

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-543024

(P2024-543024A)

(43)公表日 令和6年11月19日(2024.11.19)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	Z N A	4 B 0 6 5
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17		4 C 0 8 4
A 6 1 K	35/545 (2015.01)	A 6 1 K	35/545		4 C 0 8 7
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00		
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全131頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-525946(P2024-525946)	(71)出願人	523111348 フェイト セラピューティクス, インコーポレイティド アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 3 1, サンディエゴ, スクリップス サミット ドライブ 1 2 2 7 8
(86)(22)出願日	令和4年11月7日(2022.11.7)	(74)代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(85)翻訳文提出日	令和6年6月4日(2024.6.4)	(74)代理人	100123582 弁理士 三橋 真二
(86)国際出願番号	PCT/US2022/079419	(74)代理人	100117019 弁理士 渡辺 陽一
(87)国際公開番号	WO2023/081901	(74)代理人	100141977 弁理士 中島 勝
(87)国際公開日	令和5年5月11日(2023.5.11)	(74)代理人	100138210
(31)優先権主張番号	63/263,758		
(32)優先日	令和3年11月8日(2021.11.8)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	63/265,192		
(32)優先日	令和3年12月9日(2021.12.9)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA)		
最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 操作されたエフェクター細胞及び固形腫瘍の広範な標的化を増強する方法

(57)【要約】

ゲノム操作された i P S C の指向性分化から得られる機能的に増強された派生エフェクター細胞を取得するための方法及び組成物が提供される。改善又は増強された治療効果をもたらす安定した機能的なゲノム編集を備えている派生細胞も提供される。機能的に増強された派生エフェクター細胞を単独で、又は組み合わせ療法において抗体若しくはチェックポイント阻害剤とともに含む、治療用組成物及びその使用も提供される。

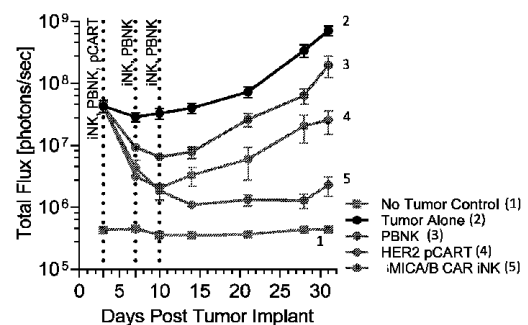


FIG. 4B

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞又はその集団を含む組成物であって、前記細胞は、免疫細胞、人工多能性細胞（iPSC）又は前記 iPSC を分化させることから得られた派生細胞であり、前記細胞は、MICA/B 腫瘍抗原標的化特異性を含み；前記細胞は、MICA/B-CAR（キメラ抗原受容体）、抗 MICA/B 抗体と組み合わせた場合に ADCC を媒介する CD16 若しくはそのバリエーション、MICA/B 腫瘍抗原を標的とする外因性 TCR、又はそれらの任意の組み合わせをコードする 1 つ以上の外因性ポリヌクレオチドを必要に応じて含み、及び

（i）前記細胞若しくはその集団は、MICA/B 以外の腫瘍抗原標的化特異性を有する CAR を更に含むか、又は

（ii）前記組成物は、感作因子を更に含み、前記感作因子は、MICA/B の腫瘍細胞表面レベルを増加させる、組成物。

【請求項 2】

前記 iPSC が、クローン iPSC、単一細胞解離 iPSC、iPSC 細胞株細胞又は iPSC マスター細胞バンク（MCB）細胞であるか、又は前記派生細胞が、造血細胞であり、末梢血、臍帯血若しくは任意の他のドナー組織から得られるその天然の対応細胞と比較してより長いテロメアを含むか、又は前記 MICA/B-CAR が、以下の特徴：

（i）T 細胞特異的であること、

（ii）NK 細胞特異的であること、

（iii）表面 MICA/B に結合すること、

（iv）MICA/B の保存された $\alpha 3$ ドメインに結合する scFV（単鎖可変フラグメント）を含むこと、

（v）配列番号 1 に対して少なくとも約 99%、98%、96%、95%、90%、85% 又は 80% の同一性であるアミノ酸配列によって表される重鎖可変領域を含むこと、

（vi）配列番号 2 に対して少なくとも約 99%、98%、96%、95%、90%、85% 又は 80% の同一性であるアミノ酸配列によって表される軽鎖可変領域を含むこと、

（vii）配列番号 3 又は 4 に対して少なくとも約 99%、98%、96%、95%、90%、85% 又は 80% の同一性であるアミノ酸配列によって表される scFV を含むこと、

（viii）T 細胞受容体（TCR）の第 1 の定常領域に機能的に連結された MICA/B 結合 scFV の重鎖可変領域及び T 細胞受容体（TCR）の第 2 の定常領域に機能的に連結された MICA/B 結合 scFV の軽鎖可変領域を含むこと、

（ix）遺伝子座：B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCR α 若しくは β 定常領域、NKG2A、NKG2D、CD38、CD25、CD44、CD58、CD54、CD56、CD69、CD71、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、又は TIGIT のうちの 1 つに挿入されており、必要に応じて、前記挿入は、前記遺伝子座における遺伝子の発現をノックアウトすること、

のうちの少なくとも 1 つを有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記細胞が、

（i）CD38 ノックアウト、

（ii）HLA-I の欠損及び／又は HLA-II の欠損、

（iii）HLA-G 若しくは非切断性 HLA-G の導入、

（iv）外因性 CD16 又はそのバリエーション、

（v）MICA/B 以外の標的化特異性を有するキメラ抗原受容体（CAR）、

（vi）細胞表面に発現された外因性サイトカイン又はその受容体の部分的な又は完全なペプチドを含むサイトカインシグナル伝達複合体、

(v i i) 表 1 に列挙される遺伝子型のうちの少なくとも 1 つ、

(v i i i) その天然の対応細胞と比較した、B 2 M、T A P 1、T A P 2、タパシン、N L R C 5、C I I T A、R F X A N K、R F X 5、R F X A P、T C R α 又は β 定常領域、N K G 2 A、N K G 2 D、C D 5 6、C I S、C B L - B、S O C S 2、P D 1、C T L A 4、L A G 3、T I M 3 及び T I G I T のうちの少なくとも 1 つの破壊、並びに

(i x) その天然の対応細胞と比較した、H L A - E、4 - 1 B B L、C D 3、C D 4、C D 8、C D 1 6、C D 4 7、C D 1 1 3、C D 1 3 1、C D 1 3 7、C D 8 0、P D L 1、A ₂ A R、抗原特異的 T C R、F c 受容体、エンゲージャ及び二重特異性若しくは多重特異性又は普遍的エンゲージャと結合するための表面トリガー受容体のうちの少なくとも 1 つの導入、

10

のうちの 1 つ以上を更に含む、請求項 1 又は 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記外因性 C D 1 6 が、高親和性非切断性 C D 1 6 (h n C D 1 6) 又はそのバリエーションを含む、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記高親和性非切断性 C D 1 6 (h n C D 1 6) 又はそのバリエーションが、

(a) C D 1 6 の外部ドメインドメイン中の F 1 7 6 V 及び S 1 9 7 P、

(b) C D 6 4 に由来する完全な又は部分的な外部ドメイン、

(c) 非天然 (又は非 C D 1 6) の膜貫通ドメイン、

(d) 非天然 (又は非 C D 1 6) の細胞内ドメイン、

(e) 非天然 (又は非 C D 1 6) のシグナル伝達ドメイン、

(f) 刺激ドメイン、並びに

20

(g) C D 1 6 に由来せず、同じ又は異なるポリペプチドに由来する膜貫通、シグナル伝達及び刺激ドメイン

のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記感作因子が、外部ビーム放射線、近接照射療法、放射性医薬品及び化学療法剤のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記感作因子が、

30

(i) カルシウム - 4 7、炭素 - 1 1、炭素 - 1 4、クロム - 5 1、コバルト - 5 7、コバルト - 5 8、エルビウム - 1 6 9、フッ素 - 1 8、ガリウム - 6 7、ガリウム - 6 8、水素 - 3、インジウム - 1 1 1、ヨウ素 - 1 2 3、ヨウ素 - 1 2 5、ヨウ素 - 1 3 1、鉄 (i o r n) - 5 9、クリプトン - 8 1 m、ルテチウム - 1 7 7、窒素 - 1 3、酸素 - 1 5、リン - 3 2、ラジウム - 2 2 3、ルビジウム - 8 2、サマリウム - 1 5 3、セレン - 7 5、ナトリウム - 2 2、ナトリウム - 2 4、ストロンチウム - 8 9、テクネチウム - 9 9 m、タリウム - 2 0 1、キセノン - 1 3 3 及びイットリウム - 9 0 のうちの少なくとも 1 つ、又は

(i i) バクリタキセルを含む、

請求項 6 に記載の組成物。

40

【請求項 8】

1 つ以上の治療剤を更に含む、請求項 1 又は 6 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記 1 つ以上の治療剤が、ペプチド、サイトカイン、チェックポイント阻害剤、エンゲージャ、抗体、抗体コンジュゲート、マイトジェン、増殖因子、低分子 R N A、d s R N A (二本鎖 R N A)、単核血球、フィーダー細胞、フィーダー細胞成分若しくはその補充因子、1 つ以上の目的のポリ核酸を含むベクター、又は免疫調節薬 (I M i D) を含む、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

(a) 前記チェックポイント阻害剤は、

50

(i) PD-1、PDL-1、TIM-3、TIGIT、LAG-3、CTLA-4、2B4、4-1BB、4-1BBL、A2AR、BATE、BTLA、CD39、CD47、CD73、CD94、CD96、CD160、CD200、CD200R、CD274、CEACAM1、CSF-1R、Foxp1、GARP、HVEM、IDO、EDO、TDO、LAIR-1、MICA/B、NR4A2、MAFB、OCT-2、Rara（レチノイン酸受容体アルファ）、TLR3、VISTA、NKG2A/HLA-E、若しくは抑制性KIRを含む1つ以上のアンタゴニストチェックポイント分子、

(ii) アテゾリズマブ、アベルマブ、セツキシマブ、デュルバルマブ、イピリムマブ、IPH4102、IPH43、IPH33、リリムマブ、モナリズマブ、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、トラスツズマブ、ベルツズマブ、及びそれらの誘導体若しくは機能的同等物のうちの1つ以上、

10

(iii) アテゾリズマブ、ニボルマブ、及びペンブロリズマブのうちの少なくとも1つ、を含むか、又は

(b) 前記治療剤が、ベネトクラクス、アザシチジン、及びポマリドマイドのうちの1つ以上を含む、

請求項9に記載の組成物。

【請求項11】

前記抗体が、

(a) 細胞表面MICA/B抗原のMICアルファ3ドメインに結合するMICA/B抗体、

20

(b) 抗体依存性細胞傷害(ADCC)を誘発する抗体、

(c) 抗CD20、抗CD22、抗HER2、抗CD52、抗EGFR、抗CD123、抗GD2、抗PDL1、及び／若しくは抗CD38抗体、並びに／又は

(d) リツキシマブ、ベルツズマブ、オフアツムマブ、ウブリツキシマブ、オカラツズマブ、オビヌツズマブ、イブリツモマブ、オクレリズマブ、イノツズマブ、モキセツモマブ、エブラツズマブ、トラスツズマブ、ベルツズマブ、アレムツズマブ、セツキシマブ、アミバンタマブ、ジヌツキシマブ、アベルマブ、ダラツムマブ、イサツキシマブ、MOR202、7G3、CSL362、エロツズマブ、及びそれらのヒト化若しくはFc改変されたバリエーション又は断片、並びにそれらの機能的同等物及びバイオシミラーのうちの1つ以上、

30

を含む、請求項1又は9に記載の組成物。

【請求項12】

多重特異性エンゲージャを更に含む、請求項1～11のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項13】

前記多重特異性エンゲージャが、(i) T細胞エンゲージャ、(ii) NK細胞エンゲージャ、(iii) 二重特異性T細胞エンゲージャ(BiTE)、(iv) 二重特異性キラー細胞エンゲージャ(BiKE)、(v) 三重特異性キラー細胞エンゲージャ(TrIKE)、(vi) MICA/Bエンゲージャ、又は(vii) CD16エンゲージャのうちの少なくとも1つである、請求項12に記載の組成物。

【請求項14】

40

前記細胞が、派生NK細胞又は派生T細胞であり、末梢血、臍帯血、又は任意の他のドナー組織から得られるその天然の対応細胞と比較して、以下の、

(i) 改善された持続性及び／又は生存率、

(ii) 自然免疫細胞に対する増加した耐性、

(iii) 増加した細胞傷害性、

(iv) 改善された腫瘍浸透、

(v) 増強又は獲得したADCC、

(vi) バイスタンダー免疫細胞を腫瘍部位に遊走、及び／又は活性化若しくは動員する増強された能力、

(vii) 腫瘍免疫抑制を低下させる増強された能力、

50

- (v i i i) 腫瘍抗原エスケープの救済の改善された能力、
- (i x) 腫瘍抗原を安定化する能力、並びに
- (x) フラトリサイドを回避する能力、

を含む特徴のうちの少なくとも1つを有する、請求項1～13のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項15】

(a) 前記膜貫通ドメインが、CD3δ、CD3ε、CD3γ、CD3ζ、CD4、CD8、CD8a、CD8b、CD27、CD28、CD40、CD84、CD166、4-1BB、OX40、ICOS、ICAM-1、CTLA-4、PD-1、LAG-3、2B4、BTLA、CD16、IL7、IL12、IL15、KIR2DL4、KIR2DS1、NKp30、NKp44、NKp46、NKG2C、NKG2D、若しくはT細胞受容体(TCR)ポリペプチドに由来するか、

10

(b) 前記刺激ドメインが、CD27、CD28、4-1BB、OX40、ICOS、PD-1、LAG-3、2B4、BTLA、DAP10、DAP12、CTLA-4、若しくはNKG2Dポリペプチドに由来するか、

(c) 前記シグナル伝達ドメインが、CD3ζ、2B4、DAP10、DAP12、DNAM1、CD137(4-1BB)、IL21、IL7、IL12、IL15、NKp30、NKp44、NKp46、NKG2C、若しくはNKG2Dポリペプチドに由来するか、又は

(d) 前記膜貫通ドメインがNKG2Dに由来し、前記非天然の刺激ドメインが2B4に由来し、及び前記非天然のシグナル伝達ドメインがCD3ζに由来する、請求項5に記載の組成物。

20

【請求項16】

MICA/B以外の腫瘍抗原標的化特異性を有する前記CARが、

- (i) T細胞特異的若しくはNK細胞特異的なもの、
- (i i) 二重特異性抗原結合CAR、
- (i i i) 切り替え可能なCAR、
- (i v) 二量体化されたCAR、
- (v) スプリットCAR、
- (v i) 多重鎖CAR、
- (v i i) 誘導性CAR、
- (v i i i) 組換えTCR、
- (i x) 別のCARと共発現されたもの、

30

(x) 必要に応じて別個の構築物内で、若しくはバイシストロン性構築物内で、細胞表面に発現された外因性サイトカイン若しくはその受容体の部分的な若しくは完全なペプチドを含むサイトカインシグナル伝達複合体と共発現されたもの、

(x i) 必要に応じて別個の構築物内で、若しくはバイシストロン性構築物内で、チェックポイント阻害剤と共発現されたもの、

(x i i) CD19、BCMA、CD20、CD22、CD38、CD123、HER2、CD52、EGFR、GD2、MSLN、VEGF-R2、PSMA及びPDL1のうちの少なくとも1つに特異的なもの、並びに／又は

40

(x i i i) ADGRE2、炭酸脱水酵素IX(CAIX)、CCR1、CCR4、がん胎児性抗原(CEA)、CD3、CD5、CD7、CD8、CD10、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD44V6、CD49f、CD56、CD70、CD74、CD99、CD123、CD133、CD138、CDS、CLEC12A、サイトメガロウイルス(CMV)感染細胞の抗原、上皮糖タンパク質2(EGP-2)、上皮糖タンパク質-40(EGP-40)、上皮細胞接着分子(EpCAM)、EGFRvIII、受容体チロシンタンパク質キナーゼerbB-2、3、4、EGFR、EGFR-VIII、ERBB葉酸結合タンパク質(FBP)、胎児のアセチルコリン受容体(AChR)、葉酸受容体-α、ガングリオシドG2

50

(G D 2)、ガングリオシド G 3 (G D 3)、ヒト上皮増殖因子受容体 2 (H E R 2)、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (h T E R T)、I C A M-1、インテグリン B 7、インターロイキン-13 受容体サブユニットアルファ-2 (I L-13 R α 2)、κ-軽鎖、キナーゼ挿入ドメイン受容体 (K D R)、ルイス A (C A 19.9)、ルイス Y (L e Y)、L 1 細胞接着分子 (L 1-C A M)、L I L R B 2、黒色腫抗原ファミリー A 1 (M A G E-A 1)、M I C A/B、ムチン 1 (M u c-1)、ムチン 16 (M u c-16)、メソテリン (M S L N)、N K C S I、N K G 2 D リガンド、c-M e t、がん-精巣抗原 N Y-E S O-1、腫瘍胎児性抗原 (h 5 T 4)、P R A M E、前立腺幹細胞抗原 (P S C A)、P R A M E 前立腺特異的膜抗原 (P S M A)、腫瘍関連糖タンパク質 72 (T A G-72)、T I M-3、T R B C I、T R B C 2、血管内皮増殖因子 R 2 (V E G F-R 2)、ウィルムス腫瘍タンパク質 (W T-1)、及び病原体抗原のうちのいずれか 1 つに特異的なもの、であり、

10

前記 (i) から (x i i i) のうちのいずれか 1 つの C A R は、必要に応じて T R A C 遺伝子座に挿入されている、及び／又は T C R の内因性プロモータによって駆動されている、及び／又は前記 T C R が前記 C A R 挿入によってノックアウトされている、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 17】

M I C A/B 以外の腫瘍抗原標的化特異性を有する前記 C A R が、B C M A に特異的である、請求項 16 に記載の組成物。

20

【請求項 18】

前記サイトカインシグナル伝達複合体が、

(a) I L 2、I L 4、I L 6、I L 7、I L 9、I L 10、I L 11、I L 12、I L 15、I L 18、I L 21、及びそのそれぞれの受容体のうちの少なくとも 1 つの部分的な若しくは完全なペプチドを含むか、又は

(b)

(i) 自己切断ペプチドを使用することによる I L 15 と I L 15 R α との共発現、

(i i) I L 15 と I L 15 R α との融合タンパク質、

(i i i) I L 15 R α の細胞内ドメインが短縮された I L 15 / I L 15 R α 融合タンパク質、

(i v) I L 15 と I L 15 R α の膜結合 S u s h i ドメインとの融合タンパク質、

30

(v) I L 15 と I L 15 R β との融合タンパク質、

(v i) I L 15 と共通受容体 γ C との融合タンパク質であって、前記共通受容体 γ C が、天然であるか若しくは改変されている、融合タンパク質、及び

(v i i) I L 15 R β のホモ二量体、のうちの少なくとも 1 つであって、(b) (i) ~ (v i i) のうちのいずれか 1 つが、別個の構築物内で、若しくはバイシストロン性構築物内で、C A R と共発現され得る、少なくとも 1 つ、又は

(c)

(i) I L 7 と I L 7 R α との融合タンパク質、

(i i) I L 7 と共通受容体 γ C との融合タンパク質であって、前記共通受容体 γ C が、天然であるか若しくは改変されている、融合タンパク質、及び

40

(i i i) I L 7 R β のホモ二量体、のうちの少なくとも 1 つであって、(c) (i) ~ (i i i) のうちのいずれか 1 つが、任意選択で、別個の構築物内で、若しくはバイシストロン性発現カセット内で、C A R と共発現される、少なくとも 1 つ、を含み、

任意選択で、

(d) 一過的に発現される、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記細胞が、派生 N K 細胞又は派生 T 細胞であり、前記派生 N K 細胞が、T 細胞を腫瘍部位に動員及び／又は遊走させることができ、前記派生 N K 細胞又は前記派生 T 細胞は、1 つ以上のチェックポイント阻害剤の存在下で腫瘍免疫抑制を低下させることができる、請求項 3 に記載の組成物。

50

【請求項 20】

前記チェックポイント阻害剤が、PD-1、PDL-1、TIM-3、TIGIT、LAG-3、CTLA-4、2B4、4-1BB、4-1BBL、A_{2A}R、BATE、BTLA、CD39、CD47、CD73、CD94、CD96、CD160、CD200、CD200R、CD274、CEACAM1、CSF-1R、Foxp1、GARP、HVEM、IDO、EDO、TDO、LAIR-1、MICA/B、NR4A2、MAFB、OCT-2、Rara（レチノイン酸受容体アルファ）、TLR3、VISTA、NKG2A/HLA-E、又は抑制性KIRを含む1つ以上のチェックポイント分子に対するアンタゴニストである、請求項19に記載の組成物。

【請求項 21】

前記チェックポイント阻害剤が、

(a) アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、イピリムマブ、IPH4102、IPH43、IPH33、リリムマブ、モナリズマブ、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、及びそれらの誘導体若しくは機能的同等物のうちの1つ以上、又は

(b) アテゾリズマブ、ニボルマブ、及びペンブロリズマブのうちの少なくとも1つ、を含む、請求項20に記載の組成物。

【請求項 22】

前記派生細胞が、派生CD34⁺細胞、派生造血幹細胞及び前駆細胞、派生造血多能性前駆細胞、派生T細胞前駆細胞、派生NK細胞前駆細胞、派生T細胞、派生NKT細胞、派生NK細胞又は派生B細胞を含む、請求項3に記載の組成物。

【請求項 23】

前記細胞が、

(i) 1つのセーフハーバー遺伝子座若しくは選択された遺伝子座に組み込まれた1つ以上の外因性ポリヌクレオチド、又は

(ii) 異なるセーフハーバー遺伝子座若しくは2つ以上の選択された遺伝子座に組み込まれた2つを超える外因性ポリヌクレオチド、を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項 24】

前記セーフハーバー遺伝子座が、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、GAPDH、若しくはRUNX1のうちの少なくとも1つを含み、前記選択された遺伝子座が、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCR、NKG2A、NKG2D、CD38、CD25、CD44、CD58、CD54、CD56、CD69、CD71、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、若しくはTIGITのうちの1つであり、前記外因性ポリヌクレオチドの前記組み込みが、前記遺伝子座における前記遺伝子の発現を必要に応じてノックアウトし、必要に応じて、前記外因性ポリヌクレオチドが、前記遺伝子座における内因性プロモータの下で発現する、請求項23に記載の組成物。

【請求項 25】

前記TCR遺伝子座が、TCRアルファ又はTCRベータの定常領域である、請求項24に記載の組成物。

【請求項 26】

請求項1～25のいずれか一項に記載の組成物を養子細胞療法に好適な対象に導入することによる前記組成物の治療的使用であって、前記対象が、自己免疫障害、血液悪性腫瘍、固形腫瘍、がん、又はウイルス感染を有する、治療的使用。

【請求項 27】

疾患又は状態を治療する方法であって、それを必要とする対象に、請求項1～7、16又は17のいずれか一項に記載の組成物を投与することを含む、方法。

【請求項 28】

前記方法が、前記対象に1つ以上の治療剤を投与することを更に含む、請求項27に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 29】

対象を治療する方法であって、

(a) 感作因子を前記対象に投与して、前記対象における腫瘍細胞を前処理することと、

(b) 前記腫瘍細胞を前処理した後に、前記対象に細胞又はその集団を投与することであって、前記細胞は、免疫細胞であるか、又は i P S C を分化させることから得られた派生細胞であり、前記細胞は、M I C A / B 腫瘍抗原標的化特異性を含み、前記細胞は、M I C A / B - C A R (キメラ抗原受容体)、抗 M I C A / B 抗体と組み合わせた場合に A D C C を媒介する C D 1 6 若しくはそのバリエーション、M I C A / B 腫瘍抗原を標的とする外因性 T C R、又はそれらの任意の組み合わせをコードする 1 つ以上の外因性ポリヌクレオチドを必要に応じて含む、投与することと、

10

を含み、

前記対象は、自己免疫障害、血液悪性腫瘍、固形腫瘍、がん、又はウイルス感染を有する、方法。

【請求項 30】

前記感作因子が、前記腫瘍細胞との接触時に前記腫瘍細胞上の M I C A / B 表面発現及び／又は M I C A / B 密度を増加させる、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記感作因子が、化学療法剤、外部ビーム放射線、近接照射療法、及び放射性医薬品のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 29 に記載の方法。

20

【請求項 32】

前記感作因子が、

(i) X 線放射線、ガンマ線放射線、光子放射線、陽子放射線、及び中性子放射線のうちの少なくとも 1 つ；又は

(i i) カルシウム-47、炭素-11、炭素-14、クロム-51、コバルト-57、コバルト-58、エルビウム-169、フッ素-18、ガリウム-67、ガリウム-68、水素-3、インジウム-111、ヨウ素-123、ヨウ素-125、ヨウ素-131、鉄 (i o r n) -59、クリプトン-81m、ルテチウム-177、窒素-13、酸素-15、リン-32、ラジウム-223、ルビジウム-82、サマリウム-153、セレン-75、ナトリウム-22、ナトリウム-24、ストロンチウム-89、テクネチウム-99m、タリウム-201、キセノン-133 及びイットリウム-90 のうちの少なくとも 1 つ、又は

30

(i i i) パクリタキセル

を含む、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記細胞又はその集団を投与する前又は投与している間に、M I C A / B 腫瘍細胞表面抗原の M I C アルファ 3 ドメインに結合する抗体を投与することを更に含む、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 34】

前記派生細胞が造血細胞であり、末梢血、臍帯血若しくは任意の他のドナー組織から得られるその天然の対応細胞と比較してより長いテロメアを含むか、又は前記 M I C A / B - C A R が、以下の特徴：

40

(i) T 細胞特異的であること、

(i i) N K 細胞特異的であること、

(i i i) 表面 M I C A / B に結合すること、

(i v) M I C A / B の保存された $\alpha 3$ ドメインに結合する s c F V (単鎖可変フラグメント) を含むこと、

(v) 配列番号 1 に対して少なくとも約 99%、98%、96%、95%、90%、85%、若しくは 80% の同一性であるアミノ酸配列によって表される重鎖可変領域を含むこと、

50

(v i) 配列番号 2 に対して少なくとも約 99%、98%、96%、95%、90%、85%、若しくは 80% の同一性であるアミノ酸配列によって表される軽鎖可変領域を含むこと、

(v i i) 配列番号 3 若しくは 4 に対して少なくとも約 99%、98%、96%、95%、90%、85%、若しくは 80% の同一性であるアミノ酸配列によって表される s c F V を含むこと、

(v i i i) T 細胞受容体 (T C R) の第 1 の定常領域に機能的に連結された M I C A / B 結合 s c F V の重鎖可変領域及び T 細胞受容体 (T C R) の第 2 の定常領域に機能的に連結された M I C A / B 結合 s c F v の軽鎖可変領域を含むこと、

(i x) 遺伝子座: B 2 M、T A P 1、T A P 2、タパシン、N L R C 5、C I I T A、R F X A N K、R F X 5、R F X A P、T C R α 若しくは β 定常領域、N K G 2 A、N K G 2 D、C D 3 8、C D 2 5、C D 4 4、C D 5 8、C D 5 4、C D 5 6、C D 6 9、C D 7 1、C I S、C B L - B、S O C S 2、P D 1、C T L A 4、L A G 3、T I M 3、若しくは T I G I T のうちの 1 つに挿入されており、必要に応じて、前記挿入は、前記遺伝子座における遺伝子の発現をノックアウトすること、

のうちの少なくとも 1 つを有する、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記細胞が、

(i) C D 3 8 ノックアウト、

(i i) H L A - I の欠損及び／又は H L A - I I の欠損、

(i i i) H L A - G 若しくは非切断性 H L A - G の導入、

(i v) 外因性 C D 1 6 又はそのバリエーション、

(v) M I C A / B 以外の標的化特異性を有するキメラ抗原受容体 (C A R)、

(v i) 細胞表面に発現された外因性サイトカイン又はその受容体の部分的な又は完全なペプチドを含むサイトカインシグナル伝達複合体、

(v i i) 表 1 に列挙される遺伝子型のうちの少なくとも 1 つ、

(v i i i) その天然の対応細胞と比較した、T A P 1、T A P 2、タパシン、N L R C 5、C I I T A、R F X A N K、R F X 5、R F X A P、T C R α 又は β 定常領域、N K G 2 A、N K G 2 D、C D 5 6、C I S、C B L - B、S O C S 2、P D 1、C T L A 4、L A G 3、T I M 3、及び T I G I T の少なくとも 1 つの破壊、並びに

(i x) その天然の対応細胞と比較した、H L A - E、4 - 1 B B L、C D 3、C D 4、C D 8、C D 1 6、C D 4 7、C D 1 1 3、C D 1 3 1、C D 1 3 7、C D 8 0、P D L 1、A 2 A R、抗原特異的 T C R、F c 受容体、エンゲージャ及び二重特異性若しくは多重特異性又は普遍的エンゲージャと結合するための表面トリガー受容体のうちの少なくとも 1 つの導入、

のうちの 1 つ以上を更に含む、請求項 2 9 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記外因性 C D 1 6 が、高親和性非切断性 C D 1 6 (h n C D 1 6) 又はそのバリエーションを含む、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記高親和性非切断性 C D 1 6 (h n C D 1 6) 又はそのバリエーションが、

(a) C D 1 6 の外部ドメインドメイン中の F 1 7 6 V 及び S 1 9 7 P、

(b) C D 6 4 に由来する完全な又は部分的な外部ドメイン、

(c) 非天然 (又は非 C D 1 6) の膜貫通ドメイン、

(d) 非天然 (又は非 C D 1 6) の細胞内ドメイン、

(e) 非天然 (又は非 C D 1 6) のシグナル伝達ドメイン、

(f) 刺激ドメイン、並びに

(g) C D 1 6 に由来せず、同じ又は異なるポリペプチドに由来する膜貫通、シグナル伝達及び刺激ドメイン

のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 38】

MICA／B 以外の標的化特異性を有する (v) の前記キメラ抗原受容体 (CAR) が

- (i) T細胞特異的若しくはNK細胞特異的なもの、
- (ii) 二重特異性抗原結合CAR、
- (iii) 切り替え可能なCAR、
- (iv) 二量体化されたCAR、
- (v) スプリットCAR、
- (vi) 多重鎖CAR、
- (vii) 誘導性CAR、
- (viii) 組換えTCR、
- (ix) 別のCARと共発現されたもの、

(x) 必要に応じて別個の構築物内で、若しくはバイシストロン性構築物内で、細胞表面に発現された外因性サイトカイン若しくはその受容体の部分的な若しくは完全なペプチドを含むサイトカインシグナル伝達複合体と共発現されたもの、

(xi) 必要に応じて別個の構築物内で、若しくはバイシストロン性構築物内で、チェックポイント阻害剤と共発現されたもの、

(xii) CD19、BCMA、CD20、CD22、CD38、CD123、HER2、CD52、EGFR、GD2、MSLN、VEGF-R2、PSMA及びPD-L1のうちの少なくとも1つに特異的なもの、並びに／又は

(xiii) ADGRE2、炭酸脱水酵素IX (CAIX)、CCR1、CCR4、がん胎児性抗原 (CEA)、CD3、CD5、CD7、CD8、CD10、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD44v6、CD49f、CD56、CD70、CD74、CD99、CD123、CD133、CD138、CDS、CLEC12A、サイトメガロウイルス (CMV) 感染細胞の抗原、上皮糖タンパク質-2 (EGP-2)、上皮糖タンパク質-40 (EGP-40)、上皮細胞接着分子 (EPCAM)、EGFRvIII、受容体チロシンタンパク質キナーゼerbB-2、3、4、EGFIR、EGFR-VIII、ERBB葉酸結合タンパク質 (FBP)、胎児のアセチルコリン受容体 (AChR)、葉酸受容体-α、ガングリオシドG2 (GD2)、ガングリオシドG3 (GD3)、ヒト上皮増殖因子受容体2 (HER2)、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT)、ICAM-1、インテグリンB7、インターロイキン-13受容体サブユニットアルファ-2 (IL-13Rα2)、κ-軽鎖、キナーゼ挿入ドメイン受容体 (KDR)、ルイスA (CA19.9)、ルイスY (LeY)、L1細胞接着分子 (L1-CAM)、LILRB2、黒色腫抗原ファミリーA1 (MAGE-A1)、MICA／B、ムチン1 (Muc-1)、ムチン16 (Muc-16)、メソテリン (MSLN)、NKCSI、NKG2Dリガンド、c-Met、がん-精巢抗原NY-ESO-1、腫瘍胎児性抗原 (h5T4)、PRAME、前立腺幹細胞抗原 (PSCA)、PRAME前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、腫瘍関連糖タンパク質72 (TAG-72)、TIM-3、TRBC1、TRBC2、血管内皮増殖因子R2 (VEGF-R2)、ウィルムス腫瘍タンパク質 (WT-1)、及び病原体抗原のうちのいずれか1つに特異的なもの、であり、

前記 (i) から (xiii) のうちのいずれか1つのCARは、必要に応じてTRAC遺伝子座に挿入されている、及び／又はTCRの内因性プロモータによって駆動されている、及び／又は前記TCRが前記CAR挿入によってノックアウトされている、請求項35に記載の方法。

【請求項 39】

前記CARがBCMAに特異的である、請求項38に記載の方法。

【請求項 40】

1つ以上の治療剤を投与することを更に含む、請求項29に記載の方法。

【請求項 41】

10

20

30

40

50

前記1つ以上の治療剤が、ペプチド、サイトカイン、チェックポイント阻害剤、エンゲージ、抗体、抗体コンジュゲート、マイトジェン、増殖因子、低分子RNA、dsRNA（二本鎖RNA）、単核血球、フィーダー細胞、フィーダー細胞成分若しくはその補充因子、1つ以上の目的のポリ核酸を含むベクター、化学療法剤若しくは放射性部分、又は免疫調節薬（IMiD）を含む、請求項40に記載の方法。

【請求項42】

（a）前記チェックポイント阻害剤は、

（i）PD-1、PDL-1、TIM-3、TIGIT、LAG-3、CTLA-4、2B4、4-1BB、4-1BBL、A2AR、BATE、BTLA、CD39、CD47、CD73、CD94、CD96、CD160、CD200、CD200R、CD274、CEACAM1、CSF-1R、Foxp1、GARP、HVEM、IDO、EDO、TDO、LAIR-1、MICA/B、NR4A2、MAFB、OCT-2、Rara（レチノイン酸受容体アルファ）、TLR3、VISTA、NKG2A/HLA-E、若しくは抑制性KIRを含む1つ以上のアンタゴニストチェックポイント分子、

10

（ii）アテゾリズマブ、アベルマブ、セツキシマブ、デュルバルマブ、イピリムマブ、IPH4102、IPH43、IPH33、リリムマブ、モナリズマブ、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、トラスツズマブ、ベルツズマブ、及びそれらの誘導体若しくは機能的同等物のうちの1つ以上、

（iii）アテゾリズマブ、ニボルマブ、及びペンブロリズマブのうちの少なくとも1つ、を含むか、又は

20

（b）前記治療剤が、ベネトクラクス、アザシチジン、及びボマリドマイドのうちの1つ以上を含む、

請求項41に記載の方法。

【請求項43】

前記抗体が、

（a）細胞表面MICA/B抗原のMICアルファ3ドメインに結合するMICA/B抗体、

（b）抗体依存性細胞傷害（ADCC）を誘発する抗体、

（c）抗CD20、抗CD22、抗HER2、抗CD52、抗EGFR、抗CD123、抗GD2、抗PDL1、及び／若しくは抗CD38抗体、並びに／又は

30

（d）リツキシマブ、ベルツズマブ、オフアツムマブ、ウブリツキシマブ、オカラツズマブ、オビヌツズマブ、イブリツモマブ、オクレリズマブ、イノツズマブ、モキセツモマブ、エブラツズマブ、トラスツズマブ、ベルツズマブ、アレムツズマブ、セツキシマブ、アミバンタマブ、ジヌツキシマブ、アベルマブ、ダラツムマブ、イサツキシマブ、MOR202、7G3、CSL362、エロツズマブ、及びそれらのヒト化若しくはFc改変されたバリエーション又は断片、並びにそれらの機能的同等物及びバイオシミラーのうちの1つ以上、

を含む、請求項41に記載の方法。

【請求項44】

多重特異性エンゲージを投与することを更に含む、請求項29～43のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項45】

前記多重特異性エンゲージが、（i）T細胞エンゲージ、（ii）NK細胞エンゲージ、（iii）二重特異性T細胞エンゲージ（BiTE）、（iv）二重特異性キラー細胞エンゲージ（BiKE）、（v）三重特異性キラー細胞エンゲージ（TriKE）、（vi）MICA/Bエンゲージ、又は（vii）CD16エンゲージのうちの少なくとも1つである、請求項44に記載の方法。

【請求項46】

対象を治療する方法であって、

前記対象に細胞又はその集団を投与することを含み、前記細胞は、免疫細胞であるか、

50

又はiPSCを分化させることから得られた派生細胞であり、前記細胞は、

(a) MICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含み、及び

(b) MICA/B以外の腫瘍抗原に対する特異性を有するCARをコードする外因性ポリヌクレオチドを含み、

必要に応じて、前記MICA/B腫瘍抗原標的化特異性は、(i) MICA/B-CAR (キメラ抗原受容体)、(ii) 抗MICA/B抗体と組み合わせた場合にADCCを媒介するCD16又はそのバリエーション、(iii) MICA/B腫瘍抗原を標的とする外因性TCR、又は(iv) それらの任意の組み合わせをコードする1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含み、

前記対象は、自己免疫障害、血液悪性腫瘍、固形腫瘍、がん、又はウイルス感染を有する、方法。

10

【請求項47】

(b) の前記CARが、

(i) T細胞特異的若しくはNK細胞特異的なもの、

(ii) 二重特異性抗原結合CAR、

(iii) 切り替え可能なCAR、

(iv) 二量体化されたCAR、

(v) スプリットCAR、

(vi) 多重鎖CAR、

(vii) 誘導性CAR、

(viii) 組換えTCR、

(ix) 別のCARと共発現されたもの、

20

(x) 必要に応じて別個の構築物内で、若しくはバイシストロン性構築物内で、細胞表面に発現された外因性サイトカイン若しくはその受容体の部分的な若しくは完全なペプチドを含むサイトカインシグナル伝達複合体と共発現されたもの、

(xi) 必要に応じて別個の構築物内で、若しくはバイシストロン性構築物内で、チェックポイント阻害剤と共発現されたもの、

(xii) CD19、BCMA、CD20、CD22、CD38、CD123、HER2、CD52、EGFR、GD2、MSLN、VEGF-R2、PSMA及びPDL1のうちの少なくとも1つに特異的なもの、並びに／又は

30

(xiii) ADGRE2、炭酸脱水酵素IX (CAIX)、CCR1、CCR4、がん胎児性抗原 (CEA)、CD3、CD5、CD7、CD8、CD10、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD44V6、CD49f、CD56、CD70、CD74、CD99、CD123、CD133、CD138、CDS、CLEC12A、サイトメガロウイルス (CMV) 感染細胞の抗原、上皮糖タンパク質-2 (EGP-2)、上皮糖タンパク質-40 (EGP-40)、上皮細胞接着分子 (EPCAM)、EGFRvIII、受容体チロシンタンパク質キナーゼerbB-2、3、4、EGFR、EGFR-VIII、ERBB葉酸結合タンパク質 (FBP)、胎児のアセチルコリン受容体 (AChR)、葉酸受容体-α、ガングリオシドG2 (GD2)、ガングリオシドG3 (GD3)、ヒト上皮増殖因子受容体2 (HER2)、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT)、ICAM-1、インテグリンB7、インターロイキン-13受容体サブユニットアルファ-2 (IL-13Rα2)、κ-軽鎖、キナーゼ挿入ドメイン受容体 (KDR)、ルイスA (CA19.9)、ルイスY (LeY)、L1細胞接着分子 (L1-CAM)、LILRB2、黒色腫瘍抗原ファミリーA1 (MAGE-A1)、MICA/B、ムチン1 (Muc-1)、ムチン16 (Muc-16)、メソテリン (MSLN)、NKCSI、NKG2Dリガンド、c-Met、がん-精巢抗原NY-ESO-1、腫瘍胎児性抗原 (h5T4)、PRAME、前立腺幹細胞抗原 (PSCA)、PRAME前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、腫瘍関連糖タンパク質72 (TAG-72)、TIM-3、TRBC1、TRBC2、血管内皮増殖因子R2 (VEGF-R2)、ウィルムス腫瘍タンパク質 (WT-1)、及び病原体抗原のうちのいずれか

40

50

1つに特異的なもの、であり、

前記 (i) から (x i i i) のうちのいずれか 1つの C A R は、必要に応じて T R A C 遺伝子座に挿入されている、及び／又は T C R の内因性プロモータによって駆動されている、及び／又は前記 T C R が前記 C A R 挿入によってノックアウトされている、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

(b) の前記 C A R が B C M A に特異的である、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

前記対象に感作因子を投与して、前記対象中の腫瘍細胞を前処理することを更に含む、請求項 46～48 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 50】

前記感作因子が、前記腫瘍細胞との接触時に前記腫瘍細胞上の M I C A / B 表面発現及び／又は M I C A / B 密度を増加させる、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

前記感作因子が、化学療法剤、外部ビーム放射線、近接照射療法、及び放射性医薬品のうちの少なくとも 1つを含む、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 52】

前記感作因子が、

(i) X 線放射線、ガンマ線放射線、光子放射線、陽子放射線、及び中性子放射線のうちの少なくとも 1つ、又は

20

(i i) カルシウム-47、炭素-11、炭素-14、クロム-51、コバルト-57、コバルト-58、エルビウム-169、フッ素-18、ガリウム-67、ガリウム-68、水素-3、インジウム-111、ヨウ素-123、ヨウ素-125、ヨウ素-131、鉄 (i o r n) -59、クリプトン-81m、ルテチウム-177、窒素-13、酸素-15、リン-32、ラジウム-223、ルビジウム-82、サマリウム-153、セレン-75、ナトリウム-22、ナトリウム-24、ストロンチウム-89、テクネチウム-99m、タリウム-201、キセノン-133 及びイットリウム-90 のうちの少なくとも 1つ、又は

(i i i) パクリタキセル

を含む、請求項 51 に記載の方法。

30

【請求項 53】

前記細胞又はその集団を投与する前又は投与している間に、M I C A / B 腫瘍細胞表面抗原の M I C アルファ 3 ドメインに結合する抗体を投与することを更に含む、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 54】

前記派生細胞が造血細胞であり、末梢血、臍帯血、若しくは任意の他のドナー組織から得られるその天然の対応細胞と比較してより長いテロメアを含むか、又は前記 M I C A / B - C A R が、以下の特徴：

(i) T 細胞特異的であること、

(i i) N K 細胞特異的であること、

40

(i i i) 表面 M I C A / B に結合すること、

(i v) M I C A / B の保存された α 3 ドメインに結合する s c F V (単鎖可変フラグメント) を含むこと、

(v) 配列番号 1 に対して少なくとも約 99%、98%、96%、95%、90%、85%、若しくは 80% の同一性であるアミノ酸配列によって表される重鎖可変領域を含むこと、

(v i) 配列番号 2 に対して少なくとも約 99%、98%、96%、95%、90%、85%、若しくは 80% の同一性であるアミノ酸配列によって表される軽鎖可変領域を含むこと、

(v i i) 配列番号 3 若しくは 4 に対して少なくとも約 99%、98%、96%、95

50

%、90%、85%、若しくは80%の同一性であるアミノ酸配列によって表される s c F Vを含むこと、

(v i i i) T細胞受容体 (T C R) の第1の定常領域に機能的に連結された M I C A / B 結合 s c F V の重鎖可変領域及び T 細胞受容体 (T C R) の第2の定常領域に機能的に連結された M I C A / B 結合 s c F v の軽鎖可変領域を含むこと、

(i x) 遺伝子座: B 2 M、T A P 1、T A P 2、タパシン、N L R C 5、C I I T A、R F X A N K、R F X 5、R F X A P、T C R α 若しくは β 定常領域、N K G 2 A、N K G 2 D、C D 3 8、C D 2 5、C D 4 4、C D 5 8、C D 5 4、C D 5 6、C D 6 9、C D 7 1、C I S、C B L - B、S O C S 2、P D 1、C T L A 4、L A G 3、T I M 3、若しくは T I G I T のうちの1つに挿入されており、必要に応じて、前記挿入は、前記遺伝子座における遺伝子の発現をノックアウトすること、

10

のうちの少なくとも1つを有する、請求項49に記載の方法。

【請求項55】

前記細胞が、

(i) C D 3 8 ノックアウト、

(i i) H L A - I の欠損及び／又は H L A - I I の欠損、

(i i i) H L A - G 若しくは非切断性 H L A - G の導入、

(i v) 外因性 C D 1 6 又はそのバリエーション、

(v) 細胞表面に発現された外因性サイトカイン又はその受容体の部分的な又は完全なペプチドを含むサイトカインシグナル伝達複合体、

20

(v i) 表1に列挙された遺伝子型のうちの少なくとも1つ、

(v i i) その天然の対応細胞と比較した、T A P 1、T A P 2、タパシン、N L R C 5、C I I T A、R F X A N K、R F X 5、R F X A P、T C R α 又は β 定常領域、N K G 2 A、N K G 2 D、C D 5 6、C I S、C B L - B、S O C S 2、P D 1、C T L A 4、L A G 3、T I M 3、及び T I G I T の少なくとも1つの破壊、並びに

(v i i i) その天然の対応細胞と比較した、H L A - E、4 - 1 B B L、C D 3、C D 4、C D 8、C D 1 6、C D 4 7、C D 1 1 3、C D 1 3 1、C D 1 3 7、C D 8 0、P D L 1、A₂A R、抗原特異的 T C R、F c 受容体、エンゲージ及び二重特異性若しくは多重特異性又は普遍的エンゲージと結合するための表面トリガー受容体のうちの少なくとも1つの導入、

30

のうちの1つ以上を更に含む、請求項46～54のいずれか一項に記載の方法。

【請求項56】

前記外因性 C D 1 6 が、高親和性非切断性 C D 1 6 (h n C D 1 6) 又はそのバリエーションを含む、請求項55に記載の方法。

【請求項57】

前記高親和性非切断性 C D 1 6 (h n C D 1 6) 又はそのバリエーションが、

(a) C D 1 6 の外部ドメインドメイン中の F 1 7 6 V 及び S 1 9 7 P、

(b) C D 6 4 に由来する完全な又は部分的な外部ドメイン、

(c) 非天然 (又は非 C D 1 6) の膜貫通ドメイン、

(d) 非天然 (又は非 C D 1 6) の細胞内ドメイン、

40

(e) 非天然 (又は非 C D 1 6) のシグナル伝達ドメイン、

(f) 刺激ドメイン、並びに

(g) C D 1 6 に由来せず、同じ又は異なるポリペプチドに由来する膜貫通、シグナル伝達及び刺激ドメイン

のうちの少なくとも1つを含む、請求項56に記載の方法。

【請求項58】

1つ以上の治療剤を投与することを更に含む、請求項46に記載の方法。

【請求項59】

前記1つ以上の治療剤が、ペプチド、サイトカイン、チェックポイント阻害剤、エンゲージ、抗体、抗体コンジュゲート、マイトジェン、増殖因子、低分子 R N A、d s R N

50

A（二本鎖RNA）、単核血球、フィーダー細胞、フィーダー細胞成分若しくはその補因子、1つ以上の目的のポリ核酸を含むベクター、化学療法剤若しくは放射性部分、又は免疫調節薬（IMiD）を含む、請求項58に記載の方法。

【請求項60】

（a）前記チェックポイント阻害剤は、

（i）PD-1、PDL-1、TIM-3、TIGIT、LAG-3、CTLA-4、2B4、4-1BB、4-1BBL、A2AR、BATE、BTLA、CD39、CD47、CD73、CD94、CD96、CD160、CD200、CD200R、CD274、CEACAM1、CSF-1R、Foxp1、GARP、HVEM、IDO、EDO、TDO、LAIR-1、MICA/B、NR4A2、MAFB、OCT-2、Rar a（レチノイン酸受容体アルファ）、TLR3、VISTA、NKG2A/HLA-E、若しくは抑制性KIRを含む1つ以上のアンタゴニストチェックポイント分子、

（ii）アテゾリズマブ、アベルマブ、セツキシマブ、デュルバルマブ、イピリムマブ、IPH4102、IPH43、IPH33、リリムマブ、モナリズマブ、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、トラスツズマブ、ベルツズマブ、及びそれらの誘導体若しくは機能的同等物のうちの1つ以上、

（iii）アテゾリズマブ、ニボルマブ、及びペンブロリズマブのうちの少なくとも1つ、を含むか、又は

（b）前記治療剤が、ベネトクラクス、アザシチジン、及びポマリドマイドのうちの1つ以上を含む、

請求項59に記載の方法。

【請求項61】

前記抗体が、

（a）細胞表面MICA/B抗原のMICアルファ3ドメインに結合するMICA/B抗体、

（b）抗体依存性細胞傷害（ADCC）を誘発する抗体、

（c）抗CD20、抗CD22、抗HER2、抗CD52、抗EGFR、抗CD123、抗GD2、抗PDL1、及び／若しくは抗CD38抗体、並びに／又は

（d）リツキシマブ、ベルツズマブ、オフアツムマブ、ウブリツキシマブ、オカラツズマブ、オビヌツズマブ、イブリツモマブ、オクレリズマブ、イノツズマブ、モキセツモマブ、エブラツズマブ、トラスツズマブ、ベルツズマブ、アレムツズマブ、セツキシマブ、アミバンタマブ、ジヌツキシマブ、アベルマブ、ダラツムマブ、イサツキシマブ、MOR202、7G3、CSL362、エロツズマブ、及びそれらのヒト化若しくはFc改変されたバリエーション又は断片、並びにそれらの機能的同等物及びバイオシミラーのうちの1つ以上、

を含む、請求項59に記載の方法。

【請求項62】

多重特異性エンゲージャを投与することを更に含む、請求項46～61のいずれか一項に記載の方法。

【請求項63】

前記多重特異性エンゲージャが、（i）T細胞エンゲージャ、（ii）NK細胞エンゲージャ、（iii）二重特異性T細胞エンゲージャ（BiTE）、（iv）二重特異性キラー細胞エンゲージャ（BiKE）、（v）三重特異性キラー細胞エンゲージャ（TriKE）、（vi）MICA/Bエンゲージャ、又は（vii）CD16エンゲージャのうちの少なくとも1つである、請求項62に記載の方法。

【請求項64】

腫瘍表面MICA/B発現及び／又は密度を増強する方法であって、腫瘍細胞を感作因子と接触させ、それにより、前記感作因子と接触させる前のMICA/B発現と比較して表面MICA/B発現を増加させることを含む、方法。

【請求項65】

10

20

30

40

50

前記感作因子が、外部ビーム放射線、近接照射療法、放射性医薬品及び化学療法剤のうちの少なくとも1つを含む、請求項64に記載の方法。

【請求項66】

前記感作因子が、

(i) X線放射線、ガンマ線放射線、光子放射線、陽子放射線、及び中性子放射線のうちの少なくとも1つ、又は

(ii) カルシウム-47、炭素-11、炭素-14、クロム-51、コバルト-57、コバルト-58、エルビウム-169、フッ素-18、ガリウム-67、ガリウム-68、水素-3、インジウム-111、ヨウ素-123、ヨウ素-125、ヨウ素-131、鉄(iorn)-59、クリプトン-81m、ルテチウム-177、窒素-13、酸素-15、リン-32、ラジウム-223、ルビジウム-82、サマリウム-153、セレン-75、ナトリウム-22、ナトリウム-24、ストロンチウム-89、テクネチウム-99m、タリウム-201、キセノン-133及びイットリウム-90のうちの少なくとも1つ、又は

(iii) バクリタキセル

を含む、請求項65に記載の方法。

【請求項67】

前記腫瘍細胞を、腫瘍細胞表面MICA/B抗原のMICアルファ3ドメインに結合する抗体と接触させることを更に含む、請求項64に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

本出願は、2021年11月8日に出願された米国仮出願第63/263,758号、及び2021年12月9日に出願された米国仮出願第63/265,192号の優先権を主張し、これらの各々の開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

(配列表の参照による組み込み)

184143-639601__SL.xmlという表題の配列表は、2022年11月7日に作成され、サイズが32,367バイトであり、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0003】

(発明の分野)

本開示は、既製の免疫細胞製品の分野に広く関する。より具体的には、本開示は、インビボで治療に適切な特性を送達することができる多機能エフェクター細胞を開発するための戦略に関する。本開示の下で開発された細胞製品は、患者由来の細胞療法の重大な限界に対処する。

【背景技術】

【0004】

養子細胞療法の分野は現在、患者由来及びドナー由来の細胞を使用することに焦点が当てられているため、がん免疫療法の一貫した製造を達成することと、それから恩恵を受ける可能性のある全ての患者に療法を提供することが特に困難なものとなっている。養子移入されたリンパ球の有効性及び持続性を改善して、患者の良好な転帰を促進する必要性も存在する。T細胞及びナチュラルキラー(natural killer、NK)細胞などのリンパ球は、自然免疫及び適応免疫に重要な役割を果たす強力な抗腫瘍エフェクターである。しかしながら、養子細胞療法のためにこれらの免疫細胞を使用することは、依然として困難であり、改善に対する満たされていない必要性が存在する。したがって、養子免疫療法においてT細胞及びNK細胞、又は他のリンパ球の可能性を最大限に活用するための重要な機会が残っている。

【発明の概要】

【0005】

奏効率、細胞の消耗、輸注された細胞の損失（生存率及び／又は持続性）、標的の喪失又は系統転換による腫瘍エスケープ、腫瘍の標的化の精度、標的外毒性、腫瘍外効果、固形腫瘍に対する有効性、すなわち腫瘍微小環境及び関連する免疫抑制、動員、輸送、並びに浸潤など、様々な問題に対処する機能的に改善されたエフェクター細胞が必要である。

【0006】

本発明の実施形態の目的は、単一細胞由来のiPSC（人工多能性幹細胞）クローン株から分化した派生非多能性細胞を生成する方法及び組成物を提供することであり、このiPSC株はそのゲノムに1つ又はいくつかの遺伝子改変を含む。前述の1つ又はいくつかの遺伝子改変には、いくつかの実施形態において、DNA挿入、欠失、及び置換が含まれ、これらの改変は、分化、増殖、継代及び／又は移植の後、その後の由来細胞において保持され、機能し続ける。

【0007】

本出願のiPSC由来の非多能性細胞には、CD34細胞、造血内皮細胞、HSC（造血幹細胞及び前駆細胞）、造血多能性前駆細胞、T細胞前駆体、NK細胞前駆体、T細胞、NK細胞、及びB細胞が含まれるが、これらに限定されない。本出願のiPSC由来の非多能性細胞は、同一の遺伝子改変を含むiPSCからの分化を通じて、それらのゲノムに1つ又はいくつかの遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作された派生細胞を取得するための操作されたクローンiPSC分化戦略は、指示された分化におけるiPSCの発生の可能性がiPSCの操作されたモダリティによって重大な影響を受けないこと、及び操作されたモダリティが派生細胞で意図したとおりに機能することから利益を得る。更に、この戦略は、末梢血から取得されたT細胞又はNK細胞などの初代リンパ球を操作する際の現在の障壁、すなわち、そのような細胞はしばしば、再現性及び均一性を欠き、高い細胞死及び低い細胞増殖を伴う不十分な細胞の持続性を呈する細胞をもたらす、そのような細胞を操作することが困難であることに起因する障壁を克服する。更に、この戦略は、最初は不均質である初代細胞源を使用して別の方法で取得される不均質のエフェクター細胞集団の生成を回避する。

【0008】

本発明のいくつかの態様は、リプログラミングプロセスに続いて、同時に、及びその前に、それぞれ、ゲノム操作の戦略を反映する（I）、（II）、又は（III）を含む方法を使用して得られたゲノム操作されたiPSCを提供する。

（I）：以下の（i）及び（ii）の一方又は両方を任意の順序で実施してiPSCを遺伝子操作する。（i）iPSCに1つ以上のコンストラクトを導入して、選択された部位での標的化組み込みを可能にし、（ii）（a）選択された部位を認識することができる1つ以上のエンドヌクレアーゼを使用して、選択された部位における1つ以上の二本鎖切断をiPSCに導入し、（b）ステップ（I）（ii）（a）のiPSCを培養して、内因性DNA修復が、選択された部位に標的化インデルを生成することを可能にし、それによって、部分又は完全分化細胞に分化することができるゲノム操作されたiPSCを得る。

（II）：非多能性細胞を遺伝子操作リプログラミングしてゲノム操作されたiPSCを得る。これには、（i）非多能性細胞を1つ以上のリプログラミング因子と、並びに任意選択で、TGFβ受容体／ALK阻害剤、MEK阻害剤、GSK3阻害剤、及び／又はROCK阻害剤を含む小分子組成物と接触させて、非多能性細胞のリプログラミングを開始することと、（ii）ステップ（II）（i）の以下の（a）及び（b）の一方又は両方を任意の順序でリプログラミング非多能性細胞に導入することと、が含まれる：（a）選択された部位での標的化組み込みを可能にする1つ以上の構築物、（b）選択された部位を認識することができる少なくとも1つのエンドヌクレアーゼを使用する、選択された部位での1つ以上の二本鎖切断、次いで、ステップ（II）（ii）（b）の細胞を培養して、内因性DNA修復が、選択された部位に標的化イン／デルを生成することを可能にする。したがって、得られたゲノム操作されたiPSCは、少なくとも1つの機能的な標

的化ゲノム編集を含み、前述のゲノム操作されたiPSCは、部分又は完全分化細胞に分化することができる。

(III)：リプログラミングしてゲノム操作されたiPSCを得るために、非多能性細胞を遺伝子操作する。これには、以下の(i)及び(ii)が含まれる：(i)以下の(a)及び(b)の一方又は両方を任意の順序で非多能性細胞に導入すること：(a)選択された部位での標的化組み込みを可能にする1つ以上の構築物、(b)選択された部位を認識することができる少なくとも1つのエンドヌクレアーゼを使用する、選択された部位での1つ以上の二本鎖切断、であって、ステップ(III)(i)(b)の細胞を培養して、内因性DNA修復が、選択された部位に標的化イン／デルを生成することを可能にする、導入することと、(ii)ステップ(III)(i)の細胞を、1つ以上のリプログラミング因子、並びに任意選択で、TGFβ受容体／ALK阻害剤、MEK阻害剤、GSK3阻害剤、及び／又はROCK阻害剤を含む小分子組成物と接触させて、選択された部位での標的化編集を含むゲノム操作されたiPSCを得ること。それによって、少なくとも1つの機能的な標的化ゲノム編集を含むゲノム操作されたiPSCを得、前述のゲノム操作されたiPSCは、部分分化細胞又は完全分化細胞に分化することができる。

