

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-531755

(P2019-531755A)

(43) 公表日 令和1年11月7日(2019.11.7)

(51) Int.Cl.	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
C 1 2 N 15/90 (2006.01)	C 1 2 N 15/90 1 0 4 Z	4 C 0 8 7
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 1 1 0	
C 1 2 N 15/87 (2006.01)	C 1 2 N 15/87 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 210 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-522945 (P2019-522945)	(71) 出願人	518032993
(86) (22) 出願日	平成29年10月26日 (2017.10.26)		インティマ バイオサイエンス, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	令和1年6月17日 (2019.6.17)		アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 0 1
(86) 国際出願番号	PCT/US2017/058605		9, ニューヨーク, コロンブス サークル 3
(87) 国際公開番号	W02018/081470	(71) 出願人	305023366
(87) 国際公開日	平成30年5月3日 (2018.5.3)		リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ
(31) 優先権主張番号	62/413,814		オブ ミネソタ
(32) 優先日	平成28年10月27日 (2016.10.27)		アメリカ合衆国 ミネソタ 5 5 4 5 5 -
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		2 0 2 0 ミネアポリス, オーク ストリート-エス・イー 2 0 0, マクナマラ アラムナイ センター 6 0 0
(31) 優先権主張番号	62/452,081	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成29年1月30日 (2017.1.30)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子改変細胞を作製するウイルス法

(57) 【要約】

本開示は、ウイルスまたは非ウイルスベクターを使用して遺伝子改変細胞集団を産生する方法を提供する。遺伝子改変細胞集団を産生するため、および／またはがんの処置のための修飾ウイルスもまた開示される。上記方法は、ヒト対象からの初代細胞集団を提供するステップ、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を含むアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを前記初代細胞集団中の少なくとも1つの初代細胞に導入するステップを含み得、同等の細胞において前記少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を組み込むためにミニサークルベクターを使用することと比較して、細胞毒性を低減し得る。

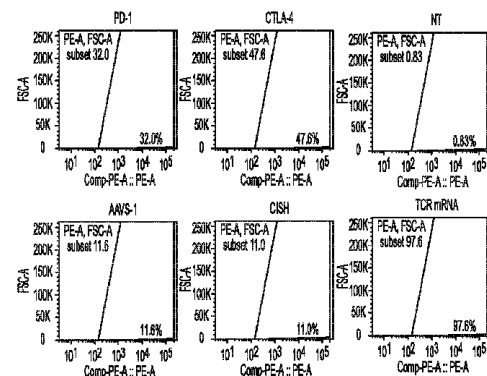


FIG. 136B

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

遺伝子改変初代細胞集団を産生する方法であって、

ヒト対象からの初代細胞集団を提供するステップと；

少なくとも 1 つの外因性トランス遺伝子を含むアデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターを前記初代細胞集団中の少なくとも 1 つの初代細胞に導入して、前記少なくとも 1 つの外因性トランス遺伝子を前記少なくとも 1 つの初代細胞のゲノム遺伝子座に組み込むステップと
を含み、

前記少なくとも 1 つの外因性トランス遺伝子を組み込むために前記 A A V ベクターを使用することが、同等の細胞において前記少なくとも 1 つの外因性トランス遺伝子を組み込むためにミニサークルベクターを使用することと比較して、細胞毒性を低減する、
方法。

10

【請求項 2】

遺伝子改変初代細胞集団を産生する方法であって、

ヒト対象からの初代細胞集団を提供するステップと；

少なくとも 1 つの外因性トランス遺伝子を含むアデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターを前記初代細胞集団中の少なくとも 1 つの初代細胞に導入して、前記少なくとも 1 つの外因性トランス遺伝子を前記少なくとも 1 つの初代細胞のゲノム遺伝子座に組み込むステップと
を含み、

20

前記初代細胞集団中の細胞の少なくとも約 20 % が、前記少なくとも 1 つの外因性トランス遺伝子を発現する、
方法。

【請求項 3】

遺伝子改変初代細胞集団を産生する方法であって、

ヒト対象からの初代細胞集団を提供するステップと；

少なくとも 1 つの外因性トランス遺伝子を含むアデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターを前記初代細胞集団中の少なくとも 1 つの初代細胞に導入して、前記少なくとも 1 つの外因性トランス遺伝子を前記少なくとも 1 つの初代細胞のゲノム遺伝子座に組み込むステップと
を含み、

30

前記遺伝子改変初代細胞集団が、前記 A A V ベクターを導入した約 4 日後に蛍光活性化細胞分取（F A C S）により測定される少なくとも約 90 % の生細胞を含む、
方法。

【請求項 4】

遺伝子改変初代細胞を作製する方法であって、

少なくとも 1 つのウイルスタンパク質またはその機能的な部分を導入するステップと；

少なくとも 1 つの外因性受容体配列をコードする少なくとも 1 つのポリ核酸を導入するステップと；

40

ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを使用して少なくとも 1 つの初代細胞の少なくとも 1 つの遺伝子において切断を導入するステップと
を含み、

前記少なくとも 1 つのウイルスタンパク質が、ミニサークルベクターを使用して前記少なくとも 1 つのポリ核酸を導入することと比較して、前記少なくとも 1 つの外因性受容体配列をコードする前記少なくとも 1 つのポリ核酸を導入することと関連付けられる毒性を低減する、
方法。

【請求項 5】

少なくとも 1 つの外因性トランス遺伝子を初代細胞に導入するための系であって、アデ

50

ノ随伴ウイルス（A A V）ベクターを含み、前記A A Vベクターが、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を前記初代細胞のゲノム遺伝子座に導入し、前記系が、前記少なくとも1つのトランス遺伝子を前記ゲノム遺伝子座に導入するミニサークルを含む同様の系と比較して、前記トランス遺伝子の前記ゲノム遺伝子座へのより高い導入効率を有し、より低い細胞毒性をもたらす、系。

【請求項6】

少なくとも1つの遺伝子改変細胞におけるタンパク質機能を抑制する少なくとも1つの遺伝子における外因性ゲノム変更、および少なくとも1つの遺伝子改変初代細胞のゲノム遺伝子座に挿入された少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を含むアデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターを含む *ex vivo* 遺伝子改変初代細胞集団。

10

【請求項7】

遺伝子改変初代細胞を作製する方法であって、

ヒト対象からの初代細胞集団を提供するステップと；

修飾アデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターを前記初代細胞集団中の少なくとも1つの初代細胞に導入して、少なくとも1つの外因性核酸を前記少なくとも1つの初代細胞のゲノム遺伝子座に組み込むステップと

を含み、

前記外因性核酸が、対応する非修飾または野生型A A Vベクターが導入された同等の初代細胞集団と比較して、より高効率で導入される、

方法。

20

【請求項8】

遺伝子改変初代細胞集団を産生する方法であって、

ヒト対象からの初代細胞集団を提供するステップと；

*ex vivo*で、前記初代細胞集団に *clustered regularly interspaced short palindromic repeat*（CRISPR）系を電気穿孔するステップであって、前記CRISPR系が、ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドおよびガイドリボ核酸（gRNA）を含み、前記gRNAが、少なくとも1つの遺伝子と相補的な配列を含み、前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドが、前記初代細胞集団中の少なくとも1つの初代細胞における前記少なくとも1つの遺伝子において二本鎖切断を導入し、

30

前記CRISPR系の電気穿孔の約1時間～約4日後にアデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターを前記初代細胞集団中の前記少なくとも1つの初代細胞に導入して、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を前記二本鎖切断に組み込むステップと

を含む方法。

【請求項9】

*ex vivo*で、前記初代細胞集団中の少なくとも1つの初代細胞の少なくとも1つの遺伝子を改変するステップをさらに含む、請求項1から3および7のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項10】

ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項1から3および7のいずれか一項に記載の方法、または請求項5に記載の系。

【請求項11】

前記改変するステップが、ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを導入することを含む、請求項9に記載の方法。

【請求項12】

前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドが、少なくとも1つの遺伝子に切断を導入する、請求項4、8、10、および11のいずれか一項に記載の方法、または請求項10もしくは11に記載の系。

50

【請求項 13】

前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドが、内因性遺伝子の不活化または発現の低減を含む、請求項 4、8、および 10 から 12 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 10 から 12 のいずれか一項に記載の系。

【請求項 14】

前記 AAV ベクターが、組換え AAV (rAAV) ベクター、ハイブリッド AAV ベクター、キメラ AAV ベクター、自己相補的 AAV (scAAV) ベクター、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項 1 から 3 および 8 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 6 に記載の集団、または請求項 5 に記載の系。

【請求項 15】

前記修飾 AAV ベクターが、組換え AAV (rAAV) ベクター、ハイブリッド AAV ベクター、キメラ AAV ベクター、自己相補的 AAV (scAAV) ベクター、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 16】

前記 AAV ベクターが、キメラ AAV ベクターである、請求項 14 もしくは 15 に記載の方法、または請求項 14 に記載の集団、または請求項 14 に記載の系。

【請求項 17】

前記 AAV ベクターが、少なくとも 1 つの AAV カプシド遺伝子配列における修飾を含む、請求項 14 もしくは 15 に記載の方法、または請求項 14 に記載の集団、または請求項 14 に記載の系。

【請求項 18】

前記修飾が、VP1、VP2、および VP3 カプシド遺伝子配列のうちの少なくとも 1 つにおける修飾を含む、請求項 17 に記載の方法または集団または系。

【請求項 19】

前記修飾が、前記カプシド遺伝子配列のうちの少なくとも 1 つの欠失を含む、請求項 18 に記載の方法または集団または系。

【請求項 20】

前記修飾が、前記カプシド遺伝子配列のうちの少なくとも 1 つにおける少なくとも 1 つのアミノ酸置換、欠失、および／または挿入を含む、請求項 18 に記載の方法または集団または系。

【請求項 21】

前記少なくとも 1 つの AAV カプシド遺伝子配列が、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、または AAV12 カプシド遺伝子配列からなる群から選択される、請求項 17 に記載の方法または集団または系。

【請求項 22】

電気穿孔またはヌクレオフェクションを含む、請求項 1 から 4 および 7 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 5 に記載の系。

【請求項 23】

前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドが、clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) 系、亜鉛フィンガー、転写アクチベーター様エフェクター (TALEN)、およびメガヌクレアーゼ-TAL リピーター (MEGATAL) からなる群から選択される、請求項 4、8、および 10 から 13 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 10 から 13 のいずれか一項に記載の系。

【請求項 24】

前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドが、CRISPR 系に由来する、請求項 23 に記載の方法または系。

【請求項 25】

前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドが、Cas1

10

20

30

40

50

、C a s 1 B、C a s 2、C a s 3、C a s 4、C a s 5、C a s 6、C a s 7、C a s 8、C a s 9、C a s 10、C s y 1、C s y 2、C s y 3、C s e 1、C s e 2、C s c 1、C s c 2、C s a 5、C s n 2、C s m 2、C s m 3、C s m 4、C s m 5、C s m 6、C m r 1、C m r 3、C m r 4、C m r 5、C m r 6、C s b 1、C s b 2、C s b 3、C s x 17、C s x 14、C s x 10、C s x 16、C s a X、C s x 3、C s x 1、C s x 1 S、C s f 1、C s f 2、C s O、C s f 4、C p f 1、c 2 c 1、c 2 c 3、C a s 9 H i F i、これらの相同体、またはこれらの変形からなる群から選択される、請求項4、8、10から13、23、および24のいずれか一項に記載の方法、または請求項10から13、23、および24のいずれか一項に記載の系。

【請求項26】

前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドが、C a s 9またはC a s 9をコードするポリヌクレオチドである、請求項25に記載の方法または系。

【請求項27】

前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドが、触媒不活性である、請求項25に記載の方法または系。

【請求項28】

前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドが、触媒不活性なC a s 9 (d C a s 9) またはd C a s 9をコードするポリヌクレオチドである、請求項27に記載の方法または系。

【請求項29】

前記遺伝子改変初代細胞集団が、前記A A Vベクターの導入後、少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8%、または100%の細胞生存率を含む、請求項1から3および8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項30】

前記細胞生存率が、前記A A Vベクターの導入の約4時間、6時間、10時間、12時間、18時間、24時間、36時間、48時間、60時間、72時間、84時間、96時間、108時間、120時間、132時間、144時間、156時間、168時間、180時間、192時間、204時間、216時間、228時間、240時間、または240時間よりも長い時間後に測定される、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

前記細胞生存率が、前記A A Vベクターの導入の約1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、31日、45日、50日、60日、70日、90日、または90日よりも長い時間後に測定される、請求項29に記載の方法。

【請求項32】

前記遺伝子改変初代細胞集団が、前記A A Vベクターの導入の約4日後に蛍光活性化細胞分取 (F A C S) により測定される少なくとも約92%の細胞生存率を含む、請求項1から3および8のいずれか一項に記載の方法、または請求項6に記載の集団。

【請求項33】

前記A A Vベクターを使用して前記少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を組み込むことが、ミニサークルを使用して同等の細胞集団において前記少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を組み込むことと比較して、細胞毒性を低減する、請求項1から3および8のいずれか一項に記載の方法、または請求項5に記載の系、または請求項6に記載の集団。

【請求項34】

前記毒性が、フローサイトメトリーにより測定される、請求項1、4、および33のいずれか一項に記載の方法、または請求項5もしくは38に記載の系、または請求項33に

10

20

30

40

50

記載の集団。

【請求項 35】

前記毒性が、約 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または 100% 低減される、請求項 33 または 34 に記載の方法または系または集団。

【請求項 36】

前記毒性が、前記 AAV ベクターまたは前記ミニサークルベクターの導入の約 4 時間、6 時間、8 時間、12 時間、24 時間、36 時間、48 時間、60 時間、72 時間、84 時間、96 時間、108 時間、120 時間、132 時間、144 時間、156 時間、168 時間、180 時間、192 時間、204 時間、216 時間、228 時間、240 時間、または 240 時間よりも長い時間後に測定される、請求項 35 に記載の方法または系または集団。

10

【請求項 37】

前記毒性が、前記 AAV ベクターまたは前記ミニサークルベクターの導入の約 1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、6 日、7 日、8 日、9 日、10 日、11 日、12 日、13 日、14 日、15 日、16 日、17 日、18 日、19 日、20 日、21 日、22 日、23 日、24 日、25 日、26 日、27 日、28 日、29 日、30 日、31 日、45 日、50 日、60 日、70 日、90 日、または 90 日よりも長い時間後に測定される、請求項 35 に記載の方法または系または集団。

【請求項 38】

前記 AAV ベクターが、細胞 1 個当たり約 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、または最大で約 9×10^9 ゲノムコピー／ウイルス粒子の感染多重度 (MOI) で導入される、請求項 1 から 3、7、および 8 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 5 に記載の系。

20

【請求項 39】

前記 AAV ベクターが、前記 CRISPR 系または前記ヌクレアーゼもしくは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを導入した 1～3 時間、3～6 時間、6～9 時間、9～12 時間、12～15 時間、15～18 時間、18～21 時間、21～23 時間、23～26 時間、26～29 時間、29～31 時間、31～33 時間、33～35 時間、35～37 時間、37～39 時間、39～41 時間、2 日、3 日、4 日、または 4 日よりも長い時間後に前記細胞に導入される、請求項 8、10 から 13、23、および 24 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 10 から 13、23、および 24 のいずれか一項に記載の系。

30

【請求項 40】

前記 AAV ベクターが、前記 CRISPR 系または前記ヌクレアーゼもしくは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを導入した 15～18 時間後に前記細胞に導入される、請求項 39 に記載の方法または系。

【請求項 41】

前記 AAV ベクターが、前記 CRISPR 系または前記ヌクレアーゼもしくは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを導入した 16 時間後に前記細胞に導入される、請求項 40 に記載の方法または系。

40

【請求項 42】

少なくとも 1 つの毒性低減剤を添加するステップをさらに含む、先行する請求項のいずれか一項に記載の方法または系。

【請求項 43】

前記少なくとも 1 つの毒性低減剤が、ウイルスタンパク質および／または細胞質 DNA センシング経路インヒビターを含む、請求項 42 に記載の方法または系。

【請求項 44】

50

前記ウイルスタンパク質が、E 4 o r f 6、E 1 B 5 5 K、S c r 7、L 7 5 5 5 0 7、N S 2 B 3、H P V 1 8 E 7、h A d 5 E 1 A、またはこれらの任意の組合せを含む、請求項 4 もしくは 4 3 に記載の方法、または請求項 4 3 に記載の系。

【請求項 4 5】

前記初代細胞または前記初代細胞集団が、初代リンパ球または初代リンパ球集団である、先行する請求項のいずれか一項に記載の方法または集団または系。

【請求項 4 6】

前記ゲノム遺伝子座または前記少なくとも 1 つの遺伝子が、アデノシン A 2 a 受容体 (A D O R A)、C D 2 7 6、V セットドメイン含有 T 細胞活性化インヒビター 1 (V T C N 1)、B リンパ球および T リンパ球関連 (B T L A)、インドールアミン 2, 3 -ジオキシゲナーゼ 1 (I D O 1)、K I R 3 D L 1 (キラー細胞免疫グロブリン様受容体、3 ドメイン、長細胞質テール、1)、リンパ球活性化遺伝子 3 (L A G 3)、A 型肝炎ウイルス細胞受容体 2 (H A V C R 2)、V I S T A (T 細胞活性化の V ドメイン免疫グロブリンサプレッサー)、ナチュラルキラー細胞受容体 2 B 4 (C D 2 4 4)、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ 1 (H P R T)、アデノ随伴ウイルス組込み部位 1 (A A V S 1)、もしくはケモカイン (C - C モチーフ) 受容体 5 (遺伝子/偽遺伝子) (C C R 5)、C D 1 6 0 分子 (C D 1 6 0)、T I G I T (I g および I T I M ドメインを有する T 細胞免疫受容体)、C D 9 6 分子 (C D 9 6)、C R T A M (細胞傷害性および制御性 T 細胞分子)、白血球関連免疫グロブリン様受容体 1 (L A I R 1)、シアル酸結合 I g 様レクチン 7 (S I G L E C 7)、シアル酸結合 I g 様レクチン 9 (S I G L E C 9)、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー 1 0 b (T N F R S F 1 0 B)、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー 1 0 a (T N F R S F 1 0 A)、カスパーゼ 8 (C A S P 8)、カスパーゼ 1 0 (C A S P 1 0)、カスパーゼ 3 (C A S P 3)、カスパーゼ 6 (C A S P 6)、カスパーゼ 7 (C A S P 7)、F A D D (F a s 関連細胞死ドメイン)、F a s 細胞表面細胞死受容体 (F A S)、形質転換増殖因子ベータ受容体 I I (T G F B R I I)、形質転換増殖因子ベータ受容体 I (T G F B R 1)、S M A D ファミリーメンバー 2 (S M A D 2)、S M A D ファミリーメンバー 3 (S M A D 3)、S M A D ファミリーメンバー 4 (S M A D 4)、S K I がん原遺伝子 (S K I)、S K I 様がん原遺伝子 (S K I L)、T G I F 1 (T G F B 誘導因子ホメオボックス 1)、プログラム細胞死 1 (P D - 1)、細胞傷害性 T リンパ球関連タンパク質 4 (C T L A 4)、インターロイキン 1 0 受容体サブユニットアルファ (I L 1 0 R A)、インターロイキン 1 0 受容体サブユニットベータ (I L 1 0 R B)、H M O X 2 (ヘムオキシゲナーゼ 2)、インターロイキン 6 受容体 (I L 6 R)、I L 6 S T (インターロイキン 6 シグナル伝達因子)、c - s r c チロシンキナーゼ (C S K)、P A G 1 (グリコスフィンゴ脂質ミクロドメインにより膜アンカーされるリンタンパク質 1)、S I T 1 (シグナル閾値調節膜貫通アダプター 1)、F O X P 3 (フォークヘッドボックス P 3)、P R ドメイン 1 (P R D M 1)、B A T F (塩基性ロイシンジッパー転写因子、A T F 様)、可溶性グアニル酸シクラーゼ 1 アルファ 2 (G U C Y 1 A 2)、可溶性グアニル酸シクラーゼ 1 アルファ 3 (G U C Y 1 A 3)、可溶性グアニル酸シクラーゼ 1 ベータ 2 (G U C Y 1 B 2)、タンパク質のプロリルヒドロキシラーゼドメイン (P H D 1、P H D 2、P H D 3) ファミリー、もしくは可溶性グアニル酸シクラーゼ 1 ベータ 3 (G U C Y 1 B 3)、e g l - 9 ファミリーの低酸素症誘導性因子 1 (E G L N 1)、e g l - 9 ファミリーの低酸素症誘導性因子 2 (E G L N 2)、e g l - 9 ファミリーの低酸素症誘導性因子 3 (E G L N 3)、P P P 1 R 1 2 C (タンパク質ホスファターゼ 1 調節サブユニット 1 2 C)、ならびにこれらの任意の組合せまたは誘導体からなる群から選択される、先行する請求項のいずれか一項に記載の方法または集団または系。

【請求項 4 7】

前記改変するステップが、ガイドポリ核酸を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 4 8】

ガイドポリ核酸をさらに含む、請求項 1 から 4 および 7 のいずれか一項に記載の方法、

10

20

30

40

50

または請求項 6 に記載の集団、または請求項 5 に記載の系。

【請求項 4 9】

前記ガイドポリ核酸が、少なくとも 1 つの遺伝子と相補的な配列を含む、請求項 8、4 7、および 4 8 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 4 8 に記載の系もしくは集団。

【請求項 5 0】

前記ガイドポリ核酸が、ガイドリボ核酸 (gRNA) である、請求項 8、4 7、および 4 8 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 4 8 に記載の系もしくは集団。

【請求項 5 1】

前記ガイドポリ核酸が、ガイドデオキシリボ核酸 (gDNA) である、請求項 8、4 7、および 4 8 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 4 8 に記載の系もしくは集団。

【請求項 5 2】

前記ガイドポリ核酸が、請求項 4 6 に記載の少なくとも 1 つの遺伝子と相補的な配列を含む、請求項 8、4 7、および 4 8 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 4 8 に記載の系もしくは集団。

