

116. 本発明は、初代免疫細胞がT細胞またはNKT細胞である、第59項～第63項のいずれか一項記載の操作された初代免疫細胞を提供する。

【0303】

10

20

30

40

50

117. 本発明は、初代細胞が第2のキメラ抗原受容体を有する、第59項～第64項のいずれか一項記載の操作された初代免疫CAR+TCR-細胞を提供する。

【0304】

118. 本発明は、内因性遺伝子の転写制御がキメラ抗原受容体(CAR)のシグナル活性化に応答性である、第65項に記載の操作された初代免疫CAR+TCR-細胞を提供する。

【0305】

119. 本発明は、第59項～第66項のいずれか一項記載の細胞の少なくとも30%、好ましくは50%、より好ましくは80%を含む、治療上有効な初代免疫細胞集団を提供する。

【0306】

120. 本発明は、細胞の少なくとも30%、好ましくは50%、より好ましくは80%がドナー、好ましくは1つの単一のドナーに由来する、第64項に記載の初代免疫細胞集団を提供する。

【0307】

121. 本発明は、免疫細胞の50%超がTCR陰性CAR陽性T細胞である、第64項に記載の初代免疫CAR+TCR-細胞の集団を提供する。

【0308】

122. 本発明は、免疫細胞の50%超がCAR陽性およびTCR陰性細胞であり、かつコード配列、好ましくはIL-7、IL-12、IL-15、IL-21またはIL-27をコードするコード配列を含む別の不活性化遺伝子を含む、第64項～第66項のいずれか一項記載の初代免疫CAR+TCR-細胞集団を提供する。

【0309】

123. 本発明は、上記第56項～第67項のいずれか一項記載の操作された初代の免疫CAR+TCR-細胞または免疫CAR+TCR-細胞集団を含む薬学的組成物を提供する。

【0310】

124. 本発明は、それを必要とする患者を処置するための方法を提供し、本方法は、第56項～第67項のいずれか一項記載のTCR-CAR-操作初代免疫CAR+TCR-細胞の集団を調製する段階；

任意で、該操作された初代免疫CAR+TCR-細胞を精製または選別する段階；

該患者への該細胞の注入時または注入後に該操作された初代免疫CAR+TCR-細胞の集団を活性化する段階

を含む。

【0311】

125. 本発明は、患者ががんの処置をされる、第69項記載の方法を提供する。

【0312】

126. 本発明は、患者が感染症の処置をされる、第69項記載の方法を提供する。

【0313】

特定の態様において、本発明の操作された初代ヒト細胞は、TRAC遺伝子および/または別のゲノム配列に遺伝子改変を導入した少なくとも1つのゲノム配列に特異的なTALENを一過性に発現した。好ましくは、ヒト細胞は、TRAC遺伝子に特異的なTALENおよび/または別のゲノム配列において特異的な、TALEN、CRISPR/CAS9、メガヌクレアーゼ、Znフィンガーヌクレアーゼのようなエンドヌクレアーゼを一過性に発現した。より好ましくは、ヒト細胞は、TRAC遺伝子の配列

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctgaccctgCCGTGTACCAAGCTGAGAGA

に特異的なTALENおよび/またはCD38、CS-1、CLL-1、CD70のようなT細胞抗原をコードするゲノム配列、CTLA4、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、LAG3、HAVCR2、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、TGFBRII、TGFBRI、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、CSK、PAG1、SIT1、FOXP

10

20

30

40

50

3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、SERCA3、IL27RA、STAT1、STAT3、ILT2 ILT4、SEMA7A、SHARPIN、STAT1、PEA15、RICTOR、JAK2、AURKA、DNMT3、miRNA31、MT1A、MT2A、PTGER2、miR101、mir26A、mir21を生成する遺伝子から選択される分子(または免疫チェックポイント)をコードするゲノム配列から選択される別のゲノム配列に特異的な別のTALENを一過性に発現した。PD1、PDL1、CTLA-4、TIM3、LAG3、TNF またはIFN は、本発明の細胞中へ操作される好ましい遺伝子であってよい。

【0314】

免疫チェックポイントはシグナル(共刺激分子)を上げるまたはシグナルを下げる分子であり、該シグナルは免疫細胞の機能、特にがん細胞に対するまたは固形がん中の結合組織に対する免疫細胞の機能に関与している。

10

【0315】

特定の態様において、本発明のヒト細胞は、ヒト細胞株、初代ヒト細胞株であってよく、初代ヒト細胞株は1つのヒト初代細胞に由来することまたはヒト初代細胞の同種集団に由来することを意味する。

【0316】

通常、免疫療法で用いるための本発明のヒト細胞または本発明のヒト細胞の集団は、ゲノム中のオフターゲット切断を含まないまたは検出不能に含む。

【0317】

特定の態様において、各TALEN部分がおよび/またはTALENが操作されたヒト細胞に対して用いられる適合ガイド配列(GUIDE-Seq)分析を用いオフサイトが判定されうる。

20

【0318】

特定の態様において、各TALEN部分がおよび/またはTALENが操作されたヒト細胞に対して用いられ、別のエンドヌクレアーゼによって誘導されるオフターゲットと比較される適合ガイド配列分析を用いオフサイトが判定されうる。

【0319】

特定の態様において、メガヌクレアーゼが操作されたヒト細胞に対して用いられる適合ガイド配列分析を用いオフサイトが判定されうる。

【0320】

特定の態様において、megaTALENが操作されたヒト細胞に対して用いられる適合ガイド配列分析を用いオフサイトが判定されうる。

30

【0321】

特定の態様において、Zn Fingerが操作されたヒト細胞に対して用いられる適合ガイド配列分析を用いオフサイトが判定されうる。

【0322】

特定の態様において、Crispr/cas 9が操作されたヒト細胞に対して用いられる適合ガイド配列分析を用いオフサイトが判定されうる。

【0323】

オフターゲット部位の判定は、例えばTALENに対して記載および適合されたように(https://www.collectis.com/uploads/files/ASGCT_2017.pdfのように)ガイド配列分析を用いて判定された通りであってよい。

40

【0324】

ガイド配列(またはguide-seq)分析は、CRISPR-Casヌクレアーゼによるオフターゲット切断のゲノムワイドプロファイリングを可能にするGUIDE-配列において最初に記載された。

【0325】

Tsai SQ, Zheng Z, Nguyen NT, Liebers M, Topkar VV, Thapar V, Wyveldens N, Khayter C, Iafrate AJ, Le LP, Aryee MJ, Joung JK. Nat Biotechnol. 2015 Feb;33(2):187-197. doi: 10.1038/nbt.3117. Epub 2014 Dec 16.およびhttps://www.collectis.com/uploads/files/ASGCT_2017.pdf適応版において記載されているようにT

50

TALENに対して用いた)。

【0326】

所与のエンドヌクレアーゼによる所与の部位についてのGUIDE-SeqリードカウントまたはGUIDE-Seqスコアは、RNAまたはタンパク質ガイドヌクレアーゼによるその配列の切断効率の定量的測定値を表す。好ましくは、TRAC遺伝子に影響を与える本発明のRNAまたはタンパク質ガイドヌクレアーゼは、ゼロに近い(検出閾値未満のまたは検出不能な)スコアを有する。

【0327】

本発明はさらに、エンドヌクレアーゼ改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞、またはTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞が12日間で少なくとも10倍超に増殖されうる前記態様のいずれかにおけるようなエンドヌクレアーゼ改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞、好ましくはTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞であるヒト細胞を提供する。

10

【0328】

本発明はさらに、エンドヌクレアーゼ改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞、またはTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞がクローニングなしに増殖されうる前記態様のいずれかにおけるようなエンドヌクレアーゼ改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞、好ましくはTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞であるヒト細胞を提供する。

【0329】

本発明は、未改変(非操作)対照細胞と比較して検出不能なレベルのMHC分子およびミクログロブリン分子の細胞表面発現に機能的に影響を与える欠失をさらに含む、上記のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

20

【0330】

本発明は、未改変(非操作)対照細胞と比較して検出不能なレベルのMHC分子およびCIITA分子、好ましくはGene ID: 4261のCIITA分子の発現に影響を与えるゲノム欠失、変異または挿入をさらに含む、上記のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0331】

本発明は、挿入が細胞の少なくとも96%において、細胞の少なくとも97%において、細胞の少なくとも98%において、または細胞の少なくとも99%においてTCRアルファをコードする遺伝子の不活性化および内因性 -TCRの検出不能な細胞表面発現をもたらした上記のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

30

【0332】

TRAC遺伝子の不活性化は、不活性化TRAC遺伝子を有する細胞が、好ましくはTRAC遺伝子の破壊、より好ましくはアルファベータTCRのTCRアルファサブユニットの細胞外ドメインおよび/または膜貫通ドメインをコードする配列の破壊のために、検出不能なレベルの細胞表面TCRアルファを有し、それゆえ、細胞外アルファベータTCRが膜に向けられず、陽性対照と比較して検出不能なレベルの細胞表面TCRアルファベータを生じることを意味する。

【0333】

1つの態様において、細胞表面発現は、モノクローナル抗ヒトアルファベータTCR、対照アイソタイプ抗体を用いてフローサイトメトリーにより測定されうる。

40

【0334】

さらに、本発明のヒト細胞(操作されたヒト細胞)は、(発現がタンパク質または薬物によりそれ自体活性化される、プロモーターによって制御される条件付き発現でない限り) TRAC中に挿入された遺伝子によりコードされる産物の、例えばCARまたはTCRの検出可能なレベルを発現する。

【0335】

本発明は、挿入が、TRACを切断するTALENのヒト細胞への導入から4日後にフローサイトメトリーによって判定された場合に細胞の少なくとも96%において、細胞の少なくとも97%において、細胞の少なくとも98%において、細胞の少なくとも99%においてTCRアルファをコードする遺伝子の不活性化および内因性 -TCRの検出不能な細胞表面発現

50

をもたらした上記のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0336】

特定の態様において、上記のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞は、TALEN結合ドメインおよび/または野生型(wt) TRAC遺伝子に存在するTALEN結合ドメイン上流の配列を含み、好ましくはwt TRAC遺伝子中の該TALEN結合ドメインは以下の配列:
TTGTCCCACAGATATCCagaaccctgaccctgCCGTGTACCAAGCTGAGAGA

を有する。特定の態様において、操作されたTRAC遺伝子は、以下の配列

TTGTCCCACAGATATCC,

10

TTGTCCCACAGATATCCa

TTGTCCCACAGATATCCag

TTGTCCCACAGATATCCaga

TTGTCCCACAGATATCCagaa

TTGTCCCACAGATATCCagaac

20

TTGTCCCACAGATATCCagaacc

TTGTCCCACAGATATCCagaaccc

TTGTCCCACAGATATCCagaaccct

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctg

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctga

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctgac

30

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctgacc

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctgaccc

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctgaccct

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctgaccctg

のいずれか1つを含みうる。

【0337】

本発明は、ttgtcccacagATATCに結合する、またはttgtcccacagATATCCAGに結合する任意のレアカットエンドヌクレアーゼ、好ましくはWO2014184741に記載されているTALENを用いて得られるTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を包含する。

【0338】

本発明は、ttgtcccacagATATCに結合する、もしくはttgtcccacagATATCCAGに結合するまたはttgtcccacagATATC

と、もしくは

ttgtcccacagATATCCAG

50

と少なくとも93.75%、87.5%、81.25%、75%、68.75%、62.5%、56.25%、5%、43.75%、37.5%、31.25%、25%、18.75%、12.5%、6.25%の同一性を有する配列に結合するTALENを用いて得られる、上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性

-TCR陰性ヒト初代細胞を提供し、ただし該TALENがTRAC遺伝子を切断しTCRアルファ遺伝子の不活性化、TCRアルファベータの検出不能な細胞表面発現を誘導し、該TALENに対するオフターゲット部位がガイド配列(guide-seq)法を用いて検出未満であることを条件とする)。

【0339】

本発明は、少なくとも1つの挿入が以下の配列
TTGTCCCACAGATATCC,

TTGTCCCACAGATATCCa

TTGTCCCACAGATATCCag

TTGTCCCACAGATATCCaga

TTGTCCCACAGATATCCagaa

TTGTCCCACAGATATCCagaac

TTGTCCCACAGATATCCagaacc

TTGTCCCACAGATATCCagaaccc

TTGTCCCACAGATATCCagaaccct

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctg

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctga

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctgac

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctgacc

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctgaccc

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctgaccct

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctgaccctg

のいずれか1つの下流に位置する外因性ポリヌクレオチド配列を含む、上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性

-TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。

【0340】

本発明は、少なくとも1つの挿入が以下の配列

10

20

30

40

50

TTGTCCCACAGATATCC,

TTGTCCCACAGATATCCa

TTGTCCCACAGATATCCag

TTGTCCCACAGATATCCaga

TTGTCCCACAGATATCCagaa

TTGTCCCACAGATATCCagaac

TTGTCCCACAGATATCCagaacc

TTGTCCCACAGATATCCagaaccc

TTGTCCCACAGATATCCagaaccct

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctg

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctga

10

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctgac

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctgacc

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctgaccc

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctgaccct

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctgaccct, および

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctgaccctg

20

のいずれか1つの下流および以下の配列

30

40

50

CCGTGTACCAGCTGAGAGA,

gCCGTGTACCAGCTGAGAGA,

tgCCGTGTACCAGCTGAGAGA,

ctgCCGTGTACCAGCTGAGAGA,

cctgCCGTGTACCAGCTGAGAGA,

ccctgCCGTGTACCAGCTGAGAGA,

accctgCCGTGTACCAGCTGAGAGA,

gaccctgCCGTGTACCAGCTGAGAGA,

tgaccctgCCGTGTACCAGCTGAGAGA,

ctgaccctgCCGTGTACCAGCTGAGAGA,

cctgaccctgCCGTGTACCAGCTGAGAGA,

ccctgaccctgCCGTGTACCAGCTGAGAGA,

accctgaccctgCCGTGTACCAGCTGAGAGA,

aaccctgaccctgCCGTGTACCAGCTGAGAGA,

gaaccctgaccctgCCGTGTACCAGCTGAGAGA, および

agaaccctgaccctgCCGTGTACCAGCTGAGAGA

のいずれか1つの上流に位置する外因性ポリヌクレオチド配列を含む、上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。

【 0 3 4 1 】

本発明による手段は、以下の配列のいずれか1つの検出を可能にする。

【 0 3 4 2 】

本発明は、少なくとも1つの挿入が、2Aペプチド、2A様ペプチド、P2Aペプチド、E2Aペプチド、F2Aペプチド、好ましくは2Aペプチド、より好ましくは配列

10

20

30

40

50

GS^GEGRGSLLTCGDVEENPGP,

GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP,

GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP,

GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP,

SGEGRGSLLTCGDVEENPGP,

SGATNFSLLKQAGDVEENPGP,

SGQCTNYALLKLAGDVESNPGP,

SGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

の2Aペプチド、さらにより好ましくは配列

SGEGRGSLLTCGDVEENPGP

の2Aペプチドから選択されるゲノムTRACコード配列とインフレームの自己切断ペプチドをコードする配列を含む、上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。

【0343】

2Aペプチド、好ましくは配列

SGEGRGSLLTCGDVEENPGP

の2Aペプチドをコードする任意のポリヌクレオチド配列が本発明による細胞のゲノムTRAC遺伝子中に挿入されうる。

【0344】

本発明は、少なくとも1つの挿入が、ゲノムTRACコード配列とインフレームの配列

SGEGRGSLLTCGDVEENPGP

の、2Aペプチドをコードする配列、キメラ抗原受容体をコードする外因性ポリヌクレオチド配列、転写終結配列(ポリアデニル化シグナルの転写終結配列)、任意でTALEN結合ドメインを含む、上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。

【0345】

本発明は、外因性ポリヌクレオチド配列が以下の抗原: CD19、CD123、CD20、CD22、CD38、CD30、CS-1、CLL-1、HSP70、BCMA、VEGF、DR4、GD2、がん精巣(CT)抗原、MUC1、GD2、oアセチルGD2、HM1.24 (CD317)、CYP1B1、SP17、PRAME、ウィルムス腫瘍1 (WT1)、熱ショックタンパク質gp96、甲状腺刺激ホルモン受容体(TSHR); CD171; CS-1 (CD2サブセット1、CRACC、SLAMF7、CD319、および19A24); C型レクチン様分子-1 (CLL-1); ガングリオシドGD3 (aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlcp(I-I)Cer); Tn抗原(Tn Ag); Fms様チロシンキナーゼ3 (FLT3); CD38; CD44v6; B7H3 (CD276); KIT (CD117); インターロイキン-13受容体サブユニット-2(IL-13Ra2); インターロイキン11受容体アルファ(IL-11Ra); 前立腺幹細胞抗原(PCA); プロテアーゼセリン21 (PRSS21); 血管内皮増殖因子受容体2 (VEGFR2); ルイス(Y)抗原; CD24; 血小板由来増殖因子受容体ベータ(PDGFR-ベータ); 時期特異的胚抗原-4(SEA-4); ムチン1、細胞表面結合(MUC1); 上皮増殖因子受容体(EGFR); 神経細胞接着分子(NCAM); 炭酸脱水酵素IX(CAIX); プロテアソーム(プロソーム、マクロペイン)サブユニット, B型, 9 (LMP2); エフリンA型受容体2 (EphA2); フコシルGM1; シアリルルイス接着

10

20

30

40

50

分子(sLe); ガングリオシドGM3 (aNeu5Ac(2-3)bDGAlp(I-4)bDGlcP(I-I)Cer; TGS5; 高分子量黒色腫関連抗原(HMWMAA); o-アセチル-GD2ガングリオシド(OAcGD2); 葉酸受容体ベータ; 腫瘍内皮マーカー1 (TEM1/CD248); 腫瘍内皮マーカー7関連(TEM7R); クラウジン6 (CLDN6); Gタンパク質-共役受容体クラスCグループ5、メンバーD (GPRC5D); 染色体Xオープンリーディングフレーム61 (CXorf61); CD97; CD179a; 未分化リンパ腫キナーゼ(ALK); ポリシアル酸; 胎盤特異的1 (Placenta-specific 1; PLAC1); globoHグリコセラミド(GloboH)の六糖部分; 乳腺分化抗原(NY-BR-1); ウロプラキン2 (UP K2); ヘパタイティスAウイルス細胞受容体1 (HAVCR1); アドレナリン受容体ベータ3 (ADRB3); パンネキシン3 (PANX3); Gタンパク質-共役受容体20 (GPR20); リンパ球抗原6複合体, 遺伝子座K9 (LY6K); 嗅覚受容体51E2 (OR51E2); TCRガンマ代替リーディングフレームタンパク質(TARP); ウィルムス腫瘍タンパク質(WT1); 染色体12pに位置する、ETS転座変種遺伝子6 (ETV6-AML); 精子タンパク質17 (SPA17); X抗原ファミリー、メンバー1A (XAGE1); アンジオポイエチン結合細胞表面受容体2 (Tie 2); 黒色腫がん精巣抗原-1 (MAD-CT-1); 黒色腫がん精巣抗原-2 (MAD-CT-2); Fos関連抗原1; p53変異体; ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT); 肉腫転座切断点; アポトーシスの黒色腫阻害物質(ML-IAP); ERG (膜貫通プロテアーゼ、セリン2 (TMPRSS2) ETS融合遺伝子); N-アセチルグルコサミニルトランスクフェラーゼV (NA17); ペアボックスタンパク質Pax-3 (PAX3); アンドロゲン受容体; サイクリンB1; v-mycトリ骨髄細胞腫ウイルスがん遺伝子神経芽腫由来ホモログ(MYCN); RasホモログファミリーメンバーC (RhoC); シトクロムP450 1B1 (CYP1B1); CCCTC結合因子(ジンクフィンガータンパク質)様(BORIS); T細胞によって認識される扁平上皮がん抗原3 (SART3); ペアボックスタンパク質Pax-5 (PAX5); プロアクロシン結合タンパク質sp32 (OY-TES 1); リンパ球特異的タンパク質チロシンキナーゼ(LCK); Aキナーゼアンカータンパク質4 (AKAP-4); 滑膜肉腫、X切断点2 (SSX2); CD79a; CD79b; CD72; 白血球関連免疫グロブリン様受容体1 (LAIR1); IgA受容体のFc断片(FCAR); 白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリーAメンバー2 (LILRA2); CD300分子様ファミリーメンバーf (CD300LF); C型レクチンドメインファミリー12メンバーA (CLEC12A); 骨髄間質細胞抗原2 (BST2); EGF様モジュール含有ムチン様ホルモン受容体様2 (EMR2); リンパ球抗原75 (LY75); グリピカン-3 (GPC3); Fc受容体様5 (FCRL5); および免疫グロブリンラムダ様ポリペプチド1 (IGLL1)ならびにそれらの組み合わせの少なくとも1つに特異的な、キメラ抗原受容体(CAR)を含む、上記のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性-TCR陰性ヒト初代細胞を提供する。

【0346】

CARは、好みしくは、CD19、CD123、CD20、CD22、CD38、CD30、CS-1、CLL-1、HSP70、BCMA、VEGF、DR4、GD2、O-アセチルGD2、がん精巣(CT)抗原、MUC1、MUC16、HM1.24 (CD317)、CYP1B1、SP17、PRAME、ウィルムス腫瘍1 (WT1)、熱ショックタンパク質gp96、クラウジン18.2、CEA、FAP - HER2 - CD79a、CD79bおよびそれらの組み合わせに特異的なCARからなるリストから選択されるCARであってよい。

【0347】

CARは、より好みしくは、CD123、CD22、CD38、CD30、CS-1、CLL-1、HSP70、BCMA、GD2、O-アセチルGD2、MUC1、FAP、HER2、CD79a、CD79bおよびそれらの組み合わせに特異的なCARからなるリストから選択されるCARであってよい。

【0348】

好みしい態様において、CARは、以下の標的抗原メソテリンFR、L1-CAM、CAIX、GD2、O-アセチルGD2、FAP、ルイスY、EGFRvIII、HER2、CD20、PSMA、kLC、CD30、CEA、FAP - HER2 - CD79a、CD79bの1つに向けられる。

【0349】

別の好みしい態様において、CARは以下の標的: -葉酸受容体(FR); L1-細胞接着分子(L1-CAM); 炭酸脱水酵素-IX (CAIX); 線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)、ヒト上皮増殖因子受容体2 (HER2); がん胎児性抗原(CEA); 前立腺特異的膜抗原(PSMA); CD79a、C

10

20

30

40

50

D79b、CD20またはCD268、C型レクチンドメインファミリー14メンバーA; 同様にEGFR5 (CLEC14a)、上皮細胞接着分子(EPCAM)、Liv-1、またはジンク輸送体LIV-1 (SLC39A6)、コリン作動性受容体ニコチン性アルファ2サブユニット(CHRNA2)、ディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼドメイン含有タンパク質10, (ADAM10)またはCDW156またはCD156cADAM10、デルタ様3 (DLL3)、C型レクチンドメインファミリー14メンバーA; 同様にEGFR5, (CLEC14a)の1つに向けられる。

【0350】

CLEC14aは、タンパク質のC型レクチンドメインファミリーの51 kDaの(予測される)メンバーである。それは脳において発現されるタイプの膜貫通タンパク質である。成熟ヒトCLEC14Aは長さが469アミノ酸である。

10

【0351】

より好ましい態様において、CARは、以下の標的抗原CD123、CD22、CD30、CLL-1、CS-1、O-アセチルGD2、FAP、HER2、CD79a、CD79bの1つに対するものである。

【0352】

より好ましい態様にて、CARは、腫瘍細胞上に発現される(または過剰発現される以下の標的抗原CD123、CD22、CD30、CLL-1、CS-1、O-アセチルGD2、FAP、HER2、CD79a、CD79bの1つに対するものである。これは、本発明において、特定のscfvドメインを用いることによって達成される。

【0353】

本発明のCAR分子は、抗原結合ドメイン、好ましくはscfv、膜貫通ドメイン、ならびに共刺激ドメインおよび/または一次シグナル伝達ドメインを含む細胞内ドメインを含む。

20

【0354】

本発明のCAR分子は、抗原結合ドメインが疾患に関連する腫瘍抗原に結合し、かつ該腫瘍抗原が以下からなる群より選択される、抗原結合ドメインを含む: CD19分子(CD19); 膜貫通4-ドメインA1(CD20としても知られるMS4A1); CD22分子(CD22); CD24分子(CD24); CD248分子(CD248); CD276分子(CD276またはB7H3); CD33分子(CD33); CD38分子(CD38); CD44v6; CD70分子(CD70); CD72; CD79a; CD79b; インターロイキン3受容体サブユニット (CD123としても知られるIL3RA); TNF受容体スーパーファミリーメンバー8(CD30としても知られるTNFRSF8); KITがん原遺伝子受容体チロシンキナーゼ(CD117); V-setプレB細胞代替軽鎖1(VPREB1またはCD179a); 接着Gタンパク質共役受容体E5(ADGRE5またはCD97); TNF受容体スーパーファミリーメンバー17(BCMAとしても知られるTNFRSF17); SLAMファミリーメンバー7(CS1としても知られるSLAMF7); L1細胞接着分子(L1CAM); C型レクチンドメインファミリー12メンバーA(CLL-1としても知られるCLEC12A); 上皮増殖因子受容体の腫瘍特異的変種(EGFRvIII); 甲状腺刺激ホルモン受容体(TSHR); Fms様チロシンキナーゼ3(FLT3); ガングリオシドGD3(GD3); Tn抗原(Tn Ag); リンパ球抗原6ファミリーメンバーG6D(LY6G6D); デルタ様標準Notchリガンド3(DLL3); インターロイキン13受容体サブユニット -2(IL-13RA2); インターロイキン11受容体サブユニット (IL11RA); メソテリン(MSLN); 受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1(ROR1); 前立腺幹細胞抗原(PSCA); erb-b2受容体チロシンキナーゼ2(ERBB2またはHer2/neu); プロテアーゼセリン21(PRSS21); キナーゼ挿入ドメイン受容体(VEGFR2としても知られるKDR); ルイスY抗原(LewisY); 溶質輸送体ファミリー39メンバー6(SLC39A6); 線維芽細胞活性化タンパク質 (FAP); Hsp70ファミリーシャペロン(HSP70); 血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR-beta); ニコチン様コリン作動性受容体2サブユニット(CHRNA2); 時期特異的胚抗原-4(SSEA-4); ムチン1、細胞表面結合(MUC1); ムチン16、細胞表面結合(MUC16); クローディン18(CLDN18); クローディン6(CLDN6); 上皮増殖因子受容体(EGFR); 黒色腫において選択的に発現される抗原(PRAME); 神経細胞接着分子(NCAM); ADAMメタロペプチダーゼドメイン10(ADAM10); 葉酸受容体1(FOLR1); 葉酸受容体 (FOLR2); 炭酸脱水酵素IX(CA9); プロテアソームサブユニット9(PSMB9またはLMP2); エフリン受容体A2(EphA2); テトラスパニン10(TSPAN10); フコシルGM1(Fuc-GM1); シアリルルイス接着分子(sLe); TGS5; 高分子量黒色腫関連抗原(

30

2サブユニット(CHRNA2); 時期特異的胚抗原-4(SSEA-4); ムチン1、細胞表面結合(MUC1); ムチン16、細胞表面結合(MUC16); クローディン18(CLDN18); クローディン6(CLDN6); 上皮増殖因子受容体(EGFR); 黒色腫において選択的に発現される抗原(PRAME); 神経細胞接着分子(NCAM); ADAMメタロペプチダーゼドメイン10(ADAM10); 葉酸受容体1(FOLR1); 葉酸受容体 (FOLR2); 炭酸脱水酵素IX(CA9); プロテアソームサブユニット9(PSMB9またはLMP2); エフリン受容体A2(EphA2); テトラスパニン10(TSPAN10); フコシルGM1(Fuc-GM1); シアリルルイス接着分子(sLe); TGS5; 高分子量黒色腫関連抗原(

40

50

HMWMAA); o-アセチル-GD2ガングリオシド(OAcGD2); 腫瘍内皮マーカー7関連(TEM7R); Gタンパク質-共役受容体クラスCグループ5、メンバーD(GPRC5D); 染色体Xオープンリーディングフレーム61 (CXORF61); ALK受容体チロシンキナーゼ(ALK); ポリシアル酸; 胎盤特異的1 (Placenta-specific 1; PLAC1); globoHグリコセラミド(GloboH)の六糖部分; NY-BR-1抗原; ウロプラキン2(UPK2); ヘパタイティスAウイルス細胞受容体1(HAVCR1); アドレナリン受容体 3(ADRB3); パンネキシン3(PANX3); Gタンパク質-共役受容体20(GPR20); リンパ球抗原6ファミリーメンバーK(LY6K); 嗅覚受容体ファミリー5 1サブファミリーEメンバー2(OR51E2); TCRガンマ代替リーディングフレームタンパク質(TARP); ウィルムス腫瘍タンパク質(WT1); 12;21染色体転座によるETV6-AML1融合タンパク質(ETV6-AML1); 精子自己抗原タンパク質17(SPA17); X抗原ファミリー、メンバー1E(XAGE1E); TEK受容体チロシンキナーゼ(Tie2); 黒色腫がん精巣抗原1(MAD-CT-1); 黒色腫がん精巣抗原2(MAD-CT-2); Fos関連抗原1; p53変異体; ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT); 肉腫転座切断点; アポトーシスの黒色腫阻害物質(ML-IAP); ERG(膜貫通プロテアーゼ、セリン2(TMPRSS2)ETS融合遺伝子); N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼV(NA17); ペアボックスタンパク質Pax-3(PAX3); アンドロゲン受容体; サイクリンB1; v-mycトリ骨髄細胞腫ウイルスがん遺伝子神経芽腫由来ホモログ(MYCN); RasホモログファミリーメンバーC(RhoC); シトクロムP450 1B 1(CYP1B1); CCCTC結合因子(ジンクフィンガータンパク質)様(BORIS); T細胞によって認識される扁平上皮がん抗原3 (SART3); ペアボックスタンパク質Pax-5(PAX5); プロアクロシン結合タンパク質sp32(OY-TES1); リンパ球特異的タンパク質チロシンキナーゼ(LCK); Aキナーゼアンカータンパク質4(AKAP-4); 滑膜肉腫、X切断点2(SSX2); 白血球関連免疫グロブリン様受容体1(LAIR1); IgA受容体のFc断片(FCAR); 白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリーAメンバー2(LILRA2); CD300分子様ファミリーメンバーf(CD300LF); 骨髄間質細胞抗原2(BST2); EGF様モジュール含有ムチン様ホルモン受容体様2(EMR2); リンパ球抗原75(LY75); グリビカン-3(GPC3); Fc受容体様5(FCRL5); 免疫グロブリンラムダ様ポリペプチド1(IGLL1)、および熱ショックタンパク質70(HSP70)。

【 0 3 5 5 】

別の局面において、本発明のCAR分子は、抗原結合ドメインが疾患に関連する抗原に結合し、かつ腫瘍抗原が以下からなる群より選択される、抗原結合ドメインを含む: CD19分子(CD19); 膜貫通4-ドメインA1(CD20としても知られるMS4A1); CD22分子(CD22); CD24分子(CD24); CD248分子(CD248); CD276分子(CD276またはB7H3); CD33分子(CD33); CD38分子(CD38); CD44v6; CD70分子(CD70); CD72; CD79a; CD79b; インターロイキン3受容体サブユニット (CD123としても知られるIL3RA); TNF受容体スーパーファミリーメンバー8(CD30としても知られるTNFRSF8); KITがん原遺伝子受容体チロシンキナーゼ(CD117); V-setプレB細胞代替軽鎖1(VPREB1またはCD179a); 接着Gタンパク質共役受容体E5(ADGRE5またはCD97); TNF受容体スーパーファミリーメンバー17(BCMAとしても知られるTNFRSF17); SLAMファミリーメンバー7(CS1としても知られるSLAMF7); L1細胞接着分子(L1CAM); C型レクチンドメインファミリー12メンバーA(CLL-1としても知られるCLEC12A); 上皮増殖因子受容体の腫瘍特異的変種(EGFRvIII); 甲状腺刺激ホルモン受容体(TSHR); Fms様チロシンキナーゼ3(FLT3); ガングリオシドGD3(GD3); Tn抗原(Tn Ag); リンパ球抗原6ファミリーメンバーG6D(LY6G6D); デルタ様標準Notchリガンド3(DLL3); インターロイキン13受容体サブユニット -2(IL-13RA2); インターロイキン11受容体サブユニット (IL11RA); メソテリン(MSLN); 受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1(ROR1); 前立腺幹細胞抗原(PSCA); erb-b2受容体チロシンキナーゼ2(ERBB2またはHer2/neu); プロテアーゼセリン21(PRSS21); キナーゼ挿入ドメイン受容体(VEGFR2としても知られるKDR); ルイスY抗原(LewisY); 溶質輸送体ファミリー39メンバー6(SLC39A6); 線維芽細胞活性化タンパク質 (FAP); Hsp70ファミリーシャペロン(HSP70); 血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR-beta); ニコチン様コリン作動性受容体 2サブユニット(CHRNA2); 時期特異的胚抗原-4(SSEA-4); ムチン1、細胞表面結合(MUC1); ムチン16、細胞表面結合(MUC16); クローディン18(CLDN18); クローディン19(CLDN19); クローディン20(CLDN20); クローディン21(CLDN21); クローディン22(CLDN22); クローディン23(CLDN23); クローディン24(CLDN24); クローディン25(CLDN25); クローディン26(CLDN26); クローディン27(CLDN27); クローディン28(CLDN28); クローディン29(CLDN29); クローディン30(CLDN30); クローディン31(CLDN31); クローディン32(CLDN32); クローディン33(CLDN33); クローディン34(CLDN34); クローディン35(CLDN35); クローディン36(CLDN36); クローディン37(CLDN37); クローディン38(CLDN38); クローディン39(CLDN39); クローディン40(CLDN40); クローディン41(CLDN41); クローディン42(CLDN42); クローディン43(CLDN43); クローディン44(CLDN44); クローディン45(CLDN45); クローディン46(CLDN46); クローディン47(CLDN47); クローディン48(CLDN48); クローディン49(CLDN49); クローディン50(CLDN50); クローディン51(CLDN51); クローディン52(CLDN52); クローディン53(CLDN53); クローディン54(CLDN54); クローディン55(CLDN55); クローディン56(CLDN56); クローディン57(CLDN57); クローディン58(CLDN58); クローディン59(CLDN59); クローディン60(CLDN60); クローディン61(CLDN61); クローディン62(CLDN62); クローディン63(CLDN63); クローディン64(CLDN64); クローディン65(CLDN65); クローディン66(CLDN66); クローディン67(CLDN67); クローディン68(CLDN68); クローディン69(CLDN69); クローディン70(CLDN70); クローディン71(CLDN71); クローディン72(CLDN72); クローディン73(CLDN73); クローディン74(CLDN74); クローディン75(CLDN75); クローディン76(CLDN76); クローディン77(CLDN77); クローディン78(CLDN78); クローディン79(CLDN79); クローディン80(CLDN80); クローディン81(CLDN81); クローディン82(CLDN82); クローディン83(CLDN83); クローディン84(CLDN84); クローディン85(CLDN85); クローディン86(CLDN86); クローディン87(CLDN87); クローディン88(CLDN88); クローディン89(CLDN89); クローディン90(CLDN90); クローディン91(CLDN91); クローディン92(CLDN92); クローディン93(CLDN93); クローディン94(CLDN94); クローディン95(CLDN95); クローディン96(CLDN96); クローディン97(CLDN97); クローディン98(CLDN98); クローディン99(CLDN99); クローディン100(CLDN100); クローディン101(CLDN101); クローディン102(CLDN102); クローディン103(CLDN103); クローディン104(CLDN104); クローディン105(CLDN105); クローディン106(CLDN106); クローディン107(CLDN107); クローディン108(CLDN108); クローディン109(CLDN109); クローディン110(CLDN110); クローディン111(CLDN111); クローディン112(CLDN112); クローディン113(CLDN113); クローディン114(CLDN114); クローディン115(CLDN115); クローディン116(CLDN116); クローディン117(CLDN117); クローディン118(CLDN118); クローディン119(CLDN119); クローディン120(CLDN120); クローディン121(CLDN121); クローディン122(CLDN122); クローディン123(CLDN123); クローディン124(CLDN124); クローディン125(CLDN125); クローディン126(CLDN126); クローディン127(CLDN127); クローディン128(CLDN128); クローディン129(CLDN129); クローディン130(CLDN130); クローディン131(CLDN131); クローディン132(CLDN132); クローディン133(CLDN133); クローディン134(CLDN134); クローディン135(CLDN135); クローディン136(CLDN136); クローディン137(CLDN137); クローディン138(CLDN138); クローディン139(CLDN139); クローディン140(CLDN140); クローディン141(CLDN141); クローディン142(CLDN142); クローディン143(CLDN143); クローディン144(CLDN144); クローディン145(CLDN145); クローディン146(CLDN146); クローディン147(CLDN147); クローディン148(CLDN148); クローディン149(CLDN149); クローディン150(CLDN150); クローディン151(CLDN151); クローディン152(CLDN152); クローディン153(CLDN153); クローディン154(CLDN154); クローディン155(CLDN155); クローディン156(CLDN156); クローディン157(CLDN157); クローディン158(CLDN158); クローディン159(CLDN159); クローディン160(CLDN160); クローディン161(CLDN161); クローディン162(CLDN162); クローディン163(CLDN163); クローディン164(CLDN164); クローディン165(CLDN165); クローディン166(CLDN166); クローディン167(CLDN167); クローディン168(CLDN168); クローディン169(CLDN169); クローディン170(CLDN170); クローディン171(CLDN171); クローディン172(CLDN172); クローディン173(CLDN173); クローディン174(CLDN174); クローディン175(CLDN175); クローディン176(CLDN176); クローディン177(CLDN177); クローディン178(CLDN178); クローディン179(CLDN179); クローディン180(CLDN180); クローディン181(CLDN181); クローディン182(CLDN182); クローディン183(CLDN183); クローディン184(CLDN184); クローディン185(CLDN185); クローディン186(CLDN186); クローディン187(CLDN187); クローディン188(CLDN188); クローディン189(CLDN189); クローディン190(CLDN190); クローディン191(CLDN191); クローディン192(CLDN192); クローディン193(CLDN193); クローディン194(CLDN194); クローディン195(CLDN195); クローディン196(CLDN196); クローディン197(CLDN197); クローディン198(CLDN198); クローディン199(CLDN199); クローディン200(CLDN200); クローディン201(CLDN201); クローディン202(CLDN202); クローディン203(CLDN203); クローディン204(CLDN204); クローディン205(CLDN205); クローディン206(CLDN206); クローディン207(CLDN207); クローディン208(CLDN208); クローディン209(CLDN209); クローディン210(CLDN210); クローディン211(CLDN211); クローディン212(CLDN212); クローディン213(CLDN213); クローディン214(CLDN214); クローディン215(CLDN215); クローディン216(CLDN216); クローディン217(CLDN217); クローディン218(CLDN218); クローディン219(CLDN219); クローディン220(CLDN220); クローディン221(CLDN221); クローディン222(CLDN222); クローディン223(CLDN223); クローディン224(CLDN224); クローディン225(CLDN225); クローディン226(CLDN226); クローディン227(CLDN227); クローディン228(CLDN228); クローディン229(CLDN229); クローディン230(CLDN230); クローディン231(CLDN231); クローディン232(CLDN232); クローディン233(CLDN233); クローディン234(CLDN234); クローディン235(CLDN235); クローディン236(CLDN236); クローディン237(CLDN237); クローディン238(CLDN238); クローディン239(CLDN239); クローディン240(CLDN240); クローディン241(CLDN241); クローディン242(CLDN242); クローディン243(CLDN243); クローディン244(CLDN244); クローディン245(CLDN245); クローディン246(CLDN246); クローディン247(CLDN247); クローディン248(CLDN248); クローディン249(CLDN249); クローディン250(CLDN250); クローディン251(CLDN251); クローディン252(CLDN252); クローディン253(CLDN253); クローディン254(CLDN254); クローディン255(CLDN255); クローディン256(CLDN256); クローディン257(CLDN257); クローディン258(CLDN258); クローディン259(CLDN259); クローディン260(CLDN260); クローディン261(CLDN261); クローディン262(CLDN262); クローディン263(CLDN263); クローディン264(CLDN264); クローディン265(CLDN265); クローディン266(CLDN266); クローディン267(CLDN267); クローディン268(CLDN268); クローディン269(CLDN269); クローディン270(CLDN270); クローディン271(CLDN271); クローディン272(CLDN272); クローディン273(CLDN273); クローディン274(CLDN274); クローディン275(CLDN275); クローディン276(CLDN276); クローディン277(CLDN277); クローディン278(CLDN278); クローディン279(CLDN279); クローディン280(CLDN280); クローディン281(CLDN281); クローディン282(CLDN282); クローディン283(CLDN283); クローディン284(CLDN284); クローディン285(CLDN285); クローディン286(CLDN286); クローディン287(CLDN287); クローディン288(CLDN288); クローディン289(CLDN289); クローディン290(CLDN290); クローディン291(CLDN291); クローディン292(CLDN292); クローディン293(CLDN293); クローディン294(CLDN294); クローディン295(CLDN295); クローディン296(CLDN296); クローディン297(CLDN297); クローディン298(CLDN298); クローディン299(CLDN299); クローディン300(CLDN300); クローディン301(CLDN301); クローディン302(CLDN302); クローディン303(CLDN303); クローディン304(CLDN304); クローディン305(CLDN305); クローディン306(CLDN306); クローディン307(CLDN307); クローディン308(CLDN308); クローディン309(CLDN309); クローディン310(CLDN310); クローディン311(CLDN311); クローディン312(CLDN312); クローディン313(CLDN313); クローディン314(CLDN314); クローディン315(CLDN315); クローディン316(CLDN316); クローディン317(CLDN317); クローディン318(CLDN318); クローディン319(CLDN319); クローディン320(CLDN320); クローディン321(CLDN321); クローディン322(CLDN322); クローディン323(CLDN323); クローディン324(CLDN324); クローディン325(CLDN325); クローディン326(CLDN326); クローディン327(CLDN327); クローディン328(CLDN328); クローディン329(CLDN329); クローディン330(CLDN330); クローディン331(CLDN331); クローディン332(CLDN332); クローディン333(CLDN333); クローディン334(CLDN334); クローディン335(CLDN335); クローディン336(CLDN336); クローディン337(CLDN337); クローディン338(CLDN338); クローディン339(CLDN339); クローディン340(CLDN340); クローディン341(CLDN341); クローディン342(CLDN342); クローディン343(CLDN343); クローディン344(CLDN344); クローディン345(CLDN345); クローディン346(CLDN346); クローディン347(CLDN347); クローディン348(CLDN348); クローディン349(CLDN349); クローディン350(CLDN350); クローディン351(CLDN351); クローディン352(CLDN352); クローディン353(CLDN353); クローディン354(CLDN354); クローディン355(CLDN355); クローディン356(CLDN356); クローディン357(CLDN357); クローディン358(CLDN358); クローディン359(CLDN359); クローディン360(CLDN360); クローディン361(CLDN361); クローディン362(CLDN362); クローディン363(CLDN363); クローディン364(CLDN364); クローディン365(CLDN365); クローディン366(CLDN366); クローディン367(CLDN367); クローディン368(CLDN368); クローディン369(CLDN369); クローディン370(CLDN370); クローディン371(CLDN371); クローディン372(CLDN372); クローディン373(CLDN373); クローディン374(CLDN374); クローディン375(CLDN375); クローディン376(CLDN376); クローディン377(CLDN377); クローディン378(CLDN378); クローディン379(CLDN379); クローディン380(CLDN380); クローディン381(CLDN381); クローディン382(CLDN382); クローディン383(CLDN383); クローディン384(CLDN384); クローディン385(CLDN385); クローディン386(CLDN386); クローディン387(CLDN387); クローディン388(CLDN388); クローディン389(CLDN389); クローディン390(CLDN390); クローディン391(CLDN391); クローディン392(CLDN392); クローディン393(CLDN393); クローディン394(CLDN394); クローディン395(CLDN395); クローディン396(CLDN396); クローディン397(CLDN397); クローディン398(CLDN398); クローディン399(CLDN399); クローディン400(CLDN400); クローディン401(CLDN401); クローディン402(CLDN402); クローディン403(CLDN403); クローディン404(CLDN404); クローディン405(CLDN405); クローディン406(CLDN406); クローディン407(CLDN407); クローディン408(CLDN408); クローディン409(CLDN409); クローディン410(CLDN410); クローディン411(CLDN411); クローディン412(CLDN412); クローディン413(CLDN413); クローディン414(CLDN414); クローディン415(CLDN415); クローディン416(CLDN416); クローディン417(CLDN417); クローディン418(CLDN418); クローディン419(CLDN419); クローディン420(CLDN420); クローディン421(CLDN421); クローディン422(CLDN422); クローディン423(CLDN423); クローディン424(CLDN424); クローディン425(CLDN425); クローディン426(CLDN426); クローディン427(CLDN427); クローディン428(CLDN428); クローディン429(CLDN429); クローディン430(CLDN430); クローディン431(CLDN431); クローディン432(CLDN432); クローディン433(CLDN433); クローディン434(CLDN434); クローディン435(CLDN435); クローディン436(CLDN436); クローディン437(CLDN437); クローディン438(CLDN438); クローディン439(CLDN439); クローディン440(CLDN440); クローディン441(CLDN441); クローディン442(CLDN442); クローディン443(CLDN443); クローディン444(CLDN444); クローディン445(CLDN445); クローディン446(CLDN446); クローディン447(CLDN447); クローディン448(CLDN448); クローディン449(CLDN449); クローディン450(CLDN450); クローディン451(CLDN451); クローディン452(CLDN452); クローディン453(CLDN453); クローディン454(CLDN454); クローディン455(CLDN455); クローディン456(CLDN456); クローディン457(CLDN457); クローディン458(CLDN458); クローディン459(CLDN459); クローディン460(CLDN460); クローディン461(CLDN461); クローディン462(CLDN462); クローディン463(CLDN463); クローディン464(CLDN464); クローディン465(CLDN465); クローディン466(CLDN466); クローディン467(CLDN467); クローディン468(CLDN468); クローディン469(CLDN469); クローディン470(CLDN470); クローディン471(CLDN471); クローディン472(CLDN472); クローディン473(CLDN473); クローディン474(CLDN474); クローディン475(CLDN475); クローディン476(CLDN476); クローディン477(CLDN477); クローディン478(CLDN478); クローディン479(CLDN479); クローディン480(CLDN480); クローディン481(CLDN481); クローディン482(CLDN482); クローディン483(CLDN483); クローディン484(CLDN484); クローディン485(CLDN485); クローディン486(CLDN486); クローディン487(CLDN487); クローディン488(CLDN488); クローディン489(CLDN489); クローディン490(CLDN490); クローディン491(CLDN491); クローディン492(CLDN492); クローディン493(CLDN493); クローディン494(CLDN494); クローディン495(CLDN495); クローディン496(CLDN496); クローディン497(CLDN497); クローディン498(CLDN498); クローディン499(CLDN499); クローディン500(CLDN500); クローディン501(CLDN501); クローディン502(CLDN502); クローディン503(CLDN503); クローディン504(CLDN504); クローディン505(CLDN505); クローディン506(CLDN506); クローディン507(CLDN507); クローディン508(CLDN508); クローディン509(CLDN509); クローディン510(CLDN510); クローディン511(CLDN511); クローディン512(CLDN512); クローディン513(CLDN513); クローディン514(CLDN514); クローディン515(CLDN515); クローディン516(CLDN516); クローディン517(CLDN517); クローディン518(CLDN518); クローディン519(CLDN519); クローディン520(CLDN520); クローディン521(CLDN521); クローディン522(CLDN522); クローディン523(CLDN523); クローディン524(CLDN524); クローディン525(CLDN525); クローディン526(CLDN526); クローディン527(CLDN527); クローディン528(CLDN528); クローディン529(CLDN529); クローディン530(CLDN530); クローディン531(CLDN531); クローディン532(CLDN532); クローディン533(CLDN533); クローディン534(CLDN534); クローディン535(CLDN535); クローディン536(CLDN536); クローディン537(CLDN537); クローディン538(CLDN538); クローディン539(CLDN539); クローディン540(CLDN540); クローディン541(CLDN541); クローディン542(CLDN542); クローディン543(CLDN543); クローディン544(CLDN544); クローディン545(CLDN545); クローディン546(CLDN546); クローディン547(CLDN547); クローディン548(CLDN548); クローディン549(CLDN549); クローディン550(CLDN550); クローディン551(CLDN551); クローディン552(CLDN552); クローディン553(CLDN553); クローディン554(CLDN554); クローディン555(CLDN555); クローディン556(CLDN556); クローディン557(CLDN557); クローディン558(CLDN558); クローディン559(CLDN559); クローディン560(CLDN560); クローディン561(CLDN561); クローディン562(CLDN562); クローディン563(CLDN563); クローディン564(CLDN564); クローディン565(CLDN565); クローディン566(CLDN566); クローディン567