10

20

30

40

【0009】

上述の方法の一実施形態では、1つ以上の選択された部位での少なくとも1つの標的化されたゲノム編集は、安全スイッチタンパク質、標的化モダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬学的に活性なタンパク質及びペプチド、薬物標的候補、又はゲノム操作されたiPSC若しくはその派生細胞の生着、輸送、ホーミング、生存能力、自己複製、持続性、及び／若しくは生存率を促進するタンパク質をコードする1つ以上の外因性ポリヌクレオチドの挿入を含む。いくつかの実施形態では、挿入のための外因性ポリヌクレオチドは、(1)CMV、EF1α、PGK、CAG、UBC、又は他の構成的、誘導性、時間特異的、組織特異的、若しくは細胞型特異的プロモータを含む1つ以上の外因性プロモータ、又は(2)AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、ベータ2ミクログロブリン、GAPDH、TCR若しくはRUNX1、又はゲノムセーフハーバーの基準を満たす他の遺伝子座を含む選択された部位に含まれる1つ以上の内因性プロモータに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、上述の方法を使用して生成されたゲノム操作されたiPSCは、カスパーゼ、チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、改変EGFR、又はB細胞CD20を含むタンパク質をコードする1つ以上の異なる外因性ポリヌクレオチドを含み、ここで、ゲノム操作されたiPSCが2つ以上の自殺遺伝子を含む場合、自殺遺伝子は、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、H11、ベータ2ミクログロブリン、GAPDH、TCR、又はRUNX1を含む異なるセーフハーバー遺伝子座に組み込まれている。一実施形態では、外因性ポリヌクレオチドは、IL2、IL4、IL6、IL7、IL9、IL10、IL11、IL12、IL15、IL18、IL21、及び／又はそれらのそれぞれを受容体の部分長又は全長ペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、外因性ポリヌクレオチドによってコードされるIL2、IL4、IL6、IL7、IL9、IL10、IL11、IL12、IL15、IL18、IL21、及び／又はそれらのそれぞれを受容体の部分長又は全長ペプチドは、融合タンパク質の形態である。

50

【0010】

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

【0011】

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

【0012】

更にいくつかの他の実施形態では、アプローチ(I)、(II)及び／又は(III)は、ゲノム操作されたiPSCを、MEK阻害剤、GSK3阻害剤、及びROCK阻害剤を含む小分子組成物と接触させて、ゲノム操作されたiPSCの多能性を維持することを更に含む。一実施形態では、少なくとも1つの標的化されたゲノム編集を含む取得されたゲノム操作されたiPSCは機能的であり、分化能があり、同一の機能のゲノム編集を含む非多能性細胞に分化することができる。

10

【0013】

したがって、一態様では、本発明はまた、細胞又はその集団を含む組成物であって、細胞は、免疫細胞、人工多能性細胞(iPSC)、又はiPSCを分化させることから得られる派生細胞であり、細胞は、MICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含み、細胞は、MICA/B-CAR(キメラ抗原受容体)、抗MICA/B抗体と組み合わせた場合にADCCを媒介するCD16若しくはそのバリエーション、MICA/B腫瘍抗原を標的とする外因性TCR、又はそれらの任意の組み合わせをコードする1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを任意選択で含み、(i)細胞又はその集団は、MICA/B以外の腫瘍抗原標的化特異性を有するCARを更に含むか、又は(ii)組成物は感作因子を更に含み、感作因子はMICA/Bの腫瘍細胞表面レベルを増加させる、組成物を提供する。

20

【0014】

組成物の様々な実施形態では、iPSCは、クローンiPSC、単一細胞解離iPSC、iPSC細胞株細胞、若しくはiPSCマスター細胞バンク(master cell bank、MCB)細胞であるか、又は派生細胞は、造血細胞であり、末梢血、臍帯血若しくは任意の他のドナー組織から得られるその天然の対応細胞と比較してより長いテロメアを含むか、又はMICA/B-CARが、以下の特徴：(i)T細胞特異的であること、(ii)NK細胞特異的であること、(iii)表面MICA/Bに結合すること、(iv)MICA/Bの保存されたα3ドメインに結合するscFV(単鎖可変フラグメント)を含むこと、(v)配列番号1に対して少なくとも約99%、98%、96%、95%、90%、85%、若しくは80%の同一性であるアミノ酸配列によって表される重鎖可変領域を含むこと、(vi)配列番号2に対して少なくとも約99%、98%、96%、95%、90%、85%、若しくは80%の同一性であるアミノ酸配列によって表される軽鎖可変領域を含むこと、(vii)配列番号3若しくは4に対して少なくとも約99%、98%、96%、95%、90%、85%、若しくは80%の同一性であるアミノ酸配列によって表されるscFVを含むこと、(viii)T細胞受容体(TCR)の第1の定常領域に機能的に連結されたMICA/B結合scFVの重鎖可変領域及びT細胞受容体(TCR)の第2の定常領域に機能的に連結されたMICA/B結合scFVの軽鎖可変領域を含むこと、並びに(ix)遺伝子座：B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCRα若しくはβ定常領域、NKG2A、NKG2D、CD38、CD25、CD44、CD58、CD54、CD69、CD71、CD56、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、若しくはTIGITのうちの1つに挿入されており、必要に応じて、挿入は、遺伝子座における遺伝子の発現をノックアウトすること、のうちの少なくとも1つを有する。組成物のいくつかの実施形態では、細胞は、(i)CD38ノックアウト、(ii)HLA-Iの欠損及び／又はHLA-IIの欠損、(iii)HLA-G若しくは非切断性HLA-Gの導入、又はCD58及びCD54の一方若しくは両方のノックアウト、(iv)外因性CD16又はそのバリエーション、(v)MICA/B以外の標的化特異性を有するキメラ抗原受容体(CAR)、(vi)細胞表面に発現された外因性サイトカイン又はその受容体の部分的な又は完全なペプチドを含むサイトカインシグナル伝達複合

30

40

50

体、(v i i) 表 1 に列挙される遺伝子型のうちの少なくとも 1 つ、(v i i i) その天然の対応細胞と比較した、T A P 1、T A P 2、タパシン、N L R C 5、C I I T A、R F X A N K、R F X 5、R F X A P、T C R α 若しくは β 定常領域、N K G 2 A、N K G 2 D、C D 5 6、C I S、C B L - B、S O C S 2、P D 1、C T L A 4、L A G 3、T I M 3、及び T I G I T のうちの少なくとも 1 つの破壊、並びに (i x) その天然の対応細胞と比較した、H L A - E、4 - 1 B B L、C D 3、C D 4、C D 8、C D 1 6、C D 4 7、C D 1 1 3、C D 1 3 1、C D 1 3 7、C D 8 0、P D L 1、A₂A R、抗原特異的 T C R、F c 受容体、エンゲージャ、及び二重特異性若しくは多重特異性又は普遍的エンゲージャと結合するための表面トリガー受容体のうちの少なくとも 1 つの導入、のうちの 1 つ以上を更に含む。

10

【0015】

組成物のいくつかの実施形態では、外因性 C D 1 6 は、高親和性非切断性 C D 1 6 (h i g h a f f i n i t y n o n - c l e a v a b l e C D 1 6、h n C D 1 6) 又はそのバリエーションを含む。特定の実施形態では、高親和性非切断性 C D 1 6 (h n C D 1 6) 又はそのバリエーションは、(a) C D 1 6 の外部ドメインドメインの F 1 7 6 V 及び S 1 9 7 P、(b) C D 6 4 に由来する完全又は部分外部ドメイン、(c) 非天然 (又は非 C D 1 6) の膜貫通ドメイン、(d) 非天然 (又は非 C D 1 6) の細胞内ドメイン、(e) 非天然 (又は非 C D 1 6) のシグナル伝達ドメイン、(f) 刺激ドメイン、並びに (g) C D 1 6 に由来せず、同じ若しくは異なるポリペプチドに由来する膜貫通、シグナル伝達、及び刺激ドメイン、のうちの少なくとも 1 つを含む。特定の実施形態では、(a) 膜貫通ドメインは、C D 3 δ 、C D 3 ϵ 、C D 3 γ 、C D 3 ζ 、C D 4、C D 8、C D 8 a、C D 8 b、C D 2 7、C D 2 8、C D 4 0、C D 8 4、C D 1 6 6、4 - 1 B B、O X 4 0、I C O S、I C A M - 1、C T L A - 4、P D - 1、L A G - 3、2 B 4、B T L A、C D 1 6、I L 7、I L 1 2、I L 1 5、K I R 2 D L 4、K I R 2 D S 1、N K p 3 0、N K p 4 4、N K p 4 6、N K G 2 C、N K G 2 D、若しくは T 細胞受容体 (T C R) ポリペプチドに由来するか、(b) 刺激ドメインは、C D 2 7、C D 2 8、4 - 1 B B、O X 4 0、I C O S、P D - 1、L A G - 3、2 B 4、B T L A、D A P 1 0、D A P 1 2、C T L A - 4、若しくは N K G 2 D ポリペプチドに由来するか、(c) シグナル伝達ドメインは、C D 3 ζ 、2 B 4、D A P 1 0、D A P 1 2、D N A M 1、C D 1 3 7 (4 - 1 B B)、I L 2 1、I L 7、I L 1 2、I L 1 5、N K p 3 0、N K p 4 4、N K p 4 6、N K G 2 C、若しくは N K G 2 D ポリペプチドに由来するか、又は (d) 膜貫通ドメインは N K G 2 D に由来し、非天然の刺激ドメインは 2 B 4 に由来し、非天然のシグナル伝達ドメインは C D 3 ζ に由来する。

20

30

【0016】

いくつかの実施形態では、感作因子は、外部ビーム放射線 (external beam radiation)、近接照射療法、放射性医薬品、及び化学療法剤のうちの少なくとも 1 つを含む。特定の実施形態では、感作因子は、腫瘍細胞と接触すると、腫瘍細胞による M I C A / B 表面発現を増加させる。いくつかの実施形態では、感作因子は、(i) カルシウム - 4 7、炭素 - 1 1、炭素 - 1 4、クロム - 5 1、コバルト - 5 7、コバルト - 5 8、エルビウム - 1 6 9、フッ素 - 1 8、ガリウム - 6 7、ガリウム - 6 8、水素 - 3、インジウム - 1 1 1、ヨウ素 - 1 2 3、ヨウ素 - 1 2 5、ヨウ素 - 1 3 1、鉄 (i o r n) - 5 9、クリプトン - 8 1 m、ルテチウム - 1 7 7、窒素 - 1 3、酸素 - 1 5、リン - 3 2、ラジウム - 2 2 3、ルビジウム - 8 2、サマリウム - 1 5 3、セレン - 7 5、ナトリウム - 2 2、ナトリウム - 2 4、ストロンチウム - 8 9、テクネチウム - 9 9 m、タリウム - 2 0 1、キセノン - 1 3 3 及びイットリウム - 9 0 のうちの少なくとも 1 つ、(又は (i i) パクリタキセルを含む。

40

【0017】

組成物の様々な実施形態では、組成物は、1 つ以上の治療剤を更に含む。いくつかの実施形態では、治療剤は、ペプチド、サイトカイン、チェックポイント阻害剤、エンゲージャ、抗体、抗体コンジュゲート、マイトジェン、増殖因子、低分子 R N A、d s R N A (

50

二本鎖RNA)、単核血球、フィーダー細胞、フィーダー細胞成分若しくはその補充因子、1つ以上の目的のポリ核酸を含むベクター、抗体、化学療法剤若しくは放射性部分、又は免疫調節薬(IMiD)を含む。治療剤がチェックポイント阻害剤である実施形態では、チェックポイント阻害剤は、(i)PD-1、PDL-1、TIM-3、TIGIT、LAG-3、CTLA-4、2B4、4-1BB、4-1BBL、A2AR、BATE、BTLA、CD39、CD47、CD73、CD94、CD96、CD160、CD200、CD200R、CD274、CEACAM1、CSF-1R、Foxp1、GARP、HVEM、IDO、EDO、TDO、LAIR-1、MICA/B、NR4A2、MAFB、OCT-2、Rara(レチノイン酸受容体アルファ)、TLR3、VISTA、NKG2A/HLA-E、若しくは抑制性KIRを含む1つ以上のアンタゴニストチェックポイント分子、(ii)アテゾリズマブ、アベルマブ、セツキシマブ、デュルバルマブ、イピリムマブ、IPH4102、IPH43、IPH33、リリムマブ、モナリズマブ、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、トラスツズマブ、ペルツズマブ、及びそれらの誘導体若しくは機能的同等物のうちの1つ以上、(iii)アテゾリズマブ、ニボルマブ、及びペンブロリズマブのうちの少なくとも1つ、を含んでもよく又は治療剤が、ベネトクラクス、アザシチジン、及びボマリドマイドのうちの1つ以上を含む。治療剤が抗体である実施形態では、抗体は、(a)抗CD20、抗CD22、抗HER2、抗CD52、抗EGFR、抗CD123、抗GD2、抗PDL1、及び/又は抗CD38抗体、又は(b)リツキシマブ、ペルツズマブ、オフアツムマブ、ウブリツキシマブ、オカラツズマブ、オビヌツズマブ、イブリツモマブ、オクレリズマブ、イノツズマブ、モキセツモマブ、エブラツズマブ、トラスツズマブ、ペルツズマブ、アレムツズマブ、セツキシマブ、アミバンタマブ、ジヌツキシマブ、アベルマブ、ダラツムマブ、イサツキシマブ、MOR202、7G3、CSL362、エロツズマブ、及びそれらのヒト化若しくはFc改変されたバリエーション若しくは断片、並びにそれらの機能的同等物及びバイオシミラーのうちの1つ以上、を含んでもよい。

10

20

30

40

50

【0018】

組成物の様々な実施形態では、組成物は、多重特異性エンゲージャを更に含む。いくつかの実施形態では、多重特異性エンゲージャは、(i)T細胞エンゲージャ、(ii)NK細胞エンゲージャ、(iii)二重特異性T細胞エンゲージャ(bi-specific T cell engager、BiTE)、(iv)二重特異性キラー細胞エンゲージャ(bi-specific killer cell engager、BiKE)、(v)三重特異性キラー細胞エンゲージャ(tri-specific killer cell engager、TriKE)、(vi)MICA/Bエンゲージャ、又は(vii)CD16エンゲージャ、のうちの少なくとも1つである。

【0019】

組成物の様々な実施形態では、細胞は、派生NK細胞又は派生T細胞であり、末梢血、臍帯血、又は任意の他のドナー組織から得られるその天然の対応細胞と比較して、(i)改善された持続性及び/又は生存率、(ii)自然免疫細胞に対する増加した耐性、(iii)増加した細胞傷害性、(iv)改善された腫瘍浸透、(v)増強又は獲得したADCC、(vi)バイスタンダー免疫細胞を腫瘍部位に遊走、及び/又は活性化若しくは動員する増強された能力、(vii)腫瘍免疫抑制を低下させる増強された能力、(viii)腫瘍抗原エスケープの救済の改善された能力、(ix)腫瘍抗原を安定化させる能力、並びに(x)フラトリサイドを回避する能力、を含む特徴のうちの少なくとも1つを有する。

【0020】

組成物の様々な実施形態では、MICA/B以外の腫瘍抗原標的化特異性を有するCARは、(i)T細胞特異的若しくはNK細胞特異的なもの、(ii)二重特異性抗原結合CAR、(iii)切り替え可能なCAR、(iv)二量体化されたCAR、(v)スプリットCAR、(vi)多重鎖CAR、(vii)誘導性CAR、(viii)組換えTCR、(ix)別のCARと共発現されたもの、(x)必要に応じて別個の構築物内で、若しくはバイシストロン性構築物内で、細胞表面に発現された外因性サイトカイン若しくは

はその受容体の部分的な若しくは完全なペプチドを含むサイトカインシグナル伝達複合体と共発現されたもの、(x i) 必要に応じて別個の構築物内で、若しくはバイシストロン性構築物内で、チェックポイント阻害剤と共発現されたもの、(x i i) CD 19、BCMA、CD 20、CD 22、CD 38、CD 123、HER 2、CD 52、EGFR、GD 2、MSLN、VEGF-R 2、PSMA 及び PDL 1 のうちの少なくとも 1 つに特異的なもの、並びに／又は (x i i i) ADGRE 2、炭酸脱水酵素 IX (CAIX)、CCR 1、CCR 4、がん胎児性抗原 (CEA)、CD 3、CD 5、CD 7、CD 8、CD 10、CD 20、CD 22、CD 30、CD 33、CD 34、CD 38、CD 41、CD 44、CD 44 V 6、CD 49 f、CD 56、CD 70、CD 74、CD 99、CD 123、CD 133、CD 138、CDS、CLEC 12 A、サイトメガロウイルス (CMV) 感染細胞の抗原、上皮糖タンパク質 2 (EGP-2)、上皮糖タンパク質-40 (EGP-40)、上皮細胞接着分子 (EPCAM)、EGFRvIII、受容体チロシンタンパク質キナーゼ erb-B 2、3、4、EGFR、EGFR-VIII、ERBB 葉酸結合タンパク質 (FBP)、胎児のアセチルコリン受容体 (AChR)、葉酸受容体- α 、ガングリオシド G 2 (GD 2)、ガングリオシド G 3 (GD 3)、ヒト上皮増殖因子受容体 2 (HER 2)、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT)、ICAM-1、インテグリン B 7、インターロイキン-13 受容体サブユニットアルファ-2 (IL-13R α 2)、 κ -軽鎖、キナーゼ挿入ドメイン受容体 (KDR)、ルイス A (CA 19.9)、ルイス Y (LeY)、L 1 細胞接着分子 (L1-CAM)、LILRB 2、黒色腫抗原ファミリー A 1 (MAGE-A 1)、MICA/B、ムチン 1 (Muc-1)、ムチン 16 (Muc-16)、メソテリン (MSLN)、NKCSI、NKG2D リガンド、c-Met、がん-精巢抗原 NY-ESO-1、腫瘍胎児性抗原 (h5T4)、PRAME、前立腺幹細胞抗原 (PSCA)、PRAME 前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、腫瘍関連糖タンパク質 72 (TAG-72)、TIM-3、TRBC 1、TRBC 2、血管内皮増殖因子 R 2 (VEGF-R 2)、ウィルムス腫瘍タンパク質 (WT-1)、及び病原体抗原のうちのいずれか 1 つに特異的なもの、であり、(i) から (x i i i) のうちのいずれか 1 つの CAR は、必要に応じて TRAC 遺伝子座に挿入されている、及び／又は TCR の内因性プロモータによって駆動されている、及び／又は TCR は CAR 挿入によってノックアウトされている。一実施形態では、MICA/B 以外の腫瘍抗原標的化特異性を有する CAR は、BCMA に特異的である。組成物の様々な実施形態では、サイトカインシグナル伝達複合体は、(a) IL 2、IL 4、IL 6、IL 7、IL 9、IL 10、IL 11、IL 12、IL 15、IL 18、IL 21、及びそのそれぞれの受容体のうちの少なくとも 1 つの部分的な若しくは完全なペプチドを含むか、又は (b) (i) 自己切断ペプチドを使用することによる IL 15 及び IL 15 R α の共発現、(i i) IL 15 と IL 15 R α との融合タンパク質、(i i i) IL 15 R α の細胞内ドメインが短縮された IL 15 / IL 15 R α 融合タンパク質、(i v) IL 15 と IL 15 R α の膜結合 Sushidメインとの融合タンパク質、(v) IL 15 と IL 15 R β との融合タンパク質、(v i) IL 15 と共通受容体 γ C との融合タンパク質であって、共通受容体 γ C が天然であるか、若しくは改変されている、融合タンパク質、並びに (v i i) IL 15 R β のホモ二量体、のうちの少なくとも 1 つであって、(b) (i) ~ (v i i) のうちのいずれか 1 つが、別個の構築物内で、若しくはバイシストロン性構築物内で、CAR と共発現され得る、少なくとも 1 つを含むか、(c) (i) IL 7 と IL 7 R α との融合タンパク質、(i i) IL 7 と共通受容体 γ C との融合タンパク質であって、共通受容体 γ C が、天然であるか若しくは改変されている、融合タンパク質、及び (i i i) IL 7 R β のホモ二量体、のうちの少なくとも 1 つであって、(c) (i) ~ (i i i) のうちのいずれか 1 つが、任意選択で、別個の構築物内で、若しくはバイシストロン性発現カセット内で、CAR と共発現される、少なくとも 1 つ、を含み、任意選択で、(c) は、一過的に発現される。組成物の様々な実施形態では、細胞は、派生 NK 細胞又は派生 T 細胞であり、派生 NK 細胞は、T 細胞を腫瘍部位に動員及び／又は遊走させることができ、派生 NK 細胞又は派生 T 細胞は、1 つ以上のチェックポイント阻害剤の存在下で腫瘍免疫抑制を

10

20

30

40

50

低下させることができる。

【0021】

1つ以上のチェックポイント阻害剤を含む組成物の実施形態では、チェックポイント阻害剤は、PD-1、PDL-1、TIM-3、TIGIT、LAG-3、CTLA-4、2B4、4-1BB、4-1BBL、A_{2A}R、BATE、BTLA、CD39、CD47、CD73、CD94、CD96、CD160、CD200、CD200R、CD274、CEACAM1、CSF-1R、Foxp1、GARP、HVEM、IDO、EDO、TDO、LAIR-1、MICA/B、NR4A2、MAFB、OCT-2、Rara（レチノイン酸受容体アルファ）、TLR3、VISTA、NKG2A/HLA-E、若しくは抑制性KIRを含む1つ以上のチェックポイント分子に対するアンタゴニストであつてもよい。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、（a）アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、イピリムマブ、IPH4102、IPH43、IPH33、リリムマブ、モナリズマブ、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、及びそれらの誘導体若しくは機能的同等物のうちの1つ以上、又は（b）アテゾリズマブ、ニボルマブ、及びペンブロリズマブのうちの少なくとも1つ、を含む。

10

【0022】

組成物の様々な実施形態では、派生細胞は、派生CD34⁺細胞、派生造血幹細胞及び前駆細胞、派生造血多能性前駆細胞、派生T細胞前駆細胞、派生NK細胞前駆細胞、派生T細胞、派生NKT細胞、派生NK細胞又は派生B細胞を含む。いくつかの実施形態では、細胞は、（i）1つのセーフハーバー遺伝子座若しくは選択された遺伝子座に組み込まれた1つ以上の外因性ポリヌクレオチド、又は（ii）異なるセーフハーバー遺伝子座若しくは2つ以上の選択された遺伝子座に組み込まれた2つを超える外因性ポリヌクレオチド、を含む。特定の実施形態では、セーフハーバー遺伝子座は、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、GAPDH、若しくはRUNX1のうちの少なくとも1つを含み、選択された遺伝子座は、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCR、NKG2A、NKG2D、CD38、CD25、CD44、CD58、CD54、CD56、CD69、CD71、CIS、CBL-B、SOC2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、若しくはTIGITのうちの1つであり、外因性ポリヌクレオチドの組み込みは、遺伝子座における遺伝子の発現を必要に応じてノックアウトし、必要に応じて、外因性ポリヌクレオチドは、遺伝子座における内因性プロモータの下で発現する。いくつかの実施形態では、TCR遺伝子座は、TCRアルファ又はTCRベータの定常領域である。

20

30

【0023】

別の態様では、本発明は、組成物を養子細胞療法に適した対象に導入することによる本明細書に記載の組成物の治療的使用であつて、対象は、自己免疫障害、血液悪性腫瘍、固形腫瘍、がん、又はウイルス感染を有する、治療的使用を提供する。別の態様では、本発明は、本明細書に記載の組成物を対象に投与することを含む、対象を治療する方法を提供する。様々な実施形態では、方法は、1つ以上の治療剤を対象に投与することを更に含む。

【0024】

更に別の態様では、本発明は、対象を治療する方法であつて、（a）感作因子を対象に投与して、対象における腫瘍細胞を前処理することと、（b）腫瘍細胞を前処理した後に、細胞又はその集団を対象に投与することであつて、細胞は、免疫細胞であるか、又はiPSCを分化させることから得られた派生細胞であり、細胞は、MICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含み、細胞は、MICA/B-CAR（キメラ抗原受容体）、抗MICA/B抗体と組み合わせた場合にADCCを媒介するCD16若しくはそのバリエーション、MICA/B腫瘍抗原を標的とする外因性TCR、又はそれらの任意の組み合わせをコードする1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを必要に応じて含む、投与することと、を含み、対象は、自己免疫障害、血液悪性腫瘍、固形腫瘍、がん、又はウイルス感染を有する、方法を提供する。治療する方法の様々な実施形態では、感作因子は、化学療法剤、外部ビーム

40

50

放射線、近接照射療法、及び放射性医薬品のうちの少なくとも1つを含む。様々な実施形態では、感作因子は、腫瘍細胞と接触すると、腫瘍細胞上のMICA/B表面発現及び／又は密度を増加させる。特定の実施形態では、感作因子は、(i) X線放射線、ガンマ線放射線、光子放射線、陽子放射線、及び中性子放射線のうちの少なくとも1つ、又は(ii) カルシウム-47、炭素-11、炭素-14、クロム-51、コバルト-57、コバルト-58、エルビウム-169、フッ素-18、ガリウム-67、ガリウム-68、水素-3、インジウム-111、ヨウ素-123、ヨウ素-125、ヨウ素-131、鉄(iorn)-59、クリプトン-81m、ルテチウム-177、窒素-13、酸素-15、リン-32、ラジウム-223、ルビジウム-82、サマリウム-153、セレン-75、ナトリウム-22、ナトリウム-24、ストロンチウム-89、テクネチウム-99m、タリウム-201、キセノン-133及びイットリウム-90のうちの少なくとも1つ、又は(iii) パクリタキセル、を含む。様々な実施形態では、方法は、細胞又はその集団を投与する前又は投与している間に、MICA/B腫瘍細胞表面抗原のMICアルファ3ドメインに結合する抗体を投与することを更に含む。

10

【0025】

いくつかの実施形態では、派生細胞は、造血細胞であり、末梢血、臍帯血若しくは任意の他のドナー組織から得られるその天然の対応細胞と比較してより長いテロメアを含むか、又はMICA/B-CARが、以下の特徴：(i) T細胞特異的であること、(ii) NK細胞特異的であること、(iii) 表面MICA/Bに結合すること、(iv) MICA/Bの保存されたα3ドメインに結合するscFV(単鎖可変フラグメント)を含むこと、(v) 配列番号1に対して少なくとも約99%、98%、96%、95%、90%、85%、若しくは80%の同一性であるアミノ酸配列によって表される重鎖可変領域を含むこと、(vi) 配列番号2に対して少なくとも約99%、98%、96%、95%、90%、85%、若しくは80%の同一性であるアミノ酸配列によって表される軽鎖可変領域を含むこと、(vii) 配列番号3若しくは4に対して少なくとも約99%、98%、96%、95%、90%、85%、若しくは80%の同一性であるアミノ酸配列によって表されるscFVを含むこと、(viii) T細胞受容体(TCR)の第1の定常領域に機能的に連結されたMICA/B結合scFVの重鎖可変領域及びT細胞受容体(TCR)の第2の定常領域に機能的に連結されたMICA/B結合scFVの軽鎖可変領域を含むこと、(ix) 遺伝子座：B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCRα若しくはβ定常領域、NKG2A、NKG2D、CD38、CD25、CD44、CD58、CD54、CD56、CD69、CD71、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、若しくはTIGITのうちの1つに挿入されており、必要に応じて、挿入は、遺伝子座における遺伝子の発現をノックアウトすること、のうちの少なくとも1つを有する。方法のいくつかの実施形態では、細胞は、(i) CD38ノックアウト、(ii) HLA-Iの欠損及び／又はHLA-IIの欠損、(iii) HLA-G若しくは非切断性HLA-Gの導入、又はCD58及びCD54の一方若しくは両方のノックアウト、(iv) 外因性CD16又はそのバリエーション、(v) MICA/B以外の標的化特異性を有するキメラ抗原受容体(CAR)、(vi) 細胞表面に発現された外因性サイトカイン又はその受容体の部分的な又は完全なペプチドを含むサイトカインシグナル伝達複合体、(vii) 表1に列挙される遺伝子型のうちの少なくとも1つ、(viii) その天然の対応細胞と比較した、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCRα若しくはβ定常領域、NKG2A、NKG2D、CD56、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、及びTIGITのうちの少なくとも1つの破壊、並びに(ix) その天然の対応細胞と比較した、HLA-E、4-1BBL、CD3、CD4、CD8、CD16、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、A2AR、抗原特異的TCR、Fc受容体、エンゲージャ、及び二重特異性若しくは多重特異性又は普遍的エンゲージャと結合するための表面トリガー受容体のうちの少なくとも1つの導入された又は増加さ

20

30

40

50

れた発現、のうちの1つ以上を更に含む。方法のいくつかの実施形態では、外因性CD16は、高親和性非切断性CD16(hnCD16)若しくはそのバリエーションを含む。特定の実施形態では、高親和性非切断性CD16(hnCD16)又はそのバリエーションは、(a)CD16の外部ドメインのF176V及びS197P、(b)CD64に由来する完全又は部分外部ドメイン、(c)非天然(又は非CD16)の膜貫通ドメイン、(d)非天然(又は非CD16)の細胞内ドメイン、(e)非天然(又は非CD16)のシグナル伝達ドメイン、(f)刺激ドメイン、並びに(g)CD16に由来せず、同じ若しくは異なるポリペプチドに由来する膜貫通、シグナル伝達、及び刺激ドメイン、のうちの少なくとも1つを含む。

【0026】

治療する方法の様々な実施形態では、MICA/B以外の標的化特異性を有する(v)のキメラ抗原受容体(CAR)は、(i)T細胞特異的又はNK細胞特異的なもの、(ii)二重特異性抗原結合CAR、(iii)切り替え可能なCAR、(iv)二量体化されたCAR、(v)スプリットCAR、(vi)多重鎖CAR、(vii)誘導性CAR、(viii)組換えTCR、(ix)別のCARと共発現されたもの、(x)必要に応じて別個の構築物内で、若しくはバイシストロン性構築物内で、細胞表面に発現された外因性サイトカイン若しくはその受容体の部分的な若しくは完全なペプチドを含むサイトカインシグナル伝達複合体と共発現されたもの、(xi)必要に応じて別個の構築物内で、若しくはバイシストロン性構築物内で、チェックポイント阻害剤と共発現されたもの、(xii)CD19、BCMA、CD20、CD22、CD38、CD123、HER2、CD52、EGFR、GD2、MSLN、VEGFR2、PSMA及びPDL1のうちの少なくとも1つに特異的なもの、並びに／又は(xiii)ADGRE2、炭酸脱水酵素IX(CAIX)、CCR1、CCR4、がん胎児性抗原(CEA)、CD3、CD5、CD7、CD8、CD10、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD44V6、CD49f、CD56、CD70、CD74、CD99、CD123、CD133、CD138、CDS、CLEC12A、サイトメガロウイルス(CMV)感染細胞の抗原、上皮糖タンパク質-2(EGP-2)、上皮糖タンパク質-40(EGP-40)、上皮細胞接着分子(EpCAM)、EGFRvIII、受容体チロシンタンパク質キナーゼerbB-2、3、4、EGFR、EGFR-VIII、ERBB葉酸結合タンパク質(FBP)、胎児のアセチルコリン受容体(ACHR)、葉酸受容体-α、ガングリオシドG2(GD2)、ガングリオシドG3(GD3)、ヒト上皮増殖因子受容体2(HER2)、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)、ICAM-1、インテグリンB7、インターロイキン-13受容体サブユニットアルファ-2(IL-13Rα2)、κ-軽鎖、キナーゼ挿入ドメイン受容体(KDR)、ルイスA(CA19.9)、ルイスY(LeY)、L1細胞接着分子(L1-CAM)、LILRB2、黒色腫抗原ファミリーA1(MAGE-A1)、MICA/B、ムチン1(Muc-1)、ムチン16(Muc-16)、メソテリン(MSLN)、NKCSI、NKG2Dリガンド、c-Met、がん-精巣抗原NY-ESO-1、腫瘍胎児性抗原(h5T4)、PRAME、前立腺幹細胞抗原(PSCA)、PRAME前立腺特異的膜抗原(PSMA)、腫瘍関連糖タンパク質72(TAG-72)、TIM-3、TRBC1、TRBC2、血管内皮増殖因子R2(VEGFR2)、ウィルムス腫瘍タンパク質(WT-1)、及び病原体抗原のうちのいずれか1つに特異的なもの、であり、(i)から(xiii)のうちのいずれか1つのCARは、必要に応じてTRAC遺伝子座に挿入されている、及び／又はTCRの内因性プロモータによって駆動されている、及び／又はTCRはCAR挿入によってノックアウトされている。一実施形態では、CARは、BCMAに特異的である。

【0027】

治療する方法の様々な実施形態では、方法は、1つ以上の治療剤を投与することを更に含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の治療剤は、ペプチド、サイトカイン、抗体、抗体コンジュゲート、チェックポイント阻害剤、マイトジェン、増殖因子、低分子RNA

10

20

30

40

50

、dsRNA（二本鎖RNA）、単核血球、フィーダー細胞、フィーダー細胞成分若しくはその補充因子、1つ以上の目的のポリ核酸を含むベクター、抗体、化学療法剤又は放射性部分、又は免疫調節薬（IMiD）を含む。治療剤がチェックポイント阻害剤である実施形態では、チェックポイント阻害剤は、（i）PD-1、PDL-1、TIM-3、TIGIT、LAG-3、CTLA-4、2B4、4-1BB、4-1BBL、A2AR、BATE、BTLA、CD39、CD47、CD73、CD94、CD96、CD160、CD200、CD200R、CD274、CEACAM1、CSF-1R、Foxp1、GARP、HVEM、IDO、EDO、TDO、LAIR-1、MICA/B、NR4A2、MAFB、OCT-2、Rara（レチノイン酸受容体アルファ）、TLR3、VISTA、NKG2A/HLA-E、若しくは抑制性KIRを含む1つ以上のアンタゴニストチェックポイント分子、（ii）アテゾリズマブ、アベルマブ、セツキシマブ、デュルバルマブ、イピリムマブ、IPH4102、IPH43、IPH33、リリムマブ、モナリズマブ、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、トラスツズマブ、ペルツズマブ、及びそれらの誘導体若しくは機能的同等物のうちの1つ以上、（iii）アテゾリズマブ、ニボルマブ、及びペンブロリズマブのうちの少なくとも1つ、を含んでもよく又は（b）治療剤は、ベネトクラクス、アザシチジン、及びボマリドマイドのうちの1つ以上を含む。治療剤が抗体である実施形態では、抗体は、（a）細胞表面MICA/B抗原のMICアルファ3ドメインに結合するMICA/B抗体、（b）抗体依存性細胞傷害（ADCC）を誘発する抗体、（c）抗CD20、抗CD22、抗HER2、抗CD52、抗EGFR、抗CD123、抗GD2、抗PDL1、及び／若しくは抗CD38抗体、又は（d）リツキシマブ、ペルツズマブ、オフアツムマブ、ウブリツキシマブ、オカラツズマブ、オビヌツズマブ、イブリツモマブ、オクレリズマブ、イノツズマブ、モキセツモマブ、エブラツズマブ、トラスツズマブ、ペルツズマブ、アレムツズマブ、セツキシマブ、アミバンタマブ、ジヌツキシマブ、アベルマブ、ダラツムマブ、イサツキシマブ、MOR202、7G3、CSL362、エロツズマブ、及びそれらのヒト化若しくはFc改変されたバリエーション若しくは断片、並びにそれらの機能的同等物及びバイオシミラーのうちの1つ以上、を含んでもよい。治療する方法の様々な実施形態では、方法は、多重特異性エンゲージャを投与することを更に含む。いくつかの実施形態では、多重特異性エンゲージャは、（i）T細胞エンゲージャ、（ii）NK細胞エンゲージャ、（iii）二重特異性T細胞エンゲージャ（BiTE）、（iv）二重特異性キラー細胞エンゲージャ（bi-specific killer cell engager、BiKE）、（v）三重特異性キラー細胞エンゲージャ（TriKE）、（vi）MICA/Bエンゲージャ、又は（vii）CD16エンゲージャ、のうちの少なくとも1つである。

10

20

30

40

50

【0028】

更に別の態様では、本発明は、対象を治療する方法であって、細胞又はその集団を対象に投与することを含み、細胞は、免疫細胞又はiPSCを分化させることから得られた派生細胞であり、細胞は、（a）MICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含み、（b）MICA/B以外の腫瘍抗原に対する特異性を有するCARをコードする外因性ポリヌクレオチドを含み、任意選択で、MICA/B腫瘍抗原標的化特異性は、（i）MICA/B-CAR（キメラ抗原受容体）、（ii）抗MICA/B抗体と組み合わせた場合にADCCを媒介するCD16又はそのバリエーション、（iii）MICA/B腫瘍抗原を標的とする外因性TCR、又は（iv）それらの任意の組み合わせをコードする1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含み、対象は、自己免疫障害、血液悪性腫瘍、固形腫瘍、がん、又はウイルス感染を有する、方法を提供する。治療する方法の様々な実施形態では、（b）のCARは、（i）T細胞特異的若しくはNK細胞特異的なもの、（ii）二重特異性抗原結合CAR、（iii）切り替え可能なCAR、（iv）二量体化されたCAR、（v）スプリットCAR、（vi）多重鎖CAR、（vii）誘導性CAR、（viii）組換えTCR、（ix）別のCARと共発現されたもの、（x）必要に応じて別個の構築物内で、若しくはバイシストロン性構築物内で、細胞表面に発現された外因性サイトカイン若しくはその受容体の部分的な若しくは完全なペプチドを含むサイトカインシグナル伝達複合

体と共発現されたもの、(x i) 必要に応じて別個の構築物内で、若しくはバイシストロン性構築物内で、チェックポイント阻害剤と共発現されたもの、(x i i) CD 19、B C M A、CD 20、CD 22、CD 38、CD 123、H E R 2、CD 52、E G F R、G D 2、M S L N、V E G F - R 2、P S M A 及び P D L 1 のうちの少なくとも1つに特異的なもの、並びに／又は (x i i i) A D G R E 2、炭酸脱水酵素 I X (C A I X)、C C R 1、C C R 4、がん胎児性抗原 (C E A)、CD 3、CD 5、CD 7、CD 8、C D 10、CD 20、CD 22、CD 30、CD 33、CD 34、CD 38、CD 41、C D 44、C D 44 V 6、C D 49 f、C D 56、C D 70、C D 74、C D 99、C D 123、C D 133、C D 138、C D S、C L E C 12 A、サイトメガロウイルス (C M V) 感染細胞の抗原、上皮糖タンパク質-2 (E G P - 2)、上皮糖タンパク質-40 (E G P - 40)、上皮細胞接着分子 (E p C A M)、E G F R v I I I、受容体チロシンタンパク質キナーゼ e r b - B 2、3、4、E G F I R、E G F R - V I I I、E R B B 葉酸結合タンパク質 (F B P)、胎児のアセチルコリン受容体 (A C h R)、葉酸受容体 - α 、ガングリオシド G 2 (G D 2)、ガングリオシド G 3 (G D 3)、ヒト上皮増殖因子受容体 2 (H E R 2)、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (h T E R T)、I C A M - 1、インテグリン B 7、インターロイキン-13 受容体サブユニットアルファ-2 (I L - 13 R α 2)、 κ -軽鎖、キナーゼ挿入ドメイン受容体 (K D R)、ルイス A (C A 19.9)、ルイス Y (L e Y)、L 1 細胞接着分子 (L 1 - C A M)、L I L R B 2、黒色腫抗原ファミリー A 1 (M A G E - A 1)、M I C A / B、ムチン 1 (M u c - 1)、ムチン 16 (M u c - 16)、メソテリン (M S L N)、N K C S I、N K G 2 D リガンド、c - M e t、がん-精巢抗原 N Y - E S O - 1、腫瘍胎児性抗原 (h 5 T 4)、P R A M E、前立腺幹細胞抗原 (P S C A)、P R A M E 前立腺特異的膜抗原 (P S M A)、腫瘍関連糖タンパク質 72 (T A G - 72)、T I M - 3、T R B C I、T R B C 2、血管内皮増殖因子 R 2 (V E G F - R 2)、ウィルムス腫瘍タンパク質 (W T - 1)、及び病原体抗原のうちのいずれか1つに特異的なもの、であり、(i) から (x i i i) のうちのいずれか1つの C A R は、必要に応じて T R A C 遺伝子座に挿入されている、及び／又は T C R の内因性プロモータによって駆動されている、及び／又は T C R は C A R 挿入によってノックアウトされている。一実施形態では、(b) の C A R は、B C M A に特異的である。

10

20

30

40

50

【0029】

治療する方法の様々な実施形態では、方法は、対象に感作因子を投与して、対象中の腫瘍細胞を前処理することを更に含む。いくつかの実施形態では、感作因子は、腫瘍細胞と接触すると、腫瘍細胞上の M I C A / B 表面発現及び／又は M I C A / B 密度を増加させる。治療する方法の様々な実施形態では、感作因子は、化学療法剤、外部ビーム放射線、近接照射療法、及び放射性医薬品のうちの少なくとも1つを含む。特定の実施形態では、感作因子は、(i) X線放射線、ガンマ線放射線、光子放射線、陽子放射線、及び中性子放射線のうちの少なくとも1つ、又は (i i) カルシウム-47、炭素-11、炭素-14、クロム-51、コバルト-57、コバルト-58、エルビウム-169、フッ素-18、ガリウム-67、ガリウム-68、水素-3、インジウム-111、ヨウ素-123、ヨウ素-125、ヨウ素-131、鉄 (i o r n) - 59、クリプトン-81m、ルテチウム-177、窒素-13、酸素-15、リン-32、ラジウム-223、ルビジウム-82、サマリウム-153、セレン-75、ナトリウム-22、ナトリウム-24、ストロンチウム-89、テクネチウム-99m、タリウム-201、キセノン-133 及び イットリウム-90 のうちの少なくとも1つ、又は (i i i) パクリタキセル、を含む。治療する方法の様々な実施形態では、方法は、細胞又はその集団を投与する前又は投与している間に、M I C A / B 腫瘍細胞表面抗原の M I C アルファ3ドメインに結合する抗体を投与することを更に含む。治療する方法のいくつかの実施形態では、派生細胞は、造血細胞であり、末梢血、臍帯血若しくは任意の他のドナー組織から得られるその天然の対応細胞と比較してより長いテロメアを含むか、又は M I C A / B - C A R が、以下の特徴：(i) T細胞特異的であること、(i i) N K細胞特異的であること、(i i i) 表面 M

ICA/Bに結合すること、(iv) MICA/Bの保存されたα3ドメインに結合するscFV（単鎖可変フラグメント）を含むこと、(v) 配列番号1に対して少なくとも約99%、98%、96%、95%、90%、85%、若しくは80%の同一性であるアミノ酸配列によって表される重鎖可変領域を含むこと、(vi) 配列番号2に対して少なくとも約99%、98%、96%、95%、90%、85%、若しくは80%の同一性であるアミノ酸配列によって表される軽鎖可変領域を含むこと、(vii) 配列番号3若しくは4に対して少なくとも約99%、98%、96%、95%、90%、85%、若しくは80%の同一性であるアミノ酸配列によって表されるscFVを含むこと、(viii) T細胞受容体（TCR）の第1の定常領域に機能的に連結されたMICA/B結合scFVの重鎖可変領域及びT細胞受容体（TCR）の第2の定常領域に機能的に連結されたMICA/B結合scFVの軽鎖可変領域を含むこと、(ix) 遺伝子座：B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCRα若しくはβ定常領域、NKG2A、NKG2D、CD38、CD25、CD44、CD58、CD54、CD56、CD69、CD71、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、若しくはTIGITのうちの1つに挿入されており、必要に応じて、挿入は、遺伝子座における遺伝子の発現をノックアウトすること、のうちの少なくとも1つを有する。

10

【0030】

治療する方法の様々な実施形態では、細胞は、(i) CD38ノックアウト、(ii) HLA-Iの欠損及び／又はHLA-IIの欠損、(iii) HLA-G若しくは非切断性HLA-Gの導入、又はCD58及びCD54の一方若しくは両方のノックアウト、(iv) 外因性CD16又はそのバリエーション、(v) 細胞表面に発現された外因性サイトカイン又はその受容体の部分的な又は完全なペプチドを含むサイトカインシグナル伝達複合体、(vi) 表1に列挙された遺伝子型のうちの少なくとも1つ、(vii) その天然の対応細胞と比較した、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCRα若しくはβ定常領域、NKG2A、NKG2D、CD56、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、及びTIGITのうちの少なくとも1つの破壊、並びに(viii) その天然の対応細胞と比較した、HLA-E、4-1BBL、CD3、CD4、CD8、CD16、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、A2AR、抗原特異的TCR、Fc受容体、エンゲージャ、及び二重特異性若しくは多重特異性又は普遍的エンゲージャと結合するための表面トリガー受容体のうちの少なくとも1つの導入、のうちの1つ以上を更に含む。いくつかの実施形態では、外因性CD16は、高親和性非切断性CD16（hnCD16）若しくはそのバリエーションを含む。特定の実施形態では、高親和性非切断性CD16（hnCD16）又はそのバリエーションは、(a) CD16の外部ドメインドメインのF176V及びS197P、(b) CD64に由来する完全又は部分外部ドメイン、(c) 非天然（又は非CD16）の膜貫通ドメイン、(d) 非天然（又は非CD16）の細胞内ドメイン、(e) 非天然（又は非CD16）のシグナル伝達ドメイン、(f) 刺激ドメイン、並びに(g) CD16に由来せず、同じ若しくは異なるポリペプチドに由来する膜貫通、シグナル伝達、及び刺激ドメイン、のうちの少なくとも1つを含む。

20

30

40

【0031】

治療する方法の様々な実施形態では、方法は、1つ以上の治療剤を投与することを更に含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の治療剤は、ペプチド、サイトカイン、抗体、抗体コンジュゲート、チェックポイント阻害剤、マイトジェン、増殖因子、低分子RNA、dsRNA（二本鎖RNA）、単核血球、フィーダー細胞、フィーダー細胞成分若しくはその補充因子、1つ以上の目的のポリ核酸を含むベクター、抗体、化学療法剤又は放射性部分、又は免疫調節薬（IMiD）を含む。治療剤がチェックポイント阻害剤である実施形態では、チェックポイント阻害剤は、(i) PD-1、PDL-1、TIM-3、TIGIT、LAG-3、CTLA-4、2B4、4-1BB、4-1BBL、A2AR、

50

B A T E、B T L A、C D 3 9、C D 4 7、C D 7 3、C D 9 4、C D 9 6、C D 1 6 0、C D 2 0 0、C D 2 0 0 R、C D 2 7 4、C E A C A M 1、C S F-1 R、F o x p l、G A R P、H V E M、I D O、E D O、T D O、L A I R-1、M I C A/B、N R 4 A 2、M A F B、O C T-2、R a r a (レチノイン酸受容体アルファ)、T L R 3、V I S T A、N K G 2 A/H L A-E、若しくは抑制性 K I R を含む 1 つ以上のアンタゴニストチェックポイント分子、(i i) アテゾリズマブ、アベルマブ、セツキシマブ、デュルバルマブ、イピリムマブ、I P H 4 1 0 2、I P H 4 3、I P H 3 3、リリムマブ、モナリズマブ、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、トラスツズマブ、ペルツズマブ、及びそれらの誘導体若しくは機能的同等物のうちの 1 つ以上、(i i i) アテゾリズマブ、ニボルマブ、及びペンブロリズマブのうちの少なくとも 1 つ、を含んでもよく又は (b) 治療剤は、ベネトクラクス、アザシチジン、及びボマリドマイドのうちの 1 つ以上を含む。治療剤が抗体である実施形態では、抗体は、(a) 細胞表面 M I C A/B 抗原の M I C アルファ 3 ドメインに結合する M I C A/B 抗体、(b) 抗体依存性細胞傷害 (A D C C) を誘発する抗体、(c) 抗 C D 2 0、抗 C D 2 2、抗 H E R 2、抗 C D 5 2、抗 E G F R、抗 C D 1 2 3、抗 G D 2、抗 P D L 1、及び/若しくは抗 C D 3 8 抗体、又は (d) リツキシマブ、ペルツズマブ、オフアツムマブ、ウブリツキシマブ、オカラツズマブ、オビヌツズマブ、イブリツモマブ、オクレリズマブ、イノツズマブ、モキセツモマブ、エブラツズマブ、トラスツズマブ、ペルツズマブ、アレムツズマブ、セツキシマブ、アミバンタマブ、ジヌツキシマブ、アベルマブ、ダラツムマブ、イサツキシマブ、M O R 2 0 2、7 G 3、C S L 3 6 2、エロツズマブ、及びそれらのヒト化若しくは F c 改変されたバリエーション若しくは断片、並びにそれらの機能的同等物及びバイオシミラーのうちの 1 つ以上、を含んでもよい。治療する方法の様々な実施形態では、方法は、多重特異性エンゲージャを投与することを更に含む。いくつかの実施形態では、多重特異性エンゲージャは、(i) T 細胞エンゲージャ、(i i) N K 細胞エンゲージャ、(i i i) 二重特異性 T 細胞エンゲージャ (B i T E)、(i v) 二重特異性キラー細胞エンゲージャ (bi-specific killer cell engager、B i K E)、(v) 三重特異性キラー細胞エンゲージャ (T r i K E)、(v i) M I C A/B エンゲージャ、又は (v i i) C D 1 6 エンゲージャ、のうちの少なくとも 1 つである。

10

20

30

40

50

【0032】

別の態様では、本発明は、腫瘍表面 M I C A/B 発現を増強する方法であって、腫瘍細胞を感作因子と接触させ、それにより、更に感作因子と接触させる前の M I C A/B 発現と比較して表面 M I C A/B 発現を増加させることを含む、方法を提供する。様々な実施形態では、感作因子は、外部ビーム放射線、近接照射療法、放射性医薬品、及び化学療法剤のうちの少なくとも 1 つを含む。特定の実施形態では、感作因子は、(i) X 線放射線、ガンマ線放射線、光子放射線、陽子放射線、及び中性子放射線のうちの少なくとも 1 つ、又は (i i) カルシウム-47、炭素-11、炭素-14、クロム-51、コバルト-57、コバルト-58、エルビウム-169、フッ素-18、ガリウム-67、ガリウム-68、水素-3、インジウム-111、ヨウ素-123、ヨウ素-125、ヨウ素-131、鉄 (i o r n)-59、クリプトン-81m、ルテチウム-177、窒素-13、酸素-15、リン-32、ラジウム-223、ルビジウム-82、サマリウム-153、セレン-75、ナトリウム-22、ナトリウム-24、ストロンチウム-89、テクネチウム-99m、タリウム-201、キセノン-133 及びイットリウム-90 のうちの少なくとも 1 つ、又は (i i i) パクリタキセル、を含む。様々な実施形態では、方法は、腫瘍細胞を、腫瘍細胞表面 M I C A/B 抗原の M I C アルファ 3 ドメインに結合する抗体と接触させることを更に含む。

【0033】

一態様では、本発明は、本明細書に記載の 1 つ以上の組成物、又はその 1 つ以上の成分を含むキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは、(i) 細胞又はその集団、例えば、本明細書に記載の様々な態様のいずれかによる細胞又はその集団；及び (i i) 感作因子、例えば、本明細書に記載の様々な態様のいずれかによる感作因子を含む。い

くつかの実施形態では、細胞又はその集団は、免疫細胞、人工多能性細胞（iPSC）、又はiPSCを分化させることから得られた派生細胞であり、細胞は、MICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含み、細胞は、MICA/B-CAR（キメラ抗原受容体）、抗MICA/B抗体と組み合わせた場合にADCCを媒介するCD16若しくはそのバリエーション、MICA/B腫瘍抗原を標的とする外因性TCR、又はそれらの任意の組み合わせをコードする1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを必要に応じて含む。いくつかの実施形態では、感作因子は、MICA/Bの腫瘍細胞表面レベルを増加させる。

【0034】

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

10

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1A】MICA及びMICBが広範な腫瘍型及び適応症にわたって広く発現されること、並びに複数の抗原が同じ腫瘍適応症内で観察されたことを示す。

【図1B】MICA及びMICBが広範な腫瘍型及び適応症にわたって広く発現されること、並びに複数の抗原が同じ腫瘍適応症内で観察されたことを示す。

【図1C】MICA及びMICBが広範な腫瘍型及び適応症にわたって広く発現されること、並びに複数の抗原が同じ腫瘍適応症内で観察されたことを示す。

【図2】MICA/B-CARを発現するiPSC由来NKEフェクター細胞が、広範囲の腫瘍細胞モデルを使用して汎腫瘍反応性を示すことを示す。

20

【図3A】MICA/B-CARを発現する例示的なNKEフェクター細胞の導入遺伝子プロファイルを示す。

【図3B】MICA/Bの天然発現が高い、中程度及び低い表記腫瘍細胞株にตอบสนองした、MICA/B特異的サイトカイン放出を示す。図3Bでは、x軸に沿った各エントリは、3つの群のドットとして結果を提示し、各群は、左から右に、それぞれ、注釈において上から下に示されている細胞を表す。

【図4A】MICA/B-CARを発現するiPSC由来NKEフェクター細胞が、ヒト肺腺がん異種移植モデルに対してインビボADCC有効性を実証したことを示す。

【図4B】MICA/B-CARを発現するiPSC由来NKEフェクター細胞が、ヒト肺腺がん異種移植モデルに対してインビボADCC有効性を実証したことを示す。

30

【図4C】MICA/B-CARを発現するiPSC由来NKEフェクター細胞が、ヒト肺腺がん異種移植モデルに対してインビボADCC有効性を実証したことを示す。

【図5】MICA/B-CARを発現するiPSC由来NKEフェクター細胞が、ADCC能力を有する抗体との適合性を示すことを示す。

【図6A】MICA/B-CARを発現するiPSC由来エフェクター細胞が、広範囲の固形腫瘍細胞モデルにおいて、直接の単剤療法反応性及びADCCと組み合わせた増強された反応性の両方を実証することを示す。

【図6B】MICA/B-CARを発現するiPSC由来エフェクター細胞が、広範囲の固形腫瘍細胞モデルにおいて、直接の単剤療法反応性及びADCCと組み合わせた増強された反応性の両方を実証することを示す。

40

【図7】MICA/B-CARを発現するiPSC由来エフェクター細胞が、トリプルネガティブ乳がん（TNBC）細胞株細胞MDA-MB-231野生型又はMICA/Bノックアウトを有するMDA-MB-231においてADCCと組み合わされて、増強された反応性を実証することを示す。

【図8A】は、MICA/B-CARを発現するiPSC由来エフェクター細胞が、直接の単剤療法反応性及び不均一な腫瘍関連抗原を有するNSCLC腺がん細胞株細胞NCI-H1975によって発現される異なる抗原を標的とするモノクローナル抗体と組み合わされて増強された反応性の両方を実証することを示す。

【図8B】は、MICA/B-CARを発現するiPSC由来エフェクター細胞が、直接

50

の単剤療法反応性及び不均一な腫瘍関連抗原を有するNSCLC腺がん細胞株細胞NCI-H1975によって発現される異なる抗原を標的とするモノクローナル抗体と組み合わせられて増強された反応性の両方を実証することを示す。

【図9A】MICA／B-CARを発現するiPSC由来エフェクター細胞が、単一用量治療レジメンにおいて、ヒト肺腺がん異種移植モデルに対してインビボ有効性を実証したことを示す。

【図9B】MICA／B-CARを発現するiPSC由来エフェクター細胞が、単一用量治療レジメンにおいて、ヒト肺腺がん異種移植モデルに対してインビボ有効性を実証したことを示す。

【図10A】MICA／B-CARを発現するiPSC由来エフェクター細胞が、複数用量治療レジメンにおいて、ヒト肺腺がん異種移植モデルに対して、抗HER2 mAb媒介性ADCCによるインビボ有効性を実証したことを示す。

【図10B】MICA／B-CARを発現するiPSC由来エフェクター細胞が、複数用量治療レジメンにおいて、ヒト肺腺がん異種移植モデルに対して、抗HER2 mAb媒介性ADCCによるインビボ有効性を実証したことを示す。

【図11】BCMA／MICA二重CAR-T細胞の生成を示す。

【図12A】BCMA CAR及びMICA CARの二重発現が、単一CAR-T細胞と比較して二重CAR-T細胞のアビディティ及び機能的応答を増加させることを示す。

【図12B】BCMA CAR及びMICA CARの二重発現が、単一CAR-T細胞と比較して二重CAR-T細胞のアビディティ及び機能的応答を増加させることを示す。

【図13】二重CAR-T細胞が、単一CAR-T細胞と比較して上昇したサイトカイン応答を示すことを示す。

【図14】多発性骨髄腫腫瘍株がBCMA及び／又はMICA／Bを発現することを示す。

【図15】BCMA及びMICA／B二重CAR-T細胞が、各個々の単一CAR-T細胞と比較して、多発性骨髄腫腫瘍株に対してより大きな細胞傷害性を示すことを示す。

【図16】BCMA及びMICA／B二重CAR-T細胞が、いくつかの多発性骨髄腫腫瘍株を認識し、効果的に死滅させることを示す。

【図17】BCMA及びMICA／B二重CAR-T細胞が、多発性骨髄腫細胞株MM1Sの腫瘍細胞増殖をインビボで制御することを示す。

【図18A】腫瘍細胞の感作がMICA／B表面発現を増大させ、MICA／B-CARエフェクター細胞抗原特異的細胞傷害性を増強することを示す。

【図18B】腫瘍細胞の感作がMICA／B表面発現を増大させ、MICA／B-CARエフェクター細胞抗原特異的細胞傷害性を増強することを示す。

【図19】腫瘍細胞の感作がMICA／B表面発現を増大させ、MICA／B-CAREフェクター細胞抗原特異的細胞傷害性を増強することを示す。

【発明を実施するための形態】

【0036】

iPSC（人工多能性幹細胞）のゲノム改変には、ポリヌクレオチドの挿入、欠失及び置換のうちの1つ以上が含まれ得る。ゲノム操作されたiPSCでの外因性遺伝子発現は、元のゲノム操作されたiPSCの長期のクローン増殖後、細胞分化後、及びゲノム操作されたiPSCに由来する細胞からの脱分化細胞タイプにおいて、遺伝子サイレンシング、又は低減した遺伝子発現などの問題にしばしば遭遇する。一方、T細胞又はNK細胞などの初代免疫細胞を直接操作することは困難であり、養子細胞療法のための操作された免疫細胞の調製及び送達に障害をもたらす。種々の実施形態では、本発明は、自殺遺伝子及び他の機能的モダリティを含む1つ以上の外因性遺伝子を安定的に組み込むための効率的で信頼できる標的化アプローチを提供し、これは生着、輸送、ホーミング、遊走、細胞傷害性、生存能力、維持、増殖、寿命、自己複製、持続性、及び／又は生存率に関する改善された治療的特性を、HSC（造血幹細胞及び前駆細胞）、T細胞前駆細胞、NK細胞前駆細胞、T細胞、NK細胞、NK細胞を含むが、これらに限定されないiPSC派生細胞

10

20

30

40

50

胞にもたらず。

【0037】

定義

本明細書で別段定義されない限り、本出願に関連して使用される科学用語及び技術用語は、当業者によって一般に理解される意味を有するものとする。更に、文脈により別段必要とされない限り、単数形用語は複数形を含み、複数形用語は単数形を含むものとする。