【請求項 5 3】

前記ガイドポリ核酸が、PD-1、CTLA-4、および／またはAAVS1 遺伝子から選択される少なくとも 1 つの遺伝子と相補的な配列を含む、請求項 8 および 4 7 から 4 9 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 4 8 もしくは 4 9 に記載の系もしくは集団。

【請求項 5 4】

前記少なくとも 1 つの外因性トランス遺伝子が、前記ゲノム遺伝子座にランダムに挿入される、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 6 に記載の集団、または請求項 5 に記載の系。

【請求項 5 5】

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が、前記ゲノム遺伝子座にランダムに挿入される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記少なくとも 1 つの外因性トランス遺伝子または前記少なくとも 1 つの外因性核酸が、前記ゲノム遺伝子座に 1 回ランダムに挿入される、請求項 5 4 もしくは 5 5 に記載の方法、または請求項 5 4 に記載の集団もしくは系。

【請求項 5 7】

前記少なくとも 1 つの外因性トランス遺伝子または前記少なくとも 1 つの外因性核酸が、前記ゲノム遺伝子座の 1 つを超える遺伝子座にランダムに挿入される、請求項 5 4 もしくは 5 5 に記載の方法、または請求項 5 4 に記載の集団もしくは系。

【請求項 5 8】

前記少なくとも 1 つの外因性トランス遺伝子または前記少なくとも 1 つの外因性核酸が、前記初代細胞のゲノムの特異的部位に挿入される、請求項 5 4 もしくは 5 5 に記載の方法、または請求項 5 4 に記載の集団もしくは系。

【請求項 5 9】

前記少なくとも 1 つの外因性トランス遺伝子または前記少なくとも 1 つの外因性核酸が、少なくとも 1 つの遺伝子に特異的に挿入される、請求項 5 8 に記載の方法または集団または系。

【請求項 6 0】

前記少なくとも 1 つの遺伝子が、PD-1、CTLA-4、および／またはAAVS1 遺伝子から選択される、請求項 5 9 に記載の方法または集団または系。

【請求項 6 1】

前記少なくとも 1 つの遺伝子が、請求項 4 6 に記載の少なくとも 1 つの遺伝子から選択される、請求項 5 9 に記載の方法または集団または系。

【請求項 6 2】

前記少なくとも1つの外因性トランス遺伝子または前記少なくとも1つの外因性核酸が、前記少なくとも1つの遺伝子の切断部で挿入される、請求項59に記載の方法または集団または系。

【請求項63】

前記少なくとも1つの外因性トランス遺伝子または前記少なくとも1つの外因性核酸が、ランダムおよび／または部位特異の様式で前記ゲノム遺伝子座に挿入される、請求項1から3および7のいずれか一項に記載の方法、または請求項6に記載の集団、または請求項5に記載の系。

【請求項64】

前記少なくとも1つの外因性トランス遺伝子または前記少なくとも1つの外因性核酸が、前記ゲノム遺伝子座の切断部と相補的な操作部位で挟まれている、請求項1から3および7のいずれか一項に記載の方法、または請求項6に記載の集団、または請求項5に記載の系。

【請求項65】

前記少なくとも1つの外因性トランス遺伝子または前記少なくとも1つの外因性核酸が、前記少なくとも1つの遺伝子の切断部と相補的な操作部位で挟まれている、請求項9に記載の方法。

【請求項66】

前記遺伝子改変初代細胞集団中の細胞の少なくとも約15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または最大で100%が、前記少なくとも1つの外因性トランス遺伝子の組込みを含む、請求項1から3および8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項67】

前記初代細胞または前記初代細胞集団が、自家初代細胞または自家初代細胞集団である、請求項1から4、7、および8のいずれか一項に記載の方法、または請求項5に記載の系、または請求項6に記載の集団。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

本出願は、2016年10月27日出願の米国仮出願第62/413,814号および2017年1月30日出願の米国仮出願第62/452,081号の利益を主張し、当該出願の各々は、全ての目的について全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

背景

過去50年間における、がん治療法における目覚ましい進歩にも拘らず、特に、進行した病期において、化学療法、放射線療法、または生物療法に対して抵抗性であり、外科法により対処できない多くの腫瘍型が依然として存在する。近年、腫瘍上の分子標的を*in vivo*で認識するリンパ球の遺伝子操作が著しく進歩した結果として、標的腫瘍寛解の目覚ましい症例がもたらされている。しかし、これらの成功は、主に、造血系腫瘍に限定されており、特定の腫瘍内の細胞が発現する、同定可能な分子の欠如、および腫瘍破壊を媒介するために、腫瘍標的に特異的に結合するのに使用され得る分子の欠如により、固形腫瘍へのより広範な適用は、限定的である。近年におけるいくつかの進歩は、場合によって、抗腫瘍T細胞応答を誘発する、腫瘍特異的変異の同定に焦点を当てている。例えば、これらの内因性変異は、全エクソームシーケンシング法を使用して同定することができる(Tranら、「Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer」、*Science*、344巻：641～644頁(2014年))。

10

20

30

40

50

参照による組込み

本明細書における全ての刊行物、特許、および特許出願は、各個別の刊行物、特許、および特許出願が、参照により組み込まれるように、具体的かつ個別に指し示された場合と同じ程度に、参照により組み込まれる。万一、本明細書の用語と、組み込まれる参考文献の用語との間で齟齬が生じた場合は、本明細書の用語が優先される。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献1】 Tran Eら、「Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer」、Science、344巻：641～644頁（2014年）

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

要旨

本明細書では、遺伝子改変初代細胞集団を産生する方法であって、ヒト対象からの初代細胞集団を提供するステップと；少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を含むアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを前記初代細胞集団中の少なくとも1つの初代細胞に導入して、前記少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を前記少なくとも1つの初代細胞のゲノム遺伝子座に組み込むステップとを含み、前記少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を組み込むために前記AAVベクターを使用することが、同等の細胞において前記少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を組み込むためにミニサークルベクターを使用することと比較して、細胞毒性を低減する、方法が開示される。場合によって、本方法は、*ex vivo*で、前記初代細胞集団中の少なくとも1つの初代細胞の少なくとも1つの遺伝子を改変するステップをさらに含む。場合によって、前記改変するステップは、ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを導入することを含む。場合によって、前記改変するステップは、ガイドポリ核酸を含む。

20

【0005】

本明細書では、遺伝子改変初代細胞集団を産生する方法であって、ヒト対象からの初代細胞集団を提供するステップと；少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を含むアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを前記初代細胞集団中の少なくとも1つの初代細胞に導入して、前記少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を前記少なくとも1つの初代細胞のゲノム遺伝子座に組み込むステップとを含み、前記初代細胞集団中の細胞の少なくとも約20%が、前記少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を発現する、方法が開示される。場合によって、本方法は、*ex vivo*で、前記初代細胞集団中の少なくとも1つの初代細胞の少なくとも1つの遺伝子を改変するステップをさらに含む。場合によって、前記改変するステップは、ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを導入することを含む。場合によって、前記改変するステップは、ガイドポリ核酸を含む。

30

40

【0006】

本明細書では、遺伝子改変初代細胞集団を産生する方法であって、ヒト対象からの初代細胞集団を提供するステップと；少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を含むアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを前記初代細胞集団中の少なくとも1つの初代細胞に導入して、前記少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を前記少なくとも1つの初代細胞のゲノム遺伝子座に組み込むステップとを含み、前記遺伝子改変初代細胞集団が、前記AAVベクターを導入した約4日後に蛍光活性化細胞分取（FACS）により測定される少なくとも約90%の生細胞を含む、方法が開示される。場合によって、本方法は、*ex vivo*で、前記初代細胞集団中の少なくとも1つの初代細胞の少なくとも1つの遺伝子を改変するステップをさらに含む。場合によって、前記改変するステップは、ヌクレアーゼま

50

たは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを導入することを含む。場合によって、前記改変するステップは、ガイドポリ核酸を含む。

【0007】

本明細書では、遺伝子改変初代細胞を作製する方法であって、少なくとも1つのウイルスタンパク質またはその機能的な部分を導入するステップと；少なくとも1つの外因性受容体配列をコードする少なくとも1つのポリ核酸を導入するステップと；ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを使用して少なくとも1つの初代細胞の少なくとも1つの遺伝子において切断を導入するステップとを含み、前記少なくとも1つのウイルスタンパク質が、ミニサークルベクターを使用して前記少なくとも1つのポリ核酸を導入することと比較して、前記少なくとも1つの外因性受容体配列をコードする前記少なくとも1つのポリ核酸を導入することと関連付けられる毒性を低減する、方法が開示される。場合によって、本方法は、*ex vivo*で、少なくとも1つの初代細胞の少なくとも1つの遺伝子を改変するステップをさらに含む。場合によって、前記改変するステップは、ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを導入することを含む。場合によって、前記改変するステップは、ガイドポリ核酸を含む。

10

【0008】

本明細書では、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を初代細胞に導入するための系であって、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを含み、前記AAVベクターが、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を前記初代細胞のゲノム遺伝子座に導入し、前記系が、前記少なくとも1つのトランス遺伝子を前記ゲノム遺伝子座に導入するミニサークルを含む同様の系と比較して、前記トランス遺伝子の前記ゲノム遺伝子座へのより高い導入効率を有し、より低い細胞毒性をもたらす、系が開示される。場合によって、前記系は、*ex vivo*で、前記初代細胞の少なくとも1つの遺伝子を改変するステップをさらに含む。場合によって、前記改変するステップは、ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを導入することを含む。場合によって、前記改変するステップは、ガイドポリ核酸を含む。

20

【0009】

本明細書では、少なくとも1つの遺伝子改変細胞におけるタンパク質機能を抑制する少なくとも1つの遺伝子における外因性ゲノム変更、および少なくとも1つの遺伝子改変初代細胞のゲノム遺伝子座に挿入された少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を含むアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを含む*ex vivo*遺伝子改変初代細胞集団が開示される。場合によって、ヌクレアーゼもしくは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドおよび／またはガイドポリ核酸を初代細胞集団に導入することは、少なくとも1つの遺伝子における前記外因性ゲノム変更をもたらし得る。場合によって、*clustered regularly interspaced short palindromic repeat*（CRISPR）系を初代細胞集団に導入することは、少なくとも1つの遺伝子における前記外因性ゲノム変更をもたらし得る。

30

【0010】

本明細書では、遺伝子改変初代細胞を作製する方法であって、ヒト対象からの初代細胞集団を提供するステップと、修飾アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを前記初代細胞集団中の少なくとも1つの初代細胞に導入して、少なくとも1つの外因性核酸を前記少なくとも1つの初代細胞のゲノム遺伝子座に組み込むステップとを含み、前記外因性核酸が、対応する非修飾または野生型AAVベクターが導入された同等の初代細胞集団と比較して、より高効率で導入される、方法が開示される。場合によって、前記方法は、*ex vivo*で、前記初代細胞集団中の少なくとも1つの初代細胞の少なくとも1つの遺伝子を改変するステップをさらに含む。場合によって、前記改変するステップは、ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを導入することを含む。場合によって、前記改変するステップは、ガイドポリ核酸を含む。場合によって、前記修飾AAVベクターは、組換えAAV（*rAAV*）ベクター、ハイブリッドAAVベクター、キメラAAVベクター、自己相補的AAV（*scAAV*）ベクター、およびこれらの任意の組合

40

50

せからなる群から選択される。

【0011】

本明細書では、遺伝子改変初代細胞集団を産生する方法であって、ヒト対象からの初代細胞集団を提供するステップと；*ex vivo*で、前記初代細胞集団に*clustered regularly interspaced short palindromic repeat* (CRISPR)系を電気穿孔するステップであって、前記CRISPR系が、ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドおよびガイドリボ核酸 (gRNA)を含み、前記gRNAが、少なくとも1つの遺伝子と相補的な配列を含み、前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドが、前記初代細胞集団中の少なくとも1つの初代細胞における前記少なくとも1つの遺伝子において二本鎖切断を導入し、前記ヌクレアーゼが、Cas9であるか、または前記ポリヌクレオチドが、Cas9をコードするステップと；前記CRISPR系の電気穿孔の約1時間～約4日後にアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを前記初代細胞集団中の前記少なくとも1つの初代細胞に導入して、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を前記二本鎖切断に組み込むステップとを含む方法が開示される。

【0012】

場合によって、本開示の方法または系は、電気穿孔および／またはヌクレオフェクションを含み得る。場合によって、本開示の方法または系は、ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリペプチドをさらに含み得る。場合によって、前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドは、少なくとも1つの遺伝子に切断を導入し得る。場合によって、前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドは、内因性遺伝子の不活化または発現の低減を含み得る。場合によって、前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドは、*clustered regularly interspaced short palindromic repeat* (CRISPR)系、亜鉛フィンガー、転写アクチベーター様エフェクター (TALEN)、およびメガヌクレアーゼ-TALリピート (MEGATAL)からなる群から選択される。場合によって、前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドは、CRISPR系からのものである。場合によって、前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドは、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx1S、Csfl、Csfl2、CsO、Csfl4、Cpfl1、c2c1、c2c3、Cas9HiFi、これらの相同体、またはこれらの変形からなる群から選択される。場合によって、前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドは、Cas9またはCas9をコードするポリヌクレオチドである。場合によって、前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドは、触媒不活性である。場合によって、前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドは、触媒不活性なCas9 (dCas9) またはdCas9をコードするポリヌクレオチドである。

【0013】

場合によって、AAVベクターは、組換えAAV (rAAV) ベクター、ハイブリッドAAVベクター、キメラAAVベクター、自己相補的AAV (scAAV) ベクター、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される。場合によって、AAVベクターは、キメラAAVベクターである。場合によって、AAVベクターは、少なくとも1つのAAVカプシド遺伝子配列における修飾を含む。場合によって、前記修飾は、VP1、VP2、およびVP3カプシド遺伝子配列のうちの少なくとも1つにおける修飾を含み得る。場合によって、前記修飾は、前記カプシド遺伝子配列のうちの少なくとも1つの欠失を含

み得る。場合によって、前記修飾は、前記カプシド遺伝子配列のうちの少なくとも1つにおける少なくとも1つのアミノ酸置換、欠失、および／または挿入を含み得る。場合によって、前記少なくとも1つのAAVカプシド遺伝子配列は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、またはAAV12カプシド遺伝子配列からなる群から選択される。場合によって、AAVベクターは、細胞1個当たり約 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、または最大で約 9×10^9 ゲノムコピー／ウイルス粒子の感染多重度(MOI)で導入される。場合によって、AAVベクターは、CRISPR系またはヌクレアーゼもしくは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを導入した1～3時間、3～6時間、6～9時間、9～12時間、12～15時間、15～18時間、18～21時間、21～23時間、23～26時間、26～29時間、29～31時間、31～33時間、33～35時間、35～37時間、37～39時間、39～41時間、2日、3日、4日、または4日より長い時間後に細胞に導入される。場合によって、AAVベクターは、CRISPR系またはヌクレアーゼもしくは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを導入した15～18時間後に細胞に導入される。場合によって、AAVベクターは、CRISPR系またはヌクレアーゼもしくは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを導入した16時間後に細胞に導入される。

【0014】

場合によって、遺伝子改変初代細胞集団は、AAVベクターの導入後、少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8%、または100%の細胞生存率を含み得る。場合によって、細胞生存率は、AAVベクターの導入の約4時間、6時間、10時間、12時間、18時間、24時間、36時間、48時間、60時間、72時間、84時間、96時間、108時間、120時間、132時間、144時間、156時間、168時間、180時間、192時間、204時間、216時間、228時間、240時間、または240時間よりも長い時間後に測定される。場合によって、細胞生存率は、AAVベクターの導入の約1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、31日、45日、50日、60日、70日、90日、または90日より長い時間後に測定される。場合によって、遺伝子改変初代細胞集団は、AAVベクターの導入の約4日後に蛍光活性化細胞分取(FACS)により測定される少なくとも約92%の細胞生存率を含み得る。

【0015】

場合によって、細胞毒性が測定される。場合によって、毒性は、フローサイトメトリーにより測定される。場合によって、AAVベクターを使用して少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を組み込むことは、ミニサークルを使用して同等の細胞集団において前記少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を組み込むことと比較して、細胞毒性を低減する。場合によって、毒性は、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%低減される。場合によって、毒性は、前記AAVベクターまたは前記ミニサークルベクターの導入の約4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、36時間、48時間、60時間、72時間、84時間、96時間、108時間、120時間、132時間、144時間、156時間、168時間、180時間、192時間、204時間、216時間、228時間、240時間、または240時間よりも長い時間後に測定される。場合によって、毒性は、前記AAVベクターまたは前記ミニサークルベクターの導入の約1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、3

1日、45日、50日、60日、70日、90日、または90日より長い時間後に測定される。

【0016】

場合によって、本開示の方法または系は、少なくとも1つの毒性低減剤を添加するステップをさらに含み得る。場合によって、前記少なくとも1つの毒性低減剤は、ウイルスタンパク質および／または細胞質DNAセンシング経路インヒビターを含み得る。場合によって、前記ウイルスタンパク質は、E4orf6、E1B55K、Scr7、L755507、NS2B3、HPV18 E7、hAd5 E1A、またはこれらの任意の組合せを含み得る。

【0017】

10

場合によって、初代細胞は、初代リンパ球である。場合によって、初代細胞集団は、初代リンパ球集団である。場合によって、細胞（例えば、初代細胞）は、自家細胞である。場合によって、細胞集団（例えば、初代細胞集団）は、自家細胞集団である。

【0018】

場合によって、本開示の方法または系または集団は、ガイドポリ核酸をさらに含み得る。場合によって、前記ガイドポリ核酸は、少なくとも1つの遺伝子と相補的な配列を含み得る。場合によって、前記ガイドポリ核酸は、ガイドリボ核酸（gRNA）である。場合によって、前記ガイドポリ核酸は、ガイドデオキシリボ核酸（gDNA）である。場合によって、前記ガイドポリ核酸は、PD-1、CTLA-4、および／またはAAVS1遺伝子から選択される少なくとも1つの遺伝子と相補的な配列を含む。

20

【0019】

場合によって、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子および／または少なくとも1つの外因性核酸は、ゲノム遺伝子座にランダムに挿入される。場合によって、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子または少なくとも1つの外因性核酸は、ゲノム遺伝子座に1回ランダムに挿入される。場合によって、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子または少なくとも1つの外因性核酸は、ゲノム遺伝子座の1つを超える遺伝子座にランダムに挿入される。場合によって、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子または少なくとも1つの外因性核酸は、初代細胞のゲノムの特異的部位に挿入される。場合によって、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子または少なくとも1つの外因性核酸は、少なくとも1つの遺伝子に特異的に挿入される。場合によって、前記少なくとも1つの遺伝子は、PD-1、CTLA-4、および／またはAAVS1遺伝子から選択される。場合によって、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子または少なくとも1つの外因性核酸は、少なくとも1つの遺伝子の切断部で挿入される。場合によって、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子または少なくとも1つの外因性核酸は、ランダムおよび／または部位特異の様式でゲノム遺伝子座に挿入される。場合によって、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子または少なくとも1つの外因性核酸は、ゲノム遺伝子座の切断部と相補的な操作部位で挟まれている。場合によって、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子または少なくとも1つの外因性核酸は、少なくとも1つの遺伝子の切断部と相補的な操作部位で挟まれている。場合によって、遺伝子改変初代細胞集団中の細胞の少なくとも約15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または最大で100%は、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子の組込みを含み得る。

30

40

【0020】

場合によって、ゲノム遺伝子座または少なくとも1つの遺伝子は、アデノシンA2a受容体（ADORA）、CD276、Vセットドメイン含有T細胞活性化インヒビター1（VTCN1）、Bリンパ球およびTリンパ球関連（BTLA）、インドールアミン2，3-ジオキシゲナーゼ1（IDO1）、KIR3DL1（キラー細胞免疫グロブリン様受容体、3ドメイン、長細胞質テール、1）、リンパ球活性化遺伝子3（LAG3）、A型肝炎ウイルス細胞受容体2（HAVCR2）、VISTA（T細胞活性化のVドメイン免疫グロブリンサプレッサー）、ナチュラルキラー細胞受容体2B4（CD244）、ヒポキ

50

サンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ1 (HPR T)、アデノ随伴ウイルス組込み部位1 (AAVS1)、もしくはケモカイン (C-Cモチーフ) 受容体5 (遺伝子/偽遺伝子) (CCR5)、CD160分子 (CD160)、TIGIT (IgおよびITIMドメインを有するT細胞免疫受容体)、CD96分子 (CD96)、CRTAM (細胞傷害性および制御性T細胞分子)、白血球関連免疫グロブリン様受容体1 (LAIR1)、シアル酸結合Ig様レクチン7 (SIGLEC7)、シアル酸結合Ig様レクチン9 (SIGLEC9)、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー10b (TNFRSF10B)、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー10a (TNFRSF10A)、カスパーゼ8 (CASP8)、カスパーゼ10 (CASP10)、カスパーゼ3 (CASP3)、カスパーゼ6 (CASP6)、カスパーゼ7 (CASP7)、FADD (Fas関連細胞死ドメイン)、Fas細胞表面細胞死受容体 (FAS)、形質転換増殖因子ベータ受容体II (TGFBRII)、形質転換増殖因子ベータ受容体I (TGFBRI)、SMADファミリーメンバー2 (SMAD2)、SMADファミリーメンバー3 (SMAD3)、SMADファミリーメンバー4 (SMAD4)、SKIがん原遺伝子 (SKI)、SKI様がん原遺伝子 (SKIL)、TGIF1 (TGFB誘導因子ホメオボックス1)、プログラム細胞死1 (PD-1)、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4 (CTLA4)、インターロイキン10受容体サブユニットアルファ (IL10RA)、インターロイキン10受容体サブユニットベータ (IL10RB)、HMOX2 (ヘムオキシゲナーゼ2)、インターロイキン6受容体 (IL6R)、IL6ST (インターロイキン6シグナル伝達因子)、c-srcチロシンキナーゼ (CSK)、PAG1 (グリコスフィンゴ脂質ミクロドメインにより膜アンカーされるリンタンパク質1)、SIT1 (シグナル閾値調節膜貫通アダプター1)、FOXP3 (フォークヘッドボックスP3)、PRドメイン1 (PRDM1)、BATF (塩基性ロイシンジッパー転写因子、ATF様)、可溶性グアニル酸シクラーゼ1アルファ2 (GUCY1A2)、可溶性グアニル酸シクラーゼ1アルファ3 (GUCY1A3)、可溶性グアニル酸シクラーゼ1ベータ2 (GUCY1B2)、タンパク質のプロリルヒドロキシラーゼドメイン (PHD1、PHD2、PHD3) ファミリー、もしくは可溶性グアニル酸シクラーゼ1ベータ3 (GUCY1B3)、egl-9ファミリーの低酸素症誘導性因子1 (EGLN1)、egl-9ファミリーの低酸素症誘導性因子2 (EGLN2)、egl-9ファミリーの低酸素症誘導性因子3 (EGLN3)、PPP1R12C (タンパク質ホスファターゼ1調節サブユニット12C)、ならびにこれらの任意の組合せまたは誘導体からなる群から選択される。