イン6(CLDN6); 上皮増殖因子受容体(EGFR); 黒色腫において選択的に発現される抗原(PRAME); 神経細胞接着分子(NCAM); ADAMメタロペプチダーゼドメイン10(ADAM10); 葉酸受容体1(FOLR1); 葉酸受容体(FOLR2); 炭酸脱水酵素IX(CA9); プロテアソームサブユニット9(PSMB9またはLMP2); エフリン受容体A2(EphA2); テトラスパニン10(TSPAN10); フコシルGM1(Fuc-GM1); シアリルルイス接着分子(sLe); TGS5; 高分子量黒色腫関連抗原(HMWMAA); o-アセチル-GD2ガングリオシド(OAcGD2); 腫瘍内皮マーカー7関連(TEM7R); Gタンパク質-共役受容体クラスCグループ5、メンバーD(GPRC5D); 染色体Xオープンリーディングフレーム61(CXorf61); ALK受容体チロシンキナーゼ(ALK); ポリシアル酸; 胎盤特異的1(Placenta-specific 1; PLAC1); globoHグリコセラミド(GI oboH)の六糖部分; NY-BR-1抗原; ウロプラキン2(UPK2); ヘパタイティスAウイルス細胞受容体1(HAVCR1); アドレナリン受容体3(ADRB3); パンネキシン3(PANX3); Gタンパク質-共役受容体20(GPR20); リンパ球抗原6ファミリーメンバーK(LY6K); 嗅覚受容体ファミリー51サブファミリーEメンバー2(OR51E2); TCRガンマ代替リーディングフレームタンパク質(TARP); ウィルムス腫瘍タンパク質(WT1); 12;21染色体転座によるETV6-A-ML1融合タンパク質(ETV6-AML1); 精子自己抗原タンパク質17(SPA17); X抗原ファミリー、メンバー1E(XAGE1E); TEK受容体チロシンキナーゼ(Tie2); 黒色腫がん精巣抗原1(MAD-CT-1); 黒色腫がん精巣抗原2(MAD-CT-2); Fos関連抗原1; p53変異体; ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT); 肉腫転座切断点; アポトーシスの黒色腫阻害物質(ML-IAP); ERG(膜貫通プロテアーゼ、セリン2(TMPRSS2)ETS融合遺伝子); N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼV(NA17); ペアボックスタンパク質Pax-3(PAX3); アンドロゲン受容体; サイクリンB1; v-mycトリ骨髄細胞腫ウイルスがん遺伝子神経芽腫由来ホモログ(MYCN); RasホモログファミリーメンバーC(RhoC); シトクロムP450 1B 1(CYP1B1); CCTC結合因子(ジンクフィンガータンパク質)様(BORIS); T細胞によって認識される扁平上皮がん抗原3(SART3); ペアボックスタンパク質Pax-5(PAX5); プロアクロシン結合タンパク質sp32(OY-TES1); リンパ球特異的タンパク質チロシンキナーゼ(LCK); Aキナーゼアンカータンパク質4(AKAP-4); 滑膜肉腫、X切断点2(SSX2); 白血球関連免疫グロブリン様受容体1(LAIR1); IgA受容体のFc断片(FCAR); 白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリーAメンバー2(LILRA2); CD300分子様ファミリーメンバーf(CD300LF); 骨髄間質細胞抗原2(BST2); EGF様モジュール含有ムチン様ホルモン受容体様2(EMR2); リンパ球抗原75(LY75); グリピカン-3(GPC3); Fc受容体様5(FCRL5); 免疫グロブリンラムダ様ポリペプチド1(IGLL1)、および熱ショックタンパク質70(HSP70)。

【0356】

特定の局面の下で、本発明の細胞は、CARが向けられる抗原が病的細胞または疾患の原因となる組織によって発現または過剰発現される、疾患の処置に用いられる。

【0357】

本発明のTCR分子は、抗原結合ドメインが疾患に関連する腫瘍抗原に結合し、かつ該腫瘍抗原が、PCTA-I/ガレクチン8、CD171、TAG72、CEA、EPCAM、PSCA、PRSS21、PDGFR-ベータ、プロスターーゼ(Prostase)、PAP、ELF2M、エフリンB2、IGF-I受容体、CAIX, gp100、bcr-abl、チロシナーゼ、GM3、NY-ESO-1、LAGE-1a、MAGE-A1、レグマイン、HPV E6,E7、MAGE AI、プロステイン、サバイビンおよびテロメラーゼ、PC-TA-I/ガレクチン8、MelanA/MART1、Ras変異体、TRP-2、RAGE-1、RU1、RU2、ならびに腸管カルボキシルエステラーゼからなる群より選択される、抗原結合ドメインを含む。

【0358】

好ましくは、本発明のCARは、疾患に関連する腫瘍抗原に結合する抗原結合ドメインを含み、かつ該腫瘍抗原は、CD22、CD123、CS-1、CLL-1、CD38、HSP70、MUC-1、CD30、FAP、HER2、CD79aおよびCD79bからなる群より選択される。

【0359】

好ましい態様において、本発明のCARは、疾患に関連する腫瘍抗原に結合する抗原結合ドメインを含み、該腫瘍抗原は、BCMA、CD33、EGFRVIII、Flt3、WT1、CD70、MU

10

20

30

40

50

C16、PRAME、TSPAN10 CLAUDIN18.2、DLL3、LY6G6D、Liv-1、CHRNA2、ADAM10からなる群より選択される。

【0360】

好ましくは、本発明の細胞の細胞表面に発現されるCARは、CD22に結合する抗原結合ドメインを含む。

【0361】

好ましくは、本発明の細胞の細胞表面に発現されるCARは、CD123に結合する抗原結合ドメインを含む。

【0362】

好ましくは、本発明の細胞の細胞表面に発現されるCARは、CD30に結合する抗原結合ドメインを含む。 10

【0363】

好ましくは、本発明の細胞の細胞表面に発現されるCARは、CD38に結合する抗原結合ドメインを含む。

【0364】

好ましくは、本発明の細胞の細胞表面に発現されるCARは、CS-1に結合する抗原結合ドメインを含む。

【0365】

好ましくは、本発明の細胞の細胞表面に発現されるCARは、CLL-1に結合する抗原結合ドメインを含む。 20

【0366】

好ましくは、本発明の細胞の細胞表面に発現されるCARは、O-アセチルGD2に結合する抗原結合ドメインを含む。

【0367】

好ましくは、本発明の細胞の細胞表面に発現されるCARは、FAPに結合する抗原結合ドメインを含む。

【0368】

好ましくは、本発明の細胞の細胞表面に発現されるCARは、HER2に結合する抗原結合ドメインを含む。

【0369】

好ましくは、本発明の細胞の細胞表面に発現されるCARは、CD79aに結合する抗原結合ドメインを含む。 30

【0370】

好ましくは、本発明の細胞の細胞表面に発現されるCARは、CD79bに結合する抗原結合ドメインを含む。

【0371】

好ましくは、本発明の細胞の細胞表面に発現されるCARは、BCMAに結合する抗原結合ドメインを含む。

【0372】

好ましくは、本発明の細胞の細胞表面に発現されるCARは、CD33に結合する抗原結合ドメインを含む。 40

【0373】

好ましくは、本発明の細胞の細胞表面に発現されるCARは、EGFRVIIIに結合する抗原結合ドメインを含む。

【0374】

好ましくは、本発明の細胞の細胞表面に発現されるCARは、Flt3に結合する抗原結合ドメインを含む。

【0375】

好ましくは、本発明の細胞の細胞表面に発現されるCARは、WT1に結合する抗原結合ドメインを含む。 50

【 0 3 7 6 】

好ましくは、本発明の細胞の細胞表面に発現されるCARは、CD70に結合する抗原結合ドメインを含む。

【 0 3 7 7 】

好ましくは、本発明の細胞の細胞表面に発現されるCARは、MUC16に結合する抗原結合ドメインを含む。

【 0 3 7 8 】

好ましくは、本発明の細胞の細胞表面に発現されるCARは、PRAMEに結合する抗原結合ドメインを含む。

【 0 3 7 9 】

好ましくは、本発明の細胞の細胞表面に発現されるCARは、TSPAN10に結合する抗原結合ドメインを含む。

10

【 0 3 8 0 】

好ましくは、本発明の細胞の細胞表面に発現されるCARは、CLAUDIN18.2に結合する抗原結合ドメインを含む。

【 0 3 8 1 】

好ましくは、本発明の細胞の細胞表面に発現されるCARは、DLL3に結合する抗原結合ドメインを含む。

【 0 3 8 2 】

好ましくは、本発明の細胞の細胞表面に発現されるCARは、LY6G6Dに結合する抗原結合ドメインを含む。

20

【 0 3 8 3 】

好ましくは、本発明の細胞の細胞表面に発現されるCARは、Liv-1に結合する抗原結合ドメインを含む。

【 0 3 8 4 】

好ましくは、本発明の細胞の細胞表面に発現されるCARは、CHRNA2に結合する抗原結合ドメインを含む。

【 0 3 8 5 】

好ましくは、本発明の細胞の細胞表面に発現されるCARは、ADAM10に結合する抗原結合ドメインを含む。

30

【 0 3 8 6 】

本発明は、CARが細胞外リガンド結合ドメイン、モノクローナル抗体に特異的な少なくとも1つのエピトープ、膜貫通ドメインおよび1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性-TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【 0 3 8 7 】

本発明は、CARが細胞外リガンド結合ドメイン、モノクローナル抗体に特異的な少なくとも1つのエピトープ、CD8アルファ由来膜貫通ドメイン、ならびに1つまたは複数のCD3ゼータ由来細胞内シグナル伝達ドメインおよび4-1BB(ヒトCD137)由来共刺激ドメインを含む、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性-TCR陰性ヒト細胞を提供する。

40

【 0 3 8 8 】

本発明は、CARが細胞外リガンド結合ドメイン、CD8アルファ由来ヒンジ、モノクローナル抗体に特異的な少なくとも1つのエピトープ、CD8アルファ由来膜貫通ドメイン、ならびに1つまたは複数のCD3ゼータ由来細胞内シグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性-TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【 0 3 8 9 】

本発明は、CARが細胞外リガンド結合ドメイン、IgG1由来ヒンジ、モノクローナル抗体に特異的な少なくとも1つのエピトープ、CD8アルファ由来膜貫通ドメイン、ならびに1つ

50

または複数のCD3ゼータ由来細胞内シグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0390】

本発明は、CARが細胞外リガンド結合ドメイン、ヒンジなし、CD8アルファ由来ヒンジ、IgG1由来ヒンジ、Fc RIII 由来ヒンジ、モノクローナル抗体に特異的な少なくとも1つのエピトープ、CD8アルファ由来膜貫通ドメイン、ならびに1つまたは複数のCD3ゼータ由来細胞内シグナル伝達ドメインおよび4-1BB由来共刺激ドメインを含む、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0391】

本発明は、抗CD123 CARが細胞外リガンド結合ドメイン、モノクローナル抗体に特異的な少なくとも1つのエピトープ、膜貫通ドメインおよび1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0392】

本発明は、抗CD22 CARが細胞外リガンド結合ドメイン、モノクローナル抗体に特異的な少なくとも1つのエピトープ、膜貫通ドメインおよび1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0393】

本発明は、抗CD30 CARが細胞外リガンド結合ドメイン、モノクローナル抗体に特異的な少なくとも1つのエピトープ、膜貫通ドメインおよび1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0394】

本発明は、抗CLL-1 CARが細胞外リガンド結合ドメイン、モノクローナル抗体に特異的な少なくとも1つのエピトープ、膜貫通ドメインおよび1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0395】

本発明は、抗CS-1 CARが細胞外リガンド結合ドメイン、モノクローナル抗体に特異的な少なくとも1つのエピトープ、膜貫通ドメインおよび1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0396】

特定の態様において、本発明は、少なくとも1つの挿入が、最初のTALEN結合ドメイン、IRES、キメラ抗原受容体(CAR)を含む外因性ポリヌクレオチド配列、ポリアデニル化シグナルの転写終結配列、任意でTALEN結合ドメインを含む、TALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0397】

特定の態様において、本発明は、キメラ抗原受容体(CAR)が、モノクローナル抗体に特異的な少なくとも1つの抗原、好ましくはモノクローナル抗体に特異的な2つの抗原を含む、上記のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0398】

特定の態様において、本発明は、外因性ポリヌクレオチドが転写終結配列またはRNAポリメラーゼの活性を停止させることによって転写を終結させるシグナルを含む、上記のようなTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0399】

終結因子配列

本発明によるTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞は、終結配列または終結因子配

10

20

30

40

50

列を含むTRAC遺伝子への挿入を含み、好ましくは本発明によるTALEN改変内因性-T
CR陰性ヒト細胞は5'から3'方向に、タンパク質をコードするオープンリーディングフレーム、好ましくはCARおよび終結配列を含む挿入を含みうる。

【0400】

したがって、終結配列または終結因子配列をTRAC遺伝子座に挿入し、CARを発現させ、内因性アルファベータTCRの細胞表面発現を抑止しうる。

【0401】

一般に、終結因子は、転写単位(遺伝子のような)の末端を定義し、新しく合成されたRNAを転写機構から解放するプロセスを開始する、配列に基づく要素である。終結因子は転写される遺伝子の下流に見出され、典型的には、ポリアデニル化またはポリ(A)シグナルのような、3'調節要素の直後に存在する。ポリアデニル化は、メッセンジャーRNA転写産物の尾部への複数のアデニン(A)ヌクレオチドの転写後付加である。ポリアデニル化の目的および機構は細胞型によって異なるが、ポリアデニル化は一般に真核生物における転写産物の寿命を促進するのに役立つ。したがって、終結因子はRNAプロセッシングを調節し、RNA半減期、および最終的には遺伝子発現の変動性に寄与する。

10

【0402】

http://parts.igem.org/Terminators/Catalog#Eukaryotic_terminatorsで真核生物において利用可能な以下の終結因子は、本発明の一部である。

【0403】

本発明の終結因子は、SV40、hGH、BGH、およびrbGlob終結因子から選択される終結因子を含む。

20

【0404】

本発明の終結因子は、SV40、hGH、BGH、およびrbGlob終結因子から選択される終結因子を含み、ポリアデニル化および終結の両方を促進する配列モチーフAAUAAAを含む。有利には、SV40後期ポリAおよびrbGlobポリAは、転写の終結がさらなるヘルパー配列の存在によるものである場合に好ましい。

30

【0405】

好ましい態様において、本発明の終結因子配列は、SV40ポリA、BGHポリA、hGHポリA、rbGlobポリAから選択される終結因子配列であってよい。より好ましい態様において、本発明の終結因子配列はBGHポリAを含み、さらにより好ましい態様において、コンセンサス配列AATAAAを含む。

30

【0406】

本発明による終結因子配列は、以下の配列:

CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCCGTGCCTCCTTGACCTGGAAAGGTGCCACTCC

CACTGTCCTTCCT**AATAAA**ATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGG

GTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATGGGAACACAATAGCAGGCATGCTGGGATGCGGTGGCTATG

,

40

CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCCGTGCCTCCTTGACCTG-

GAAGGTGCCACTCCACTGTCCTTCCT**AATAAA**ATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAG-

TAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATGGGAAGA-

CAATAGCAGGCATGCTGGGATGCGGTGGCTATGG

または

50

CCTCGACTGTGCCTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCCGTGCCTCCTGACCCCTGGAAGGTGC
CACTCCCCTGTCCTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGG
GGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGATGCGGTGG
GCTCTATGGCTTCTGAGGCGAAAGAACCAAGCTGGGGCTCTAGGGGTATCCCC

のBGHポリAを含む。本発明によるさらにより好ましい終結因子配列は、以下の配列:
CTGTGCCTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCCGTGCCTCCTGACCCCTGGAAGGTGCCACTCC

CACTGTCCCTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGG
GTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAACACAATAGCAGGCATGCTGGGATGCGGTGGCTAT

を含む。

【0407】

免疫チェックポイント因子

特定の態様において、本発明は、少なくとも1つのさらなる内因性ゲノム遺伝子がエンドヌクレアーゼ不活性化され、好ましくはTALEN不活性化され、該内因性ゲノム遺伝子が、TCRの内因性ゲノムベータサブユニット遺伝子、内因性ゲノムサイトカイン誘導性SH2含有(CISH)遺伝子、アデノシンA2a受容体(ADORA)ゲノム遺伝子、内因性ゲノムCD276遺伝子、内因性ゲノムVセトドメイン含有T細胞活性化阻害物質1(VTCN1)遺伝子、内因性ゲノムBおよびTリンパ球関連(BTLA)遺伝子、内因性ゲノム細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4(CTLA4)遺伝子、内因性ゲノムインドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ1(IDO1)遺伝子、内因性ゲノムキラー細胞免疫グロブリン様受容体、3ドメイン、長い細胞質尾部1(KIR3DL1)遺伝子、内因性ゲノムリンパ球活性化遺伝子3(LAG3)遺伝子、内因性ゲノムプログラム細胞死1(PD-1)遺伝子、内因性ゲノムA型肝炎ウイルス細胞受容体2(HAVCR2)遺伝子、T細胞活性化内因性ゲノムVドメイン免疫グロブリンサプレッサー(VISTA)遺伝子、内因性ゲノムナチュラルキラー細胞受容体2B4(CD244)遺伝子、内因性ゲノムヒポキサンチンホスホリボシリルトランスフェラーゼ1(HPRT)遺伝子、内因性ゲノムアデノ随伴ウイルス組み込み部位(AAVS1)、ならびに内因性ゲノムケモカイン(C-Cモチーフ)受容体5(遺伝子/偽遺伝子)(CCR5)遺伝子、それらの組み合わせからなる群より選択される、上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性-TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0408】

本発明は、遺伝子CTLA4、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、LAG3、HAVCR2、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、TGFBRII、TGFBRI、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3から選択される1つの遺伝子が、参照により本明細書に組み入れられるWO2014/184741にあるように不活性化されている、CARまたはTCR、特に上記のCARのいずれかを発現するTALEN改変内因性-TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0409】

本発明は、CARまたはTCR、特に上記のCARのいずれかを発現する、上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性-TCR陰性ヒト細胞を提供し、

(a) 発現が、解糖を増加させるためのSERCA3、miR101およびmir26A、解糖予備能を動員するためのBCATのような、解糖および/もしくはカルシウムシグナル伝達の低減に関与する因子; ならびに/または

10

20

30

40

50

(b) 発現がIL27RA、STAT1、STAT3のような、免疫チェックポイントタンパク質(例えばTIM3、CEACAM、LAG3、TIGIT)を上方制御する因子; ならびに/または

(c) 発現がILT2もしくはILT4のような、HLA-Gとの相互作用を媒介する因子; ならびに/または

(d) 発現がTreg増殖を低減させるためのSEMA7A、SHARPIN、アポトーシスを低下させるためのSTAT1、IL-2分泌を増加させるためのPEA15およびCD8記憶分化に有利に働くためのRICTORのようなT細胞増殖の下方制御に関与する因子; ならびに/または

(e) 発現がmir21のような、T細胞活性化の下方制御に関与するポリヌクレオチド配列; ならびに/または

(f) 発現がJAK2およびAURKAのような、サイトカインに応答するシグナル伝達経路に10
関与するポリヌクレオチド配列; ならびに/または

(g) 発現がDNMT3、miRNA31、MT1A、MT2A、PTGER2のような、T細胞枯渇に関20
与するポリヌクレオチド配列

から選択される少なくとも1つのさらなる因子の発現のレベル。

【0410】

特定の態様において、本発明は、参照により全体が本明細書に組み入れられるPA2017
70603に記載されているように、遺伝子改変されている、上記のいずれか1つに記載のTA
LEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0411】

特定の態様において、本発明は、SERCA3の発現を低減または不活性化するように遺伝
子改変されている、上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞
を提供する。

【0412】

特定の態様において、本発明は、miR101の発現を低減または不活性化するように遺伝
子改変されている、上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞
を提供する。

【0413】

特定の態様において、本発明は、解糖を増加させるためmir26Aの発現を低減または不
活性化するように遺伝子改変されている、上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性
-TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0414】

特定の態様において、本発明は、解糖予備能を動員するためBCATの発現を低減または
不活性化するように遺伝子改変されている、上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性
-TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0415】

特定の態様において、本発明は、IL27RAの発現を低減または不活性化するように遺伝
子改変されている、上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞
を提供する。

【0416】

特定の態様において、本発明は、STAT1の発現を低減または不活性化するように遺伝子
改変されている、上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を
提供する。

【0417】

特定の態様において、本発明は、STAT3の発現を低減または不活性化するように遺伝子
改変されている、上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を
提供する。

【0418】

特定の態様において、本発明は、ILT2の発現を低減または不活性化するように遺伝子改
変されている、上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提
供する。

10

20

30

40

50

【 0 4 1 9 】

特定の態様において、本発明は、ILT4の発現を低減または不活性化するように遺伝子改変されている、上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【 0 4 2 0 】

特定の態様において、本発明は、SEMA7の発現を低減または不活性化するように遺伝子改変されている、上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【 0 4 2 1 】

特定の態様において、本発明は、SHARPINの発現を低減または不活性化するように遺伝子改変されている、上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。 10

【 0 4 2 2 】

特定の態様において、本発明は、STAT1の発現を低減または不活性化するように遺伝子改変されている、上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【 0 4 2 3 】

特定の態様において、本発明は、PEA15の発現を低減または不活性化するように遺伝子改変されている、上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【 0 4 2 4 】

特定の態様において、本発明は、RICTORの発現を低減または不活性化するように遺伝子改変されている、上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【 0 4 2 5 】

特定の態様において、本発明は、mir21の発現を低減または不活性化するように遺伝子改変されている、上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【 0 4 2 6 】

特定の態様において、本発明は、JAK2の発現を低減または不活性化するように遺伝子改変されている、上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。 30

【 0 4 2 7 】

特定の態様において、本発明は、AURKAの発現を低減または不活性化するように遺伝子改変されている、上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【 0 4 2 8 】

特定の態様において、本発明は、DNMT3の発現を低減または不活性化するように遺伝子改変されている、上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【 0 4 2 9 】

特定の態様において、本発明は、miRNA31の発現を低減または不活性化するように遺伝子改変されている、上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【 0 4 3 0 】

特定の態様において、本発明は、MT1Aの発現を低減または不活性化するように遺伝子改変されている、上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【 0 4 3 1 】

特定の態様において、本発明は、MT2Aの発現を低減または不活性化するように遺伝子

10

20

30

40

50

改变されている、上記のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0432】

特定の態様において、本発明は、PTGER2の発現を低減または不活性化するように遺伝子改变されている、上記のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0433】

特定の態様において、本発明は、参照により全体が本明細書に組み入れられるPCT/EP2017/058923にあるように少なくとも1つのさらなる内因性ゲノム遺伝子が過剰発現される、上記のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。 10

【0434】

本発明は、病的状態に関与する病的細胞の生存を変化させるために用いるための上記のようなTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供し、該病的状態は例えば、MHCまたはTCR分子にかかわらず個体におけるがん、ウイルス感染症であってよく、好ましくは該TALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞はGVHDを誘導しない、より好ましくは該TALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞はGVHDを誘導しないかつHVGDを誘導しない。

【0435】

本発明は、GVHDを誘導しない医薬として用いるための、上記のようなTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0436】

本発明は、重症度分類(grade)1 GVHDを誘導しない医薬として用いるための、上記のようなTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。 20

【0437】

本発明は、重症度分類2 GVHDを誘導しない医薬として用いるための、上記のようなTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0438】

本発明は、重症度分類3 GVHDを誘導しない医薬として用いるための、上記のようなTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0439】

本発明は、重症度分類4 GVHDを誘導しない医薬として用いるための、上記のようなTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。 30

【0440】

本発明は、急性GVHDを誘導しない医薬として用いるための、上記のようなTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0441】

本発明は、慢性GVHDを誘導しない医薬として用いるための、上記のようなTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0442】

本発明は、急性GVHDも慢性GVHDも誘導しない医薬として用いるための、上記のようなTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0443】

本発明は、上記態様のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞を含むヒト細胞の集団を提供する。 40

【0444】

本発明は、上記のいずれか1つに記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞または上記のようなヒト細胞の集団および薬学的に許容される賦形剤を含む薬学的組成物を提供する。

【0445】

本発明は、医薬として用いるための、上記に記載のTALEN改变内因性 -TCR陰性ヒト細胞または上記のようなヒト細胞の集団または上記のような薬学的組成物を提供する。 50

【0446】

本発明は、がん、特に小児がんの処置で用いるための上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞または上記のようなヒト細胞の集団または上記に記載の薬学的組成物を提供する。

【0447】

本発明の目的は固形がんに対する免疫療法を包含し、本発明の細胞は、参照により本明細書に組み入れられるWO2015092024に開示されているように、低酸素に耐性があるようにおよび/または低酸素下でCARを発現させるために操作されうる

【0448】

本発明は、がん腫がん、リンパ腫、肉腫、芽細胞腫、および白血病からなる群より選択されるがんの処置で用いるための上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞または上記のようなヒト細胞の集団または上記に記載の薬学的組成物を提供する。

【0449】

本発明は、血液がん、急性白血病、B細胞急性リンパ性白血病(BALL)、T細胞急性リンパ性白血病(TALL)、小リンパ性白血病(SLL)、急性リンパ芽球性白血病(ALL)；慢性白血病、慢性骨髄性白血病(CML)、慢性リンパ球性白血病(CLL)、非ホジキンリンパ腫、もしくは骨髄腫の処置で用いるための；または疾患がCD19陰性がん、例えば、CD19陰性再発がんである、上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞または上記のようなヒト細胞の集団または上記に記載の薬学的組成物を提供する。

10

【0450】

本発明は、B細胞由来のがん、乳がん、胃がん、神経芽細胞腫、骨肉腫、肺がん、黒色腫、前立腺がん、結腸がん、腎細胞がん、卵巣がん、横紋筋肉腫、白血病、およびホジキンリンパ腫からなる群より選択されるがんの処置で用いるための上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞または上記のようなヒト細胞の集団または上記に記載の薬学的組成物を提供する。

20

【0451】

本発明は、B細胞由来のがんが、B細胞リンパ腫、B系統急性リンパ芽球性白血病、B細胞慢性リンパ性白血病、およびB細胞非ホジキンリンパ腫からなる群より選択されるがんの処置で用いるための上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞または上記のようなヒト細胞の集団または上記に記載の薬学的組成物を提供する。

30

【0452】

本発明は、AML、ALL、T細胞リンパ腫であるがんの処置で用いるための上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞または上記のようなヒト細胞の集団または上記に記載の薬学的組成物を提供する。

【0453】

エンドヌクレアーゼ改変初代細胞を検出するための手段

本発明は、TALEN、Crispr/cas 9、メガヌクレアーゼ、TAL-ヌクレアーゼ、ジンクフインガーヌクレアーゼから選択されるエンドヌクレアーゼ改変内因性 -TCR陰性初代ヒト細胞を検出するための手段または縮重された手段(degenerated means)を提供する。

40

【0454】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)では、プライマーを用いて、DNAに結合させ複製を開始させる。通常、目的は特定のDNA片を增幅することであるため、プライマーはそのDNA配列の周囲にのみ結合するようにデザインされる。対照的に、縮重オリゴヌクレオチドプライミングPCR (DOP-PCR)では、多くの配列に潜在的に結合することができるプライマーを用いる。これは2つの方法：縮重塩基対合および/または最初の2サイクルばかりでの低いアニーリング温度の使用によって達成される。縮重塩基対合はまた、他の任意の塩基対に結合することができるデオキシリノシンのような塩基を用いることによって達成される。6 bpのみの一致では、プライマーとDNAとの間の結合は、非縮重プライマーを用いた通常の適切な条件と比較して弱いという事実にもかかわらず、低い初期アニーリング温度はDNA

50

へのこのプライマーの結合を安定化させる。

【 0 4 5 5 】

縮重プライマーは一般に、3'末端に6個の通常の塩基対、一連の縮重ヌクレオチド、および再び5'末端に6個の通常の塩基対を有する。プローブの特異性は、3'末端の6 bpによって与えられる。通常のPCRプライマーの場合のように、16またはそれ以上よりも6 bpを一致させる方がはるかに容易であるため、この縮重プライマーは、通常のPCRプライマーよりもはるかに多くのゲノム中の配列を增幅する。

【 0 4 5 6 】

本発明は、ゲノムTCR遺伝子(TRAC遺伝子)の定常領域が、レアカットエンドヌクレアーゼにより生成されかつアルファベータTCRの細胞表面発現に影響を与える遺伝子改変を含み、該ゲノムTRAC遺伝子が5'から3'方向に、

- (a) 該ヒトゲノムTRAC遺伝子上流の5'領域、
- (b) レアカットエンドヌクレアーゼ用の認識ドメイン、
- (c) アルファベータTCRの細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインの細胞表面発現に影響を与える野生型TRAC遺伝子と比較したギャップまたは挿入であって、挿入が、終止コドン、IRES、TRACオーブンリーディングフレームとインフレームの自己切断ペプチドをコードする配列のようなコード配列、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする配列、TCRをコードする配列、薬物に対する感受性を付与するタンパク質をコードする配列、薬物に対する耐性を付与するタンパク質をコードする配列、サイトカイン、終結配列、それらの組み合わせのような非コード配列から選択される外因性ポリヌクレオチドを含む、ギャップまたは挿入、
- (c') 任意で第2のレアカットエンドヌクレアーゼ認識ドメイン、
- (d) ゲノムTRAC遺伝子の3'領域

をさらに含む、エンドヌクレアーゼ改変内因性 -TCR陰性初代ヒト細胞を検出するための手段を提供する。

【 0 4 5 7 】

本発明は、潜在的なオフサイトおよびオンサイトエンドヌクレアーゼ誘導事象(二本鎖DNA切断)を検出するための上記に記載の手段を提供する。

【 0 4 5 8 】

本発明は、エンドヌクレアーゼが、Crispr/Cas 9、Cpf1、TALEN、トランスポザーゼ、ZEN、ジンクフィンガーエンドヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、またはMegaTALからなる群より選択される、上記に記載の手段を提供する。

【 0 4 5 9 】

本発明は、エンドヌクレアーゼが、Crispr/Cas 9、TALEN、トランスポザーゼ、ジンクフィンガーエンドヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、MegaTAL、それらの組み合わせからなる群より選択される、上記に記載の手段を提供する。

【 0 4 6 0 】

本発明は、ゲノムTCR遺伝子(TRAC遺伝子)の定常領域が、TALENにより生成されかつアルファベータTCRの細胞表面発現に影響を与える遺伝子改変を含み、該ゲノムTRAC遺伝子が5'から3'方向に、

- (a) 該ヒトゲノムTRAC遺伝子上流の5'領域、
- (b) TALEN用の認識ドメイン、好ましくは
TTGTCCCCACAGATATCC
- (c) アルファベータTCRの細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインの細胞表面発現に影響を与える野生型TRAC遺伝子と比較したギャップまたは挿入であって、挿入が、終止コドン、IRES、TRACオーブンリーディングフレームとインフレームの自己切断ペプチドをコードする配列のようなコード配列、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする配列、TCRをコードする配列、薬物に対する感受性を付与するタンパク質をコードする配列、薬物に対する耐性を付与するタンパク質をコードする配列、サイトカイン、終結配列、それらの組み

10

20

30

40

50

合わせのような非コード配列から選択される外因性ポリヌクレオチドを含むギャップまたは挿入、

(c') 任意で第2のTALEN認識ドメイン、

(d) ゲノムTRAC遺伝子の3'領域

を含む、TALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を同定するための手段を提供する。

【0461】

本発明は、少なくとも1つの手段がエンドヌクレアーゼ改変TRAC遺伝子に挿入された配列に結合し、および/またはエンドヌクレアーゼ結合配列上流の配列に結合する、上記に記載の手段を提供する。

【0462】

本発明は、少なくとも1つのプローブを用いて操作されたヒト初代細胞におけるオフサイトおよびオンサイトエンドヌクレアーゼ誘導事象を検出するための上記に記載の手段を提供する。

【0463】

本発明において、プローブは、所与のエンドヌクレアーゼ、好ましくはTALEN、より好ましくは

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctgaccctgCCGTGTACCAAGCTGAGAGA

に結合するTALENを用いて同定された既知の真正オンサイトに基づいてデザインされうる。この好ましい局面の下で、第1の半TALEN部分が

TTGTCCCACAGATATCC

20

に結合し、第2のものが

CCGTGTACCAAGCTGAGAGA

に結合し、かつdsDNA切断が

agaaccctgaccctg

内で行われる。

【0464】

オフサイト配列の検出および同定を可能にする任意の既知の方法、好ましくは本発明の適合ガイド配列技法および本発明の挿入の検出方法が用いられる。

【0465】

特定の態様において、本発明は、ヒト初代細胞を操作するプロセス中にオフ配列に挿入された配列に結合する少なくとも1つのプローブを用いて、操作されたヒト初代細胞における潜在的オフサイトおよびオンサイトエンドヌクレアーゼ誘導事象を検出するための上記に記載の手段を提供する。

【0466】

そのようなオフサイト挿入の検出は、オフサイト事象がヒトにおける免疫療法のための医薬として用いられるエンドヌクレアーゼ操作ヒト初代細胞において望ましくないので、最終的にオフサイトを有する操作ヒト初代細胞を確保し捨て去ることを可能にするであろう。

【0467】

あるいは、エンドヌクレアーゼ操作されたヒト初代細胞におけるオフサイト事象は、ヒト初代細胞におけるエンドヌクレアーゼ誘導オフサイト事象を測定するための既知の方法のいずれか1つを用いて同定されたヒトゲノムにおける真正オフサイト配列のリストを用いて分析されうる。

【0468】

本発明は、エンドヌクレアーゼ結合ドメインに対応する配列に結合する少なくとも1つのプローブまたはエンドヌクレアーゼ結合ドメイン上流の配列に結合するプローブを用い

30

40

50

て、ヒト初代細胞における潜在的なオフサイトおよびオンサイトエンドヌクレアーゼ誘導事象を検出するための上記に記載の手段を提供する。

【0469】

相補配列を用いてもよい。

【0470】

本発明は、定義された真正オフサイト配列に対応する配列に結合する少なくとも1つのプローブを用いて、ヒト初代細胞における潜在的なオフサイトおよびオンサイトエンドヌクレアーゼ誘導事象を検出するための上記に記載の手段を提供する。

【0471】

好ましくは、本発明は、ヒト初代細胞におけるオフサイトおよびオンサイトのTRAC遺伝子特異的エンドヌクレアーゼ誘導事象を検出するための上記に記載の手段を提供する。

10

【0472】

好ましくは、本発明は、ヒト初代細胞におけるオンサイトTRAC特異的TALEN誘導事象を含む、ヒト細胞を検出するための上記に記載の手段を提供する。

【0473】

好ましくは、本発明は、

TTGTCCCACAGATATC

に結合するおよび/または

CCGTGTACCAAGCTGAGA

20

に結合するプローブによって、ヒト初代細胞におけるオンサイトのTRAC特異的TALEN誘導事象を検出するための上記に記載の手段を提供する。

【0474】

好ましくは、本発明は、

TTGTCCCACAGATATC または GGCACATGGTCGACTCT

に結合する、好ましくは

TTGTCCCACAGATATC

30

に結合する、および

AACAGGGGTGTCTATAG

に結合するプローブによって、ヒト初代細胞におけるオンサイトのTRAC特異的TALEN誘導事象を検出するための上記に記載の手段を提供する。

【0475】

本発明は、TRAC遺伝子を標的とするエンドヌクレアーゼCrispr、TALEN、メガヌクレアーゼ、Znフィンガーヌクレアーゼに対してのヒトゲノムにおける先行技術において同定された真正オフサイト配列のリストを利用する。

【0476】

最初の方法は、Hendel et al., 2015. Trends Biotechnol. Feb; 33(2): 132-140; Pattanayak V. 2014. Methods Enzymol. 546: 47-78において開示されているもの、好ましくはTALENに適合されたガイド配列法である

40

【0477】

本発明は、エンドヌクレアーゼ、好ましくはTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を同定するための手段を提供し、少なくとも1つまたは少なくとも2つの異なるエンドヌクレアーゼは、PCT/EP2016/066355にあるように一緒にまたは連続的にのいずれかで用いられ、かつTRAC遺伝子と、参照により本明細書に組み入れられるPA2016 70840に記載されたものから選択される少なくとも1つの別の遺伝子とを標的とした。

【0478】

50

本発明は、エンドヌクレアーゼ改変内因性-TCR陰性ヒト初代細胞を同定するための手段を提供し、少なくとも1つまたは少なくとも2つの異なるエンドヌクレアーゼは、PCT/EP2016/066355にあるように一緒にまたは連続的にのいずれかで用いられ、かつTRAC遺伝子とCD38、CD70、dCK、CD52、ベータ2ミクログロブリン、CIITA、TRBC、PD1、CTLA4、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、LAG 3、HAVCR2、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、TGFBRII、TGFBRI、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、SERCA3、BCAT、IL27RA、STAT1、STAT3、ILT2、ILT4、SEMA7、SHARPIN、STAT1、PEA15、RICTOR、JAK2、AURKA、DNMT3、MT1A、MT2A、PTGER2、miR101を生成する遺伝子、mir26Aを生成する遺伝子、mir21を生成する遺伝子、またはmiRNA31を生成する遺伝子から選択される少なくとも1つの別の遺伝子とを標的とした。

【 0 4 7 9 】

本発明は、TALEN改変内因性-TCR陰性ヒト初代細胞を同定するための手段を提供し、少なくとも1つまたは少なくとも2つの異なるエンドヌクレアーゼは、PCT/EP2016/066355にあるように一緒にまたは連続的にのいずれかで用いられ、かつTRAC遺伝子と、CD38、CD70、dCK、CD52、ベータ2ミクログロブリン、CIITA、TRAC、TRBC、PD1、CTLA4、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、LAG 3、HAVCR2、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、TGFBRII、TGFBRI、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、SERCA3、BCAT、IL27RA、STAT1、STAT3、ILT2、ILT4、SEMA7、SHARPIN、STAT1、PEA15、RICTOR、JAK2、AURKA、DNMT3、MT1A、MT2A、PTGER2、miR101を生成する遺伝子、mir26Aを生成する遺伝子、mir21を生成する遺伝子、またはmiRNA31を生成する遺伝子から選択される少なくとも1つの別の遺伝子とを標的とした。

【 0 4 8 0 】

本発明は、TALEN改変内因性-TCR陰性ヒト初代細胞を同定するための手段を提供し、少なくとも1つまたは少なくとも2つの異なるTALENを用いて、TRAC遺伝子と、dCK、CD52、ベータ2ミクログロブリン、CIITA、TRBC、PD1、CTLA4、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、LAG 3、HAVCR2、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、TGFBRII、TGFBRI、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、SERCA3、BCAT、IL27RA、STAT1、STAT3、ILT2、ILT4、SEMA7、SHARPIN、STAT1、PEA15、RICTOR、JAK2、AURKA、DNMT3、MT1A、MT2A、PTGER2、miR101を生成する遺伝子、mir26Aを生成する遺伝子、mir21を生成する遺伝子、またはmiRNA31を生成する遺伝子から選択される少なくとも1つの別の遺伝子とを標的とした。

【 0 4 8 1 】

本発明は、TALEN改変内因性-TCR陰性ヒト初代細胞を同定するための手段を提供し、少なくとも1つまたは少なくとも2つの異なるTALENを用いて、TRAC遺伝子と、CD38、CD70、CS1、PD1 (Uniprot Q15116)、CTLA4 (Uniprot P16410)、PPP2CA (Uniprot P67775)、PPP2CB (Uniprot P62714)、PTPN6 (Uniprot P29350)、PTPN22 (Uniprot Q9Y2R2)、LAG3 (Uniprot P18627)、HAVCR2 (Uniprot Q8TDQ0)、

10

20

30

40

50

BTLA (Uniprot Q7Z6A9)、CD160 (Uniprot O95971)、TIGIT (Uniprot Q495A1)、CD96 (Uniprot P40200)、CRTAM (Uniprot O95727)、LAIR1 (Uniprot Q6GTX8)、SIGLEC7 (Uniprot Q9Y286)、SIGLEC9 (Uniprot Q9Y336)、CD244 (Uniprot Q9BZW8)、TNFRSF10B (Uniprot O14763)、TNFRSF10A (Uniprot O00220)、CAS P8 (Uniprot Q14790)、CASP10 (Uniprot Q92851)、CASP3 (Uniprot P42574)、CASP6 (Uniprot P55212)、CASP7 (Uniprot P55210)、FADD (Uniprot Q13158)、FAS (Uniprot P25445)、TGFBRII (Uniprot P37173)、TGFRBRI (Uniprot Q15582)、SMAD2 (Uniprot Q15796)、SMAD3 (Uniprot P84022)、SMAD4 (Uniprot Q13485)、SMAD10 (Uniprot B7ZSB5)、SKI (Uniprot P12755)、SKIL (Uniprot P12757)、TGIF1 (Uniprot Q15583)、IL10RA (Uniprot Q13651)、IL10RB (Uniprot Q08334)、HMOX2 (Uniprot P30519)、IL6R (Uniprot P08887)、IL6ST (Uniprot P40189)、EIF2AK4 (Uniprot Q9P2K8)、CSK (Uniprot P41240)、PAG1 (Uniprot Q9NWQ8)、SIT1 (Uniprot Q9Y3P8)、FOXP3 (Uniprot Q9BZS1)、PRDM1 (Uniprot Q60636)、BATF (Uniprot Q16520)、GUCY1A2 (Uniprot P33402)、GUCY1A3 (Uniprot Q02108)、GUCY1B2 (Uniprot Q8BXH3)およびGUCY1B3 (Uniprot Q02153)ならびにPA201770603に開示されているものの場合、すなわちヒトSERCA3、ヒトBCAT、ヒトIL27RA、ヒトSTAT1、ヒトSTAT3、ヒトILT2、ヒトILT4、ヒトSEMA7、ヒトSHARPIN、ヒトSTAT1、ヒトPEA15、ヒトRICTOR、ヒトJAK2、ヒトAURKA、ヒトDNMT3、ヒトMT1A、ヒトMT2A、ヒトPTGER2、本発明の一部であるmiR101、mir26A、mir21、またはmiRNA31を生成するヒト遺伝子から選択される少なくとも1つの別の遺伝子とを標的とした。10 20

【0482】

以下のTALEN操作遺伝子: CD38、CD70、CS1、CTLA4、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、LAG 3、HAVCR2、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、TGFBRII、TGFBRI、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、SERCA3、BCAT、IL27RA、STAT1、STAT3、ILT2、ILT4、SEMA7、SHARPIN、STAT1、PEA15、RICTOR、JAK2、AURKA、DNMT3、MT1A、MT2A、PTGER2、miR101、mir26A、mir21、またはmiRNA31を生成する遺伝子、TRACを同定するための手段が生成された。30

【0483】

特に、以下のヒト遺伝子の1つまたはTRACと以下のヒト遺伝子の1つとの組み合わせを標的とするエンドヌクレアーゼを用いて初代細胞におけるメガヌクレアーゼ誘導真正オフサイト配列が同定され、同様にCRISPR誘導真正オフサイト配列が同定された: TRBC、CD40L、アデノシンA2a受容体(A2aR); B7関連タンパク質1 (B7RP1); BおよびTリンパ球アテニュエーター(BTLA); ガレクチン9 (GAL9)、ヘルペスウイルス侵入メディエーター(HVEM); 誘導性T細胞共刺激因子(ICOS); インターロイキン-12、-IL-27 (IL-12, IL27); キラー細胞免疫グロブリン様受容体(KIR); リンパ球活性化遺伝子3 (LAG3); プログラム細胞死タンパク質1 (PD1); PD1リガンド(PDL); 形質転換増殖因子- (TGF-); T細胞膜タンパク質3 (TIM3)、CD38、CD70、CS1、CTLA4、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、LAG 3、HAVCR2、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、TGFBRII、TGFBRI、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、SERCA3、BCAT、IL27RA、STAT1、STAT3、ILT2、ILT4、SEMA7、SHARPIN、STAT1、PEA15、RICTOR、JAK2、AURKA、DNMT3、MT1A、MT2A、PTGER2、miR101、mir26A、mir21、またはmiRNA31を生成する遺伝子。40 50

【 0 4 8 4 】

本発明は、エンドヌクレアーゼ、好ましくはTALEN、メガヌクレアーゼ、Crispr /Cas 9、Zinc Fingerエンドヌクレアーゼ、より好ましくはTALENおよびさらにより好ましくはTRAC遺伝子に結合するTALEN、好ましくはTRAC遺伝子のエクソン1中の配列に結合するTALENから選択されるエンドヌクレアーゼを用いて細胞操作中に生成されるオフサイトおよび/またはオンサイトを検出するための手段またはプローブを提供する。