【0038】

本発明は、本明細書に記載の特定の方法論、プロトコル、及び試薬などに限定されず、したがって変動し得ることが理解されるべきである。本明細書で使用する用語は、特定の

10

【0039】

本明細書で使用される場合、冠詞「a」、「an」、及び「the」は、冠詞の文法的な対象の、1又は1を超えるもの（すなわち、少なくとも1）を指すために本明細書において使用される。例として、「要素（an element）」は、1つの要素又は1つを超える要素を意味する。

【0040】

代替（例えば、「又は」）の使用は、代替の一方、両方、又はそれらの任意の組み合わせのいずれかを意味すると理解されるべきである。

20

【0041】

「及び／又は」という用語は、代替の一方又は両方のいずれかを意味すると理解されるべきである。

【0042】

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

30

【0043】

本明細書で使用される場合、「実質的に」又は「本質的に」という用語は、参照の量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量、又は長さと比較して、約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%以上である量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量、又は長さを指す。一実施形態では、「実質的に同じ」又は「本質的に同じ」という用語は、参照の量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量、又は長さとはほぼ同一である、参照の量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量、又は長さの範囲を指す。

40

【0044】

本明細書で使用される場合、「実質的に含まない」及び「本質的に含まない」という用語は交換可能に使用され、細胞集団又は培養培地などの組成物を記載するために使用されるとき、例えば、特定の物質又はその供給源の、95%を含まない、96%を含まない、97%を含まない、98%を含まない、99%を含まないなど、又は従来手段で測定して検出できないなどのように、特定の物質又はその供給源を含まない組成物を指す。組成物中の特定の成分又は物質を「含まない」又は「本質的に含まない」という用語はまた、そのような成分又は物質が（1）任意の濃度で組成物に含まれない、又は（2）機能的に

50

不活性な低い濃度で組成物に含まれることも意味する。同様の意味が、「存在しない」という用語に適用され得、組成物の特定の物質又はその供給源が存在しないことを指す。

【0045】

本明細書全体を通して、文脈が別段必要としない限り、「含む (comprise)」、「含む (comprises)」、及び「含むこと (comprising)」は、述べられたステップ、若しくは要素、又はステップ若しくは要素の群を含むことを意味するが、任意の他のステップ、若しくは要素、又はステップ若しくは要素の群を排除することを意味しないことが理解されるであろう。特定の実施形態では、「含む (include)」、「有する」、「含む (contain)」、及び「含む (comprise)」という用語は、同義的に使用される。

【0046】

「からなる (consisting of)」とは、「からなる」という語句に続く全てのものを含み、かつそれに限定されることを意味する。したがって、「からなる」という語句は、列挙された要素が必要又は必須であり、かつ他の要素が存在し得ないことを示す。

【0047】

「から本質的になる (consisting essentially of)」とは、語句の後に列挙された任意の要素を含むことを意味し、列挙された要素の開示で指定された活性又は動作を妨害しないか、又はそれらに寄与しない他の要素に限定される。したがって、「から本質的になる」という語句は、列挙された要素が必要又は必須であることを示すが、他の要素は必要に応じたものではなく、列挙された要素の活性又は動作に影響するか否かに応じて存在し得るか、又は存在し得ないことを示す。

【0048】

本明細書全体を通して、「一実施形態」、「実施形態」、「特定の実施形態」、「関連する実施形態」、「特定の実施形態」、「追加の実施形態」、若しくは「更なる実施形態」又はそれらの組み合わせへの言及は、実施形態に関連して記載された特定の特質、構造、又は特性が、本発明の少なくとも1つの実施形態に含まれることを意味する。したがって、本明細書全体にわたる様々な場所での前述の語句の出現は、必ずしも全てが同一の実施形態を参照しているとは限らない。更に、特定の特質、構造、又は特性は、1つ以上の実施形態では任意の好適な方法で組み合わせることができる。

【0049】

「エキスピボ」という用語は、概して、好ましくは自然条件の変化を最小限に抑えて、生体外の人工環境内の生体組織内又は生体組織上で行われる実験又は測定など、生体外で行われる活動を指す。特定の実施形態では、「エキスピボ」手順は、生体から採取され、通常無菌条件下で、典型的には数時間又は約24時間まで、しかしながら状況に応じて最大48時間若しくは72時間以上を含む、実験装置で培養される生細胞又は組織を含む。ある特定の実施形態では、そのような組織又は細胞は、収集及び凍結され得、エキスピボ処理のために後に解凍され得る。生細胞又は組織を使用して数日より長く続く組織培養実験又は手順は、典型的には「インビトロ」と考えられるが、ある特定の実施形態では、この用語はエキスピボと交換可能に使用され得る。

【0050】

「インビボ」という用語は、概して、生体内部で起こる活動を指す。

【0051】

本明細書で使用する場合、「リプログラミング」又は「脱分化」又は「細胞能力の増加」又は「発生能力の増加」という用語は、細胞の能力を増加させるか、又は細胞をより分化していない状態に脱分化する方法を指す。例えば、細胞能力が増加した細胞は、リプログラミングされていない状態の同じ細胞と比較して、より多くの発生可塑性を有する（すなわち、より多くの細胞タイプに分化することができる）。言い換えると、リプログラミングされた細胞は、リプログラミングされていない状態の同じ細胞よりも分化が進んでいない状態にある細胞である。

【0052】

本明細書で使用される場合、「分化」という用語は、特殊化していない（「コミットさ

10

20

30

40

50

れていない」)又はあまり特殊化していない細胞が、例えば、血液細胞又は筋細胞などの特殊化細胞の特質を獲得するプロセスである。分化した又は分化誘導された細胞は、細胞の系統内でより特殊化された(「コミットされた」)位置を呈する細胞である。「コミットされた」という用語は、分化のプロセスに適用されるとき、通常の下で特定の細胞タイプ又は細胞タイプのサブセットに分化し続ける位置まで分化経路を進み、通常の下では、異なる細胞タイプに分化し、分化度の低い細胞タイプに戻ることをできない細胞を指す。本明細書で使用される場合、「多能性」という用語は、生体又は体細胞の全ての系統を形成する細胞(すなわち、胚そのもの)の能力を指す。例えば、胚性幹細胞は、3つの胚葉、外胚葉、中胚葉、及び内胚葉の各々から細胞を形成することができる多能性幹細胞のタイプである。多能性は、完全な生物を生じさせることができない不完全な又は部分的な多能性細胞(例えば、エピブラスト幹細胞又はEpiSC)から、完全な生物を生じさせることができるより原始的でより多能性の細胞(例えば、胚性幹細胞)までの範囲に及ぶ一連の発生能である。

10

【0053】

本明細書で使用される場合、「人工多能性幹細胞」又は「iPSC」という用語は、誘導又は変更された、分化した成人(adult)、新生児又は胎児細胞からインビトロで産生された、すなわち、3つの全ての胚葉又は皮層：中胚葉、内胚葉、及び外胚葉の全ての組織に分化できる細胞にリプログラミングされた幹細胞を指す。いくつかの実施形態では、リプログラミング(reprogramming)プロセスは、リプログラミング因子及び／又は小分子化学駆動法を使用する。産生されたiPSCは、天然に存在する細胞を指していない。

20

【0054】

本明細書で使用される場合、「胚性幹細胞」という用語は、胚盤胞の内部細胞塊の天然に存在する多能性幹細胞を指す。胚性幹細胞は多能性であり、発生時に3つの一次胚葉、すなわち、外胚葉、内胚葉、及び中胚葉の全ての誘導体を発生させる。それらは、胚体外膜又は胎盤に寄与しない(すなわち、全能性ではない)。

【0055】

本明細書で使用されるとき、「多能性幹細胞」という用語は、1つ以上の胚葉(すなわち、外胚葉、中胚葉、及び内胚葉)の細胞に分化するが、3つ全てには分化しない発生能を有する細胞を指す。したがって、多能性細胞はまた、「部分的に分化した細胞」と呼ぶこともできる。多能性細胞は当該技術分野で知られており、多能性細胞の例には、例えば造血幹細胞及び神経幹細胞などの成体幹細胞が含まれる。「多能性」は、細胞が所与の系統での多くのタイプの細胞を形成し得るが、他の系統の細胞は形成しないことを示す。例えば、多能性造血細胞は多くの異なるタイプの血液細胞(赤、白、血小板など)を形成することができるが、ニューロンを形成することはできない。したがって、「多分化能」という用語は、全能性及び多能性よりも低い発生能の程度を有する細胞の状態を指す。

30

【0056】

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

40

【0057】

これまでに2つのタイプの多能性が説明されており、後期胚盤胞の胚盤葉上層幹細胞(epiblast stem cell、EpiSC)に類似した「プライミング」又は「準安定」状態の

50

多能性、及び多能性初期／着床前の胚盤胞の内部細胞塊に類似した「ナイーブ」又は「基底」状態である。両方の多能性状態が上記のような特徴を示す一方で、ナイーブ状態又は基底状態は、(i) 雌性細胞におけるX染色体の前不活性化又は再活性化、(ii) 単一細胞培養中のクローン性及び生存率の改善、(iii) DNAメチル化の全体的な低減、(iv) 発生調節遺伝子プロモータ上のH3K27me3抑制クロマチンマーク沈着の低減、並びに(v) プライミング状態多能性細胞と比較しての分化マーカーの発現低減を更に示す。外因性多能性遺伝子が体細胞に導入され、発現され、その後、得られる多能性細胞からサイレンシングされるか又は除去されるかのいずれかである細胞リプログラミングの標準的な方法論は、一般に、多能性のプライミング状態の特徴を有するようである。標準的な多能性細胞培養条件下で、そのような細胞は、外因性導入遺伝子発現が維持されない限り、プライミング状態に留まり、基底状態の特徴が観察される。

10

【0058】

本明細書で使用される場合、「多能性幹細胞形態」という用語は、胚性幹細胞の古典的な形態学的特質を指す。正常な胚性幹細胞の形態は、高い核対細胞質比を有し、核小体が顕著に存在し、典型的な細胞間間隔がある、形状が丸くて小さいことを特徴とする。

【0059】

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

【0060】

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

20

【0061】

「培養」又は「細胞培養」は、インビトロ環境における細胞の維持、増殖及び／又は分化を指す。「細胞培養培地」、「培養培地」（各場合で単数は「培地 (medium)」)、「補充成分」及び「培地補充成分」は、細胞培養を培養する栄養組成物を指す。

【0062】

「培養する」又は「維持する (maintain)」とは、例えば滅菌プラスチック（又はコーティングされたプラスチック）細胞培養皿又はフラスコ内で、組織又は体外の細胞を維持 (sustaining)、増殖 (propagating)（増殖 (growing)）、及び／又は分化させることを指す。「培養」又は「維持すること」は、細胞の増殖及び／又は維持に役立つ栄養素、ホルモン、及び／又は他の因子の供給源として培地を利用することができる。

30

【0063】

本明細書で使用する場合、「中胚葉」という用語は、初期胚発生中に出現し、循環系の血液細胞、筋肉、心臓、真皮、骨格、その他の支持組織と結合組織を含む様々な特殊化された細胞タイプを生じさせる、3つの胚葉のうちの1つを指す。

【0064】

本明細書で使用される場合、「決定的な造血内皮」(hemogenic endothelium、HE) 又は「多能性幹細胞由来の決定的な造血内皮」(pluripotent stem cell-derived definitive hemogenic endothelium、iHE) という用語は、内皮造血転換と呼ばれるプロセスにおいて造血幹細胞及び前駆細胞を生じさせる内皮細胞のサブセットを指す。胚における造血細胞の発生は、側板中胚葉から血管芽細胞を経て決定的な造血内皮細胞及び造血前駆体へと順次進行する。

40

【0065】

「造血幹細胞及び前駆細胞」、「造血幹細胞」、「造血前駆細胞」、又は「造血前駆体細胞」という用語は、造血系統にコミットしているが、更なる造血分化が可能であり、多能性造血幹細胞（血球）、骨髓前駆体、巨核球前駆体、赤血球前駆体、及びリンパ球前駆体を含む細胞を指す。造血幹細胞及び前駆細胞 (HSC) は、骨髓系（単球及びマクロフ

50

マクロファージ、好中球、好塩基球、好酸球、赤血球、巨核球／血小板、樹状細胞）、及びリンパ系（T細胞、B細胞、NK細胞）を含む全ての血液細胞タイプを生じる多能性幹細胞である。本明細書で使用されるとき、「二次造血幹細胞」という用語は、T系統細胞、NK系統細胞、及びB系統細胞を含む成熟骨髄性とリンパ性細胞型の両方を生じさせることができるCD34⁺造血細胞を指す。造血細胞はまた、原始赤血球、巨核球、及びマクロファージを生じさせる原始造血細胞の様々なサブセットを含む。

【0066】

本明細書で使用されるとき、「Tリンパ球」及び「T細胞」という用語は互換可能に使用され、胸腺での成熟を完了し、体内の特定の外来抗原の同定、並びにMHCクラスI拘束性での他の免疫細胞の活性化及び不活性化を含む免疫系における様々な役割を有する主要なタイプの白血球を指す。T細胞は、任意のT細胞、例えば、培養T細胞、例えば、初代T細胞、又は培養T細胞株、例えば、Jurkat、SupT1などからのT細胞、又は哺乳動物から取得されたT細胞であり得る。T細胞はCD3⁺細胞であり得る。T細胞は、CD4⁺／CD8⁺二重陽性T細胞、CD4⁺ヘルパーT細胞（例えば、Th1及びTh2細胞）、CD8⁺T細胞（例えば、細胞傷害性T細胞）、末梢血単核細胞（peripheral blood mononuclear cell、PBMC）、末梢血白血球（peripheral blood leukocyte、PBL）、腫瘍浸潤リンパ球（tumor infiltrating lymphocyte、TIL）、メモリT細胞、ナイーブT細胞、制御性T細胞、ガンマデルタT細胞（gamma delta T cell、 $\gamma\delta$ T細胞）、などを含むが、これらに限定されない、任意のタイプのT細胞であることができ、任意の発生段階のものであることができる。追加のタイプのヘルパーT細胞には、Th3（Treg）、Th17、Th9、又はTfh細胞などの細胞が含まれる。追加のタイプのメモリT細胞には、セントラルメモリT細胞（Tcm細胞）、エフェクターメモリT細胞（Tem細胞及びTEMRA細胞）などの細胞が含まれる。「T細胞」という用語は、T細胞受容体（T cell receptor、TCR）又はキメラ抗原受容体（CAR）を発現するように改変されたT細胞などの遺伝子操作されたT細胞を指すこともできる。T細胞又はT細胞様エフェクター細胞はまた、幹細胞又は前駆細胞（「由来T細胞」若しくは「由来T細胞様エフェクター細胞」、又は集合的に「派生T系統細胞」）から分化され得る。由来T細胞様エフェクター細胞は、いくつかの点でT細胞系統を有し得るが、同時に、初代T細胞には存在しない1つ以上の機能的特質を有する。本出願において、T細胞、T細胞様エフェクター細胞、由来T細胞、由来T細胞様エフェクター細胞、又は派生T系統細胞は、集合的に「T系統細胞」と呼ばれる。いくつかの実施形態では、派生T系統細胞は、iPSCを分化させることによって得られるiPSC由来T細胞であり、この細胞は、本明細書では「iT」細胞とも呼ばれる。

【0067】

「CD4⁺細胞」は、それらの表面でCD4を発現し、細胞性免疫応答と関連するT細胞のサブセットを指す。それらは刺激後の分泌プロファイルによって特徴付けられ、IFN- γ 、TNF- α 、IL2、IL4、及びIL10などのサイトカインの分泌が含まれ得る。「CD4」分子は、もともとTリンパ球の分化抗原として定義された55kDの糖タンパク質であるが、単球／マクロファージを含む他の細胞にも見出される。CD4抗原は免疫グロブリンスーパー遺伝子ファミリーのメンバーであり、MHC（主要組織適合性複合体）クラスII拘束性免疫応答の関連認識要素として関与している。Tリンパ球では、ヘルパー／インデューサのサブセットを定義する。

【0068】

「CD8⁺細胞」は、それらの表面上でCD8を発現し、MHCクラスI拘束性であり、細胞傷害性T細胞として機能するT細胞のサブセットを指す。「CD8」分子は、胸腺細胞と細胞傷害性及びサブレッサTリンパ球に見られる分化抗原である。CD8抗原は免疫グロブリンスーパー遺伝子ファミリーのメンバーであり、主要組織適合性複合体クラスI拘束性相互作用の関連認識要素である。

【0069】

本明細書で使用されるとき、「NK細胞」又は「ナチュラルキラー細胞」という用語は

、CD56又はCD16の発現及びT細胞受容体（CD3）の不在によって定義される末梢血リンパ球のサブセットを指す。本明細書で使用する場合、「適応NK細胞」及び「メモリNK細胞」という用語は互換可能であり、表現型的にCD3⁻及びCD56⁺であり、NKG2C及びCD57のうちの少なくとも1つ、並びに任意選択でCD16を発現するが、PLZF、SYK、FcεRγ、及びEAT-2のうちの1つ以上の発現を欠く、NK細胞のサブセットを指す。いくつかの実施形態では、CD56⁺NK細胞の単離された亜集団は、CD16、NKG2C、CD57、NKG2D、NCRリガンド、Nkp30、Nkp40、Nkp46、活性化及び抑制性KIR、NKG2A、並びに／又はDNAM-1の発現を含む。CD56⁺は、弱陽性（dim）又は強陽性（bright）発現であり得る。NK細胞又はNK細胞様エフェクター細胞は、幹細胞又は前駆細胞（「由来NK細胞」若しくは「由来NK細胞様エフェクター細胞」、又は集合的に「派生NK系統細胞」）から分化され得る。派生NK細胞様エフェクター細胞は、いくつかの点でNK細胞系統を有し得るが、同時に、初代NK細胞には存在しない1つ以上の機能的特質を有する。本出願において、NK細胞、NK細胞様エフェクター細胞、由来NK細胞、由来NK細胞様エフェクター細胞、又は派生NK系統細胞は、集合的に「NK系統細胞」と呼ばれる。いくつかの実施形態では、派生NK系統細胞は、iPSCを分化させることによって得られるiPSC由来NK細胞であり、この細胞は、本明細書では「iNK」細胞とも呼ばれる。

10

【0070】

本明細書で使用される場合、「NKT細胞」又は「ナチュラルキラーT細胞」という用語は、T細胞受容体（TCR）を発現するCD1d拘束性T細胞を指す。従来の主要組織適合性（major histocompatibility、MHC）分子によって提示されるペプチド抗原を検出する従来のT細胞とは異なり、NKT細胞は、非古典的MHC分子であるCD1dによって提示される脂質抗原を認識する。2つのタイプのNKT細胞が認識される。インバリエント又はI型NKT細胞は、非常に限られたTCRレパートリー限定された範囲のβ鎖（ヒトではVβ11）と関連する正規のα鎖（ヒトではVα24-Jα18）を発現する。非古典的又は非インバリエントのタイプII NKT細胞と呼ばれるNKT細胞の第2の集団は、より不均一なTCRαβの使用を提示する。I型NKT細胞は免疫療法に好適であると考えられている。適応又はインバリエント（I型）NKT細胞は、TCRVα24-Jα18、Vb11、CD1d、CD3、CD4、CD8、aGalCer、CD161、及びCD56のマーカーのうちの1つ以上の発現によって識別できる。

20

30

【0071】

「エフェクター細胞」という用語は、概して、刺激及び／又は活性化に応答して特定の活性を実行する免疫系における特定の細胞、又は活性化の際に特異的機能をもたらす細胞に適用される。本明細書で使用される場合、「エフェクター細胞」という用語は、免疫細胞、「分化した免疫細胞」、並びに刺激及び／又は活性化に応答して特定の活性を実行するように編集及び／又は調節された初代細胞又は分化した細胞を含み、いくつかの文脈ではそれらと交換可能である。エフェクター細胞の非限定的な例には、初代由来又はiPSC由来のT細胞、NK細胞、NKT細胞、B細胞、マクロファージ、及び好中球が含まれる。

40

【0072】

本明細書で使用される場合、「単離された」などの用語は、元の環境から分離された細胞、又は細胞の集団を指し、すなわち、単離された細胞の環境は、「単離されていない」参照細胞が存在する環境に見出される少なくとも1つの成分を実質的に含まない。この用語は、例えば、組織又は生検試料から単離された、その天然環境で見出されるようないくつか又は全ての成分から取り出される細胞を含む。この用語はまた、細胞が非天然環境、例えば、細胞培養物又は細胞懸濁液から単離された環境で見出されるため、少なくとも1つ、いくつか、又は全ての成分から取り出される細胞を含む。したがって、「単離された細胞」は、天然で見出される場合、又は非天然の環境で増殖、保管、又は存続する場合、他の物質、細胞、又は細胞集団を含む少なくとも1つの成分から部分的又は完全に分離さ

50

れる。単離された細胞の具体例には、部分的に純粋な細胞組成物、実質的に純粋な細胞組成物、及び天然に存在しない培地で培養された細胞が含まれる。単離された細胞は、所望の細胞若しくはその集団を、環境中の他の物質若しくは細胞から分離することによって、又は環境から1つ以上の他の細胞集団若しくは亜集団を取り除くことによって得ることができる。

【0073】

本明細書で使用される場合、「精製する」などの用語は、純度を増加させることを言う。例えば、純度は少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、又は100%に増加させることができる。

【0074】

本明細書で使用される場合、「コードすること」という用語は、ヌクレオチド（すなわち、rRNA、tRNA、及びmRNA）の定義された配列又はアミノ酸の定義された配列及びそれらから生じる生物学的特性を有する生物学的プロセスにおける他のポリマー及び巨大分子の合成のためのテンプレートとして機能する、遺伝子、cDNA、又はmRNAなどのポリヌクレオチド中のヌクレオチドの特定の配列の固有の特性を指す。したがって、その遺伝子に対応するmRNAの転写及び翻訳が細胞又は他の生物学的システムでタンパク質を産生する場合、その遺伝子はタンパク質をコードする。ヌクレオチド配列がmRNA配列と同一であり、通常は配列表に記載されているコード鎖と、遺伝子又はcDNAの転写のテンプレートとして使用される非コード鎖の両方を、その遺伝子又はcDNAのタンパク質又は他の産物を「コードしている」ということができる。

【0075】

「構築物」は、インビトロ又はインビボのいずれかで宿主細胞に送達されるポリヌクレオチドを含む高分子又は分子の複合体を指す。本明細書で使用される場合、「ベクター」は、外来遺伝物質の標的細胞への送達又は移入を誘導することができ、標的細胞で複製及び／又は発現することができる任意の核酸構築物を指す。したがって、「ベクター」という用語は、送達される構築物を含む。ベクターは、線状又は環状分子であり得る。ベクターは、組み込まれてもよい、又は組み込まれなくてもよい。ベクターの主なタイプには、プラスミド、エピソードベクター、ウイルスベクター、コスミド、及び人工染色体が含まれるが、これらに限定されない。ウイルスベクターには、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、センダイウイルスベクターなどが含まれるが、これらに限定されない。

【0076】

「組み込み」とは、構築物の1つ以上のヌクレオチドが細胞ゲノムに安定して挿入される、すなわち、細胞の染色体DNA内の核酸配列に共有結合されることを意味する。「標的化組み込み」とは、構築物のヌクレオチドが、予め選択された部位又は「組み込み部位」で細胞の染色体又はミトコンドリアDNAに挿入されることを意味する。本明細書で使用される場合、「組み込み」という用語は、組み込み部位での内因性配列又はヌクレオチドの欠失を伴うか又は伴わない、構築物の1つ以上の外因性配列又はヌクレオチドの挿入を含むプロセスを更に指す。挿入部位に欠失がある場合、「組み込み」は、内因性配列又は1つ以上の挿入されたヌクレオチドで欠失されたヌクレオチドの置換を更に含み得る。

【0077】

本明細書で使用されるとき、「外因性」という用語は、参照分子又は参照活性が宿主細胞に導入されるか、又は宿主細胞に対して非天然であることを意味することを意図している。分子は、例えば、コード核酸を宿主の遺伝物質に導入することにより、例えば、宿主の染色体に組み込むことにより、又は非染色体の遺伝物質、例えば、プラスミドとして導入することができる。したがって、コード核酸の発現に関して使用される用語は、コード核酸を発現可能な形態で細胞に導入することを指す。「内因性」という用語は、宿主細胞に存在する参照分子又は活性を指す。同様に、この用語は、コード核酸の発現に関して使用されるとき、細胞内に含まれ、外因的に導入されていないコード核酸の発現を指す。

【0078】

本明細書で使用される場合、「目的の遺伝子」又は「目的のポリヌクレオチド配列」は、適切な調節配列のコントロール下に置かれると、RNAに転写され、場合によってはインビボでポリペプチドに翻訳されるDNA配列である。目的の遺伝子又はポリヌクレオチドは、原核生物配列、真核生物のmRNAからのcDNA、真核生物（例えば、哺乳動物）のDNAからのゲノムDNA配列、及び合成DNA配列を含み得るが、これらに限定されない。例えば、目的の遺伝子は、miRNA、shRNA、天然ポリペプチド（すなわち、天然に見出されるポリペプチド）又はその断片、バリエーションポリペプチド（すなわち、天然ポリペプチドとの100%未満の配列同一性を有する天然ポリペプチドの変異体）又はその断片、操作されたポリペプチド又はペプチド断片、治療用ペプチド又はポリペプチド、造影用マーカー、選択マーカーなどをコードし得る。

10

【0079】

本明細書で使用される場合、「ポリヌクレオチド」という用語は、デオキシリボヌクレオチド若しくはリボヌクレオチド、又はそれらの類似体のいずれかである、任意の長さのポリマー形態のヌクレオチドを指す。ポリヌクレオチドの配列は、4つのヌクレオチド塩基：アデニン（adenine、A）、シトシン（cytosine、C）、グアニン（guanine、G）、チミン（thymine、T）から構成され、ポリヌクレオチドがRNAである場合、チミンはウラシル（uracil、U）である。ポリヌクレオチドには、遺伝子又は遺伝子断片（例えば、プローブ、プライマー、EST、又はSAGEタグ）、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA（messenger RNA、mRNA）、トランスファRNA、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐鎖ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離DNA、任意の配列の単離RNA、核酸プローブ及びプライマーが含まれ得る。「ポリヌクレオチド」はまた、二本鎖分子及び一本鎖分子の両方を指す。

20

【0080】

本明細書で使用される場合、「ペプチド」、「ポリペプチド」、及び「タンパク質」という用語は交換可能に使用され、ペプチド結合によって共有結合されたアミノ酸残基を有する分子を指す。ポリペプチドは少なくとも2つのアミノ酸を含まなければならない、ポリペプチドのアミノ酸の最大数に制限はない。本明細書で使用される場合、これらの用語は、例えば、当該技術分野では概してペプチド、オリゴペプチド及びオリゴマーとも称される短い鎖、並びに概して当該技術分野でポリペプチド又はタンパク質と称される長い鎖の両方を指す。「ポリペプチド」には、例えば、とりわけ、生物学的に活性な断片、実質的に相同なポリペプチド、オリゴペプチド、ホモ二量体、ヘテロ二量体、ポリペプチドのバリエーション、改変ポリペプチド、誘導體、類似体、融合タンパク質が含まれる。ポリペプチドは、天然ポリペプチド、組換えポリペプチド、合成ポリペプチド、又はそれらの組み合わせを含む。

30

【0081】

本明細書で使用される場合、「サブユニット」という用語は、タンパク質複合体の各別個のポリペプチド鎖を指し、各別個のポリペプチド鎖は、それ自体で安定な折り畳み構造を形成することができる。多くのタンパク質分子は、2つ以上のサブユニットから構成され、ここで、アミノ酸配列は、各サブユニットについて同一であるか、又は類似しているか、又は完全に異なるかのいずれかであり得る。例えば、CD3複合体は、CD3 α 、CD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 γ 、及びCD3 ζ サブユニットから構成され、これらはCD3 ϵ /CD3 γ 、CD3 ϵ /CD3 δ 、及びCD3 ζ /CD3 ζ 二量体を形成する。単一のサブユニット内で、ポリペプチド鎖の連続した部分は、「ドメイン」と呼ばれるコンパクトで局所的な半独立単位に折り畳まれることが多い。多くのタンパク質ドメインは、ドメインの共通機能に寄与する、サブドメインとも呼ばれる独立した「構造サブユニット」を更に含み得る。したがって、本明細書で使用される場合、「サブドメイン」という用語は、より大きなドメインの内側のタンパク質ドメイン、例えば、細胞表面受容体の外部ドメイン内の結合ドメイン、又は細胞表面受容体の内部ドメインの刺激ドメイン若しくはシグナル伝達ドメインを指す。

40

50

【0082】

「作動可能に連結された (operably-linked)」又は「作動可能に連結された (operatively linked)」は、「作動可能に接続された (operably connected)」又は「作動可能に接続された (operatively connected)」と交換可能であり、一方の機能が他方によって影響を受けるような、単一の核酸断片上の核酸配列 (又は複数のドメインを有するポリペプチド中のアミノ酸) の会合を指す。例えば、プロモータは、そのコード配列又は機能的 RNA の発現に影響を与えることができる場合、コード配列又は機能的 RNA と作動可能に連結している (すなわち、コード配列又は機能的 RNA がプロモータの転写コントロール下にある)。コード配列は、センス又はアンチセンス方向で調節配列に作動可能に連結することができる。更なる例として、受容体結合ドメインは、リガンドへの受容体の結合が当該結合に応答するシグナルを変換するように、細胞内シグナル伝達ドメインに作動可能に接続され得る。

10

【0083】

「融合タンパク質」又は「キメラタンパク質」は、本明細書で使用される場合、別々のタンパク質をコードする配列をコードする2つ以上の部分的又は完全なポリヌクレオチドを接合するための遺伝子操作を介して作製されるタンパク質であり、これらの接合されたポリヌクレオチドの発現は、元のタンパク質又はその断片の各々に由来する機能的特性を有する単一のペプチド又は複数のポリペプチドを生じる。融合タンパク質における異なる供給源の2つの隣接するポリペプチド間に、リンカー (又はスペーサ) ペプチドを付加することができる。

20

【0084】

本明細書で使用される場合、「遺伝的インプリント」という用語は、ソース細胞又は i P S C の優先的な治療特性に寄与し、ソース細胞由来 i P S C 及び／又は i P S C 由来造血系統細胞で保持可能な遺伝的又はエピジェネティックな情報を指す。本明細書で使用される場合、「ソース細胞」は、リプログラミングを通じて i P S C を生成するために使用され得る非多能性細胞であり、ソース細胞由来 i P S C は、任意の造血系統細胞を含む特定の細胞タイプに更に分化し得る。ソース細胞由来 i P S C、及びそれから分化した細胞は、文脈に応じて、「由来」細胞又は「派生」細胞と総称され得る。例えば、本出願全体で使用される派生エフェクター細胞、又は派生 N K 系統細胞若しくは派生 T 細胞は、末梢血、臍帯血、又は他のドナー組織などの天然 (natural) / 天然 (native) 供給源から取得されたそれらの初代対応物と比較して、i P S C から分化した細胞である。本明細書で使用されるとき、優先的な治療特性を付与する遺伝的インプリントは、ドナー、疾患、若しくは治療応答に特異的である選択されたソース細胞をリプログラミングすることにより、又はゲノム編集を使用して i P S C に遺伝子組換えモダリティを導入することにより、i P S C に組み込まれる。特異的に選択されたドナー、疾患、又は治療状況から取得されたソース細胞の態様では、優先的な治療特性に寄与する遺伝的インプリントには、根本的な分子事象が同定されているかどうかに関係なく、選択されたソース細胞の派生細胞に渡される、保持可能な表現型、すなわち優先的な治療特性を表す、状況特異的な遺伝的又はエピジェネティックな改変を含み得る。ドナー、疾患、若しくは治療奏効に特異的であるソース細胞は、i P S C 及び由来造血系統細胞において保持可能な遺伝的インプリントを含んでいてもよく、この遺伝的インプリントには、例えば、ウイルステ異的 T 細胞又はインバリアントナチュラルキラー T (invariant natural killer T、i N K T) 細胞からの、予め配置された単一特異的 T C R、追跡可能で望ましい遺伝子多型、例えば、選択されたドナーにおける高親和性 C D 1 6 受容体をコードする点変異のホモ接合、及び所定の H L A 要件、すなわち、増加した集団でハプロタイプを示す選択された H L A 適合ドナー細胞が含まれるが、これらに限定されない。本明細書で使用される場合、優先的な治療特性には、由来細胞の、改善された生着、輸送、ホーミング、生存能力、自己複製、持続性、免疫応答の制御及び調節、生存率、並びに細胞傷害性が含まれる。優先的な治療特性はまた、抗原標的化受容体発現、H L A 提示又はその欠如、腫瘍微小環境に対する耐性、バイスタンダー免疫細胞及び免疫修飾の誘導、腫瘍外効果の減少を伴う改善されたオン

30

40

50

ターゲット特異性、並びに／又は化学療法などの治療に対する耐性にも関連し得る。優先的な治療特性を付与する遺伝的インプリントが組み込まれているiPSCを分化させることから、1つ以上の治療特性を有する派生細胞が取得される場合、そのような派生細胞はまた「合成細胞」とも呼ばれる。例えば、本出願全体で使用される合成エフェクター細胞、又は合成NK細胞若しくは合成T細胞は、末梢血、臍帯血、又は他のドナー組織などの天然(natural)／天然(native)供給源から取得されたそれらの初代対応物と比較して、ゲノム改変されたiPSCから分化した細胞である。いくつかの実施形態では、合成細胞は、その最も近い対応する初代細胞と比較した場合に、1つ以上の非天然細胞機能を有する。

【0085】

本明細書で使用される場合、「増強された治療特性」という用語は、同じ一般的な細胞タイプの典型的な免疫細胞と比較して増強された細胞の治療特性を指す。例えば、「増強された治療特性」を有するNK細胞は、典型的な未改変及び／又は天然に存在するNK細胞と比較して、増強され、改善され、かつ／又は増加された治療特性を有する。免疫細胞の治療特性には、細胞の生着、輸送、ホーミング、生存能力、自己複製、持続性、免疫応答の制御及び調節、生存率、並びに細胞傷害性が含まれ得るが、これらに限定されない。免疫細胞の治療特性はまた、抗原標的化受容体発現、HLA提示又はその欠如、腫瘍微小環境に対する耐性、バイスタンダー免疫細胞及び免疫修飾の誘導、腫瘍外効果の減少を伴う改善されたオンターゲット特異性、並びに／又は化学療法などの治療に対する耐性によっても明らかにされる。

【0086】

本明細書で使用される場合、「エンゲージャ」という用語は、免疫細胞(例えば、T細胞、NK細胞、NK T細胞、B細胞、マクロファージ、好中球)と、腫瘍細胞との間の連結を形成することができ、免疫細胞を活性化することができる分子、例えば、融合ポリペプチドを指す。エンゲージャの例には、二重特異性T細胞エンゲージャ(bi-specific T cell engager、BiTE)、二重特異性キラー細胞エンゲージャ(bi-specific killer cell engager、BiKE)、三重特異性キラー細胞エンゲージャ(tri-specific killer cell engager、TriKE)、若しくは多重特異性キラー細胞エンゲージャ、又は複数の免疫細胞型と適合し得るユニバーサルエンゲージャが含まれるが、これらに限定されない。

【0087】

本明細書で使用される場合、「表面トリガー受容体」という用語は、免疫応答、例えば、細胞傷害性応答を誘発又は開始することができる受容体を指す。表面トリガー受容体を操作することができ、エフェクター細胞、例えば、T細胞、NK細胞、NK T細胞、B細胞、マクロファージ、又は好中球で発現させることができる。いくつかの実施形態では、表面トリガー受容体は、エフェクター細胞の天然受容体及び細胞型とは無関係に、エフェクター細胞と特異的な標的細胞(例えば、腫瘍細胞)との間の二重特異性抗体又は多重特異性抗体の結合を促進する。このアプローチを使用すると、ユニバーサル表面トリガー受容体を含むiPSCを生成し、そのようなiPSCをユニバーサル表面トリガー受容体を発現する様々なエフェクター細胞タイプの集団に分化させることができる。「ユニバーサル」とは、表面トリガー受容体が細胞型に関係なく任意のエフェクター細胞で発現及び活性化することができることを意味し、ユニバーサル受容体を発現する全てのエフェクター細胞は、エンゲージャの腫瘍結合特異性に関係なく、表面トリガー受容体によって認識できるエンゲージャに結合又は連結され得る。いくつかの実施形態では、同じ腫瘍標的化特異性を有するエンゲージャを使用して、ユニバーサル表面トリガー受容体と結合する。いくつかの実施形態では、異なる腫瘍標的化特異性を有するエンゲージャを使用して、ユニバーサル表面トリガー受容体と結合する。したがって、1つ以上のエフェクター細胞型を使用して、1つの特異的な型の腫瘍細胞を殺傷する場合もあれば、2つ以上の型の腫瘍を殺傷する場合もある。表面トリガー受容体は一般に、エフェクター細胞の活性化のための共刺激ドメインと、エンゲージャのエピトープに特異的な抗エピトープとを含む。二重特

10

20

30

40

50

異性エンゲージャは、一方の端の表面トリガー受容体の抗エピトープに特異的であり、もう一方の端の腫瘍抗原に特異的である。

【0088】

本明細書で使用される場合、「安全スイッチタンパク質」という用語は、細胞療法の可能性のある毒性又はその他の有害作用を防止するように設計された操作されたタンパク質を指す。いくつかの例では、安全スイッチタンパク質の発現は条件付きでコントロールされ、安全スイッチタンパク質をコードする遺伝子をゲノムに永久的に組み込んだ移植された操作された細胞の安全性の懸念に対処する。この条件付き調節は変動する可能性があり、小分子を介した翻訳後活性化及び組織特異的及び／又は一過性の転写制御によるコントロールが含まれる可能性がある。安全スイッチタンパク質は、アポトーシスの誘導、タンパク質合成の阻害、DNA複製、増殖停止、転写及び転写後の遺伝子調節及び／又は抗体媒介性枯渇を媒介する可能性がある。いくつかの例では、安全スイッチタンパク質は、外因性分子、例えば、プロドラッグによって活性化され、活性化されると、治療用細胞のアポトーシス及び／又は細胞死を誘発する。安全スイッチタンパク質の例には、カスパーゼ9（又はカスパーゼ3若しくは7）、チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、B細胞CD20、改変EGFR、及びこれらの任意の組み合わせなどの自殺遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。この戦略では、有害事象の発生時に投与されるプロドラッグが自殺遺伝子産物によって活性化され、形質導入された細胞を殺傷する。

10

【0089】

本明細書で使用される場合、「薬学的に活性なタンパク質又はペプチド」という用語は、生物に対して生物学的及び／又は薬学的効果を達成することができるタンパク質又はペプチドを指す。薬学的に活性なタンパク質は、疾患に対する治療的又は緩和的特性を有し、疾患の重症度を改善、軽減（relieve）、緩和、逆転又は軽減（lessen）するために投与することができる。薬学的に活性なタンパク質はまた、予防特性を有し、疾患の発症を予防するために、又はそれが出現した場合にそのような疾患若しくは病的状態の重症度を軽減するために使用される。「薬学的に活性なタンパク質」には、タンパク質若しくはペプチド全体又はその薬学的に活性な断片が含まれる。この用語はまた、タンパク質若しくはペプチドの薬学的に活性な類似体又はタンパク質若しくはペプチドの断片の類似体を含む。薬学的に活性なタンパク質という用語はまた、協調的又は相乗的に作用して治療効果をもたらす複数のタンパク質又はペプチドを指す。薬学的に活性なタンパク質又はペプチドの例には、受容体、結合タンパク質、転写及び翻訳因子、腫瘍成長抑制タンパク質、抗体若しくはその断片、増殖因子、及び／又はサイトカインが含まれるが、これらに限定されない。

20

30

【0090】

本明細書で使用されるとき、「シグナル伝達分子」という用語は、細胞シグナル伝達を改変、関与、阻害、活性化、低減、又は増大させる任意の分子を指す。「シグナル伝達」とは、細胞内で最終的に生化学的事象を引き起こす経路に沿ったタンパク質複合体の動員による化学改変の形で分子シグナルの伝達を指す。シグナル伝達経路の例は当該技術分野で知られており、Gタンパク質共役受容体シグナル伝達、チロシンキナーゼ受容体シグナル伝達、インテグリンシグナル伝達、トールゲートシグナル伝達、リガンド依存性イオンチャンネルシグナル伝達、ERK／MAPKシグナル伝達経路、Wntシグナル伝達経路、cAMP依存経路、及びIP3／DAGシグナル伝達経路が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0091】

本明細書で使用されるとき、「標的化モダリティ」という用語は、細胞に遺伝的に組み込まれて、i)固有のキメラ抗原受容体（CAR）又はT細胞受容体（TCR）に関連するときの抗原特異性、ii)モノクローナル抗体又は二重特異性エンゲージャに関連するときのエンゲージャ特異性、iii)形質転換細胞の標的化、iv)がん幹細胞の標的化、及びv)特異的な抗原又は表面分子の不在下でのその他の標的化戦略を含むがこれらに限定されない、抗原及び／又はエピトープの特異性を促進する分子、例えば、ポリペプチ

50

ドを指す。

【0092】

本明細書で使用される場合、「特異的」又は「特異性」という用語は、非特異的又は非選択的な結合とは対照的に、標的分子に選択的に結合する分子、例えば受容体又はエンゲージャの能力を指すために使用され得る。

【0093】

本明細書で使用される場合、「養子細胞療法」という用語は、免疫細胞がヒトドナーから単離されるか、又は多能性細胞のインビトロ分化から取得されるエフェクター細胞であるか否か、それらが遺伝子改変されているか否か、あるいは、それらがドナーから単離された後にエクスピボで継代されたか、増殖されたか、若しくは不死化された初代ドナー細胞であるか否か、にかかわらず、自己又は同種異系リンパ球の輸注に関する細胞ベースの免疫療法を指す。

【0094】

本明細書で使用される場合、「放射線」とは、波又は粒子の形態でのエネルギーの放出又は伝達を指す。放射線の例示的な形態としては、電磁放射線（例えば、電波、マイクロ波、赤外線、可視光線、紫外線、X線、及びガンマ線放射線）、粒子放射線（例えば、アルファ線、ベータ線、陽子放射線、及び中性子放射線）、並びに音響放射線（例えば、超音波、音波、及び地震波）が挙げられるが、これらに限定されない。様々な実施形態では、放射線の量は、グレイ（Gray、Gy）として測定され、これは、物質1キログラム当たり1ジュールの放射線エネルギーの吸収として定義される。放射線療法において、適用される放射線の量は、処置されるがんのタイプ及びステージに依存して変化する。治療症例では、固形上皮性腫瘍の典型的な用量は60～80 Gyの範囲であるが、リンパ腫は典型的には20～40 Gyで処置される。予防（アジュバント）用量は、典型的には、約45～60 Gyを1.8～2 Gyに分割したものである（例えば、乳がん、頭部がん及び頸部がんの場合）。様々な実施形態では、放射線は、本明細書に開示されるような感作因子として使用され得る。

【0095】

本明細書で使用される場合、「放射線療法（radiation therapy）」又は「放射線治療（radiotherapy）」は、細胞がどのように成長及び分裂するかを制御する遺伝物質を破壊することによって、細胞を損傷するための放射線の使用を伴うがん治療の種類を指すために互換的に使用される。健常な細胞とがん細胞の両方が放射線療法によって損傷を受けるが、放射線療法の目標は、正常で健常な細胞をできるだけ破壊しないようにすることである。「放射線療法」という用語は、多くの場合、外部ビーム放射線療法を指し、高エネルギービーム（例えば、X線、ガンマ線、光子、陽子、中性子、イオン、及びそのような治療に適用可能な任意の他の形態のエネルギー）が、治療される対象の外部の機械によって生成され、対象の身体上の正確な点に向けられる。しかしながら、「放射線療法」という用語はまた、放射線源を含むか、さもなければそれに連結されたシード、リボン、又はカプセルが、対象の体内の腫瘍又はがん細胞の中又はその近くに配置される近接照射療法を含む。近接照射療法には、低線量率インプラント、高線量率インプラント、及び永久インプラントが含まれる。「放射線療法」という用語には、放射性薬物（例えば、放射性ペプチドを含む放射性医薬品又は放射性核種）が対象に経口又は静脈内投与され、対象の体内の腫瘍又はがん細胞が位置する領域に集まる全身放射線療法も含まれる。腫瘍抗原に結合する抗体が毒性薬物に連結されている抗体-薬物候補と同様に、放射性医薬品は、腫瘍抗原に特異的に結合する標的化分子（抗体など）に連結された放射性化合物を組み込む。放射性医薬品に有用な放射性化合物の例としては、カルシウム-47、炭素-11、炭素-14、クロム-51、コバルト-57、コバルト-58、エルビウム-169、フッ素-18、ガリウム-67、ガリウム-68、水素-3、インジウム-111、ヨウ素-123、ヨウ素-125、ヨウ素-131、鉄（iron）-59、クリプトン-81m、ルテチウム-177、窒素-13、酸素-15、リン-32、ラジウム-223、ルビジウム-82、サマリウム-153、セレン-75、ナトリウム-22、ナトリウム-2

4、ストロンチウム－89、テクネチウム－99m、タリウム－201、キセノン－133、及びイットリウム－90が挙げられるが、これらに限定されない。様々な実施形態では、放射線療法は、本明細書に開示されるような感作因子として使用され得る。

【 0 0 9 6 】

本明細書で使用される場合、「リンパ球枯渇」及び「リンパコンディショニング」は、典型的には免疫療法の前の、リンパ球及びT細胞の破壊を指すために交換可能に使用される。養子細胞療法の投与前のリンパコンディショニングの目的は、エフェクター細胞の恒常性増殖を促進すること、並びに調節性免疫細胞及び恒常性サイトカインについて競合する免疫系の他の競合要素を排除することである。したがって、リンパコンディショニングは、典型的には、養子細胞療法の第1の用量の前に、1つ以上の化学療法剤を対象に投与することによって達成される。様々な実施形態では、リンパコンディショニングは、養子細胞療法の第1の用量の数時間～数日前に行う。リンパコンディショニングに有用な例示的な化学療法剤には、シクロホスファミド（CY）、フルダラビン（FLU）、及び以下に記載のものが含まれるが、これらに限定されない。しかしながら、抗CD38 mAbによる十分なリンパ球枯渇は、本明細書中で更に記載されるように、CY／FLUベースのリンパコンディショニング手順を必要とせず、又は最小限必要として、（例えば、本明細書の様々な態様に従って、iNK細胞療法において使用するための）代替的なコンディショニングプロセスを提供し得る。

【 0 0 9 7 】

本明細書で使用される場合、「ホーミング」又は「輸送」は、標的部位（例えば、細胞、組織（例えば、腫瘍）、又は臓器）への細胞の能動的ナビゲーション（遊走）を指す。

「ホーミング分子」とは、細胞を標的部位に指向する分子を指す。いくつかの実施形態では、ホーミング分子は、細胞の標的部位への相互作用を認識及び／又は開始するように機能する。いくつかの実施形態では、ホーミング分子は、ケモカイン受容体である。本明細書中で使用される場合、「ケモカイン受容体」とは、ケモカインに結合する細胞表面分子を指す。ケモカイン受容体は、天然に存在するケモカイン受容体若しくは組換えケモカイン受容体又はそれらのバリエーションを含み得る。例示的なケモカイン受容体としては、CXCRケモカイン受容体（例えば、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、又はCXCR7）、CCRケモカイン受容体（例えば、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、又はCCR11）、CX3CRケモカイン受容体（例えば、CX3CR1）、XCケモカイン受容体（例えば、XCR1）、又はそれらのバリエーションが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 9 8 】

本明細書で使用されるとき、「治療上十分な量」は、その意味の範囲内で、それが参照する特定の治療剤及び／又は医薬組成物の非毒性であるが十分かつ／又は有効な量を含み、所望の治療効果を提供する。必要とされる正確な量は、患者の全体的な健康状態、患者の年齢、並びに治療される状態のステージ及び重症度などの要因に応じて、対象ごとに異なる。特定の実施形態では、「治療上十分な量」は、治療されている対象の疾患又は状態に関連する少なくとも1つの症状を寛解、軽減、及び／又は改善するのに十分及び／又は有効である。

【 0 0 9 9 】

多能性幹細胞の分化には、培養液中の刺激剤及び細胞の物理的状態の変化など、培養系の変化が必要とされる。最も一般的な戦略は、系統特異的な分化を開始するための共通かつ重要な中間体として胚様体 (embryoid body、EB) の形成を利用する。「胚様体」とは、胚の発生を模倣することが示されている三次元のクラスターであり、三次元領域内で多数の系統を発生させる。典型的には数時間から数日である分化プロセスを通じて、単純なEB (例えば、分化を誘発された凝集多能性幹細胞) は成熟を続け、嚢胞性EBにまで成長し、典型的には数日から数週間であるこのとき、それらは、更に分化を続けるように処理される。EB形成は、細胞の三次元多層クラスターにおいて多能性幹細胞を互い

に近接させることによって開始される。典型的には、これは、多能性細胞を液滴中で沈降させること、細胞を「U」底ウェルプレート中に沈降させることを含むいくつかの方法のうちの1つによって、又は機械的攪拌によって達成される。多能性培養維持培地で維持された凝集体は適切なEBを形成しないため、EBの成長を促進するために、多能性幹細胞の凝集体には更に分化の手掛かりが必要である。そのため、多能性幹細胞の凝集体は、選択した系統へのキュー誘発を提供する分化培地に移す必要がある。多能性幹細胞のEBベースの培養は、典型的には、EB細胞クラスター内の中程度の増殖の分化した細胞集団（すなわち、外胚葉、中胚葉、及び内胚葉の胚葉）を生成する。EBは、細胞分化を促進することが証明されているが、環境内の分化のキューに対する三次元構造の細胞の露出に一貫性がないため、様々な分化状態の異種細胞を生じさせる。加えて、EBは作成及び維持することが面倒である。更に、EB形成による細胞分化には適度な細胞増殖が伴い、分化効率の低下にもつながる。

10

【0100】

対照的に、「凝集体形成」は、「EB形成」とは異なり、多能性幹細胞由来細胞の集団を増殖させるために使用することができる。例えば、凝集体に基づく多能性幹細胞の増殖中、培養培地は、増殖及び多能性を維持するように選択される。細胞増殖は一般に、より大きな凝集体を形成する凝集体のサイズを増加させ、この凝集体は、機械的又は酵素的に小さな凝集体に解離して、培養内の細胞増殖を維持し、細胞数を増加することができる。EB培養とは異なり、維持培養培地内の凝集体内で培養された細胞は、多能性のマーカーを維持する。多能性幹細胞凝集体は、分化を誘導するために更なる分化のキューを必要とする。

20

【0101】

本明細書で使用される場合、「単層分化」は、細胞の三次元多層クラスターにわたる分化、すなわち「EB形成」とは異なる分化方法を指す用語である。単層分化は、本明細書に開示される他の利点の中でも特に、EB形成が分化を開始する必要性を回避する。単層培養はEB形成の場合でなどの胚発生を模倣しないため、特定の系統への分化は、EB形成での3つ全ての胚葉分化と比較して最小限であるとみなされる。

【0102】

本明細書で使用される場合、「解離した細胞」又は「単一の解離した細胞」は、他の細胞から又は表面（例えば、培養プレート表面）から実質的に分離又は精製された細胞を指す。例えば、細胞は、機械的又は酵素的方法によって動物又は組織から解離され得る。代替的に、インビトロで凝集する細胞は、例えば、クラスターの懸濁液、単一の細胞又は単一の細胞とクラスターの混合物への解離によって、互いに酵素的又は機械的に解離され得る。更に別の代替的な実施形態では、付着細胞は培養プレート又は他の表面から解離され得る。したがって、解離には、細胞外マトリックス（extracellular matrix、ECM）及び基質（培養面など）との細胞相互作用を破壊すること、又は細胞間のECMを破壊することが含まれる。

30

【0103】

本明細書で使用される場合、「マスター細胞バンク」又は「MCB」は、1つ以上の治療特性を含むように操作されており、特徴付けられ、試験され、適格化され、拡大されており、かつ製造環境における指向性分化による細胞ベースの治療剤の産生のための出発細胞材料として確実に役立つことが示されているiPSCのクローン集団であるクローンマスター操作iPSC株を指す。様々な実施形態では、MCBは、製造プロセス中にiPSC細胞株が継代され、解凍され、又は取り扱われる合計回数を低減及び／又は排除することによって、遺伝的変異及び／又は汚染可能性を防止するために、複数の容器中で維持、貯蔵、及び／又は凍結保存される。

40

【0104】

本明細書で使用される場合、「フィーダー細胞」又は「フィーダー」は、第2のタイプの細胞と共培養されて、第2のタイプの細胞が増殖、増殖、又は分化することができる環境を提供する、1つのタイプの細胞を表す用語であり、フィーダー細胞は刺激、増殖因子

50

、栄養素を提供し、第2の細胞タイプを支持する。フィーダー細胞は、それらが支持している細胞とは異なる種に由来してもよい。例えば、幹細胞を含む特定のタイプのヒト細胞は、マウス胚性線維芽細胞又は不死化マウス胚性線維芽細胞の初代培養によって支持することができる。別の例では、末梢血由来細胞又は形質転換白血病細胞は、ナチュラルキラー細胞の増殖及び成熟を支持する。フィーダー細胞は、他の細胞と共培養されるときに、それらが支持している細胞よりも増殖するのを防ぐために、照射又はマイトマイシンなどの抗有糸分裂剤での処理によって、典型的には不活性化され得る。フィーダー細胞は、内皮細胞、間質細胞（例えば、上皮細胞又は線維芽細胞）、及び白血病細胞を含み得る。前述を限定することなく、1つの特定のフィーダー細胞タイプは、ヒト皮膚線維芽細胞などのヒトフィーダーであり得る。別のフィーダー細胞タイプは、マウス胚性線維芽細胞（mouse embryonic fibroblast、MEF）であり得る。概して、様々なフィーダー細胞を一部使用して、多能性を維持し、特定の系統に分化を指示し、増殖能力を増強し、エフェクター細胞などの特殊化した細胞タイプへの成熟を促進することができる。

10

【0105】

本明細書で使用される場合、「フィーダーフリー」（feeder-free、FF）環境とは、フィーダー若しくは間質細胞を本質的に含まない、及び／又はフィーダー細胞の培養によって前処理されていない、培養条件、細胞培養、又は培養培地などの環境を指す。「前処理された」培地とは、フィーダー細胞が培地内で少なくとも1日などの期間培養された後に採取された培地を指す。前処理された培地には、培地で培養されたフィーダー細胞によって分泌された増殖因子及びサイトカインを含む、多くのメディエータ物質が含まれる。いくつかの実施形態では、フィーダーフリー環境は、フィーダー細胞又は間質細胞の両方を含まず、フィーダー細胞の培養によって前処理もされていない。

20

【0106】

iPSC及びそれから分化した由来非多能性細胞のゲノム編集若しくは改変、又は非多能性細胞及びそれからリプログラミングされた由来iPSCのゲノム編集若しくは改変との関連で使用される「機能的」とは、（1）遺伝子レベルでは、ノックイン、ノックアウト、ノックダウン遺伝子発現、直接ゲノム編集若しくは改変によって、又は最初にゲノム操作された出発細胞からの分化若しくはリプログラミングを介した「継代」によって達成される、所望の細胞発生段階での誘導性若しくは一時的発現などのトランスジェニック若しくはコントロールされた遺伝子発現の成功、又は（2）細胞レベルでの—（i）直接ゲノム編集を通じて当該細胞において得られる遺伝子発現改変；（ii）最初にゲノム操作された出発細胞からの分化若しくはリプログラミングを介した「継代」を通じて当該細胞において維持される遺伝子発現改変；（iii）当該細胞のより初期の発生段階においてのみ出現するか、又は分化若しくはリプログラミングを介して当該細胞を生じる出発細胞においてのみ出現する遺伝子発現改変の結果としての、当該細胞における下流遺伝子制御、又は（iv）iPSC、前駆体若しくは脱分化した細胞起源で行われたゲノム編集若しくは改変に最初に由来する成熟細胞産物内に示される、増強された若しくは新たに達成された細胞機能若しくは属性による、細胞機能／特徴の除去、付加又は改変の成功を指す。

30

【0107】

HLAクラスI欠損、HLAクラスII欠損、又はその両方を含む「HLA欠損」とは、HLAクラスIタンパク質ヘテロ二量体及び／又はHLAクラスIIヘテロ二量体を含む完全なMHC複合体の表面発現のレベルが不足している、又はもはや維持されていない、又は低減している細胞を指し、減少又は低減したレベルが、他の細胞又は合成方法によって自然に検出可能なレベルよりも低くなっている。

40

【0108】

本明細書で使用されるとき、「改変されたHLA欠損iPSC」は、改善された分化能、抗原標的化、抗原提示、抗体認識、持続性、免疫回避、抑制に対する耐性、増殖、共刺激、サイトカイン刺激、サイトカイン産生（オートクリン又はパラクリン）、走化性、及び細胞傷害性、例えば、非古典的HLAクラスIタンパク質（例えば、HLA-E及びHLA-G）、キメラ抗原受容体（CAR）、T細胞受容体（TCR）、CD16Fc受

50

容体、BCL11b、NOTCH、RUNX1、IL15、4-1BB、DAP10、DAP12、CD24、CD3ζ、4-1BBL、CD47、CD113、及びPDL1に関連するがこれらに限定されないタンパク質を発現する遺伝子を導入することによって更に改変されるHLA欠損iPSCを指す。「改変されたHLA欠損」の細胞には、iPSC以外の細胞も含まれる。

【0109】

「リガンド」という用語は、標的分子と複合体を形成して、標的上の部位に結合することによってシグナルを生成する物質を指す。リガンドは、標的に特異的に結合することができる天然又は人工物質であってもよい。リガンドは、タンパク質、ペプチド、抗体、抗体複合体、コンジュゲート、核酸、脂質、多糖、単糖、小分子、ナノ粒子、イオン、神経伝達物質、又は標的に特異的に結合することができる任意の他の分子実体の形態であってもよい。リガンドが結合する標的は、タンパク質、核酸、抗原、受容体、タンパク質複合体、又は細胞であり得る。標的に結合してその機能を変化させ、シグナル伝達応答を誘発するリガンドは、「アゴニスト性 (agonistic)」又は「アゴニスト (agonist)」と呼ばれる。標的に結合し、シグナル伝達応答を遮断又は低減するリガンドは、「アンタゴニスト性」又は「アンタゴニスト」である。