【0021】

本開示の新規な特徴は、添付の特許請求の範囲に詳細に示されている。本開示の原理が利用される例示的な実施形態を示す以下の詳細な説明を参照することにより、本開示の特徴および利点のより良い理解が得られるであろう。例示的な実施形態の添付図面は次の通りである。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】図1は、*in vitro*アッセイ (例えば全エクソームシーケンシング) を使用して、がん患者から得られた試料に由来するがん関連標的配列、例えば、ネオ抗原を同定し得る方法の例を描写する。方法は、標的配列を認識する第1のT細胞に由来するトランス遺伝子、例えば、T細胞受容体 (TCR) トランス遺伝子またはがん遺伝子をさらに同定することができる。がん関連標的配列およびTCRトランス遺伝子は、同じ患者の試料から得ることもでき、または異なる患者の試料から得ることもできる。方法は、トランス遺伝子 (例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子) を含む核酸を、第2のT細胞の膜を超えて効果的かつ効率的に送達することができる。いくつかの場合には、第1および第2のT細胞は、同じ患者から得られてもよい。他の場合には、第1および第2のT細胞は、異なる患者から得られてもよい。他の場合には、第1および第2のT細胞は、異なる患者から得られてもよい。方法は、非ウイルス性組込み系 (例えば、CRISPR、TALEN、トランスポゾンベースのZEN、メガヌクレアーゼ、またはMega-TA

L)を使用して、トランス遺伝子(例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子)を安全かつ効率的にT細胞のゲノムへと組み込んで操作T細胞を作製することが可能であり、故に、トランス遺伝子(例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子)は、操作T細胞内で確実に発現され得る。操作T細胞は、免疫学的効力および抗腫瘍効力を維持する状態で増殖させ、拡大することができ、がんを治療するために患者に投与することができる。

【0023】

【図2】図2は、トランス遺伝子(例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子)組み込みおよびトランス遺伝子(例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子)発現のためのいくつかの例示的なトランスポゾン構築物を示す。

10

【0024】

【図3】図3は、*in vitro*におけるmRNAの転写、および任意の細胞型(例えば、初代細胞、細胞株など)内で、相同組換え(HR)基質を作製するための鋳型としてのその使用を示す。ウイルスカセットの、*in vitro*における転写のために、ウイルスゲノムの5'LTR領域の上流に、T7、T3、または他の転写開始配列を置くことができる。ウイルスベクターのセンス鎖およびアンチセンス鎖の両方をコードするmRNAを使用して、収率を改善することができる。

【0025】

【図4】図4は、Cas9ヌクレアーゼプラスミド、HPRT gRNAプラスミド、Amaxa EGFPMAXプラスミド、およびHPRT標的ベクターを含む、4つのプラスミドの構造を示す。

20

【0026】

【図5】図5は、0.5kbのターゲティングアームを伴う、例示的なHPRT標的ベクターを示す。

【0027】

【図6】図6は、例示的な遺伝子(例えば、HPRT遺伝子)をターゲティングする、3つの潜在的なトランス遺伝子(例えば、TCRトランス遺伝子)ロックインデザインを示す。(1)外因性プロモーター：外因性プロモーター(「プロモーター」)により転写されるTCRトランス遺伝子(「TCR」)；(2)SAインフレーム転写：スプライシングを介して内因性プロモーター(矢印により示される)により転写されるTCRトランス遺伝子；および(3)融合体インフレーム翻訳：インフレーム翻訳を介して内因性プロモーターにより転写されるTCRトランス遺伝子。3つの例示的なデザイン全てが、遺伝子機能をロックアウトし得る。例えば、HPRT遺伝子またはPD-1遺伝子を、TCRトランス遺伝子の挿入によりロックアウトする場合、6-チオグアニン(thioguanine)選択を、選択アッセイとして使用することができる。

30

【0028】

【図7】図7は、Cas9+gRNA+標的プラスミドの共トランスフェクションが、バルク集団内で、良好なトランスフェクション効率をもたらしたことを示す。

【0029】

【図8】図8は、CD3+ T細胞についての、EGFP FACS解析の結果を示す。

40

【0030】

【図9】図9は、T細胞受容体の2つの種類を示す。

【0031】

【図10】図10は、2つのプラットフォームを使用する、T細胞トランスフェクション効率の達成を示す。

【0032】

【図11】図11は、T細胞数をスケールアップした場合、例えば、T細胞数を増大させた場合の、効率的トランスフェクションを示す。

【0033】

【図12】図12は、潜在的な標的部位において、CRISPR gRNAにより生じる

50

遺伝子改変の%を示す。

【0034】

【図13】図13は、刺激T細胞内のCRISPR誘導性二本鎖切断(DSB)を示す。

【0035】

【図14】図14は、RNA送達の最適化を示す。

【0036】

【図15】図15は、標的部位における二本鎖切断を示す。遺伝子ターゲティングは、ターゲティングされるCRISPR-Cas系を導入する前に、抗CD3および抗CD28で活性化させたT細胞内の、二本鎖切断の誘導に成功した。例示を目的として述べると、免疫チェックポイント遺伝子である、PD-1、CCR5、およびCTLA4を使用して、系を検証した。

10

【0037】

【図16】図16は、CCR5におけるトランス遺伝子(例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子)の組込みを表したものを示す。CCR5に対する1kbの組換えアームを含むプラスミドターゲティングベクターの例示的なデザインである。相同組換えを使用して他の目的の遺伝子をターゲティングするためには、3kbのTCR発現トランス遺伝子を、異なる遺伝子に対する組換えアームを含む類似のベクターに挿入することができる。組換えアームの外側のプライマーを使用するPCRによる解析により、遺伝子におけるトランス遺伝子(例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子)組込みの成功を裏付けることができる。

20

【0038】

【図17】図17は、刺激T細胞内のCCR5遺伝子におけるトランス遺伝子(例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子)組込みを描写する。陽性PCR結果は、トランスフェクションの72時間後のCCR5遺伝子における相同組換えの成功を裏付ける。

【0039】

【図18】図18は、プラスミドDNAのトランスフェクションに応答したT細胞の死を示す。

【0040】

【図19】図19は、T細胞を含むがこれらに限定されない、異なる細胞型内に存在する、細胞質DNAの生得的免疫センシング経路についての概略を示す。T細胞は、外来DNAを検出するために、両方の経路を発現する。細胞毒性は、ゲノム操作時における、これらの経路の活性化から生じ得る。

30

【0041】

【図20】図20は、図19のインヒビターが、アポトーシスおよびピロトーシスを遮断することを示す。

【0042】

【図21】図21は、代表的なプラスミド修飾の概略を示す。標準的プラスミドは、生得的免疫センシング系を誘発し得る、細菌性メチル化を含有する。細菌性メチル化を除去することにより、標準的プラスミドにより引き起こされる毒性を低減することができる。また、ベクターが、「自己のDNA」と類似するように、細菌性メチル化を除去し、哺乳動物性メチル化を付加することもできる。修飾はまた、合成一本鎖DNAの使用も含み得る。

40

【0043】

【図22】図22は、代表的な機能的操作トランス遺伝子(例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子)抗原受容体を示す。この操作トランス遺伝子(例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子)は、MART-1を発現する黒色腫腫瘍細胞株に対して高度に反応性である。TCRαと、β鎖とは、フリン切断部位、およびこれに続く2Aリボソームスキップペプチドにより連結されている。

【0044】

【図23】図23Aおよび23Bは、ガイドRNAのトランスフェクション後6日目にお

50

ける、PD-1、CTLA-4、PD-1、およびCTLA-2、またはCCR5、PD-1、およびCTLA-4の発現を示す。代表的ガイド：PD-1（P2、P6、P2/6）、CTLA-4（C2、C3、C2/3）、またはCCR5（CC2）である。A. は、阻害性受容体の発現パーセントを示す。B. は、対照ガイドRNAに照らして正規化した、阻害性受容体の発現を示す。

【0045】

【図24】図24Aおよび24Bは、非染色の、ガイドを伴わない対照と比較した、CRISPR、ならびにCTLA-4特異的ガイドRNAである、ガイド#2および#3の電気穿孔の後における、初代ヒトT細胞内のCTLA-4の発現を示す。B. は、非染色の、ガイドを伴わない対照と比較した、CRISPR、ならびにPD-1特異的ガイドRNAである、ガイド#2および#6の電気穿孔の後における、初代ヒトT細胞内のPD-1の発現を示す。

10

【0046】

【図25】図25は、CRISPR、ならびにマルチプレックス化させたCTLA-4ガイドRNAおよびPD-1ガイドRNAの電気穿孔の後における、初代ヒトT細胞内のCTLA-4およびPD-1の発現についてのFACS結果を示す。

【0047】

【図26】図26Aおよび26Bは、CRISPRによる処置後における、初代ヒトT細胞内の二重ロックアウトパーセントを示す。A. は、CTLA-4ガイド#2、#3、#2および#3、PD-1ガイド#2およびCTLA-4ガイド#2、PD-1ガイド#6およびCTLA-4ガイド#3で処置したT細胞内の、CTLA-4ロックアウトパーセントであって、Zapだけ、Cas9だけ、および全てのガイドRNA対照と比較したロックアウトパーセントを示す。B. は、PD-1ガイド#2、PD-1ガイド#6、PD-1ガイド#2および#6、PD-1ガイド#2およびCTLA-4ガイド#2、PD-1ガイド#6およびCTLA-4ガイド#3で処置したT細胞内の、PD-1ロックアウトパーセントであって、Zapだけ、Cas9だけ、および全てのガイドRNA対照と比較したロックアウトパーセントを示す。

20

【0048】

【図27】図27は、CRISPR、およびCTLA-4、PD-1、またはこれらの組合せに特異的なガイドRNAの電気穿孔後における、T細胞の生存率を示す。

30

【0049】

【図28】図28は、PD-1ガイドRNAだけを導入する条件下、PD-1ガイドRNAおよびCTLA-4ガイドRNAを導入する条件下、またはCCR5ガイドRNA、PD-1ガイドRNA、およびCTLA-4ガイドRNAを導入する条件下、Zapだけによる対照条件下、またはgRNAだけによる対照条件下における、PD-1ガイドRNA#2、#6、#2および#6による切断を示す、CEL-Iアッセイの結果を示す。

【0050】

【図29】図29は、CTLA-4ガイドRNAだけを導入する条件下、PD-1ガイドRNAおよびCTLA-4ガイドRNAを導入する条件下、またはCCR5ガイドRNA、PD-1ガイドRNA、およびCTLA-4ガイドRNAを導入する条件下、Zapだけによる対照条件下、またはgRNAだけによる対照条件下における、CTLA-4ガイドRNA#2、#3、#2および#3による切断を示す、CEL-Iアッセイの結果を示す。

40

【0051】

【図30】図30は、Zapだけによる対照条件下、Cas9だけによる対照条件下、またはガイドRNAだけによる対照条件下と比較した、CCR5ガイドRNAを導入する条件下、CCR5ガイドRNA、PD-1ガイドRNA、またはCTLA-4ガイドRNAを導入する条件下における、CCR5ガイドRNA#2による切断を示す、CEL-Iアッセイの結果を示す。

【0052】

50

【図31】図31は、2' O-メチルRNA修飾を伴う、最適化されたCRISPRガイドRNAを、5マイクログラムおよび10マイクログラムで用いる、初代ヒトT細胞内の、TCRアルファのノックアウトであって、FACSにおけるCD3の発現により測定されるノックアウトを示す。

【0053】

【図32】図32は、CRISPR、およびCTLA-4へのガイドRNAによる処置後における、T細胞の生存率および表現型を測定する方法を描写する。表現型は、正常FSC/SSCプロファイルを呈する処置細胞の頻度であって、電気穿孔単独による対照の頻度に照らして正規化された頻度を定量化することにより測定した。生存率はまた、FSC/SSCゲートをかけた集団内の細胞による、Viability Dyeの除外によっても測定した。T細胞表現型は、CD3およびCD62Lにより測定する。

10

【0054】

【図33】図33は、CRISPR、ならびにPD-1へのガイドRNA、ならびにPD-1およびCTLA-4へのガイドRNAによる処置後における、T細胞の生存率および表現型を測定する方法を示す。表現型は、正常FSC/SSCプロファイルを呈する処置細胞の頻度であって、電気穿孔単独による対照の頻度に照らして正規化された頻度を定量化することにより測定した。生存率はまた、FSC/SSCゲートをかけた集団内の細胞による、Viability Dyeの除外によっても測定した。T細胞表現型は、CD3およびCD62Lにより測定する。

20

【0055】

【図34】図34は、初代ヒトT細胞およびJurkat対照への、PD-1ガイドRNAまたはCTKA-4ガイドRNAのトランスフェクション後4日目における、CRISPR遺伝子編集を検出する、T7E1アッセイの結果を示す。NNとは、T7E1ヌクレアーゼを伴わない対照である。

【0056】

【図35】図35は、TIDE (tracking of indels by decomposition) 解析の結果を示す。遺伝子編集効率パーセントを、PD-1ガイドRNAおよびCTLA-4ガイドRNAについて示す。

【0057】

【図36】図36は、単一のガイドのトランスフェクションについての、TIDE (tracking of indels by decomposition) 解析の結果を示す。欠失または挿入を伴う配列のパーセントを、PD-1ガイドRNAまたはCTLA-1ガイドRNAおよびCRISPRをトランスフェクトした初代ヒトT細胞について示す。

30

【0058】

【図37】図37は、二重ターゲティングによるPD-1配列の欠失を示す。

【0059】

【図38】図38は、二重ターゲティングによるPD-1配列の欠失についての、PCR産物のシーケンシング結果を示す。試料6および14は、介在する135bpを切り出した、2つのgRNA配列の融合体により示される。

40

【0060】

【図39】図39は、二重ターゲティングによるCTLA-4配列の欠失を示す。二重ガイドによりターゲティングされたCTLA-4のシーケンシングにおいてもまた、2つのガイドRNA配列間の欠失が存在する（試料9および14）。T7E1アッセイは、PCRによる欠失を確認する。

【0061】

【図40】図40Aおよび40Bは、A. CRISPRのトランスフェクション後6日目における、ヒトT細胞の生存率；B. ヒトT細胞のトランスフェクション効率（GFP陽性%）についてのFACS解析を示す。

【0062】

50

【図41】図41は、抗CTLA-4 CRISPRガイドRNAをトランスフェクトした染色ヒトT細胞内のCTLA-4発現についてのFACS解析を示す。PEは、抗ヒトCD152（CTLA-4）である。

【0063】

【図42】図42Aおよび42Bは、抗CTLA-4ガイドRNAおよびCRISPRのトランスフェクション後における、CTLA-4陽性ヒトT細胞についてのCTLA-4 FACS解析を示す。B. は、抗CTLA-4ガイドRNAおよびCRISPRのトランスフェクション後における、ヒトT細胞内の、パルス対照と比べた、CTLA-4ノックアウト効率を示す。

【0064】

【図43】図43は、操作トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）を含有するミニサークルDNAを示す。

【0065】

【図44】図44は、CISH、PD-1、CTLA4、およびAAVS1のための修飾sgRNAを描写する。

【0066】

【図45】図45は、CRISPRおよび抗PD-1ガイドRNAのトランスフェクション後14日目における、PD-1 KOについてのFACS結果を描写する。PerCP-Cy5.5は、マウス抗ヒトCD279（PD-1）である。

【0067】

【図46】図46Aおよび46Bは、A. は、抗PD-1 CRISPR系のトランスフェクション後における、PD-1の発現パーセントを示す。B. は、Cas9だけによる対照と比較した、PD-1ノックアウト効率パーセントを示す。

【0068】

【図47】図47は、抗PD-1ガイド#2、抗PD-1ガイド#6、抗PD1ガイド#2および#6、または抗PD-1ガイド#2および#6および抗CTLA-4ガイド#2および#3と共に、CRISPR系をトランスフェクトしたヒトT細胞の、FSC/SSCサブセットについてのFACS解析を示す。

【0069】

【図48】図48は、CRISPRおよび抗CTLA-4ガイドRNAのトランスフェクション後6日目における、ヒトT細胞についてのFACS解析を示す。PEは、マウス抗ヒトCD152（CTLA-4）である。

【0070】

【図49】図49は、CRISPRならびに抗PD-1ガイドRNAおよび抗CTLA-4ガイドRNAのトランスフェクション後1日目における、ヒトT細胞および対照Jurkat細胞についてのFACS解析を示す。ヒトT細胞の生存率およびトランスフェクション効率を、トランスフェクトJurkat細胞と比較して示す。

【0071】

【図50】図50は、CRISPRおよび抗CTLA-4ガイドRNAをトランスフェクトした、CTLA-4染色ヒトT細胞についてのFACS解析による定量化データを描写する。トランスフェクション後6日目における、CTLA-4の発現パーセントおよびノックアウトパーセントについてのデータを示す。

【0072】

【図51】図51は、CRISPRおよび抗PD-1ガイドRNAをトランスフェクトした、PD-1染色ヒトT細胞についてのFACS解析を示す。トランスフェクション後14日目における、PD-1の発現（抗ヒトCD279 PerCP-Cy5.5）についてのデータを示す。

【0073】

【図52】図52は、CRISPRおよび抗PD-1ガイドRNAをトランスフェクトしたヒトT細胞についての、Cas9だけによる対照と比較した、PD-1の発現パーセン

10

20

30

40

50

トおよびPD-1のノックアウトパーセントを示す。

【0074】

【図53】図53は、CRISPR、抗CTLA-4、および抗PD-1ガイドRNAをトランスフェクトしたヒトT細胞の、14日目における細胞数および生存率を示す。

【0075】

【図54】図54は、CRISPR、ならびに抗PD-1ガイド#2単独、抗PD-1ガイド#2および#6、または抗CTLA-4ガイド#3単独の電気穿孔後14日目における、ヒトT細胞についてのFACSデータを示す。操作T細胞を、48時間にわたり再刺激して、CTLA-4およびPD-1の発現について評価し、ガイドRNAを伴わずに電気穿孔した対照細胞と比較した。

10

【0076】

【図55】図55は、CRISPR、ならびに抗CTLA-4ガイド#2および#3、抗PD-1ガイド#2および抗CTLA-4ガイド#3、または抗PD-1ガイド#2および#6、抗CTLA-4ガイド#3および#2の電気穿孔後14日目における、ヒトT細胞についてのFACSデータを示す。操作T細胞を、48時間にわたり再刺激して、CTLA-4およびPD-1の発現について評価し、ガイドRNAを伴わずに電気穿孔した対照細胞と比較した。

【0077】

【図56】図56は、初代ヒトT細胞内のCISH遺伝子座の、CRISPRを媒介する遺伝子改変についてのSurvivorアッセイの結果を描写する。

20

【0078】

【図57】図57A、図57B、および図57Cは、A. トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子）の概略を描写する。B. キメラ抗原受容体の概略を示す。C. B細胞受容体（BCR）の概略を示す。

【0079】

【図58】図58は、体細胞の変異負荷が、腫瘍型間で変動することを示す。腫瘍特異的ネオ抗原の作製および提示は理論的に、変異負荷と正比例する。

【0080】

【図59】図59は、核酸に対して施し得る、シュドウリジン-5'-三リン酸修飾および5-メチルシチジン-5'-三リン酸修飾を示す。

30

【0081】

【図60】図60は、CRISPRおよびCISH gRNA 1、3、4、5、または6をトランスフェクトした293T細胞についての、TIDEおよび密度測定の実験結果を示す。

【0082】

【図61】図61は、CRISPRおよびCISH gRNA 1、3、4、5、または6をトランスフェクトした293T細胞についての、密度測定解析の二連の実験結果を描写する。

【0083】

【図62】図62Aおよび62Bは、CISH gRNA 1についての、二連のTIDE解析A. およびB. を示す。

40

【0084】

【図63】図63Aおよび63Bは、CISH gRNA 3についての、二連のTIDE解析A. およびB. を示す。

【0085】

【図64】図64Aおよび64Bは、CISH gRNA 4についての、二連のTIDE解析A. およびB. を示す。

【0086】

【図65】図65Aおよび65Bは、CISH gRNA 5についての、二連のTIDE解析A. およびB. を示す。

50

【0087】

【図66】図66Aおよび66Bは、CISH gRNA 6についての、二連のTIDE解析A. およびB. を示す。

【0088】

【図67】図67は、初代T細胞内のCRISPRノックアウト後における、CISHタンパク質の喪失を示すウェスタンブロットを示す。

【0089】

【図68】図68A、68B、および68Cは、細胞数によるDNA生存率であって、一本鎖DNAまたは二本鎖DNAのトランスフェクションのA. 1日後、B. 2日後、C. 3日後におけるDNA生存率を描写する。M13のss/dsDNAは、7.25kbである。pUC57は、2.7kbである。GFPプラスミドは、6.04kbである。