【 0 4 8 5 】

本発明は、以下の配列ttgtcccacagATATCに結合するTALENを用いて細胞操作中に生成されるオフサイトおよび/またはオンサイトを検出するための手段またはプローブを提供する。

10

【 0 4 8 6 】

本発明は、TALEN、メガヌクレアーゼ、Crispr/Cas 9、Zinc Fingerエンドヌクレアーゼ、megaTAL、より好ましくはTALENおよびさらにより好ましくは62/410,187において同定された遺伝子のいずれか1つに位置する配列に結合するTALENから選択されるエンドヌクレアーゼを用いて細胞操作中に生成されるオフサイトおよび/またはオンサイトを検出するための手段またはプローブを提供する。

記号	説明
Il21	インターロイキン 21
Il3	インターロイキン 3
Ccl4	イソペンテニルニリン酸デルタイソメラーゼ2
Il21	グランザイムC
Gp49a	ケモカイン(C-Cモチーフ)受容体8
Cxcl10	インターロイキン 2
Nr4a3	インターロイキン1受容体、I型
Lilrb4	腫瘍壊死因子(リガンド)スーパーファミリー、メンバー4
Cd200	神経カルシウムセンサー1
Cdkn1a	CDK5およびAb1酵素基質1
Gzmc	膜貫通およびテトラトリコペプチドリピート含有2
Nr4a2	LONペプチダーゼN-末端ドメインおよびリングフィンガー1

20

30

40

50

Cish	糖タンパク質49A	
Nr4a1	polo様キナーゼ2	
Tnf	リパーゼ、内皮	
Ccr8	サイクリン依存性キナーゼ阻害因子1A(P21)	
Lad1	グレイニーヘッド様1(ショウジョウバエ(<i>Drosophila</i>))	10
Slamf1	細胞内レチノイン酸結合タンパク質II	
Crabp2	アデニル酸キナーゼ4	
Furin	微小管結合タンパク質1B	
	アシル-CoAシンテターゼ長鎖ファミリー	
Gadd45g	メンバー6	
Bcl2l1	ジンクフィンガーEボックス結合ホメオボックス2	
Ncs1	CD200 抗原	20
Ciart	カルボキシペプチダーゼD	
Ahr	チオレドキシン還元酵素3	
Spry1	ミオシン IE	
Tnfsf4	複数スプライシング有りのRNA結合タンパク質2	
	マイトジェン活性化タンパク質キナーゼキナーゼ3、	
Myo10	逆鎖	30
Dusp5	PERP, TP53 アポトーシスエフェクタ	
Myc	ミオシンX	
Psrc1	前初期応答3	
St6galnac4	フォリクリン相互作用タンパク質2	
	白血球免疫グロブリン様受容体、	
Nfkbid	サブファミリーB、メンバー4	40

Bst2	概日関連転写抑制因子
Txnd3	RAR関連オーファン受容体ガンマ
Plk2	プロリン/セリンリッチコイルドコイル1
Gfi1	システィンリッチタンパク質2
Pim1	cAMP 応答配列調節因子
Pvt1	ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド4
Nfkbb	核内受容体サブファミリー4、グループA、 メンバー2
Gnl2	トランスクルタミナーゼ2、Cポリペプチド
Cd69	シナプス欠損1、Rho GTPアーゼ、ホモログ2 (線虫 (<i>C. elegans</i>))
Dgat2	sprouty ホモログ1(ショウジョウバエ)
Atf3	活性化転写因子3
Tnfrsf21	KRAB ドメインを有するpogo転位因子
Lonrf1	腫瘍壞死因子受容体スーパーファミリー、 メンバー21
Cables1	サイトカイン誘導SH2含有タンパク質
Cpd	リンホトキシンA
Qtrtd1	FBJ骨肉腫がん遺伝子
Polr3d	シグナル伝達リンパ球活性化分子ファミリー メンバー1
Kcnq5	シンデカン3
Fos	ミトコンドリアリボソームタンパク質L47

10

20

30

40

50

Slc19a2	ラジニン	
Hif1a	E2F転写因子5	
Il15ra	ISG15ユビキチン様修飾因子	
Nfkb1	アリール炭化水素受容体	
Phlda3	ジアシルグリセロール0-アシルトランスフェラーゼ2	10
Mtrr	FBJ骨肉腫がん遺伝子B	
Pogk	プレクストリン相同様ドメイン、ファミリーA、 メンバー3	
Map2k3os	カリウム電位依存性チャネル、サブファミリーQ、 メンバー5	
Egr2	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、 メンバー10b	20
Isg15	Mir17宿主遺伝子1(非タンパク質コード)	
Perp	グルコースフルクトースオキシドレダクターゼ ドメイン含有1	
Ipo4	プレキシンA1	
Mphosph10	熱ショック因子2	
Plk3	炭水化物スルホトランスフェラーゼ11	30
Ifitm3	増殖停止およびDNA損傷誘導性45ガンマ	
Polr1b	溶質キャリアファミリー5(ナトリウム依存性 ビタミントransporter)、メンバー6	
Usp18	インターフェロン誘導膜貫通タンパク質3	
Top1mt	DENN/MADDドメイン含有5A	
Dkc1	プラスミノーゲン活性化因子、ウロキナーゼ受容体	40

Polr1c	溶質キャリアファミリー19 (チアミントランスポーター)、メンバー2	
Cdk6	ユピキチンドメイン含有2	
Ier3	核内受容体サブファミリー4、グループA、 メンバー3	
Lta	ジンクフィンガータンパク質52	10
Ptprs	SH3ドメイン含有リングフィンガー1	
Fnip2	ジヒドロウリジンシンターゼ2	
Asna1	サイクリン依存性キナーゼ5、 調節サブユニット1(p35)	
Mybbp1a	前駆体プロセッシング7、リボヌクレアーゼP ファミリー、(出芽酵母(<i>S. cerevisiae</i>))	20
Il1r1	増殖因子非依存性1	
Dennd5a	インターロイキン15受容体、アルファ鎖	
E2f5	BCL2様1	
Rcl1	タンパク質チロシンホスファターゼ、受容体型、 S	
Fosl2	形質細胞腫変種転座1	
Atad3a	fos様抗原2	30
Bax	BCL2関連タンパク質	
Phf6	溶質キャリアファミリー4、重炭酸ナトリウム 共輸送体、メンバー7	
Zfp52	腫瘍壞死因子受容体スーパーファミリー、 メンバー4	
Crtam	ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド10	40

Nop14	polo様キナーゼ3	
Rel	CD3E抗原、イプシロンポリペプチド関連タンパク質	
Gramd1b	腫瘍壊死因子(リガンド)スーパーファミリー、メンバー11	
Ifi27l2a	ポリメラーゼ(RNA) III(DNA依存性) ポリペプチド	10
Tnfrsf10b	初期生育反応2	
Rpl7l1	DnaJ(Hsp40) ホモログ、サブファミリーC、メンバー2	
Eif1a	DNAトポイソメラーゼ1、ミトコンドリア	
Nfkb2	三要素モチーフ含有30D	20
Heatr1	DnaJ(Hsp40) ホモログ、サブファミリーC、メンバー21	
Utp20	SAMドメイン、SH3ドメインおよび核局在化シグナル、1	
Chst11	溶質キャリアファミリー5(イノシトールトランスポーター)、メンバー3	
Ddx21	ミトコンドリアリボソームタンパク質L15	30
Hsf2	二重特異性ホスファターゼ5	
Bccip	アポトーシス増強ヌクレアーゼ	
Tagap	ets変種6	
Sdc3	DIM1ジメチルアデノシントランスフェラーゼ1様 (出芽酵母)	
Sytl3	2'-5'オリゴアデニル酸シンテターゼ様1	40

Gtpbp4	UTP18、小サブユニット(SSU)プロセソーム構成要素、ホモログ(酵母)	
Crip2	BRCA2およびCDKN1A結合タンパク質	
Sh3rf1	シナプトタグミン様3	
Nsfl1c	5-メチルテトラヒドロ葉酸-ホモシステインメチルトランスフェラーゼ還元酵素	10
Gtf2f1	URB2リボソーム生合成2ホモログ(出芽酵母)	
Slc4a7	ユビキチン複合酵素E2C結合タンパク質	
Etv6	リジン(K)特異的脱メチル化酵素2B	
Trim30d	ケウインtRNAリボシリトランスフェラーゼドメイン含有1	20
Ddx27	ユビキチン特異的ペプチダーゼ31	
Pwp2	真核生物翻訳開始因子2-アルファキナーゼ2	
Chchd2	ATPアーゼファミリー、AAAドメイン含有3A	
Myo1e	接着分子、CXADR抗原1と相互作用	
Eif5b	SUMO/セントリン特異的ペプチダーゼ3	30
Stat5a	ESF1、核小体プレrRNAプロセッシングタンパク質、ホモログ(出芽酵母)	
Cops6	デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ、ターミナル、結合タンパク質2	
D19Bwg1357e	TGFB誘導因子ホメオボックス1	40

Aatf	真核生物翻訳開始因子1A	
Aen	インターフェロン刺激タンパク質	
Amica1	多形腺腫遺伝子様2	
Wdr43	PWP2周期的トリプトファンタンパク質ホモログ (酵母)	10
Cct4	フーリン(対の塩基性アミノ酸開裂酵素)	
Nifk	腫瘍壞死因子	
Tgm2	アポトーシス拮抗転写因子	
Ero1l	インターフェロン、アルファ誘導タンパク質27様2A	
	ST6(アルファ-N-アセチル-ノイロミル-2,3- ベータ-ガラクトシル-1,3)-N-アセチルガラクトサ	
Gfod1	ミニドアルファ-2,6-シリルトランスクフェラーゼ4	20
Ak4	メチルトランスクフェラーゼ様1	
Sdad1	ノッチレスホモログ1(ショウジョウバエ)	
Dimt1	ミトコンドリアリボソームタンパク質L3	
Esf1	UBXドメインタンパク質2A	
Cd3eap	グアニヌクレオチド結合タンパク質様2(核小体)	
Samsn1	プログラム細胞死11	30
Tnfrsf4	サイクリン依存性キナーゼ8	
Mettl1	真核生物翻訳開始因子5B	
Cd274	RNA末端リン酸シクラーゼ様1	
Ubtd2	NSFL1 (p97) 補因子 (p47)	
Icos	B細胞阻害因子、デルタにおけるカッパ軽鎖 ポリペプチド遺伝子エンハンサーの核因子	40

Kdm2b	M相リントンパク質10(U3核小体低分子リボ核タンパク質)	
Larp4	GRAMドメイン含有1B	
Eif3d	ER01様(出芽酵母)	
Tnfaip3	核内受容体サブファミリー4、グループA、メンバー1	10
Map1b	surfeit遺伝子2	
Cdv3	N(アルファ)-アセチルトランスフェラーゼ25、NatB補助サブユニット	
Plac8	yrdCドメイン含有(大腸菌(<i>E. coli</i>))	
Mrpl3	Laリボ核タンパク質ドメインファミリー、メンバー4	20
Surf2	SDA1ドメイン含有1	
Ubxn2a	インポーチン4	
Utp18	誘導性T細胞共刺激	
Isg20	溶質キャリアファミリー7(カチオン性アミノ酸トランスポーター、y+システム)、メンバー1	
Dnajc2	arsA亜ヒ酸塩トランスポーター、ATP結合、ホモログ1(細菌)	30
Jak2	ポリメラーゼ(RNA)IポリペプチドC	
Slc7a1	精子形成関連5	
Syde2	ユビキチン特異的ペプチダーゼ18	
Slc5a6	胎盤特異的8	
Dnttip2	基本転写因子IIIF、ポリペプチド1	40

Idi2	B細胞阻害因子、ベータにおけるカッパ軽鎖 ポリペプチド遺伝子エンハンサーの核因子	
Dus2	PHDフィンガータンパク質6	10
Pitrm1	RRN3 RNAポリメラーゼI転写因子ホモログ(酵母)	
Plxna1	細胞毒性および制御性T細胞分子	
Cdk5r1	COP9(構成的光形態形成)ホモログ、サブユニット6 (シロイヌナズナ(<i>Arabidopsis thaliana</i>))	
Ube2cbp	アスパラギン結合グリコシル化3(アルファ-1, 3- マンノシルトランスフェラーゼ)	
Tnfsf11	トリプトファニルtRNAシンテーゼ	
Pop7	低酸素上方制御1	20
Psme3	配列類似性を有するファミリー60、メンバーA	
Mir17hg	骨髓間質細胞抗原2	
Tsr1	B細胞2、p49/p100におけるカッパ軽鎖 ポリペプチド遺伝子エンハンサーの核因子	
Rbpms2	UTP20、小サブユニット(SSU)プロセソーム 構成要素、ホモログ(酵母)	30
Mrpl47	CD274 抗原	
Rab8b	プロウイルス組込部位1	
Plagl2	シグナル伝達物質および転写活性化因子5A	
Grhl1	CD69 抗原	
Zeb2	ピトリリシンメタロペプチダーゼ1	
sept-02	サイクリン依存性キナーゼ6	40

Slc5a3	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) ボックスポリペプチド27	
Naa25	ポリメラーゼ(RNA) I ポリペプチドB	
Plaur	腫瘍壞死因子、アルファ誘導タンパク質3	
Metap1	結節調節因子1	
Alg3	NOP14核小体タンパク質	
Mrpl15	リポソームタンパク質L7様1	10
Oasl1	メチオニルアミノペプチダーゼ1	
Rorc	低酸素誘導因子1、アルファサブユニット	
Nomo1	ヤーススキナーゼ2	
Tgif1	B細胞1、p105におけるカッパ軽鎖 ポリペプチド遺伝子エンハンサーの核因子	
Lipg	細網内皮症がん遺伝子	20
Rrn3	セプチン2	
Dnajc21	MKI67のFHAドメインと相互作用する 核小体タンパク質	
Yrdc	伸長因子Tu GTP結合ドメイン含有2	
Acsl6	骨髓球腫症がん遺伝子	
Spata5	先天性角化異常症1、ディスケリン	30
Urb2	心室において発現される カルニチン欠乏関連遺伝子3	
Nle1	GTP結合タンパク質4	
Wars	HEATリピート含有1	
Crem	プロテアソーム(プロソーム、マクロパイン) 活性化因子サブユニット3(PA28ガンマ、Ki)	40

Larp1	Laリポ核タンパク質ドメインファミリー、メンバー1	
Eif2ak2	DNAセグメント、Chr 19、Brigham & Women's Genetics 1357 expressed	
Hyou1	真核生物翻訳開始因子3、サブユニットD	10
Senp3	TSR1 20S rRNA 集積	
Tmtc2	MYB結合タンパク質(P160)1a	
Fosb	T細胞活性化Rho GTPアーゼ活性化タンパク質	
Pdcd11	RAB8B、メンバー-RASがん遺伝子ファミリー	
Usp31	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) ボックスポリペプチド21	20
Cdk8	シャペロニン含有Tcp1、サブユニット4(デルタ)	
Eftud2	コイルドコイルヘリックスコイルドコイル ヘリックスドメイン含有2	
Fam60a	WD反復ドメイン43	

【 0 4 8 7 】

免疫細胞活性化中に常に活性な(T細胞活性化に依存的または非依存的な)好ましい内因性遺伝子の選択。

30

40

50

記号	遺伝子の説明	
CD3G	CD3 ガンマ	10
Rn28s1	28Sリボソーム RNA	
Rn18s	18Sリボソーム RNA	
Rn7sk	RNA, 7SK, 核	
Actg1	アクチン、ガンマ、細胞質性1	
B2m	ベータ-2ミクログロブリン	
Rpl18a	リボソームタンパク質L18A	
Pabpc1	ポリ(A)結合タンパク質、細胞質性1	
Gapdh	グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ	20
Rpl19	リボソームタンパク質 L19	
Rpl17	リボソームタンパク質 L17	
Rplp0	リボソームタンパク質、大、P0	
Cfl1	コフィリン1、非筋肉性	
Pfn1	プロフィリン1	30

【 0 4 8 8 】

T細胞活性化時に一過性に上方制御される遺伝子の選択。

記号	遺伝子の説明
Il3	インターロイキン3
Il2	インターロイキン2
Ccl4	ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド4
Il21	インターロイキン21
Gp49a	糖タンパク質49A
Nr4a3	核内受容体サブファミリー4、グループA、メンバー3
Lilrb4	白血球免疫グロブリン様受容体、サブファミリーB、メンバー4
Cd200	CD200 抗原
Cdkn1a	サイクリン依存性キナーゼ阻害因子1A(P21)
Gzmc	グランザイムC
Nr4a2	核内受容体サブファミリー4、グループA、メンバー2
Cish	サイトカイン誘導SH2含有タンパク質
Ccr8	ケモカイン(C-Cモチーフ)受容体8
Lad1	ラジニン
Crabp2	細胞内レチノイン酸結合タンパク質II

【0489】

T細胞活性化時に24時間超にわたって上方制御される遺伝子の選択。

10

20

30

40

50

記号	説明	
Gzmb	グランザイムB	
Tbx21	Tボックス21	
Pdcd1	プログラム細胞死1	
Plek	プレクストリン	10
Chek1	チェックポイントキナーゼ1	
Slamf7	SLAMファミリーメンバー7	
Zbtb32	ジンクフィンガーおよびBTBドメイン含有32	
Tigit	IgおよびITIMドメインを有するT細胞免疫受容体	
Lag3	リンパ球活性化遺伝子3	20
Gzma	グランザイムA	
Wee1	WEE 1ホモログ1(分裂酵母(<i>S. pombe</i>))	
Il12rb2	インターロイキン12受容体、ベータ2	
Ccr5	ケモカイン(C-Cモチーフ)受容体5	
Eea1	初期エンドソーム抗原1	30
Dtl	denticleless ホモログ(ショウジョウバエ)	

【 0 4 9 0 】

免疫細胞活性化時に下方制御される遺伝子の選択。

記号	遺伝子の説明	
Spata6	精子形成関連6	10
Itga6	インテグリンアルファ6	
Rcbtb2	染色体凝縮の調節因子(RCC1)およびBTB(P0Z)ドメイン含有タンパク質2	
Cd1d1	CD1d1 抗原	
St8sia4	ST8アルファ-N-アセチル-ノイロミニドアルファ-2,8-シアリルトランスフェラーゼ4	
Itgae	インテグリンアルファE、上皮関連	
Fam214a	配列類似性を有するファミリー214、メンバーA	
Slc6a19	溶質キャリアファミリー6(神経伝達物質トランスポーター)、メンバー19	
Cd55	CD55 抗原	
Xkrx	X Kell血液型前駆体関連X連鎖	
Mturn	maturin、神経前駆細胞分化調節因子ホモログ (アフリカツメガエル(Xenopus))	20
H2-Ob	組織適合性2、0領域ベータ遺伝子座	
Cnr2	カンナビノイド受容体2(マクロファージ)	
Itgae	インテグリンアルファE、上皮関連	
Raver2	リボ核タンパク質、PTB結合2	
Zbtb20	ジンクフィンガーおよびBTBドメイン含有20	
Arrb1	アレスチン、ベータ1	
Abca1	ATP結合カセット、サブファミリーA(ABC1)、メンバー1	
		40

Tet1	tetメチルシトシンジオキシゲナーゼ1
Slc16a5	溶質キャリアファミリー16(モノカルボン酸トランスポーター)、メンバー5
Trav14-1	T細胞受容体アルファ可変14-1
Ampd3	アデノシンーリン酸デアミナーゼ3

10

【0491】

記号	遺伝子の説明
Zfp640	ジンクフィンガータンパク質640
LOC100038422	特徴付けられていないLOC100038422
Zfp600	ジンクフィンガータンパク質600
Serpinb3a	セリン(またはシステイン)ペプチダーゼ阻害因子、分岐群B(オボアルブミン)、メンバー3A
Tas2r106	taste受容体、2型、メンバー106
Magea3	メラノーマ抗原、ファミリーA、3
Omt2a	卵成熟、アルファ
Cpxcr1	CPX染色体領域、候補1
Hsf3	熱ショック転写因子3
Pbsn	プロバシン
Sbp	スペルミン結合タンパク質
Wfdc6b	WAP四ジスルフィドコアドメイン6B
Meiob	OBドメインを有する減数分裂特異的
Dnm3os	ダイナミン3、逆鎖
Skint11	上皮内T細胞の選択および維持11

20

30

40

T細胞活性化時にサイレントであるヒト遺伝子の選択
(セーフハーバー遺伝子を標的とする組み込み遺伝子座)。

【0492】

特に、本発明は、TCRアルファ、TCRベータに結合するTALEN、より好ましくはTCRアルファにおよび以下の配列ttgtcccacagATATCに結合するTALENを用いて細胞操作中に生成されるオフサイトおよび/またはオンサイトを検出するための手段またはプローブを提

50

供し、さらにより好ましくは該手段またはプローブは、ttgtcccacagATATCを含む配列に相補的な配列ならびに開始コドン後のおよび配列
CCGTGTACCAAGCTGAGA

の下流のTRAC遺伝子中の配列に相補的な配列を含む。

【0493】

以下の配列

ttgtcccacagA-TATC

に結合するTALENを用いた本発明のオフサイト切斷において、
ttgtcccacagATATC

10

を含む配列に相補的な配列および/または配列

CCGTGTACCAAGCTGAGA

の下流のTRAC遺伝子中の配列に相補的な配列を含む手段またはプローブは、TALENに適合されたガイド配列分析を用いた検出レベルに満たない。

【0494】

特定の態様において、本発明は、オフサイトおよびオンサイト検出が、エンドヌクレアーゼ改変ゲノムTRAC遺伝子を含む内因性-TCR陰性ヒト細胞を生成するプロセス中に実施されるガイド配列適合技法によって行われる、エンドヌクレアーゼ誘導事象のオフサイトおよびオンサイトを検出するための手段を提供する。

20

【0495】

特定の態様において、本発明は、TALEN改変ゲノムTRAC遺伝子が、

(a) ヒトゲノムTRAC遺伝子の5'領域、

(b) TALEN用の認識ドメイン、好ましくは以下の配列

ttgtcccacagATATC,もしくはttgtcccacagATATCCAG

を含むTALEN用の認識ドメイン、または

(c) アルファベータTCRの細胞外ドメインもしくは膜貫通ドメインの細胞表面発現に影響を与える野生型TRAC遺伝子と比較したギャップもしくは挿入であって、非コード配列、終止コドン、TRACオープンリーディングフレームとインフレームの自己切斷ペプチドをコードする配列、IRES、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする配列、TCRをコードする配列、薬物に対する感受性を付与するタンパク質をコードする配列、薬物に対する耐性を付与するタンパク質をコードする配列、終結配列、それらの組み合わせから選択される外因性ポリヌクレオチドを含む該挿入。

30

(c') 任意で第2のTALEN認識ドメイン、

(d) ゲノムTRAC遺伝子の3'領域

を含み、かつ手段がエンドヌクレアーゼ改変ゲノムTRAC遺伝子および/またはオフサイトに結合する、上記のいずれか1つに記載の手段を提供する。

40

【0496】

適合PCRのための縮重オリゴヌクレオチドは、操作されたTRAC遺伝子に結合し、任意でオフサイトに結合し、pcrによってさらに増幅するプローブとして本明細書で提供される。

【0497】

縮重プライマーは、「いくつかの位置がいくつかの可能な塩基を含み、所与のタンパク質配列について可能性のある全てのヌクレオチドの組み合わせを網羅する類似の配列を有するプライマーの集団を与えるオリゴヌクレオチド配列の混合物」と定義される。

【0498】

特定の態様において、本発明は、TALEN改変内因性-TCR陰性ヒト細胞を検出する

50

ための手段であって、以下の配列
ttgtccccacagATATC

の少なくとも5、6、7、8、9、10塩基に結合する該手段を提供する。

【0499】

特定の態様において、本発明は、改変ゲノムTRAC遺伝子中の配列に結合し、第1のエンドヌクレアーゼ結合ドメインの上流の配列に結合し、またはエンドヌクレアーゼ認識ドメインの上流の配列におよび/もしくはタグをコードする配列に結合するプローブを含むエンドヌクレアーゼ改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を検出するための手段を提供する。

【0500】

少なくとも2つの別々のドメインまたは単量体を含むエンドヌクレアーゼ(TALEN、メガヌクレアーゼ)の場合、第1のエンドヌクレアーゼ結合ドメインまたは認識ドメインは5'における第1の結合ドメインまたは認識ドメインであり、左側の配列に結合する。

【0501】

特定の態様において、本発明は、TALEN結合ドメインもしくはTALEN認識ドメインの上流で、改変ゲノムTRAC遺伝子中の配列に結合し、および/またはタグをコードする配列に結合するプローブを含むTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を検出するための手段を提供する。

【0502】

特定の態様において、本発明は、改変ゲノムTRAC遺伝子中、
ttgtccccacagATATC,またはttgtccccacagATATCCAG

10

20

を含む配列の少なくとも10塩基に結合するプローブを含むTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を検出するための手段を提供する。

【0503】

特定の態様において、本発明は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)およびオフサイト改変によって、好ましくはガイド配列によって、エンドヌクレアーゼ改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を検出するための手段を提供する。

【0504】

特定の態様において、本発明は、ディープシークエンシングおよびオフサイト改変によって、好ましくはガイド配列によってエンドヌクレアーゼ改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を検出するための手段を提供する。

30

【0505】

特定の態様において、本発明は、外因性コード配列が1つまたは複数のエンドヌクレアーゼおよび/またはウイルスベクターを用いて組み込まれた、不活性化ゲノムTCRA遺伝子に相補的な配列を含む手段を提供する。

【0506】

本発明は、CARをコードする外因性配列がレンチウイルスベクターまたはAAVベクターを用いてゲノムTCRA遺伝子に組み込まれ、かつゲノム破壊がCRISPR/CAS9、メガヌクレアーゼ、megaTALまたはTALENエンドヌクレアーゼシステムを用いて行われる、不活性化ゲノムTCRA遺伝子を含む上記のいずれか1つとしてのエンドヌクレアーゼ改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

40

【0507】

本発明は、エレクトロポレーションまたはヌクレオフェクションによって導入されたレンチウイルスベクターまたはAAVベクターを用いて、CARをコードする外因性配列がゲノムTCRA遺伝子に組み込まれた、上記のいずれか1つに記載のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0508】

本発明は、AAV6ベクターを用いて操作されたエンドヌクレアーゼ特異的オフサイトパターンを有するTRAC特異的エンドヌクレアーゼ操作ヒト細胞を提供する。

50

【0509】

本発明は、AAV6ベクターを用いて操作されたエンドヌクレアーゼ特異的オフサイトパターンを有するTRACエクソン1特異的エンドヌクレアーゼ操作ヒト細胞を提供する。

【0510】

本発明は、AAV6/AAV2ベクターを用いて操作されたエンドヌクレアーゼ特異的オフサイトパターンを有するTRACエクソン1特異的エンドヌクレアーゼ操作ヒト細胞を提供する。

【0511】

本発明は、AAV6ベクターを用いて操作され、かつ他のTRACエクソン1特異的エンドヌクレアーゼ操作ヒト細胞と比較して低減された特異的オフターゲットパターンを有する操作ヒト細胞の配列
ttgtccccacagATATC

10

の少なくとも10塩基に結合するTRACエクソン1特異的TALENを提供する。

【0512】

本発明は、AAV6/2ベクターを用いてCARをコードする外因性配列がゲノムTCRA遺伝子に組み込まれた、TALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

【0513】

本発明は、エレクトロポレーションによってまたはヌクレオフェクションによって導入されたAAV6/2ベクターを用いて、CARをコードする外因性配列がゲノムTCRA遺伝子に組み込まれた、TALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を提供する。

20

【0514】

本発明は、前記態様のいずれか1つに記載の細胞を投与する段階を含む、それを必要とする患者を処置する方法を提供する。

【0515】

本発明は、ゲノムTRAC遺伝子に結合する少なくとも1つのTALEN、内因性サイトカイン誘導性SH2含有(CISH)遺伝子に結合するTALENおよびアデノシンA2a受容体(ADORA)、CD276、Vセトドメイン含有T細胞活性化阻害物質1(VTCN1)、BおよびTリンパ球関連(BTLA)、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4(CTLA4)、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ1(IDO1)、キラー細胞免疫グロブリン様受容体、3ドメイン、長い細胞質尾部1(KIR3DL1)、リンパ球活性化遺伝子3(LAG3)、プログラム細胞死1(PD-1)遺伝子、A型肝炎ウイルス細胞受容体2(HAVCR2)、T細胞活性化Vドメイン免疫グロブリンサプレッサー(VISTA)、ナチュラルキラー細胞受容体2B4(CD244)、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ1(HPRT)、アデノ随伴ウイルス組み込み部位(AAVS部位(例えばAAVS1、AAVS2など))、またはケモカイン(C-Cモチーフ)受容体5(遺伝子/偽遺伝子)(CCR5)から選択される内因性遺伝子に結合するTALENを含むキットを提供する。

30

【0516】

本発明は、TALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞を產生するための方法を提供し、本方法は、

(a) ヒト初代細胞に、

(i) 操作されたヌクレアーゼがヒトTCRアルファ定常領域遺伝子内の認識配列の位置で切断を生じる、操作されたヌクレアーゼをコードする第1の核酸配列または操作されたヌクレアーゼタンパク質、および

(b) 外因性ポリヌクレオチドを含む第2の核酸配列
を導入する段階

を含み、

該外因性ポリヌクレオチドの配列が該切断部位で該ヒトTCRアルファ定常領域遺伝子に挿入され、かつさらに該遺伝子改変初代細胞が非改変対照初代細胞と比較した場合に、内因性TCRの細胞表面発現を低減させる。

40

【0517】

50

本発明は、外因性ポリヌクレオチドが、キメラ抗原受容体をコードする核酸配列を含み、該キメラ抗原受容体が細胞外リガンド結合ドメインおよび1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、上記のような方法を提供する。

【0518】

本発明は、外因性ポリヌクレオチドが、該外因性ポリヌクレオチドの発現を駆動する、活性が条件付きであるプロモーターのような、第1のプロモーター配列を含む、上記のような方法を提供する。

【0519】

本発明は、少なくとも第2の核酸配列が、該第2の核酸配列を含む組み換えアデノ随伴ウイルス(AAV6)ベクターと細胞を接触させることにより該細胞に導入される、上記のような方法を提供する。 10

【0520】

本発明は、組み換えAAVベクターが自己相補的AAVベクターである、上記のような方法を提供する。

【0521】

本発明は、組み換えAAVベクターが少なくとも部分的にAAV6に由来する、上記のような方法を提供する。

【0522】

本発明は、操作されたヌクレアーゼがメガヌクレアーゼ、ジンクフィンガヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、CRISPR/Casヌクレアーゼ、またはmegaTALヌクレアーゼである、上記のような方法を提供する。 20

【0523】

本発明は、操作されたヌクレアーゼが組み換えTALENである、上記のような方法を提供する。

【0524】

本発明は、組み換えTALENが第1サブユニットおよび第2サブユニットを含み、該第1サブユニットが第1の認識半部位に結合し、かつ該第2サブユニットが第2の認識半部位に結合する、上記のような方法を提供する。

【0525】

本発明は、TALENの第1の認識半部位が以下の配列ttgtccacagATATCCAGを有する、上記のような方法を提供する。 30

【0526】

本発明は、操作されたヌクレアーゼがメガヌクレアーゼである、上記のような方法を提供する。

【0527】

本発明は、組み換えメガヌクレアーゼが、野生型ヒトTCRアルファ定常領域の残基番号93～208内の認識配列を認識および切断し、組み換えメガヌクレアーゼが第1サブユニットおよび第2サブユニットを含み、該第1サブユニットが該認識配列の第1の認識半部位に結合し、第1の超可変(HVR1)領域を含み、かつ該第2サブユニットが該認識配列の第2の認識半部位に結合し、第2の超可変(HVR2)領域を含む、上記のような方法を提供する。 40

【0528】

本発明は、メガヌクレアーゼが、リンカーを含む一本鎖メガヌクレアーゼであり、該リンカーが第1サブユニットおよび第2サブユニットを共有結合する、上記のような方法を提供する。

【0529】

本発明は、野生型ヒトTCRアルファ定常領域の残基番号93～208内の認識配列を認識かつ切断するメガヌクレアーゼが用いられる、上記方法のいずれか1つによって得られた細胞の検出の手段を提供する。

【0530】

特定の態様において、本発明は、ゲノムTCR遺伝子(TRAC遺伝子)の定常領域が、野生型

10

20

30

40

50

ヒトTCRアルファ定常領域の残基番号93～208内の認識ドメインまたは配列を認識かつ切断するメガヌクレアーゼにより生成され、アルファベータTCRの細胞表面発現に影響を与える遺伝子改変を含み、該ゲノムTRAC遺伝子が5'から3'方向に、

(a) 野生型ヒトTCRアルファ定常領域の残基番号93～208内の認識ドメインまたは配列を認識かつ切断するメガヌクレアーゼ用の認識ドメイン上流のヒトゲノムTRAC遺伝子の5'領域、

(b) 野生型ヒトTCRアルファ定常領域の残基番号93～208内の、メガヌクレアーゼ用の認識ドメイン、

(c) アルファベータTCRの細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインの細胞表面発現に影響を与える野生型TRAC遺伝子と比較したギャップまたは挿入であって、

非コード配列、終止コドン、TRACオープンリーディングフレームとインフレームの自己切断ペプチドをコードする配列、IRES、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする配列、TCRをコードする配列、薬物に対する感受性を付与するタンパク質をコードする配列、薬物に対する耐性を付与するタンパク質をコードする配列、終結配列、それらの組み合わせから選択される外因性ポリヌクレオチドを含む該挿入、

(c') 任意で野生型ヒトTCRアルファ定常領域の残基番号93～208内の、第2のメガヌクレアーゼ認識ドメイン、

(d) ゲノムTRAC遺伝子の3'領域

をさらに含む、ヒト細胞またはヒト細胞の集団を提供する。

【0531】

1つの態様において、本発明は、野生型ヒトTCRアルファ定常領域の残基番号93～208内の認識ドメインまたは配列を認識かつ切断するメガヌクレアーゼを用いて産生されたヒト細胞を検出する手段を提供する。

【0532】

特定の態様において、本発明は、ガイドmRNAがTRACエクソン1中の以下の配列: GGGTGTCTATAGGTCTTGGGAC

を認識する、crispr/cas 9システムを用いて産生されたヒト細胞を検出するための手段を提供する。

【0533】

したがって、1つの局面において、本発明は、5'から3'方向に、

- (a) ヒトTCRアルファ定常領域遺伝子の5'領域;
- (b) PAM、(b') 外因性ポリヌクレオチド; および
- (c) ヒトTCRアルファ定常領域遺伝子の3'領域

を含む改変ヒトTCRアルファ定常領域遺伝子を、そのゲノム中に含むCrispr/cas 9改変細胞を検出するための手段を提供する。

【0534】

本発明はそれゆえ、上記方法のいずれか1つによって得られた細胞を検出するための手段を提供する。

【0535】

本発明は、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、それらの組み合わせの手段またはSEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、それらの組み合わせに由来する任意の縮重された手段を提供する。

【0536】

本発明は、特にGUIDE SEQ法における段階として、エンドヌクレアーゼによるオンサイトおよび/またはオフサイト切断を検出するための上記のような手段を提供する。

【0537】

本発明は、エンドヌクレアーゼによるオンサイトおよび/またはオフサイト切断を検出するための上記のような手段を提供する。

【0538】

10

20

30

40

50

本発明は、SEQ ID NO : 13～22のいずれか1つ、それらの組み合わせのエンドヌクレアーゼによるオンサイトおよび/またはオフサイト切断を検出するための上記のような手段を提供する。

[本発明1001]

ゲノムTCR遺伝子(TRAC遺伝子)の定常領域が、
TALENにより生成されかつ内因性アルファベータTCRの細胞表面発現に影響を与える
遺伝子改変
を含み、該ゲノムTRAC遺伝子が5'から3'方向に、
 (a) 該ヒトゲノムTRAC遺伝子上流の5'領域、
 (b) 半TALEN用の認識ドメイン、
 (c) アルファベータTCRの細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインの細胞表面発現に影響を与える野生型TRAC遺伝子と比較したギャップまたは挿入であって、挿入が、終止コドン、IRES、TRACオープンリーディングフレームとインフレームの自己切断ペプチドをコードする配列のようなコード配列、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする配列、TCRをコードする配列、薬物に対する感受性を付与するタンパク質をコードする配列、薬物に対する耐性を付与するタンパク質をコードする配列、サイトカイン、終結配列、それらの組み合わせのような非コード配列から選択される外因性ポリヌクレオチドを含む、ギャップまたは挿入、
 (c') 任意でもう一方の半TALEN用の認識ドメイン、
 (d) ゲノムTRAC遺伝子の3'領域
を含む、TALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞。

[本発明1002]

ヒト初代細胞が、ヒト初代T細胞、またはヒトリンパ系初代細胞、またはヒト初代幹細胞、またはヒト初代前駆細胞である、本発明1001のTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞。

[本発明1003]

ヒト初代細胞が、ヒト初代T細胞またはヒト初代T細胞の集団である、本発明1001～1002のいずれかのTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞。

[本発明1004]

ヒトT初代細胞またはその集団が、ヒト初代CD8 T細胞、ヒト初代CD4 T細胞、それらの組み合わせを含むかまたはそれからなる、本発明1001～1003のいずれかのTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞。

[本発明1005]

TALEN用の認識ドメインが以下の配列
ttgtcccacagATATC、または ttgtcccacagATATCCAG

および任意で

CCGTGTACCAAGCTGAGA

を含む、本発明1001～1004のいずれかのTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞

[本発明1006]

TRAC遺伝子中の以下の配列:

10

20

30

40

50

AAGTAGCCCTGCATTCAGGTTCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGCCGTGAACTTCACTGAAATCATGGCC
TCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTCTAAGATGCTAT
TTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTGTCCATCACTGGCATCTGGAC
TCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCCCTGATCCTTTGTCCCACAGATATCCAG
TCCGGTGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCGGGCCCCGGATCCコード

10

配列 TCTAGAGGGCCCGTTAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTT
GCCCCCTCCCCCGTGCCTCCCTGACCCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCCTTCTAACAAAATGAGGAAATTGCA
TCGCATTGTCAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGG
AAGACAATAGCAGGCATGCTGGGATGCGGTGGCTATGACTAGTGGCGAATTCCCGTGTACAGCTGAGAG
ACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGCTGCCTATTACCGATTTGATTCTAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGA
TTCTGATGTGTATATCACAGACAAACTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTGTC
CTGGAGCAACAAATCTGACTTGCATGTGCAAACGCCTCAACAAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTCCCC
AGCCCAGGTAAGGGCAGCTTGGTGCCTCGCAGGCTGTTCTGCTTCAGGAA

20

またはTRAC遺伝子中のSEQ ID NO：9、10、11もしくは12のいずれか1つを含む、本発明1001～1005のいずれかのTALEN改変内因性-TCR陰性ヒト初代細胞。

[本発明1007]

CAR配列が、抗CD22 CAR配列、抗CD123 CAR配列、抗CD30 CAR配列、抗HSP-70 CAR配列、抗o-アセチル-GD2 CAR配列、抗CS-1 CAR配列、抗CLL-1 CAR配列、抗CD38 CAR配列、抗5T4 CAR配列、抗MUC1 CAR配列、抗FAP CAR配列、抗HER2 CAR配列、抗CD79a CAR配列、抗CD79b CARを含む、本発明1001～1006のいずれかのTALEN改変内因性-TCR陰性ヒト初代細胞。

30

[本発明1008]

ポリヌクレオチド配列が、以下の配列：SEQ ID NO：9、SEQ ID NO：10、SEQ ID NO：11、SEQ ID NO：12のうち1つを含む、本発明1001～1007のいずれかのTALEN改変内因性-TCR陰性ヒト初代細胞。

[本発明1009]

改変されていない対照細胞と比較して検出不能なレベルのMHC分子と、ベータ2ミクログロブリン分子またはCIITA分子の細胞表面発現に機能的に影響を与える欠失とをさらに含む、本発明1001～1008のいずれかのTALEN改変内因性-TCR陰性ヒト細胞。

40

[本発明1010]

前記挿入が、TCRアルファをコードする遺伝子の不活性化および内因性-TCRの検出不能な細胞表面発現を、全細胞の少なくとも96%において、全細胞の少なくとも97%において、全細胞の少なくとも98%において、全細胞の少なくとも99%において引き起こした、本発明1001～1009のいずれかのTALEN改変内因性-TCR陰性ヒト細胞。

[本発明1011]

SEQ ID NO：3と少なくとも100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%～80%の同一性を有する配列を有する第1の半TALENであって、該第1のTALEN結合ドメ

50

インガ

ttgtccccacagATATC

に結合することを条件とする、第1の半TALENと、

SEQ ID NO : 4と少なくとも100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%～80%の同一性を有する配列を有する第2の半TALENであって、該第2の半TALENが、
CCGTGTACCAAGCTGAGA

に結合し、かつ該TALENのオフターゲット切断の頻度が検出未満であることを条件とする

10

第2の半TALENと

を含む、本発明1001～1010のいずれかのTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞。

[本発明1012]

少なくとも1つの挿入が、wt TRACに存在する配列

ttgtccccacagATATC, または ttgtccccacagATATCCAG

のTALEN結合ドメインの下流に位置する外因性ポリヌクレオチド配列を含む、本発明1001～1011のいずれかのTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞。

[本発明1013]

少なくとも1つの挿入が、2Aペプチド、2A様ペプチド、P2Aペプチド、E2Aペプチド、

20

F2Aペプチド、好ましくは2Aペプチド、より好ましくは配列

GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP, GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP, GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP,

GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP, SGEGRGSLLTCGDVEENPGP, SGATNFSLLKQAGDVEENPGP,

SGQCTNYALLKLAGDVESNPGP, SGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

の2Aペプチド、さらにより好ましくは配列

SGEGRGSLLTCGDVEENPGP

30

の2Aペプチドから選択されるゲノムTRACコード配列とインフレームの自己切断ペプチドをコードする配列を含む、本発明1001～1012のいずれかのTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞。

[本発明1014]

少なくとも1つの挿入が、ゲノムTRACコード配列とインフレームの配列

SGEGRGSLLTCGDVEENPGP

の2Aペプチドをコードする配列、キメラ抗原受容体をコードする外因性ポリヌクレオチド配列、ポリアデニル化シグナルの転写終結配列、任意でTALEN結合ドメインを含む、本発明1001～1013のいずれかのTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞。

40

[本発明1015]

外因性ポリヌクレオチド配列が、以下の抗原: 好ましくはCD22、CD123、CS-1、CLL-1、CD38、HSP70、MUC-1、CD30、o-アセチル-GD2の少なくとも1つに特異的なCARから選択されるキメラ抗原受容体(CAR)およびゲノムTRACコード配列とインフレームの配列

SGEGRGSLLTCGDVEENPGP

、ポリアデニル化シグナルの転写終結配列を含む、本発明1001～1014のいずれかのTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞。

[本発明1016]

50

(CAR)が、細胞外リガンド結合ドメイン、モノクローナル抗体に特異的なエピトープ、膜貫通ドメイン、および1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、本発明1001～1015のいずれかのTALEN改変内因性-TCR陰性ヒト細胞。

[本発明1017]

少なくとも1つの挿入が、IRES、キメラ抗原受容体(CAR)を含む外因性ポリヌクレオチド配列、ポリアデニル化シグナルの転写終結配列、任意でTALEN結合ドメインを含む、本発明1001～1011のいずれかのTALEN改変内因性-TCR陰性ヒト細胞。

[本発明1018]

キメラ抗原受容体(CAR)が、モノクローナル抗体に特異的な少なくとも1つの抗原、好ましくはモノクローナル抗体に特異的な2つの抗原を含む、本発明1001～1016のいずれかのTALEN改変内因性-TCR陰性ヒト細胞。

10

[本発明1019]

外因性ポリヌクレオチドが、RNAポリメラーゼの活性を停止させる転写終結シグナルを含む、本発明1001～1013のいずれかのTALEN改変内因性-TCR陰性ヒト細胞。

[本発明1020]

CD52、dCK GR、TCRのベータサブユニット遺伝子(TCRB1またはTCRB2)、サイトカイン誘導性SH2含有(CISH)遺伝子、アデノシンA2a受容体(ADORA)遺伝子、CD276遺伝子、Vセトドメイン含有T細胞活性化阻害物質1(VTCN1)遺伝子、BおよびTリンパ球関連(BTLA)遺伝子、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4(CTLA4)遺伝子、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ1(IDO1)遺伝子、キラー細胞免疫グロブリン様受容体、3ドメイン、長い細胞質尾部1(KIR3DL1)遺伝子、リンパ球活性化遺伝子3(LAG3)遺伝子、プログラム細胞死1(PD-1)遺伝子、A型肝炎ウイルス細胞受容体2(HAVCR2)遺伝子、T細胞活性化Vドメイン免疫グロブリンサプレッサー(VISTA)遺伝子、ナチュラルキラー細胞受容体2B4(CD244)遺伝子、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ1(HPRT)遺伝子、ならびにケモカイン(C-Cモチーフ)受容体5(遺伝子/偽遺伝子)(CCR5)遺伝子、CXCR4、それらの組み合わせからなる群より選択される内因性遺伝子

20

における少なくとも1つのさらなる破壊を含む、本発明1001～1019のいずれかのTALEN改変内因性-TCR陰性ヒト細胞。

[本発明1021]

本発明1001～1020のいずれかのTALEN改変内因性-TCR陰性ヒト細胞を含む、ヒト細胞の集団。

30

[本発明1022]

本発明1001～1020のいずれかのTALEN改変内因性-TCR陰性ヒト細胞または本発明1021のヒト細胞の集団と、薬学的に許容される賦形剤とを含む、薬学的組成物。

[本発明1023]

医薬として用いるための、本発明1001～1020のいずれかのTALEN改変内因性-TCR陰性ヒト細胞または本発明1021のヒト細胞の集団または本発明1022の薬学的組成物。

[本発明1024]

がんの処置で用いるための、本発明1001～1020のいずれかのTALEN改変内因性-TCR陰性ヒト細胞または本発明1021のヒト細胞の集団または本発明1022の薬学的組成物。

40

[本発明1025]

がん腫、リンパ腫、肉腫、芽細胞腫、および白血病からなる群より選択されるがんの処置で用いるための、本発明1001～1020のいずれかのTALEN改変内因性-TCR陰性ヒト細胞または本発明1021のヒト細胞の集団または本発明1022の薬学的組成物。

[本発明1026]