【0110】

「抗体」という用語は、本明細書において最も広い意味で使用され、概して、標的に特異的に結合する少なくとも1つの結合部位を含有する免疫応答生成分子を指し、標的は、抗原、又はある特定の抗体と相互作用することができる受容体であり得る。例えば、NK細胞は、抗体又は抗体のFc領域のそのFc-ガンマ受容体 (Fc-gamma receptor、FcγR) への結合によって活性化され、それによって、ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity、抗体依存性細胞傷害) 媒介性エフェクター細胞活性化を誘発することができる。抗体が結合する抗原若しくは受容体の特定の断片若しくは部分、又は概して標的は、エピトープ又は抗原決定基として知られている。「抗体」という用語は、天然抗体及びそのバリエーション、天然抗体及びそのバリエーションの断片、ペプチボディ及びそのバリエーション、並びに一本鎖抗体及びその断片を含む、抗体又はその特定の断片若しくは部分の構造及び／又は機能を模倣する抗体模倣体を含むが、これらに限定されない。抗体は、マウス抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダIgG、単一可変新規抗原受容体 (single variable new antigen receptor、VNAR)、サメ重鎖抗体 (Ig-NAR)、キメラ抗体、組換え抗体、単ドメイン抗体 (dAb)、抗イディオタイプ抗体、二重特異性、多重特異性、若しくは多量体抗体、又はその抗体断片であってもよい。抗イディオタイプ抗体は、別の抗体のイディオトープへの結合に特異的であり、イディオトープは、抗体の抗原決定基である。二重特異性抗体は、BiTE (二重特異性T細胞エンゲージャ) 又はBiKE (二重特異性キラー細胞エンゲージャ) であってもよく、多重特異性抗体は、TriKE (三重特異性キラー細胞エンゲージャ) であってもよい。抗体断片の非限定的な例には、Fab、Fab'、F(ab')₂、F(ab')₃、Fv、Fabc、pFc、Fd、一本鎖可変断片 (single chain fragment variable、scFv)、タンデムscFv (scFv)₂、一本鎖Fab (single chain Fab、scFab)、ジスルフィド安定化Fv (disulfide stabilized Fv、dsFv)、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、単ドメイン抗原結合断片 (single-domain antigen binding fragment、sdAb)、ラクダ重鎖IgG及びNanobody (登録商標) 断片、組換え重鎖のみ抗体 (heavy-chain-only antibody、VHH)、及び抗体全体の結合特異性を維持する他の抗体断片が含まれる。

【0111】

「Fc受容体」はFcRと略され、認識される抗体のタイプに基づいて分類される。例えば、最も一般的なクラスの抗体IgGに結合するものはFc-ガンマ受容体 (FcγR) と呼ばれ、IgAに結合するものはFc-アルファ受容体 (Fc-alpha receptor、FcαR) と呼ばれ、IgEに結合するものはFc-イプシロン受容体 (Fc-epsilon rec

10

20

30

40

50

eptor、FcεR）と呼ばれる。FcRのクラスは、それらを発現する細胞（マクロファージ、顆粒球、ナチュラルキラー細胞、T及びB細胞）並びに各受容体のシグナル伝達特性によっても区別される。Fc-ガンマ受容体（FcγR）には、FcγRI（CD64）、FcγRIIA（CD32）、FcγRIIB（CD32）、FcγRIIIA（CD16a）、及びFcγRIIIB（CD16b）など、分子構造が異なるために抗体親和性が異なるいくつかのメンバーが含まれる。

【0112】

「キメラ受容体」は、少なくとも2つの異なるタンパク質に由来するアミノ酸配列の2つ以上の部分を含むように作製される、操作された人工又はハイブリッド受容体タンパク質分子を記載するために使用される一般用語である。キメラ受容体タンパク質は、シグナル伝達を開始し、受容体へのアゴニストリガンドの結合時に下流機能を実施する能力を細胞に与えるように操作されている。例示的な「キメラ受容体」には、キメラ抗原受容体（CAR）、キメラ融合受容体（CFR）、キメラFc受容体（chimeric Fc receptor、CFcR）、及び2つ以上の受容体の融合体が含まれるが、これらに限定されない。

【0113】

CFcRと略される「キメラFc受容体」は、天然の膜貫通ドメイン及び／若しくは細胞内シグナル伝達ドメインが改変されたか、又は非天然の膜貫通ドメイン及び／若しくは細胞内シグナル伝達ドメインで置き換えられた操作されたFc受容体を記載するために使用される用語である。キメラFc受容体のいくつかの実施形態では、膜貫通及びシグナル伝達ドメインの一方又は両方が非天然であることに加えて、1つ以上の刺激ドメインを操作されたFc受容体の細胞内部分に導入して、受容体の誘発による細胞活性化、増殖、及び機能を増強することができる。標的抗原への抗原結合ドメインを含むキメラ抗原受容体（CAR）とは異なり、キメラFc受容体は、Fc断片、若しくは抗体のFc領域、若しくはエンゲージャ若しくは結合分子に含まれるFc領域に結合し、標的細胞を近傍に近づけるか、又は近づけなくとも、分子に結合して細胞機能を活性化する。例えば、Fcγ受容体は、細胞外ドメインでのIgGの結合に応答し、それによりCFcRを生成する細胞内領域において選択された膜貫通ドメイン、刺激ドメイン、及び／又はシグナル伝達ドメインを含むように操作され得る。一例では、CFcRは、その膜貫通ドメイン及び／又は細胞内ドメインを置き換えることにより、Fcγ受容体であるCD16を操作することによって産生される。CD16ベースのCFcRの結合親和性を更に改善させるために、CD64の細胞外ドメイン又はCD16の高親和性バリエーション（例えば、F176V）を組み込むことができる。高親和性CD16細胞外ドメインが含まれるCFcRのいくつかの実施形態では、197位にセリンを含むタンパク質分解性切断部位が除去されているか、又は受容体の細胞外ドメインが非切断性であるように置き換えられて、すなわち、シェディングされないようになり、これにより、hnCD16ベースのCFcRが取得される。

【0114】

FcγR受容体であるCD16には、Fc受容体FcγRIIIa（CD16a）とFcγRIIIB（CD16b）の2つのアイソフォームがあることが確認されている。CD16aは、標的細胞に付着した単量体IgGに結合してNK細胞を活性化し、抗体依存性細胞傷害（ADCC）を促進する、NK細胞によって発現される膜貫通タンパク質である。本明細書で使用されるとき、「高親和性CD16」、「非切断性CD16」、又は「高親和性非切断性CD16」（hnCD16と略される）は、CD16の天然又は非天然バリエーションを指す。野生型CD16は親和性が低く、NK細胞が活性化されると、白血球上の様々な細胞表面分子の細胞表面密度を制御するタンパク質分解切断プロセスである外部ドメインシェディングに供される。F176V及びF158Vは、高い親和性を有する例示的なCD16多型バリエーションである。膜近位領域（189位～212位）における切断部位（195位～198位）が変更又は排除されたCD16バリエーションは、脱落しない。切断部位及び膜近位領域は、国際公開第2015/148926号に詳細に記載されており、その完全な開示は参照により本明細書に組み込まれる。CD16のS197Pバリエーションは、CD16の非切断性バージョンである。F158V及びS197Pの両方を含

10

20

30

40

50

むCD16バリエーションは親和性が高く、非切断性である。別の例示的な高親和性非切断性CD16 (high affinity and non-cleavable CD16、h n C D 1 6) バリエーションは、CD64外部ドメインの3つのエクソンの1つ以上に由来する外部ドメインを含む操作されたCD16である。

【0115】

I. 増強された特性を持つ養子細胞療法に有用な細胞及び組成物

本明細書で提供されるのは、iPSCから分化した派生細胞の治療特性を増強しながら、iPSC及びその派生細胞の分化能及び細胞発生生物学に影響を与えることなくクローンiPSCの調節回路を体系的に操作する戦略である。iPSC由来細胞は機能的に改善されており、選択的モダリティの組み合わせがゲノム操作を通じてiPSCレベルで細胞に導入された後の養子細胞療法に好適である。以前には、提供された1つ以上の遺伝子編集を含む改変されたiPSCが改変された活性及び／若しくは特性を保持しながら依然として細胞発生に入る能力、並びに／又は成熟して機能的分化細胞を生成する能力を有するかどうかは不明であった。iPSCから指示された細胞分化中の予期しない失敗は、発生段階の特定の遺伝子発現又はその欠如、HLA複合体提示の要件、導入された表面発現モダリティのタンパク質シェディング、及び細胞の表現型及び／又は機能の変化を可能にする分化プロトコルの再構成の必要性を含むがこれらに限定されない側面に起因する。本出願は、本明細書において提供される様々な実施形態の1つ以上の選択されたゲノム改変がiPSC分化能に悪影響を及ぼさないこと、並びに操作されたiPSCに由来する機能的エフェクター細胞が、iPSC分化後にエフェクター細胞に保持される、個々の又は組み合わせたゲノム改変に起因する増強及び／又は獲得した治療特性を有することを示す。更に、iPSC及びiPSC由来エフェクター細胞の文脈において記載され得る全てのゲノム改変及びそれらの組み合わせは、培養されているか増殖されているかにかかわらず、T細胞、NK細胞、又は免疫調節細胞などの初代免疫細胞を含む初代由来細胞に適用可能であり、その改変は、養子細胞療法に有用な操作された免疫細胞をもたらす。

【0116】

また、本明細書では、操作されたiPSCに由来するエフェクター細胞を使用する既製の養子細胞療法設定において、低減されたオフ腫瘍効果とともにオンターゲット特異性を改善し、及び／又はホーミング、持続性及び細胞傷害性を改善するために、化学療法剤、放射線及び／又は放射性分子などの1つ以上の感作因子との接触を介して腫瘍細胞表面上のMICA/B発現を増加させるための解決策も提供される。加えて、本出願は、本明細書に詳述されるように、エフェクター細胞の増強された機能性を達成するための更なるゲノム操作態様を提供する。

【0117】

1. MICA/B-CAR

MICA及びMICBは、ヒト主要組織適合遺伝子複合体クラスI鎖関連遺伝子(MIC)の発現ファミリーメンバーである。MICファミリーのメンバーは、高度に多型である(100を超えるヒト対立遺伝子)が、構造的に保存されたモチーフを有する。遺伝子操作されたiPSC及びその派生エフェクター細胞に適用可能なのは、1つ以上のCAR設計であってもよい。CAR、すなわちキメラ抗原受容体は、抗原認識領域を含む外部ドメイン、膜貫通ドメイン、及び内部ドメインを一般に含む融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、外部ドメインは、シグナルペプチド若しくはリーダー配列及び／又はスペーサ(ヒンジとも呼ばれる)を更に含むことができる。いくつかの実施形態では、内部ドメインは、シグナル伝達ドメインを更に含むことができ、シグナル伝達ドメインは、T細胞及び／又はNK細胞の活性化又は機能に特異的なシグナル伝達タンパク質の細胞質ドメインに由来する。いくつかの実施形態では、抗原認識ドメインは、抗原に特異的に結合することができる。いくつかの実施形態では、抗原認識ドメインは、疾患又は病原体と関連する抗原に特異的に結合することができる。いくつかの実施形態では、疾患関連抗原は腫瘍抗原であり、腫瘍は液体腫瘍又は固形腫瘍であってよい。いくつかの実施形態では、CARは、当該CARを発現するT細胞、NK細胞、又はNKT細胞を活性化するのに

適している。いくつかの実施形態では、CARは、NK特異的シグナル伝達成分を含むNK細胞特異的である。ある特定の実施形態では、NK細胞は、CARをコードするポリヌクレオチドを含むiPSCに由来する。いくつかの実施形態では、CARは、T細胞特異的シグナル伝達成分を含むことによってT細胞特異的である。特定の実施形態では、T細胞は、CARをコードするポリヌクレオチドを含むiPSCに由来し、派生T細胞は、Tヘルパー細胞、細胞傷害性T細胞、メモリT細胞、制御性T細胞、ナチュラルキラーT細胞、 $\alpha\beta$ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、又はそれらの組み合わせを含んでもよい。

【0118】

特定の実施形態では、抗原認識ドメインは、マウス抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダIg、サメ重鎖のみ抗体(VNAR)、IgNAR、キメラ抗体、組換え抗体、又はその抗体断片を含む。抗体断片の非限定的な例には、Fab、Fab'、F(ab')₂、F(ab')₃、Fv、抗原結合単鎖可変フラグメント(scFv)、(scFv)₂、ジスルフィド安定化Fv(dsFv)、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、単ドメイン抗原結合断片(sdAb、ナノボディ)、組換え重鎖のみ抗体(VHH)、及び抗体全体の結合特異性を維持する他の抗体断片が含まれる。いくつかの実施形態では、CARの抗原認識領域は、腫瘍関連抗原(TAA)を標的とするT細胞受容体(TCR)の結合ドメインに由来する。

【0119】

1つの例では、本明細書は、腫瘍抗原MICA及びMICBを標的とする抗原認識領域を含むCARを提供する。MICA/B標的化CARのいくつかの実施形態では、抗原認識領域は、MICA及びMICBの保存された $\alpha 3$ ドメインに特異的に結合するscFvである(「MICA/B-CAR」と呼ばれることがある)。一実施形態では、scFvは、配列番号1に対して少なくとも約99%、約98%、約96%、約95%、約90%、約85%、又は少なくとも約80%の同一性であるアミノ酸配列によって表される重鎖の可変領域、及び配列番号2に対して少なくとも約99%、約98%、約96%、約95%、約90%、約85%、又は少なくとも約80%の同一性であるアミノ酸配列によって表される軽鎖の可変領域を含む。MICA/B scFvの一実施形態では、scFvは、配列番号3に対して少なくとも約99%、約98%、約96%、約95%、約90%、約85%、又は少なくとも約80%の同一性であるアミノ酸配列によって表され、リンカー及び/又はシグナルペプチドは例示的であり、置換可能である。MICA/B scFvの別の実施形態では、scFvは、配列番号4に対して少なくとも約99%、約98%、約96%、約95%、約90%、約85%、又は少なくとも約80%の同一性であるアミノ酸配列によって表され、リンカー及び/又はシグナルペプチドは例示的であり、それらの長さ及び配列は変動することができる。本明細書及び本出願全体で使用されるように、2つの配列間の同一性パーセントは、2つの配列の最適なアライメントのために導入する必要のあるギャップの数と各ギャップの長さを考慮して、配列によって共有される同一位置の数の関数(すなわち、同一性% = 同一位置の数 / 位置の総数 $\times$ 100)である。配列の比較と2つの配列間の同一性パーセントの決定は、当該技術分野で認識されている数学的アルゴリズムを使用して実行され得る。

【0120】

配列番号1

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

(118AA. MICA/B scFv重鎖(HC))

配列番号2

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

(107AA. MICA/B scFv軽鎖(LC))

【0121】

【表1】

配列番号3 (HC-リンカー-LC)

MDFQVQIFSFLLISASVIMSRQIQLVQSGPELKKPGETVKVSCKASGYMFTNYAMNWWKQAPEKGLKWMGW
 INTHTGDPTYADDFKGRIFSLSTSASTAYLQINNKNEDTATYFCVRTYGNYAMDYWGQGTSVTVSSGGG
 GSGGGSGGGSDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCSASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYDTSILHLCVP
 SRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQYSKFPRTEGGGTLEIK

(シグナルペプチドー他のシグナルペプチドも可能である；リンカーー他のリンカーも可能である)

10

【0122】

【表2】

配列番号4 (LC-リンカー-HC)

MDFQVQIFSFLLISASVIMSRDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCSASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYD
 TSILHLGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQYSKFPRTEGGGTLEIKGGGGSGGGSGGGG
 SQIQLVQSGPELKKPGETVKVSCKASGYMFTNYAMNWWKQAPEKGLKWMGWINTHTGDPTYADDFKGRIF
 SLETSASTAYLQINNKNEDTATYFCVRTYGNYAMDYWGQGTSVTVSS

(シグナルペプチドー他のシグナルペプチドも可能である；リンカーー他のリンカーも可能である)

20

【0123】

本明細書の別の態様は、遺伝子操作されたiPSC及びその派生細胞を提供し、細胞は、MICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含み、少なくともMICA/B-CARをコードする外因性ポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、MICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含み、少なくともMICA/B-CARをコードする外因性ポリヌクレオチドを任意選択で含むiPSC由来エフェクター細胞は、T細胞である。いくつかの実施形態では、MICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含み、少なくともMICA/B-CARをコードする外因性ポリヌクレオチドを任意選択で含むiPSC由来エフェクター細胞は、NK細胞である。いくつかの他の実施形態では、MICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含み、少なくともMICA/B-CARをコードする外因性ポリヌクレオチドを任意選択で含むiPSC由来エフェクター細胞は、NK細胞である。

30

【0124】

腫瘍関連抗原としてのMICA/Bは、GI上皮、内皮細胞及び線維芽細胞において主に発現され、その発現は細胞/遺伝毒性ストレスによって誘導され、上皮がん及び黒色腫瘍において高度に発現する。一方、腫瘍細胞上のMICA/Bのシェディングは、NK細胞サブセット及びT細胞サブセット上で発現されるNKG2Dによって認識されない可溶性MICA/Bの増加をもたらす、腫瘍回避/エスケープを可能にし、免疫監視を阻害する可能性がある。本明細書に示されるように、本明細書に提供されるMICA/B-CARにより標的化されるMICA/B腫瘍抗原は、多くのヒト及びマウス腫瘍細胞株において観察される表面MICA/Bシェディングを阻害し、MICA/B細胞表面密度の増加、MICA/Bの可溶性シェディングの低下、並びにNK及び/又はT細胞媒介性腫瘍殺傷の増強をもたらす。腫瘍細胞表面MICA/Bを標的化及び安定化することができる、本明細書で提供されるMICA/B-CARは、腫瘍MICA及びMICBへのNKG2D結合に干渉せず、免疫監視を増強し、腫瘍抗原シェディングを介して腫瘍回避を防止又は低減することができる一方で、初代T細胞、NK細胞、iPSC由来T系統細胞及びiPSC由来NK系統細胞を含むが、これらに限定されないMICA/B-CARを発現する免疫細胞を活性化して、MICA/B特異的標的化腫瘍細胞死滅を実行する。更に、提供されるMICA/B-CARを担持する免疫細胞は、様々なMICA/B対立遺伝子が発現する広範囲の腫瘍細胞型によって示されるように、汎MICA/B(腫瘍)標的化及び殺傷が可能である。

40

50

【0125】

本明細書で提供される、MICA/B腫瘍抗原標的化特異性及び任意選択でMICA/B-CARを含む、遺伝子操作されたiPSC及びその派生エフェクター細胞を含む免疫細胞は、MICA/Bとは異なる1つ以上の腫瘍抗原を標的とする1つ以上の追加のCARを更に含み得んでもよい。遺伝子操作されたiPSC及びそれからの派生エフェクター細胞に含まれる追加のCARによって標的とされてもよい抗原の非限定的な例には、ADGRE2、炭酸脱水酵素IX(CAIX)、CCR1、CCR4、がん胎児性抗原(CEA)、CD3、CD5、CD7、CD8、CD10、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD44V6、CD49f、CD56、CD70、CD74、CD99、CD123、CD133、CD138、CD269(BCMA)、CDS、CLEC12A、サイトメガロウイルス(CMV)感染細胞の抗原(例えば、細胞表面抗原)、上皮糖タンパク質-2(EGP-2)、上皮糖タンパク質-40(EGP-40)、上皮細胞接着分子(EpCAM)、EGFRvIII、受容体チロシンタンパク質キナーゼerbB-2、3、4、EGFR、EGFRvIII、ERBB葉酸結合タンパク質(FBP)、胎児のアセチルコリン受容体(AChR)、葉酸受容体- α 、ガングリオシドG2(GD2)、ガングリオシドG3(GD3)、ヒト上皮増殖因子受容体2(HER2)、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)、ICAM-1、インテグリンB7、インターロイキン-13受容体サブユニットアルファ-2(IL-13R α 2)、 κ -軽鎖、キナーゼ挿入ドメイン受容体(KDR)、ルイスA(CA19.9)、ルイスY(LeY)、L1細胞接着分子(L1-CAM)、LILRB2、黒色腫抗原ファミリーA1(MAGE-A1)、ムチン1(Muc-1)、ムチン16(Muc-16)、メソテリン(MSLN)、NKCSI、NKG2Dリガンド、c-Met、がん-精巢抗原NY-ESO-1、腫瘍胎児性抗原(h5T4)、PRAME、前立腺幹細胞抗原(PSCA)、PRAME前立腺特異的膜抗原(PSMA)、腫瘍関連糖タンパク質72(TAG-72)、TIM-3、TRBC1、TRBC2、血管内皮増殖因子R2(VEGF-R2)、ウィルムス腫瘍タンパク質(WT-1)、及び当該技術分野で公知の様々な病原体抗原が含まれる。病原体の非限定的な例には、疾患を引き起こす可能性のある、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、及び原生動物が含まれる。

【0126】

MICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含み、MICA/B-CARを任意選択で含むiPSC及びそれからの派生エフェクター細胞の一実施形態では、細胞は、CD19-CARをコードするポリヌクレオチドを更に含む。CD19を標的とするCARの非限定的な例は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2020/0317777号に記載されている。MICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含み、MICA/B-CARを任意選択で含むiPSC及びそれからの派生エフェクター細胞の別の実施形態では、細胞は、BCMA-CARをコードするポリヌクレオチドを更に含む。BCMAを標的とするCARの非限定的な例は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2019/0307797号に記載されている。MICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含み、MICA/B-CARを任意選択で含むiPSC及びそれからの派生エフェクター細胞の更に別の実施形態では、細胞は、HER2-CARをコードするポリヌクレオチドを更に含む。MICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含み、MICA/B-CARを任意選択で含むiPSC及びそれからの派生エフェクター細胞の更に別の実施形態では、細胞は、MSLN-CARをコードするポリヌクレオチドを更に含む。MICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含み、MICA/B-CARを任意選択で含むiPSC及びそれからの派生エフェクター細胞の更に別の実施形態では、細胞は、PSMA-CARをコードするポリヌクレオチドを更に含む。MICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含み、MICA/B-CARを任意選択で含むiPSC及びそれからの派生エフェクター細胞の更に別の実施形態では、細胞は、VEGF-R2 CARをコードするポリヌクレオチドを更に含む。

【0127】

MICA/B-CARのいくつかの実施形態では、CARのMICA/B結合ドメイン

と膜貫通ドメインとの間にスパーサ／ヒンジが存在する。CARに含まれ得る例示的なスパーサは、当該技術分野において一般的に既知であり、IgG4スパーサ、CD28スパーサ、CD8スパーサ、又は2つ以上のスパーサの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。スパーサの長さもまた、約25アミノ酸から約300アミノ酸以上まで変化し得る。本出願では、100アミノ酸未満、又は50アミノ酸未満のスパーサは短いとみなされ、一方、100アミノ酸超、又は200アミノ酸超のスパーサは長いとみなされる。

【0128】

いくつかの実施形態では、CARの膜貫通ドメインは、CD3δ、CD3ε、CD3γ、CD3ζ、CD4、CD8、CD8a、CD8b、CD27、CD28、CD40、CD84、CD166、4-1BB、OX40、ICOS、ICAM-1、CTLA4、PD1、LAG3、2B4、BTLA、CD16、IL7、IL12、IL15、KIR2DL4、KIR2DS1、NKP30、NKP44、NKP46、NKG2C、NKG2D、又はT細胞受容体ポリペプチドを含むがこれらに限定されない膜貫通タンパク質の天然の（すなわち、野生型）又は改変された膜貫通領域の全長又は少なくとも一部分を含む。一実施形態では、MICA／B-CAR及び／又は（MICA／B以外の抗原を標的とする）更なるCARは、CD28に由来する膜貫通ドメインを含む。一実施形態では、MICA／B-CAR及び／又は更なるCARは、NKG2Dに由来する膜貫通ドメインを含む。

10

【0129】

いくつかの実施形態では、内部ドメイン（又は細胞内ドメイン）のシグナル伝達ドメインは、CD3ζ、2B4、DAP10、DAP12、DNAM1、CD137（4-1BB）、IL21、IL7、IL12、IL15、NKP30、NKP44、NKP46、NKG2C、NKG2D、又はT細胞受容体（TCR）ポリペプチドを含むがこれらに限定されないシグナル伝達分子の全長又は少なくとも一部分を含む。一実施形態では、本明細書に開示されているCARのシグナル伝達ペプチドは、CD3ζの少なくとも1つのITAM（免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ）に対して、少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

20

【0130】

特定の実施形態では、CARの内部ドメインは、少なくとも1つの共刺激シグナル伝達領域を更に含む。共刺激シグナル伝達領域は、CD27、CD28、4-1BB、OX40、ICOS、PD1、LAG3、2B4、BTLA、DAP10、DAP12、CTLA4、若しくはNKG2D、又はそれらの任意の組み合わせを含むが、これらに限定されないシグナル伝達分子の全長又は少なくとも一部を含むことができる。

30

【0131】

一実施形態では、本明細書において提供される細胞に適用可能なCARは、CD28に由来する共刺激ドメイン、及び配列番号5と少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%同一のアミノ酸配列によって表されるCD3ζの天然の又は改変されたITAM1を含むシグナル伝達ドメインを含む。更なる実施形態では、CD28に由来する共刺激ドメイン及びCD3ζの天然の又は改変されたITAM1を含むCARはまた、CD28に由来するヒンジドメイン及び膜貫通ドメインを含み、scFVはヒンジを介して膜貫通ドメインに接続され得、CARは、配列番号6に対して少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%同一のアミノ酸配列を含み、ヒンジ／スパーサの長さ及び／又は配列は変動することができる。

40

【0132】

配列番号5

RSKRSRL LHS DY MNMT PRR PG PTR KH YQ PYA PPR D F A A Y
RSRVKFSRSADAPAYQQGQNNQ

50

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

R R R G K G H D G L F Q G L S T A T K D T F D A L H M Q A L P P R

(153 アミノ酸のCD28 共刺激+CD3 ζ I T A M)

配列番号 6

【0133】

【表 3】

IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWLVVVGGVLACYSLLVTVA
FLIEWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAY
QGGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLEFNELOKDKMAEAFSE
IGMKGERRRRGKHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR

10

(219 アミノ酸のCD28 ヒンジ+CD28 のTM+CD28 共刺激+CD3 ζ I T A M)

【0134】

別の実施形態では、本明細書において提供される細胞に適用可能なCARは、NKG2Dに由来する膜貫通ドメイン、2B4に由来する共刺激ドメイン、及び配列番号7と少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%同一のアミノ酸配列によって表される天然の又は改変されたCD3 ζを含むシグナル伝達ドメインを含む。NKG2Dに由来する膜貫通ドメイン、2B4に由来する共刺激ドメイン、及び天然の又は改変されたCD3 ζを含むシグナル伝達ドメインを含むCARは、CD8 ヒンジを更に含んでもよく、そのような構造のアミノ酸配列は、配列番号8と少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%同一である。

20

【0135】

配列番号 7

【0136】

【表 4】

SNLEVASWIAVMIIFRIGMAVAIFCCFFPSWRRKRKEKQSETSPKEFLTIIYEDVKDLKT
RRNHEQEQTFFPGGGSTIYSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPSFNS
TIYEVIGKSQPKAQNPRLSRKELENFDVYSRVKFSRSADAPAYKQGGQNQLYNELNLGR
EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDGL
YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

30

(263 アミノ酸のNKG2D TM+2B4+CD3 ζ)

配列番号 8

【0137】

【表 5】

TTTTAFRRPPTPAPTIASQFLSLRFEACRPAAGGAVHTRGLDFACDSNLEVASWIAVMIIF
RIGMAVAIFCCFFPSWRRKRKEKQSETSPKEFLTIIYEDVKDLKTRRNHEQEQTFFPGGS
TIYSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPSFNSTIYEVIGKSQPKAQN
PARLSRKELENFDVYSRVKFSRSADAPAYKQGGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE
MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDAL
HMQALPPR

40

(308 アミノ酸のCD8 ヒンジ+NKG2D TM+2B4+CD3 ζ)

【0138】

非限定的なCAR戦略としては、一对の細胞内ドメインの二量体化によるヘテロ二量体条件的活性化CAR（例えば、米国特許第9,587,020号を参照されたい）；スプリットCAR（CARを生成するための抗原結合、ヒンジ、及び内部ドメインの相同組換え）s（例えば、米国特許出願公開第2017/0183407号を参照されたい）；そ

50

れぞれ抗原結合ドメイン及びシグナル伝達ドメインに接続された2つの膜貫通ドメイン間の非共有結合を可能にする多重鎖CAR（例えば、米国特許出願公開第2014/0134142号を参照されたい）；二重特異性抗原結合ドメインを有するCAR（例えば、米国特許第9,447,194号を参照されたい）、又は同じ若しくは異なる抗原若しくはエピトープを認識する一対の抗原結合ドメインを有するCAR（例えば、米国特許第8,409,577号を参照されたい）、タンデムCAR（例えば、Hegde et al., J Clin Invest. 2016; 126(8):3036-3052）；誘導性CAR（例えば、米国特許出願公開第2016/0046700号、同第2016/0058857号、同第2017/0166877号を参照されたい）；切り替え可能なCAR（例えば、米国特許出願公開第2014/0219975号を参照されたい）；並びに当該技術分野で既知の任意の他の設計が更に含まれる。

10

【0139】

CARの更なる例は、シグナル伝達のために組換えTCR（T細胞受容体）を利用し、その結果、組換えTCR α 及び／又は組換えTCR β をもたらし、各々が、それぞれscFv重鎖又はscFv軽鎖に、任意選択で柔軟なリンカーを介して連結されたそれぞれの定常領域（すなわち、TRAC及びTRBC）を含む。組換えTCRを利用するMICA／B-CARのいくつかの実施形態では、TRACを含む組換えTCR α は、本明細書で提供されるMICA／B scFvの軽鎖（LC；配列番号：2）を含むのに対して、TRBCを含む組換えTCR β は、重鎖（HC；配列番号1）を含む。いくつかの他の実施形態では、TRACを含む組換えTCR α は、本明細書で提供されるMICA／B scFvの重鎖（HC；配列番号1）を含み、一方、TRBCを含む組換えTCR β は、軽鎖（LC；配列番号2）を含む。MICA／Bの結合エレメントを含む組換えTCRのいくつかの実施形態では、scFvは、TCR遺伝子座挿入に適しており、CD3表面発現のために内因性CD3と一体化することができる。いくつかの実施形態では、組換えTCR複合体を利用するMICA／B-CARは、腫瘍MICA／B抗原に対してより感受性及び／又は特異的である。いくつかの実施形態では、TRACのアミノ酸配列は、配列番号9に対して少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%同一のアミノ酸配列である。いくつかの実施形態では、TRBCのアミノ酸配列は、配列番号10又は11に対して少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%同一のアミノ酸配列である。

20

30

【0140】

配列番号9

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

配列番号10

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

40

配列番号11

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

【0141】

上記の代替的な実施形態では、TRACは、TCRデルタの定常領域（TRDC）で置

50

き換えられてもよく、TRBCは、TCRガンマの定常領域（TRGC）で置き換えられる。いくつかの実施形態では、TRDCのアミノ酸配列は、配列番号12に対して少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%同一のアミノ酸配列である。いくつかの実施形態では、TRBCのアミノ酸配列は、配列番号13又は14に対して少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%同一のアミノ酸配列である。

【0142】

配列番号12

SQPHTKPSVFVMKNGTNAVACLVKEFYPKDIRINLVSSKK
ITEFDPAIVISPSGKYNAVKLGYEDSNSVTC SVQH DNKT
VHSTDFEVKTDSTDHVKPKETENTKQPSK SCHKPKAIVHT
EKVNMMSLTVLGLRMLFAKTVA VNFLLTAKLFFL

10

配列番号13

DKQLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTYLCLLEKFFP
DVIKIHWQEKKSNTILGSQEGNTMKTNDTYMKFSWLTVP
KSLDKEHRCIVRHENNKNGVDQEIIIFPPIKTDVITMDPKD
NCSKDANDTLLQLTNTSAYYMYLLLLLKS VVYFAIITCC
LLRRTAFCCNGEKS

配列番号14

DKQLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTYLCLLEKFFP
DIIKIHWQEKKSNTILGSQEGNTMKTNDTYMKFSWLTVP
ESLDKEHRCIVRHENNKNGIDQEIIIFPPIKTDVTTVDPKY
NYSKDANDVITMDPKDNWSKDANDTLLQLTNTSAYYTYL
LLLLLKS VVYFAIITCCLLRRTAFCCNGEKS

20

【0143】

MICA/B-CAR及び／又は（MICA/B以外の抗原を標的とする）更なるCAR挿入に適したゲノム遺伝子座には、本明細書で提供されるゲノムセーフハーバーの基準を満たす遺伝子座、及び組み込みの結果として選択された遺伝子座における遺伝子のノックダウン又はノックアウトが所望される遺伝子座が含まれる。いくつかの実施形態では、MICA/B-CAR挿入に適した遺伝子座には、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、GAPDH、RUNX1、B2M、TAP1、TAP2、タバシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCR α 又は β 定常領域、NKG2A、NKG2D、CD38、CD25、CD44、CD58、CD54、CD56、CD69、CD71、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、及びTIGITが含まれるが、これらに限定されない。

30

【0144】

一実施形態では、MICA/B-CARを介したMICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含むiPSC及びその派生細胞は、TCR定常領域（TRAC又はTRBC）中に挿入されたCARを有し、内因性TCRノックアウト（TCR^{neg}）をもたらし、場合によりCAR発現を内因性TCRプロモータの制御下に置く。一実施形態では、MICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含むiPSC及びその派生細胞、MICA/B腫瘍抗原標的化特異性は、MICA/B-CAR、MICA/B腫瘍抗原を標的とする外因性TCR又はこれらの組み合わせを介してもよい。本明細書に記載されるMICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含むiPSC派生細胞の1つの特定の実施形態では、細胞は内因性TCRノックアウト（TCR^{neg}）を含み、派生細胞はT系統細胞である。別の実施形態では、本明細書に記載されるMICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含むiPSC及びその派生細胞はTCR^{neg}であり、CARはNKG2A遺伝子座又はNKG2D遺伝子座に挿入され、NKG2A又はNKG2Dノックアウトをもたらし、場合によりCAR発現を内因性NKG2A又はNKG2Dプロモータの制御下に置く。本明細書に記載されるMICA/B腫瘍抗

40

50

原標的化特異性を含む i P S C 派生細胞の 1 つの特定の実施形態では、細胞は N K G 2 A 又は N K G 2 D 欠損であり、派生細胞は N K 系統細胞である。更に別の実施形態では、本明細書に記載される M I C A / B 腫瘍抗原標的化特異性を含む i P S C 及びその派生細胞は、C D 3 8 コード領域に挿入された C A R を有し、C D 3 8 ノックアウトをもたらす。場合により C A R 発現を内因性 C D 3 8 プロモータの制御下に置く。一実施形態では、本明細書に記載される M I C A / B 腫瘍抗原標的化特異性を含む i P S C 及びその派生細胞は、C D 5 8 コード領域に挿入された C A R を有し、C D 5 8 ノックアウトをもたらす。一実施形態では、本明細書に記載される M I C A / B 腫瘍抗原標的化特異性を含む i P S C 及びその派生細胞は、C D 5 4 コード領域に挿入された C A R を有し、C D 5 4 ノックアウトをもたらす。一実施形態では、本明細書に記載される M I C A / B 腫瘍抗原標的化特異性を含む i P S C 及びその派生細胞は、C I S (サイトカイン誘導性 S H 2 含有タンパク質) コード領域に挿入された C A R を有し、C I S ノックアウトをもたらす。一実施形態では、本明細書に記載される M I C A / B 腫瘍抗原標的化特異性を含む i P S C 及びその派生細胞は、C B L - B (E 3 ユビキチン-タンパク質リガーゼ C B L - B) コード領域に挿入された C A R を有し、C B L - B ノックアウトをもたらす。一実施形態では、本明細書に記載される M I C A / B 腫瘍抗原標的化特異性を含む i P S C 及びその派生細胞は、S O C S 2 (E 3 ユビキチン-タンパク質リガーゼ C B L - B) コード領域に挿入された C A R を有し、S O C S 2 ノックアウトをもたらす。一実施形態では、本明細書に記載される M I C A / B 腫瘍抗原標的化特異性を含む i P S C 及びその派生細胞は、C D 5 6 (N C A M 1) コード領域に挿入された C A R を有し、N C A M 1 ノックアウトをもたらす。別の実施形態では、本明細書に記載される M I C A / B 腫瘍抗原標的化特異性を含む i P S C 及びその派生細胞は、P D 1、C T L A 4、L A G 3 及び T I M 3 のうちの任意の 1 つのコード領域に挿入された C A R を有し、挿入部位での遺伝子ノックアウトをもたらす。更なる実施形態では、本明細書における M I C A / B 腫瘍抗原標的化特異性を含む i P S C 及びその派生細胞は、T I G I T のコード領域に挿入された C A R を有し、T I G I T ノックアウトをもたらす。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 5 】

したがって、ゲノム操作された i P S C を分化させることから得られるエフェクター細胞であって、i P S C 及び派生細胞の両方が、M I C A / B 腫瘍抗原、M I C A / B - C A R、又はそれらの組み合わせを標的とする外因性 T C R を介した M I C A / B 腫瘍抗原標的化特異性をコードするポリヌクレオチドを含み、エフェクター細胞は、初代由来細胞若しくは i P S C 分化に由来する細胞であり、又は遺伝子操作された i P S C は、本明細書に記載される M I C A / B 腫瘍抗原標的化特異性を含む由来エフェクター細胞に分化することができる、エフェクター細胞が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の M I C A / B 腫瘍抗原標的化特異性を含む初代由来エフェクター細胞又は由来エフェクター細胞は、T 系統細胞である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の M I C A / B 腫瘍抗原標的化特異性を含む初代由来エフェクター細胞又は由来エフェクター細胞は、N K 系統細胞である。

【 0 1 4 6 】

本出願では更に、M I C A / B - C A R、M I C A / B 腫瘍抗原を標的とする外因性 T C R、又はそれらの組み合わせを介した M I C A / B 腫瘍抗原標的化特異性を含むがこれに限定されない本明細書に提供される少なくとも 1 つの表現型を有する単一細胞選別された及び増殖されたクローン操作された i P S C を含むマスター細胞バンクが提供され、細胞バンクは、追加の i P S C 操作のためのプラットフォーム、並びに組成が明確かつ均一であり、費用対効果の高い様式で有意な規模で大量生産することができる派生 N K 及び T 細胞を含むがこれらに限定されない、既製の操作された均質な細胞療法製品を製造するための再生可能な供給源を提供する。

【 0 1 4 7 】

2. C D 3 8 ノックアウト

細胞表面分子 C D 3 8 は、多発性骨髄腫及び C D 2 0 陰性 B 細胞性悪性腫瘍を含む、リ

ンパ系及び骨髄系の両方に由来する多発性血液系悪性腫瘍で高度に上方制御されており、これによりがん細胞を枯渇させる抗体治療の魅力的な標的となっている。抗体を介したがん細胞の枯渇は、通常、直接的な細胞アポトーシスの誘導とADCC（抗体依存性細胞傷害）などの免疫エフェクターメカニズムの活性化との組み合わせに起因する。ADCCに加えて、治療用抗体と連携した免疫エフェクター機構には、抗体依存性細胞媒介性食作用（antibody-dependent cell-mediated phagocytosis、ADCP）及び／又は補体依存性細胞傷害性（complement-dependent cytotoxicity、CDC）も含まれ得る。

【0148】

CD38はまた、悪性細胞で高度に発現する以外に、形質細胞並びにNK細胞、活性化T細胞及びB細胞にも発現する。造血中、CD38は、CD34⁺幹細胞と、リンパ系、赤血球系、及び骨髄系の系統にコミットした前駆細胞、並びに形質細胞期まで続く成熟の最終段階で発現する。II型膜貫通型糖タンパク質として、CD38は、受容体及びヌクレオチド代謝産物の生産に関与する多機能酵素の両方として細胞機能を果たす。酵素として、CD38は、合成とNAD⁺からADP-リボースへの反応の加水分解を触媒し、これによって、カルシウム依存性の細胞接着プロセスに重要である、小胞体及びリソソームからのカルシウムの放出を刺激する二次メッセンジャーCADPR及びNAADPを生成する。CD38は、受容体としてCD31を認識し、活性化されたNK細胞のサイトカイン放出と細胞傷害性を制御する。CD38は、脂質ラフトの細胞表面タンパク質と会合し、細胞質のCa²⁺フラックスを制御し、リンパ系及び骨髄細胞のシグナル伝達を媒介することも報告されている。

【0149】

悪性腫瘍の治療では、CD38抗原結合受容体で形質導入されたT細胞を全身的に使用すると、CD34⁺造血前駆細胞、単球、NK細胞、T細胞、及びB細胞のCD38⁺画分が溶解し、レシピエントの免疫エフェクター細胞機能が損なわれるため、治療奏効が不完全になり、効力が低減又は排除される。加えて、CD38特異的抗体であるダラツムマブで治療された多発性骨髄腫患者では、骨髄及び末梢血の両方でNK細胞の低減が観察されたが、T細胞及びB細胞などの他の免疫細胞タイプは、CD38の発現にもかかわらず影響を受けなかった（Casneuf et al., Blood Advances, 2017; 1(23): 2105-2114）。

【0150】

理論に拘束されることなく、本出願は、CD38特異的抗体及び／又はCD38抗原結合ドメインが誘導するフラトリサイドを通じたエフェクター細胞の枯渇又は減少を克服することにより、CD38標的化がん治療の潜在能力を最大限に活用する戦略を提供する。様々な実施形態では、本出願は、MICA／B-CARを含むCD38陰性エフェクター細胞であって、CD38によって媒介されるフラトリサイドを克服し、フラトリサイドを介したCD38特異的抗体及び／又はCD38抗原結合ドメインによって誘導されるエフェクター細胞の枯渇又は低下を回避することができる、MICA／B-CARを含むCD38陰性エフェクター細胞を提供する。加えて、CD38は、T細胞又はB細胞などの活性化リンパ球で上方制御されるため、同種異系エフェクター細胞のレシピエントにおいてダラツムマブなどのCD38特異的抗体を使用してこれらの活性化されたリンパ球を抑制及び／又は排除することにより、これらのエフェクター細胞に対する宿主同種拒絶反応を低減及び／又は防止し、それによって、エフェクター細胞の生存率及び持続性を増加させる。したがって、レシピエントT、Treg、NK、及び／又はB細胞の活性化に対するCD38特異的抗体、分泌型CD38特異的エンゲージャ、又はCD38-CAR（キメラ抗原受容体）は、養子細胞移入の前に、Cy／Flu（シクロホスファミド／フルダラビン）などの化学療法を使用するリンパ球枯渇の代替として使用することができる。

【0151】

加えて、抗CD38抗体又はCD38阻害剤の存在下でCD38⁻エフェクター細胞を使用してCD38⁺T及びpbNK細胞を標的とする場合、CD38⁺アロ反応性細胞

の枯渇は、 NAD^+ （ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、 CD38 の基質）利用可能性を増加させ、 NAD^+ 消費関連細胞死を減少させ、これは、他の利点の中でもとりわけ、免疫抑制性腫瘍微小環境におけるエフェクター細胞応答をブーストし、老化、変性又は炎症性疾患における細胞若返りを支持する。

【0152】

更に、様々な実施形態では、 CD38 ノックアウトのために本明細書において提供される戦略は、本明細書において企図される他の成分及びプロセスと適合性であり、それによって、本明細書に記載される MICA/B 腫瘍抗原標的化特異性及び CD38 ノックアウトを有する iPSC 株を作製し、単一細胞選別された及び増殖されたクローン iPSC を含むマスター細胞バンクを作製し、操作された iPSC 株の指示された分化を介して、本明細書に記載される MICA/B 腫瘍抗原標的化特異性を含む CD38 陰性（ CD38^{neg} 又は $\text{CD38}^{-/-}$ ）派生エフェクター細胞であって、当該派生エフェクター細胞は、改善された代謝適合性、酸化ストレスに対する増加した耐性、並びに細胞活性化及びエフェクター機能を増強するエフェクター細胞におけるタンパク質発現プログラムの誘導などの利点の中でもとりわけ、 CD38 標的化治療部分がエフェクター細胞とともに用いられる場合に、フラトリサイド及び同種拒絶反応に対して保護される、派生エフェクター細胞を得る。加えて、抗 CD38 モノクローナル抗体療法は、患者の造血幹細胞区画に悪影響を及ぼすことなく、患者の活性化免疫系を有意に枯渇させる。 CD38^{neg} 派生細胞は、 CD38 抗体媒介性枯渇に抵抗する能力を有し、毒性コンディショニング剤を使用せずに抗 CD38 抗体又は CD38-CAR と組み合わせ有効に投与することができ、したがって化学療法に基づくリンパ球枯渇を低減及び／又は置換することができる。

【0153】

本明細書で提供される一実施形態では、 iPSC 株における CD38 ノックアウトは、二対立遺伝子ノックアウトである。別の実施形態では、本明細書で提供される MICA/B-CAR 及び／又は MICA/B 腫瘍抗原を標的とする外因性 TCR を含む1つ以上の導入遺伝子を CD38 中の選択された位置に挿入すると同時に CD38 をノックアウトすることは、例えば、 CD38 標的化ノックイン／ノックアウト（ $\text{CD38-targeted knock-in/knockout}$ 、 CD38-KI/KO ）構築物によって達成することができる。構築物のいくつかの実施形態では、構築物は、 CD38 遺伝子座内への位置選択的挿入のための一対の CD38 標的化ホモロジーアームを含む。いくつかの実施形態では、事前に選択された標的化部位は、 CD38 のエクソン内にある。本明細書で提供される CD38-KI/KO 構築物は、導入遺伝子が、構築物に含まれる CD38 内因性プロモータ下又は外因性プロモータ下のいずれかで発現することを可能にする。2つ以上の導入遺伝子が CD38 遺伝子座の選択された位置に挿入される場合、リンカー配列、例えば2Aリンカー又はIRESは、任意の2つの導入遺伝子の間に配置される。2Aリンカーは、FMDV、ERAV、PTV-I、及びTaVに由来する自己切断ペプチド（それぞれ「F2A」、「E2A」、「P2A」、及び「T2A」と呼ばれる）をコードし、単一の翻訳から別々のタンパク質を産生できるようにする。いくつかの実施形態では、導入遺伝子及び／又は外因性プロモータサイレンシングのリスクを低減するために、構築物にインスレータが含まれる。 CD38-KI/KO 構築物に含まれる外因性プロモータは、CAG、又はCMV、EF1 α 、PGK、及びUBCを含むがこれらに限定されない他の構成的、誘導性、時間特異的、組織特異的、若しくは細胞型特異的プロモータであり得る。一実施形態では、 MICA/B-CAR を CD38 遺伝子座に挿入して、 iPSC において CD38 を同時にノックアウトする。

【0154】

したがって、本出願は、 MICA/B-CAR 、腫瘍 MICA/B ペプチドを標的とする外因性 TCR 、又はそれらの組み合わせを介した MICA/B 腫瘍抗原標的化特異性を含む iPSC 及びそれからの派生細胞であって、当該細胞は、 CD38 ノックアウトを更に含む、 iPSC 及びそれからの派生細胞を提供する。

【0155】

様々な実施形態では、当該 i P S C は、指示された分化をして、決定的な造血内皮（H E）の可能性を有する中胚葉細胞、決定的な H E、C D 3 4 + 造血細胞、造血幹細胞及び前駆細胞、造血多能性前駆細胞（multipotent progenitor、M P P）、T 細胞前駆細胞、N K 細胞前駆細胞、骨髓細胞、好中球前駆細胞、T 細胞、N K T 細胞、N K 細胞、B 細胞、好中球、樹状細胞、及びマクロファージを含むがこれらに限定されない機能的な派生造血細胞を産生することができる。いくつかの実施形態では、C D 3 8 陰性エフェクター細胞は、i P S C に由来する N K 系統細胞である。いくつかの実施形態では、C D 3 8 陰性エフェクター細胞は、i P S C に由来する T 系統細胞である。いくつかの実施形態では、C D 3 8 陰性 i P S C 及びその派生細胞は、M I C A / B - C A R を介した M I C A / B 腫瘍抗原標的化特異性、腫瘍 M I C A / B ペプチドを標的とする外因性 T C R、又はこれらの組み合わせを含むがこれらに限定されない、本明細書に記載される 1 つ以上の追加のゲノム編集を含み、本明細書に記載され、表 1 に示される 1 つ以上の更なる操作されたモダリティを更に含んでもよい。

10

【0156】

本出願において更に提供されるのは、本明細書において提供されるような少なくとも 1 つの表現型を有する、単一細胞選別及び増殖されたクローン操作 i P S C を含むマスター細胞バンクであり、この細胞バンクは、更なる i P S C 操作のためのプラットフォームと、組成が明確かつ均一であり、費用効果の高い様式でかなりの規模で大量生産することができる、派生 N K 及び T 細胞を含むがこれに限定されない、既製の操作された均質な細胞療法製品を製造するための再生可能な供給源を提供する。

20

【0157】

3. C D 1 6 ノックイン

C D 1 6 は、2 つのアイソフォーム、F c 受容体 F c γ R I I I a（C D 1 6 a；N M _ 0 0 0 5 6 9 . 6）及び F c γ R I I I b（C D 1 6 b；N M _ 0 0 0 5 7 0 . 4）として同定されている。C D 1 6 a は、標的細胞に付着した単量体 I g G に結合して N K 細胞を活性化し、抗体依存性細胞傷害（A D C C）を促進する、N K 細胞によって発現される膜貫通タンパク質である。C D 1 6 b はヒト好中球によって排他的に発現する。本明細書で使用されるとき、「高親和性 C D 1 6」、「非切断性 C D 1 6」、又は「高親和性非切断性 C D 1 6」（h n C D 1 6 と略される）は、様々な C D 1 6 バリエーションを指す。野生型 C D 1 6 は親和性が低く、N K 細胞が活性化されると、白血球上の様々な細胞表面分子の細胞表面密度を調節するタンパク質分解切断プロセスである外部ドメインシェディングに供される。F 1 7 6 V（いくつかの刊行物では F 1 5 8 V と呼ばれる）は、高親和性を有する例示的な C D 1 6 多型バリエーションであり、一方、S 1 9 7 P バリエーションは、C D 1 6 の遺伝子操作された非切断性バージョンの一例である。F 1 7 6 V と S 1 9 7 P の両方を含む操作された C D 1 6 バリエーションは、高い親和性を有し、非切断性であり、これは、国際公開第 2 0 1 5 / 1 4 8 9 2 6 号により詳細に記載されており、その完全な開示は、参照により本明細書に組み込まれる。加えて、C D 1 6 の外部ドメインが C D 6 4 の外部ドメインの少なくとも一部分で本質的に置き換えられたキメラ C D 1 6 受容体は、A D C C を実行することができる C D 1 6 受容体の所望の高親和性及び切断不可能という特質も実現することができる。いくつかの実施形態では、キメラ C D 1 6 の置換外部ドメインは、C D 6 4（U n i P R o t K B _ P 1 2 3 1 4 又はそのアイソフォーム又は多型バリエーション）の E C 1、E C 2、及び E C 3 エクソンのうちの 1 つ以上を含む。

30

40

【0158】

したがって、細胞に導入された外因性 C D 1 6 の様々な実施形態は、機能的 C D 1 6 バリエーション及びそのキメラ受容体を含む。いくつかの実施形態では、機能的 C D 1 6 バリエーションは、高親和性非切断性 C D 1 6 受容体（h n C D 1 6）である。いくつかの実施形態では、h n C D 1 6 は、F 1 7 6 V 及び S 1 9 7 P の両方を含み、いくつかの実施形態では、F 1 7 6 V を含み、切断領域が排除されている。いくつかの他の実施形態では、h n C D 1 6 は、例示的な配列である、各々が C D 6 4 外部ドメインの少なくとも一部分を含む配列番号 1 5、1 6、及び 1 7 のうちのいずれかと比較した場合、少なくとも 5 0 %、

50

55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、100%、又はその間の任意のパーセンテージの同一性を有する配列を含む。

【0159】

配列番号15

【0160】

【表6】

MWFLTTLLLVVPVDGQVDTTKAVITLQPPWVSVFQEETVTLHCEVLHLPGSSSTQWFLNGTATQTSTPSYR
ITSASVNDSGEYRCQRGLSGRSDPIQLEIHRGWLLLVQSSRVFTEGEPLALRCHAWKDKLVYNVLYYRNGK
AFKFFHWSNLTILKTNISHNGTYHCSGMGKHRYTSAGISVTVKELFPAPVLNASVTSPLLEGNLVTLSC
TKLLLRPGLQLYFSFYMGSKTLRGRNTSSEYQILTARREDSGLYWCEAATEDGNVLKRSPELELQVLGLQ
LPTPVWFHYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWKDHKFKWRKDPQDK

10

(340 アミノ酸のCD64ドメインベースの構築物；CD16TM；CD16ICD)

配列番号16

【0161】

【表7】

MWFLTTLLLVVPVDGQVDTTKAVITLQPPWVSVFQEETVTLHCEVLHLPGSSSTQWFLNGTATQTSTPSYR
ITSASVNDSGEYRCQRGLSGRSDPIQLEIHRGWLLLVQSSRVFTEGEPLALRCHAWKDKLVYNVLYYRNGK
AFKFFHWSNLTILKTNISHNGTYHCSGMGKHRYTSAGISVTVKELFPAPVLNASVTSPLLEGNLVTLSC
TKLLLRPGLQLYFSFYMGSKTLRGRNTSSEYQILTARREDSGLYWCEAATEDGNVLKRSPELELQVLGLF
FPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWKDHKFKWRKDPQDK

20

(336 アミノ酸のCD64エクソンベースの構築物；CD16TM；CD16ICD)

配列番号17

【0162】

【表8】

MWFLTTLLLVVPVDGQVDTTKAVITLQPPWVSVFQEETVTLHCEVLHLPGSSSTQWFLNGTATQTSTPSYR
ITSASVNDSGEYRCQRGLSGRSDPIQLEIHRGWLLLVQSSRVFTEGEPLALRCHAWKDKLVYNVLYYRNGK
AFKFFHWSNLTILKTNISHNGTYHCSGMGKHRYTSAGISVTVKELFPAPVLNASVTSPLLEGNLVTLSC
TKLLLRPGLQLYFSFYMGSKTLRGRNTSSEYQILTARREDSGLYWCEAATEDGNVLKRSPELELQVLGFF
FPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWKDHKFKWRKDPQDK

30

(335 アミノ酸のCD64エクソンベースの構築物；CD16TM；CD16ICD)

【0163】

したがって、本明細書において企図され、記載される編集の中でもとりわけ、外因性CD16又はそのバリエーションを含むように遺伝子操作されたエフェクター細胞又はiPSCが本明細書において提供され、エフェクター細胞は、初代供給源由来の細胞であるか、若しくはiPSC分化に由来する細胞であるか、又は遺伝子操作されたiPSCは、iPSCに導入された外因性CD16を含む由来エフェクター細胞に分化することができる。いくつかの実施形態では、外因性CD16は、高親和性非切断性CD16(hnCD16)受容体である。いくつかの実施形態では、外因性CD16は、CD64外部ドメインの少なくとも一部分を含む。いくつかの実施形態では、外因性CD16は、CD16に由来しない膜貫通ドメイン、刺激ドメイン及び／又はシグナル伝達ドメインを含むCD16ベースのキメラFc受容体(chimeric Fc receptor、CFcR)の形態である。

40

【0164】

いくつかの実施形態では、外因性CD16又はそのバリエーションを含む初代由来又は由来エフェクター細胞は、NK系統細胞である。いくつかの実施形態では、外因性CD16又はそのバリエーションを含む初代由来又は由来エフェクター細胞は、T系統細胞である。いくつかの実施形態では、外因性CD16は、hnCD16を含む。いくつかの実施形態では、hnCD16は、CD64の全長又は部分長細胞外ドメインを含む。いくつかの実施形

50

態では、i P S C又はエフェクター細胞に含まれる外因性C D 1 6又はその機能的バリエーションは、結合時に下流シグナル伝達を誘発するリガンドへのこのような結合において高い親和性を有する。外因性C D 1 6又はその機能的バリエーションに結合するリガンドの非限定例は、A D C C抗体又はその断片だけでなく、当該外因性C D 1 6のC D 1 6又はC D 6 4の細胞外結合ドメインを認識する二重特異性、三重特異性、又は多重特異性のエンゲージ又はバインダを含む。二重特異性、三重特異性、又は多重特異性のエンゲージ又はバインダの例については、本出願で以下で更に説明する。このように、本出願の態様のうちの少なくとも1つは、本開示で更に詳述する状態、疾患、又は感染症の治療における治療的使用に十分な量で、派生エフェクター細胞上で発現する外因性C D 1 6を介して1つ以上の予め選択されたA D C C抗体が予めロードされた、派生エフェクター細胞又はその細胞集団を提供し、当該外因性C D 1 6は、C D 6 4の、又はF 1 7 6 V及びS 1 9 7 Pを有するC D 1 6の細胞外結合ドメインを含む。

10

【0165】

いくつかの他の実施形態では、外因性C D 1 6は、C D 1 6又はそのバリエーションをベースとするC F c Rを含む。キメラF c受容体(C F c R)は、天然C D 1 6膜貫通及び／又は細胞内ドメインを改変又は置換することによって、非天然膜貫通ドメイン、非天然刺激ドメイン及び／又は非天然シグナル伝達ドメインを含むように産生される。本明細書で使用される「非天然」という用語は、膜貫通ドメイン、刺激ドメイン、又はシグナル伝達ドメインが、細胞外ドメインを提供する受容体以外の異なる受容体に由来することを意味する。本明細書での例示では、C D 1 6又はそのバリエーションをベースとするC F c Rは、C D 1 6に由来する膜貫通ドメイン、刺激ドメイン、又はシグナル伝達ドメインを有しない。いくつかの実施形態では、外因性C D 1 6ベースのC F c Rは、C D 3 δ、C D 3 ε、C D 3 γ、C D 3 ζ、C D 4、C D 8、C D 8 a、C D 8 b、C D 2 7、C D 2 8、C D 4 0、C D 8 4、C D 1 6 6、4-1 B B、O X 4 0、I C O S、I C A M-1、C T L A 4、P D 1、L A G 3、2 B 4、B T L A、C D 1 6、I L 7、I L 1 2、I L 1 5、K I R 2 D L 4、K I R 2 D S 1、N K p 3 0、N K p 4 4、N K p 4 6、N K G 2 C、N K G 2 D、又はT細胞受容体ポリペプチドに由来する非天然の膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、外因性のC D 1 6ベースのC F c Rは、C D 2 7、C D 2 8、4-1 B B、O X 4 0、I C O S、P D 1、L A G 3、2 B 4、B T L A、D A P 1 0、D A P 1 2、C T L A 4、又はN K G 2 Dポリペプチドに由来する非天然の刺激／阻害ドメインを含む。いくつかの実施形態では、外因性のC D 1 6ベースのC F c Rは、C D 3 ζ、2 B 4、D A P 1 0、D A P 1 2、D N A M 1、C D 1 3 7 (4-1 B B)、I L 2 1、I L 7、I L 1 2、I L 1 5、N K p 3 0、N K p 4 4、N K p 4 6、N K G 2 C、又はN K G 2 Dポリペプチドに由来する非天然のシグナル伝達ドメインを含む。C D 1 6ベースのC F c Rの一実施形態では、提供されるキメラF c受容体は、I L 7、I L 1 2、I L 1 5、N K p 3 0、N K p 4 4、N K p 4 6、N K G 2 C、及びN K G 2 Dポリペプチドのうちの1つに両方が由来する膜貫通ドメイン及びシグナル伝達ドメインを含む。C D 1 6ベースのキメラF c受容体の特定の一実施形態は、N K G 2 Dの膜貫通ドメイン、2 B 4の刺激ドメイン、及びC D 3 ζのシグナル伝達ドメインを含み、C F c Rの細胞外ドメインは、C D 6 4又はC D 1 6の細胞外ドメインの全長又は部分配列に由来し、C D 1 6の細胞外ドメインは、F 1 7 6 V及びS 1 9 7 Pを含む。C D 1 6ベースのキメラF c受容体の別の例示的な実施形態は、C D 3 ζの膜貫通ドメイン及びシグナル伝達ドメインを含み、C F c Rの細胞外ドメインは、C D 6 4又はC D 1 6の細胞外ドメインの全長又は部分配列に由来し、C D 1 6の細胞外ドメインは、F 1 7 6 V及びS 1 9 7 Pを含む。