10

【0090】

【図69】図69は、操作細胞の調製時または調製後においてモジュレートされ得る機構経路を示す。

【0091】

【図70】図70Aおよび70Bは、A. 3日目およびB. 7日目の、CRISPR系（15ugのCas9、10ugのgRNA）のトランスフェクション後における細胞数を示す。試料1：非処置である。試料2：パルスだけである。試料3：GFP mRNAである。試料4：パルスだけを施したCas9である。試料5：パルスだけを施した、5マイクログラムのミニサークルドナーである。試料6：パルスだけを施した、20マイクログラムのミニサークルドナーである。試料7：プラスミドドナー（5マイクログラム）である。試料8：プラスミドドナー（20マイクログラム）である。試料9：+ガイドPD1-2/+Cas9-ドナーである。試料10：+ガイドPD1-6/+Cas9-ドナーである。試料11：+ガイドCTLA4-2/+Cas9-ドナーである。試料12：+ガイドCTLA4-3/+Cas9-ドナーである。試料13：PD1-2/5ugのドナーである。試料14：PD1（二重）/5ugのドナーである。試料15：CTLA4-3/5ugのドナーである。試料16：CTLA4（二重）/5ugのドナーである。試料17：PD1-2/20ugのドナーである。試料18：PD1（二重）/20ugのドナーである。試料19：CTLA4-3/20ugのドナーである。試料20：CTLA4（二重）/20ugのドナーである。

20

30

【0092】

【図71】図71Aおよび71Bは、4日目における、ドナー核酸を伴わないPD-1の、A. gRNA 2、およびB. gRNA 6についてのTIDE解析を示す。

【0093】

【図72】図72Aおよび72Bは、4日目における、ドナー核酸を伴わない、CTLA4の、A. gRNA 2、およびB. gRNA 3についてのTIDE解析を示す。

【0094】

【図73】図73は、対照細胞内、5マイクログラムのドナーDNA（ミニサークル）を電気穿孔した細胞内、または20マイクログラムのドナーDNA（ミニサークル）を電気穿孔した細胞内の、7日目におけるTCRベータの検出についてのFACS解析を示す。

40

【0095】

【図74】図74は、CRISPR系、およびポリ核酸ドナーなし（対照）、5マイクログラムのポリ核酸ドナー（ミニサークル）、または20マイクログラムのポリ核酸ドナー（ミニサークル）のいずれかを電気穿孔した、7日目におけるT細胞の概要を示す。トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）陽性細胞のFACS解析の概要を示す。

【0096】

【図75】図75は、順方向におけるPD1 gRNA #2切断部位へのトランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）ミニサークルの組込みを示す。

【0097】

50

【図76】図76Aおよび76Bは、増大させる二本鎖ポリ核酸ドナー濃度で、CRISPR、および5'修飾または3'修飾（またはこれらの両方）を伴う、PD-1 gRNAまたはCISH gRNAをトランスフェクトしたヒトT細胞についてのGUIDE-Seq投与試験を使用する、4日目における生細胞の百分率を示す。B. は、CRISPR、およびPD-1 特異的 gRNA または CISH 特異的 gRNA をトランスフェクトしたヒトT細胞の、PD-1 遺伝子座またはCISH遺伝子座における組み込み効率を示す。

【0098】

【図77】図77は、PD-1 遺伝子部位またはCISH遺伝子部位における、dsDNAの組み込みについての、GoTaqおよびPhusionFlex解析を示す。

【0099】

【図78】図78は、CRISPR、および外因性トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）をコードする5マイクログラムまたは20マイクログラムのミニサークルDNAをトランスフェクトしたヒトT細胞の15日目のFACS解析を示す。

【0100】

【図79】図79は、CRISPR系、およびポリ核酸ドナーなし（対照）、5マイクログラムのポリ核酸ドナー（ミニサークル）、または20マイクログラムのポリ核酸ドナー（ミニサークル）のいずれかを電気穿孔した、15日目におけるT細胞の概要を示す。トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）陽性細胞のFACS解析の概要を示す。

【0101】

【図80】図80は、CRISPR、およびmTCRb鎖をコードするミニサークルのトランスフェクション後4日目における、デジタルPCRコピー数データによる、RNAseqと比べたコピー数を描写する。mTCRb鎖をコードするプラスミドドナーを、対照として使用した。

【0102】

【図81】図81Aおよび図81Bは、A. 外因性トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）をコードするミニサークルの用量の増加に伴う3日目のT細胞の生存率を示す。B. 外因性トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）をコードするミニサークルの用量の増加に伴う7日目のT細胞の生存率を示す。

【0103】

【図82】図82Aおよび82Bは、A. Lanzaヌクレオフェクションによる、T細胞への二本鎖DNAのトランスフェクションのための最適化条件（細胞数を、GFPをコードするプラスミドの濃度と対比する）；B. T細胞への、GFPタンパク質をコードする二本鎖DNAの、Lanzaヌクレオフェクションのための最適化条件を示す（遺伝子導入パーセントを、トランスフェクションのために使用されるGFPプラスミドの濃度と対比して示す）図である。

【0104】

【図83】図83Aおよび図83Bは、A. AAVトランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）送達のための、pDG6-AAVヘルパーフリーパッケージングプラスミドを描写する。B. ウイルス産生のための、293細胞のAAV一過性トランスフェクションのプロトコルの概略を示す。ウイルスは、初代ヒトT細胞への遺伝子導入のために精製および保存される。

【0105】

【図84】図84は、内因性免疫チェックポイント（CTLA4およびPD1を例示的な例として示す）に対する900bpの相同性アームで挟んだ、外因性トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）をコードするrAAVドナーを示す。

【0106】

【図85】図85は、AAVS1遺伝子に対する相同性アームで挟んだ外因性トランス遺

10

20

30

40

50

伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）をコードする rAAV 相同組換えドナーの、ゲノム組込みの概略を示す。

【0107】

【図86】図86A、86B、86C、および86Dは、AAVS1系を使用して生じ得る、可能な組換えイベントを示す。A. は、トランス遺伝子の組込みによる、AAVS1における、二本鎖切断の、相同性により導かれる修復を示す。B. は、AAVS1遺伝子の一方の鎖と、AAVS1の相補鎖の非相同末端結合性インデルとによる、相同性により導かれる修復を示す。C. は、トランス遺伝子の、AAVS1遺伝子部位への、非相同末端結合性挿入と、AAVS1における非相同末端結合性インデルとを示す。D. は、両方のAAVS1位置における非相同インデルであって、トランス遺伝子の、ゲノム部位への、ランダム組込みを伴う非相同インデルを示す。

10

【0108】

【図87】図87は、外因性トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）をコードするトランス遺伝子を免疫チェックポイント遺伝子に導入する、CRISPRおよびrAAVの組合せターゲティングアプローチを示す。

【0109】

【図88】図88Aおよび図88Bは、3日目のデータを示す。A. 外因性トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）をコードする7.5マイクログラムのミニサークルドナーの電気穿孔時に、カスパーゼおよびTBKインヒビターを使用したCRISPR電気穿孔実験を示す。生存率を、使用されるインヒビターの濃度と比較してプロットする。B. は、電気穿孔の効率を示す。陽性トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）パーセントを、使用されるインヒビターの濃度と対比して示す。

20

【0110】

【図89】図89は、CRISPR、および外因性トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）をコードするミニサークルDNA（7.5マイクログラム）を電気穿孔したヒトT細胞のFACSデータを示す。カスパーゼおよびTBKインヒビターを、電気穿孔時に添加した。

【0111】

【図90】図90Aおよび図90Bは、CRISPR、および外因性トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）をコードするミニサークルDNA（20マイクログラム）を電気穿孔したヒトT細胞のFACSデータを示す。A. トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）陽性細胞を、使用される免疫チェックポイント特異的ガイドと対比して示す、電気穿孔効率を示す。B. トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）陽性細胞を、使用される免疫チェックポイント特異的ガイドと対比して示す、電気穿孔効率のFACSデータを示す。

30

【0112】

【図91】図91は、CRISPR、およびミニサークルの様々な濃度での、外因性トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）をコードするミニサークルの電気穿孔後13日目のトランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）発現を示す。

40

【0113】

【図92】図92Aおよび図92Bは、CRISPR、および外因性トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）をコードするミニサークルDNAのトランスフェクションの前に、ヒトT細胞をプレフェルジンAおよびATMインヒビターで前処理した、細胞死インヒビター研究を示す。A. 電気穿孔後3日目におけるT細胞の生存率を示す。B. 電気穿孔後7日目におけるT細胞の生存率を示す。

【0114】

【図93】図93Aおよび図93Bは、CRISPR、および外因性トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）をコードするミニサークルDNAのトラ

50

ンスフェクションの前に、ヒトT細胞をブレフェルジンAおよびATMインヒビターで前処理した、細胞死インヒビター研究を示す。A. 電気穿孔後3日目における、T細胞におけるトランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）発現を示す。B. 電気穿孔後7日目における、T細胞におけるトランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）発現を示す。

【0115】

【図94】図94は、外因性トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）の組込みを迅速に検出する、スプライスアクセプターGFPレポーターアッセイを示す。

【0116】

【図95】図95は、外因性トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）の組込みを迅速に検出する、遺伝子座特異的デジタルPCRアッセイを示す。

【0117】

【図96】図96は、PGKプロモーターまたはスプライスアクセプターのどちらかを使用する、外因性トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）をコードする組換え（rAAV）ドナー構築物を示す。各構築物を、AAVS1チェックポイント遺伝子に対する850塩基対の相同性アーム（HA）で挟む。

【0118】

【図97】図97は、rAAV AAVS1トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）遺伝子ターゲティングベクターを示す。トランスジェニックトランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）発現カセットを、PPP1R12C遺伝子のイントロン領域内のAAVS1「セーフハーバー」遺伝子座に挿入するのに使用される、rAAVターゲティングベクターの概略的描示である。主要な特徴を、それらのヌクレオチド数サイズ（bp）と共に示す。ITR：内部タンデムリピート；PGK：ホスホグリセリン酸キナーゼ；mTCR：マウスT細胞受容体ベータ；SV40ポリA：サルウイルス40ポリアデニル化シグナル。

【0119】

【図98】図98は、修飾gRNAによる刺激の48時間後において、GFP+トランス遺伝子を電気穿孔したT細胞を示す。gRNAは、シュードウリジン、5'moC、5'meC、5'moU、5'hmc+5'moU、m6A、または5'moC+5'meCで修飾した。

【0120】

【図99】図99Aおよび99Bは、修飾gRNAによる刺激の48時間後において、GFP+トランス遺伝子を電気穿孔したT細胞について、GFP発現細胞のA. 生存率、およびB. MFIを描写する。gRNAは、シュードウリジン、5'moC、5'meC、5'moU、5'hmc+5'moU、m6A、または5'moC+5'meCで修飾した。

【0121】

【図100】図100Aおよび100Bは、A. 修飾キャップ除去型Cas9タンパク質、またはB. 非修飾Cas9タンパク質の比較についてのTIDE結果を示す。ゲノムの組込みは、Cas9 15マイクログラムおよび化学修飾gRNA 10マイクログラムで、非修飾Cas9またはキャップ除去型Cas9を電気穿孔した、T細胞のCCR5遺伝子座において測定した。

【0122】

【図101】図101Aおよび101Bは、逆転写酵素（RT）レポーターRNAを発現するJurkat細胞であって、Neon Transfection Systemを使用して、RTをコードするプラスミドおよびプライマー（濃度についての表を参照されたい）をトランスフェクトされ、トランスフェクション後3日目において、細胞の生存率およびGFPの発現についてアッセイされる、Jurkat細胞についてのA. 生存率、およびB. 逆転写酵素活性を示す。GFP陽性細胞は、RT活性を伴う細胞を表す。

【0123】

【図102】図102Aおよび102Bは、ヒトTILの刺激前および刺激後における絶対細胞数を示す。A. は、刺激前および刺激後における、RPMI培地中またはex vivo培地中で培養された、第1のドナーの細胞数を示す。B. は、刺激前および刺激後における、RPMI培地中で培養された、第2のドナーの細胞数を示す。

【0124】

【図103】図103Aおよび103Bは、A. 自家フィーダーの添加を伴うか、またはB. 自家フィーダーの添加を伴わない、PD-1遺伝子座をターゲティングするCRISPR系を電気穿孔したヒト腫瘍浸潤リンパ球（TIL）または対照細胞の細胞拡大を示す。

10

【0125】

【図104】図104Aおよび104Bは、CRISPR系単独（対照）；GFPプラスミド（ドナー）単独（対照）；ドナーおよびCRISPR系；ドナー、CRISPR、およびcFLPタンパク質；ドナー、CRISPR、およびhAd5 E1A（E1A）タンパク質；またはドナー、CRISPR、およびHPV18 E7タンパク質を電気穿孔したヒトT細胞を示す。GFPについてのFACS解析は、電気穿孔の、A. 48時間後、またはB. 8日間後において測定した。

【0126】

【図105】図105は、血清を用いてトランスフェクション後4日目における、CRISPR系を使用してスプライスアクセプターGFPをコードするトランス遺伝子を含む組換えAAV（rAAV）ベクターをトランスフェクトしたT細胞のフローサイトメトリ解析を示す。示された条件は、Cas9およびgRNA、GFP mRNA、Virapur低力価ウイルス、Virapur低力価ウイルスおよびCRISPR、SA-GFP pAAVプラスミド、SA-GFP pAAVプラスミドおよびCRISPR、AAVancedウイルス、またはAAVancedウイルスおよびCRISPRである。

20

【0127】

【図106】図106は、血清なしでトランスフェクション後4日目における、CRISPR系を使用してスプライスアクセプターGFPをコードするトランス遺伝子を含む組換えAAV（rAAV）ベクターをトランスフェクトしたT細胞のフローサイトメトリ解析を示す。示された条件は、Cas9およびgRNA、GFP mRNA、Virapur低力価ウイルス、Virapur低力価ウイルスおよびCRISPR、SA-GFP pAAVプラスミド、SA-GFP pAAVプラスミドおよびCRISPR、AAVancedウイルス、またはAAVancedウイルスおよびCRISPRである。

30

【0128】

【図107】図107Aおよび図107Bは、A. 血清を用いてトランスフェクション後7日目における、CRISPR系を使用してスプライスアクセプターGFPをコードするトランス遺伝子を含む組換えAAV（rAAV）ベクターをトランスフェクトしたT細胞のフローサイトメトリ解析を示す。示された条件は、SA-GFP pAAVプラスミドならびにSA-GFP pAAVプラスミドおよびCRISPRである。B. 血清を用いてまたは血清なしでトランスフェクション後7日目における、CRISPR系を使用してスプライスアクセプターGFPをコードするトランス遺伝子を含む組換えAAV（rAAV）ベクターをトランスフェクトしたT細胞のフローサイトメトリ解析を示す。示された条件は、AAVancedウイルスのみまたはAAVancedウイルスおよびCRISPRである。

40

【0129】

【図108】図108は、トランスフェクション（+）時点、血清除去およびトランスフェクション後4時間、または血清除去およびトランスフェクション後16時間における、SA-GFP pAAVプラスミドまたはSA-GFP pAAVプラスミドおよびCR

50

I S P Rのトランスフェクション後の細胞生存率を示す。

【0130】

【図109】図109は、血清条件下3～4日、血清除去4時間、または血清除去16時間における、スプライスアクセプター-GFP (SA-GFP) pAAVプラスミドのノックインの読み出しを示す。対照 (非トランスフェクト) 細胞を、SA-GFP pAAVプラスミドのみ、またはSA-GFP pAAVプラスミドおよびCRISPRをトランスフェクトした細胞と比較する。

【0131】

【図110】図110は、 1×10^5 MOI、 3×10^5 MOI、または 1×10^6 MOIの濃度でトランスフェクション後3日目における、SA-GFPトランス遺伝子をコードするrAAVまたはrAAVおよびCRISPRをトランスフェクトしたヒトT細胞のFACS解析を示す。

10

【0132】

【図111】図111は、 1×10^5 MOI、 3×10^5 MOI、または 1×10^6 MOIの濃度でトランスフェクション後7日目における、SA-GFPトランス遺伝子をコードするrAAVまたはrAAVおよびCRISPRをトランスフェクトしたヒトT細胞のFACS解析を示す。

【0133】

【図112】図112は、 1×10^5 MOI、 3×10^5 MOI、または 1×10^6 MOIの濃度でトランスフェクション後3日目における、トランス遺伝子 (例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子) をコードするrAAVまたはrAAVおよびCRISPRをトランスフェクトしたヒトT細胞のFACS解析を示す。

20

【0134】

【図113】図113は、 1×10^5 MOI、 3×10^5 MOI、または 1×10^6 MOIの濃度でトランスフェクション後7日目における、トランス遺伝子 (例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子) をコードするrAAVまたはrAAVおよびCRISPRをトランスフェクトしたヒトT細胞のFACS解析を示す。

【0135】

【図114】図114Aおよび図114Bは、4時間、6時間、8時間、12時間、18時間、および24時間の時点の、A. Cas9およびgRNAのみ、またはB. rAAV、CRISPR、およびSA-GFPトランス遺伝子をトランスフェクトしたヒトT細胞のFACS解析を示す。

30

【0136】

【図115】図115Aおよび図115Bは、A. 刺激後4日目における時間の関数としてのrAAV遺伝子導入 (% GFP+) を示す。B. は、刺激後4日目における、4時間、6時間、8時間、12時間、18時間、および24時間の時点の、rAAVのトランスフェクトまたは非トランスフェクト細胞の生細胞数を示す。

【0137】

【図116】図116は、 1×10^5 MOI、 3×10^5 MOI、 1×10^6 MOI、 3×10^6 MOI、または 5×10^6 MOIの濃度でトランスフェクション後4日目における、SA-GFPトランス遺伝子をコードするrAAVまたはrAAVおよびCRISPRをトランスフェクトしたヒトT細胞のFACS解析を示す。

40

【0138】

【図117】図117Aおよび図117Bは、A. 種々の感染多重度 (multiplicity of infection) (MOI) レベル、 $1 \sim 5 \times 10^6$ で刺激後4日目における、SA-GFPトランス遺伝子をコードするAAVベクターをトランスフェクトしたヒトT細胞のGFP陽性 (GFP+ve) 発現を示す。B. $0 \sim 5 \times 10^6$ のMOIレベルでSA-GFPトランス遺伝子をコードするAAVをトランスフェクトした、またはトランスフェクトしていないヒトT細胞の刺激後4日目における生細胞数を示す。

【0139】

50

【図118】図118は、刺激後4日目における、rAAVまたはrAAVおよびCRISPRをトランスフェクトしたヒトT細胞のFACS解析を示す。細胞は、 1×10^5 MOI、 3×10^5 MOI、 1×10^6 MOI、 3×10^6 MOI、または 5×10^6 MOIのMOIレベルでトランスフェクトした。

【0140】

【図119】図119は、種々の感染多重度(MOI)レベル、 $1 \sim 5 \times 10^6$ で刺激後4日目における、トランス遺伝子(例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子)をコードするAAVベクターをトランスフェクトしたヒトT細胞のトランス遺伝子(例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子)陽性(TCR+ve)発現を示す。

【0141】

10

【図120】図120Aおよび図120Bは、A. SA-GFPトランス遺伝子をコードするAAV、トランス遺伝子(例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子)をコードするAAV、CISHおよびトランス遺伝子(例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子)をターゲティングするCRISPR、またはCTLA-4およびトランス遺伝子(例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子)をターゲティングするCRISPRをウイルスでトランスフェクトしたヒトT細胞の発現効率パーセントを示す。B. は、rAAV、またはrAAVおよび、CISHまたはCTLA-4遺伝子をターゲティングするCRISPR gRNAをトランスフェクトした細胞の刺激後4日目におけるトランス遺伝子(例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子)発現を示すFACSプロットである。

20

【0142】

【図121】図121Aおよび図121Bは、刺激後4日目のヒトT細胞におけるトランス遺伝子(例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子)発現のFACSプロットを描写する。A. は、対照非トランスフェクト細胞を示す図であり、B. は、AAS1pAAVプラスミドのみ、CISHおよびpAAVをターゲティングするCRISPR、CTLA-4およびpAAVをターゲティングするCRISPR、NHEJミニサークルベクター、AAVS1pAAVおよびCRISPR、CISHおよびpAAV-CISHプラスミドをターゲティングするCRISPR、CTLA-4 pAAVプラスミドおよびCRISPR、またはNHEJミニサークルおよびCRISPRをトランスフェクトした細胞を示す。

30

【0143】

【図122】図122Aおよび図122Bは、A. 1×10^5 MOIから 3×10^5 MOI、 1×10^6 MOIのMOIでトランスフェクション後3日目またはトランスフェクション前(対照)の、SA-GFPをコードするrAAVをトランスフェクトしたヒトT細胞におけるGFP陽性(GFP+)発現パーセントを示す。B. は、 1×10^5 MOIから 3×10^5 MOI、 1×10^6 までのMOIでトランスフェクション後3日目またはトランスフェクション前(対照)の、トランス遺伝子(例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子)をコードするrAAVをトランスフェクトしたヒトT細胞におけるトランス遺伝子(例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子)陽性発現を示す。

【0144】

40

【図123】図123Aおよび図123Bは、トランス遺伝子(例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子)をコードするrAAVウイルスをトランスフェクション後4～19日目の、ヒトT細胞における外因性トランス遺伝子(例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子)の発現を示す。B. SA-GFPをコードするrAAVウイルスをトランスフェクション後2～19日目の、ヒトT細胞におけるSA-GFPの発現を示す。

【0145】

【図124】図124は、トランスフェクション後14日目における、各rAAVがSA-GFPトランス遺伝子をコードする、rAAVまたはrAAV+CRISPRを 1×10^5 MOIから 3×10^5 MOI、または 1×10^6 のMOIでトランスフェクトしたヒトT細胞のFACSプロットを描写する。

50

【0146】

【図125】図125は、トランスフェクション後14日目における、各rAAVがトランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）をコードする、rAAVまたはrAAV+CRISPRを 1×10^5 MOIから 3×10^5 MOI、または 1×10^6 のMOIでトランスフェクトしたヒトT細胞のFACSプロットを描写する。

【0147】

【図126】図126は、トランスフェクション後19日目における、各rAAVがSA-GFPトランス遺伝子をコードする、rAAVまたはrAAV+CRISPRを 1×10^5 MOIから 3×10^5 MOI、または 1×10^6 MOIでトランスフェクトしたヒトT細胞のFACSプロットを示す。