B細胞由来のがん、T細胞由来のがん、乳がん、胃がん、神経芽細胞腫、骨肉腫、肺がん、黒色腫、前立腺がん、結腸がん、腎細胞がん、卵巣がん、横紋筋肉腫、白血病、およびホジキンリンパ腫からなる群より選択されるがんの処置で用いるための、本発明1001～1020のいずれかのTALEN改変内因性-TCR陰性ヒト細胞または本発明1021のヒト細胞の集団または本発明1022の薬学的組成物。

50

[本発明1027]

B細胞由来のがんが、B系統急性リンパ芽球性白血病、B細胞慢性リンパ性白血病、およびB細胞非ホジキンリンパ腫からなる群より選択される、がんの処置で用いるための、本発明1001～1020のいずれかのTALEN改変内因性-TCR陰性ヒト細胞または本発明1021のヒト細胞の集団または本発明1022の薬学的組成物。

[本発明1028]

AML、ALL、T細胞リンパ腫、CLLであるがんの処置で用いるための、本発明1001～1020のいずれかのTALEN改変内因性-TCR陰性ヒト細胞または本発明1021のヒト細胞の集団または本発明1022の薬学的組成物。

[本発明1029]

改変ヒトゲノムTRAC遺伝子が5'から3'方向に、

(a) 野生型TRAC遺伝子に存在するレアカットエンドヌクレアーゼ用の認識ドメイン上流のヒトゲノムTRAC遺伝子の5'領域、

(b) アルファベータTCRの細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインの細胞表面発現に影響を与える野生型TRAC遺伝子と比較したギャップまたは挿入であって、挿入が、非コード配列、終止コドン、TRACオープンリーディングフレームとインフレームの自己切断ペプチドをコードする配列、IRES、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする配列、TCRをコードする配列、薬物に対する感受性を付与するタンパク質をコードする配列、薬物に対する耐性を付与するタンパク質をコードする配列、サイトカインをコードする配列、終結配列、それらの組み合わせから選択される外因性ポリヌクレオチドを含む、ギャップまたは挿入、

(c') 任意で第2のレアカットエンドヌクレアーゼ認識ドメイン、

(d) ゲノムTRAC遺伝子の3'領域

を含む、野生型TRAC遺伝子と比較したエンドヌクレアーゼ改変ゲノムTRAC遺伝子を含むエンドヌクレアーゼ改変内因性-TCR陰性ヒト細胞を検出するための手段。

[本発明1030]

エンドヌクレアーゼが、CRISPR/Cas 9、CRISPR/Cpf1、TALEN、トランスポザーゼ、ZEN、ジンクフィンガーエンドヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、またはMegaTALからなる群より選択され、かつ手段が、該ヌクレアーゼに特異的なエンドヌクレアーゼ改変TRACの配列におよび/または該ヌクレアーゼに特異的な該配列の上流に結合する、本発明1029の手段。

[本発明1031]

エンドヌクレアーゼがTALENである、本発明1029または1030の手段。

[本発明1032]

エンドヌクレアーゼ結合ドメインもしくはエンドヌクレアーゼ認識ドメインの上流の改変ゲノムTRAC遺伝子中の配列におよび/またはタグをコードする配列に結合する、プローブ

を含むTALEN改変内因性-TCR陰性ヒト細胞を検出するための、本発明1031の手段。

[本発明1033]

TALEN改変ゲノムTRAC遺伝子が、

(a) ヒトゲノムTRAC遺伝子の5'領域、

(b) (半?) TALEN用の認識ドメイン、好ましくは以下の配列
ttgtcccacagATATC, もしくはttgtcccacagATATCCAG

を含む(半?) TALEN用の認識ドメイン、または

(c) アルファベータTCRの細胞外ドメインもしくは膜貫通ドメインの細胞表面発現に影響を与える野生型TRAC遺伝子と比較したギャップもしくは挿入であって、挿入が、非コード配列、終止コドン、TRACオープンリーディングフレームとインフレームの自己切断ペプチドをコードする配列、IRES、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする配列、TCRをコードする配列、薬物に対する感受性を付与するタンパク質をコードする配列、薬物に対する耐性を付与するタンパク質をコードする配列、終結配列、それらの組み合わせから選択さ

10

20

30

40

50

れる外因性ポリヌクレオチドを含む、ギャップまたは挿入、

(c') 任意で第2の(半?) TALEN認識ドメイン、

(d) ゲノムTRAC遺伝子の3'領域

を含み、かつ手段が該TALEN改変ゲノムTRAC遺伝子に特異的に結合する、本発明1031または1032の手段。

[本発明1034]

改変ゲノムTRAC遺伝子中の、配列

ttgtcccacagATATC, または ttgtcccacagATATCCAG

の少なくとも10塩基に結合するプローブ

10

を含む、TALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を検出するための、本発明1031～1033のいずれかの手段。

[本発明1035]

ポリメラーゼ連鎖反応(pcr)または潜在的なオフサイト改変により、好ましくはガイド配列により、エンドヌクレアーゼ改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を検出するための、本発明1031～1034のいずれかの手段。

[本発明1036]

本発明1001～1020のいずれかのTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を検出するための、本発明1031～1035のいずれかの手段。

[本発明1037]

20

不活性化ゲノムTCRA遺伝子を含み、

CARをコードする外因性配列が、レンチウイルスベクターまたはAAVベクターを用いてゲノムTCRA遺伝子に組み込まれ、かつゲノム破壊が、CRISPR/CAS9、CRISPR/Cpf1 メガヌクレアーゼ、MegatAL、ZFN、TALEN、それらの組み合わせから選択されるエンドヌクレアーゼを用いて行われた、

本発明1001～1016のいずれかのTALEN改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞。

[本発明1038]

(a) ヒト細胞に、

(i) 操作されたヌクレアーゼがヒトTCRアルファ定常領域遺伝子内の認識配列の位置で切断を生じ、切断により検出不能なレベルまで -TCRの細胞表面発現の阻害がもたらされる、操作されたヌクレアーゼをコードする第1の核酸配列または操作されたヌクレアーゼタンパク質、

30

(ii) CARをコードする外因性ポリヌクレオチドを含む第2の核酸配列、

(iii) 任意でプローブ

を導入する段階

を含み、

該外因性ポリヌクレオチドの配列が該切断部位で該ヒトゲノムTCRアルファ定常領域遺伝子に挿入され、かつさらに非改変対照細胞と比較した場合に、該遺伝子改変細胞が内因性TCRの細胞表面発現を低減させる、

エンドヌクレアーゼ改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を產生するための方法。

40

[本発明1039]

エンドヌクレアーゼ誘導性オンサイトおよびオフサイトを、好ましくはpcrによっておよび/またはガイド配列によって検出する段階を含む、本発明1038のエンドヌクレアーゼ改変内因性 -TCR陰性ヒト細胞を產生するための方法。

[本発明1040]

操作されたヌクレアーゼが、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、CRISPR/Casヌクレアーゼ、またはmegatALヌクレアーゼである、本発明1038～1039のいずれかの方法。

[本発明1041]

操作されたヌクレアーゼがTALENである、本発明1038～1040の方法。

50

[本発明1042]

外因性ポリヌクレオチドが、自己切断ペプチドおよびキメラ抗原受容体をコードする核酸配列を含む、本発明1038～1041の方法。

[本発明1043]

キメラ抗原受容体が、細胞外リガンド結合ドメインおよび1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、本発明1038～1042のいずれかの方法。

[本発明1044]

外因性ポリヌクレオチドが、該外因性ポリヌクレオチドの発現を駆動するプロモーター配列を含む、本発明1038～1043のいずれかの方法。

[本発明1045]

少なくとも第2の核酸配列が、該第2の核酸配列を含む組み換えアデノ随伴ウイルス(AAV6)ベクターと細胞を接触させることにより該細胞に導入される、本発明1038～1044のいずれかの方法。

[本発明1046]

組み換えAAVベクターが自己相補的AAVベクターである、本発明1040～1045のいずれかの方法。

[本発明1047]

組み換えAAVベクターが少なくとも部分的にAAV6に由来する、本発明1040～1046のいずれかの方法。

[本発明1048]

組み換えTALENが第1サブユニットおよび第2サブユニットを含み、該第1サブユニットが第1の認識半部位に結合し、かつ該第2サブユニットが第2の認識半部位に結合する、本発明1040～1047のいずれかの方法。

[本発明1049]

組み換えTALENが、野生型ヒトTCRアルファ定常領域中の配列ttgtcccacagATATCを認識する、本発明1040～1048のいずれかの方法。

[本発明1050]

エンドヌクレアーゼが、

5'から3'方向に

TGCTGTGGCCTGGAGCAAC および GACTTGCATGTGCA

10

20

30

を認識しつつAAATCT内で切断するジンクフィンガー；以下の配列：

AGAGTCTCTCAGCTGGTACA, GCACCAAAGCTGCCCTTACC, AAGTCCTGTGATGTCAAGC, TTCTG-

GAACCCAATCACTGAC, GATTAAACCCGGCCACTTTC, CGTCATGAGCAGATTAAACC,

CTCAAGGTTCAGATCAGAAG, TAGGCAGACAGACTTGTAC, AACAAATGTGTACAAAGTA, CACCAA-

GCTGCCCTTACCT, CTGACAGGTTTGAAAGTT, TTCAAAACCTGTCAGTGATT,

CCGAATCCTCCTGAAAG, CCACTTCAGGAGGAGGATT, TAAACCCGGCCACTTCAGG,

TCTCAAACAAATGTGTACAAAGTA, CTTACAATCTGCAGATCTGGAATG, TTAATCTGCTCATGACGCTG,

40

50

GGAGAAGAGGGCAATGCAG, TCTTCTCCCTCTCCAAACAG, AGCAGCTTCACCTCCTTGG, GTAG-CAGCTTCACCTCCTT, AGTTGGTGGCATTGCCGGGG, TCTGTGATATACACATCAGAATC, TCTGTGATAACACATCAGAATCC, GAGTCTCTCAGCTGGTACACGGC, GAGTCTCTCAGCTGGTACACGGCA, ATTCTCAAACAAATGTGTCACAA, ATTCTCAAACAAATGTGTCACAAA, GTCTGTGATATACACATCAGAAT, GTCTGTGATATACACATCAGAATC, GAGAATCAAATCGGTGAATAGG, TGTGCTAGACATGAGGTCTATGG , 10 TCAGGGTTCTGGATATCTGTGGG, GTCAGGGTTCTGGATATCTGTGG, AAAGTCAGATTGTTGCTCCAGG, AACAAATGTGTCACAAAGTAAGG, TGGATTAGAGTCTCTCAGCTGG, TAGGCAGACAGACTTGTCACTGG, AGCTGGTACACGGCAGGGTCAGG, GCTGGTACACGGCAGGGTCAGGG, TCTCTCAGCTGGTACACGGCAGG, AGAGTCTCTCAGCTGGTACACGG, CTCTCAGCTGGTACACGGCAGGG, ACAAAACTGTGCTAGACATGAGG, ATTTGTTGAGAATCAAATCGG, TGGAATAATGCTGTTGAAGG, AGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGG, 20 CTTCTCCCCAGCCCAGGTAAGG, ACACGGCAGGGTCAGGGTCTGG, CTTCAAGAGAACAGTGCTGTGG, CTGGGGAAGAAGGTGTCTTCTGG, TTCTCCCCAGCCCAGGTAAGGG, CTTACCTGGCTGGGAAGAAGG, GACACCTCTCCCCAGCCCAGG, TTCAAAACCTGTCAGTGATTGGG, CGTCATGAGCAGATTAAACCCGG, TTCGGAACCCAATCACTGACAGG, TAAACCCGGCCACTTCAGGAGG, TTTCAAAACCTGTCAGTGATTGG, GATTAAACCCGGCCACTTCAGG, CTCGACCAGCTGACATCACAGG, AAGTTCTGTGATGTCAAGCTGG ,ATCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGG, TGCTCATGACGCTGCGGCTGTGG, CATCACAGGAACCTTCTAAAAGG, 30 GTCGAGAAAAGCTTGAAACAGG, CCACTTCAGGAGGAGGATTGG, CTGACAGGTTTGAAAGTTAGG, AGCTTGAAACAGGTAAGACAGG, CTGTTGGTCCAGCTGAGGTGAGGG, CTGCGGCTGTGGTCCAGCTGAGG, TGTGGTCCAGCTGAGGTGAGGGG, TCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGG, TTAATCTGCTCATGACGCTGCGG, ACCCGGCCACTTCAGGAGGAGG, GCTGTGGTCCAGCTGAGGTGAGG, CCGAATCCTCCTGAAAGTGG

のいずれか1つに相補的な配列を認識するCrispr/Cas 9 ; MegaTAL ; 野生型ヒトTCRアルファ定常領域の残基番号93～208内の認識配列を認識かつ切断するメガヌクレアーゼであり、

組み換えメガヌクレアーゼが第1サブユニットおよび第2サブユニットを含み、該第1サブユニットが、該認識配列の第1の認識半部位に結合しつつ第1の超可変(HVR1)領域を含み、かつ該第2サブユニットが、該認識配列の第2の認識半部位に結合しつつ第2の超可変(HVR2)領域を含む、本発明1038～1040のいずれかの方法。

[本発明1051]

メガヌクレアーゼが、リンカーを含む一本鎖メガヌクレアーゼであり、該リンカーが第1サブユニットおよび第2サブユニットを共有結合する、本発明1050の方法。

[本発明1052]

本発明1038～1051の方法のいずれか1つによって得られた細胞を検出するための手段。

10

20

30

40

50

[本発明1053]

SEQ ID NO : 5、SEQ ID NO : 6、SEQ ID NO : 7、それらの組み合わせ、または任意の縮重されたSEQ ID NO : 5、SEQ ID NO : 6、SEQ ID NO : 7、それらの組み合わせの配列から選択される、本発明1052の手段。

[本発明1054]

エンドヌクレアーゼによるオンサイトおよび/またはオフサイト切断を検出するための、本発明1052の手段。

[本発明1055]

SEQ ID NO : 13~22のいずれか1つ、それらの組み合わせを有するエンドヌクレアーゼによるオンサイトおよび/またはオフサイト切断を検出するための、本発明1054の手段。

10

[本発明1056]

以下の配列:

AGAG-

TCTCTCAGCTGGTACA, GCACCAAAGCTGCCCTTACC, AAGTTCCCTGTGATGTCAAGC, TTCGGAACCCAATCAC-TGAC, GATTAAACCCGGCCACTTTC, CGTCATGAGCAGATTAAACC, CTCAGGTTAGATCAGAAG,

TAGGCAGACAGACTTGTACAC, AACAAATGTGTACAAAGTA, CACCAAAGCTGCCCTTACCT,

CTGACAGGTTTGAAAGTTT, TTCAAAACCTGTCACTGATT, CCGAATCCTCCTCCTGAAAG, CCACTTCAG-

20

GAGGAGGATT, TAAACCCGGCCACTTCAGG, TCTCAAACAAATGTGTACAAAGTA, CTTACAATCTT-

GCAGATCTGGAATG, TTAATCTGCTCATGACGCTG, GGAGAAGAGGGCAATGCAG,

TCTTCTCCCTCTCAAACAG, AGCAGCTTCACCTCCTGG, GTAGCAGCTTCACCTCCTT, AGTTGGTGGCATT-

GCCGGGG, TCTGTGATATACACATCAGAATC, TCTGTGATATACACATCAGAATCC, GAGTCTCTCAGCTGG-

TACACGGC, GAGTCTCTCAGCTGGTACACGGCA, ATTCTCAAACAAATGTGTACAA,

30

ATTCTCAAACAAATGTGTACAAA, GTCTGTGATATACACATCAGAAT, GTCTGTGATATACACATCAGAATC, GA-

GAATCAAACAAATCGGTGAATAGG, TGTGCTAGACATGAGGTCTATGG, TCAGGGTTCTGGATATCTGTGGG,

GTCAGGGTTCTGGATATCTGTGG, AAAGTCAGATTGTTGCTCCAGG, AACAAATGTGTACAAAGTAAGG,

TGGATTTAGAGTCTCTCAGCTGG, TAGGCAGACAGACTTGTCACTGG, AGCTGGTACACGGCAGGGTCAGG,

GCTGGTACACGGCAGGGTCAGGG, TCTCTCAGCTGGTACACGGCAGG, AGAGTCTCTCAGCTGGTACACGG,

CTCTCAGCTGGTACACGGCAGGG, ACAAAACTGTGCTAGACATGAGG, ATTTGTTGAGAATCAAACAAATCGG,

40

50

TGGAATAATGCTGTTGAAGG, AGAGCAACAGTGCTGAGGCTGG, CTTCTCCCCAGGCCAGGTAAGG,
 ACACGGCAGGGTCAGGGTCTGG, CTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGG, CTGGGAAGAAGGTGTCTCTGG,
 TTCTCCCCAGGCCAGGTAAGG, CTTACCTGGCTGGGAAGAAGG, GACACCTTCTCCCCAGGCCAGG,
 TCAAAACCTGTCAGTGATTGG, CGTCATGAGCAGATTAAACCCGG, TCGGAACCCAATCACTGACAGG,
 TAAACCCGGCCACTTCAGGAGG, TTTCAAAACCTGTCAGTGATTGG, GATTAAACCCGGCCACTTCAGG,
 10 CTCGACCAGCTGACATCACAGG, AAGTTCTGTGATGTCAAGCTGG, ATCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGG,
 TGCTCATGACGCTGCGGCTGTGG, CATCACAGGAACCTTCTAAAAGG, GTCGAGAAAAGCTTGAAACAGG,
 CCACTTCAGGAGGAGGATTGG, CTGACAGGTTTGAAAGTTAGG, AGCTTGAAACAGGTAAGACAGG,
 CTGTGGTCCAGCTGAGGTGAGGG, CTGCGGCTGTGGTCCAGCTGAGG, TGTGGTCCAGCTGAGGTGAGGGG,
 TCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGG, TTAATCTGCTCATGACGCTGCGG, ACCCGGCCACTTCAGGAGGAGG,
 20 GCTGTGGTCCAGCTGAGGTGAGG, CCGAATCCTCCTGAAAGTGG

の少なくとも1つを含む配列と、そのいずれか1つの相補配列とを含む、手段。

【図面の簡単な説明】

【0 5 3 9】

【図1】TCR KO、キメラ抗原受容体(CAR)のような外因性遺伝子を発現

【図2】内因性TCRを維持、キメラ抗原受容体(CAR)のような外因性遺伝子を共発現

【図3】内因性TCRを不活性化、組み換えTCRを発現

【図4】TCR KO、外因性遺伝子を発現(IRES)

【図5】内因性TCRを維持、外因性遺伝子を共発現(IRES)

【図6】内因性TCRを不活性化、組み換えTCRを発現(IRES)

【図7】TCR KO、外因性遺伝子を発現、TALEN標的部位を編集

【図8】CD52遺伝子の不活性化ならびにTRAC遺伝子への自己切断ペプチド2A、CARおよびポリA終結因子配列をコードする配列の挿入による不活性化。

【発明を実施するための形態】

【0 5 4 0】

発明の詳細な説明

1.1 参考文献および定義

本明細書において言及される特許および科学文献は、当業者に利用可能な知識を確立する。本明細書において引用されている、交付済み特許、許可された出願、公開された外国出願、およびGenBankデータベース配列を含む参考文献は、あたかも各々が具体的かつ個別的に参照により組み入れられることを示すのと同程度に参照により本明細書に組み入れられる。

【0 5 4 1】

本発明は、異なる形態で具体化することができ、本明細書において記載される態様に限定されると解釈されるべきではない。というよりむしろ、これらの態様は、本開示が徹底的かつ完全であり、本発明の範囲を当業者に十分に伝えるように提供されている。例えば、1つの態様に関して例示された特徴は、他の態様に組み入れることができ、特定の態様に関して例示された特徴は、その態様から削除することができる。さらに、本明細書において示唆された態様に対する多数の変形および追加は、本発明から逸脱しない、本開示に照らして当業者には明らかであろう。

10

20

30

40

50

【 0 5 4 2 】

他に定義されない限り、本明細書において用いられる全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書における本発明の記載において用いられる専門用語は、特定の態様を記載することのみを目的としており、本発明の限定であると意図されるものではない。

【 0 5 4 3 】

本明細書において言及される全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【 0 5 4 4 】

本明細書において用いられる場合、「1つの(a)」、「1つの(an)」または「その(the)」は、1つまたは2つ以上を意味することができる。例えば、「1つの(a)」細胞は、単一細胞または多数の細胞、細胞の均質集団を意味することができる。10

【 0 5 4 5 】

本明細書において用いられる場合、他に具体的に示されない限り、単語「または」は、「および/または」の包括的な意味で用いられ、「いずれか/または」の排他的な意味では用いられない。

【 0 5 4 6 】

本明細書において用いられる場合、用語「TALEN」または「TALE-ヌクレアーゼ」は、FokIヌクレアーゼドメインの任意の部分に融合された14～20または16～22個のTALドメインリピートを含むDNA結合ドメインを含むエンドヌクレアーゼをいう(WO2011072246)。20

【 0 5 4 7 】

TALEヌクレアーゼは、TALE結合ドメインと切断触媒ドメインとの融合タンパク質である。これらのエンドヌクレアーゼは、初代免疫細胞、特に末梢血単核球(PBMC)由来のT細胞に成功裏に適用してきた。TALENという名称で販売されているそのようなTALE-ヌクレアーゼは、ドナーに由来するT細胞中の遺伝子配列を同時に不活性化するために、特にTCR(T細胞受容体)およびCD52をコードする遺伝子が破壊されている同種治療用T細胞を产生するために現在使用されているものである。これらの細胞は、がん患者を処置するためのキメラ抗原受容体(CAR)を備えることができる(US2013/0315884)。TALE-ヌクレアーゼは、切断ドメインFok-1の二量体化を得るために必須のヘテロ二量体形態下で対によってDNAを結合する必要があるため、非常に特異的な試薬である。左右のヘテロ二量体メンバーは各々、約14～20 bpの異なる核酸配列を認識し、全体として30～50 bpの全体的な特異性の標的配列にまたがる。30

【 0 5 4 8 】

ホーミングエンドヌクレアーゼに由来する他のエンドヌクレアーゼシステム(例えば: I-OnuIもしくはI-Crel)は、TAL-ヌクレアーゼ(例えば: MegaTAL)またはジンクフィンガヌクレアーゼと組み合わせまたは組み合わせず、これまでのところ比較的程度は低いが、同様に特異性が証明されている。

【 0 5 4 9 】

本明細書において用いられる場合、用語「コンパクトTALEN」とは、I-TevIホーミングエンドヌクレアーゼのヌクレアーゼドメインの任意の触媒活性部分に任意の向きで融合された16～22個のTALドメインリピートを有するDNA結合ドメインを含むエンドヌクレアーゼをいう。40

【 0 5 5 0 】

本明細書において用いられる場合、用語「メガヌクレアーゼ」とは、12塩基対を超える認識配列で二本鎖DNAに結合するエンドヌクレアーゼをいう。好ましくは、本発明のメガヌクレアーゼの認識配列は22塩基対である。メガヌクレアーゼは、I-Crelに由来するエンドヌクレアーゼであることができ、例えば、DNA結合特異性、DNA切断活性、DNA結合親和性、または二量体化特性に関して天然I-Crelと比べて改変されている操作されたI-Crel変種をいうことができる。そのような改変されたI-Crel変種を产生するための方法は、当50

技術分野において公知である(例えば、WO 2007/047859)。本明細書において用いられるメガヌクレアーゼは、ヘテロ二量体として、または一対のDNA結合ドメインがペプチドリンカーを用いて单一のポリペプチドに連結されている「一本鎖メガヌクレアーゼ」として二本鎖DNAに結合する。用語「ホーミングエンドヌクレアーゼ」は、用語「メガヌクレアーゼ」と同義である。本発明のメガヌクレアーゼは、本明細書において記載される方法を用いて測定された場合に細胞生存性に及ぼす有害効果またはメガヌクレアーゼ切断活性の有意な低減を観察することなく細胞をトランスフェクションし、37^oで維持しうるよう、細胞において、特にヒトT細胞において発現された場合に実質的に無毒である。

【0551】

本明細書において用いられる場合、用語「一本鎖メガヌクレアーゼ」は、リンカーによって連結された一対のヌクレアーゼサブユニットを含むポリペプチドをいう。一本鎖メガヌクレアーゼは次の構成を有する：N末端サブユニット - リンカー - C末端サブユニット。2つのメガヌクレアーゼサブユニットは一般に、アミノ酸配列が同一ではないものと考えられ、同一でないDNA配列を認識するものと考えられる。したがって、一本鎖メガヌクレアーゼは典型的には、偽回文または非回文認識配列を切断する。一本鎖メガヌクレアーゼは、実際には二量体ではないが、「一本鎖ヘテロ二量体」または「一本鎖ヘテロ二量体メガヌクレアーゼ」といわれることがある。明確にするために、特別の定めのない限り、用語「メガヌクレアーゼ」は、二量体または一本鎖メガヌクレアーゼをいうことができる。

10

【0552】

本明細書において用いられる場合、用語「リンカー」は、2つのメガヌクレアーゼサブユニットを单一のポリペプチドに連結するために用いられる外因性ペプチド配列をいうことができる。リンカーは、天然タンパク質に見られる配列を有してもよく、またはいかなる天然タンパク質にも見られない人工的な配列であってもよい。リンカーは柔軟で二次構造を欠いていてもよく、または生理学的条件下で特定の三次元構造を形成する傾向を有していてもよい。リンカーは、非限定的に、米国特許第8,445,251号によって包含されるものを含むことができる。

20

【0553】

本明細書において用いられる場合、用語「CRISPR」(クラスタ化され規則的に間隔を置いた短いパリンドロームリピート)は、ゲノムDNA中の認識部位にハイブリダイズすることによってカスパーーゼのDNA切断を指令するガイドRNAおよび、Cas9のような、カスパーーゼを含むカスパーーゼに基づくエンドヌクレアーゼをいう。

30

【0554】

他のエンドヌクレアーゼ試薬は、細菌・化膿連鎖球菌(*S. pyogenes*)のII型原核生物CRISPR(クラスタ化され規則的に間隔を置いた短いパリンドロームリピート)適応免疫系の構成要素に基づいて開発してきた。RNAガイドヌクレアーゼ系といわれるこの多成分系(Gasiunas, Barrangou et al. 2012; Jinek, Chylinski et al. 2012)は、該ヌクレアーゼをいくつかの特定のゲノム配列に運ぶ能力を有するガイドRNA分子と結合したCas9またはCpf1エンドヌクレアーゼファミリーのメンバーを伴う(Zetsche et al. (2015). Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease that provides immunity in bacteria and can be adapted for genome editing in mammalian cells. Cell 163:759-771)。そのようなプログラム可能なRNAガイドエンドヌクレアーゼは、容易にデザインされ安価に製造されうる、RNAガイドの配列によって切断特異性が決定されるので产生することが容易である。CRISPR/Cas9の特異性は、とはいえ、約10 pbのTAL-ヌクレアーゼよりも短い配列に基づいており、これはターゲティング遺伝子配列中の特定のモチーフ(PAM)の近くに位置しなければならない。

40

【0555】

本明細書において用いられる場合、用語「megaTAL」は、操作された配列特異的ホーミングエンドヌクレアーゼとともに転写活性化因子様エフェクター(TALE) DNA結合ドメインを含む一本鎖ヌクレアーゼをいう。

【0556】

50

タンパク質に関して本明細書において用いられる場合、用語「組み換え」は、タンパク質をコードする核酸、およびタンパク質を発現する細胞または生物への遺伝子操作技法の適用の結果として改変されたアミノ酸配列を有することを意味する。核酸に関して、用語「組み換え」は、遺伝子操作技法の適用の結果として改変された核酸配列を有することを意味する。遺伝子工学技法は、PCRおよびDNAクローニング技術；トランスフェクション、形質転換および他の遺伝子移入技術；相同組み換え；部位特異的変異誘発；ならびに遺伝子融合を含むが、これらに限定されることはない。この定義によれば、天然に存在するタンパク質と同一のアミノ酸配列を有するが、異種宿主におけるクローニングおよび発現によって産生されるタンパク質は、組み換えとは見なされない。

【0557】

10

以下の書面WO2017062451、WO2015057980、WO2017106528は、特にcrisprまたはメガヌクレアーゼ-TRAC改変ヒト細胞を調製する方法に関して、参照により全体が本明細書に組み入れられる。

【0558】

本明細書において用いられる場合、用語「野生型」または「天然」は、野生型対立遺伝子によってコードされるポリペプチドがその本来の機能を有する、同じ型の遺伝子の対立遺伝子集団中の最も一般的な天然に存在する対立遺伝子(すなわち、ポリヌクレオチド配列)をいう。用語「野生型」はまた、野生型対立遺伝子によってコードされるポリペプチドもいう。野生型対立遺伝子(すなわち、ポリヌクレオチド)およびポリペプチドは、野生型配列に対して1つまたは複数の変異および/または置換を含む変異体または変種対立遺伝子およびポリペプチドと区別することができる。野生型対立遺伝子またはポリペプチドは生物において正常な表現型を付与することができるが、変異体または変種対立遺伝子またはポリペプチドは、場合によっては、改変された表現型を付与することができる。野生型ヌクレアーゼは、組み換えヌクレアーゼまたは非天然ヌクレアーゼとは区別することができる。

【0559】

20

本明細書において用いられる場合、用語「改変」は、参照配列(例えば、野生型もしくは天然またはゲノム配列)と比べて配列中のアミノ酸残基の任意の挿入、欠失または置換を意味する。

【0560】

30

本明細書において用いられる場合、用語「認識配列」または「認識ドメイン」は、エンドヌクレアーゼによって結合および切断されるDNA配列をいう。メガヌクレアーゼの場合、認識配列は、4塩基対によって分離されている1対の反転した9塩基対の「半部位」を含む。

【0561】

一本鎖メガヌクレアーゼの場合、タンパク質のN末端ドメインは第1の半部位と接触し、タンパク質のC末端ドメインは第2の半部位と接触する。

【0562】

メガヌクレアーゼによる切断は、4つの塩基対3'「突出部」を生じる。「突出部」または「付着末端」は、二本鎖DNA配列のエンドヌクレアーゼ切断によって産生される短い一本鎖DNAセグメントである。I-CreIに由来するメガヌクレアーゼおよび一本鎖メガヌクレアーゼの場合、突出部は22塩基対認識配列の10~13塩基を含む。

40

【0563】

コンパクトTALENの場合、認識配列は、I-TevIドメインによって認識される第1のCNN NGN配列、それに続く長さが4~16塩基対の非特異的スペーサー、それに続くTAL-エフェクタードメインによって認識される(この配列は典型的には5' T塩基を有する)長さが16~22 bpの第2の配列を含む。コンパクトTALENによる切断は、2塩基対3'突出部を生じる。

【0564】

CRISPRの場合、認識配列は、ガイドRNAが直接的Cas9切断に結合する、典型的には16~24塩基対の配列である。CRISPRによる切断は平滑末端を生じた。

【0565】

50

本明細書において用いられる場合、用語「標的部位」または「標的配列」は、ヌクレアーゼに対する認識配列を含む細胞の染色体DNAの領域をいう。

【0566】

本明細書において用いられる場合、用語「DNA結合親和性」または「結合親和性」は、ヌクレアーゼが参照DNA分子(例えば、認識配列または任意の配列)と非共有結合する傾向を意味する。結合親和性は解離定数、3/4によって測定される。本明細書において用いられる場合、参照認識配列に対するヌクレアーゼのKdが参照ヌクレアーゼと比べて統計的に有意な変化率によって増加または減少する場合、ヌクレアーゼは「改変された」結合親和性を有する。

【0567】

本明細書において用いられる場合、用語「相同組み換え」または「HR」は、修復錆型として相同DNA配列を用いて二本鎖DNA切断が修復される天然の細胞プロセスをいう(例えば、Cahill et al. (2006), *Front. Biosci.* 11: 1958-1976を参照のこと)。相同DNA配列は、細胞に送達された内因性染色体配列または外因性核酸であってよい。

10

【0568】

本明細書において用いられる場合、用語「非相同末端結合」または「NHEJ」は、二本鎖DNA切断が2つの非相同DNAセグメントの直接結合によって修復される天然の細胞プロセスをいう(例えば、Cahill et al. (2006), *Front. Biosci.* 11: 1958-1976を参照のこと)。非相同末端結合によるDNA修復は誤りがちであり、修復部位でのDNA配列の非錆型付加または欠失を頻繁に引き起こす。場合によっては、標的認識配列での切断は標的認識部位でのNHEJを引き起こす。遺伝子のコード配列中の標的部位のヌクレアーゼ誘導性切断、引き続きNHEJによるDNA修復は、遺伝子機能を破壊する、フレームシフト変異のような、変異をコード配列に導入することができる。したがって、操作されたヌクレアーゼは、細胞の集団において遺伝子を効果的にノックアウトするために用いることができる。

20

【0569】

CAR

本明細書において用いられる場合、「キメラ抗原受容体」または「CAR」は、抗原に対する特異性を免疫エフェクター細胞(例えば、ヒトT細胞)に付与または移植する操作された受容体をいう。キメラ抗原受容体は、典型的には、細胞外リガンド結合ドメインまたは部分、およびT細胞活性化に必要なシグナルを伝達する1つまたは複数の刺激ドメインを含む細胞内ドメインを含む。いくつかの態様において、細胞外リガンド結合ドメインまたは部分は、特定のエピトープまたは抗原(例えば、がん細胞もしくは他の疾患原因細胞または粒子の表面上に選択的に存在するエピトープまたは抗原)に対する特異性を提供する、モノクローナル抗体に由来する一本鎖可変断片(scFv)の形態であってよい。細胞外リガンド結合ドメインは、関心対象の任意の抗原またはエピトープに特異的であることができる。

30

【0570】

特定の態様において、リガンド結合ドメインはCD22に特異的である。別の特定の態様において、リガンド結合ドメインはCD123に特異的である。

【0571】

SCFV

40

特定の態様において、TRAC遺伝子に挿入された外因性ポリヌクレオチドによってコードされるCARはscfvを含む。本発明のscfvは、リンカー配列を介して付着させることができる。

【0572】

ヒンジ

細胞外ドメインは、細胞外リガンド結合ドメインと膜貫通ドメインとの間にヒンジ領域をさらに含むことができる。本明細書において用いられる用語「ヒンジ領域」は一般に、膜貫通ドメインを細胞外リガンド結合ドメインに連結するように機能する任意のオリゴまたはポリペプチドを意味する。特に、ヒンジ領域は、細胞外リガンド結合ドメインに対してより高い柔軟性および接近可能性を提供するために用いられる。ヒンジ領域は、300個

50

までのアミノ酸、好ましくは10～100個のアミノ酸、最も好ましくは10～50個のアミノ酸を含みうる。ヒンジ領域は、CD8もしくはCD4の細胞外領域の全部もしくは一部、または抗体定常領域の全部もしくは一部のような、天然に存在する分子の全部もしくは一部に由来しうる。あるいは、ヒンジ領域は、天然に存在するヒンジ配列に対応する合成配列であってよく、または完全に合成のヒンジ配列であってよい。好ましい態様において、ヒンジドメインは、それぞれヒトCD8アルファ鎖、FcRIII 受容体またはIgG1の一部を含む。

【0573】

IgG4由来またはPD1由来のヒンジは、本発明の一部であり、WO2016120216に開示されており、本発明によるCARの構築において用いられる。

【0574】

本発明によるCARは細胞の膜中に固定される。したがって、そのようなCARは膜貫通ドメインをさらに含む。適切な膜貫通ドメインの際立った特徴は、細胞、好ましくは本発明においては免疫細胞、特にリンパ球細胞またはナチュラルキラー(NK)細胞の表面で発現される能力、および予め定義された標的細胞に対する免疫細胞の細胞応答を指令するためにともに相互作用する能力を含む。膜貫通ドメインは、天然源または合成源のいずれかに由来することができる。膜貫通ドメインは、任意の膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質に由来することができる。非限定的な例として、膜貫通ポリペプチドは、
、
もしくは
、CD3複合体を構成するポリペプチド、IL2受容体p55(鎖)、p75(鎖)もしくは鎖、Fc受容体、特にFc受容体IIIまたはCDタンパク質のサブユニット鎖のようなT細胞受容体のサブユニットであることができる。あるいは、膜貫通ドメインは合成によることができ、ロイシンおよびバリンのような主に疎水性残基を含むことができる。

10

【0575】

ミモトープ - 自殺スイッチ

本発明において、キメラ抗原受容体の細胞外ドメインはまた、WO2016120216に記載されているものなどのモノクローナル抗体によって認識されうるモノクローナル抗体エピトープを含みうる。好ましい態様？において、本発明のCARは「QR3」、「QR2」、「QR1」、「Q」、「R」、「R2」または「R3」CARであり、参照により本明細書に組み入れられるWO2016120216A1に記載されているようにQはQ ben10抗体によって認識されるエピトープであり、Rはリツキシマブによって認識されるエピトープである。

20

【0576】

キメラ抗原受容体の細胞外ドメインはまた、Bリンパ球上の自己抗原特異的B細胞受容体によって認識されうる自己抗原を含むこともできる(Payne et al. (2016), Science 353 (6295): 179-184を参照のこと)。自己抗体は、抗体媒介性自己免疫疾患において自己反応性Bリンパ球を特異的に標的としつつ死滅させるようにT細胞を指令すること可能にする。そのようなCARはキメラ自己抗体受容体(CAAR)ということができ、その使用は本発明によって包含される。1つまたはいくつかのモノクローナル抗体エピトープをscFvおよび/またはCARのヒンジに挿入することができ、その使用は、例えばインビボで細胞を排除するために本発明によって包含される。

30

【0577】

細胞内ドメイン

本発明によるCARのシグナル伝達ドメインまたは細胞内シグナル伝達ドメインは、細胞外リガンド結合ドメインの標的への結合に続く細胞内シグナル伝達を担い、免疫細胞の活性化および免疫応答(標的細胞に対する細胞溶解活性)を引き起こす。言い換えれば、シグナル伝達ドメインは、CARが発現されている免疫細胞の正常なエフェクター機能の少なくとも1つの活性化に関与している。例えば、T細胞のエフェクター機能は、細胞溶解活性またはサイトカインの分泌を含むヘルパー活性であってよい。したがって、用語「シグナル伝達ドメイン」は、エフェクターシグナル機能を伝達し、細胞に特殊な機能を果たすように指令するタンパク質の部分をいう。

40

【0578】

本発明のCARにおけるシグナル伝達ドメインの好ましい例は、抗原受容体結合後にシグ

50

ナル伝達を開始するように協調して作用するT細胞受容体および共受容体の細胞質配列、ならびにこれらの配列の任意の誘導体または変種および同じ機能的能力を有する任意の合成配列であることができる。シグナル伝達ドメインは、2つの異なるクラスの細胞質シグナル伝達配列、抗原依存性の一次活性化を開始するもの、および抗原非依存的に作用して二次シグナルまたは共刺激シグナルを提供するものを含む。一次細胞質シグナル伝達配列は、ITAMの免疫受容体チロシンに基づく活性化モチーフとして知られるシグナル伝達モチーフを含みうる。ITAMは、syk/zap70クラスのチロシンキナーゼに対する結合部位としての役割を果たす種々の受容体の細胞質内尾部に見られる、明確に定義されたシグナル伝達モチーフである。本発明において用いられるITAMの例は、非限定的な例として、TCRゼータ、FcRガンマ、FcRベータ、FcRエプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3エプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79bおよびCD66dに由来するものを含むことができる。10

【 0 5 7 9 】

細胞内刺激ドメインは、抗原結合後に活性化シグナルを免疫エフェクター細胞に伝達する1つまたは複数の細胞質シグナル伝達ドメインを含むことができる。1つの態様において、細胞質シグナル伝達ドメインはCD3-ゼータ細胞内刺激ドメインを含む。

【 0 5 8 0 】

別の態様において、本発明のCARのシグナル伝達ドメインはCD3ゼータシグナル伝達ドメインで構成され、ヒトCD28シグナル伝達ドメインからのいかなる配列も除外する。

【 0 5 8 1 】

特定の態様において、本発明のCARのシグナル伝達ドメインは共刺激シグナル分子を含む。共刺激分子は、効率的な免疫応答に必要とされる抗原受容体またはそのリガンド以外の細胞表面分子である。「共刺激リガンド」は、T細胞上の同族共刺激分子に特異的に結合し、それにより、例えば、ペプチドが負荷されたMHC分子とのTCR/CD3複合体の結合によって提供される一次シグナルに加えて、増殖活性化、分化などを含むが、これらに限定されないT細胞応答を媒介するシグナルを提供する抗原提示細胞上の分子をいう。共刺激リガンドは、CD7、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40 L、誘導性共刺激リガンド(ICOS-L)、細胞間接着分子(ICAM、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、M1CB、HVEM、リンホトキシンベータ受容体、3/TR6、ILT3、ILT4、Tollリガンド受容体に結合するアゴニストまたは抗体およびB7-H3と特異的に結合するリガンドを含むことができるが、これらに限定されることはない。共刺激リガンドはまた、とりわけ、限定されるものではないが、CD27、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LTGHT、NKG2C、B7-H3、CD83と特異的に結合するリガンドのような、T細胞上に存在する共刺激分子と特異的に結合する抗体を包含する。30

【 0 5 8 2 】

「共刺激分子」は、共刺激リガンドと特異的に結合し、それにより、限定されるものではないが、増殖のような、細胞による共刺激応答を媒介するT細胞上の同族結合パートナーをいう。共刺激分子は、MHCクラスI分子、BTLAおよびTollリガンド受容体を含むが、これらに限定されることはない。共刺激分子の例としては、CD27、CD8、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3およびCD83と特異的に結合するリガンドなどが挙げられる。40

【 0 5 8 3 】

1つの態様において、本発明のCARのシグナル伝達ドメインは、4-1BB (GenBank: AA A53133.)の断片からなる共刺激シグナル分子の一部を含む。別の態様において、本発明によるCARのシグナル伝達ドメインは、CD28 (NP_006130.1)由来の配列を含まない。

【 0 5 8 4 】

1つの態様において、本発明の全ての態様は、CD28 (NP_006130.1)由来の配列を含まない。50

【 0 5 8 5 】

1つの態様において、本発明のCARのシグナル伝達ドメインは、共刺激シグナル分子4-1BB (GenBank: AAA53133)の一部を含み、CD28 (NP_006130.1)由来の配列を含まない。

【 0 5 8 6 】

1つの態様において、本発明のCARのシグナル伝達ドメインは、共刺激シグナル分子4-1BB (GenBank: AAA53133)の一部およびCD3ゼータシグナル伝達ドメインを含む。

【 0 5 8 7 】

1つの態様において、本発明のCARのシグナル伝達ドメインは、共刺激シグナル分子4-1BB (GenBank: AAA53133)の一部およびCD3ゼータ細胞内シグナル伝達ドメインおよびCD28細胞内シグナル伝達ドメインを含む。 10

【 0 5 8 8 】

細胞内刺激ドメインはまた、リガンド結合後に増殖シグナルおよび/または細胞生存シグナルを伝達する1つまたは複数の細胞内共刺激ドメインを含むことができる。そのような細胞内共刺激ドメインは、非限定的に、CD28ドメイン、OX40ドメイン、またはそれらの組み合わせを含むことができる。キメラ抗原受容体は、ヒンジまたはスペーサー配列を介して細胞外リガンド結合ドメインに付着している膜貫通ドメインを含む、さらなる構造要素をさらに含むことができる。

【 0 5 8 9 】**多鎖CAR**

TRAC遺伝子中の挿入は、WO2014039523 A1に記載されているものである多鎖CARをコードする配列を含みうる。 20

【 0 5 9 0 】**外因性TCRまたは組み換え外因性TCR**

本明細書において用いられる場合、「外因性T細胞受容体(TCR)」または「組み換えTCR」は、その配列が、内因性TCRを発現しない免疫エフェクター細胞(例えば、ヒトT細胞)のゲノムに導入されるTCRをいう。免疫エフェクター細胞における外因性TCRの発現は、特異的かつ既知のエピトープまたは抗原(例えば、がん細胞もしくは他の疾患原因細胞または粒子の表面上に選択的に存在するエピトープまたは抗原)に対する特異性を付与することができる。そのような外因性T細胞受容体は、アルファおよびベータ鎖を含むことができ、あるいは、ガンマおよびデルタ鎖を含みうる。本発明において有用な外因性TCRは、本明細書において列挙されるもののような任意の関心対象の抗原またはエピトープに対する特異性を有しうる。 30

【 0 5 9 1 】

本明細書において用いられる場合、抗原の「検出不能な発現」という用語は、該抗原を発現しない陰性対照細胞を用いて測定されるレベルまでの、遺伝子改変細胞における、細胞表面での発現の低減をいう。

【 0 5 9 2 】

遺伝子改変細胞の細胞表面でのT細胞受容体の「検出不能な発現」という用語は、T細胞受容体の内因性アルファおよびベータ鎖(ならびにアルファベータTCRに特異的なAb)を発現しない対照細胞を用いて測定された遺伝子改変細胞におけるTCRの内因性アルファおよびベータ鎖のレベルに対応する。 40

【 0 5 9 3 】

低減されたという用語はまた、対照細胞の集団と比較した場合に細胞表面で内因性ポリペプチド(すなわち、内因性アルファおよびベータT細胞受容体ならびにキメラ抗原受容体)を発現する細胞集団における細胞の割合の低減をいうことができる。

【 0 5 9 4 】

そのような低減は、最大5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または最大100% (検出不能)であってよい。したがって、「低減された」という用語は、内因性T細胞受容体の部分的ノックダウンおよび完全ノックダウン(検出

10

20

30

40

50

不能)の両方、ならびに内因性アルファベータTCRの検出不能な細胞表面発現を包含する。

【0595】

アミノ酸配列と核酸配列の両方に関して本明細書において用いられる場合、「同一性%」、「配列同一性」、「類似性割合」、「配列類似性」などの用語は、整列されたアミノ酸残基またはヌクレオチド間の類似性を最大化し、同一または類似の残基またはヌクレオチドの数、全残基またはヌクレオチドの数、ならびに配列アライメント中のギャップの存在および長さの関数である配列のアライメントに基づく2つの配列の類似性の程度の尺度をいう。標準的なパラメータを用いて配列類似性を判定するための種々のアルゴリズムおよびコンピュータプログラムが利用可能である。本明細書において用いられる場合、配列類似性は、アミノ酸配列についてはBLASTpプログラムおよび核酸配列についてはBLASTnプログラムを用いて測定され、そのどちらも全米バイオテクノロジー情報センター(National Center for Biotechnology Information) (www.ncbi.nlm.nih.gov/)を通じて利用可能であり、例えば、Altschul et al. (1990), J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish and States (1993), Nature Genet. 3:266-272; Madden et al. (1996), Meth. Enzymol. 266: \ 3 \ -U \ ;Altschul et al. (1997), Nucleic Acids Res. 25:33 89-340 2; Zhang et al. (2000), J. Comput. Biol. 7(1-2):203-14に記載されている。