20

30

40

【0166】

上述のようなC D 1 6ベースのキメラF c受容体の様々な実施形態は、抗体又はその断片のF c領域に、又は、二重特異性、三重特異性、若しくは多重特異性のエンゲージ若しくはバインダに、高い親和性で結合することができる。結合すると、キメラ受容体の刺激ドメイン及び／又はシグナル伝達ドメインは、エフェクター細胞の活性化及びサイトカ

50

イン分泌、並びに抗体が、又は腫瘍抗原結合成分及びFc領域を有する二重特異性、三重特異性、若しくは多重特異性のエンゲージャ若しくはバインダが標的とする腫瘍細胞の殺傷を可能にする。理論に制限されることなく、CD16ベースのキメラFc受容体の、非天然の膜貫通、刺激及び／若しくはシグナル伝達ドメインを通じて、又は外部ドメインへのエンゲージャの結合を通じて、CFcRはエフェクター細胞の殺傷能力に寄与し得、エフェクター細胞の増殖及び／又は増殖の可能性を増加させる。抗体及びエンゲージャは、抗原を発現している腫瘍細胞とCFcRを発現しているエフェクター細胞を近接させることができ、これも増強された腫瘍細胞の殺傷に寄与する。二重特異性、三重特異性、多重特異性エンゲージャ又はバインダのための例示的な腫瘍抗原には、B7H3、BCMA、CD10、CD19、CD20、CD22、CD24、CD30、CD33、CD34、CD38、CD44、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD179b、CEA、CLEC12A、CS-1、DLL3、EGFR、EGFRvIII、EPCAM、FLT-3、FOLR1、FOLR3、GD2、gpA33、HER2、HM1.24、LGR5、MSLN、MCSP、MICA/B、PSMA、PAMA、P-カドヘリン、及びROR1が含まれるが、これらに限定されない。腫瘍細胞を攻撃する際にCD16ベースのCFcRを発現するエフェクター細胞を結合させるのに好適ないくつかの非限定的な例示的な二重特異性、三重特異性、多重特異性のエンゲージャ又はバインダには、CD16（又はCD64）-CD30、CD16（又はCD64）-BCMA、CD16（又はCD64）-IL15-EPCAM、及びCD16（又はCD64）-IL15-CD33が含まれる。

10

20

【0167】

NK細胞活性化に続いて細胞表面から切断される初代NK細胞によって発現される内因性CD16とは異なり、派生NK細胞の様々な非切断性バージョンのCD16は、CD16の脱落を回避し、一定の発現を維持する。派生NK細胞では、非切断性CD16は、改善した細胞機能の指標であるTNFα及びCD107aの発現を増加させる。非切断性CD16はまた、抗体依存性細胞傷害（ADCC）、及び二重、三重、又は多重特異的エンゲージャの結合も増強する。ADCCは、抗体でコーティングされた標的細胞へのCD16の結合を介したNK細胞媒介性溶解のメカニズムである。由来NK細胞に導入されたhnCD16の追加の高親和性特性により、細胞療法を必要とする対象に細胞を投与する前に、hnCD16を介したADCC抗体のNK細胞へのインビトロ負荷も可能になる。本明細書において提示されるように、hnCD16は、いくつかの実施形態では、F176V及びS197Pを含んでもよく、又は配列番号15、16若しくは17によって例示されるようにCD64に由来する全長又は部分長の外部ドメインを含んでもよく、又は非天然の膜貫通ドメイン、刺激ドメイン、及びシグナル伝達ドメインのうちの少なくとも1つを更に含んでもよい。開示されるように、本出願はまた、本出願で更に詳しく説明するように、状態、疾患、又は感染症の治療における治療的使用に十分な量の1つ以上の予め選択されたADCC抗体が予めロードされた、派生NK細胞又はその細胞集団を提供する。いくつかの実施形態では、予めロードされたCD38抗体はダラツムマブである。いくつかの実施形態では、予めロードされた抗体は抗MICA/B抗体である。

30

【0168】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるMICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含む由来NK細胞において、MICA/B腫瘍抗原標的化特異性は、抗MICA/B抗体と組み合わせた場合にADCCを媒介する外因性CD16若しくはそのバリエーションを介するか、又は更にMICA/B-CAR及び／若しくは腫瘍MICA/Bペプチドを標的とする外因性TCRを介する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるMICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含む由来NK細胞は、CD38ノックアウトを更に含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるMICA/B腫瘍抗原標的化特異性及びCD38ノックアウトを含む由来NK細胞は、CD38抗体で予めロードされる。いくつかの実施形態では、予めロードされたCD38抗体はダラツムマブである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のMICA/B腫瘍抗原標的化特異性及びCD38ノックアウト

40

50

を含む由来NK細胞は、抗HER2抗体（例えば、トラスツズマブ、ペルツズマブ）、抗EGFR抗体（例えば、セツキシマブ、アミバンタマブ）、又は抗PD-L1抗体（例えば、アベルマブ）のうちの1つ以上で予めロードされる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるMICA/B腫瘍抗原標的化特異性及びCD38ノックアウトを含む由来NK細胞は、1つ以上の抗MICA/B抗体で予めロードされる。

【0169】

初代NK細胞とは異なり、初代供給源（すなわち、末梢血、臍帯血、又は他のドナー組織などの天然／天然源）由来の成熟T細胞はCD16を発現しない。発現した外因性の非切断性CD16を含むiPSCが、T系統細胞の発生生物学を損なうことなく、外因性CD16を発現するだけでなく、獲得したADCCメカニズムを通じて機能を実行することができる機能的な派生T細胞に分化することができることは、以前は予想外であった。派生T系統細胞で獲得したこのADCCは、二重標的化、及び／又はCAR-T細胞療法でよく生じる、低減若しくは消失したCAR-T標的抗原の発現、若しくはCAR（キメラ抗原受容体）による認識を回避する変異抗原の発現を伴って腫瘍が再燃する、抗原エスケープを救済するためのアプローチとして追加的に使用され得る。当該派生T系統細胞が、外因性CD16（機能的バリエーション及びCD16ベースのCFcRを含む）発現を介して獲得したADCCを含み、抗体が、CARが標的とする腫瘍抗原とは異なる腫瘍抗原を標的とする場合、抗体を使用してCAR-T抗原エスケープを救済し、CAR-T治療でよく見られる標的腫瘍の再発又は再発を軽減又は防止できる。二重標的化を達成しながら抗原エスケープを低減及び／又は防止するこのような戦略は、1つ以上のCARを発現するNK細胞にも同様に適用可能である。

【0170】

したがって、本出願は、抗MICA/B抗体と組み合わせた場合にADCCを媒介する外因性CD16若しくはそのバリエーションを介して、又は更にMICA/B-CAR及び／若しくは腫瘍MICA/Bペプチドを標的とする外因性TCRを介して、MICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含む派生T系統細胞を提供する。更に提供される実施形態では、本明細書で得られる派生T系統細胞は、本明細書に記載のMICA/B腫瘍抗原標的化特異性に加えてCD38ノックアウトを含み、その結果、腫瘍抗原CD38を標的とする治療剤の存在下で細胞が排除されるのを回避することができる。一実施形態では、腫瘍抗原CD38を標的とする治療薬は抗CD38抗体である。別の実施形態では、腫瘍抗原CD38を標的とする治療薬は、CD38結合領域、例えば抗CD38 scFVを含むCARである。いくつかの実施形態では、派生T系統細胞に含まれる外因性CD16は、F176V及びS197Pを含むhnCD16である。いくつかの他の実施形態では、派生T細胞に含まれるhnCD16は、配列番号15、16若しくは17によって例示されるような、CD64に由来する全長又は部分長の外部ドメインを含むか、又は非天然の膜貫通ドメイン、刺激ドメイン及びシグナル伝達ドメインのうちの少なくとも1つを更に含み得る。本明細書で説明されているように、そのような派生T系統細胞は、抗体の治療効果を高めるためにADCCによって媒介されたモノクローナル抗体で腫瘍を標的とする獲得されたメカニズムを有する。開示されるように、本出願はまた、以下で更に詳しく説明するように、状態、疾患、又は感染症の治療における治療的使用に十分な量の1つ以上の予め選択されたADCC抗体が予めロードされた、派生T系統細胞又はその細胞集団を提供する。

【0171】

更に提供されるように、本明細書に記載のMICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含む細胞又はその集団は、第2のCAR及び／又は外因性CD16若しくはそのバリエーション（表1における「CD16^{ex}」）及び／又は本明細書に記載の1つ以上の追加の操作されたモダリティ、及び／又は表1に示されるものを更に含んでもよい。本出願では更に、本明細書に記載のMICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含むがこれに限定されない本明細書に提供される少なくとも1つの表現型、及び外因性CD16又はそのバリエーションを含むがこれらに限定されない本明細書に提供される少なくとも1つの表現型を有する単一細胞選

別された及び増殖されたクローン操作された i P S C を含むマスター細胞バンクが提供され、細胞バンクは、追加の i P S C 操作のためのプラットフォーム、並びに組成が明確かつ均一であり、費用対効果の高い方法で有意な規模で大量生産することができる派生 N K 及び T 細胞を含むがこれらに限定されない、既製の (off-the-shelf) 操作された均質な細胞療法製品を製造するための再生可能な供給源を提供する。

【0172】

4. 外因的に導入されたサイトカインシグナル伝達複合体

臨床的に適切なサイトカインの全身的高用量投与を回避することにより、そのような行為による用量制限毒性のリスクが減少し、サイトカイン媒介性細胞自律性が確立される。可溶性サイトカインを追加投与する必要なしにリンパ球自律性を達成するために、I L 2、I L 4、I L 6、I L 7、I L 9、I L 10、I L 11、I L 12、I L 15、I L 18、I L 21、及び／又はそれらの対応する受容体のうちの1つ以上の部分長又は全長ペプチドを含むシグナル伝達複合体が細胞に導入され、可溶性サイトカインを投与せずにリンパ球自律性を達成するために、サイトカイン自体の発現を伴って又は伴わずに、サイトカインのシグナル伝達を可能にしてもよく、それによってサイトカインの毒性のリスクを低減して、細胞の増殖 (growth)、増殖 (proliferation)、増殖 (expansion)、及び／若しくはエフェクター機能を維持又は改善する。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達のための導入されたサイトカイン及び／又はそのそれぞれの天然若しくは改変された受容体 (シグナル伝達複合体) は、細胞表面上で発現する。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達は構成的に活性化される。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達の活性化は誘導可能である。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達の活性化は、一過性及び／又は一時的である。いくつかの実施形態では、細胞表面サイトカイン／サイトカイン受容体の一過性／一時的発現は、レトロウイルス、センダイウイルス、アデノウイルス、エピソード、ミニサークル、又は m R N A を含む R N A が保有する発現構築物を介する。

【0173】

I L 2、I L 4、I L 6、I L 7、I L 9、I L 10、I L 11、I L 12、I L 15、I L 18 及び I L 21 を含むが、これらに限定されない、1つ、2つ、又はそれ以上のサイトカインのシグナル伝達のためのタンパク質複合体を細胞に導入するための様々な構築物設計が、本明細書で提供される。例えば、シグナル伝達複合体が I L 15 に対するものである実施形態では、膜貫通 (T M) ドメインは、I L 15 受容体に固有のものであることができ、又は任意の他の膜結合タンパク質の膜貫通ドメインで改変若しくは置換されてもよい。様々な実施形態では、サイトカインシグナル伝達複合体は、I L 15 の全長又は部分長、及び I L 15 受容体の全長又は部分長 (I L 15 receptor、I L 15 R) を含む I L 15 受容体融合体 (I L 15 receptor fusion、I L 15 R F) を含む。いくつかの実施形態では、I L 15 及び I L 15 R α は、I L 15 のトランス提示を模倣する自己切断ペプチドを使用して、I L 15 のシス提示を排除することなく共発現される。他の実施形態では、I L 15 R α はリンカーを介して C 末端で I L 15 に融合されており、I L 15 のシス提示を排除することなくトランス提示を模倣し、I L 15 が膜結合されることを確保する。他の実施形態では、短縮された細胞内ドメインを持つ I L 15 R α は、リンカーを介して C 末端で I L 15 に融合され、I L 15 のトランス提示を模倣し、I L 15 の膜結合を維持し、シス提示及び／又はその細胞内ドメインを介した正常 I L 15 R によって媒介される他の可能性のあるシグナル伝達経路を追加的に排除する。他の実施形態では、I L 15 R α は、国際公開第 2019/191495 号及び同第 2019/126748 号 (各々の開示全体が参照により本明細書に組み込まれる) に記載されるように、細胞内ドメインを含まない I L 15 (I L 15 Δ) に融合される。

【0174】

様々な実施形態では、このような短縮された構築物は、配列番号 18 に対して少なくとも 75%、80%、85%、90%、95%、又は 99% 同一のアミノ酸配列を含む。短縮された I L 15 / I L 15 R α の一実施形態では、構築物は、配列番号 18 の最後の 4

つのアミノ酸（K S R Q）を含まず、配列番号 19 に対して少なくとも 75 %、80 %、85 %、90 %、95 %又は 99 %同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、構築物は、配列番号 19 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、構築物は、配列番号 18 のアミノ酸配列を含む。

【0175】

配列番号 18

【0176】

【表 9】

MDWTWILFLVAAATR¹VHSGIHVFILGCF²SAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPS
CKVTAMKCFLLELQVISLES³GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVH
IVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRK
AGTSSLTECVLNKATNVAHWTT⁴PSLKCIRD⁵PALVHQRAPPSTVTTAGVTPQPE⁶SLSPSGKEPAASSPSSN
NTAATTAAIVPGSQLMPKSPSTGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAI
STSTVLLCGLSAVSL⁷LACYLKSRQ

10

（379 アミノ酸；シグナル及びリンカーペプチドに下線を付す）

配列番号 19

【0177】

【表 10】

MDWTWILFLVAAATR¹VHSGIHVFILGCF²SAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPS
CKVTAMKCFLLELQVISLES³GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVH
IVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRK
AGTSSLTECVLNKATNVAHWTT⁴PSLKCIRD⁵PALVHQRAPPSTVTTAGVTPQPE⁶SLSPSGKEPAASSPSSN
NTAATTAAIVPGSQLMPKSPSTGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAI
STSTVLLCGLSAVSL⁷LACYL

20

（375 アミノ酸；シグナル及びリンカーペプチドに下線を付す）

【0178】

更に他の実施形態では、IL15R α の細胞質ドメインは、IL15を備えたエフェクター細胞の自律的特質に悪影響を与えることなく省略することができる。他の実施形態では、IL15R α 全体が除去されるが、一端でIL15と融合し、他で膜貫通ドメインと融合し（mb-Sushi）、任意選択で、Sushiドメインと膜貫通ドメインとの間にリンカーがあるSushiドメインは例外である。融合したIL15/mb-Sushiは、膜結合タンパク質の膜貫通ドメインを介して細胞表面に発現する。IL15の望ましいトランス提示のみが保持されている場合、シス提示を含む、IL15R α を介した不要なシグナル伝達が排除される。いくつかの実施形態では、Sushiドメインと融合したIL15を含む成分は、配列番号 20 に対して少なくとも 75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、又は 99 %の同一性のアミノ酸配列を含む。

30

【0179】

配列番号 20

【0180】

【表 11】

MDWTWILFLVAAATR¹VHSGIHVFILGCF²SAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPS
CKVTAMKCFLLELQVISLES³GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVH
IVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRK
AGTSSLTECVLNKATNVAHWTT⁴PSLKCIR

40

（242 アミノ酸；シグナル及びリンカーペプチドに下線を付す）

【0181】

他の実施形態では、天然又は改変されたIL15R β は、リンカーを介してC末端でIL15に融合され、構成的シグナル伝達を可能にし、IL15膜結合及びトランス提示を維持する。他の実施形態では、天然又は改変された共通受容体 γ Cは、サイトカインの構成的シグナル伝達及び膜結合トランス提示のために、リンカーを介してC末端でIL15

50

に融合される。共通受容体 γC は、共通ガンマ鎖又は $CD132$ と呼ばれ、 $IL2$ 受容体サブユニットガンマ又は $IL2RG$ としても知られている。 γC は、 $IL2$ 、 $IL4$ 、 $IL7$ 、 $IL9$ 、 $IL15$ 及び $IL21$ 受容体を含むが、これらに限定されない、多くのインターロイキン受容体の受容体複合体に共通するサイトカイン受容体サブユニットである。他の実施形態では、 $IL15$ の不在下でホモ二量体を形成する操作された $IL15R\beta$ は、サイトカインの構成的シグナル伝達を生成するのに有用である。

【0182】

他の様々な実施形態では、サイトカインシグナル伝達複合体は、 $IL7$ の全長又は部分長、及び $IL7$ 受容体の全長又は部分長を含む $IL7$ 受容体融合体 ($IL7RF$) を含む。膜貫通 (TM) ドメインは、 $IL7$ 受容体に対して天然であり得るか、又は任意の他の膜結合タンパク質の膜貫通ドメインで改変若しくは置換されてもよい。いくつかの実施形態では、天然 (又は野生型) 又は改変 $IL7R$ は、リンカーを介して C 末端で $IL7$ に融合されてもよく、構成的シグナル伝達を可能にし、膜結合 $IL7$ を維持する。いくつかの実施形態では、そのような構築物は、配列番号 21 に対して少なくとも 75%、80%、85%、90%、95% 又は 99% 同一のアミノ酸配列を含み、膜貫通ドメイン、シグナルペプチド及びリンカーは柔軟であり、長さ及び／又は配列は様々である。いくつかの実施形態では、構築物は、配列番号 21 のアミノ酸配列を含む。

【0183】

配列番号 21

【0184】

【表 12】

MDWTWILELVAAATRVHSDCDIEGKDQYESVLMVSIQDLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHIC
DANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKS
LEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLOEIKTCWNKILMGTKEHSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSL
QESGYAQNGDLEDAELDDYSFSCYSQLEVNGSQHSLTCAFEDPDVNITNLEFEICGALVEVKCLN
FRKLQEIYFIETKKFLLIGKSNICVKVGEKSLTCKKIDLTITIVKPEAPFDLSVVYREGANDEFVVT
FNTSHLQKKYVKVLMHDVAYRQEKDENKWTHTVNLSSSTKLTLQKRLQPAAMYETKVRSDPDHYFK
GFWSEWSPSYFRTFEINNSSGEMDPILLTISILSFFSVALLVILACVLWKKRIKPIVWPSLPDH
KKTLEHLCKKPRKNLNVSNFNPESFLDCQIHRVDDIQARDEVEGFLQDTFPQOLEESEKQRLGGDV
QSPNCPSEDVWITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLDCRESGKNGPHVYQDLLLLSLG
TTNSTLPPPFSLQSGILTLNPFVAQGGPILTSLSGNSQEEAYVTMSSFYQNG

(シグナルペプチドー $IL7$ ーリンカーー $IL7R$; 膜貫通ドメイン (TM) 、シグナルペプチド及びリンカーは、長さ及び配列は様々であり得る)

【0185】

別の実施形態では、天然又は改変された共通受容体 γC は、構成的及び膜結合サイトカインシグナル伝達複合体のために、リンカーを介して C 末端で $IL7$ に融合される。更に、 $IL7$ の不在下でホモ二量体を形成する操作された $IL7R$ は、サイトカインの構成的シグナル伝達を生成するのに有用である。

【0186】

当業者は、上述のシグナルペプチド及びリンカー配列が例示であり、シグナルペプチド又はリンカーとしての使用に好適なそれらのバリエーションを決して限定しないことを理解するであろう。当業者には既知であり利用可能な多くの好適なシグナルペプチド又はリンカー配列が存在する。当業者は、シグナルペプチド及び／又はリンカー配列が、シグナルペプチドによって導かれるか、又はリンカーによって連結される機能性ペプチドの活性を変えることなく、別の配列で置換され得ることを理解する。

【0187】

CAR と外因性サイトカイン及び／又はサイトカイン受容体シグナル伝達 (表 1 におけるシグナル伝達複合体、又は「IL」) の両方を含む iPSC 及びそれからの派生細胞では、CAR と IL は別々の構築物で発現されてもよく、又は CAR と IL の両方を含むバ

イシストロン性構築物で共発現されてもよい。いくつかの更なる実施形態において、シグナル伝達複合体は、自己切断 2 A コード配列を介して CAR 発現構築物の 5' 末端又は 3' 末端のいずれかに連結され得る。したがって、IL シグナル伝達複合体（例えば、IL 7 シグナル伝達複合体）及び CAR は、単一のオープンリーディングフレーム（ORF）内にあってもよい。一実施形態では、シグナル伝達複合体は、CAR-2A-IL 又は IL-2A-CAR 構築物に含まれる。CAR-2A-IL 又は IL-2A-CAR が発現される場合、自己切断 2 A ペプチドは、発現された CAR 及び IL が解離することを可能にし、次いで、解離した IL は、膜貫通ドメインが細胞膜に固定された状態で細胞表面に提示され得る。CAR-2A-IL 又は IL-2A-CAR のバイシストロン性設計により、タイミングと数量の両方で、例えば、単一の ORF の発現のための誘導性プロモータ又は時間的若しくは空間的特異性を持つプロモータなどの、組み込むために選択され得る同一の制御メカニズムの下で、CAR と IL のシグナル伝達複合体の協調された発現を可能にする。自己切断ペプチドは、口蹄疫ウイルス（foot-and-mouth disease virus、FMDV）、ウマ鼻炎 A ウイルス（equine rhinitis A virus、ERAV）、Thosea asigna ウイルス（Thosea asigna virus、TaV）、及びブタテシオウイルス 1（porcine tescho virus-1、PTV-I）（Donnelly, ML, et al., J. Gen. Virol., 82, 1027-101 (2001); Ryan, MD, et al., J. Gen. Virol., 72, 2727-2732 (2001)）などのアフトウイルス属、並びにタイロウイルス（例えば、タイラマウス脳脊髄炎ウイルス）及び脳心筋炎ウイルスなどのカルジオウイルス属を含む、ピコルナウイルス科のメンバーで見出される。FMDV、ERAV、PTV-I、及び TaV に由来する 2 A ペプチドは、それぞれ「F2A」、「E2A」、「P2A」、及び「T2A」と呼ばれることもある。

10

20

30

40

50

【0188】

本明細書に開示されるバイシストロン性 CAR-2A-IL 又は IL-2A-CAR の実施形態は、本明細書において提供される任意の他のサイトカイン又はサイトカインシグナル伝達複合体、例えば IL 2、IL 4、IL 6、IL 9、IL 10、IL 11、IL 12、IL 18、及び IL 21 のうちの任意の 1 つ以上の発現も企図される。いくつかの実施形態では、バイシストロン性 CAR-2A-IL 又は IL-2A-CAR は、IL 2、IL 4、IL 7、IL 9、IL 15 及び IL 21 のうちの 1 つ以上の発現のためのものである。

【0189】

MICA/B-CAR、腫瘍 MICA/B ペプチドを標的とする外因性 TCR、抗 MICA/B 抗体と組み合わせた場合に ADC を媒介する外因性及び CD 16 若しくはそのバリエーション、又はそれらの組み合わせを介した MICA/B 腫瘍抗原標的化特異性を含む iPSC 及びその派生細胞のいくつかの実施形態では、細胞は、第 2 の CAR、CD 38 ノックアウト、並びに外因性サイトカイン及び／又はサイトカイン受容体シグナル伝達のうちの 1 つ以上を任意選択で含み、細胞は、表 1 に列挙される追加の属性のいずれか 1 つを更に含んでもよい。MICA/B 腫瘍抗原標的化特異性及び任意選択で MICA/B-CAR を含む iPSC 及びその派生細胞の特定の実施形態では、第 2 の CAR は、BCMA-CAR を含む。いくつかの実施形態では、表 1 の遺伝子型のうちのいずれか 1 つを含む iPSC 及びその派生エフェクター細胞は、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、RFX5、RFXAP、RAG1、及び染色体 6 p 21 領域内の任意の遺伝子のうちの少なくとも 1 つの破壊、又は HLA-E、4-1BBL、CD4、CD8、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、A2AR、TCR、Fc 受容体、抗体、及び二重特異性、多重特異性、若しくはユニバーサルエンゲージャとカップリングするための表面トリガー受容体のうちの少なくとも 1 つの導入、を更に含み得る。

【0190】

したがって、様々な実施形態では、サイトカイン IL 15 若しくは IL 7 及び／又はそ

これらの受容体は、上記の構築物設計のうちの1つ以上を使用してiPSCに導入されてもよく、iPSC分化時にこれらの派生細胞に導入されてもよい。加えて、本明細書に記載されるMICA/B腫瘍抗原標的化特異性及び本明細書に提供される少なくとも1つの表現型（第2のCAR、外因性CD16若しくはそのバリエーション、CD38ノックアウト、サイトカインシグナル伝達複合体（IL）及び／又は本明細書に開示される1つ以上の操作されたモダリティを含むがこれらに限定されない）をコードするポリヌクレオチドを含む人工多能性細胞（iPSC）、クローンiPSC、クローンiPSC細胞株又はiPSC由来細胞が本明細書に提供され、サイトカインシグナル伝達複合体は、本節に記載される細胞表面に発現された外因性サイトカイン及び／又はその受容体の部分的な又は完全なペプチドを含み、細胞バンクは、更なるiPSC操作のためのプラットフォーム並びに組成が明確かつ均一であり、費用対効果の高い方法で有意な規模で大量生産することができる既製の操作された均質な細胞療法製品を製造するための再生可能な供給源を提供する。

10

【0191】

5. HLA-I及びHLA-IIの欠損

同種拒絶の問題を回避するために、複数のHLAクラスI及びクラスIIタンパク質は、同種異系レシピエントの組織適合性のために一致している必要がある。本明細書で提供されるのは、HLAクラスI及びHLAクラスIIタンパク質の両方の発現が排除又は実質的に減少したiPSC細胞株及びそれから分化したその派生細胞である。HLAクラスI欠損は、HLAクラスI遺伝子座（染色体6p21）の任意の領域の機能的欠失、又はベータ2ミクログロブリン（beta-2 microglobulin、B2M）遺伝子、TAP1遺伝子、TAP2遺伝子、及びタプシンを含むが、これらに限定されない、HLAクラスI関連遺伝子の欠失若しくは破壊によって達成することができる。例えば、B2M遺伝子は、全てのHLAクラスIヘテロ二量体の細胞表面発現に不可欠な共通のサブユニットをコードする。B2M陰性細胞はHLA-I欠損である。HLAクラスII欠損は、RFXANK、CIITA、RFX5、及びRFXAPを含むがこれらに限定されない、HLA-II関連遺伝子の機能的欠失又は破壊によって達成できる。CIITAは転写コアクチベータであり、クラスIIタンパク質の発現に必要な転写因子RFX5の活性化を通じて機能する。CIITA陰性細胞はHLA-II欠損である。本明細書で提供されるのは、HLA-IとHLA-II両方の欠損を持つ、例えばB2MとCIITA両方の発現がないiPSC株及びその派生細胞であり、取得された派生エフェクター細胞は、MHC（主要組織適合性複合体）マッチングの必要性を排除して宿主の（同種異系）T細胞による認識と殺傷を回避することによって、同種異系細胞治療を可能にする。

20

30

【0192】

更に、HLAクラスI発現の欠如が、宿主NK細胞による溶解を引き起こす。したがって、活性化されたCD38発現宿主NK細胞を除去するためのCD38コンディショニングの上述のアプローチに加えて、この「自己喪失」応答を克服するために、HLA-E、HLA-G又は他の非古典的HLA-Iタンパク質を任意選択でノックインして、NK細胞認識及び操作されたiPSC由来のHLA-I欠損エフェクター細胞の死滅を回避することができる。一実施形態では、提供されるHLA-I欠損iPSC及びその派生細胞は、HLA-Gノックインを更に含む。

40

【0193】

代替的に、一実施形態では、提供されるHLA-I欠損iPSC及びその派生細胞は、CD58ノックアウト及びCD54ノックアウトの一方又は両方を更に含む。CD58（又はLFA-3）及びCD54（又はICAM-1）は、シグナル依存性細胞相互作用を開始し、免疫細胞を含む、細胞の遊走を促進する接着タンパク質である。CD58及び／又はCD54破壊が、同種異系NK細胞殺傷に対するHLA-I欠損iPSC由来エフェクター細胞の感受性を効果的に低下させることが以前に示された。CD58ノックアウトは、CD54ノックアウトよりも同種異系NK細胞活性化の低減においてより高い効率をもたらす。CD58及びCD54の両方の二重ノックアウトは、NK細胞活性化の最も増強された低減をもたらすことが示された。いくつかの観察において、CD58及びCD5

50

4 二重ノックアウトは、「自己喪失」効果を克服することにおいて、HLA-I 欠損細胞に対するHLA-G 過剰発現よりも更に効果的である。

【0194】

本明細書で提供されるように、いくつかの実施形態では、iPSC 及びその派生細胞は、MICA/B-CAR、腫瘍MICA/B ペプチドを標的とする外因性TCR、及び記載されるような抗MICA/B 抗体と組み合わせた場合にADCC を媒介する外因性CD16 又はそのバリエーションのうちの1つ以上を介した少なくともMICA/B 腫瘍抗原標的化特異性を含み、細胞は、HLA-I 及び／又はHLA-II 欠損である。いくつかの実施形態では、当該HLA-I 及び／又はHLA-II 欠損 iPSC 並びにその派生細胞は、CD58 陰性である。いくつかの他の実施形態では、HLA-I 及びHLA-II 欠損 iPSC 並びにその派生細胞は、CD54 陰性である。更にいくつかの他の実施形態では、当該HLA-I 及び／又はHLA-II 欠損 iPSC 並びにその派生細胞は、CD54 陰性及びCD58 陰性である。更に、MICA/B 腫瘍抗原標的化特異性及び任意選択でMICA/B-CAR 及び／又は腫瘍MICA/B ペプチドを標的とする外因性TCR 及び／又は抗MICA/B 抗体と組み合わせた場合にADCC を媒介する外因性CD16 若しくはそのバリエーションを含む iPSC 及びその派生細胞のいくつかの実施形態では、細胞は、HLA-I 及び／又はHLA-II 欠損であり、HLA-G をコードする外因性ポリヌクレオチドを有する。記載されるようなMICA/B 腫瘍抗原標的化特異性を含む iPSC 及びその派生細胞のいくつかの実施形態では、細胞は、HLA-I 及び／又はHLA-II 欠損であり、CD58 陰性である。記載されるようなMICA/B 腫瘍抗原標的化特異性を含む iPSC 及びその派生細胞のいくつかの実施形態では、細胞は、HLA-I 及び／又はHLA-II 欠損であり、CD54 陰性である。記載されるようなMICA/B 腫瘍抗原標的化特異性を含む iPSC 及びその派生細胞の更にいくつかの他の実施形態では、細胞は、HLA-I 及び／又はHLA-II 欠損であり、CD58 陰性及びCD54 陰性の両方である。

10

20

【0195】

いくつかの実施形態では、活性化されたレシピエント免疫細胞において上方制御された表面タンパク質を標的とする不活性化CAR を発現させることによって、HLA-I 及び／又はHLA-II の欠損のための操作をバイパスするか又はインタクトなままにして、同種拒絶反応を回避することができる。いくつかの実施形態では、活性化されたレシピエント免疫細胞において上方制御される表面タンパク質には、CD38、CD25、CD69、CD44、4-1BB、OX40、又はCD40L が含まれるが、これらに限定されない。細胞がそのような不活性化CAR を発現する場合、細胞は、CAR によって標的化される同じ表面タンパク質を発現しないか、又はそのノックアウトを有することが好ましい。いくつかの実施形態では、不活性化CAR は、CD38-CAR、CD25-CAR、CD69-CAR、CD44-CAR、4-1BB-CAR、OX40-CAR、及びCD40L-CAR のうちの少なくとも1つを含む。

30

【0196】

本出願において更に提供されるのは、HLA 修飾（HLA-E 又はHLA-G ノックインを伴う若しくは伴わない、又はCD58 及びCD54 の一方若しくは両方のノックアウトを伴うHLA-I 及び／又はHLA-II 欠損）を含むがこれらに限定されない、本明細書において提供されるような少なくとも1つの表現型を有する、ソーティングされた単一細胞及び増殖されたクローン操作 iPSC を含むマスター細胞バンクであり、この細胞バンクは、更なる iPSC 操作のためのプラットフォームと、組成が明確かつ均一であり、費用効果の高い様式でかなりの規模で大量生産することができる、派生NK 及びT 細胞を含むがこれらに限定されない、既製の操作された均質な細胞療法製品を製造するための再生可能な供給源を提供する。

40

【0197】

6. 本明細書で提供される遺伝子操作された iPSC 株及び派生細胞

上記を考慮して、本出願は、免疫細胞、iPSC、iPS 細胞株細胞、又はそれらの集

50

団、及び i P S C を分化させることから得られる派生機能性細胞であって、各細胞は M I C A / B 腫瘍抗原標的化特異性をコードするポリヌクレオチドを含み、細胞は、M I C A / B - C A R (キメラ抗原受容体)、抗 M I C A / B 抗体と組み合わせた場合に A D C C を媒介する C D 1 6 若しくはそのバリエーション、M I C A / B 腫瘍抗原を標的とする外因性 T C R、又はそれらの任意の組み合わせをコードする 1 つ以上のポリヌクレオチドを含み、細胞は、本出願に記載される 1 つ以上の更なる遺伝子改変を更に含んでもよく、細胞は、真核細胞、動物細胞、ヒト細胞、人工多能性細胞 (i P S C)、i P S C 由来エフェクター細胞、免疫細胞、又はフィーダー細胞である、免疫細胞、i P S C、i P S 細胞株細胞、又はそれらの集団、及び i P S C を分化させることから得られる派生機能性細胞を提供する。

10

【0198】

派生エフェクター細胞のいくつかの実施形態では、i P S C 及びそれらの派生細胞は、C A R (例えば、M I C A / B - C A R) をコードするポリヌクレオチドを含み、C A R は、T C R 定常領域 (T R A C 又は T R B C) に挿入され、T C R ノックアウトをもたらす、任意選択で、C A R 発現を内因性 T C R プロモータの制御下に置く。T C R α 又は T C R β の定常領域 (T R A C 又は T R B C) の破壊は、T C R n e g 細胞を産生する。加えて、T C R の発現は、i P S C から分化した N K 系統エフェクター細胞においても陰性である。T C R n e g 細胞は、H L A 適合を必要とせず、同種異系養子細胞療法において使用される場合、低下したアロ反応性が有し、G v H D (移植片対宿主病) を予防することができる。C A R の追加の挿入部位には、A A V S 1、C C R 5、R O S A 2 6、コラーゲン、H T R P、H 1 1、G A P D H、R U N X 1、B 2 M、T A P 1、T A P 2、タパシン、N L R C 5、C I I T A、R F X A N K、R F X 5、R F X A P、N K G 2 A、N K G 2 D、C D 2 5、C D 3 8、C D 4 4、C D 5 8、C D 5 4、C D 5 6、C D 6 9、C D 7 1、C I S、C B L - B、S O C S 2、P D 1、C T L A 4、L A G 3、T I M 3、及び T I G I T が含まれるが、これらに限定されない。別の実施形態では、本明細書に記載されるエフェクター細胞、i P S C 及びその派生細胞 (例えば、派生 N K 細胞) は C A R をコードするポリヌクレオチドを含み、C A R を N K G 2 A 遺伝子座又は N K G 2 D 遺伝子座に挿入する場合、N K G 2 A 又は N K G 2 D ノックアウトをもたらす、それにより、C A R 発現を内因性 N K G 2 A 又は N K G 2 D プロモータの制御下に置く。したがって、別の実施形態では、上記の M I C A / B 腫瘍抗原標的化特異性を含む細胞は、T C R n e g 及び / 又は本出願に記載の 1 つ以上の追加の遺伝子改変を更に含む。

20

30

【0199】

いくつかの実施形態では、機能的派生細胞は造血細胞であり、決定的な造血内皮 (H E) の可能性を有する中胚葉細胞、決定的な H E、C D 3 4 + 造血細胞、造血幹細胞及び前駆細胞、造血多能性前駆細胞 (M P P)、T 細胞前駆細胞、N K 細胞前駆細胞、骨髄細胞、好中球前駆細胞、T 系統細胞、N K T 系統細胞、N K 系統細胞、B 系統細胞、好中球、樹状細胞、及びマクロファージを含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、機能的派生造血細胞は、対応する初代 T、N K、N K T、及び / 又は B 細胞には存在しない 1 つ以上の機能的特質を有するエフェクター細胞を含む。

【0200】

M I C A / B 腫瘍抗原標的化特異性をコードするポリヌクレオチドを含む、免疫細胞、i P S C、i P S 細胞株細胞、又はそれらの集団、及び誘導された機能的派生細胞であって、各細胞は、M I C A / B - C A R (キメラ抗原受容体)、抗 M I C A / B 抗体と組み合わせた場合に A D C C を媒介する C D 1 6 若しくはそのバリエーション、M I C A / B 腫瘍抗原を標的とする外因性 T C R、又はそれらの任意の組み合わせをコードする 1 つ以上のポリヌクレオチドを含み、C D 3 8 抗体を使用して C D 1 6 媒介性の増強された A D C C を誘導する場合、i P S C 及び / 又は C D 3 8 ノックアウト、M I C A / B - C A R 及び外因性 C D 1 6 を含むその派生エフェクター細胞又はそれらのバリエーションは、エフェクター細胞の排除、すなわち C D 3 8 を発現するエフェクター細胞の低下又は枯渇を引き起こすことなく C D 3 8 を発現する (腫瘍) 細胞を標的とすることができ、それにより i P S

40

50

C及びそのエフェクター細胞の持続性及び／又は生存率を増加させるように、細胞は、TCR^{neg}及びCD38陰性でもある、免疫細胞、iPSC、iPSC細胞株細胞、又はそれらの集団、及び誘導された機能的派生細胞も本明細書において提供される。いくつかの実施形態では、当該エフェクター細胞は、T系統細胞を含む。いくつかの実施形態では、当該エフェクター細胞は、NK系統細胞を含む。各細胞が本明細書に記載のMICA/B腫瘍抗原標的化特異性をコードするポリヌクレオチドを含む、本明細書に記載の免疫細胞、iPSC、iPSC細胞株細胞又はその集団、及びiPSCを分化させることから得られる派生機能的細胞は、任意選択で、TCR^{neg}、CD38陰性、エンゲージャ、チェックポイント阻害剤、抗体及び／又は本出願において提供される他の属性のうちの1つ以上を含む。

10

【0201】

本明細書に記載されるMICA/B腫瘍抗原標的化特異性をコードするポリヌクレオチドを含むiPSCであって、細胞が、MICA/B、TCR^{neg}、CD38陰性、エンゲージャ、チェックポイント阻害剤、抗体及び／又は本出願において提供される他の属性以外の標的特異性を有する第2のキメラ抗原受容体(CAR)をコードするポリヌクレオチドのうちの1つ以上を更に含み、2つの異なる腫瘍抗原を標的とする2つのCARを有する機能的派生エフェクター細胞を産生するように指示された分化をすることができるiPSCも提供される。様々な実施形態では、iPSC及びその派生エフェクター細胞に含まれる第2のCARは、腫瘍細胞表面タンパク質CD19、BCMA、CD20、CD22、CD38、CD123、HER2、CD52、EGFR、GD2、MSLN、VEGF-R2、PSMA及び／又はPDL1を標的とする。一実施形態では、iPSC及びその派生エフェクター細胞に含まれる第2のCARは、BCMA-CARである。一実施形態では、iPSC及び／又はそれらの派生エフェクター細胞は、CD38を標的とする第2のCARを有し、細胞もまたCD38陰性である。したがって、CD38-CARは、CD38媒介性フラトリサイドによるiPSC及び／又はそれらの派生エフェクター細胞の排除をもたらさない。いくつかの実施形態では、CD38ノックアウトを含むiPSC及びその派生エフェクター細胞に含まれるCARは、CD38を標的化しない。

20

【0202】

本明細書に記載されるMICA/B腫瘍抗原標的化特異性をコードするポリヌクレオチドを含むiPSCであって、細胞は、少なくとも1つの外因性サイトカインシグナル伝達複合体(IL)、TCR^{neg}、CD38陰性、第2のCAR、エンゲージャ、チェックポイント阻害剤、抗体及び／又は本出願において提供される他の属性をコードするポリヌクレオチドの1つ以上を更に含み、ILは、細胞の生存律、持続性及び／又は増殖に寄与するサイトカインシグナル伝達を可能にし、iPSC株は、改善された生存率、持続性、増殖及びエフェクター細胞機能を有する機能的派生造血細胞を産生するように指示された分化をすることができる、iPSCが更に提供される。様々な実施形態では、外因的に導入されたサイトカインシグナル伝達は、IL2、IL4、IL6、IL7、IL9、IL10、IL11、IL12、IL15、IL18、及びIL21のいずれか1つ、2つ、又はそれより多くのシグナル伝達を含む。いくつかの実施形態では、導入されるサイトカインシグナル伝達複合体は、細胞におけるIL15シグナル伝達のためのものであり、細胞は、任意選択で、NK系統細胞である。いくつかの他の具体的な実施形態では、導入されるサイトカインシグナル伝達複合体は、細胞におけるIL7シグナル伝達のためのものであり、細胞は、任意選択で、T系統細胞である。いくつかの実施形態では、サイトカイン及び／又はそのそれぞれの受容体の部分的な又は完全なペプチドを含む導入されたサイトカインシグナル伝達複合体は、細胞表面上で発現される。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達は構成的に活性化される。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達の活性化は誘導可能である。いくつかの実施形態では、サイトカインシグナル伝達の活性化は、一過性及び／又は一時的である。いくつかの実施形態では、細胞表面サイトカイン/サイトカイン受容体の一過性/一時的発現は、レトロウイルス、センダイウイルス、アデノウイルス、エピソーム、ミニサークル、又はmRNAを含むRNAを

30

40

50

介する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるMICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含むiPSC又はその派生細胞に含まれるサイトカインシグナル伝達複合体は、IL7シグナル伝達を可能にする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるMICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含むiPSC又はその派生細胞に含まれるサイトカインシグナル伝達複合体は、IL10シグナル伝達を可能にする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるiPSC MICA/B腫瘍抗原標的化特異性又はその派生細胞に含まれるサイトカインシグナル伝達複合体は、IL15シグナル伝達を可能にする。上記実施形態のMICA/B腫瘍抗原標的化特異性及びILを含むiPSC及びその派生細胞は、インビトロ又はインビボで、追加的に供給される可溶性サイトカインと接触することなく自律的に細胞増殖(growth)、増殖(proliferation)、増殖(expansion)及び/又はエフェクター機能を維持又は改善することができるのみならず、腫瘍部位でのホーミング、輸送及び保持を増強することができ、腫瘍部位において、腫瘍細胞は、腫瘍関連タンパク質を過剰発現し、一次起源の免疫細胞又はクローンiPSCの合理的設計及び精密操作を通じてエフェクター細胞に提供される機能的特徴と相乗作用するように感作されることができる。例えば、ホーミング関連ケモカイン受容体を過剰発現するエフェクター細胞は、改善された細胞輸送を有し、これは、腫瘍によって発現される適合するケモカインが、腫瘍細胞前処理を介して腫瘍感作組成物によって上方制御される場合に、更に増強され得る。したがって、様々な実施形態では、エフェクター細胞又はiPSCは、本明細書で企図及び記載される編集の中でもとりわけ、外因性CXCR2又はそのバリエーションを更に含むように遺伝子操作される。このような編集に有用なヒトCXCR2のアミノ酸配列の非限定的な例は、UniProtKB番号P25025として登録されているものである。いくつかの実施形態では、CXCR2のバリエーションは、UniProtKB番号：Q6LCZ7、C9JW47、C9JG19、C9J1J7、及びC9J2F9として登録されているものなどのCXCR2アイソフォームを含む。

10

20

【0203】

本明細書に記載されるMICA/B腫瘍抗原標的化特異性をコードするポリヌクレオチドを含むiPSCであって、細胞が、HLA-I及び/又はHLA-II欠損(例えば、B2Mノックアウト及び/又はCIITAノックアウト)、TCR^{neg}、CD38陰性、第2のCAR、IL、エンゲージャ、チェックポイント阻害剤、抗体及び/又は本出願において提供される他の属性のうちの1つ以上を含み、更に任意選択で、HLA-G過剰発現、CD58ノックアウト及びCD54ノックアウトのうちの1つを更に含み、機能的派生造血細胞を産生するように指示された分化をすることができるiPSCも提供される。更なる実施形態では、本明細書に記載のMICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含むHLA-I及び/又はHLA-II欠損iPSC並びにその派生エフェクター細胞は、CD38陰性でもあり、エフェクター細胞排除を引き起こすことなくADCCを誘導するために抗CD38抗体とともに使用することができ、それによって、iPSC及びそのエフェクター細胞の持続性及び/又は生存率を増加させる。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞は、増加したインビボでの持続性及び/又は生存率を有する。

30

【0204】

したがって、本出願は、表1の以下の遺伝子型のいずれか1つを含むiPSC及びそれらの機能的派生造血細胞を提供する。本出願の表1に提供される「CAR(第2)」は、MICA/B-CARとは異なる標的化特異性を有するCARを表し、その非限定的な例としては、CD19、BCMA、CD20、CD22、CD123、HER2、CD52、EGFR、GD2、MSLN、VEGFR2、PSMA及びPDL1のうちの少なくとも1つを標的とするCARが挙げられる。特定の実施形態では、CAR(第2の)は、BCMAに対する標的化特異性を有する。表1に提供されるように、「IL」は、どの特定のサイトカイン/受容体発現が選択されるかに応じて、IL2、IL4、IL6、IL7、IL9、IL10、IL11、IL12、IL15、IL18、及びIL21のうちの任意の1つ以上のシグナル伝達を与えるサイトカインシグナル伝達複合体を表す。更に、「IL」はまた、IL15Δ実施形態を包含し、これは、IL15及びIL15Rαの

40

50

短縮型融合タンパク質として上に詳述されるが、細胞内ドメインを含まない。更に、i P S Cとその機能的派生造血細胞がC A R（M I C A／B－C A R及び／又は第2のC A R）とI Lの両方を含む遺伝子型を有する場合、C A RとI Lは2 A配列を含むバイシストロン性発現カセットに含まれてもよい。対照的に、いくつかの他の実施形態では、C A R及びI Lは、i P S C及びそれらの機能的派生造血細胞に含まれる別々の発現カセット中にある。特定の一実施形態では、C A RとI Lの両方を発現するi P S C及びその機能的派生エフェクター細胞に含まれるのは、I L 1 5であり、I L 1 5構築物は、C A Rとともに、又はC A Rとは別に発現カセットに含まれる。

【0205】
【表13-1】

表1：提供される細胞の該当する例示的な遺伝子型：

MICA/B-CAR又はMICA/B-TCR	CD38 ^{hi}	CD16 ^{hi}	CAR ^(第2)	I L	B2M ^{hi} CIITA ^{hi}	HLA-G又は(CD54 ^{hi} 又はなしのCD58 ^{hi})	遺伝子型
✓							1. MICA/B-CAR
✓	✓						2. MICA/B-TCR
✓							3. MICA/B-CAR CD38 ^{hi}
✓		✓					4. MICA/B-TCR CD38 ^{hi}
✓							5. MICA/B-CAR CD16 ^{hi}
✓			✓				6. MICA/B-TCR CD16 ^{hi}
✓				✓			7. MICA/B-CAR CAR ^(第2)
✓							8. MICA/B-TCR CAR ^(第2)
✓							9. MICA/B-CAR I L
✓							10. MICA/B-TCR I L
✓				✓			11. MICA/B-CAR B2M ^{hi} CIITA ^{hi}
✓							12. MICA/B-TCR B2M ^{hi} CIITA ^{hi}
✓				✓		✓	13. MICA/B-CAR B2M ^{hi} CIITA ^{hi} CD58 ^{hi}
							14. MICA/B-TCR B2M ^{hi} CIITA ^{hi} CD58 ^{hi}
							15. MICA/B-CAR B2M ^{hi} CIITA ^{hi} CD54 ^{hi}
							16. MICA/B-TCR B2M ^{hi} CIITA ^{hi} CD54 ^{hi}
							17. MICA/B-CAR B2M ^{hi} CIITA ^{hi} CD58 ^{hi} CD54 ^{hi}
							18. MICA/B-TCR B2M ^{hi} CIITA ^{hi} CD58 ^{hi} CD54 ^{hi}
							19. MICA/B-CAR B2M ^{hi} CIITA ^{hi} HLA-G
							20. MICA/B-TCR B2M ^{hi} CIITA ^{hi} HLA-G
✓	✓	✓					21. MICA/B-CAR CD38 ^{hi} CD16 ^{hi}
							22. MICA/B-TCR CD38 ^{hi} CD16 ^{hi}
✓	✓		✓				23. MICA/B-CAR CD38 ^{hi} CAR ^(第2)
✓	✓			✓			24. MICA/B-TCR CD38 ^{hi} CAR ^(第2)
							25. MICA/B-CAR CD38 ^{hi} I L
							26. MICA/B-TCR CD38 ^{hi} I L
✓	✓				✓		27. MICA/B-CAR CD38 ^{hi} B2M ^{hi} CIITA ^{hi}
							28. MICA/B-TCR CD38 ^{hi} B2M ^{hi} CIITA ^{hi}

10
20
30
40
50

【 0 2 0 6 】
【 表 1 3 - 2 】

(表 1 の続き)

MICA/B-CAR又はMICA/B-TCR		CD38 ^{-/-}	CD16 ^{exo}	CAR ^(第2)	IL	B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-}	HLA-G又は 54 ^{-/-} 又は LのCD58 ^{-/-}	遺伝子型
✓	✓	✓				✓	✓	29. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} 30. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD54 ^{-/-} 31. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} CD54 ^{-/-} 32. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} HLA-G 33. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} 34. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD54 ^{-/-} 35. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} CD54 ^{-/-} 36. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} HLA-G
✓			✓	✓				37. MICA/B-CAR CD16 ^{exo} CAR ^(第2) 38. MICA/B-TCR CD16 ^{exo} CAR ^(第2)
✓			✓		✓			39. MICA/B-CAR CD16 ^{exo} IL 40. MICA/B-TCR CD16 ^{exo} IL
✓			✓			✓		41. MICA/B-CAR CD16 ^{exo} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} 42. MICA/B-TCR CD16 ^{exo} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-}
✓			✓			✓	✓	43. MICA/B-CAR CD16 ^{exo} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} 44. MICA/B-CAR CD16 ^{exo} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD54 ^{-/-} 45. MICA/B-CAR CD16 ^{exo} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} CD54 ^{-/-} 46. MICA/B-CAR CD16 ^{exo} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} HLA-G 47. MICA/B-TCR CD16 ^{exo} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} 48. MICA/B-TCR CD16 ^{exo} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD54 ^{-/-} 49. MICA/B-TCR CD16 ^{exo} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} CD54 ^{-/-} 50. MICA/B-TCR CD16 ^{exo} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} HLA-G
✓				✓	✓			51. MICA/B-CAR CAR ^(第2) IL 52. MICA/B-TCR CAR ^(第2) IL
✓				✓		✓		53. MICA/B-CAR CAR ^(第2) B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} 54. MICA/B-TCR CAR ^(第2) B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-}
✓				✓		✓	✓	55. MICA/B-CAR CAR ^(第2) B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} 56. MICA/B-CAR CAR ^(第2) B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD54 ^{-/-} 57. MICA/B-CAR CAR ^(第2) B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} CD54 ^{-/-} 58. MICA/B-CAR CAR ^(第2) B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} HLA-G 59. MICA/B-TCR CAR ^(第2) B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} 60. MICA/B-TCR CAR ^(第2) B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD54 ^{-/-} 61. MICA/B-TCR CAR ^(第2) B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} CD54 ^{-/-} 62. MICA/B-TCR CAR ^(第2) B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} HLA-G

【 0 2 0 7 】

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 3】

(表 1 の続き)

MICA/B-CAR又はMIC A/B-TCR	CD38	CD16 ^{exo}	CAR ^(第2)	IL	B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-}	HLA-G又は(CD54 ^{-/-} あり又はなしのCD58 ^{-/-})	遺伝子型
✓				✓	✓		63. MICA/B-CAR IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} 64. MICA/B-TCR IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-}
✓				✓	✓	✓	65. MICA/B-CAR IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} 66. MICA/B-CAR IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD54 ^{-/-} 67. MICA/B-CAR IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} CD54 ^{-/-} 68. MICA/B-CAR IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} HLA-G 69. MICA/B-TCR IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} 70. MICA/B-TCR IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD54 ^{-/-} 71. MICA/B-TCR IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} CD54 ^{-/-} 72. MICA/B-TCR IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} HLA-G
✓	✓	✓	✓				73. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} CAR ^(第2) 74. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} CAR ^(第2)
✓	✓	✓		✓			75. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} IL 76. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} IL
✓	✓	✓			✓		77. MICA/B-CAR CD16 ^{exo} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} 78. MICA/B-TCR CD16 ^{exo} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-}
✓	✓	✓			✓	✓	79. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} 80. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD54 ^{-/-} 81. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} CD54 ^{-/-}
							82. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} HLA-G 83. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} 84. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD54 ^{-/-} 85. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} CD54 ^{-/-}
✓	✓		✓	✓			86. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} HLA-G 87. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} CAR ^(第2) IL 88. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} CAR ^(第2) IL
✓	✓		✓		✓		89. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} CAR ^(第2) IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} 90. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} CAR ^(第2) IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-}

【 0 2 0 8 】

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 4】

(表 1 の続き)

MICA/B-CAR又はMICA/B-TCR		CD38 ^{-/-}	CD16 ^{ex}	CAR ^(第2)	IL	B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-}	HLA-G又は 54 ^{-/-} 又はなし のCD58 ^{-/-}	遺伝子型
✓	✓	✓		✓		✓	✓	91. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} CAR ^(第2) IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} 92. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} CAR ^(第2) IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD54 ^{-/-} 93. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} CAR ^(第2) IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} C D54 ^{-/-} 94. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} CAR ^(第2) IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} HLA-G 95. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} CAR ^(第2) IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} 96. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} CAR ^(第2) IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD54 ^{-/-} 97. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} CAR ^(第2) IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} C D54 ^{-/-} 98. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} CAR ^(第2) IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} HLA-G 99. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} 100. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} 101. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} 102. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD54 ^{-/-} 103. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} CD54 ^{-/-} 104. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} HLA-G 105. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} 106. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD54 ^{-/-} 107. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} CD54 ^{-/-} 108. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} HLA-G 109. MICA/B-CAR CD16 ^{ex} CAR ^(第2) IL 110. MICA/B-TCR CD16 ^{ex} CAR ^(第2) IL 111. MICA/B-CAR CD16 ^{ex} CAR ^(第2) B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} 112. MICA/B-TCR CD16 ^{ex} CAR ^(第2) B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-}

【0 2 0 9】

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 5】

(表 1 の続き)					遺伝子型	
MICA/B-CAR又はMICA/B-TCR	CD38 ^{+/+}	CD16 ^{exo}	CAR ^(第2)	IL	B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+}	HLA-G又はHLA-54 ^{+/+} 又はなしのCD58 ^{+/+}
✓		✓	✓		✓	✓
						113. MICA/B-CAR CD16 ^{exo} CAR ^(第2) B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} CD58 ^{+/+} 114. MICA/B-CAR CD16 ^{exo} CAR ^(第2) B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} CD54 ^{+/+} 115. MICA/B-CAR CD16 ^{exo} CAR ^(第2) B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} CD58 ^{+/+} CD54 ^{+/+} 116. MICA/B-CAR CD16 ^{exo} CAR ^(第2) B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} HLA-G 117. MICA/B-TCR CD16 ^{exo} CAR ^(第2) B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} CD58 ^{+/+} 118. MICA/B-TCR CD16 ^{exo} CAR ^(第2) B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} CD54 ^{+/+} 119. MICA/B-TCR CD16 ^{exo} CAR ^(第2) B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} CD58 ^{+/+} CD54 ^{+/+} 120. MICA/B-TCR CD16 ^{exo} CAR ^(第2) B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} HLA-G 121. MICA/B-CAR CD16 ^{exo} IL B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} 122. MICA/B-TCR CD16 ^{exo} IL B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} 123. MICA/B-CAR CD16 ^{exo} IL B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} CD58 ^{+/+} 124. MICA/B-CAR CD16 ^{exo} IL B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} CD54 ^{+/+} 125. MICA/B-CAR CD16 ^{exo} IL B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} CD58 ^{+/+} CD54 ^{+/+} 126. MICA/B-CAR CD16 ^{exo} IL B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} HLA-G 127. MICA/B-TCR CD16 ^{exo} IL B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} CD58 ^{+/+} 128. MICA/B-TCR CD16 ^{exo} IL B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} CD54 ^{+/+} 129. MICA/B-TCR CD16 ^{exo} IL B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} CD58 ^{+/+} CD54 ^{+/+} 130. MICA/B-TCR CD16 ^{exo} IL B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} HLA-G 131. MICA/B-CAR CAR ^(第2) CD16 ^{exo} IL B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} 132. MICA/B-TCR CAR ^(第2) CD16 ^{exo} IL B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} 133. MICA/B-CAR CAR ^(第2) CD16 ^{exo} IL B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} CD58 ^{+/+} 134. MICA/B-CAR CAR ^(第2) CD16 ^{exo} IL B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} CD54 ^{+/+} 135. MICA/B-CAR CAR ^(第2) CD16 ^{exo} IL B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} CD58 ^{+/+} CD54 ^{+/+} 136. MICA/B-CAR CAR ^(第2) CD16 ^{exo} IL B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} HLA-G 137. MICA/B-TCR CAR ^(第2) CD16 ^{exo} IL B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} CD58 ^{+/+} 138. MICA/B-TCR CAR ^(第2) CD16 ^{exo} IL B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} CD54 ^{+/+} 139. MICA/B-TCR CAR ^(第2) CD16 ^{exo} IL B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} CD58 ^{+/+} CD54 ^{+/+} 140. MICA/B-TCR CAR ^(第2) CD16 ^{exo} IL B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} HLA-G 141. MICA/B-CAR CD38 ^{+/+} CD16 ^{exo} CAR ^(第2) IL 142. MICA/B-TCR CD38 ^{+/+} CD16 ^{exo} CAR ^(第2) IL