10

【0148】

【図127】図127は、トランスフェクション後19日目における、各rAAVがトランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）をコードする、rAAVまたはrAAV+CRISPRを 1×10^5 MOIから 3×10^5 MOI、または 1×10^6 のMOIでトランスフェクトしたヒトT細胞のFACSプロットを示す。

【0149】

【図128】図128は、トランスフェクション後3もしくは4日目、7、14または19日目における、SA-GFPまたはトランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）をコードするAAVをトランスフェクトしたヒトT細胞のFACSプロットを示す。X軸は、トランス遺伝子発現を示す。

20

【0150】

【図129】図129Aおよび図129Bは、A. 刺激後3～14日目の、トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）をコードするrAAVを 1×10^5 MOIから 3×10^5 MOI、 1×10^6 、 3×10^6 MOI、または 5×10^6 のMOIでトランスフェクトしたヒトT細胞における、トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）発現を示す。B. は、トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）をコードするrAAVを、CRISPRと共におよびCRISPRなしで 1×10^5 MOIから 3×10^5 MOI、 1×10^6 、 3×10^6 MOI、または 5×10^6 のMOIでトランスフェクトした細胞の、刺激後14日目の生細胞数を示す。

30

【0151】

【図130】図130は、刺激後14日目における、 1×10^5 MOI、 3×10^5 MOI、 1×10^6 、 3×10^6 MOI、または 5×10^6 のMOIでrAAVのみまたはrAAVおよびCRISPRをトランスフェクトした細胞の、トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）発現を示す。

【0152】

【図131】図131は、4日目～14日目における、rAAVのみ、またはrAAVおよび、CISH遺伝子をターゲティングし、トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）をコードするCRISPRをトランスフェクトした細胞の、トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）発現を示す。

40

【0153】

【図132】図132は、4日目～14日目における、rAAVのみ、またはrAAVおよび、CTLA-4遺伝子をターゲティングし、トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）をコードするCRISPRをトランスフェクトした細胞の、トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）発現を示す。

【0154】

【図133】図133Aおよび図133Bは、SA-GFPをコードするトランス遺伝子をトランスフェクトしたヒトT細胞の、刺激後3日目におけるGFP FACSデータを示す。A. 非トランスフェクト対照またはGFP mRNAトランスフェクト対照細胞を示す。B. ウイルスタンパク質なし、E4orf6のみ、E1b55k H373A、ま

50

たはE4orf6+E1b55K H373Aを有する、rAAVパルス細胞、またはrAAVおよびCRISPRトランスフェクト細胞を示す。

【0155】

【図134】図134は、ウイルスタンパク質を利用しない、またはE4orf6およびE1b55k H373Aを利用して、rAAVパルスまたはrAAVおよびCRISPRで刺激後3日目における、トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）をコードするrAAVをトランスフェクトしたヒトT細胞のFACS解析を示す。AAVS1遺伝子を、トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）組みに利用した。

【0156】

【図135】図135Aおよび図135Bは、ウイルスタンパク質を利用しない、またはE4orf6およびE1b55k H373Aを利用して、rAAVパルス、またはrAAVおよびCRISPRで刺激後3日目における、トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）をコードするrAAVをトランスフェクトしたヒトT細胞のFACS解析を示す。CTLA4遺伝子を、トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）組みに利用した。Bは、非トランスフェクト対照およびミニサークルのみ対照のFACSデータを示す。

【0157】

【図136】図136Aおよび図136Bは、刺激後3日目における、トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）をコードするrAAVをトランスフェクトしたヒトT細胞の発現データを示す。A. 対照細胞（NT）と比較した、CTLA4、PD-1、AAVS1、またはCISHのゲノム修飾を有するT細胞における、トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）発現のフローサイトメトリーデータの概要を示す。B. 対照細胞（NT）と比較した、CTLA4、PD-1、AAVS1、またはCISHのゲノム修飾を有するT細胞の、トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）発現のフローデータを示す。

【0158】

【図137】図137Aおよび図137Bは、刺激後3日目および7日目における、トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）をコードするrAAVをトランスフェクトしたヒトT細胞の発現データを示す。A. 3および7日目の、対照細胞（NT）と比較した、CTLA4、PD-1、AAVS1、またはCISHのゲノム修飾を有するT細胞における、トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）発現のフローサイトメトリーデータの概要を示す。B. 刺激後7日目の、対照細胞（NT）と比較した、CTLA4、PD-1、AAVS1、またはCISHのゲノム修飾を有するT細胞の、トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）発現のフローデータを示す。

【0159】

【図138】図138は、rAAVドナーデザインの概略を示す。

【0160】

【図139】図139は、rAAVを遺伝子導入後14日目のトランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）発現を示す。細胞は、PD-1またはCTLA-4をノックダウンするためにCRISPRも用いて修飾する。データは、非遺伝子導入（NT）細胞と比較した操作細胞を示す。

【0161】

【図140】図140は、rAAVによるトランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）ノックイン後のPD-1およびCTLA-4発現を示す。トランスフェクション後17日目のFACSデータを示す。

【0162】

【図141】図141Aは、複数のPBMCドナーについての、CRISPRおよびrAAV操作細胞のトランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）発現

10

20

30

40

50

パーセントを示す。図141Bは、ドナー91、92、および93の一塩基多型（SNP）データを示す。

【0163】

【図142】図142は、複数のドナーについての、PD-1、AAVS1、CISH、およびCTLA-4におけるSNP頻度を示す。

【0164】

【図143】図143は、トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）を発現し、CISHノックアウトを有するように操作された細胞のmTORアッセイからのデータを示す。データ概要は、電気穿孔後3、7、および14日のものである。

【0165】

【図144】図144は、CRISPRおよびrAAVを使用して外因性トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）を発現し、CISHノックアウトを有するように操作されたT細胞についての、参照対照と比較したCISHのコピー数を示す。

【0166】

【図145】図145Aは、CISH KO後3、7、14日目における、GAPDH対照と対比したmTOR1のddPCRデータを示す。図145Bは、rAAVによるCISH KOおよびトランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）ノックイン後3、7、14日目における、トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）発現を示す。

【0167】

【図146】図146Aは、PD-1におけるインデルの存在についてのオフターゲット（OT）解析の概要を示す。図146Bは、CISHにおけるインデルの存在についてのオフターゲット解析の概要を示す。

【0168】

【図147】図147Aは、組み込んだトランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）と比べた、デジタルPCRプライマーおよびプローブの配置を示す。図147Bは、未処理細胞およびCRISPR CISH KO+rAAV修飾細胞についての、参照遺伝子と比べた組み込んだトランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）を示すデジタルPCRデータを示す。

【0169】

【図148】図148Aは、CISH KO細胞における、ddPCRによるトランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）組み込みパーセントを示す。図148Bは、CRISPRの電気穿孔およびrAAV遺伝子導入後3、7、および14日目における、トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）組み込みおよびタンパク質発現を示す。

【0170】

【図149】図149は、未処理細胞およびCRISPR CTLA-4 KO+rAAV修飾細胞についての、参照遺伝子と比べた組み込んだトランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）を示すデジタルPCRデータを示す。

【0171】

【図150】図150Aは、3、7、および14日目の、CTLA-4 KO細胞におけるddPCRによるトランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）組み込みパーセントを示す。図150Bは、CRISPR CTLA-4 KOの電気穿孔および外因性トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）をコードするrAAVの遺伝子導入後3、7、および14日目における、トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）組み込みおよびタンパク質発現を示す。

【0172】

【図151】図151は、rAAVのトランスフェクション（ 2×10^5 細胞の小規模トランスフェクションおよび 1×10^6 細胞の大規模トランスフェクション）およびCRI

10

20

30

40

50

S P Rの電気穿孔後3、7、および14日目における、完全なトランス遺伝子（例えば、T C Rトランス遺伝子またはがん遺伝子）発現についてのフローサイトメトリーデータを示す。

【0173】

【図152】図152は、C R I S P R処理細胞（ 2×10^5 細胞）におけるr A A Vを遺伝子導入後14日目の、F A C S解析によるトランス遺伝子（例えば、T C Rトランス遺伝子またはがん遺伝子）発現を示す。細胞には、C T L A-4またはP D-1に対するC R I S P RおよびガイドRNAも電気穿孔した。

【0174】

【図153】図153は、複数のP B M Cドナーについての、r A A Vおよび、A A V S 1、P D-1、C I S H、またはC T L A-4におけるC R I S P R K Oを遺伝子導入後14日目の、トランス遺伝子（例えば、T C Rトランス遺伝子またはがん遺伝子）発現パーセントを示す。

10

【0175】

【図154】図154は、8 p m o l二本鎖（d s）または16 p m o l d sドナー（O D N）を利用する、C I S HにおけるG U I D E-s e qデータを示す。

【0176】

【図155】図155 Aは、P D-1に対する相同性アームを有する、外因性トランス遺伝子（例えば、T C Rトランス遺伝子またはがん遺伝子）をコードするr A A Vベクターについてのベクターマップを示す。図155 Bは、P D-1に対する相同性アームおよびM N Dプロモーターを有する、外因性トランス遺伝子（例えば、T C Rトランス遺伝子またはがん遺伝子）をコードするr A A Vベクターについてのベクターマップを示す。

20

【0177】

【図156】図156は、溶解緩衝液を使用しないまたは溶解緩衝液を用いる、単一細胞P C Rの比較を示す。細胞はC R I S P Rで処理し、C I S H遺伝子においてノックアウトを有する。

【0178】

【図157】図157 Aは、トランス遺伝子（例えば、T C Rトランス遺伝子またはがん遺伝子）ノックインを示す概略を示す。図157 Bは、r A A Vトランス遺伝子（例えば、T C Rトランス遺伝子またはがん遺伝子）ノックインを有する細胞のウェスタンブロットを示す。

30

【0179】

【図158】図158は、C R I S P Rおよび抗C I S HガイドRNAをトランスフェクション後28日目の、C I S H遺伝子座における単一細胞P C Rを示す。細胞に、外因性トランス遺伝子（例えば、T C Rトランス遺伝子またはがん遺伝子）をコードするr A A Vも遺伝子導入した。

【0180】

【図159】図159 Aは、外因性トランス遺伝子（例えば、T C Rトランス遺伝子またはがん遺伝子）をコードするr A A Vを遺伝子導入後7日目における、トランス遺伝子（例えば、T C Rトランス遺伝子またはがん遺伝子）発現を示す。図159 Bは、外因性トランス遺伝子（例えば、T C Rトランス遺伝子またはがん遺伝子）をコードするr A A Vを遺伝子導入後7日目における、ウェスタンブロットを示す。

40

【0181】

【図160】図160は、H I F-1および代謝へのその関与の概略を示す。

【発明を実施するための形態】

【0182】

開示の詳細な説明

以下の記載および実施例は、本開示の実施形態を詳細に例示する。本開示は、本明細書で記載される特定の実施形態に限定されるものではなく、したがって変化し得ることを理解されたい。当業者は、その範囲内に包含される本開示の多数の変形および改変が存在す

50

ることを認識するであろう。

定義

【0183】

「AAV」または「組換えAAV」または「rAAV」という用語は、AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、もしくはAAV-12を含む公知の血清型のいずれかのアデノ随伴ウイルス、自己相補的AAV (scAAV)、rh10、もしくはハイブリッドAAV、またはこれらの任意の組合せ、誘導体、もしくは変異体を指す。AAVは、小型無エンベロープ一本鎖DNAウイルスである。それらは、非病原性パルボウイルスであり、複製のために、ヘルパーウイルス、例えば、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、およびCMVを必要とし得る。野生型AAVは、母集団において一般的であり、任意の公知の病理と関連付けられない。ハイブリッドAAVは、AAVからの遺伝子素材および異なるウイルスからの遺伝子素材を含むAAVである。キメラAAVは、2つまたはそれよりも多いAAV血清型からの遺伝子素材を含むAAVである。場合によって、AAVは、キメラAAVであり得る。AAV変異体は、その親AAVと比較して、そのカプシドタンパク質において1または複数のアミノ酸変異を含むAAVである。本明細書で使用される、AAVは、鳥類AAV、ウシAAV、イヌAAV、ウマAAV、霊長類AAV、非霊長類AAV、およびヒツジAAVを含み、霊長類AAVは、非霊長類に感染するAAVを指し、非霊長類AAVは、非霊長類動物に感染するAAV、例えば、鳥類に感染する鳥類AAVを指す。場合によって、野生型AAVは、repおよびcap遺伝子を含む、rep遺伝子は、ウイルス複製に必要とされ、cap遺伝子は、カプシドタンパク質の合成に必要とされる。

【0184】

「組換えAAVベクター」または「rAAVベクター」または「AAVベクター」という用語は、上述のAAV血清型のいずれか由来のベクターを指す。場合によって、AAVベクターは、全体または部分、例えば、repおよび/またはcap遺伝子が欠失したAAV野生型遺伝子のうちの1または複数を含み得るが、遺伝子治療のためのAAVウイルスのパッケージングおよび使用に必要とされる機能エレメントを含有する。例えば、オープンリーディングフレームまたはクロニングされた外因性配列を挟む機能的なITR (inverted terminal repeat) またはITR配列は、AAVビリオンの複製およびパッケージングに重要であることが公知であるが、AAVが、本明細書で記載される実施形態、例えば、遺伝子治療または遺伝子送達系のための使用に適するように、ITR配列は、ヌクレオチドの挿入、欠失、または置換を含んで、野生型ヌクレオチド配列から修飾され得る。一部の態様では、本明細書に参照により組み込まれる、Wu、Hum Gene Ther.、2007年、18巻(2号): 171~82頁で説明される通り、自己相補的ベクター(sc)、例えば、ウイルス第二鎖DNA合成のための必要条件をバイパスすることができ、トランス遺伝子タンパク質の発現のより高率を引き起こし得る自己相補的AAVベクターが使用され得る。一部の態様では、AAVベクターは、最適血清型、プロモーター、およびトランス遺伝子の選択を可能にするように作製され得る。場合によって、ベクターは、免疫細胞に選択的に結合または感染するターゲティングされたベクターまたは修飾ベクターであり得る。

【0185】

「AAVビリオン」または「rAAVビリオン」という用語は、本明細書で記載されるAAVベクターをキャプシド形成する少なくとも1つのAAVカプシドタンパク質を含むカプシドを含むウイルス粒子を指し、ベクターは、一部の実施形態において異種ポリヌクレオチド配列またはトランス遺伝子をさらに含み得る。

【0186】

本明細書で使用される基準数値およびその文法的同等物に関する、「約」という用語およびその文法的同等物は、その値からプラスまたはマイナス10%の範囲の値を含み得る。例えば、「約10」という量は、9~11の量を含む。基準数値に関する「約」という

用語はまた、その値からプラスまたはマイナス10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%の範囲の値も含み得る。

【0187】

本明細書で使用される「活性化」という用語およびその文法的同等物は、細胞が、休眠状態から、活性状態へと移行する過程を指す場合がある。この過程は、抗原への応答、遊走、および／または機能的活性状態への、表現型もしくは遺伝子的変化を含み得る。例えば、「活性化」という用語は、T細胞活性化の段階的過程を指す場合がある。例えば、T細胞は、完全に活性化するのに、少なくとも2つのシグナルを要求し得る。第1のシグナルは、抗原-MHC複合体による、トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）の係合の後で生じることが可能であり、第2のシグナルは、共刺激性分子の係合により生じ得る。in vitroにおいて、抗CD3は、第1のシグナルを模倣することが可能であり、抗CD28は、第2のシグナルを模倣し得る。

10

【0188】

本明細書で使用される「隣接する」という用語およびその文法的同等物は、基準の対象物のすぐ隣を指す場合がある。例えば、ヌクレオチド配列の文脈における隣接するという用語は、間にヌクレオチドを伴わないことを意味する。例えば、ポリヌクレオチドBと隣接するポリヌクレオチドAとは、AとBとの間にヌクレオチドを伴わないABを意味し得る。

【0189】

本明細書で使用される「抗原」という用語およびその文法的同等物は、1または複数の受容体が結合することが可能な、1または複数のエピトープを含有する分子を指す場合がある。例えば、抗原は、宿主の免疫系を刺激して、抗原が提示されている場合の、細胞性の抗原特異的免疫応答をもたらす場合もあり、体液性抗体応答をもたらす場合もある。抗原はまた、それ自体により、または別の分子と組み合わせて存在する場合に、細胞性応答および／または体液性応答を誘発する能力も有し得る。例えば、腫瘍細胞抗原は、トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）により認識され得る。

20

【0190】

本明細書で使用される「エピトープ」という用語およびその文法的同等物は、抗体、B細胞、T細胞、または操作細胞により認識され得る、抗原の一部を指す場合がある。例えば、エピトープは、トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）により認識されるがんエピトープであり得る。また、抗原内の複数のエピトープも認識することができる。エピトープはまた、変異している場合もある。

30

【0191】

本明細書で使用される「自家」という用語およびその文法的同等物は、同じ存在に由来することを指す場合がある。例えば、試料（例えば、細胞）を採取し、加工し、後に同じ対象（例えば、患者）へと戻すことができる。自家工程は、ドナーとレシピエントとが異なる対象である、同種工程と区別される。

【0192】

「～へとバーコードづけされた」という用語は、第1の分子が、第2の分子を同定するのに使用し得るバーコードを含有する場合における、分子間の関係を指す。

40

【0193】

本明細書で使用される「がん」という用語およびその文法的同等物は、細胞の過剰増殖であって、その固有の形質（正常な制御の喪失）が、調節されていない増殖、分化の欠如、限局的な組織浸潤、および転移を結果としてもたらす過剰増殖を指す場合がある。本発明の方法との関連で、がんは、急性リンパ球がん、急性骨髄性白血病、胞巣状横紋筋肉腫、膀胱がん、骨がん、脳腫瘍、乳がん、肛門がん、肛門管がん、直腸がん、眼がん、肝臓内胆管がん、関節がん、頸部がん、胆嚢がん、または胸膜がん、鼻がん、鼻腔がん、または中耳がん、口腔がん、外陰がん、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性がん、結腸がん、食道がん、子宮頸がん、線維肉腫、消化管カルチノイド腫瘍、ホジキンリンパ腫、下咽頭がん、腎臓がん、喉頭がん、白血病、液性腫瘍、肝臓がん、肺がん、リンパ腫、悪性中皮

50

腫、マスト細胞腫、黒色腫、多発性骨髄腫、鼻咽頭がん、非ホジキンリンパ腫、卵巣がん、膵臓がん、腹膜がん、網がん、および腸間膜がん、咽頭がん、前立腺がん、直腸がん、腎臓がん、皮膚がん、小腸がん、軟組織がん、固体腫瘍、胃がん、精巣がん、甲状腺がん、尿管がん、および／または膀胱がんのうちのいずれかを含む、任意のがんであり得る。本明細書で使用される「腫瘍」という用語は、細胞または組織の異常な増殖であって、例えば、悪性型または良性型の増殖を指す。

【0194】

本明細書で使用される「がんネオ抗原」または「ネオ抗原」または「ネオエピトープ」という用語およびその文法的同等物は、正常な、変異していない宿主のゲノム内ではコードされない抗原を指す場合がある。「ネオ抗原」は、場合によって、腫瘍形成性のウイルスタンパク質、または体細胞変異の帰結として発生する異常なタンパク質を表し得る。例えば、ネオ抗原は、ウイルスタンパク質の活性を介する、細胞機構の破壊により発生し得る。別の例は、場合によって、体細胞変異をもたらし得る、発がん性化合物への曝露であり得る。この体細胞変異は最終的に、腫瘍／がんの形成をもたらし得る。

【0195】

本明細書で使用される「細胞傷害作用」という用語は、細胞の正常状態の、意図されないかまたは所望されない変更を指す。細胞の正常状態とは、細胞傷害性組成物、細胞傷害剤、および／または細胞傷害性状態への細胞の曝露の前に顕在化されるかまたは存在する状態を指す場合がある。一般に、正常状態にある細胞とは、ホメオスタシスにある細胞である。細胞の正常状態の、意図されないかまたは所望されない変更は、例えば、細胞死（例えば、プログラム細胞死）、複製の潜在能の減殺、膜の完全性などの細胞の完全性の減殺、代謝活性の減殺、発生能の減殺、または本出願で開示される細胞傷害作用のうちのいずれかの形態で顕在化され得る。

【0196】

「細胞傷害作用を低減すること」または「細胞傷害作用を低減する」という語句は、細胞傷害性組成物、細胞傷害剤、および／または細胞傷害性状態への曝露時における、細胞の正常状態の、意図されないかまたは所望されない変更の程度または頻度の低減を指す。語句は、細胞傷害性組成物、細胞傷害剤、および／または細胞傷害性状態へと曝露された個々の細胞内の細胞傷害作用の程度を低減することを指す場合もあり、細胞集団を、細胞傷害性組成物、細胞傷害剤、および／または細胞傷害性状態へと曝露した場合に、細胞傷害作用を呈する集団の細胞数を低減することを指す場合もある。

【0197】

本明細書で使用される「操作された」という用語およびその文法的同等物は、核酸、例えば、生物のゲノム内の核酸の、1または複数の変更を指す場合がある。「操作された」という用語は、遺伝子の変更、付加、および／または欠失を指す場合がある。操作細胞とはまた、遺伝子を付加し、欠失させ、かつ／または変更した細胞も指す場合がある。

【0198】

本明細書で使用される「細胞」または「操作細胞」または「遺伝子改変細胞」という用語およびこれらの文法的同等物は、ヒトまたは非ヒト動物起源の細胞を指す場合がある。

「操作細胞」および「遺伝子改変細胞」という用語は、本明細書で互換的に使用される。

【0199】

本明細書で使用される「チェックポイント遺伝子」という用語およびその文法的同等物は、免疫応答の振幅を調節するように作用する阻害性過程（例えば、フィードバックループ）、例えば、有害な応答の、制御されない伝播を緩和させる、免疫阻害性フィードバックループ（例えば、CTLA-4およびPD-1）に関与する、任意の遺伝子を指す場合がある。これらの応答は、感染症に対する免疫応答時に生じ得る付随的な組織損傷に対して防御する分子シールド、および／または末梢における自己寛容の維持への寄与を含み得る。チェックポイント遺伝子の非限定的な例は、拡張CD28ファミリーの受容体のメンバーおよびそれらのリガンド、ならびに共阻害性経路（例えば、CTLA-4およびPD-1）に関与する遺伝子を含み得る。「チェックポイント遺伝子」という用語はまた、免