10

【0596】

本明細書において用いられる場合、2つのアミノ酸配列の類似性%は、BLASTpアルゴリズムについての以下のパラメータに基づくスコアである: ワードサイズ = 3; ギャップオープニングペナルティ = -1; ギャップ伸長ペナルティ = -1; およびスコアリングマトリックス = BLOSUM62。本明細書において用いられる場合、2つの核酸配列の類似性%は、BLASTnアルゴリズムについての以下のパラメータに基づくスコアである: ワードサイズ = 1; ギャップオープニングペナルティ = -5; ギャップ伸長ペナルティ = -2; 一致報酬 = 1; および不一致ペナルティ = -3。

20

【0597】

2つのタンパク質またはアミノ酸配列の改変について本明細書において用いられる場合、「～に対応する」という用語は、2つのタンパク質を標準的な配列アライメント(例えば、BLASTpプログラムを用いる)に供した場合に、第1のタンパク質における特定の改変が第2のタンパク質における改変におけるのと同じアミノ酸残基の置換であること、および第1のタンパク質における改変のアミノ酸位置が、第2のタンパク質における改変のアミノ酸位置に対応するまたはこれと一列に整列することを示すために用いられる。したがって、残基XとYが配列アライメントで互いに対応する場合、XとYが異なる数であるという事実にもかかわらず、第1のタンパク質における残基「X」のアミノ酸「A」への改変は、第2のタンパク質における残基「Y」のアミノ酸「A」への改変に対応する。

30

【0598】

本明細書において用いられる場合、「認識半部位」、「認識配列半部位」、または単に「半部位」という用語は、ホモ二量体またはヘテロ二量体TALENの単量体によって認識されるTRAC遺伝子の二本鎖DNA分子中の核酸配列を意味する。

【0599】

第1の「認識半部位」または「第1の認識部位」または「第1の認識ドメイン」は、TALENの第2の単量体((右側の単量体))と比較して5'側に位置する単量体 ((左側の単量体))によって認識される二本鎖DNA分子中の核酸配列を意味する。

40

【0600】

本明細書において用いられる場合、メガヌクレアーゼに対する「認識半部位」、「認識配列半部位」、または単に「半部位」という用語は、ホモ二量体もしくはヘテロ二量体メガヌクレアーゼの単量体によって、または一本鎖メガヌクレアーゼの1つのサブユニットによって認識される二本鎖DNA分子中の核酸配列を意味する。

【0601】

本明細書において用いられる場合、用語「超可変領域」は、比較的高い変動性を有するアミノ酸を含むメガヌクレアーゼ単量体またはサブユニット内の局在配列をいう。超可变

50

領域は、約50～60個の連続残基、約53～57個の連続残基、または好ましくは約56個の残基を含むことができる。

【0602】

超可変領域は、認識配列中のDNA塩基と接触する1つまたは複数の残基を含むことができ、単量体またはサブユニットの塩基選択性を変化させるように改変することができる。超可変領域はまた、メガヌクレアーゼが二本鎖DNA認識配列と会合すると、DNA骨格に結合する1つまたは複数の残基を含むことができる。そのような残基を、DNA骨格および標的認識配列に対するメガヌクレアーゼの結合親和性を変化させるように改変することができる。本発明の異なる態様において、超可変領域は、変動性を示す1～20個の残基を含んでもよく、塩基選択性および/またはDNA結合親和性に影響を与えるように改変することができる。特定の態様において、超可変領域は、変動性を示す約15～18個の残基を含み、塩基選択性および/またはDNA結合親和性に影響を与えるように改変することができる。

【0603】

2017年7月9日に更新されたTCRアルファ遺伝子Gene ID: 6955 (NCBI)。

本明細書において用いられる場合、用語「T細胞受容体アルファ遺伝子」は、Genome Data Viewer Map ViewerLocationにおけるTRA由来の染色体14: 14q11.2上のヒトTCRアルファ遺伝子をいう。

【0604】

T細胞受容体は、小さなペプチドとしてプロセッシングされ、抗原提示細胞(APC)の表面で主要組織適合遺伝子複合体(MHC)分子に結合された外来抗原を認識する。各T細胞受容体は、1本のアルファ鎖および1本のベータ鎖または1本のデルタ鎖および1本のガンマ鎖からなる二量体である。単一細胞では、T細胞受容体遺伝子座はデルタ、ガンマ、ベータ、およびアルファの順序で再編成され発現される。

【0605】

デルタとガンマの両方の再配列が機能的鎖を生じる場合、細胞はデルタおよびガンマを発現する。そうでなければ、細胞はベータおよびアルファ遺伝子座を再配列するように進行する。この領域は、T細胞受容体アルファおよびデルタ遺伝子座の生殖細胞系構成を果たす。アルファおよびデルタ遺伝子座はともに、V(可変)、J(連結)、およびC(定常)セグメントを含み、デルタ遺伝子座はまた、多様性(D)セグメントを含む。デルタ遺伝子座は、アルファ遺伝子座内、アルファVセグメントとJセグメントの間に位置する。T細胞発生の間、デルタ鎖はDセグメントをJセグメントと連結するDNAレベルでの組み換え事象によって合成される；次いでVセグメントはD-J遺伝子に連結される。

【0606】

アルファ鎖は、単一のVセグメントをJセグメントと連結させる組み換えによって合成される。両方の鎖について、Cセグメントは後にRNAレベルでスプライシングにより連結される。多くの異なるVセグメントといくつかのJセグメントとの組み換えは、広範囲の抗原認識を提供する。さらなる多様性は、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼによるヌクレオチドの無作為付加から生じる接合部多様性によって達成される。5つの可変セグメントは、アルファ鎖またはデルタ鎖のどちらでも使用でき、TRAV/DV記号によって記載される。アルファ遺伝子座のいくつかのVおよびJセグメントは、タンパク質をコードできないことが知られており、偽遺伝子と考えられる。

【0607】

(T細胞受容体アルファ遺伝子) TCRAまたはTRAC遺伝子の定常領域は、NCBI Gen ID番号28755によって同定される。本発明のTALENエンドヌクレアーゼによって標的とされるTCRアルファ遺伝子の領域は、T細胞受容体アルファタンパク質の細胞外部分または膜内部分をコードする配列に対応する。遺伝子改変(消失、変異または挿入)は最終的には、アルファベータTCRの細胞表面発現の変化をもたらす。

【0608】

特定の態様において、遺伝子改変はTCRのデルタガンマの細胞表面発現を変化させる。

【0609】

10

20

30

40

50

特定の態様において、ヌクレアーゼにより標的とされるTCRアルファ遺伝子の領域は、WO2017062451にある通りであり、またはWO2015057980にある通りであり、またはWO2017106528にある通りである。

【0610】

1つの態様において、T細胞受容体アルファ定常領域の遺伝子改変は、終止コドン前の、およびWO2017106528に定義される通りの、ヒトT細胞受容体アルファ定常領域の、c1、c2またはc3領域、好ましくはc1に対応する領域に位置し、好ましくは、T細胞受容体アルファ定常領域の遺伝子改変は、ヒトT細胞受容体アルファ定常領域のc1領域に対応する領域に位置する。

【0611】

1つの態様において、T細胞受容体アルファ定常領域の遺伝子改変は、
TTGTCCCCACAGATATCCagaaccctgaccctgCCGTGTACCAGCTGAGAGA

10

に対応する領域に位置する。

【0612】

「T細胞受容体アルファ定常領域遺伝子」、「TRAC遺伝子」は、ヒト遺伝子の定常領域をいい、特にNCBI Gen ID番号28755によって同定される配列をいう。これは野生型(wt)TRAC遺伝子ともいわれ、その配列は個体ごとにわずかに異なりうる(わずかに異なるとはタンパク質配列に影響を与えることのない0.001%の配列変化(サイレント置換欠失または挿入)を意味する)。

20

【0613】

ゲノムのとは、ゲノム(細胞の染色体DNA)に属し、本発明において実施される導入遺伝子または外因性ポリヌクレオチドとして実験の一部としてゲノムに組み込まれなかったことを意味する。言い換えれば、本発明のTRAC遺伝子は導入遺伝子、または外因性ポリヌクレオチドではない。

【0614】

細胞

1つの局面において、本明細書において記載されるのは、TCR遺伝子の発現が調節される、細胞(例えば、リンパ系細胞、幹細胞(例えば、iPSC、胚性幹細胞、MSCもしくはHSC)または前駆細胞を含むヒト細胞のような真核細胞)である。

30

【0615】

1つの局面において、本明細書において記載されるのは、アルファベータTCR遺伝子の細胞表面発現がTRAC遺伝子のエクソンc1、c2および/またはc3の改変(変異、欠失または挿入、好ましくは挿入)によって阻害される、ヒト細胞(例えば、リンパ系細胞、幹細胞(例えば、iPSC、胚性幹細胞、MSCもしくはHSC)または前駆細胞を含むヒト細胞のような真核細胞)である。

【0616】

1つの局面において、本明細書において記載されるのは、機能的アルファベータTCRの細胞表面発現が損なわれうるように、内因性アルファベータTCR遺伝子の発現が、TCRの細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインをコードするTCR遺伝子配列への外因性配列の(or)挿入によって調節される、細胞(例えば、リンパ系細胞、幹細胞(例えば、iPSC、胚性幹細胞、MSCもしくはHSC)または前駆細胞を含むヒト細胞のような真核細胞)である。

40

【0617】

タグ

タグは、マーカーまたは標識として用いられ、オンサイトに(場合によりオフサイトに)組み込まれかつ検出されうる、非コード配列またはコード配列を含む配列であるように意図される。

【0618】

操作

本発明のTRAC欠損ヒト細胞は、さらなるゲノム改変、例えば不活性化T細胞受容体ベ

50

タ遺伝子、ならびに不活性化PD1、CD52および/またはCTLA4遺伝子を含みうる。

【0619】

本発明のTRAC欠損ヒト細胞は、さらなるゲノム改変、例えばキメラ抗原受容体(CAR)をコードする遺伝子、T細胞受容体(TCR)をコードする遺伝子および/または抗体をコードする遺伝子、IL-2、IL-7、IL-3、IL-12、IL-15、IL-17、IL-27から選択されるサイトカイン、薬物に対する耐性を付与するタンパク質、薬物に対する感受性を付与するタンパク質、それらの組み合わせをコードする導入遺伝子のような挿入された導入遺伝子または挿入された外因性ポリヌクレオチド配列を含みうる。

【0620】

好ましい態様において、導入遺伝子またはポリヌクレオチドはTRAC遺伝子に挿入される。

10

【0621】

薬学的組成物

本明細書において記載の薬学的に許容される媒体(または担体)および任意の細胞または細胞集団を含む薬学的組成物、ならびに対象における障害(例えば、がん)の処置のためのエクスピボ治療において細胞および薬学的組成物を使用する方法も提供される。

【0622】

本発明において、TCR遺伝子の発現が不活性化されている細胞が本明細書において記載される。好ましい態様において、TCR遺伝子のエクソンc1、c2および/またはc3が不活性化されている。他の態様において、内因性TCRプロモーターの活性は不活性化されておらず、活性化されうる。内因性TCRプロモーターの活性化は、TCR遺伝子に結合してTCR発現を活性化する外因性分子(例えば、DNA結合ドメインおよび転写活性化ドメインを含む操作された転写因子)によるものであってよい。

20

【0623】

いくつかの態様において、TRAC遺伝子のノックアウト、TRAC遺伝子のノックイン、TRAC遺伝子のノックアウトを伴わないTRAC遺伝子のノックイン、好ましくはTRAC遺伝子のノックアウトを伴うTRAC遺伝子のノックイン、より好ましくはTRAC遺伝子のノックアウトおよび病的細胞上で発現される抗原に特異的なCARの発現を伴うTRAC遺伝子のノックインを引き起こすように一過性発現された操作ヌクレアーゼを含む細胞が記載される。

30

【0624】

さらに、記載される本発明のヒトTRAC欠損ヒト細胞は、内因性TCR遺伝子の発現が低減され、細胞表面でのTCRアルファベータ発現が検出不能である細胞である。

【0625】

さらに、記載される本発明のヒトTRAC改変ヒト細胞は、既知および選択のアルファベータTCR遺伝子であってよい既知および選択のTCR遺伝子の発現が維持され、かつ細胞表面での既知のTCRアルファベータ発現が検出可能である細胞である。

【0626】

TCR遺伝子の発現が(非操作細胞と比較して)低減され、細胞表面でのTCRアルファベータ発現が(陽性対照と比較して)検出不能であり、かつ少なくとも1つの外因性導入遺伝子および/または少なくとも1つの内因性遺伝子(例えば、ベータ2ミクログロブリン(B2M)ならびに/またはPD1および/もしくはCTLA4のような免疫学的チェックポイント遺伝子のさらなるノックアウトあるいはそれらの組み合わせを含むようにさらに操作されている、細胞も本明細書で提供される。

40

【0627】

外因性導入遺伝子は、(例えば、TCR遺伝子がノックアウトされる場合)TCR遺伝子に組み込まれてもよく、および/またはセーフハーバー遺伝子のような非TCR遺伝子に組み込まれてもよい。場合によっては、外因性導入遺伝子はACTRおよび/またはCARをコードする。導入遺伝子構築体は、HDR駆動プロセスまたはNITEJ駆動プロセスのいずれかによって挿入されうる。

【0628】

50

いくつかの局面において、検出不能なTCR発現を有する細胞は、外因性TCRまたは外因性CARを含む。本発明の細胞はさらに、1つまたは複数のチェックポイント阻害因子遺伝子のノックアウトを含む。いくつかの態様において、チェックポイント阻害剤はPD1である。他の態様において、チェックポイント阻害剤は、CTLA4またはCTLA4、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、LAG 3、HAVCR2、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、TGFBRII、TGFRBRI、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2およびGUCY1B3からなるリストから選択されるWO2014191128に開示された免疫チェックポイントのいずれかである。

【0629】

いくつかの局面において、検出不能なTCR発現を有する細胞は、外因性TCRまたは外因性CARならびにPD1およびTCRアルファ、PD1およびTCRベータ、CTLA-4およびTCRアルファ、CTLA-4およびTCRベータ、LAG 3およびTCRアルファ、LAG 3およびTCRベータ、Tim3およびTCRアルファ、Tim3およびTCRベータ、BTLAおよびTCRアルファ、BTLAおよびTCRベータ、BY55およびTCRアルファ、BY55およびTCRベータ、TIGITおよびTCRアルファ、TIGITおよびTCRベータ、B7H5およびTCRアルファ、B7H5およびTCRベータ、LAIR1およびTCRアルファ、LAIR1およびTCRベータ、SIGLEC10およびTCRアルファ、SIGLEC10およびTCRベータ、2B4およびTCRアルファ、2B4およびTCRベータからなる群より選択される少なくとも2つの不活性化遺伝子を含む。

【0630】

さらなる局面において、本発明のTCRアルファKO細胞はPD1ノックアウトおよびCTLA4ノックアウトを含む。いくつかの態様において、不活性化される別のTCR遺伝子は、TCR(TCRB)をコードする遺伝子である。いくつかの態様において、これは、この遺伝子の定常領域(TCR定常領域、またはTRBC)の標的化切断を介して達成される。全ての態様において、TCRアルファ(TCRA)をコードするTCR遺伝子は改変され、TCRアルファベータの細胞表面に影響を与えるかまたは影響を与えない挿入、変異および/または欠失を含む。さらなる態様において、挿入はTCR遺伝子C1定常領域の標的化切断を介して達成される。いくつかの態様において、TCR遺伝子改変細胞は、B2M遺伝子、HLA-A、-B、-C遺伝子、もしくはTAP遺伝子、またはそれらの任意の組み合わせの位置でさらに改変される。他の態様において、HLAクラスIIの調節因子CTLAも改変される。

【0631】

さらなる局面において、本発明のTCRアルファKO細胞は、サイトカインコード配列、好ましくはIL-2、IL-7、-12、15、-17、-27、-27の挿入を有するCD25 KOを含む。

【0632】

好ましい態様において、TRAC遺伝子改変ヒト細胞は、B2M遺伝子および/またはTAP遺伝子の位置で、ならびにHLAクラスIIの調節因子CTLAの位置でさらに改変される。

【0633】

より好ましい態様において、TRAC遺伝子KOヒト細胞は、B2M遺伝子および/またはTAP遺伝子の位置で、ならびにHLAクラスIIの調節因子CTLAの位置でさらにKOされる。

【0634】

ある種の態様において、本明細書において記載される細胞は、TRAC遺伝子に対する改変(例えば、欠失および/または挿入)(例えば、TALENを用いたエクソンc1の改変)を含む。

【0635】

ある種の態様において、改変は、TCRA遺伝子発現が調節される、例えば、抑制かまたは活性化されるように、本明細書において記載されるような操作された転写因子の結合を含む。他の態様において、改変は、切断の部位および/もしくは結合部位の1個もしくは複数個の塩基対の上流の、下流のおよび/もしくはそれを含む1~300塩基対(またはその間の任意の数の塩基対)内の配列に対する改変; 結合部位および/もしくは切断部位を含むお

10

20

30

40

50

および/もしくはその両側の1～100塩基対(またはその間の任意の数の塩基対)内の改変; 結合部位および/もしくは切断部位を含むおよび/もしくはその両側(例えば、1～5、1～10、1～20もしくはそれ以上の塩基対)の1～50塩基対(またはその間の任意の数の塩基対)内の改変; ならびに/またはヌクレアーゼ結合部位および/もしくは切断部位内の1個もしくは複数個の塩基対に対する改変を含むが、これらに限定されない、ヌクレアーゼ結合(標的)部位および/または切断部位の位置または近傍の遺伝子改変(天然ヌクレオチド配列の変化)である。

【0636】

好ましい態様において、WO 2017106528または米国特許出願公開第20150132269号に記載されているようなジンクフィンガー媒介TRACデザインを含む細胞を検出するための手段。 10

【0637】

化膿連鎖球菌CRISPR Cas9システムのためのガイドRNAも、米国特許出願公開第201500566705号にあるようにまたはWO2017106528の表2にあるようにTCRA遺伝子を標的とするように構築された。

【0638】

本発明の改変細胞は、リンパ系細胞(例えば、ヒトT細胞)、ヒト幹/前駆細胞(例えば、人工ヒト多能性幹細胞(iPSC)、ヒト胚性幹細胞(例えば、ヒトES)、ヒト間葉系幹細胞(MSC)、またはヒト造血幹細胞(HSC)のようなヒト細胞である。ヒト幹細胞は、全能性または多能性であってよい(例えば、多能性骨髄系またはリンパ系幹細胞であるHSCのような部分的に分化されうる)。他の態様において、本発明は、TCR発現についてヌル遺伝子型を有するヒト細胞を産生するための方法を提供する。本明細書において記載される(TCRA遺伝子座の位置で改変された)任意の改変ヒト幹細胞を次に分化させて、改変TCRA遺伝子発現を有する本明細書において記載の幹細胞に由来する分化された(インビポまたはインビトロ)細胞を生成することができる。 20

【0639】

別の局面において、本明細書において記載される細胞、細胞の集団または薬学的組成物、該細胞のまたは該薬学的組成物の検出の手段は、例えば、障害の処置または予防または改善において用いることができる。本方法は、典型的には、(a) TCR遺伝子が不活性化または下方調節され、TCRアルファベータの細胞表面発現が検出不能であり、かつ細胞が分子を発現してその特異性を変えるようにTALENを用い単離されたヒト細胞(例えば、前駆体、脱分化または分化T細胞またはリンパ球)において内因性TCR遺伝子を切断または下方制御する段階、および(b) 細胞を対象に導入し、それによって障害を処置または予防する段階を含む。 30

【0640】

いくつかの態様において、TCR (TCRB)をコードする遺伝子は、B2M遺伝子、およびHLAクラスII遺伝子の調節因子CIITAと同様に、不活性化または下方制御される。

【0641】

本方法は、典型的には、(a) TCRアルファベータの細胞表面発現が検出不能であり、かつ細胞が分子(インフレームの挿入)を発現してその特異性、好ましくはCARを変えるようにTCR遺伝子が改変される、例えば不活性化される(TCRアルファタンパク質の発現を停止させる挿入)ようなヌクレアーゼ(TALEN)を用い単離された細胞(例えば、前駆体、脱分化または分化T細胞またはリンパ球)において内因性TCR遺伝子を切断または下方制御する段階ならびに(b) TCR遺伝子発現を改変するために用いられるCRISPR/Casまたは操作された転写因子(例えば、ZFN-TF、TALE-TF、Cpf1-TFまたはCas9-TF)を用い他のヌクレアーゼ改変細胞と比較してヌクレアーゼTALEN改変細胞を検出および同定する段階、(c) シグナチャとしておよび操作された細胞の品質対照としてオフサイト(の欠如)を同定する段階を含む。 40

【0642】

いくつかの態様において、不活性化はベータ遺伝子の定常領域(TCR 定常領域またはT

10

20

30

40

50

RBC)の標的化切断を介して達成される。好ましい態様において、TCRアルファ(TCRA)をコードする遺伝子は、細胞表面でTCRアルファベータの発現を不活性化する挿入を含むように改変される。

【0643】

さらに好ましい態様において、障害はがんまたは感染性疾患である。さらに好ましい態様において、不活性化はこの遺伝子の定常領域(TCR定常領域、またはTRACと略される)の標的化切断を介して達成される。いくつかの態様において、さらなる遺伝子が調節(ノックアウト)され、例えば、B2M、PD1および/もしくはCTLA4ならびに/または1つもしくは複数の治療用導入遺伝子が細胞中に存在する(ベクターを用いたヌクレアーゼ媒介組み込みのような標的化組み込みを介して組み込まれる)。

10

【0644】

転写因子および/またはヌクレアーゼは、mRNAとして、タンパク質の形態および/またはヌクレアーゼをコードするDNA配列として細胞または周囲の培地に導入することができる。ある種の態様において、対象に導入された単離細胞は、さらなるゲノム改変、例えば、組み込まれた外因性配列(切断されたTCR遺伝子もしくは異なる遺伝子、例えばセーフハーバー遺伝子もしくは遺伝子座へ)および/またはさらなる遺伝子、例えば1つもしくは複数のHLA遺伝子の不活性化(例えば 例えば、ヌクレアーゼによって媒介される)をさらに含む。外因性配列またはタンパク質は、ベクター(例えばAd、AAV、LV)を介して、またはエレクトロポレーションのような技法を用いることによって導入されうる。いくつかの態様において、タンパク質は細胞圧搾により細胞に導入される(Kollmannsperger et al (2016) Nat Comm 7, 10372 doi: 10.1038/ncomms10372を参照のこと)。

20

【0645】

好ましくは、ヌクレアーゼ、好ましくはヌクレアーゼをコードするmRNA、さらにより好ましくはTALENをコードするmRNAは、US20130315884に記載されているようにエレクトロポレーションによってヒト初代細胞に導入される。

【0646】

細胞療法

いくつかの局面において、本発明の操作されたヒト細胞は、治療のため、例えば養子細胞移入、免疫療法のために使用され得る。他の態様において、T細胞移植に使用するための細胞は、関心対象の別の遺伝子改変を含む。1つの局面において、T細胞は、がんマーカーに特異的な挿入されたキメラ抗原受容体(CAR)を含む。さらなる局面において、挿入されたCARは、悪性B細胞を含む、B細胞に特徴的なCD22マーカーに特異的である。

30

【0647】

1つの局面において、T細胞は、がんマーカーに特異的な挿入されたキメラ抗原受容体(CAR)を含む。さらなる局面において、挿入されたCARは、悪性B細胞を含む、B細胞に特徴的なCD38マーカーに特異的であり、不活性化されたゲノムCD38遺伝子を含む。

【0648】

1つの局面において、T細胞は、がんマーカーに特異的な挿入されたキメラ抗原受容体(CAR)を含む。さらなる局面において、挿入されたCARは、悪性免疫細胞、AML、BPDCNを含む、免疫細胞に特徴的なCD123マーカーに特異的である。

40

【0649】

1つの局面において、T細胞は、がん性B細胞マーカーに特異的な挿入されたキメラ抗原受容体(CAR)を含む。さらなる局面において、挿入されたCARは、悪性免疫B細胞を含む、免疫細胞に特徴的なCD22マーカーに特異的である。

【0650】

そのような細胞は、適合するまたは部分適合するHLAを有する患者を処置するために複数回投与(反復投与)される治療用組成物において有用であり、非適合HLAの場合は、継続して投与される量が同じではなく、したがってそれを必要とするあらゆる患者のための既製の治療剤として使用することができるであろう。

【0651】

50

別の局面において、TCRが調整（改変）されたT細胞は、挿入された抗体結合T細胞受容体（ACTR）ドナー配列を含む。いくつかの態様において、ACTRドナー配列は、ヌクレアーゼ誘導切断後にTCR遺伝子の発現を妨げるようTCR遺伝子内に挿入される。他の態様において、ドナー配列は、「避難港（safe harbor）」となる遺伝子座、例えばAAVS 1、HPRT、アルブミンおよびCCR5遺伝子内に挿入される。いくつかの態様において、ACTR配列は、標的とされた組み込みを通じて挿入され、その場合、ACTRドナー配列は、操作されたヌクレアーゼの切断部位に隣接する配列に対して相同性を有する隣接相同アームを含む。いくつかの態様において、ACTRドナー配列はさらに、プロモーターおよび／または他の転写調節配列を含む、他の態様において、ACTRドナー配列は、プロモーターを含まない。いくつかの態様において、ACTRドナーは、TCR コード遺伝子（TCRB）内に挿入される。いくつかの態様において、挿入は、この遺伝子の定常領域（TCR 定常領域またはTRBC）の標的とされた切断を通じて達成される。好ましい態様において、ACTRドナーは、TCRaコード遺伝子（TCRA）内に挿入される。さらなる好ましい態様において、挿入は、この遺伝子の定常領域（TCRa定常領域、略してTRAC）の標的とされた切断を通じて達成される。いくつかの態様において、このドナーはTCRA内のエクソン配列内に挿入され、他の態様において、このドナーはTCRA内のイントロン配列内に挿入される。いくつかの態様において、TCRが調整された細胞はさらに、CARを含む。なおさらなる態様において、TCRが調整された細胞は、HLA遺伝子またはチェックポイント阻害遺伝子においてさらに調整される。

【 0 6 5 2 】

本明細書に記載される改変された細胞（例えば、不活性化されたTCR遺伝子を含むT細胞もしくは幹細胞）を含む薬学的組成物またはTCR遺伝子結合分子（例えば、操作された転写因子および／もしくはヌクレアーゼ）の1つもしくは複数ならびに本明細書に記載される薬学的に許容される媒体または賦形剤を含む薬学的組成物も提供される。特定の態様において、薬学的組成物はさらに、1つまたは複数の薬学的に許容される賦形剤を含む。改変された細胞、TCR遺伝子結合分子（もしくはこれらの分子をコードするポリヌクレオチド）および／またはこれらの細胞もしくは分子を含む薬学的組成物は、当技術分野で公知の方法を通じて、例えば静脈内注入、特定の血管、例えば肝動脈への注入を通じて、または直接組織注射（例えば、筋肉）を通じて、対象に導入される。いくつかの態様において、対象は、この組成物を用いて処置または改善することができる疾患または状態を有する成人である。他の態様において、対象は、小児対象であり、組成物は、疾患または状態（例えば、がん、移植片対宿主病等）を予防、処置または改善するために投与される。

【 0 6 5 3 】

「組み換えDNA構築物」、「組み換え構築物」、「発現カセット」、「発現構築物」、「キメラ構築物」、「構築物」および「組み換えDNAフラグメント」という用語は、本明細書で言い換え可能に使用され、一本鎖または二本鎖ポリヌクレオチドである。組み換え構築物は、非限定的に、自然界では一緒に見出されない調節およびコード配列を含む、一本鎖または二本鎖ポリヌクレオチドの人為的組み合わせを含む。例えば、組み換えDNA構築物は、異なる供給源由来の調節配列およびコード配列、または同じ供給源由来であるが自然界で見出されるのとは異なる様式で配置された調節配列およびコード配列を含み得る。そのような構築物は、それ自体で使用され得、またはベクターと組み合わせて使用され得る。

【 0 6 5 4 】

本明細書で使用される場合、「ベクター」または「組み換えDNAベクター」は、特定の宿主細胞においてポリペプチドをコードする配列の転写および翻訳を実現する複製システムおよび配列を含む構築物であり得る。当業者に周知のように、ベクターが使用される場合、ベクターの選択は、宿主細胞を形質転換するのに使用される方法に依存する。ベクターは、非限定的に、プラスミドベクターおよび組み換えAAVベクター、または本発明のメガヌクレアーゼをコードする遺伝子を標的細胞に送達するのに適した当技術分野で公知の任意の他のベクターを含み得る。当業者は、本発明の単離されたヌクレオチドまたは核酸

10

20

30

40

50

配列のいずれかを含む宿主細胞を首尾よく形質転換し、選択し、増殖させるためにベクター上に存在しなければならない遺伝子要素を熟知している。

【0655】

本明細書で使用される場合、「ベクター」はまた、ウイルスベクターを表し得る。ウイルスベクターは、非限定的に、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およびアデノ随伴ウイルスベクター（AAV）を含み得る。

【0656】

本明細書で使用される場合、「ベクター」はまた、AAV6カプシドタンパク質およびガイドを行うAAV2配列を有するアデノ随伴ウイルスベクターを表し得る。

【0657】

本明細書で使用される場合、「多シストロン性」mRNAは、2つまたはそれ以上のコード配列（すなわち、シストロン）を含み、2つ以上のタンパク質をコードする単一のメッセンジャーRNAを表す。多シストロン性mRNAは、IRESエレメント、T2Aエレメント、P2Aエレメント、E2AエレメントおよびF2Aエレメントを含むがこれらに限定されない、同一のmRNA分子からの2つまたはそれ以上の遺伝子の翻訳を実現する当技術分野で公知の任意の要素を含み得る。

【0658】

本明細書で使用される場合、「ヒトT細胞」または「T細胞」は、ヒトドナーから単離されるT細胞を表す。ヒトT細胞およびそれら由来の細胞は、培養下で継代されていない単離されたT細胞、不死化を行わず細胞培養条件下で継代および維持されるT細胞、および不死化され細胞培養条件下で無限に維持することができるT細胞を含む。

【0659】

本明細書で使用される場合、「対照」または「対照細胞」は、遺伝的に改変された細胞の遺伝子型または表現型の変化を測定する上での参照点を提供する細胞を表す。対照細胞は、例えば、(a)野生型細胞、すなわち、遺伝的に改変された細胞を生成する遺伝的変更のための出発細胞と同じ遺伝子型の野生型細胞、(b)遺伝的に改変された細胞と同じ遺伝子型であるが、ヌル構築物で（すなわち、関心対象の特性に対して既知の効果を有しない構築物で）形質転換された細胞、または(c)遺伝的に改変された細胞と遺伝的に同一であるが、変更された遺伝子型もしくは表現型の発現を誘導する条件もしくは刺激もしくはさらなる遺伝的改変に供されていない細胞、を含み得る。

【0660】

アルファベータTCRを発現するT細胞。サイレント変異を含み得る、（例えば、上記のNCBI参考文献に記載される）ネイティブTCR遺伝子を有するT細胞。

【0661】

治療適用

2.1 本発明の原理

本発明は、一部、異なる操作されたヌクレアーゼが、ヒトTCRアルファ遺伝子内で見出される認識配列、および使用されるヌクレアーゼに依存して、オフサイト配列を認識および切断するという発見に基づいている。（オフサイトおよびオンサイトの）切断される配列は、使用されるヌクレアーゼに特異的であり、安定な医薬品としての最終生成物の信頼性を増減させるオフターゲット部位の頻度および数に関連する。医薬品は宿主内で安定的でなければならず、かつ一定圧力を付与する免疫系に抗さなければならないという事実から、これが提供されることが特に重要である。

【0662】

さらに、本発明にしたがい、外因性ポリヌクレオチド配列が、TCRアルファ定常領域遺伝子内のヌクレアーゼ切断部位に特異的に挿入され得、さらなる編集された遺伝子、例えばCD52またはdCK KO遺伝子を有する細胞の中からさえも、操作された細胞を検出するためのタグとして使用され得る。挿入は、例えば、関心対象の配列が細胞内で同時に発現されるよう、相同組み換えによって行われる。そのような外因性配列は、非コード配列であり得、および/または、例えばキメラ抗原受容体、外因性TCR受容体もしくは関心対象の

10

20

30

40

50

任意の他のポリペプチドをコードし得る。最終的に、TRAC遺伝子の改変は、wt TRAC非操作配列と比較して特異的な配列を生じる。

【 0 6 3 】

本発明者らは、以下の配列を含む、副作用（GVHD、・・・）を有さないまたは軽減された、安定な表現型および遺伝子型を示す（すなわち、非検出可能レベルのオフサイトを有する）、免疫療法のために操作されたヒト細胞を提供した：

AAGTAGCCCTGCATTCAGGTTCCCTGAGTGGCAGGCCAGGCCGTGGCGTGAACGTTACTGAAATCATGGCC

TCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTCTAAGATGCTAT

10

TTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTGTCCATCACTGGCATCTGGAC

TCCAGCCTGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCCGTACCTGTCCTTGTCCCACAGATATCCAG

TCCGGTGAGGGCAGAGGAAGTCTTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCGGGCCCCGGATCCコード

配列 TCTAGAGGGCCCGTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTT

GCCCCCTCCCCGTGCCTTCCCTGACCCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCCTTCTAACAAAATGAGGAAATTGCA

TCGCATTGCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGG

20

AAGACAATAGCAGGCATGCTGGGATGCGGTGGCTATGACTAGTGGCGAATTCCGTGTACAGCTGAGAG

ACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGCTGCCTATTCAACGATTGATTCTAACAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGA

TTCTGATGTGTATATCACAGACAAAATGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTGCTGTGGC

CTGGAGCAACAAATCTGACTTGCATGTGCAAACGCCCTAACAAACAGCATTATTCCAGAACAGACACCTTCTCCCC

AGCCCAGGTAAAGGCAGCTTGGTGCCTCGCAGGCTGTTCTGCTTCAGGAA

30

好ましくは、ゲノムTRAC内の挿入物は、以下の配列を含む：

AAGTAGCCCTGCATTCAGGTTCCCTGAGTGGCAGGCCAGGCCGTGGCGTGAACGTTACTGAAATCATGGCC

TCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTCTAAGATGCTAT

TTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTGTCCATCACTGGCATCTGGAC

TCCAGCCTGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCCGTACCTGTCCTTGTCCCACAGATATCCAG

TCCGGTGAGGGCAGAGGAAGTCTTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCGGGCCCCGGATCCGCTCTGC

40

CCGTCACCGCTCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGTCACGCAGCAAGACCAGGAGGGGGAGGCAGCTGCC

CTACAGCAACCCAGCCTGTGCAGCGGAGGCAGCGGGAGGGGGTAGCCAGGTGCAGCTGCAGC

AGAGCGGCCCTGGCCTGGTAAAGCCAAGCCAGACACTGTCCCTGACCTGCGCCATCAGCGCGATTCCGTGAG

CTCCAACCTCGCCGCCTGGAATTGGATCAGGCAGTCCCCTCTCGGGGCCTGGAGTGGCTGGGAAGGACATACT

ATCGGTCTAAGTGGTACAACGATTATGCCGTGTGAAGAGCAGAATCACAATCAACCCGTACACCTCCAAGA

50

ATCAGTTCTCTGCAGCTGAATAGCGTACACCAGAGGACACCGCCGTACTATTGCCAGGGAGGTGACC
 GGCGACCTGGAGGATGCCTTGACATCTGGGCCAGGGACAATGGTGACCGTCTAGCGGAGGAGGAGGAT
 CCGGAGGAGGAGGATCTGGCGCGCGCAGCGATATCCAGATGACACAGTCCCCATCCTCTGAGCGCCTCC
 GTGGCGACAGAGTGACAATCACCTGTAGGGCTCCAGACCATCTGGTCTTACCTGAACGGTATCAGCAGAG
 GCCCGCAAGGCCCTAATCTGCTGATCTACGCAAGCTCCCTGCAGAGCGGAGTGCCATCCAGATTCTGG
 CAGGGGCTCCGGCACAGACTCACCTGACCATCTAGCCTGCAGGCCAGGACTTCGCCACCTACTATTGCCA
 GCAGTCTTATGCATCCCCAGACATTGGCCAGGGACCAAGCTGGAGATCAAGGGAAGCGGGAGGGGAGG 10
 CAGCTGCCCTACAGCAACCCAGCCTGTGCAGCGAGGCCGGCAGCGAGCTGCCACCCAGGGCACCTC
 TCCAACGTGTCCACCAACGTGAGGCCAGCCAAGCCCACCCACCGCCTGCTCTTATTCCAATCCTCCGTG
 CTCCCCACACACCCAGCACCAAGGCCACCTACACCTGCACCAACCATGCCCTCAGCCCCTGAGCCTGAGAC
 CTGAGGCATGTAGGCCAGCAGCAGGAGGAGCAGTCATACAAGGGGTCTGGATTTGCATGCGACATCTACATC
 TGGGCACCTCTGGCAGGAACATGTGGCGTCTGCTCAGCCTGGTCATCACCTGTACTGCAAGAGAGGCAG 20
 GAAGAAGCTGCTGTATCTCAAGCAGCCCTCATGCGCCCGTGCAGACAACCCAGGAGGAGGATGGCTGCT
 CCTGTTAGGTTCCAGAAGAGGGAGGGAGGATGTGAGCTGCGGTGAAGTTTCCGGCTGCCGACGCACC
 TGCAACCGAGGCCAGAACCGAGCTGTATAACGAGCTGAATCTGGCCGGAGAGAGGGTACGATGTGCTG
 GACAAGAGGCCGGCAGAGATCCAGAGATGGCGGAAGCCGGAGAAAGAACCTCAGGAGGGCTGTA
 CAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCGAGGCCTATTCTGAGATGGCATGAAGGGAGAGAGGCCGGGG
 CAAGGGACACGACGGACTGTACCGGGACTGAGCACAGCCACCAAGGATACCTATGACGCCCTGCATATGCAGG
 CACTGCCTCAAGGTGATCTAGAGGCCGTTAACCCGCTGATCAGCTCGACTGTGCCCTCTAGTGCAGC 30
 CATCTGTTTTGCCCTCCCCGTGCCTTGCACCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCTTCTAATAAAAT
 GAGGAAATTGCATGCATTGCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGTGGGCAGGACAGCAAGG
 GGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGATGCGGTGGCTATGACTAGTGGGAATTCCGTG
 TACCAAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGCTGCCTATTCAACGATTGATCTCAAACAAATGTGT
 CACAAAGTAAGGATTCTGATGTATATCACAGACAAACTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTCAAGAGCA
 ACAGTGCTGGCCTGGAGCAACAAATGACTTGCATGTGCAAACGCCTCAACAAACAGCATTATTCCAGAAG
 ACACCTCTCCCCAGCCAGGTAAAGGGAGCTTGGTGCCTCGCAGGCTGTTCTGCTTCAGGAA, (SEQ
 ID N°9) 40

または

AAGTAGCCCTGCATTCAGGTTCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCGTGAACGTTACTGAAATCATGGCC

TCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTCTAAGATGCTAT

TTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTGTCCATCACTGGCATCTGGAC

TCCAGCCTGGGTTGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCTAACCTGATCCTTGCCCACAGATATCCAG

TCCGGTGAGGGCAGAGGAAGTCTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCGGGCCCCGGATCCGCTCTGC

CCGTCACCGCTCTGCTGCCACTGCCCTGCTGCACGCCGCCAGACCCGGCGGAGGAGGCTTGGCCCC

TACAGCAACCCAGCCTGTGCTGGCGGGCGGAGCAGGGCCAGACTGTCCCTGACCTGCCATCTGGCGACAGCGTGAGCTC

AGCGGCCCTGGCTGGAGCCAAGCCAGACACTGTCCCTGACCTGCCATCTGGCGACAGCGTGAGCTC

CAACAGCGCCGCATGGAATTGGATCAGGCAGTCCCCATCTGGGGCCTGGAGTGGCTGGCAGAACATACTATA

GGTCCACCTGGTACAACGACTATGCCGGCTCGTGAAGTCTGCATCACAAATCAACCCGATACCAGCAAGAACAT

AGTTCTCCCTGCAGCTGACATCTGTGACCCCTGAGGACACAGCCGTGTACTATTGCACCAAGCAGGCACAATA

CATTTCGGGAATGGACGTGTGGGACAGGGCACACTGGTGACCGTGAGCGGAGGAGGAGGATCCGGCGGA

GGAGGCTCTGGCGGCGGCAGCGACATCCAGCTGACCCAGTCCCCTCTAGCCTGAGCGCCTCCGTGGCG

ATAGAGTACAATCACCTGTAGGGCCTCTCAGAGCATCTCTTACCTGAACGGTACAGCAGAACGCCCAGCA

AGGCCCTAACGCTGCTGATCTACGCAGCAAGCTCCCTGCAGTCTGGAGTGCAAGCAGATTCTCCGGCTTGGC

AGCGGCACCGACTTACACTGACCATCTAGCCTGCAGCCTGAGGATTGCCACATACTATTGCCAGCAGTCCT

ATTCTACACCAACTGACCTTGGCGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGGGAAAGCGGCGGCGGAGTTGTCC

ATATTCAAACCAAGTCTGTGAGCGGAGGAGGAAGCGAACTGCCTACTCAGGGAACCTTCAGCAACGTG

TCCACCAATGTGAGCCAGCAAAGCTTACACAACCGCATGCCACTCTAACCCAGCCTGTGACAACCACA

CCAGCACCCAGGCCCTACCCCTGCACCAACAATGCCCTCCAGCCTGTCTGCCAGAGGCCTGCAGA

CCCGCCGCCGGCGAGCAGTGCACACACGGGCTGGACTTGCTGTGATATCTATCTGGCACCAGTGGC

CGGAACATGTGGCGTGTGCTGTGACTGGCATTACACTGTACTGTAAGCGAGGCCGAAGAAACTGCTGTA

TATTTCAAACAGCCCTTATGAGACCTGTGAGACTACCCAGGGAGGAAGACGGCTGCAGCTGTAGGTTCCCCG

AGGAAGAGGAAGGCAGGTGTGAGCTGAGGGCAAGTTAGCCGCTCGCAGATGCCCTGCTTACAGCAGG

GGCAGAACATCAGCTGTATAACGAGCTGAATCTGGGACGGAGAGAGGAATACGACGTGCTGGATAAAAGGCGCGG

10

20

30

40

50

GAGAGACCCGAAATGGGAGGCAGGCCACGACGGAAAAACCCCAGGAGGGCTGTACAATGAAC TGAGAA
 GGACAAAATGGCAGAGGCCTATAGTGAATCGGGATGAAGGGAGAGAGAAGGC GCGCAAAGGGCACGATG
 GCCTGTACCAGGGGCTGTCTACTGCCACCAAGGACACCTATGATGCTCTGCATATGCAGGC ACTGCCTCAAGGT
 GATCTAGAGGGCCCCTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCC
 CTCCCCCGTGCCTCCTTGACCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCCTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCG
 10 CATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGGATTGGGAA
 GACAATAGCAGGCATGCTGGGATGCGGTGGCTATGACTAGTGGCGAATTCCCGTGTACCAGCTGAGAGAC
 TCTAAATCCAGTGACAAGTCTGCTGCCTATTACCGATTTGATTCTAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATT
 TGATGTGTATATCACAGACAAAATGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGCC
 GAGCAACAAATCTGACTTGATGTGCAAACGCCCTAACAAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTCCCCAG
 CCCAGGTAAGGGCAGCTTGGTGCCTCGCAGGCTGTTCTGCTCAGGAA (SEQ ID N°10) 20

または

AAGTAGGCCCTGCATTCAGGTTCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGCCGTGAACTGTTACTGAAATCATGGCC
 TCTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTCTAAGATGCTAT
 TTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTGTCCATCACTGGCATCTGGAC
 TCCAGCCTGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCTGATCCTTGTCCCACAGATATCCAG
 TCCGGTGAGGGCAGAGGAAGTCTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCGGGCCCCGGATCCGCTCTGC
 30 CCGTCACCGCTCTGCTGCCACTGCCCTGCTGCA CGCCAGACCCGGCGGAGGAGGCTTGGCC
 TACAGCAACCCAGCCTGTGCTTGGCGGGCGGCAGCGGAGGCGGGCTCCAGGTGCAGCTGCAGCAG
 AGCGGCCCGGCTGGTAAGCCTAGCCAGACACTGTCCTGACCTGCGCAATCTCCGGCGACAGCGTGTCCGG
 AACAGGGCCACATGGAATTGGATCAGACAGTCTCCAAGCAGGGCCTGGAGTGGCTGGAAAGGACCTACTAT
 CGGTCCGCTGGTACAACGACTATGCCGTCTGTGAAGGGCCGCATCACATTCAACCCAGATACCAGCAAGAAT
 40 CAGTTTCCCTGCAGCTGAATTCTGTGACACCCGAGGATACCGCCGTGTACTATTGCCAGAGGCGAGAGCGG
 AGCAGCAGCAGACGCCCTCGATATCTGGGCCAGGGCACCACAGTGACAGTGAGCGGAGGAGGAGGATCCGG

CGGAGGGAGGCTCTGGCGGCGGCAGCGACATCCAGCTGACCCAGAGGCCACCTTCCCTGCTGCCAGCGTG
 GGCGATCGCGTACAATCACCTGTCGGGCCTCCAGTCTATCAGCTCCTACCTGAACCTGGTATCAGCAGAACCA
 GGCAAGGCCCCAAGCTGCTGATCTACGCAGCATCTAGCCTGCAGTCTGGAGTGCAAGCAGATTCAAGCGGATC
 CGGATTGGCACAGACTTACACTGACCATCTCCTCTGCAGCCGAGGATTCGCCACCTACTATTGCCAGCAG
 TCTTATAGCACACCTCAGACCTTGGCCAGGGACCAAGGTGGACATCAAGGAAAGTGGAGGAGGAGGAAGTT
 GTCCCTACTCAAACCCATCTGTGCTCAGGAGGAGGAGGAAGTGAACCTGCCTACTCAGGAAACATTCAAC
 GTGCCACCAATGTGAGCCCAGCAAAGCCTACCAACCGCATGCCACTCTAACCCAGCCTGTGCACAACC
 ACACCAAGCAGCCCAGGCCCCCTACCCCTGCACCAACAATGCCCTCCAGCCTCTGCTCTGCCAGAGGCCTGC
 AGACCCGCCGCCGGAGCAGTGCACACACGGGCCTGGACTTGCCGTGATATCTATATCTGGCACCAACT
 GGCGGAACATGTGGCGTGTGCTGCTGACTGGCATTACACTGTACTGTAAGCGAGGCCAGAAGAAACTGC
 TGTATTTCAAACAGCCTTATGAGACCTGTGCAACTACCCAGGAGGAAGACGGCTGCAGCTGTAGGTTCC
 CCGAGGAAGAGGAAGGCCGGTGTGAGCTGAGGGTCAAGTTAGCCGCTCCGCAGATGCCCTGCTTACAGCA
 GGGCAGAACAGCTGTATAACGAGCTGAATCTGGACGGAGAGAGGAATACGACGTGCTGGATAAAAGGC
 GGGAGAGACCCGAAATGGAGGAAGGCCATAGTGAATCGGATGAAGGGAGAGAGAACGGCGGAAAGGGAC
 AAGGACAAAATGGCAGAGGCCTATAGTGAATCGGATGAAGGGAGAGAGAACGGCGGAAAGGGAC
 GGCCTGTACCAGGGCTGTACTGCCACCAAGGACACCTATGATGCTCTGCATATGCAGGCAC
 TGCTTACCGCTTACCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTAGTTGCCAGCCATCTGTTGCTT
 CCTCCCCCGTGCCTCCTGACCTGGAGGTGCCACTCCACTGTCCTTCTAATAAAATGAGGAATTGCATC
 GCATTGCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGG
 AGACAATAGCAGGCATGCTGGGATGCGGTGGCTATGACTAGTGGCAATTCCGTGTACAGCTGAGAGA
 CTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGCTGCCATTACCGATTGATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATT
 CTGATGTGTATATCACAGACAAAATGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGT
 GGAGCAACAAATCTGACTTGCAACGCCCTCAACACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTCCCCA
 GCCCAGGTAAGGGCAGCTTGGTGCCTCGCAGGCTGTTCTGCTTCAGGAA, ((SEQ ID N°11))