【 0 2 1 0 】

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 6】

(表 1 の続き)		遺伝子型				
MICA/B-CAR又はMIC A/B-TCR	CD38 ^{-/-}	CD16 ^{exo}	CAR ^(第2)	IL	B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-}	HLA-G又は(CD54 ^{-/-} あり又はなし)のCD58 ^{-/-}
✓	✓	✓	✓		✓	143. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} CAR ^(第2) B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} 144. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} CAR ^(第2) B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} 145. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} CAR ^(第2) B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} 146. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} CAR ^(第2) B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD54 ^{-/-} 147. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} CAR ^(第2) B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} CD54 ^{-/-} 148. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} CAR ^(第2) B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} HLA-G 149. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} CAR ^(第2) B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} 150. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} CAR ^(第2) B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD54 ^{-/-} 151. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} CAR ^(第2) B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} CD54 ^{-/-} 152. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} CAR ^(第2) B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} HLA-G 153. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} 154. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} 155. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} 156. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD54 ^{-/-} 157. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} CD54 ^{-/-} 158. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} HLA-G 159. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} 160. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD54 ^{-/-} 161. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} CD54 ^{-/-} 162. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} HLA-G 163. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} 164. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exo} IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-}

【 0 2 1 1 】

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 7】

(表 1 の続き)					遺伝子型	
MICA/B-CAR又はMICA/B-TCR	CD38 ^{-/-}	CD16 ^{exx}	CAR ^(第2)	CIITA ^{-/-}	HLA-G又は(54 ^{-/-} あり又はなし)CD58 ^{-/-}	
✓	✓		✓	✓	✓	165. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} CAR ^(第2) IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} 166. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} CAR ^(第2) IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD54 ^{-/-} 167. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} CAR ^(第2) IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} CD54 ^{-/-} 168. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} CAR ^(第2) IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} HLA-G 169. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} CAR ^(第2) IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} 170. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} CAR ^(第2) IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD54 ^{-/-} 171. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} CAR ^(第2) IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} CD54 ^{-/-} 172. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} CAR ^(第2) IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} HLA-G 173. MICA/B-CAR CD16 ^{exx} CAR ^(第2) IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} 174. MICA/B-TCR CD16 ^{exx} CAR ^(第2) IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} 175. MICA/B-CAR CD16 ^{exx} CAR ^(第2) IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} 176. MICA/B-CAR CD16 ^{exx} CAR ^(第2) IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD54 ^{-/-} 177. MICA/B-CAR CD16 ^{exx} CAR ^(第2) IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} CD54 ^{-/-} 178. MICA/B-CAR CD16 ^{exx} CAR ^(第2) IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} HLA-G 179. MICA/B-TCR CD16 ^{exx} CAR ^(第2) IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} 180. MICA/B-TCR CD16 ^{exx} CAR ^(第2) IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD54 ^{-/-} 181. MICA/B-TCR CD16 ^{exx} CAR ^(第2) IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} CD58 ^{-/-} CD54 ^{-/-} 182. MICA/B-TCR CD16 ^{exx} CAR ^(第2) IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} HLA-G 183. MICA/B-CAR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exx} CAR ^(第2) IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-} 184. MICA/B-TCR CD38 ^{-/-} CD16 ^{exx} CAR ^(第2) IL B2M ^{-/-} CIITA ^{-/-}

【表 1 3 - 8】

遺伝子型						
MICA/B-CAR又はMICA/B-TCR	CD38 ^{+/+}	CD16 ^{exo}	CAR ^(第2)	IL	B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+}	HLA-G又は(54 ^{+/+} あり又はなし)のCD58 ^{+/+})
✓	✓	✓	✓	✓	✓	185. MICA/B-CAR CD38 ^{+/+} CD16 ^{exo} CAR ^(第2) IL B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} C D58 ^{+/+}
						186. MICA/B-CAR CD38 ^{+/+} CD16 ^{exo} CAR ^(第2) IL B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} C D54 ^{+/+}
						187. MICA/B-CAR CD38 ^{+/+} CD16 ^{exo} CAR ^(第2) IL B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} C D58 ^{+/+} CD54 ^{+/+}
						188. MICA/B-CAR CD38 ^{+/+} CD16 ^{exo} CAR ^(第2) IL B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} HLA-G
						189. MICA/B-TCR CD38 ^{+/+} CD16 ^{exo} CAR ^(第2) IL B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} C D58 ^{+/+}
						190. MICA/B-TCR CD38 ^{+/+} CD16 ^{exo} CAR ^(第2) IL B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} C D54 ^{+/+}
						191. MICA/B-TCR CD38 ^{+/+} CD16 ^{exo} CAR ^(第2) IL B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} C D58 ^{+/+} CD54 ^{+/+}
						192. MICA/B-TCR CD38 ^{+/+} CD16 ^{exo} CAR ^(第2) IL B2M ^{+/+} CIITA ^{+/+} H LA-G

【0 2 1 3】

7. 追加の改変

いくつかの実施形態では、遺伝子組換えモダリティは、安全スイッチタンパク質、標的化モダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬学的に活性なタンパク質及びペプチド、薬物標的候補、又はiPSC若しくはその派生細胞の生着、輸送、ホーミング、生存能力、自己複製、持続性、免疫応答調節及び修飾、並びに／若しくは生存率を促進するタンパク質、のうちの1つ以上を更に含む。いくつかの実施形態では、遺伝子改変されたiPSC及びその派生細胞は、表1に列挙された遺伝子型を含む。いくつかの実施形態では、表1の遺伝子型のうちのいずれか1つを含むiPSC及びその派生エフェクター細胞

胞は、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、RFX5、RFXAP、及び染色体6p21領域内の任意の遺伝子のうちの少なくとも1つの破壊、又はHLA-E、4-1BBL、CD3、CD4、CD8、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、A2AR、抗原特異的TCR、Fc受容体、エンゲージャ、及び二重特異性、多重特異性、若しくはユニバーサルエンゲージャとカップリングするための表面トリガー受容体のうちの少なくとも1つの導入、を更に含み得る。

【0214】

エンゲージャは、異なる抗体の2つ以上の単鎖可変フラグメント(s c F v)からなる融合タンパク質であり、少なくとも1つのs c F Vがエフェクター細胞表面分子に結合し、少なくとも別の1つが腫瘍特異的表面分子を介して腫瘍細胞に結合する。エンゲージャの例には、二重特異性T細胞エンゲージャ(B i T E)、二重特異性キラー細胞エンゲージャ(B i K E)、三重特異性キラー細胞エンゲージャ(T r i K E)、多重特異性キラー細胞エンゲージャ、又は複数の免疫細胞型と適合し得るユニバーサルエンゲージャが含まれるが、これらに限定されない。したがって、エンゲージャは、二重特異性又は多重特異性であり得る。このような二重特異性又は多重特異性エンゲージャは、エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞、NKT細胞、B細胞、マクロファージ、及び／又は好中球)を腫瘍細胞に誘導し、免疫エフェクター細胞を活性化することができ、CAR-T細胞療法の利益を最大化する大きな可能性を示している。

【0215】

いくつかの実施形態では、エンゲージャは、その同時又は連続投与によって、本明細書に記載のエフェクター細胞の集団と組み合わせて使用され、エフェクター細胞は、エンゲージャによって認識される表面分子又は表面トリガー受容体を含む。いくつかの他の実施形態では、エンゲージャは、本明細書に記載されるようにi P S Cを遺伝子操作すること、及び操作されたi P S Cの指示された分化を通じて、派生エフェクター細胞によって発現される二重特異性抗体である。二重特異性若しくは多重特異性エンゲージャ認識、又はカップリングに使用できる例示的なエフェクター細胞表面分子又は表面トリガー受容体には、CD3、CD28、CD5、CD16、NKG2D、CD64、CD32、CD89、NKG2C、及び本明細書に開示されるキメラFc受容体が含まれるが、これらに限定されない。上記のように、いくつかの実施形態では、エンゲージャ認識のために派生エフェクター細胞の表面に発現する外因性CD16は、本明細書に記載されるような、CD16(F176V及び任意選択でS197Pを含む)又はCD64細胞外ドメイン、並びに天然又は非天然の膜貫通、刺激及び／又はシグナル伝達ドメインを含むh n C D 1 6である。いくつかの実施形態では、エンゲージャ認識のためにエフェクター細胞の表面に発現する外因性CD16は、CD16ベースのキメラFc受容体(C F c R)である。いくつかの実施形態では、CD16ベースのC F c Rは、NKG2Dの膜貫通ドメイン、2B4の刺激ドメイン、及びCD3ζのシグナル伝達ドメインを含み、外因性CD16の細胞外ドメインは、CD64又はCD16の細胞外ドメインの全長又は部分配列に由来し、CD16の細胞外ドメインは、F176V及び任意選択でS197Pを含む。

【0216】

いくつかの実施形態では、エンゲージャのための標的細胞は、腫瘍細胞である。二重特異性又は多重特異性エンゲージャ認識のための例示的な腫瘍細胞表面分子には、B7H3、BCMA、CD10、CD19、CD20、CD22、CD24、CD30、CD33、CD34、CD38、CD44、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD179b、CEA、CLEC12A、CS-1、DLL3、EGFR、EGFRvI I I、EPCAM、FLT-3、FOLR1、FOLR3、GD2、gpA33、HER2、HM1.24、LGR5、MSLN、MCSP、MICA/B、PSMA、PAMA、P-カドヘリン、ROR1が含まれるが、これらに限定されない。一実施形態では、二重特異性抗体は、CD3-CD19である。別の実施形態では、二重特異性抗体は、CD16-CD30又はCD64-CD30である。別の実施形態では、二重特異性抗体は、

C D 1 6 - B C M A 又は C D 6 4 - B C M A である。更に別の実施形態では、二重特異性抗体は、C D 3 - C D 3 3 である。

【0217】

更に別の実施形態では、二重特異性抗体は、エフェクター細胞と腫瘍細胞抗原結合ドメインとの間のリンカーを更に含む。例えば、改変された I L 1 5 が、エフェクター細胞増殖を促進するエフェクター N K 細胞のためのリンカーとして使用され得る（いくつかの刊行物では、T r i K E、又は三重特異性キラーエンゲージャと呼ばれる）。一実施形態では、T r i K E は C D 1 6 - I L 1 5 - E P C A M 又は C D 6 4 - I L 1 5 - E P C A M である。別の実施形態では、T r i K E は C D 1 6 - I L 1 5 - C D 3 3 又は C D 6 4 - I L 1 5 - C D 3 3 である。更に別の実施形態では、T r i K E は N K G 2 C - I L 1 5 - C D 3 3（「2 C 1 5 3 3」）である。I L 1 5 に加えて、T r i K E に含めるのに適したサイトカインはまた、I L 2、I L 4、I L 6、I L 7、I L 9、I L 1 0、I L 1 1、I L 1 2、I L 1 8 及び I L 2 1 を含むがこれらに限定されない他のサイトカインに由来し得る。

10

【0218】

いくつかの実施形態では、二重特異性又は多重特異性のエンゲージャのための表面トリガー受容体は、ときには細胞型に応じて、エフェクター細胞に対して内因性であり得る。他のいくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法及び組成物を使用して、すなわち、表 1 に列挙される遺伝子型を含む i P S C を更に操作し、次いで、T 細胞、N K 細胞、又はソース i P S C と同一の遺伝子型と表面トリガー受容体を含む任意のその他のエフェクター細胞への i P S C の分化を指示することを通じて、1 つ以上の外因性表面トリガー受容体をエフェクター細胞に導入することができる。

20

【0219】

8. 免疫療法のための抗体

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるゲノム操作されたエフェクター細胞に加えて、状態、疾患、又は指標に関連する抗原を標的とする抗体又は抗体断片を含む追加の治療剤をこれらのエフェクター細胞とともに組み合わせ療法にて使用することができる。いくつかの実施形態では、抗体は、対象への同時又は連続投与によって、本明細書に記載のエフェクター細胞の集団と組み合わせて使用される。他の実施形態では、そのような抗体又はその断片は、当該抗体又はその断片をコードする外因性ポリヌクレオチド配列を使用して i P S C を遺伝子操作すること、及び操作された i P S C の分化を指示することにより、エフェクター細胞によって発現され得る。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞は外因性 C D 1 6 バリエーションを発現し、エフェクター細胞の細胞傷害性は、A D C を介して抗体によって増強される。

30

【0220】

上記で考察したように、腫瘍細胞上の M I C A / B のシェディングは、増加した可溶性 M I C A / B をもたらし、これは腫瘍回避／エスケープを可能にし、その免疫監視を阻害し得る。本明細書において提供されるように、M I C アルファ 3 ドメイン（例えば、M I C A 又は M I C B アルファ 3 ドメイン）に結合する抗体は、多くのヒト及びマウス腫瘍細胞株において観察される表面 M I C A / B シェディングを防止するために使用され得、M I C A / B 細胞表面密度の増加、低下した M I C A / B の可溶性シェディング、増強された検出能力並びに／又は増強された N K 及び／若しくは T 細胞媒介性腫瘍殺傷をもたらす。いくつかの実施形態では、M I C アルファ 3 ドメイン（例えば、M I C A 又は M I C B アルファ 3 ドメイン）を標的とする抗体は、治療を必要とする対象へのその同時投与又は連続投与によって、本明細書に記載されているエフェクター細胞の集団と組み合わせて使用される。他の実施形態では、そのような抗体又はその断片は、当該抗体又はその断片をコードする外因性ポリヌクレオチド配列を使用して i P S C を遺伝子操作すること、及び操作された i P S C の分化を指示することにより、エフェクター細胞によって発現され得る。

40

【0221】

50

したがって、本明細書において提供されるゲノム操作されたエフェクター細胞は、細胞表面 M I C A / B 抗原に結合する M I C A / B 抗体及び／又は状態、疾患若しくは徴候に関連する異なる抗原を標的とする抗体若しくは抗体断片を含む 1 つ以上の追加の治療剤を含む併用療法において使用され得る。いくつかの実施形態では、細胞表面 M I C A / B 抗原の M I C アルファ 3 ドメインに結合する M I C A / B 抗体。いくつかの実施形態では、追加の治療用抗体はモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、追加の治療用抗体は、ヒト化抗体、ヒト化モノクローナル抗体、又はキメラ抗体である。いくつかの実施形態では、追加の治療用抗体又は抗体断片は、ウイルス抗原に特異的に結合する。他の実施形態では、追加の治療用抗体又は抗体断片は、腫瘍抗原に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、腫瘍又はウイルス特異的抗原は、投与された i P S C 由来エフェクター細胞を活性化して、それらの殺傷能力を増強する。いくつかの実施形態では、単独で、又は M I C アルファ 3 ドメイン（例えば、M I C A 又は M I C B アルファ 3 ドメイン）に結合する抗体と組み合わせた、投与された i P S C 由来エフェクター細胞に対する追加の治療剤として、併用処置に適した追加の治療用抗体は、抗 C D 2 0 抗体（リツキシマブ、ベルツズマブ、オフアツムマブ、ウブリツキシマブ、オカラツズマブ、オビヌツズマブ）、抗 H E R 2 抗体（トラスツズマブ、ベルツズマブ）、抗 C D 5 2 抗体（アレムツズマブ）、抗 E G F R 抗体（セルツキシマブ（certuximab）、アミバンタマブ）、抗 G D 2 抗体（ジヌツキシマブ）、抗 P D L 1 抗体（アベルマブ）、抗 C D 3 8 抗体（ダラツムマブ、イサツキシマブ、M O R 2 0 2）、抗 C D 1 2 3 抗体（7 G 3、C S L 3 6 2）、抗 S L A M F 7 抗体（エロツズマブ）、抗 M I C A / B 抗体（7 C 6、6 F 1 1、1 C 2）、並びにそれらのヒト化又は F c 改変されたバリエーション若しくは断片、又はそれらの機能的同等物及びバイオシミラーを含むがそれらに限定されない。いくつかの実施形態では、投与された i P S C 由来エフェクター細胞に対する追加の治療剤としての併用治療に好適な抗体は、標的細胞上の 2 つ以上の抗原若しくはエピトープを標的とするか、又は標的細胞を標的としながらエフェクター細胞（例えば、T 細胞、NK 細胞、若しくはマクロファージ細胞）を標的細胞に向けて動員する、二重特異性抗体又は多重特異性抗体を更に含む。このような二重特異性又は多重特異性抗体は、エフェクター細胞（例えば、T 細胞、NK 細胞、NK T 細胞、B 細胞、マクロファージ、及び／又は好中球）を腫瘍細胞に誘導し、免疫エフェクター細胞を活性化することができるエンゲージャとして機能し、抗体療法の利益を最大化する大きな可能性を示している。

10

20

30

【0222】

いくつかの実施形態では、i P S C 由来エフェクター細胞は、表 1 に列挙された遺伝子型を含む造血系統細胞を含む。いくつかの実施形態では、i P S C 由来エフェクター細胞は、表 1 に列挙された遺伝子型を含む NK 細胞を含む。いくつかの実施形態では、i P S C 由来エフェクター細胞は、表 1 に列挙された遺伝子型を含む T 細胞を含む。

【0223】

液性又は固形腫瘍を治療するのに有用な組み合わせのいくつかの実施形態では、組み合わせは、1 つ以上の予め選択されたモノクローナル抗体と、M I C A / B 腫瘍抗原標的化特異性を含む i P S C 由来 NK 又は T 細胞とを含み、細胞は、M I C A / B - C A R、腫瘍 M I C A / B ペプチドを標的とする外因性 T C R、抗 M I C A / B 抗体と組み合わせた場合に A D C C を媒介する C D 1 6 若しくはそのバリエーション、又はそれらの任意の組み合わせをコードする 1 つ以上のポリヌクレオチドを任意選択で含む。液性腫瘍又は固形腫瘍を治療するのに有用な組み合わせのいくつかの実施形態では、組み合わせは、抗 M I C A / B モノクローナル抗体と、本明細書に記載される M I C A / B 腫瘍抗原標的化特異性を含む i P S C 由来 NK 又は T 細胞とを含む。M I C A / B モノクローナル抗体及び本明細書に記載の i P S C 由来 NK 又は T 細胞を含む治療組み合わせのいくつかの実施形態では、M I C A / B モノクローナル抗体は、本明細書に記載の M I C A / B 腫瘍抗原標的化特異性を含む NK 細胞の集団において発現され、細胞は、M I C A / B モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドを更に含む。いくつかの実施形態では、M I C A / B モノクローナル抗体は、7 C 6、6 F 1 1 及び 1 C 2 のうちの 1 つである。液性又は固形腫瘍

40

50

を治療するのに有用な組み合わせのいくつかの実施形態では、組み合わせは、本明細書に記載されるMICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含むiPSC由来NK又はT細胞を含み、細胞は、CD38ノックアウト、及び1つ以上の抗CD38抗体を更に含む。一実施形態では、抗CD38抗体は、ダラツムマブ、イサツキシマブ及びMOR202を含む。一実施形態では、組み合わせは、本明細書に記載されるMICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含むiPSC由来NK細胞を含み、細胞は、CD38ノックアウト、及びダラツムマブを更に含む。いくつかの更なる実施形態では、ダラツムマブと組み合わせて含まれるiPSC由来NK細胞は、IL15並びに／又はCD38若しくはCD19、BCMA、CD20、CD22、CD123、HER2、CD52、EGFR、GD2、MSLN、VEGFR2、PSMA及びPDL1のうちの1つを標的とする第2のCARを更に含み、IL15は、CARと共発現されるか、又は別々に発現され、IL15は、上で論述されている形態のうちのいずれか1つである。いくつかの特定の実施形態では、IL15は、CARと共発現されるか、又は別々に発現される。

10

【0224】

いくつかの実施形態では、組み合わせは、本明細書に記載のMICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含むiPSC由来NK細胞と、抗HER2抗体（例えば、トラスツズマブ、ペルツズマブ）、抗EGFR抗体（例えば、セツキシマブ、アミバンタマブ）、又は抗PDL1抗体（例えば、アベルマブ）のうちの1つ以上とを含む。いくつかの更なる実施形態では、抗HER2抗体、抗EGFR抗体又は抗PDL1抗体のいずれかと組み合わせて含まれるiPSC由来NK細胞は、本明細書に記載のMICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含み、CD38ノックアウト、IL15、並びにCD38又はCD19、BCMA、CD20、CD22、CD123、HER2、CD52、EGFR、GD2、MSLN、VEGFR2、PSMA及びPDL1の1つを標的とする第2のCARの1つ以上を任意選択で含み、IL15は、CARと共発現されるか、又は別々に発現され、IL15は、上で論述されている形態のうちのいずれか1つである。いくつかの特定の実施形態では、IL15は、CARと共発現されるか、又は別々に発現される。液性又は固形腫瘍を治療するのに有用な組み合わせのいくつかの実施形態では、組み合わせは、本明細書に記載されるMICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含むiPSC由来NK又はT細胞を含み、細胞は、TCR^{neg}、CD38ノックアウト、HLA-I及び／又はHLA-I欠損、及びサイトカインシグナル伝達複合体のうちの1つ以上、並びに上記のような治療用抗体を任意選択で含む。

20

30

【0225】

9. チェックポイント阻害剤

チェックポイントは、阻害されていない場合に免疫応答を抑制又は下方制御することができる細胞分子、しばしば細胞表面分子である。腫瘍が特定の免疫チェックポイント経路を、特に腫瘍抗原に特異的なT細胞に対する免疫耐性の主要なメカニズムとして選択していることが明らかになっている。チェックポイント阻害剤(CI)は、チェックポイント遺伝子の発現又は遺伝子産物を減少させるか、又はチェックポイント分子の活性を低下させ、それによって、阻害性チェックポイントを遮断し、免疫系機能を回復させることができるアンタゴニストである。PD1/PDL1又はCTLA4を標的化するチェックポイント阻害剤の開発により、腫瘍学の展望が変わり、これらの薬剤は複数の適応症で長期の寛解をもたらした。しかしながら、多くの腫瘍サブタイプはチェックポイント遮断療法に耐性があり、再発は依然として重大な懸念事項である。したがって、本出願の一態様は、CIとの併用療法に、本明細書で提供されるようなゲノム操作された機能性iPSC由来細胞を含めることにより、CI耐性を克服するための治療アプローチを提供する。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、対象へのその同時又は連続投与によって、本明細書に記載のエフェクター細胞の集団と組み合わせて使用される。いくつかの他の実施形態では、チェックポイント阻害剤は、当該チェックポイント阻害剤又はその断片若しくはバリエーションをコードする外因性ポリヌクレオチド配列を使用してiPSCを遺伝子操作すること、及び操作されたiPSCの分化を指示することにより、エフェクター細胞

40

50

によって発現される。本明細書に記載されるエフェクター細胞との併用療法のいくつかの実施形態は、少なくとも1つのチェックポイント分子を標的とするための少なくとも1つのチェックポイント阻害剤を含み、派生細胞は、MICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含み、表1に列挙される1つ以上の追加の属性を任意選択で含む。

【0226】

いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤又はその断片をコードする外因性ポリヌクレオチド配列は、別個の構築物で又はバイシストロン性構築物でのいずれかで、CARと共発現される。いくつかの更なる実施形態では、チェックポイント阻害剤又はその断片をコードする配列は、例えば、CAR-2A-CI又はCI-2A-CARのように例示される自己切断2Aコード配列を介してCAR発現構築物の5'又は3'末端のいずれかに連結され得る。したがって、チェックポイント阻害剤とCARのコード配列は、単一のオープンリーディングフレーム(open reading frame、ORF)にある。チェックポイント阻害剤が送達され、腫瘍微小環境(tumor microenvironment、TME)に浸潤することができる派生エフェクター細胞によってペイロードとして発現及び分泌されると、それは、TMEに結合すると阻害性チェックポイント分子を打ち消し、CARなどのモダリティを活性化するか、又は受容体を活性化することによって、エフェクター細胞を活性化する。併用療法の一実施形態では、派生エフェクター細胞は、上記のように、NK系統細胞である。併用療法の別の実施形態では、派生エフェクター細胞は、上記のように、T系統細胞である。

【0227】

本明細書で提供される派生NK細胞又はT細胞との併用療法に好適なチェックポイント阻害剤には、PD1(Pdcd1、CD279)、PDL-1(CD274)、TIM3(Havcr2)、TIGIT(WUCAM及びVstm3)、LAG3(CD223)、CTLA4(CD152)、2B4(CD244)、4-1BB(CD137)、4-1BBL(CD137L)、A2AR、BATE、BTLA、CD39(Entpd1)、CD47、CD73(NT5E)、CD94、CD96、CD160、CD200、CD200R、CD274、CEACAM1、CSF-1R、Foxp1、GARP、HVEM、IDO、EDO、TDO、LAIR-1、MICA/B、NR4A2、MAFB、OCT-2(Pou2f2)、レチノイン酸受容体アルファ(retinoic acid receptor alpha、Rara)、TLR3、VISTA、NKG2A/HLA-E、及び抑制性KIR(例えば、2DL1、2DL2、2DL3、3DL1、及び3DL2)のアンタゴニストが含まれるが、これらに限定されない。

【0228】

いくつかの実施形態では、上述のチェックポイント分子のうちのいずれかを阻害するアンタゴニストは抗体である。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害抗体は、マウス抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダIg、単一可変新規抗原受容体(VNAR)、サメ重鎖のみ抗体(IgNAR)、キメラ抗体、組換え抗体、又はこれらの抗体断片であり得る。抗体断片の非限定的な例には、Fab、Fab'、F(ab')₂、F(ab')₃、Fv、一本鎖抗原結合断片(scFv)、(scFv)₂、ジスルフィド安定化Fv(dsFv)、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、単一ドメイン抗原結合断片(sdAb、ナノボディ)、組換え重鎖のみ抗体(VHH)、及び抗体全体の結合特異性を維持するその他の抗体断片が含まれ、それらは、抗体全体よりも、製造するのに費用対効果が高く、より簡単に使用することができ、又は感度が高くあり得る。いくつかの実施形態では、1つ又は2つ又は3つ又はそれ以上のチェックポイント阻害剤は、アテゾリズマブ(抗PDL1 mAb)、アベルマブ(抗PDL1 mAb)、デュルバルマブ(抗PDL1 mAb)、トレメリムマブ(抗CTLA4 mAb)、イピリムマブ(抗CTLA4 mAb)、IPH4102(抗KIR抗体)、IPH43(抗MICA抗体)、IPH33(抗TLR3抗体)、リリムマブ(抗KIR抗体)、モナリズマブ(抗NKG2A抗体)、ニボルマブ(抗-PD1 mAb)、ペンブロリズマブ(抗PD1 mAb)、及びそれらの誘導体、機能的同等物、又はそれらのバイオシミラーの

少なくとも1つを含む。

【0229】

いくつかの実施形態では、多くのmiRNAが免疫チェックポイントの発現をコントロールする調節因子として見出されるため、上述のチェックポイント分子のうちのいずれかを阻害するアンタゴニストはマイクロRNAベースである(Dragomir et al., Cancer Biol Med. 2018, 15(2):103-115)。いくつかの実施形態では、チェックポイントアンタゴニスト性miRNAは、miR-28、miR-15/16、miR-138、miR-342、miR-20b、miR-21、miR-130b、miR-34a、miR-197、miR-200c、miR-200、miR-17-5p、miR-570、miR-424、miR-155、miR-574-3p、miR-513、及びmiR-29cを含むが、これらに限定されない。

10

【0230】

いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、CARと共発現され、以下のチェックポイント分子のうちの少なくとも1つを阻害する：PD-1、PDL-1、TIM-3、TIGIT、LAG-3、CTLA-4、2B4、4-1BB、4-1BBL、A2AR、BATE、BTLA、CD39(Entpd1)、CD47、CD73(NT5E)、CD94、CD96、CD160、CD200、CD200R、CD274、CEACAM1、CSF-1R、Foxp1、GARP、HVEM、IDO、EDO、TDO、LAIR-1、MICA/B、NR4A2、MAFB、OCT-2(Pou2f2)、レチノイン酸受容体アルファ(Rara)、TLR3、VISTA、NKG2A/HLA-E、及び抑制性KIR。いくつかの実施形態では、表1に列挙される遺伝子型を有する派生細胞においてCARと共発現するチェックポイント阻害剤は、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、トレメリムマブ、イピリムマブ、IPH4102、IPH43、IPH33、リリムマブ、モナリズマブ、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、及びそれらのヒト化又はFc改変されたバリエーション、断片、及びそれらの機能的同等物又はバイオシミラーを含む群から選択される。いくつかの実施形態では、CARと共発現するチェックポイント阻害剤は、アテゾリズマブ、又はそのヒト化、若しくはFc改変されたバリエーション、断片又はそれらの機能的同等物若しくはバイオシミラーである。いくつかの他の実施形態では、CARと共発現するチェックポイント阻害剤は、ニボルマブ、又はそのヒト化、又はFc改変されたバリエーション、断片又はそれらの機能的同等物又はバイオシミラーである。いくつかの他の実施形態では、CARと共発現するチェックポイント阻害剤は、ペンブロリズマブ、又はそのヒト化、又はFc改変されたバリエーション、断片又はそれらの機能的同等物又はバイオシミラーである。

20

30

【0231】

本明細書で提供される派生細胞及びチェックポイント分子を阻害する少なくとも1つの抗体を含む併用療法はいくつかの他の実施形態では、当該抗体は、派生細胞によって、又は派生細胞内で産生されず、本明細書に記載のMICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含む及び表1に列挙される1つ以上の更なる属性を任意選択で含む派生細胞の投与前、投与とともに、又は投与後に更に投与される。いくつかの実施形態では、提供される派生NK細胞又は派生T細胞との併用療法における1つ、2つ、3つ以上のチェックポイント阻害剤の投与は、同時又は逐次的である。本明細書に記載のMICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含み、表1に列挙される遺伝子型をもたらす1つ以上の追加のゲノム編集を任意選択で含む由来NK細胞又はT細胞を含む併用治療の一実施形態では、処置に含まれるチェックポイント阻害剤は、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、トレメリムマブ、イピリムマブ、IPH4102、IPH43、IPH33、リリムマブ、モナリズマブ、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、及びそれらのヒト化又はFc改変されたバリエーション、断片及びそれらの機能的同等物又はバイオシミラーのうちの1つ以上である。本明細書に記載のMICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含み、表1に列挙される遺伝子型をもたらす1つ以上の追加のゲノム編集を任意選択で含む由来NK細胞又はT細胞を含む併用療法のいく

40

50

つかの実施形態では、処置に含まれるチェックポイント阻害剤は、アテゾリズマブ、又はそのヒト化若しくはFc改変されたバリエーション、断片及びその機能的同等物又はバイオシミラーである。本明細書に記載のMICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含み、表1に列挙される遺伝子型をもたらす1つ以上の追加のゲノム編集を任意選択で含む由来NK細胞又はT細胞を含む併用治療のいくつかの実施形態では、処置に含まれるチェックポイント阻害剤は、ニボルマブ、又はそのヒト化若しくはFc改変されたバリエーション、断片又はその機能的同等物又はバイオシミラーである。本明細書に記載のMICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含み、表1に列挙される遺伝子型をもたらす1つ以上の追加のゲノム編集を任意選択で含む由来NK細胞又はT細胞を含む併用治療のいくつかの実施形態では、処置に含まれるチェックポイント阻害剤は、ペンブロリズマブ、又はそのヒト化若しくはFc改変されたバリエーション、断片又はその機能的同等物又はバイオシミラーである。

10

【0232】

II. iPSCの選択された遺伝子座における標的化ゲノム編集のための方法

本明細書で互換可能に使用されるゲノム編集、又はゲノム編集、又は遺伝子編集は、標的細胞のゲノムにDNAが挿入、欠失、及び／又は置換される一種の遺伝子工学である。標的化ゲノム編集（「標的化ゲノム編集」又は「標的化遺伝子編集」と互換可能である）は、ゲノム内の事前に選択された部位での挿入、欠失、置換を可能にする。標的化編集に挿入部位で内因性配列が欠失すると、影響を受けた配列を含む内因性遺伝子は、配列欠失によりノックアウト又はノックダウンされる可能性がある。したがって、標的化編集を使用して、内因性遺伝子発現を正確に破壊することもできる。本明細書で同様に使用される用語「標的化組み込み」は、挿入部位での内因性配列の欠失を伴うか又は伴わない、1つ以上の外因性配列の挿入を含むプロセスを指す。対照的に、ランダムに組み込まれた遺伝子は位置効果とサイレンシングの影響を受けやすく、その発現は信頼できず、予測できない。例えば、セントロメア及びサブテロメア領域は、特に導入遺伝子サイレンシングを起こしやすい。相互に新しく組み込まれた遺伝子は、周囲の内因性遺伝子とクロマチンに影響を与え、細胞の挙動を変え、又は細胞の形質転換を促進する可能性がある。したがって、セーフハーバー遺伝子座やゲノムセーフハーバー（genomic safe harbor、GSH）などの事前に選択された遺伝子座に外因性DNAを挿入することは、安全性、効率、コピー数制御、及び信頼性の高い遺伝子応答制御にとって重要である。

20

【0233】

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

30

【0234】

代替的に、特異的なレアカットエンドヌクレアーゼによる二本鎖切断（double strand break、DSB）の特異的な導入により、より高い頻度で標的化編集を実現することができる。このようなヌクレアーゼ依存の標的化編集は、DSBに応答して発生する非同末端結合（non-homologous end joining、NHEJ）を含むDNA修復メカニズムを利用する。外因性の遺伝物質を含むドナーベクターがない場合、NHEJは少数の内因性ヌクレオチドのランダムな挿入又は欠失（インデル）をしばしば引き起こす。対照的に、一対のホモロジーアームと隣接する外因性遺伝物質を含むドナーベクターが存在する場合、相同組換えによる相同指向性修復（homology directed repair、HDR）中に外因性遺伝物質がゲノムに導入され得、「標的化組み込み」がもたらされる。いくつかの状況において、標的化組み込み部位は、選択された遺伝子のコード領域内にあることが意図され、したがって、標的化組み込みは、遺伝子発現を破壊し、1つの単一編集ステップにおいて同時ノックイン及びノックアウト（KI/KO）をもたらすことができる。

40

【0235】

目的の遺伝子座（gene locus of interest、GOI）における選択位置に1つ以上の導入遺伝子を挿入して、同時に遺伝子をノックアウトすることを達成することができる

50

。同時ノックイン及びノックアウト (knock-in and knockout、K I / K O) に好適な遺伝子座には、B 2 M、T A P 1、T A P 2、タパシン、N L R C 5、C I I T A、R F X A N K、R F X 5、R F X A P、T C R α 又は β 定常領域、N K G 2 A、N K G 2 D、C D 3 8、C D 2 5、C D 6 9、C D 7 1、C D 4 4、C D 5 8、C D 5 4、C D 5 6、C I S、C B L - B、S O C S 2、P D 1、C T L A 4、L A G 3、T I M 3、及び T I G I T が含まれるが、これらに限定されない。位置選択的挿入のためのそれぞれの部位特異的標的化ホモロジーアームにより、導入遺伝子が、部位の内因性プロモータ下又は構築物に含まれる外因性プロモータ下のいずれかで発現されることが可能になる。2 つ以上の導入遺伝子が C D 3 8 遺伝子座の選択された位置に挿入される場合、リンカー配列、例えば 2 A リンカー又は I R E S は、任意の 2 つの導入遺伝子の間に配置される。2 A リンカーは、例えば、F M D V、E R A V、P T V - I、又は T a V に由来する自己切断ペプチド (それぞれ「F 2 A」、「E 2 A」、「P 2 A」、及び「T 2 A」と呼ばれる) をコードし、単一の翻訳から別々のタンパク質を産生できるようにする。いくつかの実施形態では、導入遺伝子及び／又は外因性プロモータサイレンシングのリスクを低減するために、構築物にインスレータが含まれる。種々の実施形態では、外因性プロモータは、C A G、又は C M V、E F 1 α 、P G K、及び U B C を含むがこれらに限定されない他の構成的、誘導性、時間特異的、組織特異的、若しくは細胞型特異的プロモータであり得る。

10

【0236】

特異的な標的化 D S B を導入することができる利用可能なエンドヌクレアーゼには、ジンクフィンガヌクレアーゼ (zinc-finger nucleases、Z F N)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (transcription activator-like effector nucleases、T A L E N)、RNA 誘導 C R I S P R (Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats、クラスター化等間隔短鎖回分リピート) システムが含まれるが、これらに限定されない。更に、p h i C 3 1 及び B x b 1 インテグラーゼを利用する D I C E (デュアルインテグラーゼカセット交換) システムも、標的化組み込みのための有望なツールである。

20

【0237】

Z F N は、ジンクフィンガ DNA 結合ドメインに融合したヌクレアーゼを含む標的化ヌクレアーゼである。「ジンクフィンガ DNA 結合ドメイン」又は「zinc finger DNA binding domain、Z F B D」とは、1 つ以上のジンクフィンガを介して配列特異的な様式で DNA に結合するポリペプチドドメインを意味する。ジンクフィンガは、亜鉛イオンの配位により構造が安定化されるジンクフィンガ結合ドメイン内の約 3 0 アミノ酸のドメインである。ジンクフィンガの例には、C₂H₂ ジンクフィンガ、C₃H ジンクフィンガ、及び C₄ ジンクフィンガが含まれるが、これらに限定されない。「設計された」ジンクフィンガドメインは、天然に存在しないドメインであり、その設計／構成は主に合理的な基準、例えば、既存の Z F P 設計と結合データの情報を格納するデータベースの情報を処理するための置換ルールとコンピュータ化アルゴリズムの適用に起因する。例えば、米国特許第 6, 140, 081 号、同第 6, 453, 242 号及び同第 6, 534, 261 号を参照されたい、国際公開第 98 / 53058 号、同第 98 / 53059 号、同第 98 / 53060 号、同第 02 / 016536 号及び同第 03 / 016496 号も参照されたい。 「選択された」ジンクフィンガドメインは、その生産が主にファージディスプレイ、相互作用トラップ、又はハイブリッド選択などの経験的プロセスから生じる天然では見られないドメインである。Z F N は、米国特許第 7, 888, 121 号及び同第 7, 972, 854 号で詳細に説明されており、それらの完全な開示は参照により本明細書に組み込まれる。当該技術分野で最も認識されている Z F N の例は、F o k I ヌクレアーゼとジンクフィンガ DNA 結合ドメインとの融合である。

30

40

【0238】

T A L E N は、T A L エフェクター DNA 結合ドメインに融合したヌクレアーゼを含む標的化ヌクレアーゼである。「転写活性化因子様エフェクター DNA 結合ドメイン」、「T A L エフェクター DNA 結合ドメイン」、又は「T A L E DNA 結合ドメイン」とは

50

、T A Lエフェクタータンパク質のD N Aへの結合に関与するT A Lエフェクタータンパク質のポリペプチドドメインを意味する。T A Lエフェクタータンパク質は、感染中にX a n t h o m o n a s属の植物病原体によって分泌される。これらのタンパク質は植物細胞の核に入り、それらのD N A結合ドメインを介してエフェクター特異的なD N A配列に結合し、トランス活性化ドメインを介してこれらの配列で遺伝子転写を活性化する。T A LエフェクターD N A結合ドメインの特異性は、反復可変残基（repeat variable-dir esidue、R V D）と呼ばれる選択された反復位置に多型を含む不完全な3 4アミノ酸リピートのエフェクター可変数に依存する。T A L E Nは、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願第2 0 1 1 / 0 1 4 5 9 4 0号により詳細に記載されている。当該技術分野で最も認識されているT A L E Nの例は、T A LエフェクターD N A結合ドメインへのF o k Iヌクレアーゼの融合ポリペプチドである。

10

【0 2 3 9】

本発明の方法で使用される標的化ヌクレアーゼの別の例は、標的化S p o 1 1ヌクレアーゼ、目的のD N A配列に特異性を有するD N A結合ドメイン、例えばジンクフィンガD N A結合ドメイン、T A LエフェクターD N A結合ドメインなどに融合したヌクレアーゼ活性を有するS p o 1 1ポリペプチドを含むポリペプチドである。

【0 2 4 0】

本発明の実施形態に適した標的化ヌクレアーゼの更なる例には、個別に又は組み合わせて使用されるかどうかにかかわらず、B x b 1、p h i C 3 1、R 4、P h i B T 1、及びW β / S P B c / T P 9 0 1 - 1が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0 2 4 1】

標的化ヌクレアーゼの他の非限定的な例には、天然に存在するヌクレアーゼ及び組換えヌクレアーゼ、c a s、c p f、c s e、c s y、c s n、c s d、c s t、c s h、c s a、c s m、及びc m rを含むファミリーからのC R I S P R関連のヌクレアーゼ、制限エンドヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、ホーミングエンドヌクレアーゼなどが挙げられる。

【0 2 4 2】

一例としてC a s 9を使用すると、C R I S P R / C a s 9は、2つの主要な成分：（1）C a s 9エンドヌクレアーゼと（2）c r R N A - t r a c r R N A複合体とを必要とする。共発現すると、2つの成分が複合体を形成し、P A M及びP A M近位のシーディング領域（seeding region）を含む標的D N A配列に動員される。c r R N Aとt r a c r R N Aを組み合わせてキメラガイドR N A（guide RNA、g R N A）を形成し、C a s 9を選択した配列を標的に導くことができる。次いで、これら2つの成分は、トランスフェクション又は形質導入を介して哺乳動物細胞に送達できる。

30

【0 2 4 3】

D I C Eを介した挿入は、例えば、p h i C 3 1とB x b 1などのリコンビナーゼの対を使用して、各酵素自体の小さなa t t B及びa t t P認識部位に厳しく制限されている外因性D N Aの一方の組み込みを提供する。これらの標的化a t t部位は哺乳類のゲノムには天然に存在しないため、最初に所望の組み込み部位のゲノムに導入する必要がある。例えば、米国特許出願公開第2 0 1 5 / 0 1 4 0 6 6 5号（その開示が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

40

【0 2 4 4】

本発明の一態様は、標的化されたゲノム組み込みのための1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を提供する。一実施形態では、構築物は、所望の組み込み部位に特異的な一対の相同アームを更に含み、標的化組み込みの方法は、構築物を細胞に導入して、細胞宿主酵素機構による部位特異的相同組換えを可能にすることを含む。別の実施形態では、細胞における標的化組み込みの方法は、1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入することと、所望の組み込み部位に特異的なD N A結合ドメインを含むZ F N発現カセットを細胞に導入してZ F Nを介した挿入を可能にすることと、を含む。更に別の実施形態では、細胞における標的化組み込みの方法は、1つ以上の外因性ポリヌ

50

クレオチドを含む構築物を細胞に導入することと、所望の組み込み部位に特異的なDNA結合ドメインを含むTALEN発現カセットを細胞に導入してTALENを介した挿入を可能にすることと、を含む。別の実施形態では、細胞における標的化組み込みの方法は、1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入することと、Cas9発現カセット及び所望の組み込み部位に特異的なガイド配列を含むgRNAを細胞に導入してCas9を介した挿入を可能にすることと、を含む。更に別の実施形態では、細胞における標的化組み込みの方法は、一対のDICEリコンビナーゼの1つ以上のatt部位を含む構築物を細胞内の所望の組み込み部位に導入することと、1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入することと、DICEリコンビナーゼ用の発現カセットを導入し、DICEを介した標的化組み込みを可能にすることと、を含む。

10

【0245】

標的化組み込みのための有望な部位には、ヒトのゲノムの遺伝子内又は遺伝子外領域であり、理論的には、宿主細胞又は生物に悪影響を与えることなく、新たに組み込まれたDNAの予測可能な発現に対応できる、セーフハーバー遺伝子座、又はゲノムセーフハーバー(GSH)が含まれるが、これらに限定されない。有用なセーフハーバーは、ベクターにコードされたタンパク質又は非コードRNAの望ましいレベルを生成するために十分な導入遺伝子発現を可能にする必要がある。セーフハーバーはまた、細胞を悪性形質転換しやすくしたり、細胞機能を変化させたりするものであってはならない。組み込み部位が、可能性のあるセーフハーバー遺伝子座であるためには、理想的には、以下を含むがこれらに限定されない基準を満たす必要がある：配列アノテーションによって判断されるような、調節エレメント又は遺伝子の破壊が存在しないこと、遺伝子密集領域内の遺伝子間領域、又は反対方向に転写された2つの遺伝子の間の収束位置であること、ベクターにコードされた転写活性化因子と、隣接する遺伝子、特にがん関連遺伝子及びマイクロRNA遺伝子のプロモータとの間の長距離相互作用の可能性を最小限にする距離を保つこと、並びに遍在的な転写活性を示す、広範な空間的及び時間的発現配列タグ(expressed sequence tag、EST)発現パターンによって反映されるような、明らかに遍在的な転写活性を有すること。この後者の特質は幹細胞で特に重要であり、幹細胞では、分化中にクロマチンのリモデリングが通常、いくつかの遺伝子座のサイレンシングと他の遺伝子座の活性化の可能性をもたらす。外因性挿入に好適な領域内では、挿入のために選択された正確な遺伝子座は、反復要素と保存された配列を欠き、ホモロジーアームの増幅用のプライマーを簡単に設計することができるはずである。

20

30

【0246】

ヒトゲノム編集、又は具体的には標的化組み込みに好適な部位には、アデノ随伴ウイルス部位1(adeno-associated virus site 1、AAVS1)、ケモカイン(CCモチーフ)受容体5(chemokine(CC motif)receptor 5、CCR5)遺伝子座、及びマウスROSA26遺伝子座のヒトのオルソログが含まれるが、これらに限定されない。加えて、マウスH11遺伝子座のヒトオルソログはまた、本明細書に開示される標的化組み込みの組成物及び方法を使用して挿入するための好適な部位であり得る。更に、コラーゲンとHTRP遺伝子座は、標的化組み込みのためのセーフハーバーとしても使用され得る。しかしながら、選択した各部位の検証は、特定の組み込み事象のために特に幹細胞で必要であることが示されており、プロモータの選択、外因性遺伝子の配列と配置、構築物の設計などの挿入戦略の最適化がしばしば必要である。

40

【0247】

標的化されたインデルのために、編集部位はしばしばその発現及び／又は機能が破壊されることが意図されている内因性遺伝子に含まれている。いくつかの実施形態では、標的化されたインデルを含む内因性遺伝子は、免疫応答の調節及び修飾に関連する。いくつかの他の実施形態では、標的化インデルを含む内因性遺伝子は、標的化モダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬物標的候補、免疫応答調節及び修飾、あるいは幹細胞及び／又は前駆細胞、並びにそれらに由来する細胞の生着、輸送、ホーミング、生存能力、自己複製、持続性、及び／又は生存率を抑制するタンパク質と関連する。

50

【0248】

したがって、本発明の別の態様は、ゲノムセーフハーバーを含む選択された遺伝子座、又は本明細書において提供されるような、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、TRAC、若しくはCD38遺伝子座などの継続的又は一時的な遺伝子発現について安全かつ十分に調節されていることが既知の若しくは証明された事前に選択された遺伝子座における標的化組み込みの方法を提供する。一実施形態では、標的化組み込みの方法のためのゲノムセーフハーバーは、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、ベータ2ミクログロブリン、CD38、GAPDH、TCR、若しくはRUNX1、又はゲノムセーフハーバーの基準を満たす他の遺伝子座を含む、1つ以上の望ましい組み込み部位を含む。一実施形態では、1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入することと、望ましい組み込み部位に特異的な相同アームのペア及び1つ以上の外因性配列を含む構築物を細胞に導入して、細胞宿主酵素機構による部位特異的相同組換えを可能にすることを含む、細胞への標的化組み込みの方法であって、望ましい組み込み部位は、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、GAPDH、TCR、若しくはRUNX1、又はゲノムセーフハーバーの基準を満たす他の遺伝子座を含む、方法。更なる組み込み部位は、破壊、例えば減少又はロックアウトのために意図される内因性遺伝子座を含み、これは、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCR α 若しくは β 定常領域、NKG2A、NKG2D、CD38、CD25、CD69、CD71、CD44、CD58、CD54、CD56、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、又はTIGITを含む。

10

20

【0249】

別の実施形態では、細胞における標的化組み込みの方法は、1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入することと、所望の組み込み部位に特異的なDNA結合ドメインを含むZFN発現カセットを細胞に導入して、ZFN媒介挿入を可能にすることと、を含み、所望の組み込み部位は、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、GAPDH、RUNX1、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCR α 若しくは β 定常領域、NKG2A、NKG2D、CD25、CD38、CD44、CD54、CD56、CD58、CD69、CD71、OX40、4-1BB、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、又はTIGITを含む。更に別の実施形態では、細胞における標的化組み込みの方法は、1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入することと、所望の組み込み部位に特異的なDNA結合ドメインを含むTALEN発現カセットを細胞に導入して、TALEN媒介挿入を可能にすることと、を含み、所望の組み込み部位は、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、GAPDH、RUNX1、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCR α 若しくは β 定常領域、NKG2A、NKG2D、CD25、CD38、CD44、CD54、CD56、CD58、CD69、CD71、OX40、4-1BB、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、又はTIGITを含む。別の実施形態では、細胞における標的化組み込みの方法は、1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入することと、所望の組み込み部位に特異的なCas9発現カセット、及びガイド配列を含むgRNAを細胞に導入して、Cas9媒介挿入を可能にすることと、を含み、所望の組み込み部位は、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、GAPDH、RUNX1、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCR α 若しくは β 定常領域、NKG2A、NKG2D、CD25、CD38、CD44、CD54、CD56、CD58、CD69、CD71、OX40、4-1BB、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、又はTIGITを含む。更に別の実施形態では、細胞における標的化組み込みの方法は、DICEレコンビナーゼの対の

30

40

50

1つ以上のa t t部位を含む構築物を細胞における所望の組み込み部位に導入することと、1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入することと、D I C Eレコンビナーゼの発現カセットを導入して、D I C E媒介標的化組み込みを可能にすることと、を含み、所望の組み込み部位は、A A V S 1、C C R 5、R O S A 2 6、コラーゲン、H T R P、H 1 1、G A P D H、R U N X 1、B 2 M、T A P 1、T A P 2、タパシン、N L R C 5、C I I T A、R F X A N K、R F X 5、R F X A P、T C R α 若しくは β 定常領域、N K G 2 A、N K G 2 D、C D 2 5、C D 3 8、C D 4 4、C D 5 4、C D 5 6、C D 5 8、C D 6 9、C D 7 1、O X 4 0、4-1 B B、C I S、C B L - B、S O C S 2、P D 1、C T L A 4、L A G 3、T I M 3、又はT I G I Tを含む。

【0250】

更に、本明細書で提供されるように、セーフハーバーでの標的化組み込みのための上述の方法は、目的のポリヌクレオチド、例えば、安全スイッチタンパク質、標的化モダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬学的に活性なタンパク質及びペプチド、薬物標的候補、及び幹細胞及び／又は前駆細胞の生着、輸送、ホーミング、生存能力、自己複製、持続性、及び／又は生存率を促進するタンパク質をコードするポリヌクレオチドを挿入するために使用される。いくつかの他の実施形態では、1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを含む構築物は、1つ以上のマーカー遺伝子を更に含む。一実施形態では、本発明の構築物中の外因性ポリヌクレオチドは、安全スイッチタンパク質をコードする自殺遺伝子である。誘導された細胞死のための好適な自殺遺伝子系としては、カスパーゼ9（又はカスパーゼ3若しくは7）及びA P 1 9 0 3、チミジンキナーゼ（thymidine kinase、T K）及びガンシクロビル（ganciclovir、G C V）、シトシンデアミナーゼ（cytosine deaminase、C D）及び5-フルオロシトシン（5-fluorocytosine、5-F C）が挙げられるが、これらに限定されない。加えて、一部の自殺遺伝子系は細胞型に特異的であり、例えば、B細胞分子C D 2 0によるTリンパ球の遺伝子改変は、m A b リツキシマブの投与時にそれらを排除することができる。更に、セツキシマブによって認識されるエピトープを含む改変されたE G F Rは、細胞がセツキシマブに曝露されたときに遺伝子操作された細胞を枯渇させるために使用することができる。したがって、本発明の一態様は、カスパーゼ9（カスパーゼ3又は7）、チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、改変E G F R、及びB細胞C D 2 0から選択される安全スイッチタンパク質をコードする1つ以上の自殺遺伝子の標的化組み込みの方法を提供する。

【0251】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法によって組み込まれた1つ以上の外因性ポリヌクレオチドは、標的化組み込みのための構築物に含まれる作動可能に連結された外因性プロモータによって駆動される。プロモータは誘導性又は構成的であり得、そして時間特異的、組織特異的又は細胞型特異的であり得る。本発明の方法に適した構成的プロモータには、サイトメガロウイルス（C M V）、伸長因子1 α （E F 1 α ）、ホスホグリセリン酸キナーゼ（P G K）、ハイブリッドC M Vエンハンサ／ニワトリ β -アクチン（C A G）、及びユビキチンC（U B C）プロモータが含まれるが、これらに限定されない。一実施形態では、外因性プロモータはC A Gである。

【0252】

本明細書に記載される方法によって組み込まれた外因性ポリヌクレオチドは、組み込み部位において、宿主ゲノム中の内因性プロモータによって駆動され得る。一実施形態では、本明細書に記載される方法は、細胞のゲノムにおけるA A V S 1遺伝子座における1つ以上の外因性ポリヌクレオチドの標的化組み込みのために使用される。一実施形態では、少なくとも1つの組み込まれたポリヌクレオチドは、内因性A A V S 1プロモータによって駆動される。別の実施形態では、本明細書に記載される方法は、細胞のゲノムにおけるR O S A 2 6遺伝子座での標的化組み込みのために使用される。一実施形態では、少なくとも1つの組み込まれたポリヌクレオチドは、内因性R O S A 2 6プロモータによって駆動される。更に別の実施形態では、本明細書に記載される方法は、細胞のゲノムにおけるH 1 1遺伝子座での標的化組み込みのために使用される。一実施形態では、少なくとも1

10

20

30

40

50

つの組み込まれたポリヌクレオチドは、内因性H11プロモータによって駆動される。別の実施形態では、本明細書に記載される方法は、細胞のゲノムにおけるコラーゲン遺伝子座での標的化組み込みのために使用される。一実施形態では、少なくとも1つの組み込まれたポリヌクレオチドは、内因性コラーゲンプロモータによって駆動される。更に別の実施形態では、本明細書に記載される方法は、細胞のゲノムにおけるHTRP遺伝子座での標的化組み込みのために使用される。一実施形態では、少なくとも1つの組み込まれたポリヌクレオチドは、内因性HTRPプロモータによって駆動される。理論的には、所望の位置での正しい挿入のみが、内因性プロモータによって駆動される外因性遺伝子の遺伝子発現を可能にするであろう。

【0253】

いくつかの実施形態では、標的化組み込みの方法のための構築物に含まれる1つ以上の外因性ポリヌクレオチドは、1つのプロモータによって駆動される。いくつかの実施形態では、構築物は、同じプロモータによって駆動される2つの隣接するポリヌクレオチド間に1つ以上のリンカー配列を含み、部分間の物理的分離を高め、酵素機構へのアクセスを最大にする。リンカー配列のリンカーペプチドは、関連する機能に応じて、部分（外因性ポリヌクレオチド、及び／又はそこからコードされるタンパク質又はペプチド）間の物理的分離をより柔軟又はより堅くするように選択されたアミノ酸からなり得る。リンカー配列は、プロテアーゼにより切断可能であり得るか、又は化学的に切断可能であり、別個の部分を生じ得る。リンカーにおける酵素的切断部位の例には、エンテロキナーゼ、第Xa因子、トリプシン、コラゲナーゼ、及びトロンビンなどのタンパク質分解酵素による切断のための部位が含まれる。いくつかの実施形態では、プロテアーゼは、宿主によって天然に産生されるものであるか、又は外因的に導入される。代替的に、リンカー中の切断部位は、選択された化学物質、例えば臭化シアン、ヒドロキシルアミン、又は低pHへの曝露時に切断され得る部位であり得る。必要に応じたリンカー配列は、切断部位の提供以外の目的を果たし得る。リンカー配列は、部分が適切に機能するために、別の隣接部分に対する部分の効果的な配置を可能にするべきである。リンカーはまた、部分間のいずれかの立体障害を防ぐのに十分な長さの単純なアミノ酸配列であってもよい。加えて、リンカー配列は、例えば、リン酸化部位、ビオチン化部位、硫酸化部位、γ-カルボキシル化部位などを含むがこれらに限定されない翻訳後改変を提供することができる。いくつかの実施形態では、リンカー配列は、生物学的に活性なペプチドを単一の望ましくない立体配座に保持しないように柔軟である。リンカーは、柔軟性を提供するために、グリシン、アラニン、及びセリンなどの小さな側鎖を有するアミノ酸から主になってもよい。いくつかの実施形態では、リンカー配列の約80～90パーセント以上が、グリシン、アラニン、又はセリン残基、特にグリシン及びセリン残基を含む。いくつかの実施形態では、G4Sリンカーペプチドは、融合タンパク質の末端プロセシング及びエンドヌクレアーゼドメインを分離する。他の実施形態では、2Aリンカー配列は、2つの別個のタンパク質が単一の翻訳から産生されることを可能にする。好適なリンカー配列は、経験的に容易に同定することができる。加えて、リンカー配列の好適なサイズ及び配列はまた、従来のコンピュータモデリング技術によって決定され得る。一実施形態では、リンカー配列は、自己切断ペプチドをコードする。一実施形態では、自己切断ペプチドは2Aである。いくつかの他の実施形態では、リンカー配列は、配列内リボソーム進入部位（Internal Ribosome Entry Sequence、IRES）を提供する。いくつかの実施形態では、任意の2つの連続するリンカー配列は異なる。

【0254】

標的化組み込みのための外因性ポリヌクレオチドを含む構築物を細胞に導入する方法は、それ自体既知の細胞への遺伝子移入の方法を使用して達成することができる。一実施形態では、構築物は、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、センダイウイルスベクターなどのウイルスベクターの骨格を含む。いくつかの実施形態では、プラスミドベクターは、外因性ポリヌクレオチドを標的細胞（例えば、pAL-11、pXT1、pRC/CMV、pRC/RSV

10

20

30

40

50

、p c D N A I / N e o)などに送達及び／又は発現するために使用される。いくつかの他の実施形態では、エピソームベクターは、外因性ポリヌクレオチドを標的細胞に送達するために使用される。いくつかの実施形態では、組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) を遺伝子操作に使用して、相同組換えを介して挿入、欠失、又は置換を導入することができる。レンチウイルスとは異なり、r A A Vは宿主ゲノムに組み込まれない。加えて、エピソーム r A A Vベクターは、従来の標的化プラスミドのトランスフェクションと比較して、相同指向性遺伝子標的化をはるかに高い割合で仲介する。いくつかの実施形態では、A A V 6又はA A V 2ベクターを使用して、i P S Cのゲノム中の標的部位に挿入、欠失、又は置換を導入する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法及び組成物を使用して取得されたゲノム改変された i P S C及びそれらの派生細胞は、表 1 に列挙された少なくとも 1 つの遺伝子型を含む。