10

20

30

40

50

疫チェックポイント遺伝子も指す場合がある。

【0200】

「CRISPR」、「CRISPR系」、または「CRISPRヌクレアーゼ系」、およびこれらの文法的同等物は、DNAに結合する非コードRNA分子（例えば、ガイドRNA）と、ヌクレアーゼの機能性（例えば、2つのヌクレアーゼドメイン）を伴うCasタンパク質（例えば、Cas9）とを含み得る。例えば、Sander, J.D.ら、「CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes」、Nature Biotechnology、32巻：347～355頁（2014年）を参照されたい。例えば、Hsu, P.D.ら、「Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering」、Cell、157巻（6号）：1262～1278頁（2014年）もまた、参照されたい。

10

【0201】

本明細書で使用される「～を破壊すること」という用語およびその文法的同等物は、例えば、切断、欠失、挿入、変異、再配列、またはこれらの任意の組合せにより遺伝子を変更する工程を指す場合がある。破壊は、タンパク質発現のノックアウトまたはノックダウンをもたらす場合がある。ノックアウトは、完全または部分的ノックアウトであり得る。例えば、遺伝子は、ノックアウトまたはノックダウンにより破壊することができる。遺伝子の破壊は、遺伝子によりコードされるタンパク質の発現を部分的に低減することの場合もあり、これを完全に抑制することの場合もある。遺伝子の破壊はまた、異なる遺伝子、例えば、下流における遺伝子の活性化も引き起こし得る。場合によって、「～を破壊すること」という用語は、抑制すること、妨害すること、または操作することなどの用語と互換的に使用することができる。

20

【0202】

本明細書で使用される「機能」という用語およびその文法的同等物は、意図される目的を果たすか、有するか、またはこれに適う能力を指す場合がある。「機能的」とは、正常機能の、ベースラインから100%までの任意のパーセントを含み得る。例えば、機能的とは、正常機能の5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、および／もしくは100%を含み得るか、またはほぼこれらの比率を含み得る。場合によって、機能的という用語は、正常機能の100%またはほぼ100%を超える、例えば、正常機能の125、150、175、200、250、300%、および／もしくはこれを上回ることを意味し得る。

30

【0203】

本明細書で使用される「遺伝子編集」という用語およびその文法的同等物は、ゲノムにおいて、1または複数のヌクレオチドを挿入するか、置き換えるか、または除去する遺伝子操作を指す場合がある。遺伝子編集は、ヌクレアーゼ（例えば、天然で存在するヌクレアーゼまたは人工的に操作されたヌクレアーゼ）を使用して実施することができる。

【0204】

本明細書で使用される「変異」という用語およびその文法的同等物は、ポリヌクレオチド内の、1または複数のヌクレオチドの置換、欠失、および挿入を含み得る。例えば、ポリヌクレオチド（cDNA、遺伝子）配列内またはポリペプチド配列内で、最大1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、20、25、30、40、50、またはそれよりも多い、ヌクレオチド／アミノ酸を、置換し、欠失させ、かつ／または挿入することができる。変異は、遺伝子のコード配列またはその調節配列に影響を及ぼし得る。変異はまた、ゲノム配列構造、またはコードされるmRNAの構造／安定性にも影響を及ぼし得る。

40

【0205】

本明細書で使用される「非ヒト動物」という用語およびその文法的同等物は、ヒト以外の全ての動物種であって、天然動物の場合もあり、遺伝子改変された非ヒト動物の場合もある、非ヒト哺乳動物を含む動物種を含み得る。「核酸」、「ポリヌクレオチド」、「ポリ核酸」、および「オリゴヌクレオチド」という用語、ならびにこれらの文法的同等物は

50

、互換的に使用することができ、直鎖状コンフォメーションまたは環状コンフォメーションにあり、一本鎖形態または二本鎖形態にある、デオキシリボヌクレオチドポリマーまたはリボヌクレオチドポリマーを指し得る。本開示の目的では、これらの用語は、長さに関して限定的とはみなされるべきではない。用語は、天然ヌクレオチドの類似体のほか、塩基部分、糖部分、および／またはリン酸部分（例えば、ホスホロチオエート骨格）において修飾されたヌクレオチドも包含し得る。用語の変化形はまた、脱メチル化、CpGメチル化の付加、細菌性メチル化の除去、および／または哺乳動物性メチル化の付加も包含し得る。一般に、特定のヌクレオチドの類似体は、同じ塩基対合特異性を有し得る、すなわち、Aの類似体は、Tと塩基対であり得る。

【0206】

本明細書で使用される「末梢血リンパ球」（PBL）という用語およびその文法的同等物は、血液（例えば、末梢血）中を循環するリンパ球を指す場合がある。末梢血リンパ球とは、臓器へと局在化しないリンパ球を指す場合がある。末梢血リンパ球は、T細胞、NK細胞、B細胞、またはこれらの任意の組合せを含み得る。

【0207】

本明細書で使用される「表現型」という用語およびその文法的同等物は、生物の観察可能な特徴または形質の複合物であって、その形状、発生、生化学的特性または生理学的特性、生物季節学、挙動、および挙動の結果などの複合物を指す場合がある。文脈に応じて、「表現型」という用語は、ある場合には、集団の観察可能な特徴または形質の複合物を指す。

【0208】

本明細書で使用される「プロトスペーサー」という用語およびその文法的同等物は、PAMに隣接する核酸配列であって、ガイドRNAのスペーサー配列または操作されたターゲティング部分など、ガイドRNAの部分にハイブリダイズすることが可能な核酸配列を指す場合がある。プロトスペーサーは、遺伝子内、ゲノム内、または染色体内のヌクレオチド配列であって、ガイドRNAにターゲティングされるヌクレオチド配列であり得る。天然状態では、プロトスペーサーは、PAM（プロトスペーサー隣接モチーフ）と隣接する。RNAにガイドされるヌクレアーゼの切断部位は、プロトスペーサー配列内にある。例えば、ガイドRNAが、特異的プロトスペーサーをターゲティングする場合、Casタンパク質は、プロトスペーサー配列内で二本鎖切断を生じ、これにより、プロトスペーサーを切断するであろう。切断後、プロトスペーサーの破壊は、非相同末端結合（NHEJ）または相同性により導かれる修復（HDR）を結果としてもたらし得る。プロトスペーサーの破壊は、プロトスペーサーの欠失を結果としてもたらし得る。加えて、または代替的に、プロトスペーサーの破壊は、プロトスペーサーへと挿入されるか、またはこれを置き換える外因性核酸配列を結果としてもたらし得る。

【0209】

本明細書で使用される「レシピエント」という用語およびその文法的同等物は、ヒトまたは非ヒト動物を指す場合がある。レシピエントはまた、それを必要とするレシピエントでもあり得る。

【0210】

本明細書で使用される「組換え」という用語およびその文法的同等物は、2つのポリ核酸の間の遺伝情報の交換過程を指す場合がある。本開示の目的では、「相同組換え」または「HR」とは、例えば、二本鎖切断の修復時において生じ得る、このような遺伝子交換の特化形態を指す場合がある。この過程は、例えば、標的分子（例えば、二本鎖切断を経た分子）を修復するための鋳型として、ドナー分子を使用して、ヌクレオチド配列相同性を要求する場合があり、ある場合には、非交叉型遺伝子変換またはショートトラクト型遺伝子変換として公知である。このような移入はまた、破壊される標的とドナーとの間で形成されるヘテロ二重鎖DNAのミスマッチの是正、および／または標的の一部となりうる遺伝情報を再合成するのにドナーを使用し得る合成依存性鎖アニーリング、および／または関連する過程も伴いうる。このような特化したHRは、ドナーポリヌクレオチドの配列

10

20

30

40

50

の一部または全部を、標的ポリヌクレオチドへと組み込みうるように、標的分子の配列の変更を結果としてもたらし得ることが多い。場合によって、「組換えアーム」という用語と、「相同性アーム」という用語は、本明細書で互換的に使用することができる。

【0211】

本明細書では、「標的ベクター」という用語と、「ターゲティングベクター」という用語とを、互換的に使用する。

【0212】

本明細書で使用される「トランス遺伝子」という用語およびその文法的同等物は、生物へと移入される遺伝子または遺伝子素材を指す場合がある。例えば、トランス遺伝子は、生物へと導入される遺伝子を含む、DNAの連なりまたはセグメントであり得る。トランス遺伝子を生物へと移入する場合、生物を、トランスジェニック生物と称する。トランス遺伝子は、トランスジェニック生物において、RNAまたはポリペプチド（例えば、タンパク質）を産生するその能力を保持し得る。トランス遺伝子は、異なる核酸、例えば、RNAまたはDNAから構成され得る。トランス遺伝子は、操作T細胞受容体、例えば、TCRトランス遺伝子をコードし得る。トランス遺伝子は、TCR配列を含み得る。トランス遺伝子は、がん遺伝子を含み得る。トランス遺伝子は、免疫がん遺伝子を含み得る。トランス遺伝子は、組換えアームを含み得る。トランス遺伝子は、操作部位を含み得る。場合によって、トランス遺伝子は、がん遺伝子である。場合によって、トランス遺伝子は、免疫がん遺伝子である。場合によって、トランス遺伝子は、腫瘍抑制遺伝子である。場合によって、トランス遺伝子は、タンパク質分解を直接または間接的に促進するタンパク質をコードする。場合によって、トランス遺伝子は、腫瘍溶解性遺伝子である。場合によって、トランス遺伝子は、腫瘍細胞をターゲティングすることにおいてリンパ球を補助し得る。場合によって、トランス遺伝子は、T細胞エンハンサー遺伝子である。場合によって、トランス遺伝子は、腫瘍溶解性ウイルス遺伝子である。場合によって、トランス遺伝子は、腫瘍細胞増殖を阻害する。場合によって、トランス遺伝子は、抗がん受容体である。場合によって、トランス遺伝子は、抗血管新生因子である。場合によって、トランス遺伝子は、細胞傷害性遺伝子である。例示的なトランス遺伝子は、CD28、誘導性共刺激因子（ICOS）、CD27、4-1BB（CD137）、ICOS-L、CD70、4-1BBL、シグナル3、サイトカイン、例えば、IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21、ICAM-1（CD54）、LFA-3（CD58）、HLAクラスI遺伝子、B7、CD80、CD83、CD86、CD32、CD64、4-1BBL、CD3、CD1d、CD2、膜結合型IL-15、膜結合型IL-17、膜結合型IL-21、膜結合型IL-2、切断型CD19、VEGF、カスパーゼ、ケモカイン、もしくは上記のいずれかに対する抗体（例えば、モノクローナル抗体）をコードする1もしくは複数の遺伝子、またはこれらの任意の組合せを含むがこれらに限定されない。場合によって、トランス遺伝子は、細胞または組織修復に関与するタンパク質（例えば、DNA修復、免疫応答（例えば、インターフェロンおよびインターロイキン）と関連付けられるタンパク質、および構造タンパク質）をコードする。場合によって、トランス遺伝子は、増殖因子受容体をコードする。

【0213】

「がん遺伝子」という用語は、それが正常よりも高い活性を有する（例えば、過剰発現されている）ときに、細胞の生態に対する、例えば、細胞周期または細胞死過程に対する効果のために、異常な組織増殖を誘導する遺伝子を指す。「がん遺伝子」という用語は、（単独または他の変化と共同して）細胞を増殖に対する正常な抑制から解放し、それによって細胞を腫瘍細胞へと変換し得る、動物細胞における正常遺伝子の過剰発現形を包含する。ヒトがん遺伝子の例は、myc、myb、mdm2、PKA-I（タンパク質キナーゼAタイプI）、Ab1、Bcl1、タンパク質の抗アポトーシスB細胞リンパ腫2（Bcl-2）ファミリー（Bcl-2、Bcl-XL、Bcl-w、Mcl-1、Bfl1/A-1、およびBcl-B（例えば、Kangら（Clin. Cancer Res.（2009年）15巻：1126～32頁）を参照されたい））、Bcl6、Ras、c-Rafキナーゼ

、C D C 2 5 ホスファターゼ、サイクリン、サイクリン依存性キナーゼ、(c d k s)、
 テロメラゼ、P D G F / s i s、e r b A、e r b - B、e t s、f e s (f p s)、
 f g r、f m s、f o s、j u n、m o s、s r c、増殖細胞核抗原 (P C N A)、形質
 転換増殖因子-ベータ (T G F - ベータ)、転写因子核因子カッパ B (N F - k a p p a
 B)、E 2 F、H E R - 2 / n e u、T G F - アルファ、E G F R、T G F - ベータ、
 I G F I R、P 1 2、M D M 2、c - m y b、c - m y c、B R C A、B c l - 2、V E
 G F、M D R、フェリチン、トランスフェリン受容体、I R E、H S P 2 7、h s t、i
 n t 1、i n t 2、j u n、h i t、B - l y m、m a s、m e t、m i l (r a f)、
 m o s、n e u (E r b B 2)、r a l (m i l)、H a - r a s、K i - r a s (K r
 a s)、N - r a s、r e l、r o s、s i s、s k i、t r k、E r b B 1、E r b B
 2、E r b B 3、E r b B 4、ベータ-カテニン、y e s、およびメタロチオネイン遺伝
 子を含むがこれらに限定されない。

10

【0214】

本明細書で使用される「T細胞」という用語およびその文法的同等物は、任意の由来の
 T細胞を指す場合がある。例えば、T細胞は、初代T細胞、例えば、自家T細胞、細胞株
 などであり得る。T細胞はまた、ヒトT細胞の場合もあり、非ヒトT細胞の場合もある。

【0215】

本明細書で使用される「TIL」または腫瘍浸潤リンパ球という用語およびこれらの文
 法的同等物は、腫瘍から単離された細胞を指す場合がある。例えば、TILは、腫瘍へと
 遊走した細胞であり得る。TILはまた、腫瘍に浸潤した細胞でもあり得る。TILは、
 腫瘍内で見出される任意の細胞であり得る。例えば、TILは、T細胞、B細胞、単球、
 ナチュラルキラー細胞、またはこれらの任意の組合せであり得る。TILは、混合細胞集
 団であり得る。TIL集団は、表現型の異なる細胞、分化程度の異なる細胞、系統の異な
 る細胞、またはこれらの任意の組合せを含み得る。

20

【0216】

「治療効果」は、処置される状態に変化が見られる場合に生じ得る。変化は、肯定的変
 化の場合もあり、否定的変化の場合もある。例えば、「肯定的効果」は、対象における活
 性化T細胞数の増大に対応し得る。別の例では、「否定的効果」は、対象における腫瘍の
 量またはサイズの減少に対応し得る。少なくとも10%の改善、好ましくは、少なくとも
 25%、より好ましくは、少なくとも50%、なおより好ましくは、少なくとも75%、
 および最も好ましくは、100%の改善が見られる場合に、処置される状態には「変化」
 が見られる。変化は、個体において処置される状態の重症度の改善に基づく場合もあり、
 本開示の組成物をそれと組み合わせて投与する治療用組成物による処置を伴う個体および
 これを伴わない個体の集団における、状態の改善の頻度の差違に基づく場合もある。同様
 に、本開示の方法は、対象へと、「治療有効」量の細胞を投与するステップを含み得る。
 「治療的に有効な」という用語は、「治療効果を及ぼすこと」に対応する定義を有するよ
 うに理解されるべきである。

30

【0217】

本明細書で使用される「セーフハーバー」および「免疫セーフハーバー」という用語な
 らびにこれらの文法的同等物は、外因性核酸を組み込むために使用され得るゲノム内の場
 所であって、組込みが、核酸単独の添加により、宿主細胞の増殖に対して、著明な効果を
 引き起こさない場所を指す場合がある。セーフハーバーの非限定的な例は、H P R T、A
 A V S 部位 (例えば、A A V S 1、A A V S 2 など)、C C R 5、またはR o s a 2 6 を
 含み得る。例えば、ヒトパルボウイルス、A A V は、ヒト染色体19 q 1 3 . 3 - q t e
 r またはA A V S 1 遺伝子座に優先的に組み込まれることが公知である。A A V S 1 遺伝
 子座での目的の遺伝子の組込みは、様々な細胞型におけるトランス遺伝子の安定な発現を
 支援し得る。場合によって、ヌクレアーゼを操作して、A A V S 1 遺伝子座での二本鎖切
 断の作製をターゲティングしてA A V S 1 遺伝子座でのトランス遺伝子の組み込みを可能
 にする場合もあり、A A V S 1 部位での外因性核酸配列、例えば、トランス遺伝子、細胞
 受容体、または本明細書で開示する任意の目的の遺伝子の組み込みのためにA A V S 1 遺

40

50

伝子座での相同組換えを容易とする場合もある。場合によって、A A V ウイルスベクターは、外因性ヌクレアーゼを伴うかまたは伴わない A A V S 1 部位での組み込みのためにトランス遺伝子を送達するために使用される。

【0218】

本明細書で使用される「配列」という用語およびその文法的同等物は、D N A の場合もあり、R N A の場合もあり；直鎖状の場合もあり、環状の場合もあり、分枝状の場合もあり；一本鎖の場合もあり、二本鎖の場合もある、ヌクレオチド配列を指す場合がある。配列は、変異させることができる。配列は、任意の長さ、例えば、2 ～ 1, 0 0 0, 0 0 0 の間、またはそれよりも多いヌクレオチドの長さ（またはこれらの間であるか、もしくははこれらを上回る、任意の整数値）、例えば、約 1 0 0 ～ 約 1 0, 0 0 0 ヌクレオチドの間または約 2 0 0 ～ 約 5 0 0 ヌクレオチドの間であり得る。

10

【0219】

「ウイルスベクター」という用語は、ウイルスに由来する遺伝子移入ベクターまたは遺伝子送達系を指す。このようなベクターは、当技術分野で公知の組換え技法を使用して構築することができる。一部の態様では、このようなベクターを派生させるためのウイルスは、アデノ随伴ウイルス (A A V)、ヘルパー依存性アデノウイルス、ハイブリッドアデノウイルス、エプスタイン・バーウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、単純ヘルペスウイルス、センダイウイルス (H V J)、モロニーマウス白血病ウイルス、ポックスウイルス、および H I V ベースのウイルスから選択される。

概要

20

【0220】

本明細書では、遺伝子改変細胞（例えば、遺伝子改変初代細胞）集団を産生する方法が開示される。場合によって、方法は、ヒト対象からの細胞集団（例えば、初代細胞集団）を提供するステップを含む。場合によって、前記方法は、アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターを細胞集団中の少なくとも 1 つの細胞に導入するステップを含む。場合によって、前記 A A V ベクターは、少なくとも 1 つの外因性トランス遺伝子を含む。場合によって、前記少なくとも 1 つの外因性トランス遺伝子は、少なくとも 1 つの細胞のゲノム遺伝子座に組み込まれる。場合によって、細胞または細胞集団は、初代細胞または初代細胞集団である。場合によって、前記方法は、少なくとも 1 つの外因性トランス遺伝子を含むミニサークルベクターを細胞集団中の少なくとも 1 つの細胞に導入するステップ（すなわち、A A V ベクターの代わりにミニサークルベクターを導入するステップ）を含む。場合によって、少なくとも 1 つの外因性トランス遺伝子をゲノム遺伝子座に組み込むために A A V ベクターを使用することは、同等の細胞において前記組み込みのためにミニサークルベクターを使用することと比較して、細胞毒性を低減する。場合によって、細胞（例えば、初代細胞）集団中の細胞の少なくとも約 2 0 % が、前記少なくとも 1 つの外因性トランス遺伝子を発現する。場合によって、遺伝子改変細胞（例えば、遺伝子改変初代細胞）集団は、少なくとも約 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 3 %、9 5 %、9 8 %、または 9 9 % の生細胞を含む。場合によって、細胞生存率は、蛍光活性化細胞分取 (F A C S) により測定される。場合によって、細胞生存率は、A A V ベクターが少なくとも 1 つの細胞に、および／または細胞集団に導入された約 1 日、2 日、3 日、4 日、7 日、1 0 日、1 4 日、または 1 4 日より長い時間後に測定される。

30

40

【0221】

本明細書では、遺伝子改変細胞（例えば、遺伝子改変初代細胞）を作製する方法が開示される。場合によって、前記方法は、少なくとも 1 つのウイルスタンパク質またはその機能的な部分を導入するステップを含む。場合によって、前記方法は、ミニサークルベクター（すなわち、前記少なくとも 1 つのウイルスタンパク質またはその機能的な部分の代わりにミニサークルベクター）を導入するステップを含む。場合によって、前記方法は、少なくとも 1 つの外因性受容体配列をコードする少なくとも 1 つのポリ核酸を導入するステップをさらに含む。場合によって、前記方法は、ヌクレアーゼまたはヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを使用して少なくとも 1 つの細胞の少なくとも 1 つの遺伝子にお

50

いて切断を導入するステップをさらに含む。場合によって、前記少なくとも1つのウイルススタンパク質は、ミニサークルベクターを使用して前記少なくとも1つのポリ核酸を導入することと比較して、前記少なくとも1つの外因性受容体配列をコードする前記少なくとも1つのポリ核酸を導入することと関連付けられる毒性を低減する。

【0222】

本明細書では、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を細胞（例えば、初代細胞）に導入するための系が開示される。場合によって、系は、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを含む。場合によって、前記AAVベクターは、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を細胞（例えば、初代細胞）のゲノム遺伝子座に導入する。場合によって、系は、ミニサークルベクターを含む。場合によって、前記ミニサークルベクターは、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を細胞（例えば、初代細胞）のゲノム遺伝子座に導入する。場合によって、前記AAVベクターを含む系は、前記ミニサークルベクターを含む同様の系と比較して、前記少なくとも1つの外因性トランス遺伝子のゲノム遺伝子座へのより高い組み込み効率を有する。場合によって、AAVベクターを含む系は、ミニサークルベクターを含む同様の系と比較して、より低い細胞毒性をもたらす。