または

AAGTAGCCCTGCATTCAGGTTCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCGTGAACGTTACTGAAATCATGGCC
 TCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTCTAAGATGCTAT

10

20

30

40

50

TTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTACTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTGTCCATCACTGGCATCTGGAC
 TCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCGGGCCCCGATCCGCTCTGC
 TCGGTAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCGGGCCCCGATCCGCTCTGC
 CCGTCACCGCTCTGCTGCCCTGCCCTGCTGCGCACGCCAGACCAGGCGGAGGAGGCTCCTGCCCT
 TACTCTAACCAAGCCTGTGCCGGAGGAGGAGGATCCGGCGGAGGAGGCTTGAGGTGAAGCTGGTGGAG
 AGCGGAGGAGGCCTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGTCTTGAGCTGCGCACGCATCCGGCTCACCTTACAGA
 10
 CTACTATATGTCTGGGTGAGACAGCCCCCTGGCAAGGCCCTGGAGTGGCTGCCCTGATCAGGTCCAAGGCCG
 ATGGCTACACCACAGAGTATTCCGCCTCTGTGAAGGGCAGATTACCCCTGTCTAGGGACGATGCCAGTCCATCC
 TGACTGCAGATGAATGCACTGCGCCCGAGGACAGCGCCACATACTATTGTGCCAGAGACGCCGCCTACTATT
 CTTACTATAGCCCTGAGGGCGCTATGGACTACTGGGCCAGGGCACCTCCGTGACAGTGAGCTCCGGAGGAGG
 AGGAAGCGGAGGAGGAGGAGGCTCCGGCGGCGGCTATGGCGACTATAAGGATATCGTATGACCCAGAGC
 CACAAGTTATGTCTACAAGCGTGGCGACCGCGTGAACATCACCTGCAAGGCCAGCCAGATGTGGATTCCGC
 CGTGGCCTGGTACCGAGCAGAAGCCTGGCAGAGCCCTAACGCCCTGATCTATTCCGCCTTACCGTATAGCGG
 20
 AGTGCCTGACCGCTTACCGGAAGGGATCCGGAACAGACTTCACCCGTACAATCTCTAGCGTGCAGGCCAG
 GATCTGGCCGTGTACTATTGTCAGCAGTACTATAGCACCCCTGGACCTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGGAGATC
 AAGAGAGGACTGGAGGAGGAGGAAGCTGCCACTCCAACCCCTCTGTGCAAGCGGAGGAGGAGGAGGATCTG
 AGCTGCCAACCCAGGGCACATTTCACCGTCTACAAATGTGAGCCAGCAAGCCAACCACAACCGCATGC
 CCTTATAGCAATCCATCCCTGTGACAACCACACCTGCACCAAGACCACCAACCCAGCACCTACAATGCCCTC
 AGCCACTGAGCCTGCGCCCCGAGGCATGCCGGCCTGCAGCAGCGGGCGCCGTGACACCAGGGCCTGGACT
 30
 TCGCCTGCGATATCTACATCTGGCACCTCTGGCAGGAACCTGTGGCGTGTGCTGAGCCTGGTACACCC
 TGACTGCAAGAGAGGAGGAAGAAGCTGCTGTATCTCAAGCAGCCTTATGCGCCCTGTGCAAGACCAC
 AGGAGGAGGACGGCTGCAGCTGCGTCCCAGAAGAGGAGGAGGGCGGCTGTGAGCTGAGAGTGAAGTT
 AGCAGGTCCGCCGATGCACCGACATACAGCAGGGACAGAACAGCTGTATAACGAGCTGAATCTGGCCGGA
 GAGAGGAGTACGACGTGCTGGATAAGAGGAGGGAGGGACCCGAGATGGGAGGCAAGCCACGGAGAAA
 GAACCCCCAGGAGGGCCTGTACAATGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTTACCGAGATCGGCATG
 AAGGGAGAGAGGCGCCGGGCAAGGGACACGATGGCCTGTACCGAGGACAAAGGACACC
 40

TATGATGCCCTGCATATGCAGGCACTGCCTCCAAGGTGATCTAGAGGGCCCGTTAAACCCGCTGATCAGCCTCG
 ACTGTGCCTTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCCGTGCCTCCTGACCTGGAAGGTGCCACTC
 CCACTGTCCTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGG
 GGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGCTAT
 GACTAGTGGCGAATTCCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGCTGCCTATTCAACGATT
 TTGATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTATATCACAGACAAAATGTGCTAGACATGAG
 GTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTGCATGTGCAAACGCCTCAA
 CAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTGGTGCCTCGCAGGCTGTT
 CCTTGCTTCAGGAA (SEQ ID N°12)

ここで、下線部の配列はゲノム TRAC の配列（相同アーム）であり、太字斜体の配列は 2A ペプチドをコードする配列であり、斜体はポリ A 終結配列（BGH ポリ A）に対応する配列である。

【 0 6 6 4 】

インフレームは、CAR 配列、特に抗 CD22 CAR、抗 CD123 CAR 配列、好ましくは抗 CD 22 CAR、抗 CD123 CAR をコードする配列である。

【 0 6 6 5 】

本発明者らはまた、操作された細胞（TALEN 改変内因性 -TCR 陰性ヒト初代細胞）を検出および同定する手段も提供した。これは、医薬を製造する上で必須の工程であり、品質制御された細胞を提供するのに有用である。

【 0 6 6 6 】

したがって、本発明は、1 つの細胞において単一の操作されたヌクレアーゼを用いて单一の認識部位を標的とすることによって内因性アルファベータ T 細胞受容体のノックアウトと外因性核酸配列（例えば、キメラ抗原受容体または外因性 TCR）の発現の両方を実現する。

【 0 6 6 7 】

したがって、本発明は、CAR 発現細胞の均質な集団を提供する。

【 0 6 6 8 】

キメラ抗原受容体をコードする配列が TCR アルファ定常領域遺伝子内に挿入される特定の態様において、本発明は、抗原特異的 CAR を発現し、TCR アルファベータ発現が減少したまたは内因性 TCR が完全にノックアウトされた「同種異系」T 細胞を製造する簡略化された方法を提供する。そのような細胞は、同種異系対象に投与されたときに移植片対宿主病（GVHD）を軽減し得もしくは誘導しないまたは宿主の T 細胞による拒絶（HvGD）を誘導しない。

【 0 6 6 9 】

T 細胞受容体アルファ定常領域遺伝子内の認識配列を認識および切断する TALEN ならびにそれを行う対応するヌクレアーゼ

特定の態様において、本発明は、TALEN またはコンパクト TALEN を用いて実施され得る。

【 0 6 7 0 】

生きた細胞のゲノムにおいて DNA 断裂を行うために部位特異的ヌクレアーゼを使用することが可能であること、およびそのような DNA 断裂が変異誘発性 NHEJ 修復を通じてまたはトランスジェニック DNA 配列との相同組み換えを通じてゲノムの恒久的な改変をもたら

し得ることが当技術分野で公知となっている。NHEJは、切断部位において変異誘発を起こし得、それによって対立遺伝子を不活性化させる。NHEJに関する変異誘発は、異常な非機能的タンパク質を生じる早い段階の停止コドン、フレームシフト変異の生成を通じて対立遺伝子を不活性化させ得る、またはナンセンス変異依存mRNA分解等の機構を起動し得る。NHEJを通じた変異誘発を誘発するためのスクレアーゼの使用は、特定の変異または野生型対立遺伝子内に存在する配列を標的とするために使用することができる。

【 0 6 7 1 】

標的遺伝子座において二本鎖断裂を誘導するためのスクレアーゼの使用は、相同組み換え、特にゲノム標的に相同な配列が隣接するトランスジェニックDNA配列の相同組み換えを刺激することが公知である。このようにして、外因性核酸配列は標的遺伝子座に挿入され得る。そのような外因性核酸は、非コード配列であり得るまたは、例えば、キメラ抗原受容体、外因性TCRまたは関心対象の任意の配列もしくはポリペプチドをコードし得る。関心対象のポリペプチドを発現させる場合、オープンリーディングフレームまたはコード配列は、TCRプロモーターに対してインフレームであるかまたはそれ独自のプロモーターを有さなければならない。コード配列がTCRプロモーターに対してインフレームである場合、それは、それ自体で、それ自身により発現される後続のポリペプチドのために、自己切断ペプチド、例えば2Aペプチドをコードする配列を含む必要がある。

10

【 0 6 7 2 】

IRES

1つの態様において、外因性配列によってコードされるポリペプチドは、IRESを含む。

20

【 0 6 7 3 】

IRESは、内部リボソーム侵入部位を意味し、本発明の遺伝子内に挿入されたコード配列の転写およびその後の翻訳を可能にする任意のIRESであり得る。

gccccctccctccccccccctaacgttactggcgaagccgcttggataaggccgtgtgcgttgtctatatgttattttccaccata
 ttggcgttttggcaatgtgagggcccgaaacctggccctgtcttgcacgagcattccttagggctttccctctcgccaaaggaa
 tgcaaggctgttgaatgtcgtgaaggaaggcagttcctgttgaagcttcttgaagacaacaacgtctgtgcgacccttgcaggcagc
 ggaaccccccacctggcgacaggtgcctctgcggccaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaacccactgc
 cacgttgcgttggatagtgtggaaagagtcaaaatggctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgccagaaggta
 ccattgtatggatctgtatctgggcctcggtgcacatgtttacatgtgttagtcgaggtaaaaaacgtctaggccccccgaaccac
 ggggacgtggtttcccccggaaaaacacgtgataatggccacaacc

30

【 0 6 7 4 】

有利な態様において、本発明は、TALENを用いて実施され得る。

【 0 6 7 5 】

有利な態様において、本発明は、

40

50

ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTATCGATATGCCGATCTACGCACGCTGGCTACAGCCAGCAGCAA
CAGGAGAAGATCAAACCGAAGGTTGTTGACAGTGGCGCAGCACGAGGCAGGGACTGGTCGGCACGGGTTA
CACACGCGCACATCGTGCCTAACGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATG
ATCGCAGCGTTGCCAGAGGCGACACACGAAGCGATCGTGGCGTCGGCAAACAGTGGTCCGGCGACCGCCTC
TGGAGGCCTGCTCACGGTGGCGGGAGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTACAGTGGACACAGGCCAACTTCTCAA
10
GATTGCAAAACGTGGCGCGTGACCGCAGTGGAGGCAGTGCATGCCAATGCACTGACGGTGCCCCG
CTCAACTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCC
AGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAAT
GGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCAGGCCACGGCTGACCCCC
CAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCG
GTGCTGTGCCAGGCCACGGCTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAG
20

10

20

30

40

50

GCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGT

GCCATGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTCTGTGCCAG

GCCCACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCCTGGAGACG

GTCCAGCGGCTGTTGCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCA

ATATTGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTGCAGGCCTGTTGCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTGAC

CCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTT

GCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATTGGTGGCAAG

CAGGCCTGGAGACGGTGCAGGCCTGTTGCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTGACCCCCAGCAGGT

GTGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTCTGTGCC

AGGCCACGGCTTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATTGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGAC

GGTGCAGGCCTGTTGCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTGACCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGC

AATGGCGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTT

ACCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATTGGTGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTGCAGGCCTG

TTGCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATTGGCGTGGCA

AGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTGACCCGGAGCAGG

TGGTGGCCATGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTCTGTG

CCAGGCCACGGCTTGACCCCTCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATTGGCGCGGCAGGCCGGCCTGGA

GAGCATTGTTGCCAGTTATCTGCCCTGATCCGGCGTTGGCCCGTTGACCAACGACCACCTCGTCGCCCTGGC

CTGCCCTGGCGGGCGTCCTGCGCTGGATGCAGTAAAAAGGGATTGGGGATCCTATCAGCCGTTCCAGCTGG

TGAAGTCCAGCTGGAGGAGAAGAAATCCGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCAACGAGTACATCGA

GCTGATCGAGATGCCCGAACAGCACCCAGGACCGTACCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTCATGAAGG

TGTACGGCTACAGGGCAAGCACCTGGCGGCTCCAGGAAGCCGACGGGCCATCTACACCGTGGCTCCCC

CATCGACTACGGCGTGATCGTGACCCAAGGCCTACTCCGGGGCTACAACCTGCCATGGCCAGGCCAG

AAATGCAGAGGTACGTGGAGGAGAACCAAGCAGGAAACAAGCACATCAACCCAAACGAGTGGTGAAGGTGT

ACCCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCTGTCGTCCGGCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCAGCTG

ACCAAGGCTGAACCACATCACCAACTGCAACGGCGCCGTGCTGCCGTGGAGGAGCTCTGATCGCGCGAGA

TGATCAAGGCCGGCACCTGACCCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAAACGGCAGATCAACTCGCGG

CCGACTGATAA (SEQ ID N°1)

によってコードされるTALENを用いて実施され得、これは例えば、

10

20

30

40

50

MGDPKKRKVIDIADLRTLGYQQQQEKIKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVKYQDMIA
 ALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLKIAKRGGVTAVEAVHAWRNALTGAPLNTPQ
 QVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASN
 GGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALE
 TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLC
 10 QAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPQ
 QVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASN
 GGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALE
 TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGRPALESIVAQLSRP
 DPALAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKKGDPISRSQVKSELEEKSELHKLKYVPHEYIELIEARNSTQDRILEM
 KVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPQADEMQRYVEENQTRNKHINP
 20 NEWWKVYPSSVTEFKFLVSGHFKGNYKAQLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIGEMIKAGTLTLEEVRRKFNNGEINF
 AAD (SEQ ID N°3)

および

ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTATCGATATGCCGATCTACGCACGCTGGCTACAGCCAGCAA
 CAGGAGAAGATCAAACCGAAGGTTGTTGACAGTGGCGCAGCACGAGGCAGTGGTGGCCACGGTTA
 30 CACACGCGCACATCGTTCGTTAACGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATG
 ATCGCAGCGTTGCCAGAGGCACACACGAAGCGATCGTGGCGTCGGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTC
 TGGAGGCCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGGTCCACCGTTACAGTGGACACAGGCCAATTCTCAA
 GATTGCAAAACGTGGCGCGTGAACCGCAGTGGAGGGCAGTGCATGGCGCAATGCACTGACGGTGCCCCG
 CTCAACTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCCACGATGGCGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCC
 40 AGCGGCTGTTGCCGGTGTGCCAGGCCACGGCTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATGG
 CGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCC

GGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGGCC

GGTGCCTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAG

GCGCTGGAGACGGTGCAGGCCTGTTGCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGT

GCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGCTGTGCCGGTGTGCCAGG

CCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGG

TCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGCCCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAAT

10

GGCGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACC

CCCCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTTGC

CGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCA

GGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGT

GCCATGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGCCAG

GCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACG

GTGCAGGCCTGTTGCCGGTGTGCCCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCC

20

ACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTTGA

CCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATAATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCCTGTT

GCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCCACGATGGCGGAA

GCAGGCCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTG

GTGGCCATGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGCC

AGGCCACGGCTTGACCCCTCAGCAGGTGGTGGCCATGCCAGCAATGGCGGGCAGGCCGGCTGGAGA

30

GCATTGTTGCCAGTTATCTGCCCTGATCCGGCGTGGATGCAGTGAAAAGGGATTGGGGATCCTATCAGCCGTTCCAGCTGGT

GAAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAATCCGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCGAG

CTGATCGAGATGCCCGAACAGCACCCAGGACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTCATGAAGGT

GTACGGCTACAGGGCAAGCACCTGGCGGCTCCAGGAAGCCGACGGCGCCATCTACACCGTGGCTCCCC

ATCGACTACGGCGTGTGGACACCAAGGCCTACTCCGGCGCTACAACCTGCCATGGCCAGGCCACGA

AATGCAGAGGTACGTGGAGGAGAACCAAGACCAGGAAACAAGCACATCAACCCAACGAGTGGTGAAGGTGTA

40

CCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCTGTTGTCCGGCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCAGCTGA

CCAGGCTGAACCACATCACCAACTGCAACGGCGCCGTGCTGTCCGTGGAGGAGCTCTGATCGCGGCGAGAT

GATCAAGGCCGGCACCTGACCCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCGCGGC

CGACTGATAA (SEQ ID N°2)

の配列を生じ、これは例えば、右TALENの場合、

50

MGDPKKRKVIDIADLRTLGYQQQQEKIKPKVRSTVAQHHEALVHGFTAHIVALSQHPAALGTVAVKYQDMIA
 ALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLKIAKRGGVTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPE
 QVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASH
 DGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALE
 TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPV
 10 CQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLT
 PQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPEQVVAIAS
 HDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALE
 TVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPV
 DPALAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKKGLDPISRSQVKSELEEKSELHKLKYVPHEYIELIEIARNSTQDRILEM
 KVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRNKHINP
 20 NEWWKVYPSSVTEFKFLVSGHFKGNYKAQLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRRKFNNGEINF
 AAD, (SEQ ID N° 4)

をコードする。

【0676】

有利な態様において、本発明は、以下の配列、
 TTGTCCCACAGATATCCagaaccctgaccctgCCGTGTACCACTGAGAGA

20

を認識するTALENを用いて実施され得る。

【0677】

予め決定されたDNA部位に結合するTALENドメインを作製する方法は、当技術分野で公知である、例えば、Reyon et al. (2012) Nat Biotechnol. 30:460-5。

【0678】

本発明の改善された方法は、エンドヌクレアーゼが、検出未満のオフターゲット切断を誘導するようにする。

【0679】

本発明の改善された方法は、TALENエンドヌクレアーゼが、オフターゲット切断を誘導しないまたは非常に限定的で無症状のオフターゲット切断を誘導するようにする。

30

【0680】

特定の態様において、本発明を比較するために使用されるヌクレアーゼは、単鎖メガヌクレアーゼである。単鎖メガヌクレアーゼは、リンカーベプチドによって接続されたN末端サブユニットおよびC末端サブユニットを含む。この2つのドメインの各々が、認識配列の半分（認識半部位）を認識し、DNA切断の部位は、認識配列の中央の2つのサブユニットの境界面付近である。DNA鎖の断裂は、WO2017106528に開示されるようにメガヌクレアーゼによるDNA切断が一対の4塩基対、3'単鎖オーバーハングを生じるよう、4塩基対分埋め合わせされる。

【0681】

本発明は、そのような細胞を検出する手段（メガヌクレアーゼによって誘導されるオン

40

50

サイトおよびオフサイトdsDNA切断)を提供する。

【0682】

本明細書で使用される組み換えメガヌクレアーゼは、第1の超可変(HVR1)領域を含む第1のサブユニットおよび第2の超可変(HVR2)領域を含む第2のサブユニットを含む。さらに、第1のサブユニットは、認識配列内の第1の認識半部位(例えば、TRC1、TRC3またはTRC7半部位)に結合し、第2のサブユニットは、認識配列内の第2の認識半部位(例えば、TRC2、TRC4またはTRC8半部位)に結合する。組み換えメガヌクレアーゼが単鎖メガヌクレアーゼである態様において、第1および第2のサブユニットは、HVR1領域を含み第1の半部位に結合する第1のサブユニットがN末端サブユニットとして配置され、HVR2領域を含み、第2の半部位に結合する第2のサブユニットがC末端サブユニットとして配置されるよう、配向され得る。代替の態様において、第1および第2のサブユニットは、HVR1領域を含み第1の半部位に結合する第1のサブユニットがC末端サブユニットとして配置され、HVR2領域を含み、第2の半部位に結合する第2のサブユニットがN末端サブユニットとして配置されるよう、配向され得る。対応する例示的なTRC 1-2メガヌクレアーゼ、TRC 3-4メガヌクレアーゼおよびTRC 7-8メガヌクレアーゼは、WO2017106528に開示されている。

【0683】

様々な異なるタイプのヌクレアーゼが、本発明を実施する上で有用である。1つの態様において、本発明は、組み換えメガヌクレアーゼを用いて実施され得る。別の態様において、本発明は、CRISPRヌクレアーゼまたはCRISPRニッカーゼを用いて実施され得る。予め決定されたDNA部位を認識するCRISPRおよびCRISPRニッカーゼを作製する方法は、当技術分野で公知である、例えば、Ran, et al. (2013) Nat Protoc. 8: 2281-308。

【0684】

遺伝的に改変された細胞を作製するための概略的方法

本発明は、ヒトTCRアルファ定常領域遺伝子内で見いだされる認識配列を認識および切断する操作されたTALENヌクレアーゼを用いて遺伝的に改変された細胞を作製する方法を提供する。

【0685】

1つの態様において、本発明は、ヒトTCRアルファ定常領域遺伝子内で見いだされる認識配列

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctgaccctgCCGTGTACCAAGCTGA-GAGA

を認識および切断する操作されたTALENヌクレアーゼを用いて遺伝的に改変された細胞を作製する方法を提供する。

【0686】

1つの態様において、本発明は、ヒトTCRアルファ定常領域遺伝子内で見いだされる認識配列に対して少なくとも80%の同一性を有する配列

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctgaccctgCCGTGTACCAAGCTGAGAGA

を認識および切断する操作されたTALENヌクレアーゼを用いて遺伝的に改変された細胞を作製する方法を提供する。

【0687】

1つの態様において、本発明は、ヒトTCRアルファ定常領域遺伝子内で見いだされる認識配列に対して少なくとも90%の同一性を有する配列

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctgaccctgCCGTGTACCAAGCTGAGAGA

を認識および切断する操作されたTALENヌクレアーゼを用いて遺伝的に改変された細胞を作製する方法を提供する。

【0688】

1つの態様において、本発明は、ヒトTCRアルファ定常領域遺伝子内で見いだされる認

10

20

30

40

50

識配列に対して少なくとも91%の同一性を有する配列
TTGTCCCACAGATATCCagaaccctgaccctgCCGTGTACCAAGCTGAGAGA

を認識および切断する操作されたTALENヌクレアーゼを用いて遺伝的に改変された細胞を作製する方法を提供する。

【0689】

1つの態様において、本発明は、ヒトTCRアルファ定常領域遺伝子内で見いだされる認識配列に対して少なくとも92%の同一性を有する配列

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctgaccctgCCGTGTACCAAGCTGAGAGA

10

を認識および切断する操作されたTALENヌクレアーゼを用いて遺伝的に改変された細胞を作製する方法を提供する。

【0690】

1つの態様において、本発明は、ヒトTCRアルファ定常領域遺伝子内で見いだされる認識配列に対して少なくとも93%の同一性を有する配列

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctgaccctgCCGTGTACCAAGCTGAGAGA

を認識および切断する操作されたTALENヌクレアーゼを用いて遺伝的に改変された細胞を作製する方法を提供する。

【0691】

20

1つの態様において、本発明は、ヒトTCRアルファ定常領域遺伝子内で見いだされる認識配列に対して少なくとも94%の同一性を有する配列

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctgaccctgCCGTGTACCAAGCTGAGAGA

を認識および切断する操作されたTALENヌクレアーゼを用いて遺伝的に改変された細胞を作製する方法を提供する。

【0692】

1つの態様において、本発明は、ヒトTCRアルファ定常領域遺伝子内で見いだされる認識配列に対して少なくとも95%の同一性を有する配列

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctgaccctgCCGTGTACCAAGCTGAGAGA

30

を認識および切断する操作されたTALENヌクレアーゼを用いて遺伝的に改変された細胞を作製する方法を提供する。

【0693】

1つの態様において、本発明は、ヒトTCRアルファ定常領域遺伝子内で見いだされる認識配列に対して少なくとも96%の同一性を有する配列

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctgaccctgCCGTGTACCAAGCTGAGAGA

を認識および切断する操作されたTALENヌクレアーゼを用いて遺伝的に改変された細胞を作製する方法を提供する。

【0694】

40

1つの態様において、本発明は、ヒトTCRアルファ定常領域遺伝子内で見いだされる認識配列に対して少なくとも97%の同一性を有する配列

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctgaccctgCCGTGTACCAAGCTGAGAGA

を認識および切断する操作されたTALENヌクレアーゼを用いて遺伝的に改変された細胞を作製する方法を提供する。

【0695】

1つの態様において、本発明は、ヒトTCRアルファ定常領域遺伝子内で見いだされる認識配列に対して少なくとも98%の同一性を有する配列

50

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctgaccctgCCGTGTACCGAGCTGAGAGA

を認識および切断する操作されたTALENヌクレアーゼを用いて遺伝的に改変された細胞を作製する方法を提供する。

【 0 6 9 6 】

1つの態様において、本発明は、ヒトTCRアルファ定常領域遺伝子内で見いだされる認識配列に対して少なくとも99%の同一性を有する配列

TTGTCCCACAGATATCCagaaccctgaccctgCCGTGTACCGAGCTGAGAGA

を認識および切断する操作されたTALENヌクレアーゼを用いて遺伝的に改変された細胞を作製する方法を提供する。 10

【 0 6 9 7 】

1つの態様において、本発明は、ヒトTCRアルファ定常領域遺伝子内で見いだされる認識配列に対して少なくとも100%の同一性を有する配列

TTGTCCCACAGA-TATCCagaaccctgaccctgCCGTGTACCGAGCTGAGAGA

を認識および切断する操作されたTALENヌクレアーゼを用いて遺伝的に改変された細胞を作製する方法を提供する。

【 0 6 9 8 】

そのような認識配列における切断は、切断部位におけるNHEJおよびヒトT細胞受容体アルファ鎖サブユニットの発現阻害をもたらし、それによって細胞表面上でのT細胞受容体の発現および/または機能の低下を引き起こし得る。加えて、そのような認識配列における切断はさらに、TCRアルファ定常領域遺伝子への直接的な外因性核酸配列の相同組み換えをもたらし得る。 20

【 0 6 9 9 】

ヌクレアーゼをコードするRNA

本発明の操作されたTALENヌクレアーゼは、タンパク質の形態で、または好ましくは、操作されたヌクレアーゼをコードする核酸として細胞に送達され得る。そのような核酸は、DNA（例えば、環状もしくは直鎖状プラスミドDNAもしくはPCR産物）またはRNAもしくはRNAの組み合わせであってよい。 30

【 0 7 0 0 】

そのようなRNAは、様々な安定性、様々な長さを有してもよく、様々な量で送達することができる。

【 0 7 0 1 】

操作されたTALENヌクレアーゼをコードする配列がDNA形態で送達される態様において、それは、ヌクレアーゼ（TALENまたはメガヌクレアーゼ遺伝子）の転写を促進するプロモーターに機能的に連結されるべきである。本発明に適した哺乳動物プロモーターは、構成性プロモーター、例えばサイトメガロウイルス初期（CMV）プロモーター（Thomsen et al. (1984), Proc Natl Acad Sci USA. 81(3): 659-63）またはSV40初期プロモーター（Benoist and Chambon (1981), Nature. 290 (5804): 304-10）および誘導性プロモーター、例えばテトラサイクリン誘導性プロモーター（Dingermann et al. (1992), Mol Cell Biol. 12(9): 4038-45）を含む。 40

【 0 7 0 2 】

いくつかの態様において、操作されたヌクレアーゼをコードする遺伝子が細胞のゲノムに組み込まれる可能性をそれが低下させるという理由で、操作されたヌクレアーゼをコードするmRNAが細胞に送達される。操作されたヌクレアーゼをコードするそのようなmRNAは、当技術分野で公知の方法、例えばインビトロ転写を用いて作製され得る。いくつかの態様において、mRNAは、7-メチル-グアノシンを用いてキャップされる。いくつかの態様において、mRNAは、ポリアデニル化され得る。他の態様において、mRNAは、異なる長さのポリAテイルを有し得る。 50

【 0 7 0 3 】

特定の態様において、本発明の操作されたヌクレアーゼをコードするmRNAは、細胞内で同時に発現される2つまたはそれ以上のヌクレアーゼ（またはその半分）をコードする多シストロン性mRNAであり得る。多シストロン性mRNAは、同じ標的遺伝子内の異なる認識配列を標的とする2つまたはそれ以上の本発明のヌクレアーゼをコードし得る。あるいは、多シストロン性mRNAは、少なくとも1つの本明細書に記載されるヌクレアーゼおよび同じ遺伝子内に位置する別の認識配列を標的とするまたは両方の遺伝子において切断部位が生じるよう第2の遺伝子内に位置する第2の認識配列を標的とする少なくとも1つの追加のヌクレアーゼをコードし得る。多シストロン性mRNAは、IRESエレメント、T2Aエレメント、P2Aエレメント、E2AエレメントおよびF2Aエレメントを含むがこれらに限定されない同じmRNA分子からの2つまたはそれ以上の遺伝子（すなわち、シストロン）の翻訳を可能にする当技術分野で公知の任意の要素を含み得る。

【 0 7 0 4 】

特定の態様において、本発明の操作されたヌクレアーゼをコードするmRNAは、細胞内で同時に発現される2つまたはそれ以上のヌクレアーゼをコードする多シストロン性mRNAであり得る。多シストロン性mRNAは、同じ標的遺伝子内の異なる認識配列を標的とする2つまたはそれ以上の本発明のヌクレアーゼをコードし得る。あるいは、多シストロン性mRNAは、少なくとも1つの本明細書に記載されるヌクレアーゼおよび同じ遺伝子内に位置する別の認識配列を標的とするまたは両方の遺伝子において切断部位が生じるよう第2の遺伝子内に位置する第2の認識配列を標的とする少なくとも1つの追加のヌクレアーゼをコードし得る。多シストロン性mRNAは、IRESエレメント、T2Aエレメント、P2Aエレメント、E2AエレメントおよびF2Aエレメントを含むがこれらに限定されない同じmRNA分子からの2つまたはそれ以上の遺伝子（すなわち、シストロン）の翻訳を可能にする当技術分野で公知の任意の要素を含み得る。

【 0 7 0 5 】

特定の態様において、本発明の操作されたヌクレアーゼをコードするmRNAは、細胞内で同時に発現される2つまたはそれ以上のヌクレアーゼをコードする多シストロン性mRNAであり得る。多シストロン性mRNAは、同じ標的遺伝子内の異なる認識配列を標的とする2つまたはそれ以上の本発明のヌクレアーゼをコードし得る。あるいは、多シストロン性mRNAは、少なくとも1つの本明細書に記載されるヌクレアーゼおよび同じ遺伝子内に位置する別の認識配列を標的とするまたは両方の遺伝子において切断部位が生じるよう第2の遺伝子内に位置する第2の認識配列を標的とする少なくとも1つの追加のヌクレアーゼをコードし得る。多シストロン性mRNAは、IRESエレメント、T2Aエレメント、P2Aエレメント、E2AエレメントおよびF2Aエレメントを含むがこれらに限定されない同じmRNA分子からの2つまたはそれ以上の遺伝子（すなわち、シストロン）の翻訳を可能にする当技術分野で公知の任意の要素を含み得る。

【 0 7 0 6 】

特定の態様において、本発明の操作されたヌクレアーゼをコードするmRNAは、細胞内で同時に発現される2つまたはそれ以上のヌクレアーゼをコードする多シストロン性mRNAであり得る。多シストロン性mRNAは、同じ標的遺伝子内の異なる認識配列を標的とする2つまたはそれ以上の本発明のヌクレアーゼをコードし得る。あるいは、多シストロン性mRNAは、少なくとも1つの本明細書に記載されるヌクレアーゼおよび同じ遺伝子内に位置する別の認識配列を標的とするまたは両方の遺伝子において切断部位が生じるよう第2の遺伝子内に位置する第2の認識配列を標的とする少なくとも1つの追加のヌクレアーゼをコードし得る。多シストロン性mRNAは、IRESエレメント、T2Aエレメント、P2Aエレメント、E2AエレメントおよびF2Aエレメントを含むがこれらに限定されない同じmRNA分子からの2つまたはそれ以上の遺伝子（すなわち、シストロン）の翻訳を可能にする当技術分野で公知の任意の要素を含み得る。

【 0 7 0 7 】

特定の態様において、本発明の操作されたヌクレアーゼをコードするmRNAは、細胞内

10

20

30

40

50

で同時に発現される2つまたはそれ以上のヌクレアーゼをコードする多シストロン性mRNAであり得る。多シストロン性mRNAは、同じ標的遺伝子内の異なる認識配列を標的とする2つまたはそれ以上の本発明のヌクレアーゼをコードし得る。あるいは、多シストロン性mRNAは、少なくとも1つの本明細書に記載されるヌクレアーゼおよび同じ遺伝子内に位置する別の認識配列を標的とするまたは両方の遺伝子において切断部位が生じるよう第2の遺伝子内に位置する第2の認識配列を標的とする少なくとも1つの追加のヌクレアーゼをコードし得る。多シストロン性mRNAは、IRESエレメント、T2Aエレメント、P2Aエレメント、E2AエレメントおよびF2Aエレメントを含むがこれらに限定されない同じmRNA分子からの2つまたはそれ以上の遺伝子（すなわち、シストロン）の翻訳を可能にする当技術分野で公知の任意の要素を含み得る。

10

【0708】

特定の態様において、本発明の操作されたヌクレアーゼをコードするmRNAは、細胞内で同時に発現される2つまたはそれ以上のヌクレアーゼおよび非コード調節性RNAをコードする多シストロン性mRNAであり得る。多シストロン性mRNAは、同じ標的遺伝子内の異なる認識配列を標的とし、T細胞の分化または脱分化のプログラムを活性化する2つまたはそれ以上の本発明のヌクレアーゼをコードし得る。あるいは、多シストロン性mRNAは、少なくとも1つの本明細書に記載されるヌクレアーゼおよび同じ遺伝子内に位置する別の認識配列を標的とするまたは両方の遺伝子において切断部位が生じるよう第2の遺伝子内に位置する第2の認識配列を標的とする少なくとも1つの追加のヌクレアーゼならびに記載される（Neilson, R. Genes Dev. 2007 Mar 1; 21(5): 578-589. doi: 10.1101/gad.1522907）ような細胞の成熟状態を調節する非コードARNをコードし得る。

20

【0709】

多シストロン性mRNAは、IRESエレメント、T2Aエレメント、P2Aエレメント、E2AエレメントおよびF2Aエレメントを含むがこれらに限定されない同じmRNA分子からの2つまたはそれ以上の遺伝子（すなわち、シストロン）の翻訳を可能にする当技術分野で公知の任意の要素を含む。

【0710】

精製されたヌクレアーゼタンパク質は、ゲノムDNAを切断するよう細胞に送達され得、その切断部位で、当技術分野で公知の様々な異なる機構により、関心対象の配列との相同組み換えまたは非相同末端接続を実現する。

30

【0711】

いくつかの態様において、操作されたヌクレアーゼタンパク質または操作されたヌクレアーゼをコードするDNA/mRNAは、細胞取り込みを促進するよう膜透過性ペプチドまたは標的となるリガンドに連結される。当技術分野で公知の膜透過性ペプチドの例は、ポリアルギニン（Jearawiriyapaisarn, et al. (2008) Mol Ther. 16: 1624-9）、HIVウイルス由来のTATペプチド（Hudecz et al. (2005), Med. Res. Rev. 25: 679-736）、MPG（Simeoni, et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31: 2717-2724）、Pep-1（Deshayes et al. (2004) Biochemistry 43: 7698-7706）およびHSV-1 VP-22（Deshayes et al. (2005) Cel Mol Life Sci. 62: 1839-49）を含む。代替の態様において、操作されたヌクレアーゼまたは操作されたヌクレアーゼをコードするDNA/mRNAは、そのヌクレアーゼタンパク質/DNA/mRNAが標的細胞に結合し、インターナライズされるよう、標的細胞上で発現される特定の細胞表面受容体を認識する抗体に共有結合によりまたは非共有結合により連結される。あるいは、操作されたヌクレアーゼタンパク質/DNA/mRNAは、そのような細胞表面受容体に対する天然リガンド（またはその天然リガンドの一部）に共有結合によりまたは非共有結合により連結され得る（McCall, et al. (2014) Tissue Barriers. 2(4): e944449; Dinda, et al. (2013) Curr Pharm Biotechnol. 14: 1264-74; Kang, et al. (2014) Curr Pharm Biotechnol. 15(3): 220-30; Qian et al. (2014) Expert Opin Drug Metab Toxicol. 10 (11): 1491-508）。

40

【0712】

いくつかの態様において、操作されたヌクレアーゼまたは操作されたヌクレアーゼをコ

50

ードするDNA/mRNAは、当技術分野で公知の方法を用いてナノ粒子に共有結合により、好ましくは非共有結合により連結されるまたはそのようなナノ粒子内にカプセル化される (Sharma, et al. (2014) *Biomed Res Int.* 2014)。ナノ粒子は、その長さの規模が<1 μm、好ましくは<100 nmであるナノスケールの送達システムである。そのようなナノ粒子は、金属、脂質、ポリマーまたは生体高分子から構成されるコアを用いて設計され得、複数コピーの組み換えメガヌクレアーゼタンパク質、mRNAまたはDNAが、そのナノ粒子コアに付加され得るまたはナノ粒子コア内にカプセル化され得る。これは、各細胞に送達されるタンパク質/mRNA/DNAのコピー数を増加させ、したがって、その標的認識配列が切断される可能性を最大化するよう各々の操作されたヌクレアーゼの細胞内発現を増加させる。そのようなナノ粒子の表面はさらに、その表面がペイロードの細胞送達および取り込みを強化する付加的機能を与えるコア・シェルナノ粒子を形成するよう、ポリマーまたは脂質(例えば、キトサン、カチオン性ポリマーまたはカチオン性脂質)により改変され得る (Jian et al. (2012) *Biomaterials.* 33 (30): 7621-30)。ナノ粒子はさらに、そのナノ粒子を適当な細胞型に案内するおよび/または細胞取り込みの可能性を増加させるよう標的となる分子に連結されることが有利であり得る。そのような標的となる分子の例は、細胞表面受容体に特異的な抗体および細胞表面受容体に対する天然リガンド(またはその天然リガンドの一部)を含む。

【0713】

いくつかの態様において、操作されたヌクレアーゼタンパク質または操作されたヌクレアーゼをコードするDNA/mRNAは、リポソーム内にカプセル化されるまたはカチオン性脂質を用いて複合体化される(例えば、Lipofectamine(商標), Life Technologies Corp., Carlsbad, CA; Zuris et al. (2015) *Nat Biotechnol.* 33: 73-80; Mishra et al. (2011) *J Drug Deliv.* 2011: 863734を参照のこと)。リポソームおよびリポプレックス配合物は、ペイロードを分解から保護し得、細胞の細胞膜との融合および/または細胞膜の破壊を通じて細胞取り込みおよび送達効率を向上させ得る。

【0714】

いくつかの態様において、操作されたヌクレアーゼタンパク質または操作されたヌクレアーゼをコードするDNA/mRNAは、ポリマースキャホールド(例えば、PLGA)内にカプセル化されるまたはカチオン性ポリマー(例えば、PEI、PLL)を用いて複合体化される (Tamboli et al. (2011) *Ther Deliv.* 2(4): 523-536)。

【0715】

いくつかの態様において、操作されたヌクレアーゼタンパク質または操作されたヌクレアーゼをコードするDNA/mRNAは、自己集合してミセルを形成する両親媒性分子に結合される (Tong et al. (2007) *J Gene Med.* 9(11): 956-66)。ポリマー性ミセルは、凝集を防止し得、電荷相互作用を遮蔽し得、細胞外での非特異的相互作用を減少させ得る親水性ポリマー(例えば、ポリエチレングリコール)により形成されるミセルシェルを含み得る。

【0716】

いくつかの態様において、操作されたヌクレアーゼタンパク質(本発明においてはヌクレアーゼまたはエンドヌクレアーゼとも称される)または操作されたヌクレアーゼをコードするDNA/mRNAは、細胞への送達のためにエマルジョンまたはナノエマルジョン(すなわち、<1 nmの平均粒子径を有するもの)内に配合される。「エマルジョン」という用語は、非限定的に、水不混和相が水相と混合されたときに、非極性残基(例えば、長い炭化水素鎖)を水から遠ざけ、極性ヘッド基を水の方に向ける疎水力の結果として形成され得る脂質構造体を含む、任意の水中油型、油中水型、水中油中水型、または油中水中油型の分散物または小滴を表す。これらの他の脂質構造体は、単層、少数層および多層脂質ベシクル、ミセルおよび層状相を含むがこれらに限定されない。エマルジョンは、水相および親脂相(典型的に、油および有機溶媒を含む)から構成される。エマルジョンはまた、多くの場合、1つまたは複数の界面活性剤を含む。ナノエマルジョン配合物は、例えば、各々の全体が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許出願第2002/0045667号

および第2004/0043041号、ならびに米国特許第6,015,832号、第6,506,803号、第6,635,676号および第6,559,189号に記載されるように、周知である。

【0717】

いくつかの態様において、操作されたヌクレアーゼタンパク質または操作されたヌクレアーゼをコードするDNA/mRNAは、多機能性ポリマーコンジュゲート、DNAデンドリマーおよびポリマーデンドリマーに共有結合により付加または非共有結合により結合される（Mastorakos et al. (2015) *Nanoscale*. 7(9): 3845-56; Cheng et al. (2008) *J. P harm Sci.* 97(1): 123-43）。デンドリマーの生成により、ペイロードの運搬能およびサイズを制御することができ、かつ高いペイロード運搬能を提供することができる。さらに、複数の表面基の提示は、安定性を向上させ、非特異的相互作用を減少させるために利用され得る。

10

【0718】

いくつかの態様において、操作されたヌクレアーゼをコードする遺伝子は、ウイルスベクターを用いて細胞に導入される。そのようなベクターは、当技術分野で公知であり、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを含む（Vannucci, et al. (2013) *New Microbiol.* 36: 1-22）においてレビューされている）。本発明において有用な組み換えAAVベクターは、細胞へのウイルスの形質導入および細胞ゲノムへのヌクレアーゼ遺伝子の挿入を可能にする任意のAAV由来であり得る。特定の態様において、組み換えAAVベクターは、AAV6カプシドタンパク質およびAAV6カプシドタンパク質を有する粒子への遺伝子物質のカプセル化を実現するAAV2由来の構造要素をコードする。

20

【0719】

組み換えAAVベクターはまた、それらが宿主細胞において第2鎖のDNA合成を必要としないよう自己相補性であり得る（McCarty, et al. (2001) *Gene Ther.* 8: 1248-54）。

【0720】

操作されたTALENヌクレアーゼ遺伝子がDNA形態（例えばプラスミド）および/またはウイルスベクター（例えば、AAV）を通じて送達される場合、それらは、プロモーターに機能的に連結されていなければならない。いくつかの態様において、これは、ウイルスプロモーター、例えば、ウイルスベクター由来の内因性プロモーター（例えば、レンチウイルスベクターのLTR）または周知のサイトメガロウイルスもしくはSV40ウイルス初期プロモーターであり得る。好ましい態様において、ヌクレアーゼ遺伝子は、標的細胞（例えば、ヒトT細胞）における優先的な遺伝子発現を誘導するプロモーターに機能的に連結される。

30

【0721】

同様に、遺伝子、例えばCARまたはTCRをコードするポリヌクレオチドは、ベクター（例えば、レンチ、AAV、好ましくはAAV、より好ましくはAAV6、さらにより好ましくはAAV6およびAAV2 ITR）として送達され得る。

【0722】

本発明はさらに、ヌクレアーゼ切断部位において外因性核酸配列をTRAC定常領域遺伝子に挿入する細胞への外因性核酸の導入を提供する。いくつかの態様において、外因性核酸は、ヌクレアーゼ切断部位における細胞ゲノムへの核酸配列の組み換えを促進する5'相同アームおよび3'相同アームを含む。

40

【0723】

本発明の外因性核酸またはポリヌクレオチドは、以前に開示された手段のいずれかによって細胞に導入され得る。特定の態様において、外因性核酸は、ウイルスベクター、例えばレンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルスまたは好ましくはAAV2逆方向末端反復（ITR）を有する組み換えAAVベクター、より好ましくは組み換えAAV6ベクターによって導入される。外因性核酸を導入するのに有用な組み換えAAVベクターは、細胞へのウイルスの形質導入および細胞ゲノムへの外因性核酸配列の挿入を可能にする任意の血清型を有し得る。特定の態様において、組み換えAAVベクターは、血清型AAV6を有する。

50

組み換えAAVベクターはまた、それらが宿主細胞において第2鎖のDNA合成を必要としないよう自己相補性であり得る。

【0724】

別の特定の態様において、外因性核酸は、単鎖DNAテンプレートを用いて細胞に導入され得る。単鎖DNAは、外因性核酸を含み得、好ましい態様において、相同組み換えによるヌクレアーゼ切断部位への核酸配列の挿入を促進する5'および3'相同アームを含み得る。単鎖DNAはさらに、5'相同アームの5'側上流に5'AAV逆方向末端反復(ITR)配列、および3'相同アームの3'側下流に3'AAV2 ITR配列を含み得る。

【0725】

別の特定の態様において、本発明のエンドヌクレアーゼおよび/または本発明の外因性核酸配列(例えば、CAR)をコードする遺伝子は、直鎖化されたDNAテンプレートを用いたトランスフェクションによって細胞に導入され得る。いくつかの例において、エンドヌクレアーゼおよび/または外因性核酸配列をコードするプラスミドDNAは、細胞へのトランスフェクションの前に環状プラスミドDNAが直鎖化されるよう1つまたは複数の制限酵素によって消化され得る。