10

【0255】

I I I . ゲノム操作された i P S Cを取得及び維持する方法

本発明はまた、1つ以上の所望の部位での1つ以上の標的化編集（例えば、多重ゲノム操作）を含むゲノム操作された i P S Cを取得及び維持する方法も提供し、1つ以上の標的化編集は、増殖されたゲノム操作された i P S C又は i P S C由来非多能性細胞において、それぞれの選択した編集部位で無傷及び機能的であり続ける。標的化編集は、i P S Cとそこから派生した細胞のゲノムに、挿入、欠失、及び／又は置換を導入する（すなわち、選択した部位での標的化組み込み及び／又はインデル）。患者由来の末梢血由来一次エフェクター細胞の直接操作と比較して、本明細書で提供される i P S Cの編集及び分化を通じて、ゲノム操作されたエフェクター細胞を取得することの多くの利点としては、以下のことが含まれるが、これらに限定されない。操作されたエフェクター細胞の供給源が無制限であること、特に複数の操作された様式が関与する場合、エフェクター細胞の反復操作の必要がないこと、得られたエフェクター細胞が、伸長したテロメアを有し、消耗が少ないために若返っていること、エフェクター細胞集団は、編集部位、コピー数、並びに対立遺伝子変異、ランダム突然変異及び発現多様性 (variegation) の欠如に関して均質であり、これは主に、本明細書において提供される操作された i P S Cにおけるクローン選択が可能であることに起因する。

20

【0256】

いくつかの実施形態では、1つ以上の選択された部位に1つ以上の標的化編集を含むゲノム操作された i P S Cは、細胞維持培養培地 (F M M) 内で長期間単一細胞として維持、継代、及び増殖され、i P S Cは、選択された部位で標的化編集と機能改変を保持する。F M M中で培養された i P S Cは、それらの未分化プロファイル及び基底プロファイル又はナイーブプロファイルを維持し続け；培養洗浄又は選択を必要としない提供されたゲノム安定性を維持し続けることが示されており、3つの体細胞系統全て、すなわち、胚様体又は単層を介するインビトロ分化（胚様体の形成を伴わない）、及びテラトーマ形成によるインビボ分化を容易に生じる。例えば、国際公開第 2 0 1 5 / 1 3 4 6 5 2 号（その開示が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

30

【0257】

いくつかの実施形態では、1つ以上の標的化組み込み及び／又はインデルを含むゲノム操作された i P S Cは、M E K阻害剤、G S K 3阻害剤、及びR O C K阻害剤を含む培地 (F M M) 中で維持され、継代され、増殖され、T G F β 受容体 / A L K 5阻害剤を含まないか、又は本質的に含まず、i P S Cは、選択された部位において無傷で機能的な標的化編集を保持する。

40

【0258】

本発明の別の態様は、i P S Cの標的化編集を通じて、あるいは最初に標的化編集によりゲノム操作非多能性細胞を生成し、次に選択／分離されたゲノム操作非多能性細胞をリプログラミングして非多能性細胞と同じ標的化編集を含む i P S Cを取得することを通じて、ゲノム操作された i P S Cを生成する方法を提供する。本発明の更なる態様は、標的化組み込み及び／又は標的化インデルを細胞に導入することによって同時にリプログラミ

50

ングを受けているゲノム操作非多能性細胞を提供し、接触した非多能性細胞はリプログラミングに十分な条件下にあり、リプログラミングの条件は、非多能性細胞を1つ以上のリプログラミング因子及び小分子と接触させることを含む。同時のゲノム操作及びリプログラミングのための方法の様々な実施形態では、非多能性細胞を1つ以上のリプログラミング因子及び必要に応じて1つ以上の小分子と接触させることによりリプログラミングを開始する前に、又は本質的に同時に、非多能性細胞に標的化組み込み及び／又は標的化インデルを導入することができる。

【0259】

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

10

【0260】

いくつかの実施形態では、リプログラミングは、非多能性細胞を少なくとも1つのリプログラミング因子、及び任意選択でTGFβ受容体／ALK阻害剤、MEK阻害剤、GSK3阻害剤、及びROCK阻害剤の組み合わせと接触させることにより開始される。いくつかの実施形態では、上述の任意の方法によって産生されるゲノム操作されたiPSCは、MEK阻害剤、GSK3阻害剤、及びROCK阻害剤の組み合わせを含む混合物を使用して更に維持及び増殖される。

20

【0261】

ゲノム操作されたiPSCを作製する方法のいくつかの実施形態では、方法は、本明細書に記載のMICA／B腫瘍抗原標的化特異性を含み、本明細書に提供される遺伝子型をもたらす1つ以上の追加のゲノム編集を任意選択で含むゲノム操作されたiPSCを得るために、1つ以上の標的化組み込み及び／又はインデルをiPSCに導入することによって、iPSCをゲノム操作することを含む。代替的に、ゲノム操作されたiPSCを生成する方法は、(a) 1つ以上の標的化編集を非多能性細胞に導入して、選択した部位で標的化組み込み及び／又はインデルを含むゲノム操作された非多能性細胞を取得することと、(b) ゲノム操作された非多能性細胞を1つ以上のリプログラミング因子、並びに必要に応じてTGFβ受容体／ALK阻害剤、MEK阻害剤、GSK3阻害剤及び／又はROCK阻害剤を含む小分子組成物と接触させて、選択された部位で標的化組み込み及び／又はインデルを含むゲノム操作されたiPSCを取得することと、を含む。代替的に、ゲノム操作されたiPSCを生成する方法は、(a) 非多能性細胞を、1つ以上のリプログラミング因子、並びに任意選択で、TGFβ受容体／ALK阻害剤、MEK阻害剤、GSK3阻害剤及び／又はROCK阻害剤を含む小分子組成物と接触させて、非多能性細胞のリプログラミングを開始することと、(b) ゲノム操作のためにリプログラミング非多能性細胞に1つ以上の標的化組み込み及び／又はインデルを導入することと、(c) 選択された部位に標的化組み込み及び／又はインデルを含むクローンのゲノム操作されたiPSCを得ることと、を含む。上記の方法のいずれかは、クローンiPSCを得るために、ゲノム操作されたiPSCの単一細胞ソーティングを更に含み得る。ゲノム操作されたiPSCのクローン増殖を通じて、本明細書で提供されるような少なくとも1つの表現型を有する単一細胞ソーティング及び増殖されたクローン操作iPSCを含むようにマスター細胞バンクが生成される。マスター細胞バンクは、続いて凍結保存され、更なるiPSC操作のためのプラットフォーム、及び既製の操作された均質な細胞療法製品を製造するための再生可能な供給源を提供し、これらの製品は、組成が明確かつ均一であり、費用効果の高い様式でかなりの規模で大量生産することができる。

30

40

【0262】

リプログラミング因子は、国際公開第2015／134652号及び同第2017／066634号に開示されているような、OCT4、SOX2、NANOG、KLF4、L

50

I N 2 8、C-MY C、E C A T 1、U T F 1、E S R R B、S V 4 0 L T、H E S R G、C D H 1、T D G F 1、D P P A 4、D N M T 3 B、Z I C 3、L 1 T D 1、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択され、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。1つ以上のリプログラミング因子は、ポリペプチドの形態であり得る。リプログラミング因子はまた、リプログラミング因子をコードするポリヌクレオチドの形態であり得、したがって、レトロウイルス、センダイウイルス、アデノウイルス、エピソード、プラスミド、及びミニサークルなどのベクターによって非多能性細胞に導入され得る。特定の実施形態では、少なくとも1つのリプログラミング因子をコードする1つ以上のポリヌクレオチドは、レンチウイルスベクターによって導入される。いくつかの実施形態では、1つ以上のポリヌクレオチドは、エピソードベクターによって導入される。様々な他の実施形態では、1つ以上のポリヌクレオチドは、センダイウイルスベクターによって導入される。いくつかの実施形態では、1つ以上のポリヌクレオチドは、プラスミドの組み合わせによって導入される。例えば、国際公開第2019/075057(A1)号(その開示が参照により本明細書に組み込まれる)を参照されたい。

10

【0263】

いくつかの実施形態では、非多能性細胞は、同一の又は異なる選択された部位での標的化組み込みのための複数のベクターによって、異なる外因性ポリヌクレオチド及び／又は異なるプロモータを含む複数の構築物でトランスフェクトされる。これらの外因性ポリヌクレオチドは、自殺遺伝子、又は標的化モダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬学的に活性なタンパク質及びペプチド、薬物標的候補、又はiPSC若しくはその派生細胞の生着、輸送、ホーミング、生存能力、自己複製、持続性、及び／又は生存率を促進するタンパク質をコードする遺伝子を含み得る。いくつかの実施形態では、外因性ポリヌクレオチドは、siRNA、shRNA、miRNA、及びアンチセンス核酸を含むがこれらに限定されないRNAをコードする。これらの外因性ポリヌクレオチドは、構成的プロモータ、誘導性プロモータ、時間特異的プロモータ、及び組織特異的又は細胞型特異的プロモータからなる群から選択される1つ以上のプロモータによって駆動され得る。したがって、ポリヌクレオチドは、プロモータを活性化する条件下で、例えば、誘導剤の存在下で、又は特定の分化した細胞型で発現可能である。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、iPSC及び／又はiPSCから分化した細胞で発現される。一実施形態では、1つ以上の自殺遺伝子は、構成的プロモータにより駆動され、例えば、CAGにより駆動されるキャパーゼ-9である。異なる外因性ポリヌクレオチド及び／又は異なるプロモータを含むこれらの構築物は、同時又は連続的に非多能性細胞にトランスフェクトすることができる。複数の構築物の標的化組み込みに供される非多能性細胞は、1つ以上のリプログラミング因子に同時に接触させて、ゲノム操作と同時にリプログラミングプロセスを開始することができ、これにより、同じ細胞のプールに複数の標的化組み込みを含むゲノム操作されたiPSCを取得することができる。このように、この堅牢な方法により、同時のリプログラミングと操作戦略により、選択された1つ以上の標的部位に組み込まれた複数のモダリティを持つクローンゲノム操作されたhiPSCを誘導できる。

20

30

【0264】

IV. ゲノム操作されたiPSCを分化させることにより遺伝子操作されたエフェクター細胞を取得する方法

40

本発明の更なる態様は、奇形腫形成によるゲノム操作されたiPSCのインビボ分化の方法を提供し、ゲノム操作されたiPSCからインビボで誘導された分化細胞は、所望の部位で標的化組み込み及び／又はインデルを含む無傷で機能的な標的化編集を保持する。いくつかの実施形態では、奇形腫形成を介してゲノム操作されたiPSCからインビボで誘導された分化細胞は、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、ベータ2ミクログロブリン、CD38、GAPDH、TCR、若しくはRUNX1、又はゲノムセーフハーバーの基準を満たす他の遺伝子座を含む、1つ以上の望ましい部位に組み込まれた1つ以上の誘導性自殺遺伝子を含む。いくつかの他の実施形態では、奇形腫形成を介してゲノム操作されたiPSCからインビボで誘導された分化細胞は、標

50

的化モダリティをコードするポリヌクレオチド、又は幹細胞及び／若しくは前駆細胞の輸送、ホーミング、生存能力、自己複製、持続性、及び／若しくは生存率を促進するタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の誘導性自殺遺伝子を含む奇形腫形成を介してゲノム操作されたiPSCからインビボで誘導された分化細胞は、免疫応答の調節及び媒介に関連する内因性遺伝子の1つ以上のインデルを更に含む。いくつかの実施形態では、インデルは、1つ以上の内因性チェックポイント遺伝子に含まれる。いくつかの実施形態では、インデルは、1つ以上の内因性MHCクラスIIサブユニット遺伝子に含まれる。いくつかの実施形態では、インデルは、主要組織適合性複合体と関連する1つ以上の内因性遺伝子に含まれる。いくつかの実施形態では、インデルは、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、GAPDH、RUNX1、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCR α 又は β 定常領域、NKG2A、NKG2D、CD25、CD38、CD44、CD54、CD56、CD58、CD69、CD71、OX40、4-1BB、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、及びTIGITを含むが、これらに限定されない、1つ以上の内因性遺伝子に含まれる。

10

【0265】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される1つ以上の遺伝子改変を含むゲノム操作されたiPSCは、造血細胞系統又は他の特定の細胞型をインビトロで誘導するために使用され、誘導された非多能性細胞は、選択された部位で標的化編集を含む機能的遺伝子改変を保持する。いくつかの実施形態では、造血細胞系統又は他の特定の細胞型をインビトロで誘導するために使用されるゲノム操作されたiPSCは、凍結保存され、それらの使用直前に解凍される、マスター細胞バンク細胞である。一実施形態では、ゲノム操作されたiPSC由来細胞は、決定的な造血内皮（HE）能を有する中胚葉細胞、決定的なHE、CD34⁺造血細胞、造血幹前駆細胞、造血多能性前駆体（MPP）、T細胞前駆体、NK細胞前駆体、骨髓細胞、好中球前駆体、T細胞、NKT細胞、NK細胞、B細胞、好中球、樹状細胞、及びマクロファージを含むがこれらに限定されず、ゲノム操作されたiPSCに由来する細胞は、所望の部位で標的化編集を含む機能的な遺伝子改変を保持する。

20

30

【0266】

iPSC由来造血細胞系統を得るための適用可能な分化方法及び組成物には、例えば、国際公開第2017/078807号に示されるものが含まれ、その開示が参照により本明細書に組み込まれる。提供されているように、造血細胞系統を生成するための方法と組成物は、無血清、フィーダーを含まない、及び／又は間質を含まない条件下で、スケラブルで単層のEB形成を必要としない培養プラットフォームにおいて、iPSCを含む、多能性幹細胞に由来する決定的な造血内皮（HE）を介する。提供された方法に従って分化され得る細胞は、多能性幹細胞から、特定の最終分化細胞及び分化転換細胞にコミットした前駆細胞、及び多能性中間体を経由せずに造血運命に直接移行した様々な系統の細胞にまで及ぶ。同様に、幹細胞を分化させることによって産生される細胞は、多能性幹細胞又は前駆細胞から、最終分化細胞まで、及び全ての介在する造血細胞系統にまで及ぶ。

40

【0267】

単層培養において造血系統の細胞を多能性幹細胞から分化及び増殖させる方法は、多能性幹細胞をBMP経路活性化因子、及び任意選択でbFGFと接触させることを含む。提供されるように、多能性幹細胞由来の中胚葉細胞が得られ、多能性幹細胞から胚様体を形成することなく増殖される。次いで、中胚葉細胞をBMP経路活性化因子、bFGF、及びWNT経路活性化因子との接触に供して、多能性幹細胞から胚様体を形成することなく、決定的な造血内皮（HE）能を有する増殖中胚葉細胞を取得する。その後のbFGFとの接触、及び任意選択でROCK阻害剤、及び／又はWNT経路活性化因子との接触により、決定的なHE能を有する中胚葉細胞は、同様に分化中に増殖される、決定的なHE細胞

50

胞に分化する。

【0268】

本明細書で提供される造血系統の細胞を得るための方法はE B媒介の多能性幹細胞分化より優れているが、これは、E B形成が適度な増殖から最小限の細胞増殖をもたらし、均一な増殖を必要とする多くの用途で重要な単層培養、及び集団内の細胞の均一な分化を可能にせず、骨が折れ、効率が低くなるためである。

【0269】

提供されている単層分化プラットフォームは、造血幹細胞及びT細胞、B細胞、NK T細胞、及びNK細胞などの分化した子孫の誘導をもたらす決定的な造血内皮への分化を促進する。単層分化戦略は、増強された分化効率と大規模な増殖を組み合わせ、種々の治療用途のための多能性幹細胞由来造血細胞の治療上適切な数の送達を可能にする。更に、本明細書で提供される方法を使用した単層培養は、インビトロ分化、インビボ修飾、及びインビボ長期造血自己複製、再構成及び生着の全範囲を可能にする機能的造血系統細胞をもたらす。提供されているように、i P S C由来造血系統細胞には、決定的な造血内皮、造血多能性前駆細胞、造血幹細胞及び前駆細胞、T細胞前駆体、NK細胞前駆体、T細胞、NK細胞、NK T細胞、B細胞、マクロファージ、並びに好中球が含まれるがこれらに限定されない。

【0270】

決定的な造血系統の細胞への多能性幹細胞の分化を指示するための方法は、(i) 多能性幹細胞を、BMP活性化因子、及び必要に応じてb F G Fを含む組成物と接触させて、多能性幹細胞からの中胚葉細胞の分化及び増殖を開始させることと、(i i) 中胚葉細胞を、BMP活性化因子、b F G F、及びG S K 3阻害剤を含む組成物と接触させて、中胚葉細胞からの決定的なH Eの可能性を有する中胚葉細胞の分化及び増殖を開始させることであって、組成物は、任意選択でT G F β 受容体/A L K阻害剤を含まない、ことと、(i i i) 決定的なH E能を有する中胚葉細胞を、R O C K阻害剤、b F G F、V E G F、S C F、I G F、E P O、I L 6、及びI L 11からなる群から選択される1つ以上の増殖因子及びサイトカイン、並びに任意選択でW n t経路活性化因子を含む組成物と接触させて、決定的な造血内皮能を有する多能性幹細胞由来中胚葉細胞からの決定的な造血内皮の分化及び増殖を開始させることであって、組成物は、任意選択でT G F β 受容体/A L K阻害剤を含まない、ことと、を含む。

【0271】

いくつかの実施形態では、方法は、多能性幹細胞を、M E K阻害剤、G S K 3阻害剤、及びR O C K阻害剤を含み、T G F β 受容体/A L K阻害剤を含まない組成物と接触させ、多能性幹細胞を播種及び増殖させることを更に含む。いくつかの実施形態では、多能性幹細胞は、i P S C、又はナイーブi P S C、又は1つ以上の遺伝的インプリントを含むi P S Cであり、i P S Cに含まれる1つ以上の遺伝的インプリントは、そこから分化した造血細胞に保持される。多能性幹細胞の造血系統の細胞への分化を指示するための方法のいくつかの実施形態では、多能性幹細胞の造血系統の細胞への分化は、胚様体の生成がなく、単層培養形態である。

【0272】

上述の方法のいくつかの実施形態では、取得された多能性幹細胞由来の決定的な造血内皮細胞は、C D 3 4⁺である。いくつかの実施形態では、取得された決定的な造血内皮細胞は、C D 3 4⁺ C D 4 3⁻である。いくつかの実施形態では、決定的な造血内皮細胞は、C D 3 4⁺ C D 4 3⁻ C X C R 4⁻ C D 7 3⁻である。いくつかの実施形態では、決定的な造血内皮細胞は、C D 3 4⁺ C X C R 4⁻ C D 7 3⁻である。いくつかの実施形態では、決定的な造血内皮細胞は、C D 3 4⁺ C D 4 3⁻ C D 9 3⁻である。いくつかの実施形態では、決定的な造血内皮細胞は、C D 3 4⁺ C D 9 3⁻である。

【0273】

上述の方法のいくつかの実施形態では、方法は、(i) 多能性幹細胞由来の決定的な造血内皮を、R O C K阻害剤と、V E G F、b F G F、S C F、F l t 3 L、T P O、及び

IL7 からなる群から選択される1つ以上の増殖因子及びサイトカインと、任意選択で BMP 活性化因子を含む組成物と接触させて、プレT細胞前駆体への決定的な造血内皮の分化を開始させることと、任意選択で、(ii) プレT細胞前駆体を、SCF、Flt3L、及びIL7 からなる群から選択される1つ以上の増殖因子及びサイトカインを含むが、VEGF、bFGF、TPO、BMP 活性化因子及びROCK阻害剤のうちの1つ以上を含まない組成物と接触させて、T細胞前駆体又はT細胞へのプレT細胞前駆体の分化を開始させることと、を更に含む。この方法のいくつかの実施形態では、多能性幹細胞由来T細胞前駆体は、 $CD34^+CD45^+CD7^+$ である。この方法のいくつかの実施形態では、多能性幹細胞由来T細胞前駆体は、 $CD45^+CD7^+$ である。

【0274】

多能性幹細胞の造血系統の細胞への分化を指示するための上記方法の更にいくつかの実施形態では、方法は、(i) 多能性幹細胞由来の決定的な造血内皮を、ROCK阻害剤；VEGF、bFGF、SCF、Flt3L、TPO、IL3、IL7、及びIL15 からなる群から選択される1つ以上の増殖因子及びサイトカイン、並びに必要に応じてBMP 活性化因子を含む組成物と接触させ、決定的な造血内皮のプレNK細胞前駆体への分化を開始することと、必要に応じて(ii) 多能性幹細胞由来のプレNK細胞前駆体を、SCF、Flt3L、IL3、IL7、及びIL15 からなる群から選択される1つ以上の増殖因子及びサイトカインを含む組成物と接触させ、VEGF、bFGF、TPO、BMP 活性化因子、及びROCK阻害剤の1つ以上を含まない培地は、プレNK細胞前駆体からNK細胞前駆体又はNK細胞への分化を開始することと、を更に含む。いくつかの実施形態では、多能性幹細胞由来NK前駆体は、 $CD3^-CD45^+CD56^+CD7^+$ である。いくつかの実施形態では、多能性幹細胞由来NK細胞は、 $CD3^-CD45^+CD56^+$ であり、必要に応じて、 $NKp46^+$ 、 $CD57^+$ 及び $CD16^+$ であることによって更に規定される。

【0275】

いくつかの実施形態では、上記の方法から得られるゲノム操作iPSC由来細胞は、AAVS1、CCR5、ROSA26、コラーゲン、HTRP、H11、GAPDH、RUNX1、B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCR α 若しくは β 定常領域、NKG2A、NKG2D、CD25、CD38、CD44、CD54、CD56、CD58、CD69、CD71、OX40、4-1BB、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3、及びTIGIT、又はゲノムセーフハーバーの基準を満たす他の遺伝子座を含む、1つ以上の所望の組み込み部位で組み込まれる1つ以上の誘導性自殺遺伝子を含む。いくつかの他の実施形態では、ゲノム操作されたiPSC由来細胞は、安全スイッチタンパク質、標的化モダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬学的に活性なタンパク質及びペプチド、薬物標的候補、又は幹細胞及び／若しくは前駆細胞の輸送、ホーミング、生存能力、自己複製、持続性、及び／若しくは生存率を促進するタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の自殺遺伝子を含むゲノム操作されたiPSC由来細胞は、チェックポイント遺伝子、内因性T細胞受容体遺伝子、及びMHCクラスIサプレッサ遺伝子を含むがこれに限定されない、免疫応答調節及び媒介と関連する1つ以上の内因性遺伝子に含まれる1つ以上のインデルを更に含む。一実施形態では、1つ以上の自殺遺伝子を含むゲノム操作されたiPSC由来細胞は、B2M遺伝子にインデルを更に含み、B2Mがノックアウトされている。

【0276】

加えて、第1の運命のゲノム操作造血細胞から第2の運命のゲノム操作造血細胞を取得するための適用可能な脱分化方法及び組成物は、例えば、その開示が参照により本明細書に組み込まれている国際公開第2011/159726号に示されているものを含む。その中で提供される方法及び組成物は、リプログラミング中に内因性Nanog遺伝子の発現を制限することによって、開始非多能性細胞を非多能性中間細胞に部分的にリプログラミングすることを可能にし、非多能性中間細胞を、中間細胞を所望の細胞型に分化させる

10

20

30

40

50

ための条件に供する。

【0277】

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

本発明は、いくつかの実施形態では、開示される方法及び組成物を使用してゲノム操作されたiPSCから分化された機能的に増強された派生免疫細胞の単離された集団又は亜集団を含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、組成物のiPSCは、MICA/B-CAR、抗MICA/B抗体と組み合わせた場合にADCCを媒介するCD16若しくはそのバリエーション、腫瘍MICA/Bペプチドを標的とする外因性TCR、又はそれらの任意の組み合わせを介したMICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含み、iPSC由来エフェクター細胞に保持可能な表1に列挙されるような遺伝子型をもたらす1つ以上の追加の標的化遺伝子編集を任意選択で更に含み、遺伝子操作されたiPSC及びその派生細胞は細胞ベースの養子療法に適している。

10

【0278】

一実施形態では、本組成物の遺伝子操作されたエフェクター細胞の単離された集団又は亜集団は、iPSC由来CD34⁺細胞を含む。一実施形態では、組成物の遺伝子操作エフェクター細胞の単離された集団又は亜集団は、iPSC由来HSC細胞を含む。一実施形態では、組成物の遺伝子操作エフェクター細胞の単離された集団又は亜集団は、iPSC由来プロT細胞又はT細胞を含む。一実施形態では、組成物の遺伝子操作エフェクター細胞の単離された集団又は亜集団は、iPSC由来プロNK細胞又はNK細胞を含む。一実施形態では、組成物の遺伝子操作エフェクター細胞の単離された集団又は亜集団は、iPSC由来免疫調節細胞又は骨髄由来のサプレッサ細胞(myeloid derived suppressor cell, MDSC)を含む。

20

【0279】

組成物のいくつかの実施形態では、iPSC由来遺伝子操作エフェクター細胞は、改善された治療の可能性のために、エクスピボで更に調節される。本組成物の一実施形態では、iPSCに由来する遺伝子操作されたエフェクター細胞の単離された集団又は亜集団は、ナイーブT細胞、幹細胞メモリT細胞及び／若しくはセントラルメモリT細胞の数又は比率の増加を含む。本組成物の一実施形態では、iPSCに由来する遺伝子操作されたエフェクター細胞の単離された集団又は亜集団は、I型NK細胞の数又は比率の増加を含む。本組成物の別の実施形態では、iPSCに由来している遺伝子操作エフェクター細胞の単離された集団又は亜集団は、適応NK細胞の数又は比率の増加を含む。本組成物のいくつかの実施形態では、iPSCに由来する遺伝子操作されたCD34⁺細胞、HSC細胞、T細胞、NK細胞、若しくは骨髄由来サプレッサ細胞の単離された集団又は亜集団は、同種異系である。組成物のいくつかの他の実施形態では、iPSCに由来する遺伝子操作されたCD34⁺細胞、HSC細胞、T細胞、NK細胞、又はMDSCの単離された集団又は亜集団は、自家性である。

30

【0280】

組成物のいくつかの実施形態では、分化のためのiPSCは、由来エフェクター細胞において望ましい治療特性を伝えるために選択された遺伝子インプリントを含み、分化中の細胞発生生物学が破壊されず、当該iPSC由来分化造血細胞において遺伝子インプリントが保持され、機能的であることを条件とする。

40

【0281】

組成物のいくつかの実施形態では、多能性幹細胞の遺伝的インプリントは、(i) 非多能性細胞をiPSCにリプログラミングする間若しくはその後に、多能性細胞のゲノムにおけるゲノム挿入、欠失若しくは置換を通じて得られる1つ以上の遺伝子組換えモダリティ、又は(ii) ドナー、疾患、若しくは治療応答に特異的である、供給源特異的免疫細胞の1つ以上の保持可能な治療特性を含み、多能性細胞は、供給源特異的免疫細胞からリプログラミングされ、iPSCは、供給源治療特性を保持し、供給源治療特性はまた、iPSC由来造血系統細胞にも含まれている。

50

【0282】

組成物のいくつかの実施形態では、遺伝子組換えモダリティは、安全スイッチタンパク質、標的化モダリティ、受容体、シグナル伝達分子、転写因子、薬学的に活性なタンパク質及びペプチド、薬物標的候補、又はiPSC若しくはその派生細胞の生着、輸送、ホーミング、生存能力、自己複製、持続性、免疫応答調節及び修飾、並びに／若しくは生存率を促進するタンパク質、のうちの1つ以上を含む。組成物のいくつかの実施形態では、遺伝子改変されたiPSC及びその派生細胞は、MICA／B腫瘍抗原標的化特異性を含み、細胞は、MICA／B-CAR、抗MICA／B抗体と組み合わせた場合にADCCを媒介するCD16若しくはそのバリエーション、腫瘍MICA／Bペプチドを標的とする外因性TCR、又はそれらの任意の組み合わせを任意選択で含み、表1に列挙される遺伝子型をもたらし1つ以上の追加の標的化遺伝子編集を任意選択で含む。組成物のいくつかの他の実施形態では、本明細書に記載されているMICA／B腫瘍抗原標的化特異性を含む遺伝子改変されたiPSC及びその派生細胞は、(1) B2M、TAP1、TAP2、タパシン、NLRC5、CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP、TCR α 若しくはTCR β 定常領域 (TRAC若しくはTRBC)、NKG2A、NKG2D、CD38、CD25、CD69、CD71、CD44、CD54、CD56、CD58、OX40、4-1BB、CIS、CBL-B、SOCS2、PD1、CTLA4、LAG3、TIM3及びTIGITの1つ以上の破壊、並びに／又は(2) 二重特異性若しくは多重特異性又は普遍的エンゲージャとのカップリングのためのHLA-E、HLA-G、4-1BBL、CD3、CD4、CD8、CD47、CD113、CD131、CD137、CD80、PDL1、A2AR、CAR、TCR、Fc受容体、若しくは表面トリガー受容体の1つ以上の導入を含む追加の遺伝子組換えモダリティを更に含む。

10

20

【0283】

組成物の更にいくつかの他の実施形態では、iPSC由来造血系統細胞は、以下のうちの少なくとも2つの組み合わせに関する供給源特異的免疫細胞の治療属性を含む：(i) 1つ以上の抗原標的化受容体の発現、(ii) 改変されたHLA、(iii) 腫瘍微小環境に対する耐性、(iv) バイスタンダー免疫細胞及び免疫修飾の動員、(v) 低減された腫瘍外効果を伴う改善されたオンターゲット特異性、並びに(vi) 改善されたホーミング、持続性、細胞傷害性、又は抗原エスケープ救済。

【0284】

組成物のいくつかの実施形態では、本明細書に記載されるMICA／B腫瘍抗原標的化特異性を含み、表1に列挙される遺伝子型をもたらし1つ以上の追加の標的化遺伝子編集を任意選択で含むiPSC由来造血細胞は、IL2、IL4、IL6、IL7、IL9、IL10、IL11、IL12、IL15、IL18、若しくはIL21を含む少なくとも1つのサイトカイン及び／若しくはその受容体、又はその任意の改変タンパク質を発現し、少なくともMICA／B-CAR、抗MICA／B抗体と組み合わせた場合にADCCを媒介するCD16若しくはそのバリエーション、腫瘍MICA／Bペプチドを標的とする外因性TCR、又はそれらの任意の組み合わせを発現する。組成物のいくつかの実施形態では、細胞は、IL7又はIL15を含む少なくとも1つのサイトカイン及び／又はその受容体を発現する。本組成物のいくつかの実施形態では、サイトカイン(複数可)及びCAR(複数可)の操作された発現は、NK細胞特異的である。いくつかの他の実施形態では、サイトカイン及びCARの操作された発現は、T細胞特異的である。組成物のいくつかの実施形態では、iPSC由来造血エフェクター細胞は、抗原特異的である。組成物のいくつかの実施形態では、抗原特異的派生エフェクター細胞は、液体腫瘍を標的とする。組成物のいくつかの実施形態では、抗原特異的派生エフェクター細胞は、固形腫瘍を標的とする。組成物のいくつかの実施形態では、抗原特異的iPSC由来造血エフェクター細胞は、腫瘍抗原エスケープを救済することができる。

30

40

【0285】

更に、本出願は、MICA／Bを上方制御して、エフェクター細胞腫瘍部位ホーミング、輸送及び保持を増大させる腫瘍感作手順と相乗作用することができる合理的に設計され

50

たエフェクター細胞を提供することによって、併用治療アプローチを可能にし、これは、エフェクター細胞の増大した細胞傷害性及び持続性に寄与する。本明細書に提示されるように、MICA及びMICBは汎腫瘍関連ストレス抗原であり、その結果、腫瘍細胞が感作／ストレス因子に曝露されると、腫瘍細胞は腫瘍細胞表面MICA及びMICB発現を上方制御する。感作時の腫瘍細胞上のストレスタンパク質MICA／Bの上方制御はまた、シェディングによるMICA／B腫瘍抗原の喪失を軽減又は回避する（MICA／B腫瘍細胞表面発現は動的であり、異なる腫瘍株にわたって異なる速度で連続的にシェディングされている）。したがって、本出願のこの態様は、MICA／Bを発現する腫瘍細胞を感作因子に曝露して表面MICA／Bレベルを上昇させ、それによって、限定されないが、MICA／B-CCR、MICA／B標的化TCRを介する、又はエフェクター細胞のMICA／B抗体媒介性ADCC能力を介することを含む、腫瘍MICA／B抗原標的化特異性を含むエフェクター細胞の治療指数を増強することを含む方法を提供する。

10

【0286】

腫瘍感作は、潜在的な腫瘍形成機構（細胞周期進行、炎症、増殖、アポトーシス、浸潤、灌流、転移、及び血管新生を含むが、これらに限定されない）を調節して、本明細書に記載される所望の操作された治療属性を有する同種異系エフェクター細胞などの別の選択的薬物の活性に対して腫瘍細胞をより感受性にし、それによって、腫瘍を標的とする治療エフェクター細胞の有効性を増強することによって、腫瘍耐性を克服するために利用され得る。理論に束縛されるものではないが、本発明の組成物及び方法において有用な例示的な感作因子は、放射線療法、放射性医薬品、又は化学療法剤であってもよい。したがって、本発明の上で論述した組成物は、本明細書に記載されているような感作因子を更に含んでもよい。様々な実施形態では、感作因子は、MICA／Bの腫瘍細胞表面発現を増加させる。

20

【0287】

放射線療法の実施形態としては、高エネルギービーム（例えば、X線、ガンマ線、光子、陽子、中性子、イオン、及びそのような治療に適用可能な任意の他の形態のエネルギー）が機械によって生成され、腫瘍に向けられる、外部ビーム放射線療法；放射線源／粒子を含有するか、さもなければそれに連結されたシード、リボン、又はカプセルが、腫瘍又はがん細胞内又はその近くに配置される、近接照射療法を含むが、これらに限定されない。放射性薬物（例えば、放射性ペプチドを含む放射性医薬品又は放射性核種）の実施形態は、標的化分子（例えば、抗体コンジュゲート）に連結された放射性化合物を含む。

30

【0288】

様々な実施形態では、がん若しくは腫瘍細胞に曝露されるか、又はがん若しくは腫瘍細胞と接触する放射線因子の量は、約0.0001 Gy～約80 Gyの範囲である。したがって、いくつかの実施形態では、対象に提供される、及び／又は本明細書で提供される組成物に含まれる感作因子の量は、少なくとも約0.0001 Gy、少なくとも約0.0005 Gy、少なくとも約0.001 Gy、少なくとも約0.0015 Gy、少なくとも約0.01 Gy、少なくとも約0.015 Gy、少なくとも約0.1 Gy、少なくとも約0.15 Gy、少なくとも約1.0 Gy、少なくとも約1.5 Gy、少なくとも約10.0 Gy、少なくとも約15 Gy、少なくとも約20.0 Gy、少なくとも約25.0 Gy、少なくとも約30.0 Gy、少なくとも約35.0 Gy、少なくとも約40.0 Gy、少なくとも約45.0 Gy、少なくとも約50.0 Gy、少なくとも約55.0 Gy、少なくとも約60.0 Gy、少なくとも約65.0 Gy、少なくとも約70.0 Gy、少なくとも約75.0 Gy、少なくとも約80.0 Gy、又はその間の任意の範囲である。特定の実施形態では、感作因子の量は、約25.0 Gyである。

40

【0289】

放射性医薬品として有用な放射性化合物の例としては、カルシウム-47、炭素-11、炭素-14、クロム-51、コバルト-57、コバルト-58、エルビウム-169、フッ素-18、ガリウム-67、ガリウム-68、水素-3、インジウム-111、ヨウ素-123、ヨウ素-125、ヨウ素-131、鉄（iron）-59、クリプトン-8

50

1 m、ルテチウム－177、窒素－13、酸素－15、リン－32、ラジウム－223、ルビジウム－82、サマリウム－153、セレン－75、ナトリウム－22、ナトリウム－24、ストロンチウム－89、テクネチウム－99m、タリウム－201、キセノン－133、及びイットリウム－90が挙げられるが、これらに限定されない。

【0290】

腫瘍細胞感作に使用できる可能性のある例示的な化学療法剤には、アルキル化剤（シクロホスファミド、メクロレタミン、メファリン、クロラムブシル、ヘアメチルメラミン、チオテパ、ブスルファン、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン）、代謝拮抗剤（メトトレキサート、フルオロウラシル、フロクスウリジン、シタラビン、6-メルカプトプリン、チオグアニン、ペントスタチン）、ピンカアルカロイド（ピンクリスチン、ピンブラスチン、ビンデシン）、エピポドフィロトキシン（エトポシド、エトポシドオルトキノン、及びテニポシド）、抗生物質（ダウノルビシン、ドキソルビシン、ミトキサントロン、ビスアントレン、アクチノマイシンD、プリカマイシン、ピューロマイシン、及びグラミシジンD）、コルヒチン、サイトカラシンB、エメチン、メイタンシン、並びにアムサクリンが含まれるが、これらに限定されない。追加の薬剤には、アミングルテチミド、シスプラチン、カルボプラチン、マイトマイシン、アルトレタミン、シクロホスファミド、ロムスチン（CCNU）、カルムスチン（BCNU）、イリノテカン（CPT-11）、アレムツザマブ、アルトレタミン、アナストロゾール、L-アスパラギナーゼ、アザシチジン、ベバシズマブ、ベキサロテン、ブレオマイシン、ボルテゾミブ、ブスルファン、カルステロン、カペシタビン、セレコキシブ、セツキシマブ、クラドリビン、クロフラビン、シタラビン、ダカルバジン、デニロイキンジフチトクス、ジエチルスチルベストロール、ドセタキセル、ドロモスタノロン、エビルビシン、エルロチニブ、エストラムスチン、エトポシド、エチニルエストラジオール、エキセメスタン、フロクスウリジン、5-フルオロウラシル、フルダラビン、フルタミド、フルベストラント、ゲフィチニブ、ゲムシタビン、ゴセレリン、ヒドロキシウレア、イブリツモマブ、イダルビシン、イフォスファミド、イマチニブ、インターフェロンアルファ（2a、2b）、イリノテカン、レトロゾール、ロイコボリン、ロイプロリド、レバミゾール、メクロレタミン、メゲストロール、メルファリン、メルカプトプリン、メトトレキサート、メトキサレン、マイトマイシンC、ミトタン、ミトキサントロン、ナンドロロン、ノフェツモマブ、オキサリプラチン、パクリタキセル、パミドロネート、ペメトレキセド、ペガデマラーゼ、ペガスパルガーゼ、ペントスタチン、ピボプロマン、プリカマイシン、ポリフェプロサン、ポリフィマー、プロカルバジン、キナクリン、リツキシマブ、サルグラモストム、ストレプトゾシン、タモキシフェン、テモゾロマイド、テニポシド、テストラクトン、チオグアニン、チオテパ、トペテカン、トレミフェン、トシツモマブ、トラスツズマブ、トレチノイン、ウラシルマスタード、バルビシン、ビノレルビン、及びゾレドロネートが含まれる。他の好適な化学剤は、化学療法剤又は放射線療法剤として承認され、当該技術分野で知られているものを含む、ヒトへの使用が承認されているものである。そのような薬剤は、多くの標準的な医師及び腫瘍学者の参考文献（例えば、Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ninth Edition, McGraw-Hill, N. Y., 1995）又はNational Cancer Instituteウェブサイト（fda.gov/cder/cancer/druglistfarne.htm）のうちのいずれかを参照でき、どちらも随時更新される。

【0291】

更に、本出願は、固形がん又は腫瘍などのがん又は腫瘍を有する対象を治療する方法であって、そのような接触／曝露の前のMICA／B表面発現と比較して、表面MICA／B発現を増加又は増強するために対象におけるがん又は腫瘍細胞を感作するステップを含む方法の様々な実施形態を提供する。いくつかの実施形態では、表面MICA／B発現を増加又は増強するためのがん又は腫瘍細胞の感作後、上記のようなエフェクター細胞又はその集団が対象に与えられ／投与され、エフェクター細胞は、MICA／B-CAR、抗

MICA/B抗体と組み合わせた場合にADCCを媒介するCD16若しくはそのバリエーション、MICA/Bペプチドを標的とする外因性TCR、又はそれらの任意の組み合わせを介するMICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含む。いくつかの他の態様において、本明細書において提供される1つ以上の治療剤は、エフェクター細胞又はその集団との併用処置のために更に投与される。いくつかの実施形態では、1つ以上の治療剤は、エフェクター細胞の投与前、投与と同時に、又は投与後に提供されてもよい抗体、エンゲージャ、又はチェックポイント阻害剤を含む。

【0292】

本発明の派生エフェクター細胞、組成物、及び／又は方法を養子細胞療法に適した対象に導入することにより、種々の疾患が改善され得る。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるiPSC由来造血細胞、組成物又は方法は、同種異系養子細胞療法のためのものである。加えて、本発明は、いくつかの実施形態では、養子細胞療法に好適な対象に細胞又は組成物を導入することによる、上記免疫細胞及び／又は治療用組成物及び／又は方法の治療的使用であって、対象が自己免疫障害、血液悪性腫瘍、固形腫瘍、又はHIV、RSV、EBV、CMV、アデノウイルス、若しくはBKポリオーマウイルスと関連する感染を有する、治療的使用を提供する。様々な実施形態では、そのような治療的使用は、エフェクター細胞及び任意選択で1つ以上の治療剤を含む治療用組成物を対象に導入する前に、腫瘍細胞を感作することを更に含んでもよい。

【0293】

血液悪性腫瘍の例には、急性及び慢性白血病（急性骨髄性白血病（acute myelogenous leukemia、AML）、急性リンパ性白血病（acute lymphoblastic leukemia、ALL）、慢性骨髄性白血病（chronic myelogenous leukemia、CML）、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（non-Hodgkin lymphoma、NHL）、ホジキン病、多発性骨髄腫、及び骨髄異形成症候群が含まれるが、これらに限定されない。固形がんの例には、脳、前立腺、乳房、肺、結腸、子宮、皮膚、肝臓、骨、脾臓、卵巣、精巣、膀胱、腎臓、頭、首、胃、子宮頸、直腸、喉頭、及び食道のがんが含まれるが、これらに限定されない。様々な自己免疫傷害の例には、円形脱毛症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、皮膚筋炎、糖尿病（1型）、若年性特発性関節炎のいくつかの形態、糸球体腎炎、グレーブス病、ギランバレー症候群、特発性血小板減少性紫斑病、重症筋無力症、いくつかの形態の心筋炎、多発性硬化症、類天疱瘡／類天疱瘡、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性筋炎、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、リウマチ様関節炎、強皮症／全身性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデス、甲状腺炎のいくつかの形態、ブドウ膜炎のいくつかの形態、白斑、多発血管炎を伴う肉芽腫症（ウェゲナー病）が含まれるが、これらに限定されない。ウイルス感染症の例には、HIV（ヒト免疫不全ウイルス）、HSV（単純ヘルペスウイルス）、KSHV（カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス）、RSV（呼吸器合胞体ウイルス）、EBV（エプスタインバーウイルス）、CMV（サイトメガロウイルス）、VZV（水痘帯状疱疹ウイルス）、アデノウイルス、レンチウイルス、BKポリオーマウイルスに関連疾患が含まれるが、これらに限定されない。

【0294】

本明細書に開示されている実施形態の由来エフェクター細胞又は本明細書で提供される組成物を使用する治療は、症候の提示に基づいて又は再燃防止のために行うことができる。「治療すること」、「治療」などの用語は、本明細書では、概して、所望の薬理学的及び／又は生理学的効果を取得することを意味するために使用される。効果は、疾患を完全に若しくは部分的に予防することに関して予防的であり得、かつ／又は疾患及び／若しくは疾患に起因する有害作用の部分的若しくは完全な治療に関して治療的であり得る。本明細書で使用される場合、「治療」は、対象における疾患のあらゆる介入を網羅し、以下を含む：疾患にかかりやすい可能性があるが、まだそれを有していると診断されていない対象において疾患が生じることを予防すること、疾患を阻害する、すなわちその発症を阻止すること、又は疾患を緩和する、すなわち疾患を後退させること。治療剤及び／又は組成物は、疾患又は傷害の発症前、発症中又は発症後に投与され得る。治療が患者の望ましく

ない臨床症状を安定化又は軽減させる進行中の疾患の治療もまた、特に重要である。特定の実施形態では、治療を必要とする対象は、細胞療法により少なくとも1つの関連する症状を抑制、寛解、及び／又は改善することができる疾患、状態、及び／又は傷害を有する。特定の実施形態は、細胞療法を必要とする対象が、骨髄又は幹細胞移植の候補、化学療法又は放射線療法を受けた対象、過剰増殖性障害又はがん、例えば、造血系の過剰増殖性障害又はがんを有するか又は有するリスクがある対象、腫瘍、例えば、固形腫瘍を有するか又は発症するリスクがある対象、ウイルス感染又はウイルス感染と関連する疾患を有するか又は有するリスクがある対象を含むが、これらに限定されないことを企図する。

【0295】

本明細書に開示された実施形態の由来造血系統細胞を含む治療に対する応答性を評価するとき、応答は、臨床的利益率、死亡までの生存率、病理学的完全奏効、病理学的応答の半定量的測定、臨床的完全寛解、臨床的部分寛解、臨床的安定疾患、無再発生存、無転移生存、無病生存、循環腫瘍細胞減少、循環マーカー応答、及びRECIST（固形腫瘍における応答評価基準（Response Evaluation Criteria In Solid Tumors））基準、のうちの少なくとも1つによって測定できる。

【0296】

本明細書に開示されるiPSC由来エフェクター細胞を含む治療用組成物は、上記のように、がん又は腫瘍細胞の感作を含む他の処置の前、間、及び／又は後に対象に投与することができる。したがって、併用療法の方法は、1つ以上の追加の治療剤の使用前、使用中、及び／又は使用後のiPSC由来エフェクター細胞の投与又は調製も含むことができる。上述のように、1つ以上の追加の治療剤は、ペプチド、サイトカイン、チェックポイント阻害剤、エンゲージャ、マイトジェン、増殖因子、低分子RNA、dsRNA（二本鎖RNA）、単核血球、フィーダー細胞、フィーダー細胞成分又はその補充因子、1つ以上の目的のポリ核酸を含むベクター、抗体、化学療法剤又は放射性部分、又は免疫調節薬（IMiD）を含む。iPSC由来免疫細胞の投与は、追加の治療剤の投与から、時間、日、又は週単位によって時間的に分離することができる。追加的又は代替的に、投与は、抗腫瘍剤、手術などの非薬物療法などであるがこれらに限定されない他の生物活性剤又はモダリティと組み合わせることができる。

【0297】

組み合わせ細胞療法のいくつかの実施形態では、治療的組み合わせは、本明細書において提供されるiPSC由来造血系統細胞及び抗体又は抗体断片である追加の治療剤を含む。いくつかの実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒト化抗体、ヒト化モノクローナル抗体、又はキメラ抗体であってもよい。いくつかの実施形態では、抗体又は抗体断片は、ウイルス抗原に特異的に結合する。他の実施形態では、抗体又は抗体断片は、腫瘍抗原に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、腫瘍又はウイルス特異的抗原は、投与されたiPSC由来造血系統細胞を活性化して、それらの殺傷能力を増強する。いくつかの実施形態では、投与されたiPSC由来造血系統細胞に対する追加の治療剤として、併用治療に適した抗体は、抗CD20抗体（例えば、リツキシマブ、ベルツズマブ、オファツムマブ、ウブリツキシマブ、オカラツズマブ、オビヌツズマブ）、抗HER2抗体（例えば、トラスツズマブ、ペルツズマブ）、抗CD52抗体（例えば、アレムツズマブ）、抗EGFR抗体（例えば、セツキシマブ、アミバンタマブ）、抗GD2抗体（例えば、ジヌツキシマブ）、抗PD-L1抗体（例えば、アベルマブ）、抗CD38抗体（例えば、ダラツムマブ、イサツキシマブ、MOR202）、抗CD123抗体（例えば、7G3、CSL362）、抗SLAMF7抗体（エロツズマブ）、抗MICA/B抗体（7C6、6F11、1C2）、並びにそれらのヒト化若しくはFc改変されたバリエーション若しくは断片、又はそれらの機能的同等物若しくはバイオシミラーを含むがこれらに限定されない。本発明は、本明細書に記載されるMICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含むiPSC由来エフェクター細胞を含む治療用組成物であって、細胞は、表1に列挙される表現型（phenotype）をもたらす1つ以上の追加のゲノム編集と、上記のような抗体又は抗体断片である追加の治療剤とを任意選択で含む治療用

10

20

30

40

50

組成物を提供する。

【0298】

いくつかの実施形態では、追加の治療剤は、1つ以上のチェックポイント阻害剤を含む。チェックポイントは、阻害されていない場合に免疫応答を抑制又は下方制御することができる細胞分子、しばしば細胞表面分子を指す。チェックポイント阻害剤は、チェックポイントの遺伝子発現又は遺伝子産物を低減するか、又はチェックポイント分子の活性を低下させることができるアンタゴニストである。派生エフェクター細胞との併用療法に好適なチェックポイント阻害剤は、上に提供されている。

【0299】

提供される派生エフェクター細胞を含む組み合わせ療法のいくつかの実施形態は、チェックポイント分子を標的化する少なくとも1つの阻害剤を更に含む。提供される派生エフェクター細胞との組み合わせ療法のいくつかの他の実施形態は、2つ、3つ、又はそれ以上のチェックポイント分子が標的とされるように、2つ、3つ、又はそれ以上の阻害剤を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組み合わせ療法のためのエフェクター細胞は、提供されるような派生NK細胞である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の併用療法のためのエフェクター細胞は、派生T細胞である。いくつかの実施形態では、併用療法のための派生NK細胞又はT細胞は、本明細書で提供されるように機能的に増強されている。いくつかの実施形態では、2つ、3つ、又はそれ以上のチェックポイント阻害剤は、派生エフェクター細胞の投与と同時、前、又は後に組み合わせ療法で投与することができる。いくつかの実施形態では、2つ以上のチェックポイント阻害剤は、同時に、又は一度に1つ（逐次的に）投与される。

【0300】

いくつかの実施形態では、上述のチェックポイント分子のうちのいずれかを阻害するアンタゴニストは抗体である。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害抗体は、マウス抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダIg、単一可変新規抗原受容体（VNAR）、サメ重鎖のみ抗体（Ig NAR）、キメラ抗体、組換え抗体、又はこれらの抗体断片であり得る。抗体断片の非限定的な例には、Fab、Fab'、F(ab')₂、F(ab')₃、Fv、一本鎖抗原結合断片（scFv）、（scFv）₂、ジスルフィド安定化Fv（dsFv）、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、単一ドメイン抗原結合断片（sdAb、ナノボディ）、組換え重鎖のみ抗体（VHH）、及び抗体全体の結合特異性を維持するその他の抗体断片が含まれ、それらは、抗体全体よりも、製造するのに費用対効果が高く、より簡単に使用することができ、又は感度が高くあり得る。いくつかの実施形態では、1つ又は2つ又は3つ又はそれ以上のチェックポイント阻害剤は、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、イピリムマブ、IPH4102、IPH43、IPH33、リリムマブ、モナリズマブ、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、及びそれらの誘導体又は機能的同等物のうちの少なくとも1つを含む。

【0301】

派生エフェクター細胞及び1つ以上のチェック阻害剤を含む併用療法は、皮膚T細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（NHL）、菌状息肉症、パジェット様細網症、セザリー症候群、肉芽腫様弛緩皮膚、リンパ腫様丘疹症、慢性苔癬状皰糠疹、急性痘瘡状苔癬状皰糠疹、CD30⁺皮膚T細胞リンパ腫、二次皮膚CD30⁺大細胞リンパ腫、非菌状息肉症CD30皮膚大T細胞リンパ腫、多形性T細胞リンパ腫、レンネルトリリンパ腫、皮下T細胞リンパ腫、血管中心性リンパ腫、芽球性NK細胞リンパ腫、B細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫（HL）、頭頸部腫瘍：扁平上皮がん、横紋筋肉腫、ルイス肺癌（Lewis lung carcinoma、LLC）、非小細胞肺癌、食道扁平上皮がん、食道腺がん、腎細胞がん（renal cell carcinoma、RCC）、結腸直腸がん（colorectal cancer、CRC）、急性骨髄性白血病（AML）、乳がん、胃がん、前立腺小細胞神経内分泌がん（prostatic small cell neuroendocrine carcinoma、SCNC）、肝臓がん、膠芽腫、肝臓がん、口腔扁平上皮がん、膵臓がん、甲状腺乳頭がん、肝内胆管細胞がん、肝細胞がん、骨がん、転移、及び鼻咽頭がんを含むがこれらに限定されない、液性及び固形が

んの治療に適用できる。

【0302】

本明細書で提供されるような派生エフェクター細胞以外のいくつかの実施形態では、治療的使用のための組み合わせは、化学療法剤又は放射性部分を含む1つ以上の追加の治療剤を含む。化学療法剤とは、細胞傷害性抗腫瘍剤、すなわち、腫瘍細胞を優先的に殺傷するか、又は急速に増殖する細胞の細胞周期を破壊するか、又は幹がん細胞を根絶することが見出され、腫瘍性細胞の増殖を防止又は低減するために治療的に使用される化学剤を指す。化学療法剤はまた、抗腫瘍性又は細胞傷害性の薬物又は薬剤と称されることもあり、その例は当該技術分野で既知である。

【0303】

いくつかの実施形態では、化学療法剤は、アントラサイクリン、アルキル化剤、スルホン酸アルキル、アジリジン、エチレンイミン、メチルメラミン、ナイトロジェンマスタード、ニトロソウレア、抗生物質、代謝拮抗剤、葉酸類似体、プリン類似体、ピリミジン類似体、酵素、ポドフィロトキシン、白金含有薬剤、インターフェロン、及びインターロイキンを含む。例示的な化学療法剤には、アルキル化剤（シクロホスファミド、メクロレタミン、メファリン、クロラムブシル、ヘアメチルメラミン、チオテパ、ブスルファン、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン）、代謝拮抗剤（メトトレキサート、フルオロウラシル、フロクスウリジン、シタラビン、6-メルカプトプリン、チオグアニン、ペントスタチン）、ピンカアルカロイド（ピンクリスチン、ピンブラスチン、ビンデシン）、エポドフィロトキシン（エトポシド、エトポシドオルトキノン、及びテニポシド）、抗生物質（ダウノルビシン、ドキソルビシン、ミトキサントロン、ビスアントレン、アクチノマイシンD、プリカマイシン、ピューロマイシン、及びグラミシジンD）、パクリタキセル、コルヒチン、サイトカラシンB、エメチン、メイタンシン、並びにアムサクリンが含まれるが、これらに限定されない。追加の薬剤には、アミングルテチミド、シスプラチン、カルボプラチン、マイトマイシン、アルトレタミン、シクロホスファミド、ロムスチン（CCNU）、カルムスチン（BCNU）、イリノテカン（CPT-11）、アレムツザマブ、アルトレタミン、アナストロゾール、L-アスパラギナーゼ、アザシチジン、ベバシズマブ、ベキサロテン、プレオマイシン、ボルテゾミブ、ブスルファン、カルステロン、カペシタビン、セレコキシブ、セツキシマブ、クラドリビン、クロフラビン、シタラビン、ダカルバジン、デニロイキンジフチトクス、ジエチルスチルベストロール、ドセタキセル、ドロモスタノロン、エピルビシン、エルロチニブ、エストラムスチン、エトポシド、エチニルエストラジオール、エキセメスタン、フロクスウリジン、5-フルオロウラシル、フルダラビン、フルタミド、フルベストラント、ゲフィチニブ、ゲムシタビン、ゴセレリン、ヒドロキシウレア、イブリツモマブ、イダルビシン、イフォスファミド、イマチニブ、インターフェロンアルファ（2a、2b）、イリノテカン、レトロゾール、ロイコボリン、ロイプロリド、レバミゾール、メクロレタミン、メゲストロール、メルファリン、メルカプトプリン、メトトレキサート、メトキサレン、マイトマイシンC、ミトタン、ミトキサントロン、ナンドロロン、ノフェツモマブ、オキサリプラチン、パクリタキセル、パミドロネート、ペメトレキセド、ペガデマラーゼ、ペガスパルガーゼ、ペントスタチン、ピボプロマン、プリカマイシン、ポリフェプロサン、ポルフィマー、プロカルバジン、キナクリン、リツキシマブ、サルグラモストム、ストレプトゾシン、タモキシフェン、テモゾロマイド、テニポシド、テストラクトン、チオグアニン、チオテパ、トペテカン、トレミフェン、トシツモマブ、トラスツズマブ、トレチノイン、ウラシルマスタード、バルルビシン、ビノレルビン、及びゾレドロネートが含まれる。他の好適な薬剤は、化学療法剤又は放射線療法剤として承認され、当該技術分野で知られているものを含む、ヒトへの使用が承認されているものである。そのような薬剤は、多くの標準的な医師及び腫瘍学者の参考文献（例えば、Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ninth Edition, McGraw-Hill, N. Y., 1995）又はNational Cancer Instituteウェブサイト（fda.gov/cder/cancer/dr

10

20

30

40

50

uglistfrarne.htm)のうちのいずれかを参照でき、どちらも随時更新される。

【0304】

サリドマイド、レナリドマイド、及びボマリドマイドなどの免疫調節薬(IMiD)は、NK細胞及びT細胞の両方を刺激する。本明細書において提供されるように、IMiDは、がん治療のためにiPSC派生治療用免疫細胞とともに使用され得る。

【0305】

治療組成物に含まれるiPSC誘導造血系統細胞の単離された集団以外に、対象／患者への投与に適した組成物は、1つ以上の薬学的に許容される担体(添加物)及び／若しくは希釈剤(例えば、薬学的に許容される媒体、例えば細胞培養培地)、又は他の薬学的に許容される成分を更に含むことができる。薬学的に許容される担体及び／又は希釈剤は、部分的には、投与される特定の組成物によって、並びに治療用組成物を投与するために使用される特定の方法によって決定される。したがって、本発明の実施形態の治療用組成物の多種多様な適切な製剤が存在する(例えば、その開示が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed. 1985を参照されたい)。

【0306】

一実施形態では、治療用組成物は、本明細書に開示される方法及び組成物によって作製されたiPSC由来T細胞を含む。一実施形態では、治療用組成物は、本明細書に開示される方法及び組成物によって作製された多能性細胞由来NK細胞を含む。一実施形態では、治療用組成物は、本明細書に開示される方法及び組成物によって作製されたiPSC由来CD34⁺HE細胞を含む。一実施形態では、治療用組成物は、本明細書に開示される方法及び組成物によって作製された多能性細胞由来HSCを含む。一実施形態では、治療用組成物は、本明細書に開示される方法及び組成物によって作製された多能性細胞由来MDS細胞を含む。本明細書に開示されるiPSC由来造血系統細胞の集団を含む治療用組成物は、静脈内、腹腔内、経腸、又は気管投与方法によって個別に、又は他の好適な化合物と組み合わせて投与して、所望の治療目標に影響を与えることができる。