【0223】

本明細書では、*ex vivo* 遺伝子改変細胞（例えば、遺伝子改変初代細胞）集団が開示される。場合によって、前記集団は、少なくとも1つの遺伝子における外因性ゲノム変更を含む。場合によって、少なくとも1つの遺伝子における前記ゲノム変更は、少なくとも1つの遺伝子改変細胞においてタンパク質機能を抑制する。場合によって、前記集団は、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターをさらに含む。場合によって、前記AAVベクターは、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を含む。場合によって、前記少なくとも1つの外因性トランス遺伝子は、前記少なくとも1つの遺伝子改変細胞（例えば、遺伝子改変初代細胞）のゲノム遺伝子座に挿入される。

【0224】

本明細書では、遺伝子改変細胞（例えば、遺伝子改変初代細胞）を産生する方法が開示される。場合によって、前記方法は、ヒト対象からの細胞集団（例えば、初代細胞集団）を提供するステップを含む。場合によって、前記方法は、修飾アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを細胞集団中の少なくとも1つの細胞（例えば、初代細胞集団中の少なくとも1つの初代細胞）に導入するステップを含む。場合によって、前記方法は、非修飾または野生型アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを細胞集団中の少なくとも1つの細胞（例えば、初代細胞集団中の少なくとも1つの初代細胞）に導入するステップを含む。場合によって、前記AAVベクター（例えば、前記修飾AAVベクターまたは前記非修飾もしくは野生型AAVベクター）を導入するステップは、少なくとも1つの外因性核酸の前記少なくとも1つの細胞のゲノム遺伝子座への組み込みをもたらす。場合によって、修飾AAVベクターを導入して、前記外因性核酸を前記ゲノム遺伝子座に組み込むことは、対応する非修飾または野生型AAVベクターが導入された同等の細胞集団と比較して、より高効率の前記核酸の組み込みをもたらす。

【0225】

本明細書では、遺伝子改変細胞（例えば、遺伝子改変初代細胞）集団を産生する方法が開示される。場合によって、前記方法は、ヒト対象からの細胞集団（例えば、初代細胞集団）を提供するステップを含む。場合によって、前記方法は、（例えば、*ex vivo* で、）前記細胞集団に *clustered regularly interspaced short palindromic repeat* (CRISPR) 系を電気穿孔するステップを含む。場合によって、前記CRISPR系は、ヌクレアーゼもしくは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドおよび／またはガイドリボ核酸（gRNA）を含む。場合によって、前記gRNAは、少なくとも1つの遺伝子と相補的な配列を含む。場合によって、前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドは、前記細胞集団中の少なくとも1つの細胞における少なくとも1つの遺伝子において二本鎖切断を導入する。場合によって、前記ヌクレアーゼは、Cas9であるか、または

前記ポリヌクレオチドは、C a s 9をコードする。場合によって、前記A A Vベクターは、前記C R I S P R系の電気穿孔の前、後、またはそれと同時に、前記細胞集団に、または前記細胞集団中の前記少なくとも1つの細胞に導入される。場合によって、前記A A Vベクターは、前記C R I S P R系の電気穿孔の後に導入される。場合によって、前記A A Vベクターは、前記C R I S P R系の電気穿孔の約1時間～約4時間後に導入される。場合によって、前記A A Vベクターは、前記C R I S P R系の電気穿孔の約4時間後よりも後の時間（例えば、前記C R I S P R系の前記電気穿孔の10時間後、1日後、2日後、5日後、10日後、30日後、1カ月後、2カ月後など）に導入される。場合によって、前記A A Vベクターは、前記C R I S P R系の電気穿孔の前（例えば、前記C R I S P R系の前記電気穿孔の30分、1時間、2時間、5時間、10時間、18時間、1日、2日、3日、5日、8日、10日、30日、1カ月、2カ月前など）に導入される。場合によって、前記A A Vベクターは、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を前記二本鎖切断に組み込む。

10

【0226】

場合によって、本明細書で開示する方法のいずれかは、（例えば、e x v i v oで、）細胞集団中の少なくとも1つの細胞を改変するステップをさらに含み得る。場合によって、前記改変するステップは、ヌクレアーゼまたはヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを導入することを含む。場合によって、細胞または細胞集団は、初代細胞または初代細胞集団である。場合によって、本明細書で開示される方法のいずれかおよび／または系のいずれかは、ヌクレアーゼまたはヌクレアーゼをコードするポリペプチドをさらに含み得る。場合によって、本明細書で開示される方法のいずれかおよび／または系のいずれかは、ガイドポリ核酸をさらに含み得る。場合によって、本明細書で開示される方法のいずれかおよび／または系のいずれかは、電気穿孔および／またはヌクレオフェクションを含み得る。

20

細胞

【0227】

本明細書で開示される組成物および方法は、細胞を用い得る。細胞は、初代細胞であり得る。初代細胞は、初代リンパ球であり得る。初代細胞集団は、初代リンパ球集団であり得る。場合によって、細胞（例えば、初代細胞）は、自家細胞である。場合によって、細胞集団（例えば、初代細胞集団）は、自家細胞集団である。細胞は、組換え細胞であり得る。細胞は、末梢血単核細胞、骨髓、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位に由来する組織、腹水、胸水、脾臓組織、および腫瘍を含む、多数の非限定的な供給源から得ることができる。例えば、任意のT細胞株を使用することができる。代替的に、細胞は、健康ドナーに由来する場合もあり、がんを伴うと診断された患者に由来する場合もあり、感染を伴うと診断された患者に由来する場合もある。別の実施形態では、細胞は、異なる表現型特徴を提示する混合細胞集団の一部であり得る。細胞はまた、細胞療法バンクから得ることもできる。免疫抑制処置に対して抵抗性の破壊細胞も得ることができる。所望の細胞集団はまた、改変前に選択することもできる。選択は、磁気分離、フローサイトメトリー選択、抗生物質選択のうちの少なくとも1つを含み得る。1または複数の細胞は、任意の血液細胞、例えば、末梢血単核細胞（P B M C）、リンパ球、単球、またはマクロファージであり得る。1または複数の細胞は、任意の免疫細胞、例えばリンパ球、B細胞、またはT細胞であり得る。細胞はまた、自然食品、アフエレーシス、または対象の腫瘍試料から得ることもできる。細胞は、腫瘍浸潤リンパ球（T I L）であり得る。場合によって、アフエレーシスは、白血球アフエレーシスであり得る。白血球アフエレーシスは、血球が血液から単離される手順であり得る。白血球アフエレーシス中、血液は、対象の腕の針から除去され、全血を赤血球、血漿、およびリンパ球に分ける機械を通して循環し、その後、血漿および赤血球は、他方の腕の針を通して対象に戻され得る。場合によって、細胞は、処置レジメンおよび細胞療法の投与後に単離される。例えば、アフエレーシスは、細胞投与と順に、またはそれと同時に実施することができる。場合によって、アフエレーシスは、細胞生成物の投与前、および投与の最長で約6週間後に実施される。場合によって

30

40

50

、アフエレーシスは、細胞生成物の投与の－3週間、－2週間、－1週間、0、1週間、2週間、3週間、4週間、1カ月、2カ月、3カ月、4カ月、5カ月、6カ月、7カ月、8カ月、9カ月、10カ月、11カ月、1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、または最長で約10年後に実施される。場合によって、アフエレーシスにより収集した細胞は、特異的溶解、サイトカイン放出、メタボロミクス研究、生体エネルギー療法研究、サイトカイン産生の細胞内FACS、ELISAアッセイ、およびリンパ球サブセット解析についての試験を受け得る。場合によって、細胞生成物またはアフエレーシス生成物の試料は、注入細胞の表現型および機能の適時的解析のために凍結保存され得る。

【0228】

本明細書では、細胞内ゲノム移植を実施するために有用な、組成物および方法が開示される。ゲノム移植についての例示的な方法は、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれるPCT/US2016/044858で説明されている。細胞内ゲノム移植は、治療適用のために、細胞および核酸を遺伝子改変することを含み得る。全体を通して記載される組成物および方法は、操作細胞の、生理学および免疫学的な抗腫瘍効力を改善する形で、腫瘍特異的トランス遺伝子（例えば、TCRまたは抗腫瘍活性を補助する他の遺伝子）を送達するために、核酸により媒介される遺伝子操作工程を使用し得る。効果的な養子細胞移入ベースの免疫療法（ACT）は、がん（例えば、転移性がん）患者を処置するのに有用であり得る。例えば、ウイルスまたは非ウイルス法を使用して、がん細胞上の固有の変異であるネオ抗原を認識するT細胞受容体（TCR）またはがん遺伝子などのトランス遺伝子を発現するように、自家末梢血リンパ球（PBL）または腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を改変し、開示される、細胞内ゲノム移植の組成物および方法において使用することができる。自家PBLまたはTILなどの細胞は、抗腫瘍活性を補助するトランス遺伝子を発現するように改変され得る。ネオ抗原は、変異負荷が大きな腫瘍と関連し得る（図58）。

【0229】

細胞は、遺伝子改変または遺伝子操作され得る。細胞（例えば、遺伝子改変または遺伝子操作細胞）は、患者へと投与されたらその性能を改善し得る条件下で、増殖させ、拡大することもできる。操作細胞は、選択することができる。例えば、細胞の拡大および操作の前に、様々な非限定的な方法により、細胞の供給源を、対象から得ることができる。細胞は、末梢血単核細胞、骨髓、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位に由来する組織、腹水、胸水、脾臓組織、および腫瘍を含む、多数の非限定的な供給源から得ることができる。例えば、任意のT細胞株を使用することができる。代替的に、細胞は、健常ドナーに由来する場合もあり、がんを伴うと診断された患者に由来する場合もあり、感染を伴うと診断された患者に由来する場合もある。別の実施形態では、細胞は、異なる表現型特徴を提示する混合細胞集団の一部であり得る。細胞株はまた、既に記載されている方法に従い、形質転換されたT細胞から得ることもできる。細胞はまた、細胞療法バンクから得ることもできる。免疫抑制処置に対して抵抗性の改変細胞も得ることができる。所望の細胞集団はまた、改変の前に選択することもできる。操作細胞集団はまた、改変の後で選択することもできる。

【0230】

場合によって、操作細胞は、自家移植において使用することができる。代替的に、操作細胞は、同種移植において使用することができる。場合によって、操作細胞は、がん関連標的配列および／またはトランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）を同定するのにその試料が使用された同じ患者へと投与することができる。場合によって、操作細胞は、がん関連標的配列および／またはトランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）を同定するのにその試料が使用された患者と異なる患者へと投与することができる。1または複数の相同組換えエンハンサーは、本開示の細胞と共に導入することができる。エンハンサーは、二本鎖切断の、相同性により導かれる修復を容易とし得る。エンハンサーは、トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子また

10

20

30

40

50

はがん遺伝子)の本開示の細胞への組込みを容易とし得る。エンハンサーは、二本鎖切断の、相同性により導かれる修復が優先的に生じるように、非相同末端結合(NHEJ)を遮断し得る。

【0231】

1 または複数のサイトカインは、本開示の細胞と共に導入することができる。サイトカインは、細胞傷害性Tリンパ球(養子移入させる腫瘍特異的細胞傷害性Tリンパ球を含む)をブーストして、腫瘍微小環境内で拡大するのに用いることができる。場合によって、IL-2を使用して、本明細書で記載される細胞の拡大を容易とすることができる。IL-15などのサイトカインもまた、利用することができる。IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21、またはこれらの任意の組合せなど、免疫療法の分野において妥当である、他のサイトカインもまた、用いることができる。場合によって、IL-2、IL-7、およびIL-15を使用して、本開示の細胞を培養する。

10

【0232】

場合によって、細胞は、*in vivo*細胞性能を改善するための薬剤、例えば、S-2-ヒドロキシグルタル酸塩(S-2HG)で処理することができる。S-2HGでの処理は、非処理細胞と比較して、細胞増殖および*in vivo*での持続性を改善し得る。S-2HGはまた、S-2HGで処理していない細胞と比較して、処理細胞において抗腫瘍効能を改善し得る。場合によって、S-2HGでの処理は、CD62Lの発現増大をもたらし得る。場合によって、S-2HGで処理した細胞は、非処理細胞と比較して、より高レベルのCD127、CD44、4-1BB、Eomesを発現し得る。場合によって、S-2HGで処理した細胞は、非処理細胞と比較して、PD-1の発現低減を有し得る。CD127、CD44、4-1BB、およびEomesのレベルの増大は、非処理細胞と比較して、S-2HGで処理した細胞におけるCD127、CD44、4-1BB、およびEomesの発現において約5%~約700%、例えば、約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、または最大で700%の増大であり得る。場合によって、S-2HGで処理した細胞は、非処理細胞と比較して、フローサイトメトリー解析により測定される約5%~約700%増大した細胞拡大および/または増殖、例えば、非処理細胞と比較して、フローサイトメトリー解析により測定される約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、または最大で700%増大した細胞拡大および/または増殖を有し得る。

20

30

【0233】

S-2HGで処理される細胞は、約10 μ M~約500 μ Mの濃度に曝露され得る。濃度は、約10 μ M、20 μ M、30 μ M、40 μ M、50 μ M、60 μ M、70 μ M、80 μ M、90 μ M、100 μ M、150 μ M、200 μ M、250 μ M、300 μ M、350 μ M、400 μ M、450 μ M、または最大で500 μ Mであり得る。

【0234】

細胞傷害作用は一般に、細胞に対して毒性である、組成物、薬剤、および/または状態(例えば、外因性DNA)の資質を指す場合がある。一部の態様では、本開示の方法は一般に、遺伝子改変時に、1または複数の細胞へと導入される、外因性DNAの細胞傷害効果を低減することに関する。場合によって、細胞傷害作用、または細胞に対して細胞傷害性である物質の効果は、DNAの切断、細胞死、オートファジー、アポトーシス、核凝縮、細胞の溶解、壊死、細胞運動性の変更、細胞硬直性の変更、細胞質タンパク質発現の変更、膜タンパク質発現の変更、所望されない細胞分化、膨張、膜完全性の喪失、代謝活性の停止、代謝活性の低下、代謝活性の亢進、反応性酸素分子種の増大、細胞質の収縮、炎症促進性サイトカイン(例えば、DNAセンシング経路の産物としての)の産生、またはこれらの任意の組合せを含み得る。炎症促進性サイトカインの非限定的な例は、インターロイキン6(IL-6)、インターフェロンアルファ(IFN α)、インターフェロンベ

40

50

ータ（ $IFN\beta$ ）、C-Cモチーフリガンド4（ $CCl4$ ）、C-Cモチーフリガンド5（ $CCl5$ ）、C-X-Cモチーフリガンド10（ $CXC10$ ）、インターロイキン1ベータ（ $IL-1\beta$ ）、 $IL-18$ および $IL-33$ を含む。場合によって、細胞傷害作用は、トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）など、ポリ核酸の導入の影響を受ける場合がある。

【0235】

細胞傷害作用の変化は、当技術分野で公知である、多数の方式のうちのいずれかにより測定することができる。場合によって、細胞傷害作用の変化は、細胞死または所望されない細胞分化など、細胞傷害作用関連効果の発生の程度および／または頻度に基づき評価することができる。場合によって、細胞傷害作用の低減は、当技術分野で公知のアッセイであって、色素除外、細胞の生存率、損傷および／または死と関連する形状特徴の検出、ならびに目的の細胞型と関連する酵素活性および／または代謝活性の測定など、標準的な検査室法を含むアッセイを使用して、細胞毒性の量を測定することにより評価する。

10

【0236】

場合によって、ゲノム移植を経る細胞は、組織または細胞と共培養することにより、活性化させることもでき、拡大することもできる。細胞は、抗原提示細胞であり得る。人工抗原提示細胞（ $aAPC$ ）は、T細胞受容体および共刺激性分子に対するリガンドを発現することが可能であり、場合によって、それらの効力および機能を改善しながら、移入のためのT細胞を活性化させ、拡大し得る。 $aAPC$ は、T細胞活性化のための任意の遺伝子を発現するように操作することができる。 $aAPC$ は、T細胞拡大のための任意の遺伝子を発現するように操作することができる。 $aAPC$ は、ビーズ、細胞、タンパク質、抗体、サイトカイン、またはこれらの任意の組合せであり得る。 $aAPC$ は、ゲノム移植を経る可能性のある細胞集団へと、シグナルを送達し得る。例えば、 $aAPC$ は、シグナル1、シグナル2、シグナル3、またはこれらの任意の組合せを送達し得る。シグナル1は、抗原認識シグナルであり得る。例えば、シグナル1は、TCRへの、ペプチド-MHC複合体のライゲーション、またはCD3に対するアゴニスト抗体であって、CD3シグナル-形質導入複合体の活性化をもたらし得るアゴニスト抗体の結合であり得る。シグナル2は、共刺激性シグナルであり得る。例えば、共刺激性シグナルは、それぞれ、 $ICOS-L$ 、CD70、および4-1BBLに結合する、抗CD28、誘導性共刺激因子（ $ICOS$ ）、CD27、および4-1BB（CD137）であり得る。シグナル3は、サイトカインシグナルであり得る。サイトカインは、任意のサイトカインであり得る。サイトカインは、 $IL-2$ 、 $IL-7$ 、 $IL-12$ 、 $IL-15$ 、 $IL-21$ 、またはこれらの任意の組合せであり得る。

20

30

【0237】

場合によって、人工抗原提示細胞（ $aAPC$ ）を使用して、細胞集団を活性化させ、かつ／または拡大することができる。場合によって、人工抗原提示細胞は、アロ特異性を誘導しえない。 $aAPC$ は場合によって、HLAを発現しえない。 $aAPC$ は、活性化および／または刺激のために使用し得る遺伝子を安定的に発現するように、遺伝子改変することができる。場合によって、K562細胞を、活性化のために使用することができる。K562細胞はまた、拡大のために使用することもできる。K562細胞は、ヒト赤白血病細胞株であり得る。K562細胞は、目的の遺伝子を発現するように操作することができる。K562細胞は、HLAクラスI分子、HLAクラスII分子、またはCD1d分子を内因的に発現しえないが、 $ICAM-1$ （CD54）およびLFA-3（CD58）を発現し得る。K562は、シグナル1を、T細胞へと送達するように操作することができる。例えば、K562細胞は、HLAクラスIを発現するように操作することができる。場合によって、K562細胞は、B7、CD80、CD83、CD86、CD32、CD64、4-1BBL、抗CD3、抗CD3 mAb、抗CD28、抗CD28 mAb、CD1d、抗CD2、膜結合型 $IL-15$ 、膜結合型 $IL-17$ 、膜結合型 $IL-21$ 、膜結合型 $IL-2$ 、切断型CD19、または任意の組合せなど、さらなる分子を発現するように操作することができる。場合によって、操作K562細胞は、CD80およびCD8

40

50

3に加えて、抗CD3 mAbの膜形態である、クローンOKT3を発現し得る。場合によって、操作K562細胞は、CD80およびCD83に加えて、抗CD3 mAbの膜形態である、クローンOKT3、抗CD28 mAbの膜形態を発現し得る。

【0238】

aAPCは、ビーズであり得る。球形ポリスチレンビーズを、CD3およびCD28に対する抗体でコーティングし、T細胞を活性化させるために使用することができる。ビーズは、任意のサイズであり得る。場合によって、ビーズは、3および6マイクロメートルであり得るか、またはほぼこの長さであり得る。ビーズは、4.5マイクロメートルのサイズであり得るか、またはほぼこのサイズであり得る。ビーズは、任意の細胞対ビーズ比で用いることができる。例えば、1ミリメートル当たり100万個の細胞で、3対1のビーズ対細胞比を使用することができる。aAPCはまた、剛性球形粒子、ポリスチレンラテックスマイクロビーズ、磁性ナノ粒子または磁性マイクロ粒子、ナノサイズ量子ドット、4、ポリ(乳酸-ε-グリコール酸)(PLGA)マイクロスフェア、非球形粒子、5、カーボンナノチューブバンドル、6、楕円体のPLGAマイクロ粒子、7、ナノワーム、流体脂質二重層含有系、8、2D支援型脂質二重層(2D-SLB)、9、リボソーム、10、RAFTソーム/マイクロドメインリボソーム、11、SLB粒子、またはこれらの任意の組合せでもあり得る。

【0239】

場合によって、aAPCは、CD4 T細胞を拡大し得る。例えば、aAPCは、HLAクラスII拘束性CD4 T細胞の抗原プロセッシングおよび提示経路を模倣するように操作することができる。K562は、HLA-D、DPα、DPβ鎖、Ii、DMα、DMβ、CD80、CD83、またはこれらの任意の組合せを発現するように操作することができる。例えば、操作K562細胞は、HLA拘束性抗原特異的CD4 T細胞を拡大するために、HLA拘束性ペプチドでパルスすることができる。

【0240】

場合によって、aAPCの使用は、細胞(例えばT細胞)の活性化、拡大、または任意の組合せのために外因的に導入されるサイトカインと組み合わせることができる。細胞はまた、in vivoにおいて、例えば、ゲノム移植された細胞の、対象への投与の後に、対象の血液中で拡大することもできる。

【0241】

細胞内ゲノム移植のためのこれらの組成物および方法は、がん治療に、多くの利点をもたらし得る。例えば、これらの組成物および方法は、高効率の遺伝子の移入、発現、細胞生存率の増大、組換え誘導性二本鎖切断の効率的導入、および非相同末端結合(NHEJ)機構により、相同性により導かれる修復(HDR)を優先する工程、および相同な組換え体の効率的回収および拡大をもたらし得る。

【0242】

細胞内ゲノム移植

細胞内ゲノム移植は、治療適用のために、細胞および核酸を遺伝子改変する方法であり得る。場合によって、本開示に記載される組成物および方法は、細胞のゲノムへとトランス遺伝子を導入するのに使用することができる。全体を通して記載される組成物および方法は、T細胞の、生理学および免疫学的な抗腫瘍効力を攪乱せずに置く形で、腫瘍特異的なトランス遺伝子(例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子)発現のための、核酸により媒介される遺伝子操作工程を使用し得る。効果的な養子細胞移入ベースの基づく免疫療法(ACIT)は、がん(例えば、転移性がん)患者を処置するのに有用であり得る。例えば、非ウイルス法を使用して、がん細胞上の固有の変異であるネオ抗原を認識するトランス遺伝子(例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子)を発現するように自家末梢血リンパ球(PBL)を改変し、開示される、細胞内ゲノム移植の組成物および方法において使用することができる。