【0726】

細胞に送達される場合、本発明の外因性核酸は、以前に議論された哺乳動物プロモーターおよび誘導性プロモーターを含む、コードされるポリペプチドの細胞内での発現に適した任意のプロモーターに機能的に連結され得る。本発明の外因性核酸はまた、合成性プロモーターに機能的に連結され得る。合成性プロモーターは、非限定的に、JeTプロモーターを含み得る(WO 2002/012514)。

【0727】

活性化

本発明の遺伝的に改変された細胞がヒトT細胞またはそれ由来の細胞である場合、そのような細胞は、ヌクレアーゼおよび/または外因性核酸配列の導入前に活性化を必要とし得る。例えば、T細胞は、細胞を活性化するのに十分な期間、可溶性であるまたは支持体(すなわち、ビーズ)に結合された抗CD3および抗CD28抗体と接触させられ得る。

【0728】

自殺遺伝子

本発明の遺伝的に改変された細胞はさらに、その誘導が細胞死を誘発し、インビトロまたはインビボでのその細胞の選択的破壊を可能にする1つまたは複数の誘導性自殺遺伝子を発現するよう改変され得る。いくつかの例において、自殺遺伝子は、細胞毒性ポリペプチド、無毒性のプロドラッグを細胞毒性の薬物に変換する能力を有するポリペプチド、および/または細胞内の細胞毒性遺伝子経路を活性化するポリペプチドをコードし得る。すなわち、自殺遺伝子は、それ自身によりまたは他の化合物の存在下で細胞死を引き起こす生成物をコードする核酸である。そのような自殺遺伝子の代表例は、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼをコードするものである。さらなる例は、水痘帯状疱疹ウイルスのチミジンキナーゼおよび5-フルオロシトシンを強毒性の化合物である5-フルオロウラシルに変換することができる細菌遺伝子シトシンデアミナーゼをコードする遺伝子である。自殺遺伝子はまた、非限定的な例として、カスパー-9、カスパー-8またはシトシンデアミナーゼをコードする遺伝子を含む。いくつかの例において、カスパー-9は、特定の二量体化化学誘導因子(CID)を用いて活性化され得る。自殺遺伝子はまた、細胞に治療的および/または細胞毒性モノクローナル抗体に対する感受性を与える、細胞表面上で発現されるポリペプチドをコードし得る。さらなる例において、自殺遺伝子は、抗CD20 mAbリツキシマブによって認識される抗原性モチーフおよび自殺遺伝子を発現する細胞の選択を可能にするエピトープを含む組み換え抗原性ポリペプチドをコードし得る。例えば、2つのリツキシマブ結合エピトープおよびQBEnd10結合エピトープを含む、WO2013153391に記載されるRQR8ポリペプチドを参照のこと。そのような遺伝子の場合、リツキシマブは、必要とされる場合、細胞枯渇を誘導するよう対象に投与され得る。

【0729】

10

20

30

40

50

1つの態様において、2つのリツキシマブ結合エピトープは、キメラ抗原受容体、例えば、抗CD22 CAR、または抗CD123 CAR、または抗CD30 CARの、そのscfvのリンカー内におよび／またはそのscfvを膜貫通ドメインに連結するヒンジ内に、直接挿入される。

【0730】

1つの態様において、2つのリツキシマブ結合エピトープおよびQBEnd10結合エピトープは、キメラ抗原受容体、例えば、抗CD22 CAR、または抗CD123 CAR、または抗CD30 CARの、そのscfvのVHとVLの間のリンカー内におよび／またはそのscfvを膜貫通ドメインに連結するヒンジ内に、直接挿入される。

【0731】

いくつかの態様において、本発明は、本発明の遺伝的に改変された細胞（TALEN改変内因性-TCR陰性ヒト初代細胞であって、ゲノムTCR遺伝子（TRAC遺伝子）の定常領域が、TALENによって生成されかつアルファベータTCRの細胞表面発現に影響する遺伝子改変を含み、ゲノムTRAC遺伝子が、5'から3'方向に、

(a) ヒトゲノムTRAC遺伝子上流の5'領域、

(b) TALEN用の認識ドメイン、

(c) アルファベータTCRの細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインの細胞表面発現に影響する野生型TRAC遺伝子と比較してのギャップまたは挿入であって、挿入が、非コード配列、例えば停止コドン、IRES、コード配列、例えばTRACオープンリーディングフレームとインフレームの自己切断ペプチドをコードする配列、キメラ抗原受容体（CAR）をコードする配列、TCRをコードする配列、薬物に対する感受性を付与するタンパク質をコードする配列、薬物に対する耐性を付与するタンパク質をコードする配列、サイトカイン、終結配列、それらの組み合わせから選択される外因性ポリヌクレオチドを含む、ギャップまたは挿入、

(c') 任意で、第2のTALEN認識ドメイン、

(d) ゲノムTRAC遺伝子の3'領域、

を含む細胞）または本発明の遺伝的に改変された細胞の集団、ならびに薬学的担体、ならびに別の医薬、例えばdCK KO細胞のためのPNA、CD52 KOのためのアレムツズマブ、GR KO細胞のためのグルココルチコイドを含む薬学的組成物を提供する。

【0732】

そのような薬学的組成物は、公知の技術にしたがって調製され得る。例えば、Remington, The Science And Practice of Pharmacy (21st ed. 2005)を参照のこと。本発明にしたがう薬学的配合物の製造において、細胞は典型的に、薬学的に許容される担体と混合され、得られる組成物が、対象に投与される。担体は、当然、配合物中のあらゆる他の成分と適合するという意味で許容可能でなければならず、対象に対して有害であってはならない。いくつかの態様において、本発明の薬学的組成物はさらに、対象における疾患の処置に有用な1つまたは複数の追加の薬剤を含み得る。さらなる態様において、遺伝的に改変された細胞が遺伝的に改変されたヒトT細胞（またはそれ由来の細胞）である場合、本発明の薬学的組成物はさらに、インビボでの細胞の増殖および生着を促進する生体分子、例えばサイトカイン（例えば、IL-2、IL-7、IL-15および／またはIL-21、IL-27）を含み得る。本発明の遺伝的に改変された細胞を含む薬学的組成物は、追加の薬剤または生体分子と同じ組成物として投与され得、あるいは別の組成物として同時投与され得る。

【0733】

治療適用

本発明の薬学的組成物は、養子免疫療法により標的とすることができる任意の疾患状態を処置するのに有用であり得る。本発明の物質（CARまたはTCRを発現する操作された初代ヒト細胞）を用いて処置され得る疾患は、同物質の細胞表面上で発現されるCARの標的を発現する細胞または組織によって特徴づけられることもあり、そうでないこともある。

【0734】

特定の態様において、本発明の薬学的組成物は、がんの処置において有用である。そのようながんは、非限定的に、がん腫、リンパ腫、肉腫、芽細胞腫、白血病、B細胞起源の

10

20

30

40

50

がん、乳がん、胃がん、神経芽細胞腫、骨肉腫、肺がん、黒色腫、前立腺がん、結腸がん、腎細胞がん、卵巣がん、横紋筋肉腫、白血病およびホジキンリンパ腫を含み得る。特定の態様において、B細胞起源のがんは、非限定的に、B細胞系急性リンパ芽球性白血病、B細胞慢性リンパ性白血病およびB細胞非ホジキンリンパ腫を含む。

【0735】

特定の態様において、本発明の物質は、CAR標的の発現により特徴づけられる疾患を処置するために、本発明の細胞の表面上で発現されるCARに基づき使用され得る。

【0736】

がんの処置に有用な、遺伝的に改変された細胞（本発明の操作された細胞）の量は、1~108細胞の範囲であり得る。

【0737】

本発明の細胞を検出するための手段

本発明は、操作された細胞を検出する手段を提供する。本発明のそのような手段は、欠失、変異、挿入を起こした改変されたTCR遺伝子を認識および検出することができる任意の手段を含む。本発明のそのような手段は、TRAC遺伝子の欠失、変異、挿入、および存在する場合、オフサイトのそれらを起こした改変されたTCR遺伝子を認識および検出することができる任意の手段を含む。

【0738】

この手段は、オリゴヌクレオチド、縮重オリゴヌクレオチド、プローブ、DNAプローブ、RNAプローブ、標識エンドヌクレアーゼ、標識TALEN、それらの組み合わせであり得る。

【0739】

本発明は、操作された細胞を検出するため、特にwt TRAC遺伝子、欠失を有するTRAC遺伝子、TRAC遺伝子に0.5.kb、1kb、2, kb、3 kb、4 kb~5 kb挿入物が挿入されたTRAC遺伝子を検出するための方法を提供する。本発明のそのような方法は、wt TRAC遺伝子を認識、結合する手段、欠失、変異または挿入を起こした改変されたTRAC遺伝子を認識、結合する手段を含む。

【0740】

操作されたTRAC遺伝子は、エンドヌクレアーゼ結合部位を維持し得る。したがって、特定の態様において、本発明の手段は、エンドヌクレアーゼの結合配列であるまたはそれに相補的である配列を含む。

【0741】

特定の態様において、本発明の手段は、TRAC遺伝子の5'側の10~15個の最初のヌクレオチドに結合するポリヌクレオチド配列およびTRAC遺伝子の3'側の10~15個の最後のヌクレオチドに結合する別のポリヌクレオチド配列を含む。本発明は、wt TRAC遺伝子または欠失、変異もしくは挿入を含む改変されたTRAC遺伝子を検出する方法を提供する。

【0742】

本発明は、

(i) TRACが改変された細胞および適当な対照として使用される細胞のDNAを精製する段階、

(ii) 該DNAを、本発明の改変されたTRAC遺伝子またはwt TRAC遺伝子を検出する手段と共にインキュベートし、混合物を得る段階、

(iii) 該混合物をPCRに供する段階、

(iv) PCR産物を配列決定する段階

を含む、wt TRAC遺伝子または欠失、変異もしくは挿入を含む改変されたTRAC遺伝子を検出する方法を提供する。

【0743】

特定の態様において、本発明の手段は、TALENの結合配列に相補的な、好ましくはTTGTCCCACAGATATCC, CCGTGTACCAAGCTGAGAGA

10

20

30

40

50

に相補的な、または
TTGTCCCACAGATATCC, CCGTGTACCAGCTGAGAGA

を含む配列を含む。

【0744】

特定の態様において、本発明の手段は、メガヌクレアーゼの結合配列であるまたはメガヌクレアーゼの結合配列に相補的な配列を含む。

【0745】

特定の態様において、本発明の手段は、コンパクトTALENヌクレアーゼの結合配列に相補的な配列を含む。

10

【0746】

特定の態様において、本発明の手段は、megaTALヌクレアーゼの結合配列に相補的な配列を含む。

【0747】

特定の態様において、本発明の手段は、Crispr/Cas9システムのガイドが結合する配列に相補的である配列を含むまたはTRAC遺伝子を操作するために使用されるガイドを含む。

20

【0748】

すべての例において、この手段は、エンドヌクレアーゼの第1の単量体によって認識されるまたは認識された、エンドヌクレアーゼによって認識される配列（相同アーム）のちょうど上流にある操作されたTRAC遺伝子内の配列を認識するよう設計された配列を含み得る（このヌクレアーゼの結合ドメインが切断されても、ちょうど上流の配列は操作されたTRAC遺伝子内にとどまる）。

【0749】

本明細書で使用される場合、「認識配列」という用語は、エンドヌクレアーゼによって結合および切断されるDNA配列を表す。

【0750】

TALENの場合、認識配列は、2つの部位、すなわち5'から3'方向に、左側認識配列、それに続く右側認識配列、より好ましくは、

TTGTCCCACAGATATC および CCGTGTACCAGCTGAGA

30

を含む。

【0751】

メガヌクレアーゼの場合、認識配列は、4つの塩基対によって隔てられた一対の逆方向9塩基対「半部位」を含む。単鎖メガヌクレアーゼの場合、そのタンパク質のN末端ドメインが第1の半部位と接触し、そのタンパク質のC末端ドメインが第2の半部位と接触する。メガヌクレアーゼによる切断は、4塩基対の3'「オーバーハング」を生じる。「オーバーハング」または「粘着末端」は、二本鎖DNA配列のエンドヌクレアーゼ切断によって生成され得る短い一本鎖のDNAセグメントである。I-CreI由来のメガヌクレアーゼおよび単鎖メガヌクレアーゼの場合、オーバーハングは、22塩基対認識配列の塩基10～13を含む。コンパクトTALENの場合、認識配列は、I-TevIドメインによって認識される第1のCNNNGN配列、それに続く4～16塩基対長の非特異的スペーサー、それに続くTAL-エフェクタードメインによって認識される16～22bp長の第2の配列（この配列は典型的に、5' T塩基を有する）を含む。コンパクトTALENによる切断は、2塩基対3'オーバーハングを生じる。CRISPRの場合、認識配列は、Cas9切断を誘導するようガイドRNAが結合する、典型的に16～24塩基対の配列である。CRISPRによる切断は、平滑末端を生じる。

40

【0752】

本明細書で使用される場合、「標的部位」または「標的配列」または「オンサイト」または「オンサイト標的」という用語は、（変異、欠失または挿入を導入するために）改変または編集されることが意図される、ヌクレアーゼの認識配列を含む細胞の染色体DNAの領域を表す。

50

【 0 7 5 3 】

オフターゲット部位またはオフターゲット配列は、（編集されることが意図されている）想定される標的配列ではなく、試験されるTALENに対して低い特異性および／または低い親和性で結合し得る、ヌクレアーゼの第2の認識配列を含む細胞の染色体DNAの領域を表す。

【 0 7 5 4 】

本発明の好ましいTALEN：

本明細書で使用される場合、「DNA結合親和性」または「結合親和性」という用語は、参照DNA分子（例えば、認識配列または任意配列）に対して非共有結合により結合するヌクレアーゼの傾向を意味する。結合親和性は、解離定数3/4によって測定される。本明細書で使用される場合、ヌクレアーゼは、参照認識配列に対するそのヌクレアーゼのKdが参照ヌクレアーゼと比較して統計学的に有意な割合の変化により増加または減少している場合、「変更された」結合親和性を有する。本発明において、TALENは、以下の配列
5' TGATCCTTGTccccacagatatccagaaccctgaccctgcccgtgtaccagctgagaga 3'

10

または、5'から3'方向に、

TTGTCCCACAGATATC

（第1もしくは左側結合部位、第1もしくは左側認識ドメイン）

CCGTGTACCACTGAGA

20

（第2もしくは右側結合部位 - 第2もしくは右側認識ドメイン）を含む

TTGTCCCACAGATATCAGAACCTGACCCTGCCGTGTACCACTGAGA (SEQ ID N°8)

20

に優先的に結合し得る。

【 0 7 5 5 】

好ましい態様において、この手段は、操作されたTRAC遺伝子に挿入されたTAGおよび／またはヌクレアーゼの認識配列の上流のTRAC遺伝子の一部に結合する配列を含む。

【 0 7 5 6 】

以下の下線が付された配列は、操作された細胞の検出のための本発明のプローブまたは手段を設計する基礎として使用される候補配列に対応する

DDDDDDDDDDDDTTGTCCCACAGATATCAGAACCTGACCCTGCCGTGTACCACTGAGAADDDDDDDDDDDDDDDDD

30

DDDDDDDDDDDDDD

：第2の認識ドメインの上流（第1の認識ドメインの5'側）または下流のTRAC遺伝子の配列。

【 0 7 5 7 】

別の態様によれば、本発明にしたがうプローブまたは手段は、TRAC遺伝子の配列の一部およびTALENの第1の認識ドメインの一部を含み得る。

40

【 0 7 5 8 】

別の態様によれば、本発明にしたがうプローブまたは手段は、TALENの第1の認識ドメインの一部またはTALENの第1の認識ドメイン全体を含み得る。

【 0 7 5 9 】

別の態様によれば、本発明にしたがうプローブまたは手段は、TALENの第1の認識ドメインを含み得る。

【 0 7 6 0 】

別の態様によれば、本発明にしたがうプローブまたは手段は、組み込まれたポリペプチドの配列のTALEN部分の第1の認識ドメインを含み得る。

【 0 7 6 1 】

50

別の態様によれば、本発明にしたがうプローブまたは手段は、ゲノムに組み込まれたポリヌクレオチド、自己切斷ペプチドをコードする配列、IRESをコードする配列、CARをコードする配列に結合する配列またはドメインを含み得、該配列は、以下のうちの1つであつてよく：

DDDDDDDDDDDDTTGTCCCACAGATATCAGAACCTGACCCTGCCGTGTACAGCTGAGADDDDDDDDDDDDD,

DDDDDDDDDDDDTTGTCCCACAGATATCAGAACCTGACCCTGCCGTGTACAGCTGAGADDDDDDDDDDD,

DDDDDDDDDDDDTTGTCCCACAGATATCAGAACCTGACCCTGCCGTGTACAGCTGAGADDDDDDDDDDD,

DDDDDDDDDDDDTTGTCCCACAGATATCAGAACCTGACCCTGCCGTGTACAGCTGAGADDDDDDDDDDD,

DDDDDDDDDDDDTTGTCCCACAGATATC(XXX)nCCGTGTACAGCTGAGADDDDDDDDDDD

ここで(XXX)nはタグを含む組み込まれたポリヌクレオチドであり、タグは非コード配列、タンパク質、例えば自己切斷ペプチド、CARをコードする配列であり得、Dは塩基を表し、連続するDはゲノムのwt TRAC遺伝子との相同部分を表す。

【0762】

本発明の手段は、WO 2017062451におけるまたはWO 2017106528に開示される又クレアーゼの「認識配列」に基づいて設計されたものであるが、本明細書に示される他の認識配列にも基づいており、好ましくは、算出されたかまたは算出およびインシリコで測定されたかのいずれかのオフサイトの頻度は、これまでに生成されたヌクレアーゼを用いて生成されたものを上回らないであろう。

【0763】

本発明のTALENは、TALENに適合されたguide-seq法を含む、現在までにオフターゲットを検出するものとして開示されている方法の任意の一つを用いて検出可能なオフサイト標的を有さない。

【0764】

本発明のTALENは、ヒト細胞のゲノム内の活性な遺伝子を標的としつつ切断する（活性は、その遺伝子が正常な細胞において、正常な成体細胞において、正常な前駆細胞において、正常な胚性細胞において発現されることを意味する）。

【0765】

好ましい態様において、本発明のTALENは、TCR遺伝子、より好ましくはTCRアルファまたはTCRベータ、TCRデルタまたはTCRガンマ、さらにより好ましくはTCRアルファおよび/またはベータの成分を標的としつつ切断する。

【0766】

TCRアルファまたはベータ定常領域の停止コドンを切断するTALEN。TCRベータ定常領域は、2つの候補遺伝子（TRBC1およびTRBC2）を有する。

【0767】

停止に対するTALEN TRAC

hsTRAC_ex1
gatacgaacctaaacttcaaaacctgtcagtgattgggtccgaatcctcctcgtaaagtggccgggttaatctgctcatgac-
tgattgggtccgaatcctcctcgtaaagtggccgggttaatctgctcatgac-
gctgcggctgtggccagcTGAgttgaggggcctgaagctggg

【0768】

10

20

30

40

50

4つのTALENが同定された。

TCTGCTCATGACGCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGAGGTGAGGGGCCTGAA

TCTGCTCATGACGCTGC GGCTGTGGTCCAGCTG AGGTGAGGGGCCTGAA

TGCTCATGACGCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGAGGTGAGGGGCCTGAA

TGCTCATGACGCTGCGG CTGTGGTCCAGCTG AGGTGAGGGGCCTGAA

10

TGACGCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGAGGTGAGGGGCCTGAAAGCTGGGA

TGACGCTGCGGCTGTGG TCCAGCTGAGGTGAG GGGCCTGAAGCTGGGA

TGGTCCAGCTGAGGTGAGGGGCCTGAAAGCTGGAGTGGGTTAGGGA

TGGTCCAGCTGAGGTGA GGGCCTTGAAGCTG GGAGTGGGTTAGGGA

20

【 0 7 6 9 】

特異性結果に基づく最良のTALENは、TALEN2である。

TGCTCATGACGCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGAGGTGAGGGGCCTGAA

TGCTCATGACGCTGCGG CTGTGGTCCAGCTG AGGTGAGGGGCCTGAA

【 0 7 7 0 】

hSTRBC1_stop

taaccccaaaaacttcttctgcagGTCAAGAGAAAGGATTCTgaAGGCAGCCCTG-

30

GAAGTGGAGTTAGGAGCTTAACCGTCATGGTTCAATA

【 0 7 7 1 】

3つのTALENが同定された。

TCTGCAGGTCAAGAGAAAGGATTCTGAAGGCAGCCCTGGAAGTGGAA

TCTGCAGGTCAAGAGAA AGGATTCTGAAG GCAGCCCTGGAAGTGGAA

40

TTTCTCTCTGCAGGTCAAGAGAAAGGATTCTGAAGGCAGCCCTGGA

TTTCTCTCTGCAGGTCA AAGAGAAAGGATTTC TGAAGGCAGCCCTGGA

TTCTGAAGGCAGCCCTGGAAGTGGAGTTAGGAGCTTCTAACCGTCA

TTCTGAAGGCAGCCCTG GAAGTGGAGTTAG GAGCTTCTAACCGTCA

【 0 7 7 2 】

50

特異性結果に基づき同定された最良のTALENは、以下のTALENである。
 TTCTGAAGGCAGCCCTGGAAGTGGAGTTAGGAGCTTAACCCGTCA

TTCTGAAGGCAGCCCTG GAAGTGGAGTTAG GAGCTTCTAACCCGTCA

【 0 7 7 3 】

hSTRBC2_stop

tagccccgtgaaaaccctgaaaatgttctcttccacagGTCAAGAGAAAGGAT-

TCCAGAGGCtagCTCCAAAACCATCCCAGGTCAATTCTCATCCTCACCCACTCCAAAAC- 10

CATCCCAGGTCAATTCTTCATCC

【 0 7 7 4 】

4つのTALENが同定された。

TGAAAATGTTCTCTCTTCCACAGGTCAAGAGAAAGGATTCCAGAGGCTA

TGAAAATGTTCTCTCTT CCACAGGTCAAGAGA AAGGATTCCAGAGGCTA

20

TTCTCTCTTCCACAGGTCAAGAGAAAGGATTCCAGAGGCTAGCTCCAAA

TTCTCTCTTCCACAGGT CAAGAGAAAGGATTTC CAGAGGCTAGCTCCAAA

TTCTCTCTTCCACAGGTCAAGAGAAAGGATTCCAGAGGCTAGCTCCAAA

TCTCTCTTCCACAGGTCA AAGAGAAAGGATTCC AGAGGCTAGCTCCAAA

30

TAGCTCCAAAACCATCCCAGGTCAATTCTCATCCTCACCCACTCCAAAA

TAGCTCCAAAACCATCC CAGGTCAATTCTCAT CCTCACCCACTCCAAAA

【 0 7 7 5 】

特異性に基づく最良のTALENは、TALEN2（または4）である。

TTCTCTCTTCCACAGGTCAAGAGAAAGGATTCCAGAGGCTAGCTCCAAA

TTCTCTCTTCCACAGGT CAAGAGAAAGGATTTC CAGAGGCTAGCTCCAAA

30

【 0 7 7 6 】

他の態様において、本発明のTALENは、特許出願62/410,187（KO/KI）に開示される遺伝子の任意の一つを標的としあつ切断する。

【 0 7 7 7 】

投与後も安定であり、オフサイト切断の頻度がほぼゼロであるヒトに投与可能な薬物または医薬（ユニバーサルTCR陰性CART細胞または既製品）を製造するために、本発明者らは、本発明のTALENを用いた際に発生し得るオフサイトの頻度を体系的に分析し、そのデータを、TCRアルファベータタンパク質の細胞外または膜貫通ドメインをコードするヒトTRAC遺伝子の同じ配列（または連続する配列）（これらは、欠失、挿入によって不活性化されたときに、機能的なTCRアルファベータの細胞表面発現を減少させるであろう）

40

50

を標的とすることが報告されているメガヌクレアーゼ、MegaTAL、crispr/casシステムを用いて得られたデータと比較した。

【0778】

そのような細胞の安定性を測定するために、免疫細胞を用いておよびUSP 62/537,435に記載される標的となる抗原を発現する細胞を用いて数週間（少なくとも5週間）の間毎日細胞を検査するインビトロシステムを構築した。

【0779】

また、本発明の細胞を用いる「同種異系療法」を受けた2名の健常個体（ヒト）由來の血液サンプルを、血液中の細胞の存在について、最初の注射後4週間分析した。

【0780】

TAGは、それを含む操作されたヒト細胞の検出を可能にする要素、好ましくは遺伝的要素、例えば配列を意味する。

【0781】

本発明のTAGは、エンドヌクレアーゼ認識ドメイン、自己切断ペプチドをコードする配列もしくは配列の一部、IRESおよび/またはレアカットエンドヌクレアーゼ、例えばTAL EN、CRISPR、メガヌクレアーゼ、メガタル（megatal）、ジンクフィンガーの認識配列の上流の配列のちょうど下流の配列もしくは配列の一部を含み得る。

【0782】

検出は、特異的な抗体、オリゴヌクレオチド、好ましくは2つのヌクレオチド、RNA、DNA、それらの組み合わせであり得る検出手段を用いて達成される。

【0783】

本発明にしたがい、手段は、操作されたTRAC遺伝子に挿入されたタグおよび/またはこの挿入物の5'側のTRAC遺伝子の一部、TRAC遺伝子に挿入された配列（CAR、外因性TCR、薬物に対する感受性を細胞に与える遺伝子）の一部を認識するよう設計された配列を含み得る。

【0784】

1つの態様において、TRAC遺伝子に挿入されるタグは、自己切断ペプチドをコードする配列および/または別の選択された配列、例えば
GAC TAC AAA GAC GAT GAC GAC AAG,

TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT, CAC CAC CAC CAC CAC, GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA
GAG GAT CTG

またはCostea PI, Lundeberg J, Akan P (2013) TagGD: FAST and Accurate Software for DNA Tag Generation and Demultiplexing. PLoS ONE 8(3): e57521. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0057521>に記載されるものの任意の一つを含み得る。

【0785】

これらのタグの任意の一つを検出する手段は、本発明の一部である。

【0786】

加えて、本発明者らは、切断およびCARの挿入により操作された場合に細胞表面上でのTCR発現を抑制するTCRアルファの3つのエクソン内の適切な標的配列ならびに検出可能なオフサイトを決定した。

【0787】

したがって本発明は、以下の配列：

10

20

30

40

50

GAGAATCAAATCGGTGAATAGG, TTCAAAACCTGTCAGTGATTGGG, TGTGCTAGACATGAGGTCTATGG,
 CGTCATGAGCAGATTAAACCCGG, TCAGGGTTCTGGATATCTGTGGG, GTCAGGGTTCTGGATATCTGTGG,
 TTCGGAACCCAATCACTGACAGG, TAAACCCGGCCACTTCAGGAGG, AAAGTCAGATTGTTGCTCCAGG,
 AACAAATGTGTCACAAAGTAAGG, TGGATTAGAGTCTCTCAGCTGG, TAGGCAGACAGACTTGTCACTGG,
 AGCTGGTACACGGCAGGGTCAGG, GCTGGTACACGGCAGGGTCAGGG, TCTCTCAGCTGGTACACGGCAGG,
 10 TTCAAAACCTGTCAGTGATTGG, GATTAACCCGGCCACTTCAGG, CTCGACCAGCTTGACATCACAGG,
 AGAGTCTCTCAGCTGGTACACGG, CTCTCAGCTGGTACACGGCAGGG, AAGTTCCGTGATGTCAAGCTGG,
 ATCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGG, TGCTCATGACGCTGCGGCTGTGG, ACAAAACTGTGCTAGACATGAGG,
 ATTTGTTGAGAATCAAATCGG, CATCACAGGAACCTTCTAAAAGG, GTCGAGAAAAGCTTGAAACAGG,
 CCACTTCAGGAGGAGGATTCGG, CTGACAGGTTTGAAAGTTAGG, AGCTTGAAACAGGTAAGACAGG,
 20 TGGAATAATGCTGTTGAAGG, AGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGG, CTGTGGTCCAGCTGAGGTGAGGG,
 CTGCGGCTGTGGTCCAGCTGAGG, TGTGGTCCAGCTGAGGTGAGGG, CTTCTCCCCAGCCCAGGTAAGG,
 ACACGGCAGGGTCAGGGTTCTGG, CTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGG, CTGGGGAAAGAAGGTGTCTCTGG,
 TCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGG, TTAATCTGCTCATGACGCTGCGG, ACCCGGCCACTTCAGGAGGAGG,
 TTCTCCCCAGCCCAGGTAAGGG, CTTACCTGGGCTGGGAAGAAGG, GACACCTTCTCCCCAGCCCAGG,
 GCTGTGGTCCAGCTGAGGTGAGG, CCGAATCCTCCTCCTGAAAGTGG

30 、その相補的配列の一つを含む本発明のTCR操作細胞を検出するための少なくとも1つの手段を提供し、この手段は、例えば、ペプチド2A配列のCAR配列に結合し、本発明にしたがうPCRを可能にする手段と組み合わされ得る。

【 0 7 8 8 】

他の態様において、本発明はまた、以下の配列

AGAGTCTCTCAGCTGGTACA,
GCACCAAAGCTGCCCTTACC, AAGTTCCGTGATGTCAAGC, TTGGAAACCCAATCACTGAC,
GATTAAACCCGGCCACTTTC, CGTCATGAGCAGATTAAACC, CTCAGGTTAGATCAGAAG,
TAGGCAGACAGACTTGTAC, AACAAATGTGTACAAAGTA, CACCAAAGCTGCCCTTACCT,
CTGACAGGTTTGAAAGTT, TTCAAAACCTGTCAGTGATT, CCGAATCCTCCTGAAAG,
CCACTTCAGGAGGAGGATT, TAAACCCGGCCACTTCAGG, TCTCAAACAAATGTGTACAAAGTA,
CTTACAATCTGCAGATCTGGAATG, TTAATCTGCTCATGACGCTG, GGAGAAGAGGGGCAATGCAG,
TCTTCTCCCTCTCCAAACAG, AGCAGCTTCACCTCCTGG, GTAGCAGCTTCACCTCCTT,
AGTTGGTGCATTGCCGGGG, TCTGTGATATAACACATCAGAATC, TCTGTGATATAACACATCAGAATCC,
GAGTCTCTCAGCTGGTACACGGC, GAGTCTCTCAGCTGGTACACGGCA, ATTCTCAAACAAATGTGTACAA,
ATTCTCAAACAAATGTGTACAAA, GTCTGTGATATAACACATCAGAAT, GTCTGTGATATAACACATCAGAATC,
GAGAATCAAACAAATCGGTGAATAGG, TGTGCTAGACATGAGGTCTATGG, TCAGGGTTCTGGATATCTGTGGG,
GTCAGGGTTCTGGATATCTGTGG, AAAGTCAGATTGTTGCTCCAGG, AACAAATGTGTACAAAGTAAGG,
TGGATTTAGAGTCTCTCAGCTGG, TAGGCAGACAGACTTGTCACTGG, AGCTGGTACACGGCAGGGTCAGG,
GCTGGTACACGGCAGGGTCAGGG, TCTCTCAGCTGGTACACGGCAGG, AGAGTCTCTCAGCTGGTACACGG,
CTCTCAGCTGGTACACGGCAGGG, ACAAAACTGTGCTAGACATGAGG, ATTTGTTGAGAATCAAATCGG,
TGGAATAATGCTGTTGAAGG, AGAGCAACAGTGTGCTGGCCTGG, CTTCTCCCCAGCCCAGGTAAGG,
ACACGGCAGGGTCAGGGTTCTGG, CTTCAAGAGCAACAGTGTGTTGG, CTGGGAAGAAGGTGTCTCTGG,
TTCTCTCCCCAGCCCAGGTAAGGG, CTTACCTGGCTGGGAAGAAGG, GACACCTTCTCTCCCCAGCCCAGG,
TTCAAAACCTGTCAGTGATTGGG, CGTCATGAGCAGATTAAACCCGG, TTGGAAACCCAATCACTGACAGG,
TAAACCCGGCCACTTCAGGAGG, TTTCAAACCTGTCAGTGATTGG, GATTAAACCCGGCCACTTCAGG,
CTCGACCAGCTGACATCACAGG, AAGTTCTGTGATGTCAAGCTGG, ATCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGG,
TGCTCATGACGCTGGCTGTGG, CATCACAGGAACCTCTAAAAGG, GTGAGAAAAGCTTGAAACAGG,
CCACTTCAGGAGGAGGATTGG, CTGACAGGTTGAAAGTTAGG, AGCTTGAAACAGGTAAGACAGG,
CTGTGGTCCAGCTGAGGTGAGGG, CTGGCTGTGGCCAGCTGAGG, TGTGGTCCAGCTGAGGTGAGGGG,
TCCTCCTCTGAAAGTGGCCGGG, TTAATCTGCTCATGACGCTGG, ACCCGGCCACTTCAGGAGGAGG,
GCTGTGGTCCAGCTGAGGTGAGG, CCGAATCCTCCTGAAAGTGG

10

20

30

40

50

およびそれらのいずれか一つの相補的配列の少なくとも1つを含む配列を含む操作された免疫細胞（細胞は様々なエンドヌクレアーゼCrispr/Cas9を用いて操作されたものである）を検出するための手段を提供する。

【実施例】

【0789】

本発明は、以下の実施例によってさらに解説されるが、これらの実施例は限定をなすものとみなされるべきでない。当業者は、従来的な実験のみを用いて、本明細書に記載される特定の物質および手順に対する多くの等価物を認識するまたは確認することができるであろう。そのような等価物は、以下の実施例に続く特許請求の範囲に包含されることが意図されている。

10

【0790】

メガヌクレアーゼ、Crispr/cas9、ZnフィンガーまたはMegaTALにより誘導される実際のオフサイトの一覧を、以前にWO2014153470A2、WO2017062451、WO2015057980、WO2017106528に記載された各TRAC特異的エンドヌクレアーゼを用いて作成した。

【0791】

これらの一覧を作成するために、異なる遺伝的背景の異なるドナーが試験され得る。オフサイト配列は、適合されたguide seq法を用いて同定した。

【0792】

実施例1：TRAC遺伝子内のTALEN結合配列（または認識配列）、ならびに自己切断ペプチド、CAR、および終結シグナル（ポリA）を含むポリヌクレオチドの挿入のための操作されたTRAC遺伝子内の配列

20

本発明のアルファベータTCR欠失細胞を検出するための本発明の任意の手段、プローブ、オリゴヌクレオチドの設計の枠組み

TRACエクソン1（大文字）

30

40

50

ttggccaagattgatagcttgtgcctgcctgagtcccagtccatcacgagcagctggttc-
taagatgctattcccgataaaggcatgagaccgtgactt-
gccagccccacagagccccgccttgtccatcactggcatctggactccagcctgggtgggg-
caaagaggaaatgagatcatgtccataccctgatccttgcctccacagA-

TATCCAGAACCTGACCTGCCGTTACCAGCTGAGAGACTCTAA**TCCAG-**

TGACAAGTCTGTCTGCCTATTACCGATTTGAT-

TCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAATGTGCTA-

GACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAG-

CAACAAATCTGACTTGCATGTGCAAACGCCCTAACAAACAGCATTATTCCAGAAGACAC-

CTTCTTCCCCAGCCCAGGtaagggcagcttgggccttcgcaggctgttccttgctcag-

actaagaaaacagtgagccttgttctggcagtccagagaatgacacggaaaaaagcagatgaa-

gagaagggtggcaggagagggcacgtggcccagcctcagtcctccaactgagttccctgcctgccttgctcagactgttt-

ttccctgcctgcctgcctttgcctcagactgtttcccccttactgcttctaggcctcattctaagccccctctccaagtt-

gccccttactgtcttctaggcctcattctaagcccccttccaaagt-

gcctctccttatttctccctgtctgccaaaaatcttcccagctactaagtcagtctcac-

gcagtcactcattaacccaccaatcactgattgtgccggcacatgaatgcac

【 0 7 9 3 】

好ましい組み込み部位：

20

30

40

50

ttggccaagattgatagcttgtccgtccctgagtcggcgtccatcacgagcagctggttc-
taagatgctattccgtataaagcatgagaccgtgactt-
gccagccccacagagccccgcccgtccatcactggcatctggactccagcctgggtggg-
caaagagggaaatgagatcatgtcctaaccctgatccttgtccacagATATCCAG

10

XXX CCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTACCGATTT-

GATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGA-

CAAAACTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTGGCCTGGAG-

CAACAAATCTGACTTGCATGTGCAAACGCCCTCAACAAACAGCATTATTCCAGAAGACAC-

CTTCTTCCCCAGGCCAGGtaagggcagcttggcgcctcgcaggctttccctgctcag-

gaatggccagggtctgcccagagctctggtaatgatgtctaaaactcctctgattgggtctcgcccttatccattgccacaaaacccttttt

20

actaagaaacagtgagccttgttctggcagtccagagaatgacacggaaaaaagcagatgaa-

gagaaggtggcaggagagggcacgtggcccagcctcagtctctccaactgagttcctgcctgccttgctcagactgttt-

ttcctgcctgcctgccttgctcagactgttgcccttactgcttctaggcctattctaagcccttctccaagtt-

gccccttactgtcttctaggcctattctaagcccttctccaagtt-

gcctctccttattctccctgtgcaaaaatcttccagctcactaagtcaactgcac-

30

gcagtcaactcattaacccaccaatcaactgatttgccggcacatgaatgcac

XXXは、挿入されるポリヌクレオチドを表す。

【0794】

dsDNA切断(5')後に検出された配列

TRAC内の最も好ましい配列：

ttgtcccacagATATCCAG - TCRとインフレームの2A配列 - CAR配列 - pA - 右側相同部
別候補：

40

50

ttgtcccacagATATCCAGAAC - 2A 配列 - CAR 配列 - pA - 右側相同部

ttgtcccacagATATCCAGAACCC - 2A 配列 - CAR 配列 - pA - 右側相同部

ttgtcccacagATATCCAGAACCCCTGAC - 2A 配列 - CAR 配列 - pA - 右側相同部

ttgtcccacagATATCCAGAACCCCTGACCCT - 2A 配列 - CAR 配列 - pA - 右側相同部

ttgtcccacagATATCCAGAACCCCTGACCCTGAC - 2A 配列 - CAR 配列 - pA - 右側相同部

10

ttgtcccacagATATCCAGAACCCCTGACCCTGCGT - 2A 配列 - CAR 配列 - pA - 右側相同部

ttgtcccacagATATCCAGAACCCCTGACCCTGCGTGTAC - 2A 配列 - CAR 配列 - pA - 右側相同部

ttgtcccacagATATCCAGAACCCCTGACCCTGCCGTGTACAG - 2A 配列 - CAR 配列 - pA - 右側相同部

【 0 7 9 5 】

3' 側の可能性のある配列：制限なし、下線部の配列は存在しない場合がある：
左側相同部 -2A 配列 - CAR 配列 - pA - CCTGACCCTGCCGTGTACAGCTGAGAGACTCTAA

左側相同部 -2A 配列 - CAR 配列 - pA - CTGACCCTGCCGTGTACAGCTGAGAGACTCTAA

20

左側相同部 -2A 配列 - CAR 配列 - pA - TGACCCTGCCGTGTACAGCTGAGAGACTCTAA

左側相同部 -2A 配列 - CAR 配列 - pA - GACCCTGCCGTGTACAGCTGAGAGACTCTAA

左側相同部 -2A 配列 - CAR 配列 - pA - ACCCTGCCGTGTACAGCTGAGAGACTCTAA

左側相同部 -2A 配列 - CAR 配列 - pA - CCCTGCCGTGTACAGCTGAGAGACTCTAA

30

40

50

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA –CCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA –CTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA –TGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA –GCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA –CCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAA

(最も好ましい配列)。

10

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA –CGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA –GTGTACCAGCTGAGAGACTCTAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA –TGTACCAGCTGAGAGACTCTAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA –GTACCAGCTGAGAGACTCTAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA –TGTACCAGCTGAGAGACTCTAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA –GTACCAGCTGAGAGACTCTAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA –TACCAGCTGAGAGACTCTAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA –ACCAGCTGAGAGACTCTAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA –CCAGCTGAGAGACTCTAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA –CAGCTGAGAGACTCTAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA –AGCTGAGAGACTCTAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA –GCTGAGAGACTCTAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA –CTGAGAGACTCTAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA –TGAGAGACTCTAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA –GAGAGACTCTAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA –AGAGACTCTAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA –GAGACTCTAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA –AGACTCTAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA –GACTCTAA

20

30

40

【 0 7 9 6 】

TRAC内で調査された他のTALEN

エクソン1内 :

TCCAGTGACAAGTCTGTctgcctattcaccgaTTTGATTCTCAAACAA

【 0 7 9 7 】

(5'側の組み合わせ (TRACとインフレームの2A配列を含む))

50

ttgtccccacagATATCCAGAACCCCTGACCCCTGCCGTGTACCAAGCTGAGAGACTCTAAA 2A 配列 – CAR 配列

– pA – 右側相同部

ttgtccccacagATATCCAGAACCCCTGACCCCTGCCGTGTACCAAGCTGAGAGACTCTAAATCC 2A 配列 – CAR 配列

– pA – 右側相同部

ttgtccccacagATATCCAGAACCCCTGACCCCTGCCGTGTACCAAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGT 2A 配列 –

10

CAR 配列 – pA – 右側相同部

ttgtccccacagATATCCAGAACCCCTGACCCCTGCCGTGTACCAAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGAC 2A 配列 –

CAR 配列 – pA – 右側相同部

ttgtccccacagATATCCAGAACCCCTGACCCCTGCCGTGTACCAAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAG - 2A

配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

ttgtccccacagATATCCAGAACCCCTGACCCCTGCCGTGTACCAAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCT - 2A

20

配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

ttgtccccacagATATCCAGAACCCCTGACCCCTGCCGTGTACCAAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTC - -

2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

ttgtccccacagATATCCAGAACCCCTGACCCCTGCCGTGTACCAAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTC

C - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

30

ttgtccccacagATATCCAGAACCCCTGACCCCTGCCGTGTACCAAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTC

CCTA- 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

ttgtccccacagATATCCAGAACCCCTGACCCCTGCCGTGTACCAAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTC

CCTATT - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

ttgtccccacagATATCCAGAACCCCTGACCCCTGCCGTGTACCAAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTC

CCTATTCA - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

40

50

ttgtccccacagATATCCAGAACCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG

CCTATTCACCGAT - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

ttgtccccacagATATCCAGAACCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG

CCTATTCACCGATTT - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

ttgtccccacagATATCCAGAACCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG

CCTATTCACCGATTTGAT - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

ttgtccccacagATATCCAGAACCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG

CCTATTCACCGATTTGATTCT - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

ttgtccccacagATATCCAGAACCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG

CCTATTCACCGATTTGATTCTCAA - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

【 0 7 9 8 】

3' 側の可能性のある組み合わせ

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA – TTCACCGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA – TCACCGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA – CACCGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA – ACCGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA – CCGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA – CGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA – GATTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA – ATTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA – TTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA – TTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA – TTGATTCTCAAACAAATGTGTACAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA – TGATTCTCAAACAAATGTGTACAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA – GATTCTCAAACAAATGTGTACAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA – ATTCTCAAACAAATGTGTACAA

10

20

30

40

50

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA – TTCTCAAACAAATGTGTCACAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA – TCTCAAACAAATGTGTCACAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA – CTCAAACAAATGTGTCACAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA – TCAAACAAATGTGTCACAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA – CAAACAAATGTGTCACAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA – AAACAAATGTGTCACAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA – AACAAATGTGTCACAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA – ACAAATGTGTCACAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA – CAAATGTGTCACAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA – AAATGTGTCACAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA – AATGTGTCACAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA – ATGTGTCACAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA – TGTGTCACAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA – GTGTCACAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA – TGTCACAA

左側相同部 -2A 配列 – CAR 配列 – pA – GTCACAA

【 0 7 9 9 】

TATATCACAGACAAAAActgtgctagacatgagGTCTATGGACTTCAAGA

に結合する TRAC_T04

ttgtccccacagATATCCAGAACCCCTGACCCCTGCCGTGTACCGAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG

CCTATTCAACGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTG - 2A 配列 – CAR

配列 – pA – 右側相同部

ttgtccccacagATATCCAGAACCCCTGACCCCTGCCGTGTACCGAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG

CCTATTCAACGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTAT - 2A 配列 – CAR

配列 – pA – 右側相同部

10

20

30

40

50

ttgtccccacagATATCCAGAACCCCTGACCCTGCCGTGTACCAAGCTGAGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG

CCTATTACCGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTCAAAAGTAAGGATTCTGATGTTATATC - 2A 配列 -

CAR 配列 - pA - 右側相同部

ttgtccccacagATATCCAGAACCCCTGACCCTGCCGTGTACCAAGCTGAGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG

CCTATTACCGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTCAAAAGTAAGGATTCTGATGTTATATCACA - 2A

配列 - CAR 配列 - pA - 右側相同部

10

ttgtccccacagATATCCAGAACCCCTGACCCTGCCGTGTACCAAGCTGAGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG

CCTATTACCGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTCAAAAGTAAGGATTCTGATGTTATATCACAGAC- 2A

配列 - CAR 配列 - pA - 右側相同部

ttgtccccacagATATCCAGAACCCCTGACCCTGCCGTGTACCAAGCTGAGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG

CCTATTACCGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTCAAAAGTAAGGATTCTGATGTTATATCACAGACAAA - 2A

配列 - CAR 配列 - pA - 右側相同部

20

ttgtccccacagATATCCAGAACCCCTGACCCTGCCGTGTACCAAGCTGAGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG

CCTATTACCGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTCAAAAGTAAGGATTCTGATGTTATATCACAGACAAA -

2A 配列 - CAR 配列 - pA - 右側相同部

ttgtccccacagATATCCAGAACCCCTGACCCTGCCGTGTACCAAGCTGAGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG

CCTATTACCGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTCAAAAGTAAGGATTCTGATGTTATATCACAGACAAAACTG

TG - 2A 配列 - CAR 配列 - pA - 右側相同部

30

ttgtccccacagATATCCAGAACCCCTGACCCTGCCGTGTACCAAGCTGAGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG

CCTATTACCGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTCAAAAGTAAGGATTCTGATGTTATATCACAGACAAAACTG

TGCTA - 2A 配列 - CAR 配列 - pA - 右側相同部

ttgtccccacagATATCCAGAACCCCTGACCCTGCCGTGTACCAAGCTGAGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG

CCTATTACCGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTCAAAAGTAAGGATTCTGATGTTATATCACAGACAAAACTG

TGCTAGAC - 2A 配列 - CAR 配列 - pA - 右側相同部

ttgtccccacagATATCCAGAACCCCTGACCCTGCCGTGTACCAAGCTGAGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG

CCTATTACCGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTCAAAAGTAAGGATTCTGATGTTATATCACAGACAAAACTG

40

50

TGCTAGACATG - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

ttgtcccacagATATCCAGAACCCCTGACCTGCCGTGTACAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG
CCTATTACCGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCTGATGTTATATCACAGACAAAACTG

TGCTAGACATGAGG - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

ttgtcccacagATATCCAGAACCCCTGACCTGCCGTGTACAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG
CCTATTACCGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCTGATGTTATATCACAGACAAAACTG

10

TGCTAGACATGAGGTTCT - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

ttgtcccacagATATCCAGAACCCCTGACCTGCCGTGTACAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG
CCTATTACCGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCTGATGTTATATCACAGACAAAACTG

TGCTAGACATGAGGTCTATG - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

ttgtcccacagATATCCAGAACCCCTGACCTGCCGTGTACAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG
CCTATTACCGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCTGATGTTATATCACAGACAAAACTG

20

TGCTAGACATGAGGTCTATGGAC - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

【 0 8 0 0 】

TRAC_T05 (下線部の配列) : Talen 結合部位
TGAGGTCTATGGACTTCaagagcaacagtgctGTGGCTGGAGCAACAA

ttgtcccacagATATCCAGAACCCCTGACCTGCCGTGTACAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG
CCTATTACCGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCTGATGTTATATCACAGACAAAACTG

30

TGCTAGACATGAGGTCTATGGAC - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

ttgtcccacagATATCCAGAACCCCTGACCTGCCGTGTACAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG
CCTATTACCGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCTGATGTTATATCACAGACAAAACTG

TGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTC - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

40

ttgtcccacagATATCCAGAACCCCTGACCTGCCGTGTACAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG
CCTATTACCGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCTGATGTTATATCACAGACAAAACTG

TGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTC - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

50

ttgtccccacagATATCCAGAACCTGACCCTGCCGTGTACCAAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG

CCTATTCAACCGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAAACTG

TGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGC - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

ttgtccccacagATATCCAGAACCTGACCCTGCCGTGTACCAAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG

CCTATTCAACCGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAAACTG

TGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAAC - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

10

ttgtccccacagATATCCAGAACCTGACCCTGCCGTGTACCAAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG

CCTATTCAACCGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAAACTG

TGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGT - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

ttgtccccacagATATCCAGAACCTGACCCTGCCGTGTACCAAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG

CCTATTCAACCGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAAACTG

TGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTG - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

20

ttgtccccacagATATCCAGAACCTGACCCTGCCGTGTACCAAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG

CCTATTCAACCGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAAACTG

TGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTG - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

30

ttgtccccacagATATCCAGAACCTGACCCTGCCGTGTACCAAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG

CCTATTCAACCGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAAACTG

TGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGC - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

ttgtccccacagATATCCAGAACCTGACCCTGCCGTGTACCAAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG

CCTATTCAACCGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAAACTG

TGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGC - 2A 配列 – CAR 配列 –

pA – 右側相同部

40

ttgtccccacagATATCCAGAACCTGACCCTGCCGTGTACCAAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG

CCTATTCAACCGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAAACTG

TGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGC - 2A 配列 – CAR

配列 – pA – 右側相同部

hsTRAC_T01

TATCCAGAACCTGACCctgccgttaccagctGAGAGACTCTAAATCCA

ttgtcccacagATATCCAG - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

ttgtcccacagATATCCAGAAC - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

ttgtcccacagATATCCAGAACCT - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

ttgtcccacagATATCCAGAACCTGAC - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

10

ttgtcccacagATATCCAGAACCTGACCCT - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

ttgtcccacagATATCCAGAACCTGACCCTGCC - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

ttgtcccacagATATCCAGAACCTGACCCTGCCGTG - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

ttgtcccacagATATCCAGAACCTGACCCTGCCGTGTAC - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

ttgtcccacagATATCCAGAACCTGACCCTGCCGTGTACCAAG - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

20

ttgtcccacagATATCCAGAACCTGACCCTGCCGTGTACCAAGCTG - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

ttgtcccacagATATCCAGAACCTGACCCTGCCGTGTACCAAGCTGAGA - 2A 配列 – CAR 配列 – pA – 右側相同部

30

ttgtcccacagATATCCAGAACCTGACCCTGCCGTGTACCAAGCTGAGAGAC - 2A 配列 – CAR 配列 –

pA – 右側相同部

ttgtcccacagATATCCAGAACCTGACCCTGCCGTGTACCAAGCTGAGAGACTCT - 2A 配列 – CAR 配列

– pA – 右側相同部

【 0 8 0 2 】

40

エクソン2を標的とするTALENの例

TTAGAAAGTTCTGTGatgtcaagctggctcgAGAAAAGCTTGAAACA

に結合するTRAC_T02

【 0 8 0 3 】

実施例2 : TALEN実験プロトコルを用いてTRAC遺伝子座にCARを挿入することによるUCART細胞の生成

TRAC遺伝子座を破壊し、その転写制御下にCAR（例えば、CD22特異的m971 QR3またはCD123特異的K43 QR3）を配置する（TRAC-CAR）ために、TRAC遺伝子座の第1エクソンを標的とするTRAC TALENならびに自己切断性T2Aペプチドおよびそれに続くCAR

50

cDNAをコードするアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター修復マトリクスを調製した。PB MCを解凍し、TransactヒトTアセチベーター-CD3/CD28ビーズを用いて活性化させた。それらの活性化から3日後、T細胞を、最短で4時間後にトランスフェクトされるよう継代した。次いでT細胞を、AgilePulseシステム (Harvard Apparatus) を用いた100万細胞あたり1 μ gのTRAC TALENをコードするmRNAの0.4 cmキュベットへの電気的移入によってトランスフェクトした。エレクトロポレーション後、細胞を直ちに、 4×10^6 細胞/mLの濃度となるよう20 ng/ml IL-2および5% CTS (商標) 免疫細胞SRを補充したX-Vivo-15培地に希釈し、5%CO₂の存在下、37℃で、12ウェルプレート (ウェルあたり500 μ l)においてインキュベートした。

【0804】

5'側および3'側に300 kb相同アームを含む組み換えAAV6ドナーベクターを培養物に添加した (エレクトロポレーションから1.5時間後に、 3×10^4 vg/細胞の感染多密度で)。その後、編集された細胞を、20 ng/ml IL-2および5% CTS (商標) 免疫細胞SRを補充したX-Vivo-15培地中、30℃で一晩培養し、その後日から標準条件下に戻して培養した (37℃、 1×10^6 細胞/mL、20 ng/ml IL-2および5% CTS (商標) 免疫細胞SRを補充したX-Vivo-15培地)。次いで細胞を、標準条件下で拡張し、2~3日毎に継代した。トランスフェクション/形質導入から10日後に、TRACのノックアウトおよびCARの発現を、フローサイトメトリーによって評価した。

【0805】

次に、形質導入から10日後に、抗原提示細胞に対するCAR⁺ T細胞の細胞溶解能を、5%CO₂の存在下、37℃で4時間または一晩の共培養後にフロー型細胞毒性アッセイにおいて評価した。

【0806】

それらの抗原 (CD22またはCD123) 発現レベルに関して選択された標的細胞。CARTおよび標的細胞を、4時間実験については1:1、2:1、5:1および10:1ならびに0.1:1、0.2:1、0.5:1および1:1のエフェクター (CAR⁺) : 標的比でX-Vivo-15培地中で共培養した。培養培地に、5% CTS (商標) 免疫細胞SRを補充した。陽性 (DaudiまたはRaji) および陰性 (SUP-T1) 腫瘍細胞株を区別するために、陽性標的細胞をCFSEで染色し、SUP-T1をCellTrace紫色増殖マーカーで染色した。共培養の最後に、細胞生存率を測定し、非特異的標的細胞溶解に対する正規化の後に比溶解率を計算した。

【0807】

TRACおよびCD52遺伝子またはTRAC dCK遺伝子の同時編集により、それぞれ、アレムツズマブ処置またはPNA処置と共にまたはそれらの後に投与することができるTCR/CD52欠失T細胞またはTCR/dCK欠失T細胞が得られる。アレムツズマブは、リンパ球除去 (lymphodepletion) / 免疫抑制を媒介し、それによって生着を促進する。100万細胞あたり1 μ gのTRAC TALENをコードするmRNAおよび1 μ gのCD52 TALENまたはdCK TALENをコードするmRNAの電気的移入によりT細胞をトランスフェクトした唯一の違いを除いて、以前に記載されたのと同じプロトコルを使用した。

【0808】

並行して、細胞を、関心対象の異なるCARおよび対照CAR (CAR 1) をコードする異なるプラスミドを用いてトランスフェクトした。上清を48時間後に収集し、超遠心により濃縮した。異なる量 (μ l) の上清で形質導入されたJurkat細胞を用いて滴定を行った。4日後、CAR発現を、生/死細胞マーカーを用いた生きたRQR8⁺細胞に対するフローサイトメトリーによって評価し、ウイルス価を決定した。

【0809】

TALENが標的とするCAR遺伝子の、TRAC遺伝子座への組み込み。rAAV6は、1000 bp~100の相同アームに隣接するCARカセットおよび編集されるTRAC遺伝子座の下側パネルを含むものであった。

【0810】

活性化から3日後、T細胞を、100万細胞あたり1 μ gの量のTRAC TALENをコードする

10

20

30

40

50

mRNAで、好ましくは電気的移入によって、トランスフェクトしたまたはしなかった。1.5時間後、rAAV6ドナーベクターを、 3×10^4 vg/細胞の感染多重度で、培養物に添加したまたはしなかった。TCRおよびCARの発現を、生／死細胞マーカーと共にCD4、CD8、TCR mAb、CD22またはCD123組み換えタンパク質（全長）を用いた生きたT細胞に対するフローサイトメトリーによって評価した。

【0811】

その結果は、rAAV形質導入後のCAR⁺細胞の集団が、rLv形質導入後よりも均質であることを示している。

【0812】

このTCR KOおよびCAR KIの2-in-1戦略を用いると、TRAC遺伝子座におけるCARの組み込みは非常に効率的であり、CAR⁺ TCR⁻細胞の出現率が42%超に達する。

10

【0813】

抗原提示細胞に対する総細胞またはCAR⁺ T細胞の細胞溶解能を、フロー型細胞毒性アッセイにおいて評価した。細胞生存率を、それぞれ10:1、5:1、2:1および1:1または1:1、0.5:1、0.2:1および0.1:1に設定されたエフェクター／標的比でのCAR T細胞との4時間または一晩の共培養後に測定した。

【0814】

その結果は、rAAV6形質導入後に生成されたTRAC-CART細胞が、rLV形質導入後に生成されたUCARTと同程度にインピトロで細胞毒性であることを示している。

【0815】

活性化から3日後、T細胞を、100万細胞あたり1 μgのTRACおよびCD52 TALENをコードする各mRNAの電気的移入によってトランスフェクトしたまたはしなかった。1.5時間後、rAAV6ドナーベクターを、 3×10^4 vg/細胞の感染多重度で、培養物に添加したまたはしなかった。TCR、CD52およびCARの発現を、生／死細胞マーカーと共にCD4、CD8、TCR mAb、CD22またはCD123組み換えタンパク質（全長）を用いた生きたT細胞に対するフローサイトメトリーによって評価した。

20

【0816】

その結果は、このTCR KOおよびCAR KIの2-in-1戦略を2つ以上のTALENの使用に拡張できることを示している。以前に実証されたように、TRAC遺伝子座におけるCARの組み込みは非常に効率的かつ特異的であり、CAR⁺ TCR⁻細胞の出現率が47%超に達する。重要なことは、CD52 TALENをコードする1 μgのmRNAでのみT細胞をトランスフェクトした場合に、CD52遺伝子座においてCAR発現が検出されなかったことである。CAR⁺ T細胞の集団の80%超は、TCR およびCD52の両方に関してノックアウトされる。

30

【0817】

TALEN、メガヌクレアーゼ、Znフィンガーにより操作された初代細胞の特徴づけ - TRAC認識配列 - オフサイト測定

（すべてヒトT細胞受容体アルファ定常領域内の）ヒトTRAC遺伝子の認識配列を認識するよう操作された組み換えヌクレアーゼは、以前に、WO2017062451 Precision TRAC、WO2015057980またはWO2017106528で開示された。そのエンドヌクレアーゼの活性は、内因性TCRアルファベータの細胞外部分の失活、および最終的に、内因性アルファベータTCRの細胞表面の下方調節をもたらす。対応するZnフィンガーは、US2011158957で開示された。

40

【0818】

すべてのヌクレアーゼを、WO2013176915に開示される参照TALENと比較した。

【0819】

ヌクレアーゼがそれら各自の認識配列を認識および切断することができるかどうかを決定するため、白血球除去療法により単離された初代細胞を使用した。

【0820】

細胞を以下のように操作し、読み取りとしてアルファベータTCRの細胞表面発現を測定した。

50

【0821】

個々の実験において、精製された細胞集団を使用して、TRAC遺伝子の編集が全血細胞、精製ナイーブT細胞、精製メモリーT細胞等において相違し得るかどうかを試験した。

【0822】

操作されたTRAC遺伝子を検出する手段は、プローブ、オリゴヌクレオチド、1 kbを超えるTRAC遺伝子内のDNAのPCR增幅のために設計されたオリゴヌクレオチドである。標識された(P32)が、代替法として調製され得る。

【0823】

リアルタイムPCR、認識配列の上流のTRAC遺伝子の保存された領域を標的とするTaqManワンステップ逆転写定量PCR(qRT-PCR)等の任意のPCR法が適合され得、これらは本発明の一部である。

10

【0824】

オンターゲット組み込みを定量するために以下の配列：

GCTGGGGTTTGAGAAGAGATCCTATTAAATAAAAGAATAAGCAGTATTATAAGTAGGCCCTGCATTTCAGGTTCC

TTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTGGCCAAGATTGATAGCTTGTG

CCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTCTAAGATGCTATTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTG

ACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGCAAAGAG

20

GGAAATGAGATCATGTCCTAACCTGATCCTCTGTCCCACAGATATCCAGTCCGGTGAGGGCAGAGGAAGTCTT

CTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCGGGCC

を、以下の手段：

フォワード：GCTGGGGTTTGAGAAGAGATCC

リバース：GACTTCCTCTGCCCTCACC

プローブ：CCCTTGTCCATCACTGGCAT

30

を用いて増幅した。

【0825】

細胞を、それらの拡張の異なる時点で収集した。

【0826】

2工程の洗浄をX-Vivo15培地中で行い、その後に1回のさらなる洗浄を、37℃で30分間、140 U/mlのベンゾナーゼの存在下で行った。

【0827】

過剰なベンゾナーゼを除去するために、2回のさらなる洗浄が必要である。

【0828】

その後細胞を乾燥させてペレット状にし、-20℃で保存した。

40

【0829】

ゲノムDNAを、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)を製造元のガイドラインにしたがい用いて抽出する。

【0830】

gDNA濃度を、Quant-iT (商標) PicoGreen (商標) dsDNA Assay Kit (ThermoFisher Scientific)を用いて評価した。

【0831】

qPCRアッセイのために、プライマーおよびプローブ(FAM)を、フォワードプライマーがTRAC遺伝子座内の左側相同配列の外側に位置し、リバースプライマーがT2A配列内

50

に位置することで、373 bpの配列を増幅するよう設計する。プライマーおよびプローブの混合物を、300 nMのフォワードプライマー、900 nMのリバースプライマーおよび250 nMのプローブ (IDT Technologies) を含むTE緩衝液として調製する。

【0832】

別の好ましい態様において、プライマーおよびプローブの混合物を、300 nMのフォワードプライマー、900 nMのリバースプライマーおよび220 nMのプローブ (IDT Technologies) を含むTE緩衝液として調製する。

【0833】

別の好ましい態様において、プライマーおよびプローブの混合物を、300 nMのフォワードプライマー、900 nMのリバースプライマーおよび220 nMのプローブ (IDT Technologies) ならびに100~200 ng (10 µl)、好ましくは20~30 ng (10 µl) の範囲を使用する最適な量のgDNAを含むTE緩衝液として調製する。

10

【0834】

標的の増幅は、TaqMan Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher 4369514) を使用して行い、C1000 Touch (商標) Thermal Cycler (BioRad) において実行する。遺伝子の発現を、RPP30遺伝子の発現 (ddPCR (商標) CNV Assay, Validated (HEX)) に基づき正規化し、コピー数を、TRAC遺伝子座の配列に対応する数ヌクレオチド分を5'側に延ばした以前に記載されたような関心対象の配列を含む標準プラスミドの希釈物 (10^6 コピー / µl ~ 10^0 コピー / µl) から計算する。

【0835】

本発明に対応する配列を増幅するため、プライマー / プローブの濃度を調整し、アニール / 伸長工程を2倍に、例えば45秒間から1分30秒間に増やした。

20

【0836】

好ましくは、アニール / 伸長工程を45秒間から1分30秒間に増やし、61.5 °C で行った。

【0837】

以下の遺伝子についてのGUIDE SEQによるオンサイトおよび / またはオフサイト切断の決定 : CD28 Talen、CD28 Talen、CD28 CrisprおよびPD1 TALEN、TRAC Talen (2つのストリンジエンシー条件) CS1、CS1 + TRAC Talen、CD52 + TRAC Talen、CS1 + TRAC Talen

【0838】

30

dsODNの配列 :
GTTAATTGAGTTGTCATATGTTAATAACGGTAT

を、

40

50

AAGTAGCCCTGCATTCAGGTTCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGCCGTGAACGTTACTGAAATCATGGCC
TCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTCTAAGATGCTAT
TCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTGTCCATCACTGGCATCTGGAC
TCCAGCCTGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCCCTGATCCTTTGTCCCACAGATATCCAG
TCCGGTGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCGGGCCCCGGATCCGCTCTG 10
CCCGTCACCGCTCTGCTGCTGCCCTGCCCTGCTGCACGCCAGACCAGGGGGAGGAGGCTCCTGCCC
TTACTCTAACCCAAGCCTGTGCTCCGGAGGGAGGATCCGGGGAGGAGGCTTGAGGTGAAGCTGGTGG
GAGCGGAGGGAGGCCTGGTGCAGCCTGGCGGCCCTGTCTGAGCTGCGCAGCATCCGGCTCACTTACAG
ACTACTATATGTCTTGGGTGAGACAGCCCCCTGGCAAGGCCCTGGAGTGGCTGCCCTGATCAGGTCCAAGGCC
GATGGCTACACCACAGAGTATTCCGCCTGTGAAGGGCAGATTCACCTGTCTAGGGACGATGCCAGTCCATC
CTGTACCTGCAGATGAATGCACTGCGCCCCGAGGACAGCGCCACATACTATTGTGCCAGAGACGCCCTACTAT 20
TCTTACTATAGCCCTGAGGGCGCTATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCTCGTGACAGTGAGCTCCGGAGGAGG
AGGAAGCGGAGGGAGGCTCCGGCGGCCCTATGCCGACTATAAGGATATCGTGATGACCCAGAGC
CACAAAGTTATGTCTACAAGCGTGGCGACCGCGTGAACATCACCTGCAAGGCCAGGAATGTGGATTCCGC
CGTGGCCTGGTACCGAGCAGAACGCTGGCCAGGCCCTAACGACTGATCTATTCCGCCTTACCGGTAGCGG
AGTGCCTGACCGCTTACCGGAAGGGGATCCGGAACAGACTTCACCCCTGACAATCTAGCGTGCAGGCCGAG 30
GATCTGGCCGTACTATTGTCAGCAGTACTATAGCACCCCTGGACCTCGGCGGAGGAACCAAGCTGGAGATC
40

AAGAGAGGATCTGGAGGAGGAGGAAGCTGCCATACTCCAACCCCTCTGTGCAGCGGAGGAGGAGGATCTG
 AGCTGCCAACCCAGGGCACATTTCCAACGTGTCTACAAATGTGAGCCCAGCAAAGCCAACCACAACCGCATGC
 CCTTATAGCAATCCATCCCTGTGCACAACCACACCTGCACCAAGACCACCAACCCAGCACCTACAATGCCCTC
 AGCCACTGAGCCTGCGCCCCGAGGCATGCCGCCTGCAGCAGGCAGGCCGTGCACACCAGGGCCTGGACT
 TCGCCTGCGATATCTACATCTGGCACCTCTGGCAGGAACCTGTGGCGTGCTGCTGAGCCTGGTCATCACCC
 10
 TGTACTGCAAGAGAGGCAGGAAGAAGCTGCTGTATATCTCAAGCAGCCATTGCGCCCTGTGCAGACCACAC
 AGGAGGAGGACGGCTGCAGCTCGGTTCCCAGAAGAGGAGGGAGGGCGGCTGTGAGCTGAGAGTGAAGTT
 AGCAGGTCCGCCGATGCACCAGCATACCAGCAGGGACAGAACCCAGCTGTATAACGAGCTGAATCTGGCCCGA
 GAGAGGAGTACGACGTGCTGGATAAGAGGAGGGAGGGACAGATGGGAGGGCAAGCCACGGAGAAA
 GAACCCCCAGGAGGGCCTGTACAATGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTATTCCGAGATGGCATG
 AAGGGAGAGAGGCGCCGGGCAAGGGACACGATGGCCTGTACCAGGGCCTGTCTACCGCCACAAAGGACACC
 20
 TATGATGCCCTGCATATGCAGGCACTGCCCTCAAGGTGATCTAGAGGGCCGTTAAACCCGCTGATCAGCCTCG
 ACTGTGCCTTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCCGTGCCTCCTGACCTGGAAGGTGCCACTCC
 CACTGTCCTTCTAATAAAATGAGGAATTGCATCGCATTGCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGG
 GTGGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGATGCGGTGGCTATG
 ACTAGTGGCGAATTCCCGTGTACCAAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGCTGCCTATTACCGATT
 30
TGATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTATATCACAGACAAACTGTGCTAGACATGAGG
TCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTGCATGTGCAAACGCCCTCAAC
AACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTCCCCAGCCAGGTAAGGGCAGCTTGGTGCCTCGCAGGCTGTTTC
CTTGCTTCAGGAA

の存在下または非存在下でオフサイトおよびオンサイトへの挿入のために使用した。

【0839】

サンプル：

初代T細胞を、1000 pmolのDSオリゴヌクレオチドと共にTRACエンドヌクレアーゼまたは何もないのいずれかを用いて電気穿孔した。

【0840】

各条件の2つのサンプルを処理し、ゲノムDNAを抽出した。各ゲノムDNAを3つのアリコートに分け、GUIDE-seqプロトコルを用いて個別に処理した。

【0841】

ゲノムDNAを抽出し、標準的なGUIDE-seq手順に供した：

- ・超音波によるDNAのせん断
- ・平滑な先端部を有するようにする末端修復

10

20

30

40

50

・(一方の側のみでライゲートすることができるよう)一方の側が平滑であり、他方がオーバーハングを有するY字アダプターとのライゲーション

・DSオリゴと上記アダプターとの間での連続的なPCR:これらはオリゴの配列(隣接領域の一方の側を増幅する「プラス」増幅)またはオリゴの逆相補配列(隣接領域の他方の側を増幅する「マイナス」増幅)のいずれかを用いて行うことができる)

・その後、各PCR産物を両方の側(R1およびR2)で配列決定する。

【0842】

すべてのサンプルを、マイナスおよびプラス鎖の両方で増幅し、両先端部R1およびR2で配列決定する。

【0843】

ヌクレアーゼ:

TALENのアームは、以下の通りである(T0を含む)

・TRACの場合

TRACL=TTGTCCCACAGATAT および TRACR=TCTCAGCTGGTACAC

10

ゲノムのv37.1上のこの部位の位置:

・オンサイトTRAC:4016436位(4106460上のスペーサーの中心)から始まるコンティグNT_026437.12

【0844】

PCRに使用したプライマー

20

このオリゴの側で使用したプライマーは:

・プラス鎖の場合、第1のPCRで

ATACCGTTATTAACATATGACA (SEQ ID N°13)

、次いで第2のPCRで、

CAT-ATGACAACTCAATTAAAC (SEQ ID N°14)

・ ATACCGTTATTAACATATGACA (SEQ ID N°15) オリゴ(逆相補)

・ ATACCGTTATTAACATATGACA 第1のPCR (SEQ ID N°16)

30

・ CATATGACAACTCAATTAAAC 第2のPCR (SEQ ID N°17)

・マイナス鎖の場合、第1のPCRで

GTAAATTGAGTTGTCATATGTTAATAACGGTA (SEQ ID N°18)

、次いで第2のPCRで

TTGAGTTGTCATATGTTAATAACGGTA (SEQ ID N°19)

・ GTAAATTGAGTTGTCATATGTTAATAACGGTAT (SEQ ID N°20) オリゴ

40

・ GTAAATTGAGTTGTCATATGTTAATAAC 第1のPCR (SEQ ID N°21)

・ TTGAGTTGTCATATGTTAATAACGGTA 第2のPCR (SEQ ID N°22)

【0845】

生成物の構造

求められる生成物の構造は、以下のようなものであるべきであり、ここでDSオリゴヌクレオチドは大文字で、PCR後も残存すると考えられるプライマーは小文字で示され、未知のゲノム配列は

50

NNNNNNNNNN

で表される：

・「プラス」PCRの場合、

R1 -> aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctttccgatct-

NNNNNNNNNNNTTAATTGAGTTGTCATATG-

tatcaccgactgcccataagagaggactccaggactcaactaaggcgaatctcgtatgccgtttctgcttg <- R2

10

・「マイナス」PCRの場合

R2 -> caagcagaagacggcatacggatccgttagtgcgtggactggcctctatggcag-

tcggat-TTGAGTTGTCATATGTTAATAACGGTATNNNNNNNNNNNN-

agatcggaaagcgtcgtaggaaagagtgttagatctcggtggccgtatcatt <- R1

【0846】

配列データの処理：

最初に、読み取りを、予想されるプライマーの存在について試験した：

20

・マイナス_R2の読み取りについては、第1のTを含まない第2のプライマーの配列である

配列

TGAGTTGTCATATGTTAATAACGGTAT

の存在を確認した

・プラス_R2の読み取りについては、第2のPCRプライマーの配列である配列
CATATGACAACCTCAATTAAAC

の存在を確認した。

【0847】

30

R2の読み取りがこの配列を示さなかった場合、R2を除外した。その後、残りの読み取りを、20 bpの最小必要重複長のアダプターの存在について3'および5'側から連続的にトリミングし、10 bpより短い残存配列を破棄した。その数を：

・初期読み取り数

・(必要とされるオリゴについての)フィルター後の読み取り数

・短いトリミングされた配列を破棄した場合、トリミングされた読み取りの最終数
で表す。

【0848】

所定のエンドヌクレアーゼによるTRAC遺伝子内の所定部位についてのGUIDE-Seq読み取り数またはGUIDE-Seqスコアは、RNAまたはタンパク質ガイドヌクレアーゼによるその配列の切断効率の定量的尺度を表す。好ましくは、TRAC遺伝子に影響する本発明のRNAまたはタンパク質ガイドヌクレアーゼは、ほぼゼロ(検出不可)のスコアを有する。

40

【0849】

その結果は、TRAC遺伝子およびアルファベータTCRの細胞表面発現に影響する試験された4つのTALENについてのオンサイト切断を示している。オフサイト切断は、TALEN編集初代細胞において、TALENに適合されたguide-seq分析を用いて検出不可であった。

【0850】

トランスフェクションから48、72、96時間後に、適当な対照との比較でTCRアルファベータ陽性および陰性細胞の比率を決定するために、細胞をフローサイトメトリーによって評価した。試験したすべてのメガヌクレアーゼおよびcrisprは、TCR陰性細胞を生じる

50

ことが見出された。

【 0 8 5 1 】

抗CD22または抗CD123キメラ抗原受容体配列の挿入を、pcrおよびTCRアルファ定常領域遺伝子の配列決定によって確認した。

【 0 8 5 2 】

キメラ抗原受容体の細胞表面発現を、抗Fabまたはリツキシマブを用いたフローサイトメトリーによって確認した。細胞表面上の内因性T細胞受容体のノックアウトを、以前に記載されたようにしてフローサイトメトリーによって検証した。

【 0 8 5 3 】

これらの研究は、TALEN、メガヌクレアーゼおよびCrisprがヒトドナーから得られたT細胞内のTRAC遺伝子を認識および切断することができることを実証した。さらに、これらの研究は、挿入物の3'側でのインデルの発生により示されるように、NHEJが切断部位で起こることを実証した。さらに、TRAC TALENは、CARがゲノムTRAC遺伝子に挿入された細胞内にCD52 TALENが存在する場合でさえも、ドナーから得られたヒトT細胞においてT細胞受容体の細胞表面発現を減少させることを示した。

10

【 0 8 5 4 】

これらの研究は、外因性核酸配列を、他の部位(CD52、dCK)への挿入なしに相同組み換えを通じてTCRアルファ定常領域内の切断部位に特異的に組み込むために、AAVベクターが組み換えTALENまたはCrisprと共に使用され得ることを実証している。

【 0 8 5 5 】

20

実施例3

T細胞におけるIL-15およびCARをコードするマトリクスのTALEN(登録商標)を通じた二重標的化組み込み

この実施例は、PD1およびCD25遺伝子を調節する内因性T細胞プロモーターの制御下にIL-15/可溶性IL-15受容体アルファヘテロ二量体(IL15/sIL15r)発現力セットを組み込むことによりCAR T細胞療法の治療結果を改善する方法について記載する。両方の遺伝子ともCAR T細胞が腫瘍に接触した際に上方調節されることが公知であるので、腫瘍近傍でのみIL-15/sIL15rを再発現するようそれらを乗っ取ることができる。この方法は、活性化誘導T細胞死(AICD)を減少させ、T細胞の生存を促進し、T細胞の抗腫瘍活性を強化し、T細胞アネルギーを好転させるその能力を維持しつつ、IL15/sIL15rの全身分泌の潜在的副作用を減少させる。

30

【 0 8 5 6 】

IL15/sIL15rをPD1およびCD25遺伝子座に組み込むよう構築されたこの方法は、AAV6によってベクター化されたDNA修復マトリクスの存在下でTALENを用いて両方の遺伝子座において二本鎖断裂を生成することからなるものであった。このマトリクスは、2Aシス作用性エレメントならびに調節エレメント(停止コドンおよびポリA配列)によって隔てられたIL15/sIL15rコード領域を埋め込んだ2つの相同アームからなる。標的とされる遺伝子座およびT細胞活性におけるその関与に依存して、標的とされる内因性遺伝子は、個々のマトリクス設計を通じて不活性化され得るまたは不活性化されない。

【 0 8 5 7 】

40

CD25遺伝子を標的とする遺伝子座とした場合、挿入マトリクスは、この遺伝子のタンパク質産物がT細胞機能に必須であることから、CD25を不活性化せずに、IL15/sIL15rをノックイン(KI)するよう設計した。これに対して、PD1はT細胞阻害/T細胞の消耗に関与するので、挿入マトリクスは、IL15/sIL15rの発現および分泌を実現しつつその発現を抑制するよう設計した。

【 0 8 5 8 】

このアプローチを解説し、初代T細胞における多標的化挿入の実現性を実証するため、3つの異なるマトリクスを設計した。CARmと命名した第1のものは、TRAC TALENの存在下で抗CD22 CAR cDNAをTRAC遺伝子座に挿入するよう設計した。第2のものであるIL-15_CD25mは、CD25 TALEN(登録商標)を用いて、2Aシス作用性エレメントによって

50

隔てられたIL15、sIL15r および LNGFR cDNAと命名した表面マーカーをCD25内因性コード配列の停止コドンの直前に組み込むよう設計した。第3のものであるIL-15_PD1 mは、同じ発現カセットを含み、PD1 TALENを用いてPD1オープンリーディングフレームの中央に組み込まれるよう設計した。3つのマトリクスは、IL15/sIL15r およびCARと標的となる内因性遺伝子の共発現を可能にするよう、発現カセットの上流に位置する追加の2Aシス作用性エレメントを含んだ。

【 0 8 5 9 】

本発明者らは最初に、T細胞における二重標的化挿入の効率を、IL15/sIL15r マトリクスをコードするAAV6の1つをCARをコードするものと共に用いてそれらを形質導入することによって評価し、その後に対応するTALEN（登録商標）でトランスフェクトした。T RAC TALENおよびPD1またはCD25 TALENをコードするmRNAの存在下でのマトリクスのAAV6に基づくベクター化は、操作されたT細胞の46%超での抗CD22 CARの発現を実現した。

10

【 0 8 6 0 】

CD25およびPD1遺伝子座におけるIL15mの組み込み度を決定するため、操作されたT細胞を、抗CD3/CD28でコーティングされたビーズまたはCD22を発現するRaji腫瘍細胞のいずれかを用いて活性化させた。活性化から2日後、細胞を回収し、IL15/sIL15r 分泌の代理としてLNGFR発現を用いてFACSによって分析した。本発明者らの結果は、抗CD3/CD28でコーティングされたビーズが、抗CD22 CARの存在に非依存的に、IL-15m_CD25またはIL-15m_PD1を含むT細胞による LNGFRの発現を誘導したことを示した。しかし、腫瘍細胞は、CARmおよびIL-15mの両方により処理されたT細胞による LNGFRの発現を誘導したのみであった。このことは、 LNGFRの発現が、CARによる腫瘍細胞との接觸を通じて特異的に誘導され得ることを示した。

20

【 0 8 6 1 】

予想された通り、内因性CD25遺伝子は、活性化された処理されたT細胞においても発現されていた一方、PD1発現は、大きく損なわれた。

【 0 8 6 2 】

LNGFRの発現と培地中へのIL15の分泌の相関を検証するために、抗CD22 CARおよび LNGFRを発現するT細胞を、CD22発現Raji腫瘍細胞の存在下（E:T比 = 1 : 1）で合計10日間インキュベートした。第2、4、7および10日に上清を回収し、IL15の存在をELISAアッセイによって定量した。本発明者らの結果は、IL15が、CARmおよびIL15mマトリクスの両方によってそれらの対応するTALENと共に同時処理されたT細胞によってのみ培地中に分泌されたことを示した。これらのマトリクスのいずれか一方で処置されたT細胞は、休止状態のT細胞との比較で有意なレベルのIL15を分泌することができなかった。

30

【 0 8 6 3 】

分泌されたIL-15のレベルがCAR T細胞の活性に影響を及ぼし得るかどうかを評価するため、CAR T細胞を、腫瘍細胞の存在下、5 : 1のE : T比で4日間共培養した。それらをペレット化し、IL-2を欠き、新鮮な腫瘍細胞を含む培養培地に再懸濁することによって、それらの抗腫瘍活性を毎日検査した。CAR T細胞の抗腫瘍活性を、ルシフェラーゼを発現する残存するRaji腫瘍細胞の発光を測定することによって毎日観察した。本発明者らの結果は、IL-15を共発現するCAR T細胞が、検討したすべての時点において、IL-15を欠くそれらよりも高い抗腫瘍活性を有していたことを示した。

40

【 0 8 6 4 】

したがって、まとめると本発明者らの結果は、TRACおよびCD25またはPD1遺伝子座におけるCARおよびIL15 cDNAの同時標的化挿入を示した。この二重標的化挿入は、十分な抗CD22 CARの発現および培地中へのIL15の分泌をもたらした。分泌されたIL15のレベルは、CAR T細胞の活性を強化するのに十分であった。

【 0 8 6 5 】

本発明は、TALENにより改変された内因性 -TCR陰性ヒト初代細胞であって、そのゲノムTCR遺伝子（TRAC遺伝子）の定常領域が、内因性アルファベータTCRの細胞表面

50

発現に影響するTALENにより生成された遺伝的改変を含み、ゲノムTRAC遺伝子が、5'から3'方向に、

(a)ヒトゲノムTRAC遺伝子上流の5'領域、

(b)半TALEN用の認識ドメイン、

(c)アルファベータTCRの細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインの細胞表面発現に影響する野生型TRAC遺伝子と比較してのギャップまたは挿入であって、挿入が、非コード配列、例えば停止コドン、IRES、コード配列、例えばTRACオープンリーディングフレームとインフレームの自己切断ペプチドをコードする配列、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする配列、TCRをコードする配列、薬物に対する感受性を付与するタンパク質をコードする配列、薬物に対する耐性を付与するタンパク質をコードする配列、サイトカイン、終結配列、それらの組み合わせから選択される外因性ポリヌクレオチドを含む、ギャップまたは挿入、

(c')任意で、(a)もう一方の半TALEN用の認識ドメイン、

(d)ゲノムTRAC遺伝子の3'領域、

を含み、さらに、別の不活性化されたゲノム遺伝子、例えば、以下のコード遺伝子：インターロイキン3、インターロイキン2、ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド4、インターロイキン21、糖タンパク質49A、核受容体サブファミリー4、グループA、メンバー3、白血球免疫グロブリン様受容体、サブファミリーB、メンバー4、CD200抗原、サイクリン依存性キナーゼ阻害物質1A(P21)、グランザイムC、核受容体サブファミリー4、グループA、メンバー2、サイトカイン誘導性SH2含有タンパク質、ケモカイン(C-Cモチーフ)受容体8、ラジニン、細胞レチノイン酸結合タンパク質II、グランザイムB、T-ボックス21、プログラム細胞死1、プレクストリン、チェックポイントキナーゼ1、SLAMファミリーメンバー7、ジンクフィンガーおよびBTBドメイン含有32、IgおよびITIMドメイン含有T細胞免疫受容体、リンパ球活性化遺伝子3、グランザイムA、WEE1ホモログ1(分裂酵母(S. pombe))、インターロイキン12受容体、ベータ2、ケモカイン(C-Cモチーフ)受容体5、初期エンドソーム抗原1およびdentinelessホモログ(ショウジョウバエ(Drosophila))をコードする遺伝子、のいずれか一つを含む細胞、を包含する。

【0866】

本発明は、TALENにより改変された内因性-TCR陰性ヒト初代細胞を包含し、そのゲノムTCR遺伝子(TRAC遺伝子)の定常領域が、内因性アルファベータTCRの細胞表面発現に影響するTALENにより生成された遺伝的改変を含み、ゲノムTRAC遺伝子が、5'から3'方向に、

(a)ヒトゲノムTRAC遺伝子上流の5'領域、

(b)半TALEN用の認識ドメイン、

(c)アルファベータTCRの細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインの細胞表面発現に影響する野生型TRAC遺伝子と比較してのギャップまたは挿入であって、挿入が、非コード配列、例えば停止コドン、IRES、コード配列、例えばTRACオープンリーディングフレームとインフレームの自己切断ペプチドをコードする配列、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする配列、TCRをコードする配列、薬物に対する感受性を付与するタンパク質をコードする配列、薬物に対する耐性を付与するタンパク質をコードする配列、サイトカイン、終結配列、それらの組み合わせから選択される外因性ポリヌクレオチドを含む、ギャップまたは挿入、

(c')任意で、(a)もう一方の半TALEN用の認識ドメイン、

(d)ゲノムTRAC遺伝子の3'領域、

を含み、別の不活性化されたゲノム遺伝子、例えば、以下のコード遺伝子：CXCL13、NFRSF1B、RGS2、TIGIT、CD27、NFRSF9、SLA、NF19A、NPP5F、XCL2、HLA-DMA、FAM3C、QCRC1、WARS、EIF3L、KCNK5、TMBIM6、CD200、C3H7A、SH2D1A、ATP1B3、YO7A、THADA、PARK7、EGR2、FDFT1、CRTAMおよびIFI16、のいずれか一つをさらに含む。

【0867】

10

20

30

40

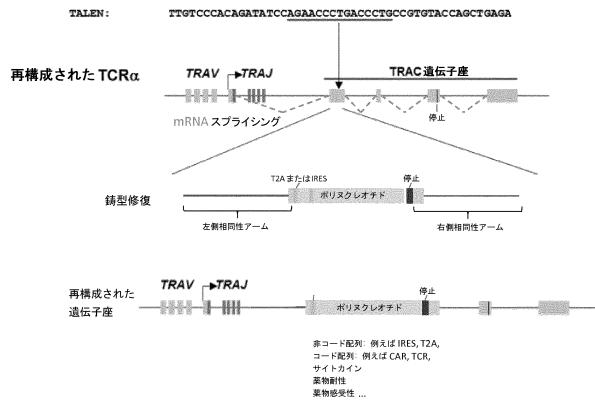
50

1つの特定の様態において、第2の不活性化される遺伝子は、挿入物を含み、挿入物は、サイトカイン、特にIL-3、IL-7、IL-12およびIL-15を含む。

【図面】

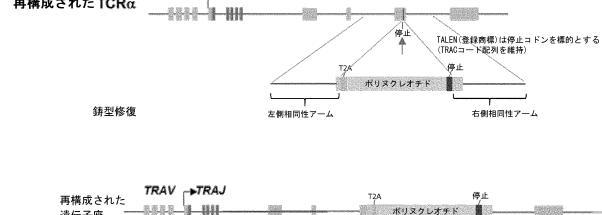
【図 1】

TCR KO, 外因性遺伝子を挿入



【図 2】

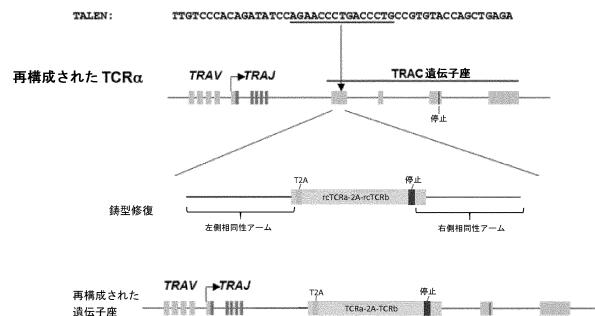
内因性TCRを維持、外因性遺伝子を共発現



10

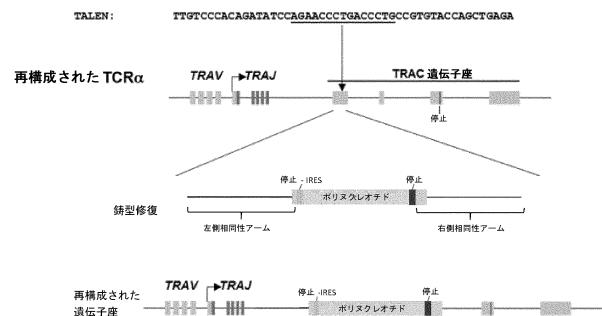
【図 3】

内因性TCRを不活性化、組み換えTCRを発現



【図 4】

TCR KO, 外因性遺伝子を発現 (IRES)



20

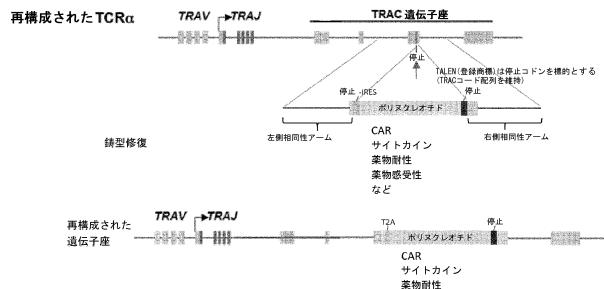
30

40

50

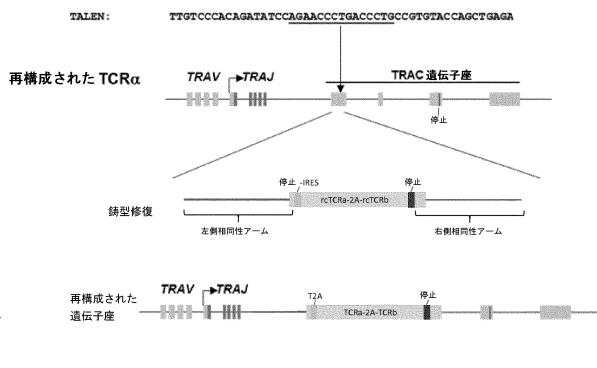
【図 5】

内因性TCRを維持、外因性遺伝子を共発現 (IRES)



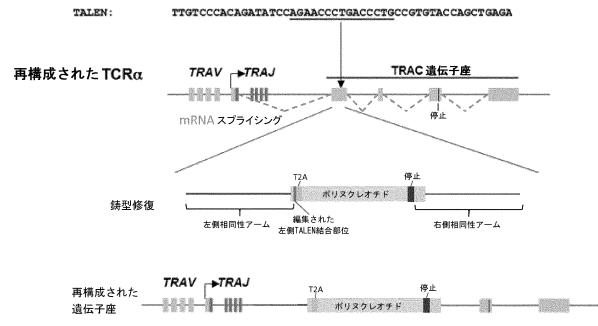
【図 6】

内因性TCRを不活性化、組み換えTCRを発現 (IRES)

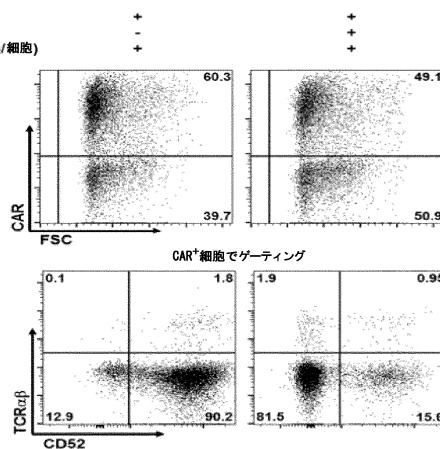


【図 7】

TCR KO、外因性遺伝子を発現、TALEN標的部位を編集



【図 8】

TRAC Talen
CD52 Talen
rAAV6 (3.1x10⁴ vg/細胞)

【配列表】

0007236380000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

		F I			
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0	Z
C 1 2 N	15/867 (2006.01)	C 1 2 N	15/867		Z
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02		
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17		
A 6 1 K	35/28 (2015.01)	A 6 1 K	35/28		
A 6 1 K	35/15 (2015.01)	A 6 1 K	35/15		
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N	
		A 6 1 K	39/395		T

(33)優先権主張国・地域又は機関

デンマーク(DK)

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ドゥシャター フィリップ

フランス共和国 91210 ドラヴェイユ ケ デ ダームス バトー ファウェン

(72)発明者 ビュッセル ブライアン

アメリカ合衆国 10010 ニューヨーク州 ニューヨーク パーク アベニュー サウス 295

(72)発明者 ジュイレラット アレクサンドル

アメリカ合衆国 10028 ニューヨーク州 ニューヨーク イースト エイティセカンド ストリート 444 #5エイ

(72)発明者 ゴートラン アンヌ - ソフィ

フランス共和国 91580 エトレシー リュ ロリマー 21

(72)発明者 ポアロ ローラント

フランス共和国 75020 パリ リュー ドゥ ラ リュニオン 10

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 特表2016-525888 (JP, A)

国際公開第2015/136001 (WO, A1)

国際公開第2016/124765 (WO, A1)

国際公開第2016/160721 (WO, A1)

Cancer Research, 2015年, Vol.75, No.18, pp.3853-3864

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 1 5 / 9 0

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

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

G e n b a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

UniProt / GenSeq
PubMed