【0307】

これらの薬学的に許容される担体及び／又は希釈剤は、治療用組成物のpHを約3～約10に維持するのに十分な量で存在することができる。このように、緩衝液は、全組成物の重量対重量ベースで約5%もの多さであり得る。塩化ナトリウム及び塩化カリウムなどであるがこれらに限定されない、電解質もまた、治療用組成物に含まれ得る。一態様では、治療用組成物のpHは、約4～約10の範囲である。代替的に、治療用組成物のpHは、約5～約9、約6～約9、又は約6.5～約8の範囲である。別の実施形態では、治療用組成物は、当該pH範囲のうちの1つのpHを有する緩衝液を含む。別の実施形態では、治療用組成物は、約7のpHを有する。代替的に、治療用組成物は、約6.8～約7.4の範囲のpHを有する。更に別の実施形態では、治療用組成物は、約7.4のpHを有する。

【0308】

本発明はまた、部分的に、本発明の実施形態の特定の組成物及び／又は培養物における薬学的に許容される細胞培養培地の使用を提供する。そのような組成物は、ヒト対象への投与に好適である。一般的に言えば、本発明の実施形態によるiPSC由来エフェクター細胞の維持、増殖、及び／又は健康を支持する任意の培地は、医薬細胞培養培地としての使用に適している。特定の実施形態では、薬学的に許容される細胞培養培地は、無血清及び／又はフィーダーを含まない培地である。様々な実施形態では、無血清培地は動物成分を含まず、任意選択で無タンパク質であり得る。任意選択で、培地は、生物薬学的に許容される組換えタンパク質を含み得る。動物成分を含まない培地は、成分が非動物源に由来する培地を指す。組換えタンパク質は、動物を含まない培地で天然の動物タンパク質に取って代わり、栄養素は、合成、植物、又は微生物の供給源から取得される。対照的に、無タンパク質培地は、実質的にタンパク質を含まないと定義される。当業者は、上述の培地

の例は例示であり、本発明での使用に好適な培地の配合を決して限定するものではなく、当業者に既知であり利用可能な多くの好適な培地があることを理解するであろう。

【0309】

iPSC由来造血系統細胞は、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、又は99%のT細胞、NK細胞、NKT細胞、プロT細胞、プロNK細胞、CD34⁺ HE細胞、HSC、B細胞、骨髄由来サプレッサ細胞(MDSC)、調節性マクロファージ、調節性樹状細胞、又は間葉系間質細胞を有することができる。例えば、いくつかの実施形態では、iPSC由来造血系統細胞は、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、又は99%のNK細胞を有することができる。例えば、いくつかの実施形態では、iPSC由来造血系統細胞は、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、又は99%のT細胞を有することができる。いくつかの実施形態では、iPSC由来造血系統細胞は、約95%~約100%のT細胞、NK細胞、プロT細胞、プロNK細胞、CD34⁺ HE細胞、又は骨髄由来サプレッサ細胞(MDSC)を有する。いくつかの実施形態では、iPSC由来造血系統細胞は、約95%~約100%のNK細胞を有する。いくつかの実施形態では、iPSC由来造血系統細胞は、約95%~約100%のT細胞を有する。いくつかの実施形態では、本発明は、細胞治療を必要とする対象を治療するための、約95%のT細胞、NK細胞、プロT細胞、プロNK細胞、CD34⁺ HE細胞、又は骨髄由来サプレッサ細胞(MDSC)の単離された集団を有する組成物などの、精製T細胞又はNK細胞を有する治療用組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、細胞療法を必要とする対象を治療するための、約95%のNK細胞の単離された集団を有する組成物などの、精製NK細胞を有する治療用組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、細胞療法を必要とする対象を治療するための、約95%のT細胞の単離された集団を有する組成物などの、精製T細胞を有する治療用組成物を提供する。

【0310】

本出願の一態様は、MICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含むエフェクター細胞の1つ以上の治療用量を投与することによって、治療することを必要とする対象を治療する方法であって、細胞は、MICA/B-CAR、抗MICA/B抗体と組み合わせた場合にADCCを媒介するCD16若しくはそのバリエーション、MICA/Bペプチドを標的とする外因性TCR、又はそれらの任意の組み合わせを任意選択で含む、細胞は、表1に列挙される遺伝子型をもたらす1つ以上の追加のゲノム編集を任意選択で含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、本出願は、そのような接触/曝露の前のMICA/B表面発現と比較して、MICA/Bの表面発現を増加又は増強するために対象におけるがん又は腫瘍細胞を最初に感作することによって、がん又は腫瘍を有する対象を治療する方法を提供する。がん又は腫瘍細胞の感作後、上記のようなエフェクター細胞又はその集団が対象に与えられ/投与され、エフェクター細胞は、本明細書に提供されるMICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含み、細胞は、表1に列挙される遺伝子型をもたらす1つ以上の更なるゲノム編集を任意選択で含む。様々な態様では、エフェクター細胞又はその集団は、上記のような1つ以上の更なる治療剤の前に、又はそれと同時に提供されてもよい。

【0311】

本出願の別の態様は、併用細胞療法を使用して、必要とする対象を治療する方法を提供する。併用細胞療法のいくつかの実施形態では、治療することを必要とする対象を治療する方法は、1つ以上の治療用量の、本明細書に記載されているMICA/B腫瘍抗原標的化特異性を含むエフェクター細胞を投与することであって、当該細胞は、表1に列挙される遺伝子型をもたらす1つ以上の更なるゲノム編集を任意選択で含む、投与することと、並びにペプチド、サイトカイン、チェックポイント阻害剤、エンゲージャ、マイトジェン、増殖因子、低分子RNA、dsRNA(二本鎖RNA)、単核血球、フィーダー細胞、フィーダー細胞成分若しくはその補充因子、1つ以上の目的のポリ核酸を含むベクター、抗体、化学療法剤若しくは放射性部分、又は免疫調節薬(IMiD)を含む1つ以上の治療剤を投与することと、任意選択で、本明細書で提供される放射線療法、放射性医薬品又

は化学療法剤を含む感作因子を投与することによって対象の腫瘍細胞を前処置することを含む。

【0312】

当業者が理解するように、本明細書において提供される方法及び組成物に基づくiPSCから派生する自己と同種異系の造血系統細胞の両方は、上述のような細胞療法で 사용할ことができる。自家移植の場合、由来造血系統細胞の単離された集団は、患者と完全又は部分的にHLA適合する。別の実施形態では、派生造血系統細胞は、対象とHLA適合せず、派生造血系統細胞は、HLA I及び／又はHLA II欠損を有するNK細胞又はT細胞である。

【0313】

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

【0314】

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

【0315】

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

【0316】

別の例示的な実施形態では、対象に提供される細胞の有効量は、約 2×10^6 細胞／kg、約 3×10^6 細胞／kg、約 4×10^6 細胞／kg、約 5×10^6 細胞／kg、約 6×10^6 細胞／kg、約 7×10^6 細胞／kg、約 8×10^6 細胞／kg、約 9×10^6 細胞／kg、又は約 10×10^6 細胞／kg、又はそれ以上の細胞／kgであり、介在する全ての細胞用量を含む。

【0317】

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

10

20

30

40

50

g ～約 10×10^6 細胞 / kg、約 3×10^6 細胞 / kg ～約 10×10^6 細胞 / kg、約 4×10^6 細胞 / kg ～約 10×10^6 細胞 / kg、約 5×10^6 細胞 / kg ～約 10×10^6 細胞 / kg、 2×10^6 細胞 / kg ～約 6×10^6 細胞 / kg、 2×10^6 細胞 / kg ～約 7×10^6 細胞 / kg、 2×10^6 細胞 / kg ～約 8×10^6 細胞 / kg、 3×10^6 細胞 / kg ～約 6×10^6 細胞 / kg、 3×10^6 細胞 / kg ～約 7×10^6 細胞 / kg、 3×10^6 細胞 / kg ～約 8×10^6 細胞 / kg、 4×10^6 細胞 / kg ～約 6×10^6 細胞 / kg、 4×10^6 細胞 / kg ～約 7×10^6 細胞 / kg、 4×10^6 細胞 / kg ～約 8×10^6 細胞 / kg、 5×10^6 細胞 / kg ～約 6×10^6 細胞 / kg、 5×10^6 細胞 / kg ～約 7×10^6 細胞 / kg、 5×10^6 細胞 / kg ～約 8×10^6 細胞 / kg、又は 6×10^6 細胞 / kg ～約 8×10^6 細胞 / kg であり、介在する全ての細胞用量を含む。

10

【0318】

いくつかの実施形態では、派生造血系統細胞の治療的使用は、単回投与治療である。いくつかの実施形態では、由来造血系統細胞の治療的使用は、複数回用量治療である。いくつかの実施形態では、複数回投与治療は、毎日、3日ごと、7日ごと、10日ごと、15日ごと、20日ごと、25日ごと、30日ごと、35日ごと、40日ごと、45日ごと、50日ごとの1回の投与、又はその間の任意の日数の任意の回数の投与である。いくつかの実施形態では、複数回投与治療は、3回、4回、又は5回の週1回用量を含む。3回、4回、又は5回を含む複数回投与治療のいくつかの実施形態では、週1回用量は、追加の単回用量又は複数回用量が必要かどうかを決定するための観察期間を更に含む。

20

【0319】

本発明の派生造血系統細胞の集団を含む組成物は、無菌であり得、ヒト患者／対象への投与に好適であり、すぐに投与され得る（すなわち、更なる処置を伴わずに投与され得る）。すぐに投与される細胞ベースの組成物は、組成物が、対象への移植又は投与の前に、いずれかの更なる処理又は操作を必要としないことを意味する。他の実施形態では、本発明は、小化学分子を含む1つ以上の薬剤の投与前に増殖及び／又は調整される、派生造血系統細胞の単離された集団を提供する。iPSC由来エフェクター細胞を含む免疫細胞を調節するための組成物及び方法は、例えば、国際公開第2017/127755号（その関連する開示は参照により本明細書に組み込まれる）に詳細に記載されている。組換えTCR又はCARを発現するように遺伝子操作された由来造血系統細胞については、細胞は、例えば、米国特許第6,352,694号に記載されている方法を使用して活性化及び増殖させることができる。

30

【0320】

特定の実施形態では、由来造血系統細胞に対する一次刺激シグナル及び共刺激シグナルは、異なるプロトコルによって提供することができる。例えば、各シグナルを提供する薬剤は、溶液中にあるか、又は表面に結合することができる。表面に結合される場合、薬剤は、同じ表面に（すなわち、「シス」形成で）又は別個の表面に（すなわち、「トランス」形成で）結合され得る。代替的に、一方の薬剤を表面に結合させ、他方の薬剤を溶液中に存在させることができる。一実施形態では、共刺激シグナルを提供する薬剤は、細胞表面に結合することができ、一次活性化シグナルを提供する薬剤は、溶液中にあるか、又は表面に結合される。特定の実施形態では、両方の薬剤が溶液中にあり得る。別の実施形態では、薬剤は、可溶性形態とし、次いで、本発明の実施形態でのTリンパ球の活性化及び増殖での使用に企図される人工抗原提示細胞（aAPC）についての米国特許公開第2004/0101519号及び同第2006/0034810号（これらの開示は参照により組み込まれる）に開示されているような、Fc受容体を発現する細胞、又はこの薬剤に結合する抗体若しくは他の結合剤など、表面に架橋させることができる。

40

【0321】

投与量、頻度、及びプロトコルのいくらかの変動は、治療される対象の状態に応じて必然的に発生する。投与の責任者は、いずれにしても、個々の対象に対しての適切な用量、頻度及びプロトコルを決定する。

50

【実施例】

【0322】

次の例は、例示のために提供されるものであり、限定のためのものではない。

【0323】

実施例1－材料及び方法

様々なプロモータの制御下で自殺系を効果的に選択し、異なるセーフハーバー遺伝子座組み込み戦略と組み合わせて試験するために、単一細胞の継代と高スループットの96ウェルプレートベースのフローサイトメトリーソーティングを可能にする、出願人独自のhiPSCプラットフォームを使用し、単一又は複数の遺伝子調整によるクローンhiPSCの導出を可能にした。

【0324】

小分子培養におけるhiPSCの維持：hiPSCは、培養のコンフルエンスが75%～90%に達すると、単一細胞として日常的に継代された。単一細胞解離のために、37℃で3～5分間、hiPSCをPBS (Mediatech) で洗浄し、Accutase (Millipore) で処理した。次いで、単細胞懸濁液を従来の培地と混合し、FMMに再懸濁し、マトリゲルでコーティングした表面に播種した。継代は通常1：6～1：8で、マトリゲルで前もってコーティングされた組織培養プレートに移し、2～3日ごとにFMMを供給した。細胞培養は、37℃、5～10% CO₂に設定された加湿インキュベーターで維持された。

【0325】

ZFNによるヒトのiPSC操作、目的のモダリティの標的化編集のためのCRISPR：ROSA26標的化挿入を例として使用して、ZFNを介したゲノム編集では、200万個のiPSCが、2.5 µgのZFN-L、2.5 µgのZFN-Rの混合物及びAAVS1標的化挿入用の5 µgのドナー構築物でトランスフェクトされた。CRISPRを介したゲノム編集では、200万個のiPSCが、5 µgのROSA26-gRNA/Cas9とROSA26標的化挿入用の5 µgドナー構築物の混合物でトランスフェクトされた。Neonトランスフェクションシステム (Life Technologies) を使用してトランスフェクションを行った。トランスフェクション後の2日目又は3日目に、プラスミドに人工プロモータ駆動型GFP及び／又はRFP発現カセットが含まれている場合、フローサイトメトリーを使用してトランスフェクション効率を測定した。

【0326】

ゲノム編集されたiPSCの一括ソーティング及びクローンソーティング：ZFN又はCRISPR-Cas9を使用したゲノム標的化編集を含むiPSCに、GFP⁺ SSEA4⁺ TRA181⁺ iPSCの一括ソーティング及びクローンソーティングを行った。単一細胞解離された標的化iPSCプールを、最適な性能のために新規に作製した、ハンクス平衡塩溶液 (Mediatech)、4%ウシ胎児血清 (Invitrogen)、1×ペニシリン／ストレプトマイシン (Mediatech)、及び10mMのHepes (Mediatech) を含む染色緩衝液に再懸濁した。SSEA4-PE、TRA181-Alexa Fluor-647 (BD Biosciences) などのコンジュゲート一次抗体を細胞溶液に加えた。溶液を染色緩衝液で洗浄し、スピンし、フローサイトメトリーでのソーティングのために10 µMチアゾピブを含む染色緩衝液に再懸濁した。フローサイトメトリーによるソーティングは、FACS Aria II (BD Biosciences) で行った。ソーティングが完了したら、96ウェルプレートにインキュベートした。コロニー形成は早くも2日目に検出され、ほとんどのコロニーはソーティング後7～10日の間に増殖した。最初の継代では、ウェルをPBSで洗浄し、30 µLのアキュターゼで解離させた。解離したコロニーを、予め5×マトリゲルでコーティングした96ウェルプレートの別のウェルに移す。その後の継代は日常的に行った。各クローン細胞株をGFP蛍光レベル及びTRA1-81発現レベルについて分析した。クローン集団を凍結保存し、マスター細胞バンクとして機能させる前に、ほぼ100%のGFP⁺ 及びTRA1-81⁺ を有するクローン株を、操作されたiPSCのオフターゲット

編集及び／又は核型を含むがこれらに限定されない更なるスクリーニング及び分析のために選択した。フローサイトメトリー分析はGuava EasyCyte 8 HT (Millipore) で実行され、Flowjo (Flowjo, LLC) を使用して分析された。

【0327】

実施例2-MICA/B-CARを発現する免疫細胞は、汎腫瘍反応性を示す。

がん細胞株エンサイクロペディア (The Cancer Cell Line Encyclopedia, CCLE) 公開データベースは、約1600のがん株のリストを有し、そのうち1083 (約65%) がMICA又はMICB陽性のいずれかである。候補腫瘍株の選択したコレクションにわたるMICA、MICB及びいくつかの他の腫瘍共抗原mRNA発現レベルが図1Aに示されており、本明細書において提供される方法及び組成物によって、MICA/Bを発現する液性腫瘍に加えて、黒色腫、子宮頸がん、結腸直腸がん、乳がん、卵巣がん及び骨肉腫を含むがこれらに限定されないそのようながん／腫瘍を標的化可能であることを示す。代表的な固形腫瘍株の選択にわたってフローサイトメトリーによって、MICA/B、上皮増殖因子受容体 (EGFR)、HER2及びPD-L1の表面タンパク質発現を更に決定し、相対蛍光強度を、ビーズ当たり特定数のPE分子を含有する基準ラテックスビーズと比較することによって、表面抗原分子の数を計算した (図1B)。最後に、確立された免疫組織化学 (IHC) 法を使用して、治療未経験患者の腫瘍外科切片をMICA/B及びEGFR発現について評価した。3つ全ての腫瘍にわたって、異なる染色密度で、陽性MICA/B発現が観察された。対照的に、EGFRは、腫瘍指標によって決定される特徴的な染色パターンを示した (図1C)。同じ腫瘍内で観察された抗原不均一性及び複数の抗原の存在は、腫瘍細胞傷害を最大化するために複数抗原標的化の可能性のあることを明瞭に示す。

【0328】

7C6抗体の結合ドメインを含むMICA/B-CARを発現するiPSC由来NK細胞 (MICA/B-CAR iNK) の反応性を試験するために、MICA及び／又はMICB陽性腫瘍株の広範なコレクションと、2:1のE:T比で、37℃で、CD107a/b抗体の存在下において、細胞をインキュベートした。4時間後、細胞を残存腫瘍細胞と区別するために、CD56及びCD16でMICA/B-CAR iNK細胞を表面染色し、%IFN γ 、TNF α 及び脱顆粒 (CD107a/b⁺) 細胞を定量し、サイトカインの産生及び脱顆粒によって測定した場合、MICA/B-CAR iNK細胞が、CAR陰性iNK細胞と比較して、MICA/Bを発現する腫瘍細胞に対して反応性であることを示した (図2)。

【0329】

別の実験において、抗原認識領域がMICA及びMICBの保存された $\alpha 3$ ドメインに特異的に結合するscFVである、MICA/B標的化CAR (本明細書において「MICA/B-CAR」と称される) を含むiPSC由来NK細胞を調製し、凍結保存した。MICA/B-CAR iNK細胞の導入遺伝子プロファイル (図3A) は、非改変iNK、増殖された末梢血 (PB) NK及び末梢血由来単核細胞 (PBMC) 画分内に含有されるNK細胞と比較して、MICA/B-CAR iNK細胞が外因性CD16、CD38ノックアウト、及びIL15RFを更に含むことを示す。全てのNK細胞は、CD45⁺CD56⁺CD3⁻プロファイルを有する。MICA/Bの天然発現が高い、中程度及び低い表記腫瘍細胞株との、1:1のE:T比での4時間の共インキュベーションに応答したMICA/B特異的サイトカイン放出を、Meso-Scale Discover (MSD) によって測定した (図3B)。

【0330】

MICA/B-CAR iNK細胞の腫瘍増殖阻害を、肺がん異種移植モデルにおいてインビボで評価した。5 $\times 10^5$ 個の肺腺がん (Calu3; 低MICA/B発現) 腫瘍細胞を0日目にNSGマウスに静脈内注射した。3日目に、1 $\times 10^7$ 個の解凍したMICA/B-CAR iNK細胞又はHER2-CARを発現する2 $\times 10^6$ 個の初代T細胞

胞の第1の静脈内用量をマウスに与え、続いて、7日目に同じ細胞の第2の等しい用量を与え、10日目に第3の用量を与えた（図4A）。腫瘍増殖を治療の過程で評価し（図4B）、生物発光イメージング（BLI）測定を毎週行った（図4C）。

【0331】

実施例3-MICA/B-CARを発現する免疫細胞は、ADCC能力を有する抗体の存在下で増強されたエフェクター機能を示す。

MICA/B-CAR iNK細胞の汎腫瘍反応性をADCCと組み合わせて更に拡張することができるかどうかを試験するために、MSDプラットフォームを使用してIFN γ 及びTNF α の上清濃度を定量しながら、約1 μ g/mLのアベルマブ（抗PD-L1抗体）、セツキシマブ（抗EGFR抗体）、又はトラスツズマブ（抗HER2抗体）あり又はなしで、hnCD16を更に発現するMICA/B-CAR iNK細胞を、4時間、2:1のE:T比で1 $\times$ 10⁵個のCaSki細胞とインキュベートした（図5）。MICA/B陽性腫瘍細胞株に対して最小限の天然細胞傷害を示し（図2を参照されたい）、ADCCの状況でのみ細胞傷害を実行することができるCAR陰性iNK細胞と比較して、MICA/B-CAR iNK細胞の腫瘍細胞反応性は、表面MICA又はMICBを発現する腫瘍株に対して特異的であり、ADCC能力を有するモノクローナル抗体（mAb）によって効果的に増強/拡大することができる。

【0332】

セツキシマブ（抗EGFR抗体）、トラスツズマブ（抗HER2抗体）又はアベルマブ（抗PD-L1抗体）あり又はなしで、対照NK細胞（CAR陰性iNK細胞）及びMICA/B-CAR⁺NK細胞と3:1のエフェクター:標的（E:T）比でインキュベートすることによって、追加の及び複数の代表的な抵抗性MICA/B⁺腫瘍細胞株を試験した。xCeLLigence（商標）及び/又はIncucyte（登録商標）細胞アッセイプラットフォームを使用して、腫瘍細胞傷害を測定した。図6A~6Bに示される直接及びモノクローナル抗体媒介性ADCC（抗体依存性細胞傷害）は、MICA/B-CAR CD16⁺iNK細胞の複数抗原標的化能力を実証し、したがって、MICA/Bの喪失によるいずれの腫瘍エスケープも制限する。

【0333】

更に、5 μ g/mLのアベルマブあり又はなしで、トリプルネガティブ乳がん（TNBC）株、MDA-MB-231の野生型（WT）及びMICA/Bノックアウト（KO）細胞を、3:1のE:T比でMICA/B-CAR iNK細胞と共培養した。xCeLLigence（商標）及び/又はIncucyte（登録商標）細胞アッセイプラットフォームを使用して、腫瘍細胞傷害を測定した。異なって発現された蛍光タンパク質の検出を介して、直接的細胞傷害及びADCCを評価し、腫瘍単独条件に対する残存腫瘍細胞のパーセンテージとして提示した（図7）。

【0334】

等モル濃度の抗EGFR/c-MET（アミバンタマブ、EGFR及びMETを標的とし、Fcを介してADCC能力を示すIgG1二重特異性抗体）、抗EGFR（セツキシマブ）、抗PD-L1（アベルマブ）又は抗HER2（トラスツズマブ）mAbあり及びなしで、NCI-H1975非小細胞肺癌（NSCLC）株のEGFRエクソン20挿入変異体（図8A）及び肺腺がんCalu3細胞（図8B）を、3:1のE:Tの比で、MICA/B-CAR iNK細胞とともにインキュベートし、パーセント細胞溶解又は腫瘍単独条件に対する残存腫瘍細胞のパーセンテージを経時的に測定した。図7、8A及び8Bに示されるように、MICA/B-CAR iNK細胞抗腫瘍活性及び抗原認識は、腫瘍標的化モノクローナル抗体と組み合わせて増強される。

【0335】

MICA/B-CARエフェクター細胞インビボ機能の特徴付けのために、表面検出可能なヒトMICAタンパク質を発現するようにB16/F10黒色腫細胞を操作し、NSGマウスあたり1.0 $\times$ 10⁴細胞の用量で静脈内（i.v.）注射した。腫瘍移植後3日目に、いずれもMICA/B-CARを発現するように操作された2 $\times$ 10⁶個のプー

10

20

30

40

50

ルされた初代T細胞又は 1×10^7 個のiNK細胞を、野生型B16/F10 (MICA⁻) 又はB16/F10 MICA陽性 (MICA⁺) 転移性腫瘍を含有するマウスに静脈内注射した。11日後、低倍率顕微鏡を使用して、肺B16/F10転移性 (met) 腫瘍の数を数え (図9A)、MICA/B-CAR含有T細胞及びiNK細胞はいずれも、インビボで腫瘍量を低下させた。MICA/B-CAR iNKは、ヒトMICAを過剰発現するように操作されたB16-F10細胞を使用したマウス転移性黒色腫モデルにおいて、CAR陰性iNK対照細胞と比較して、肺 (図9B) 及び肝臓 (図示せず) 転移の数を有意に低下させた。

【0336】

図10Aに示される別個のインビボ特徴付けアッセイにおいて、エフェクター細胞の複数回投与に関連する腫瘍増殖阻害を、ヒト肺腺がん異種移植モデルにおいて評価した。 5×10^5 個の肺腺がん (Calu3; 低MICA/B発現) 腫瘍細胞を0日目にNSGマウスに静脈内注射した。3日目に、単独で又はトラスツズマブ (ハーセプチン (商標) として商業的に知られている抗HER2抗体) と組み合わせて、 1×10^7 個の3MICA/B-CAR iNK細胞の第1の静脈内用量をマウスに与え、続いて、7日目に同じ細胞の第2の等しい用量を、10日目に第3の用量を与えた。処置の過程で腫瘍増殖を評価し、生物発光イメージング (BLI) 測定を毎週行った (図10B)。示されるように、併用療法 (すなわち、トラスツズマブと組み合わせたMICA/B-CAR iNK細胞) は、ハーセプチン (商標) 単独と比較して有意な腫瘍増殖阻害 (TGI) を実証する。したがって、MICA/B-CAR iNK細胞は、インビボ機能性を示すのみならず、抗HER2 (トラスツズマブ) ADCの状況での増強されたインビボ機能性を示す。

【0337】

実施例4-二重CARを発現する免疫細胞は増加した機能性を示す。

標的化細胞療法に対する耐性は、腫瘍内の抗原喪失及びクローン不均一性から生じることができ。2つの腫瘍関連抗原 (Tumor Associated Antigens、TAA) を標的とする二重CARアプローチを試験し、B細胞成熟抗原 (BCMA) 及びMICA/Bを標的とする有効な組み合わせを実証した。本実施例では、BCMA-CAR、MICA/B-CAR、又はそれらの組み合わせを有するレンチウイルスで初代T細胞を形質導入して、単一CAR及び二重CAR T細胞を生成した。図11に示すように、各CARの下流に位置するレポーター遺伝子上で、形質導入された細胞が濃縮された。抗CD38などの治療用抗体と組み合わせて使用される場合、得られる養子細胞療法は、治療を回避するために腫瘍抗原を脱落させ又は下方制御する多発性骨髄腫などの悪性細胞に対する完全な治療アプローチのために、3つのTAAを標的とする。

【0338】

二重CAR-T細胞のアビディティ及び機能的応答を評価するために、示されたCAR-T試料とともにNa1m6-BCMA-MICA細胞をインキュベートし、音波を利用して、十分に制御された力を数百の個々の細胞に並行して及ぼし、単一細胞とそれらの標的との間の相互作用を高スループットで測定するLumicks z-Movi (登録商標) を使用して0~1000 pNの範囲の音響力の傾斜に曝露した。エフェクター細胞が、0~1000 pNの範囲の力に対応する力の傾斜 (force ramp) に供されると、結合していない細胞及び弱く結合した細胞は、それらの標的から外れる。結合した細胞のパーセンテージが高いほど、エフェクター細胞が有するアビディティ及び機能的応答は高くなる。この傾斜にわたって結合した細胞のパーセンテージが図12Aに示されており、二重CAR-T細胞は、各個々のCARを発現するCAR-T細胞よりも高いアビディティを示した。

【0339】

二重CAR-T細胞の細胞傷害を評価するために、Na1m6-BCMA-MICA標的細胞を、1:8のE:Tの比で、図12Bに示されている表記CAR-T細胞試料とともにインキュベートした。Incucyte (登録商標) 細胞アッセイプラットフォームを使用して、36時間にわたって、共培養物を標的細胞死滅についてモニターした。示さ

れるように、二重CAR-T細胞は、各個々のCARを発現するCAR-T細胞よりも増加した細胞傷害を示した。

【0340】

反応性を試験するために、タンパク質輸送阻害剤の存在下で4時間、1:1のE:T比で、MICA/B-CAR T細胞、BCMA-CAR T細胞又は二重CAR T細胞を表記の標的株とともにインキュベートした。アッセイの終わりに、細胞を収集し、表面を染色し、%TNF α 及び脱顆粒(CD107a⁺)細胞を定量し、サイトカイン産生及び脱顆粒によって測定すると、二重CAR-T細胞は、各個々のCARを発現するCAR-T細胞と比較して、MICA/B発現腫瘍細胞、BCMA発現腫瘍細胞、及び両方の抗原を発現する腫瘍細胞に対して増加した反応性を示すことが示された(図13)。

10

【0341】

次いで、多発性骨髄腫腫瘍株のパネルを、フローサイトメリーによって、腫瘍抗原BCMA(青色)及びMICA/B(紫色)の発現についてスクリーニングした。図14に示されているように、各抗原の様々な発現がいくつかの系統にわたって観察され、全ての株が少なくとも1つの抗原について陽性であった。別の実験では、図15に示されているように、NLR標識されたH929多発性骨髄腫腫瘍細胞及びRPMI8226多発性骨髄腫腫瘍細胞を表記のCAR-T細胞とともに培養し、Incucyte(登録商標)アッセイプラットフォームを使用して48時間にわたって細胞死滅についてモニターした。示されるように、二重CAR-T細胞は、各個々のCARを発現するCAR-T細胞と比較して、多発性骨髄腫腫瘍細胞株へのより大きな細胞傷害(cytotoxicity)を示し、対応する曲線下面積の値が右パネルに示されている。カスパーゼ3/7について染色され、フローサイトメリーによって分析される前に、図14からの多発性骨髄腫腫瘍株又はNalm6-BCMA細胞の各々を、非形質導入細胞又はBCMA/MICA二重CAR-T細胞とともに、様々なE:T比で4時間共培養した。図16に示されているように、非形質導入細胞は、標的細胞に対して特異的な細胞傷害を示さなかったのに対して、二重CAR-T細胞は、いくつかの多発性骨髄腫腫瘍株の腫瘍細胞を認識し、死滅させた。最良適合曲線に対して計算されたEC50値も示されている。

20

【0342】

別のインビボアッセイでは、NSGマウスにルシフェラーゼ化MM1S腫瘍細胞を静脈内注射し、2日後にビビクルのみ、非形質導入エフェクター細胞又はBCMA/MICA二重CAR-T細胞で処置した。図17に示されているように、発光の総フラックスによって腫瘍増殖を16日間にわたってモニタリングし、BCMA/MICA二重CAR-T細胞は、ビビクルのみ又は非形質導入エフェクター細胞と比較して有意な腫瘍増殖阻害(TGI)を示した。したがって、二重CAR-T細胞は、増強されたインビボ機能性を示す。

30

【0343】

実施例4-腫瘍細胞を感作することは、MICA/B発現を増大させる。

種々のがん細胞株を0~25GyのX線放射線(± 25 Gy)に曝露して、MICA/B発現腫瘍細胞の感作の可能性を調査した。照射後、細胞表面MICA/Bのシェディングを防止するために、及び検出能力を増強するために、約15 μ g/mLのMICA/B α 3ドメイン結合抗体とともに直ちに細胞を培養し、又は対照mAbとともに37°Cで約36時間培養した。インキュベーション後、表面抗原の喪失を最小限に抑えるために、TrypLE(商標)を使用して細胞を培養から剥離させ、6D4汎MICA/B結合mAbを使用して細胞表面MICA/Bを検出した。図18Aに示されているように、表面MICA/B発現は、アルファ-3ドメイン標的化mAbによって安定化され、照射を含むストレス因子を適用することは、異なる固形腫瘍細胞株にわたって表面MICA/B発現を上昇させる。細胞株ごとに0Gyのみの標準培養条件に正規化することによって、条件($\pm$ 照射及び $\pm$ MICA/B α 3ドメイン結合抗体)ごとのMICA/B倍数上方制御も計算され、例えば、照射を使用して腫瘍細胞を感作することが腫瘍細胞表面上のMICA/B発現を増大させることを示した(図18B)。

40

50

【0344】

腫瘍感作が、MICA/B CARを発現するエフェクター細胞に対する腫瘍感受性を増強するかどうかを試験するために、種々の腫瘍細胞株を、25 Gy曝露あり又はなしでウェルあたり 1×10^4 で播種した。約18時間後、MICA/B CARを発現するiPSC由来NK細胞(MICA/B CAR iNK)、又は4-1BBL⁺IL21⁺K562細胞を使用して2週間増殖させたMICA/B CAR陰性PBNK細胞を、腫瘍細胞株細胞に3:1のE:T比で添加し、更に24時間インキュベートして、xCeLLigence (商標) RTCAシステムを使用してパーセント腫瘍細胞細胞溶解を測定した。図19に示されているように、感作因子で前処理された腫瘍は、腫瘍細胞表面MICA/Bレベルを増大させることができ、これは、MICA/B CAR iNK細胞に対する増強された腫瘍感受性につながる。MICA/B CAR陰性NK細胞を使用した場合(PBNK細胞)、増強された感受性は観察されないため、この増強された感受性はMICA/B:MICA/B CAR特異的である。これらのデータは、MICA/B表面レベルがMICA/B CAR iNK反応性レベルといくらか相関したことを示唆する。したがって、MICA/B CARエフェクター細胞が、MICA/B抗原のMICA α 3ドメインに結合して発現を増加させ、及び/又はシェディングを低下させるMICA/B抗体と任意選択で組み合わせられたがん又は腫瘍細胞の感作(例えば、照射)とともに相乗作用を与える能力は、iPSC由来NK又はT細胞を含むエフェクター細胞の既製製品の治療指数を増加させることができ、これは、これらのエフェクター細胞における外因性CD16発現を介したADCC機序で更に増強される。

10

20

【0345】

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

【0346】

本明細書で言及される全ての特許及び刊行物は、本開示が関係する当業者の技術水準を示している。全ての特許及び刊行物は、個々の刊行物が参照により組み込まれるものとして具体的かつ個別に示されたかのように、参照により本明細書に組み込まれる。

【0347】

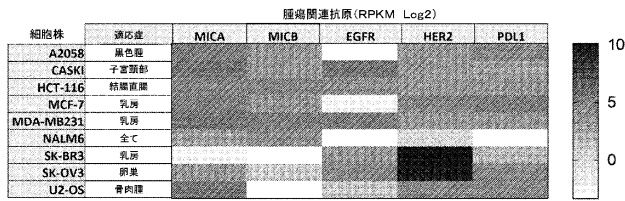
本明細書に例示的に記載された本開示は、本明細書に具体的に開示されていない任意の1つ又は複数の要素、限定又は複数の限定がなくても実施することができる。したがって、例えば、本明細書の各例において、「含む」、「から本質的になる」、及び「からなる」という用語のうちのいずれかは、他の2つの用語のいずれかに置き換えることができる。使用されている用語及び表現は、限定ではなく説明の用語として使用されており、そのような用語及び表現の使用において、示され説明された特徴又はその一部のいずれかの同等物を除外する意図はなく、そうではなくて特許請求される本開示の範囲内で様々な修正が可能であると認識される。したがって、本開示は、好ましい実施形態及び任意選択の特質によって具体的に開示されているが、本明細書で開示される概念の修正及び変形は、当業者によって想到されてもよく、そのような修正及び変形は、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲内であることが理解されるべきである。

30

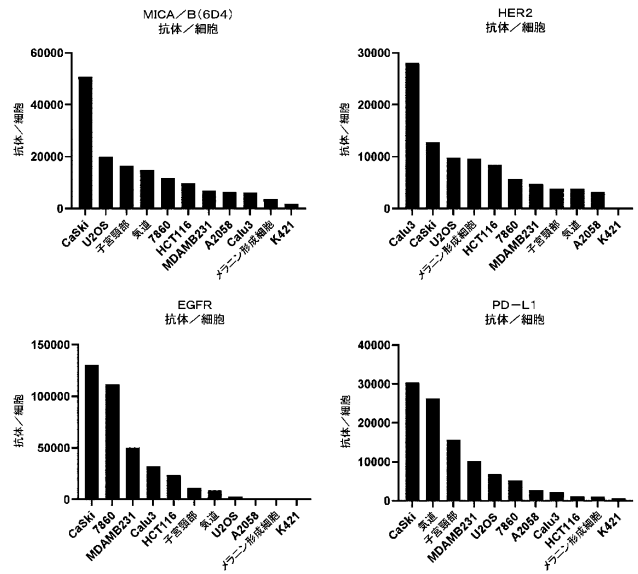
40

50

【図面】
【図 1 A】

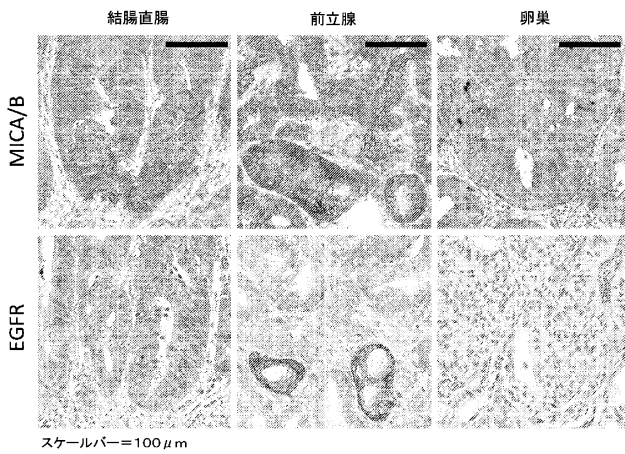


【図 1 B】

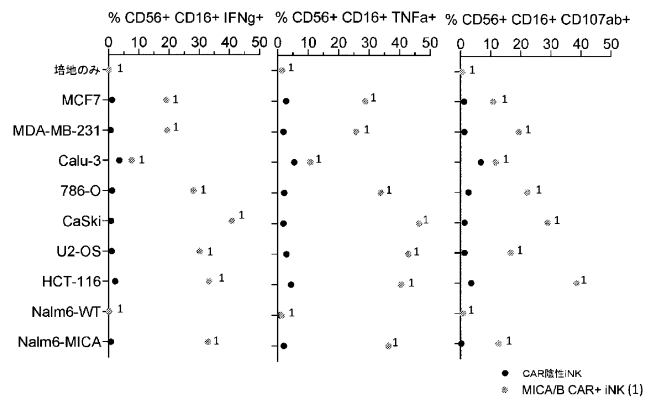


10

【図 1 C】



【図 2】



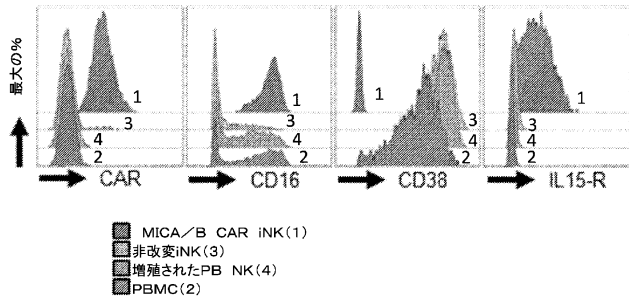
20

30

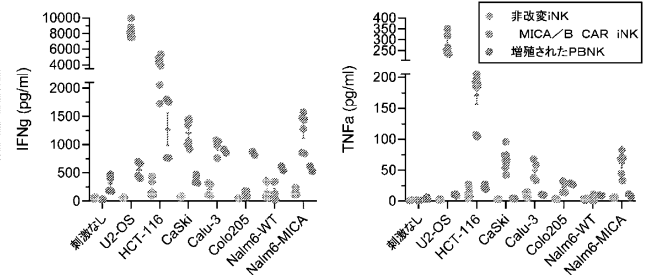
40

50

【図 3 A】

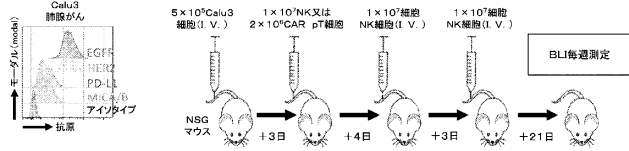


【図 3 B】

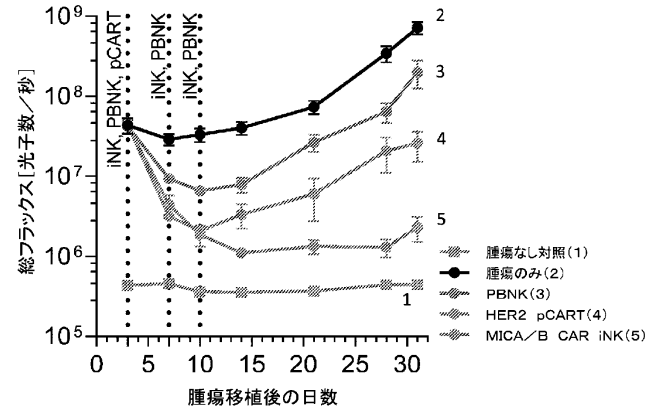


10

【図 4 A】

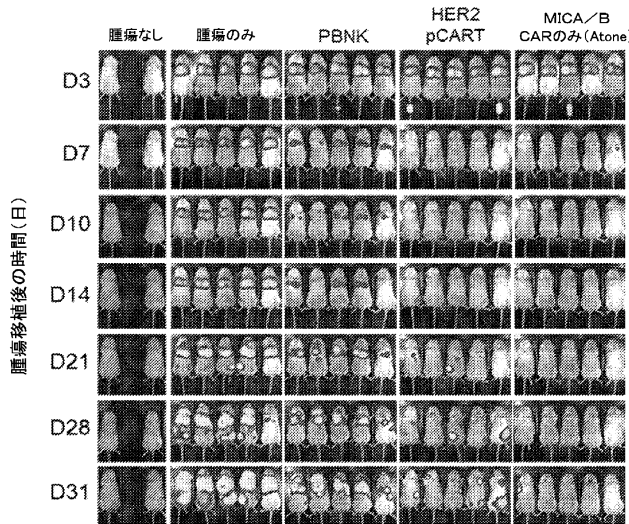


【図 4 B】

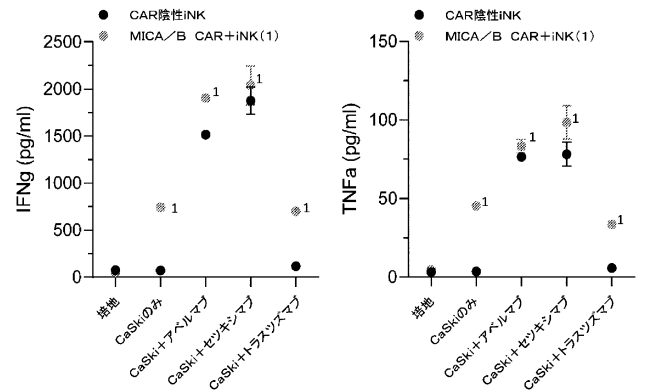


20

【図 4 C】



【図 5】

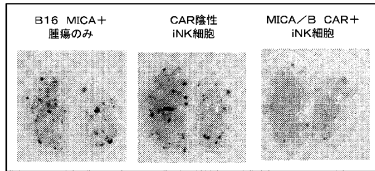


30

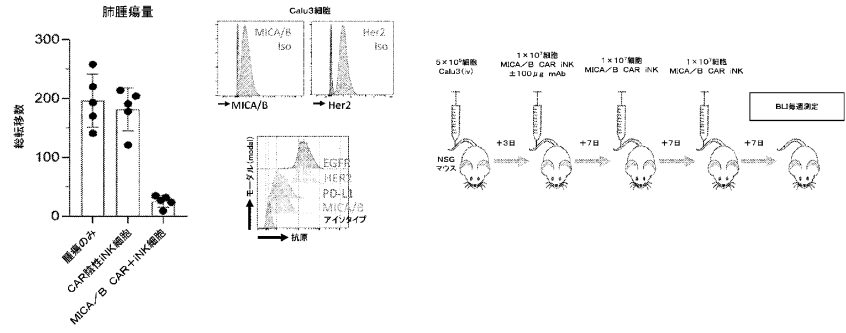
40

50

【図 9 B】

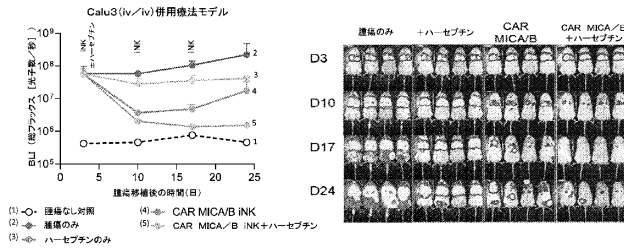


【図 10 A】

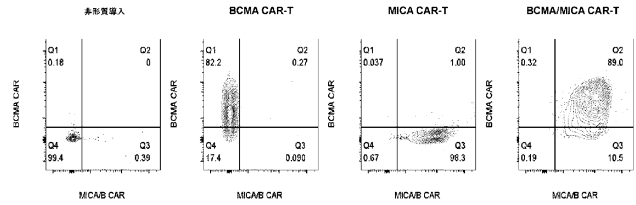


10

【図 10 B】

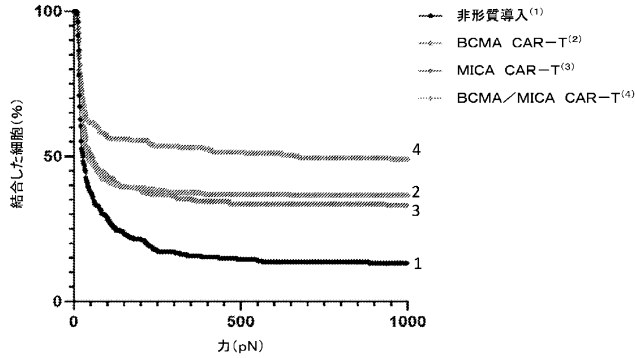


【図 11】

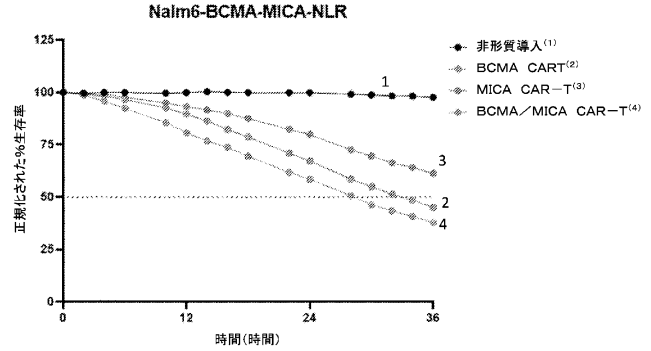


20

【図 12 A】



【図 12 B】

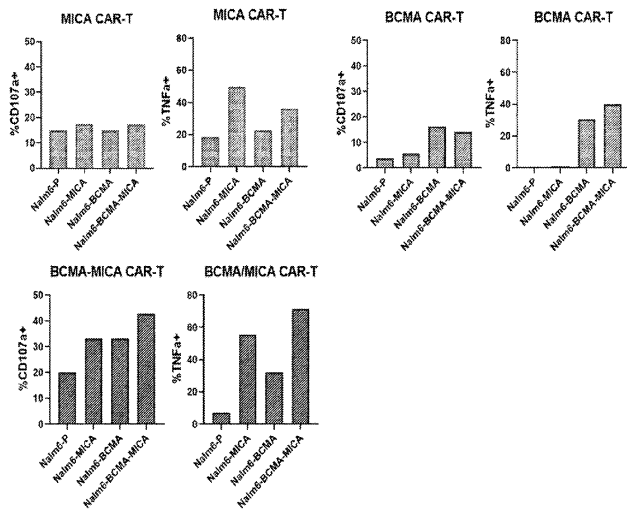


30

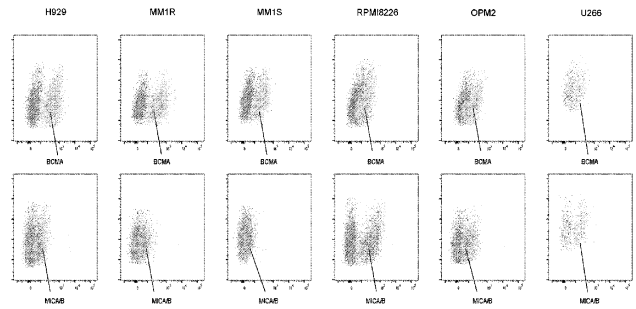
40

50

【図 13】

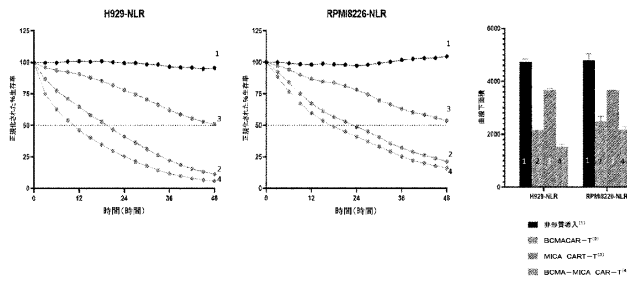


【図 14】

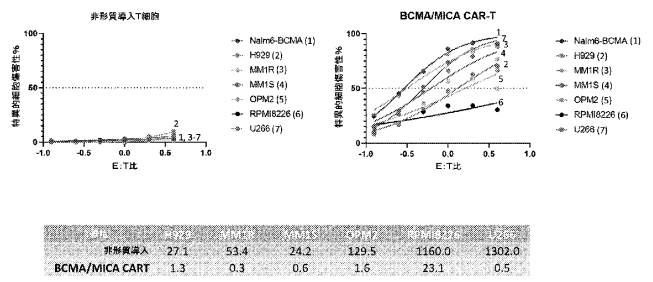


10

【図 15】



【図 16】



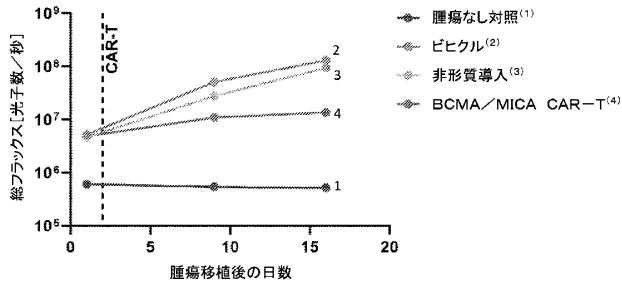
20

30

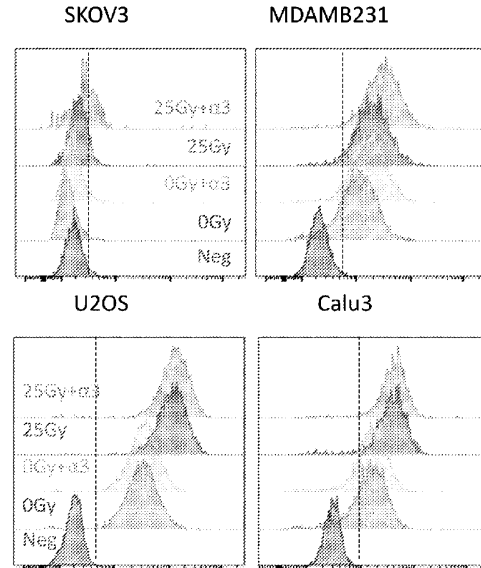
40

50

【図 17】



【図 18 A】

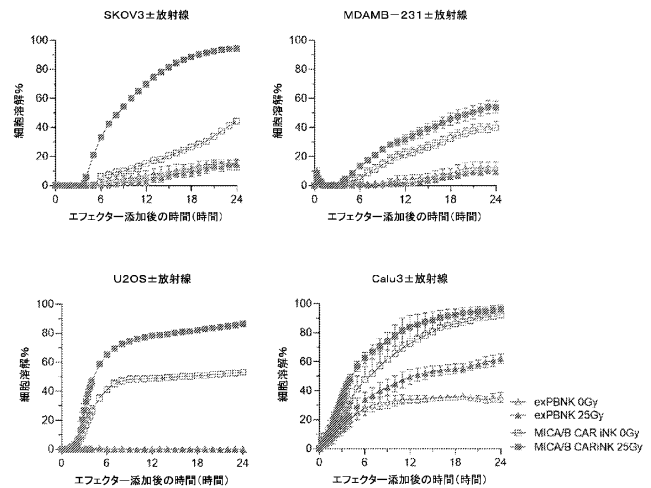


10

【図 18 B】

腫瘍細胞株	0Gyベースラインに対する倍数変化		
	0Gy+α3	25Gy	25Gy+α3
U2OS	1.09	3.74	4.26
SKOV	1.27	1.54	1.98
MDAMB231	1.58	1.86	2.81
Calu3	1.01	2.13	2.23

【図 19】



20

30

40

50

【配列表】

2024543024000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/079419

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 35/545(2015.01)i; A61K 35/17(2015.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61K 45/06(2006.01)i; A61P 37/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 31/12(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 35/545(2015.01); A61K 35/17(2015.01); A61K 45/06(2006.01); A61K 48/00(2006.01); A61P 35/00(2006.01); A61P 37/00(2006.01); C07K 16/28(2006.01); C07K 16/30(2006.01); C12N 5/074(2010.01); C12N 5/0783(2010.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: immune cell, induced pluripotent cell (iPSC), MICA/B, tumor surface antigen, chimeric antigen receptor (CAR), sensitizing agent		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2021-0163622 A1 (FATE THERAPEUTICS, INC.) 03 June 2021 (2021-06-03) paragraphs [0017]-[0266]	1-11,15-25,64-67
A	US 2021-0163895 A1 (FATE THERAPEUTICS, INC.) 03 June 2021 (2021-06-03) the whole document	1-11,15-25,64-67
A	WO 2021-077117 A1 (FATE THERAPEUTICS, INC.) 22 April 2021 (2021-04-22) the whole document	1-11,15-25,64-67
A	WO 2021-062281 A2 (FATE THERAPEUTICS, INC.) 01 April 2021 (2021-04-01) the whole document	1-11,15-25,64-67
A	WO 2021-113744 A1 (FATE THERAPEUTICS, INC.) 10 June 2021 (2021-06-10) the whole document	1-11,15-25,64-67
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 March 2023		Date of mailing of the international search report 10 March 2023
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer HEO, Joo Hyung Telephone No. +82-42-481-5373

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/079419

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

10

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/079419

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

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

1. ☒ Claims Nos.: **27-63**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 27-63 pertain to methods for treatment of the human body by therapy (PCT Article 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(iv)).
2. ☒ Claims Nos.: **13,28,45,56,57,63**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
As claims 13, 28, 45, 56, 57 and 63 each refer to an unsearchable claim which does not comply with PCT Rule 6.4(a), claims 13, 28, 45, 56, 57 and 63 are unclear (PCT Article 6).
3. ☒ Claims Nos.: **12,14,26,27,44,55,62**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US2022/079419

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
US	2021-0163622	A1	03 June 2021	AU	2020-314969	A1 03 February 2022
				BR	112022000641	A2 29 March 2022
				CA	3146967	A1 21 January 2021
				CN	114258429	A 29 March 2022
				EP	3999628	A1 25 May 2022
				IL	289830	A 01 March 2022
				IL	289830	D0 01 March 2022
				JP	2022-541441	A 26 September 2022
				KR	10-2022-0035190	A 21 March 2022
				US	2022-275333	A1 01 September 2022
				WO	2021-011919	A1 21 January 2021
US	2021-0163895	A1	03 June 2021	AU	2018-261800	A1 05 December 2019
				AU	2018-388413	A1 11 June 2020
				AU	2019-243315	A1 24 September 2020
				BR	112019023080	A2 09 June 2020
				BR	112020011017	A2 17 November 2020
				BR	112020019205	A2 05 January 2021
				CA	3083779	A1 27 June 2019
				CA	3093020	A1 03 October 2019
				CA	3111211	A1 05 March 2020
				CN	111279336	A 12 June 2020
				CN	111542594	A 14 August 2020
				CN	111954715	A 17 November 2020
				EP	3611000	A1 19 February 2020
				EP	3619627	A1 11 March 2020
				EP	4083192	A1 02 November 2022
				IL	275177	A 30 July 2020
				IL	275177	D0 30 July 2020
				IL	277611	D0 30 November 2020
				JP	2020-523716	A 06 August 2020
				JP	2021-152931	A 30 September 2021
				JP	2021-506236	A 22 February 2021
				KR	10-2020-0015517	A 12 February 2020
				KR	10-2020-0102454	A 31 August 2020
				KR	10-2020-0127250	A 10 November 2020
				SG	11201908661	A 30 October 2019
				SG	11202005173	A 29 June 2020
				SG	11202008977	A 29 October 2020
				US	10927346	B2 23 February 2021
				US	11365394	B2 21 June 2022
				US	2020-069734	A1 05 March 2020
				WO	2015-153474	A1 08 October 2015
				WO	2019-126748	A1 27 June 2019
				WO	2020-046906	A1 05 March 2020
WO	2021-077117	A1	22 April 2021	AU	2020-363697	A1 07 April 2022
				AU	2020-363697	A1 15 April 2021
				CN	114761425	A 15 July 2022
				CN	114901693	A 12 August 2022
				EP	4041759	A1 17 August 2022
				EP	4045539	A1 24 August 2022

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US2022/079419

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				IL	291924	A	01 June 2022
				JP	2022-550899	A	05 December 2022
				JP	2022-552314	A	15 December 2022
				KR	10-2022-0108038	A	02 August 2022
				WO	2021-071962	A1	15 April 2021
WO	2021-062281	A2	01 April 2021	AU	2020-353166	A1	24 March 2022
				AU	2020-353166	A1	01 April 2021
				CA	3149585	A1	01 April 2021
				CN	114867846	A	05 August 2022
				EP	4034638	A2	03 August 2022
				IL	291484	A	01 May 2022
				IL	291484	D0	01 May 2022
				JP	2022-548943	A	22 November 2022
				KR	10-2022-0085779	A	22 June 2022
				WO	2021-062281	A3	20 May 2021
WO	2021-113744	A1	10 June 2021	AU	2020-395239	A1	23 June 2022
				AU	2020-395239	A1	10 June 2021
				BR	112022011072	A2	23 August 2022
				CA	3160423	A1	10 June 2021
				CN	115087731	A	20 September 2022
				EP	4069827	A1	12 October 2022
				IL	293564	A	01 August 2022
				JP	2023-505206	A	08 February 2023
				KR	10-2022-0124179	A	13 September 2022

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N	15/13	(2006.01)	C 1 2 N	15/13	
C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z

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

弁理士 池田 達則

(72)発明者 ジョン チャールズ ゴールディング

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 3 1, サンディエゴ, スクリップス サミット ドライブ
1 2 2 7 8

(72)発明者 バーラム バラメール

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 3 1, サンディエゴ, スクリップス サミット ドライブ
1 2 2 7 8

(72)発明者 マーティン ホスキング

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 3 1, サンディエゴ, スクリップス サミット ドライブ
1 2 2 7 8

(72)発明者 ライアン ビョルダール

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 3 1, サンディエゴ, スクリップス サミット ドライブ
1 2 2 7 8

F ターム (参考)

4B065	AA90X AA90Y AB01 BA02 CA43 CA44
4C084	AA19 MA02 NA05 NA14 ZB071 ZB072 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272 ZB331 ZC75
4C087	AA01 AA02 BB37 BB63 BB65 CA04 CA12 MA02 NA05 NA14 ZB07 ZB26 ZB27 ZB33