【0243】

患者のがんにおける、固有の免疫原性変異を認識する、がん特異的TCRの配列を同定

する、1つの例示的な方法については、PCT/US14/58796において記載されている。例えば、トランス遺伝子（例えば、がん特異的TCR、または外因性トランス遺伝子、またはがん遺伝子）は、ランダム挿入または特異的挿入を使用して、細胞ゲノム（例えば、T細胞）へと挿入することができる。場合によって、挿入は、ウイルス挿入であり得る。場合によって、挿入は、非ウイルス挿入を介し得る（例えば、ミニサークルベクターによる）。場合によって、トランス遺伝子のウイルス挿入は、特定のゲノム部位へとターゲティングすることができ、または他の場合には、トランス遺伝子のウイルス挿入は、ゲノム部位へのランダム挿入であり得る。場合によって、トランス遺伝子（例えば、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子）または核酸（例えば、少なくとも1つの外因性核酸）は、細胞のゲノムへと1回挿入される。場合によって、トランス遺伝子（例えば、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子）または核酸（例えば、少なくとも1つの外因性核酸）は、ゲノム遺伝子座へとランダムに挿入される。場合によって、トランス遺伝子（例えば、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子）または核酸（例えば、少なくとも1つの外因性核酸）は、1つを超えるゲノム遺伝子座へとランダムに挿入される。場合によって、トランス遺伝子（例えば、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子）または核酸（例えば、少なくとも1つの外因性核酸）は、少なくとも1つの遺伝子（例えば、PD-1、CTLA-4、および/またはAAVS1）に挿入される。場合によって、トランス遺伝子（例えば、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子）または核酸（例えば、少なくとも1つの外因性核酸）は、遺伝子（例えば、PD-1、CTLA-4、および/またはAAVS1）内の切断に挿入される。場合によって、1つを超えるトランス遺伝子（例えば、外因性トランス遺伝子）は、細胞のゲノムへと挿入される。場合によって、1つを超えるトランス遺伝子（例えば、外因性トランス遺伝子）は、1または複数のゲノム遺伝子座に挿入される。場合によって、トランス遺伝子（例えば、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子）または核酸（例えば、少なくとも1つの外因性核酸）は、少なくとも1つの遺伝子に挿入される。場合によって、トランス遺伝子（例えば、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子）または核酸（例えば、少なくとも1つの外因性核酸）は、2つまたはそれよりも多い遺伝子（例えば、PD-1、CTLA-4、および/またはAAVS1）に挿入される。場合によって、トランス遺伝子（例えば、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子）または核酸（例えば、少なくとも1つの外因性核酸）は、細胞のゲノムへとランダムに、および/または特異的に挿入される。場合によって、トランス遺伝子は外因性トランス遺伝子である。場合によって、外因性トランス遺伝子はがん遺伝子である。場合によって、トランス遺伝子（例えば、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子）は、遺伝子（例えば、PD-1、CTLA-4、および/またはAAVS1）の少なくとも一部と相補的な操作部位で挟まれる。場合によって、トランス遺伝子（例えば、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子）は、遺伝子（例えば、PD-1、CTLA-4、またはAAVS1）内の切断と相補的な操作部位で挟まれる。場合によって、トランス遺伝子（例えば、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子）は、遺伝子内に挿入されない（例えば、PD-1、CTLA-4、および/またはAAVS1内に挿入されない）。場合によって、トランス遺伝子は、遺伝子内の切断（例えば、PD-1、CTLA-4、および/またはAAVS1内の切断）に挿入されない。

【0244】

場合によって、遺伝子改変された細胞集団における細胞の、少なくとも約5%、または少なくとも約10%、または少なくとも約15%、または少なくとも約20%、または少なくとも約25%、または少なくとも約30%、または少なくとも約35%、または少なくとも約40%、または少なくとも約45%、または少なくとも約50%、または少なくとも約55%、または少なくとも約60%、または少なくとも約65%、または少なくとも約70%、または少なくとも約75%、または少なくとも約80%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%は、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を含む。場合によって、本開示の方法のうちのいずれかは、遺伝子改

変えられた細胞集団における細胞の、少なくとも約もしくは約 5 %、または少なくとも約もしくは約 10 %、または少なくとも約もしくは約 15 %、または少なくとも約もしくは約 20 %、または少なくとも約もしくは約 25 %、または少なくとも約もしくは約 30 %、または少なくとも約もしくは約 35 %、または少なくとも約もしくは約 40 %、または少なくとも約もしくは約 45 %、または少なくとも約もしくは約 50 %、または少なくとも約もしくは約 55 %、または少なくとも約もしくは約 60 %、または少なくとも約もしくは約 65 %、または少なくとも約もしくは約 70 %、または少なくとも約もしくは約 75 %、または少なくとも約もしくは約 80 %、または少なくとも約もしくは約 85 %、または少なくとも約もしくは約 90 %、または少なくとも約もしくは約 95 %、または少なくとも約もしくは約 97 %、または少なくとも約もしくは約 98 %、または少なくとも約もしくは約 99 % が、少なくとも 1 つの外因性トランス遺伝子を含むことを結果としてもたらし得る。場合によって、遺伝子改変された細胞集団における細胞の、少なくとも約または約 3 %、5 %、8 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、93 %、95 %、97 %、98 %、99 %、99.5 %、または 100 % は、少なくとも 1 つの遺伝子（例えば、PD-1、CTLA-4、および／または AAVS1）内の切断に組み込まれた、少なくとも 1 つの外因性トランス遺伝子を含む。場合によって、少なくとも 1 つのトランス遺伝子は、1 または複数の遺伝子内の切断に組み込まれる。場合によって、遺伝子改変された細胞集団における細胞の、少なくとも約または約 3 %、5 %、8 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、93 %、95 %、97 %、98 %、99 %、99.5 %、または 100 % は、細胞のゲノム内に組み込まれた少なくとも 1 つの外因性トランス遺伝子を含む。場合によって、遺伝子改変された細胞集団における細胞の、少なくとも約または約 3 %、5 %、8 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、93 %、95 %、97 %、98 %、99 %、99.5 %、または 100 % は、ゲノム遺伝子座内に組み込まれた少なくとも 1 つの外因性トランス遺伝子を含む。場合によって、組込みは、ウイルス（例えば、AAV または修飾 AAV）または非ウイルス（例えば、ミニサークル）系を含む。

【0245】

場合によって、ゲノム遺伝子座または少なくとも 1 つの遺伝子は、アデノシン A2a 受容体 (ADORA)、CD276、V セットドメイン含有 T 細胞活性化インヒビター 1 (VTGN1)、B リンパ球および T リンパ球関連 (BTLA)、インドールアミン 2, 3-ジオキシゲナーゼ 1 (IDO1)、KIR3DL1 (キラー細胞免疫グロブリン様受容体、3 ドメイン、長細胞質テール、1)、リンパ球活性化遺伝子 3 (LAG3)、A 型肝炎ウイルス細胞受容体 2 (HAVCR2)、VISTA (T 細胞活性化の V ドメイン免疫グロブリンサプレッサー)、ナチュラルキラー細胞受容体 2B4 (CD244)、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ 1 (HPR1)、アデノ随伴ウイルス組込み部位 1 (AAVS1)、またはケモカイン (C-C モチーフ) 受容体 5 (遺伝子/偽遺伝子) (CCR5)、CD160 分子 (CD160)、TIGIT (Ig および ITIM ドメインを有する T 細胞免疫受容体)、CD96 分子 (CD96)、CRTAM (細胞傷害性および制御性 T 細胞分子)、白血球関連免疫グロブリン様受容体 1 (LAIR1)、シアル酸結合 Ig 様レクチン 7 (SIGLEC7)、シアル酸結合 Ig 様レクチン 9 (SIGLEC9)、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー 10b (TNFRSF10B)、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー 10a (TNFRSF10A)、カスパーゼ 8 (CASP8)、カスパーゼ 10 (CASP10)、カスパーゼ 3 (CASP3)、カスパーゼ 6 (CASP6)、カスパーゼ 7 (CASP7)、FADD (Fas 関連細胞死ドメイン)、Fas 細胞表面細胞死受容体 (FAS)、形質転換増殖因子ベータ受容体 II (TGFBRII)、形質転換増殖因子ベータ受容体 I (TGFBRI)、SMAD ファミリーメンバー 2 (SMAD2)、SMAD ファミリーメンバー 3 (SM

A D 3)、S M A Dファミリーメンバー4 (S M A D 4)、S K Iがん原遺伝子 (S K I)、S K I様がん原遺伝子 (S K I L)、T G I F 1 (T G F B誘導因子ホメオボックス1)、プログラム細胞死1 (P D-1)、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4 (C T L A 4)、インターロイキン10受容体サブユニットアルファ (I L 10 R A)、インターロイキン10受容体サブユニットベータ (I L 10 R B)、H M O X 2 (ヘムオキシゲナーゼ2)、インターロイキン6受容体 (I L 6 R)、I L 6 S T (インターロイキン6シグナル伝達因子)、c-s r cチロシンキナーゼ (C S K)、P A G 1 (グリコスフィンゴ脂質ミクロドメインにより膜アンカーされるリンタンパク質1)、S I T 1 (シグナル閾値調節膜貫通アダプター1)、F O X P 3 (フォークヘッドボックスP3)、P R Dメイン1 (P R D M 1)、B A T F (塩基性ロイシンジッパー転写因子、A T F様)、可溶性グアニル酸シクラーゼ1アルファ2 (G U C Y 1 A 2)、可溶性グアニル酸シクラーゼ1アルファ3 (G U C Y 1 A 3)、可溶性グアニル酸シクラーゼ1ベータ2 (G U C Y 1 B 2)、タンパク質のプロリルヒドロキシラーゼドメイン (P H D 1、P H D 2、P H D 3)ファミリー、または可溶性グアニル酸シクラーゼ1ベータ3 (G U C Y 1 B 3)、T細胞受容体アルファ遺伝子座 (T R A)、T細胞受容体ベータ遺伝子座 (T R B)、e g l-9ファミリーの低酸素症誘導性因子1 (E G L N 1)、e g l-9ファミリーの低酸素症誘導性因子2 (E G L N 2)、e g l-9ファミリーの低酸素症誘導性因子3 (E G L N 3)、P P P 1 R 1 2 C (タンパク質ホスファターゼ1調節サブユニット12C)、およびこれらの任意の組合せまたは誘導体からなる群から選択される。

10

【0246】

20

場合によって、本開示は、遺伝子改変された細胞集団および遺伝子改変された細胞集団を産生する方法を提供する。場合によって、前記遺伝子改変された細胞集団は、少なくとも約30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、99.5%、または100%の細胞生存率（例えば、細胞生存率は、A A Vベクター（または非ウイルスベクター（例えば、ミニサークルベクター））が細胞集団へと導入された後のある時点で測定され、および／または、細胞生存率は、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子が少なくとも1つの細胞のゲノム遺伝子座へと組み込まれた後のある時点で測定される）を含む。場合によって、細胞生存率は、F A C Sによって測定される。場合によって、細胞生存率は、ウイルス（例えば、A A V）ベクターまたは非ウイルス（例えば、ミニサークル）ベクターを、細胞および／または細胞集団へと導入した後、約4時間、6時間、8時間、10時間、12時間、18時間、20時間、24時間、30時間、36時間、40時間、48時間、54時間、60時間、72時間、84時間、96時間、108時間、120時間、132時間、144時間、156時間、168時間、180時間、192時間、204時間、216時間、228時間、240時間、もしくは240時間よりも長い期間、少なくともほぼこれらの期間、または最大でほぼこれらの期間で測定される。場合によって、細胞生存率は、ウイルス（例えば、A A V）ベクターまたは非ウイルス（例えば、ミニサークル）ベクターを、細胞および／または細胞集団へと導入した後、約1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、31日、45日、50日、60日、70日、90日、もしくは90日よりも長い期間、少なくともほぼこれらの期間、または最大でほぼこれらの期間で測定される。場合によって、細胞生存率は、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子が、少なくとも1つの細胞のゲノム遺伝子座へと組み込まれた後に測定される。場合によって、細胞生存率は、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子が、少なくとも1つの細胞のゲノム遺伝子座へと組み込まれた後、約4時間、6時間、8時間、10時間、12時間、18時間、20時間、24時間、30時間、36時間、40時間、48時間、54時間、60時間、72時間、84時間、96時間、108時間、120時間、132時間、144時間、156時間、168時間、180時間、192時間、204時間、216時間、228時間、240時間、240時間よりも長く、11日、12日、

30

40

50

13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、31日、45日、50日、60日、70日、90日、もしくは90日より長い期間、少なくともほぼこれらの期間、または最大でほぼこれらの期間で測定される。場合によって、細胞毒性は、ウイルス系または非ウイルス系が細胞または細胞集団へと導入された後に測定される。場合によって、細胞毒性は、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子が、少なくとも1つの細胞のゲノム遺伝子座へと組み込まれた後に測定される。場合によって、細胞毒性は、野生型AAVもしくは非修飾AAVまたは非ウイルス系（例えば、ミニサークルベクター）が、同等の細胞または同等の細胞集団へと導入される場合より、修飾AAVベクターが使用される場合に低い。場合によって、細胞毒性は、非ウイルスベクター（例えば、ミニサークルベクター）が、同等の細胞または同等の細胞集団へと導入される場合より、AAVベクターが使用される場合に低い。場合によって、細胞毒性は、フローサイトメトリーによって測定される。場合によって、細胞毒性は、野生型AAVベクターもしくは非修飾AAVベクターまたはミニサークルベクターが、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を組み込むために使用される場合と比較して、修飾AAVベクターが少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を組み込むために使用される場合、約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、12%、15%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、82%、85%、88%、90%、92%、95%、97%、98%、99%、もしくは100%、少なくともほぼこれらの比率、または最大でほぼこれらの比率だけ低減される。場合によって、細胞毒性は、ミニサークルベクターまたは別の非ウイルス系が、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を組み込むために使用される場合と比較して、AAVベクターが使用される場合、約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、12%、15%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、82%、85%、88%、90%、92%、95%、97%、98%、99%、もしくは100%、少なくともほぼこれらの比率、または最大でほぼこれらの比率だけ低減される。場合によって、AAVは、組換えAAV（rAAV）、修飾AAV、ハイブリッドAAV、自己相補的AAV（scAAV）、キメラAAV、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される。

10

20

30

【0247】

場合によって、本明細書で開示される方法は、細胞へと、1または複数の核酸（例えば、第1の核酸および／または第2の核酸）を導入するステップを含む。当業者は、核酸は一般に、その分子が、長鎖に連結された、多くのヌクレオチドからなる物質を指す場合があることを認識するであろう。核酸の非限定的な例は、人工核酸類似体（例えば、ペプチド核酸、モルホリノオリゴマー、ロックト核酸、グリコール核酸、またはトレオース核酸）、環状核酸、DNA、一本鎖DNA、二本鎖DNA、ゲノムDNA、ミニサークルDNA、プラスミド、プラスミドDNA、ウイルスDNA、ウイルスベクター、ガンマーレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、RNA、短鎖ヘアピンRNA、psiRNA、および／またはこれらのハイブリッド体もしくは組合せを含む。場合によって、方法は、核酸を含むことが可能であり、核酸は、合成核酸である。場合によって、試料は、核酸を含むことが可能であり、核酸は、断片化することができる。場合によって、核酸は、ミニサークルである。

40

【0248】

場合によって、核酸は、プロモーター領域、バーコード、制限部位、切断部位、エンドヌクレアーゼ認識部位、プライマー結合部位、選択用マーカー、固有の識別配列、耐性遺伝子、リンカー配列、またはこれらの任意の組合せを含み得る。核酸は、細菌を使用することなく作製することができる。例えば、核酸は、低減された微量の細菌性要素を有する、または細菌性要素を完全に含まない場合がある。プラスミドベクターと比較した場合、核酸は、PCRによって測定して、20%～40%、40%～60%、60%～80%、

50

または80%~100%、プラスミドベクターよりも少ない細菌の痕跡を有し得る。プラスミドベクターと比較した場合、核酸は、PCRによって測定して、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%から、または最大で100%、プラスミドベクターよりも少ない細菌の痕跡を有し得る。一部の態様では、これらの部位は、酵素的消化、増幅、シーケンシング、結合のターゲティング、精製、耐性特性（例えば、抗生物質耐性）の付与、またはこれらの任意の組合せに有用であり得る。場合によって、核酸は、1または複数の制限部位を含み得る。制限部位は一般に、部位特異的分子（例えば、プロテアーゼ、エンドヌクレアーゼ、または酵素）が、核酸を切断し得る、特異的ペプチド配列または特異的ヌクレオチド配列を指す場合がある。一例では、核酸は、1または複数の制限部位を含むことが可能であり、この場合、制限部位における核酸の切断は、核酸を断片化する。場合によって、核酸は、少なくとも1つのエンドヌクレアーゼ認識部位を含み得る。

10

【0249】

場合によって、核酸は、別の核酸にたやすく結合し得る（例えば、核酸は、粘着末端またはヌクレオチドの突出を含む）。例えば、核酸は、核酸の第1の末端において、突出を含み得る。一般に、粘着末端または突出とは、核酸の末端における、一連の非対合ヌクレオチドを指す場合がある。場合によって、核酸は、核酸の1または複数の末端において、一本鎖突出を含み得る。場合によって、突出は、核酸の3'末端において生じ得る。場合によって、突出は、核酸の5'末端において生じ得る。突出は、任意の数のヌクレオチドを含み得る。例えば、突出は、1ヌクレオチド、2ヌクレオチド、3ヌクレオチド、4ヌクレオチド、または5もしくはそれよりも多いヌクレオチドを含み得る。場合によって、核酸は、別の核酸への結合の前に、修飾を要求し得る（例えば、核酸は、エンドヌクレアーゼによる消化を必要とし得る）。場合によって、核酸の修飾により、ヌクレオチドの突出を作製することができ、突出は、任意の数のヌクレオチドを含み得る。例えば、突出は、1ヌクレオチド、2ヌクレオチド、3ヌクレオチド、4ヌクレオチド、または5もしくはそれよりも多いヌクレオチドを含み得る。一例では、核酸は、制限部位を含むことが可能であり、この場合、核酸を、制限部位において、制限酵素（例えば、NotI）で消化することにより、4ヌクレオチドの突出を産生する。場合によって、修飾は、核酸の1または複数の末端において、平滑末端を作製することを含む。一般に、平滑末端とは、両方の鎖が、塩基対で終結する二本鎖核酸を指す場合がある。一例では、核酸は、制限部位を含むことが可能であり、この場合、核酸を、制限部位において、制限酵素（例えば、BsaI）で消化することにより、平滑末端を産生する。

20

30

【0250】

プロモーターとは、RNAポリメラーゼおよび転写因子の結合を制御し、遺伝子転写の効率、遺伝子が、細胞内のどこで発現し得るのか、および／または遺伝子を、どの細胞型内で発現し得るのかに対して大きな影響を及ぼし得る核酸配列である。プロモーターの非限定的な例は、サイトメガロウイルス（cytomegalovirus）（CMV）プロモーター、伸長因子1アルファ（EF1α）プロモーター、SV40（simian vacuolating）ウイルスプロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK1）プロモーター、ユビキチンC（Ubc）プロモーター、ヒトベータアクチンプロモーター、CAGプロモーター、テトラサイクリン応答エレメント（TRE）プロモーター、UASプロモーター、Actin5c（Ac5）プロモーター、ポリヘドロンプロモーター、Ca²⁺/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII（CaMKIIa）プロモーター、GAL1プロモーター、GAL10プロモーター、TEF1プロモーター、グリセルアルデヒド3-三リン酸（phosphage）デヒドロゲナーゼ（GDS）プロモーター、ADH1プロモーター、CaMV35Sプロモーター、Ubiプロモーター、ヒトポリメラーゼIII RNA（H1）プロモーター、U6プロモーター、またはこれらの組合せを含む。

40

【0251】

プロモーターは、CMV、U6、MND、またはEF1αであり得る（図155A）。

50

場合によって、プロモーターは、外因性トランス遺伝子（例えばTCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）配列と隣接し得る。場合によって、rAAVベクターは、スプライシングアクセプターをさらに含み得る。場合によって、スプライシングアクセプターは、外因性トランス遺伝子（例えばTCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）配列と隣接し得る。プロモーター配列は、PKGプロモーターまたはMNDプロモーターであり得る（図155B）。MNDプロモーターは、骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサーを伴う修飾MOMuLV LTRのU3領域を含有する合成プロモーターであり得る。

【0252】

ウイルスベクター

場合によって、ウイルスベクターを用いて、細胞へとトランス遺伝子を導入することができる。ウイルスベクターは、非限定的に、レンチウイルス、レトロウイルス、またはアデノ随伴ウイルスであり得る。ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルスベクターであり得る（図139および図140）。場合によって、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターは、組換えAAV（rAAV）ベクター、ハイブリッドAAVベクター、キメラAAVベクター、自己相補的AAV（scAAV）ベクター、変異体AAVベクター、および任意のこれらの組合せであり得る。場合によって、AAVベクターは、キメラAAVベクターであり得る。場合によって、アデノ随伴ウイルスは、外因性トランス遺伝子（例えば、少なくとも1つの、がん遺伝子のようなトランス遺伝子）を導入するのに使用することができる。場合によって、ウイルスベクターは同質遺伝子的であり得る。場合によって、ウイルスベクターは、公知のSNPを有するゲノムの部分へと組み込むことができる。他の場合には、ウイルスベクターは、公知のSNPを有するゲノムの一部へと導入されない場合がある。例えば、rAAVは、対象自身のゲノムDNAと同質遺伝子的または同種であるように設計することができる。場合によって、同質遺伝子的ベクターは、相同組換えの効率を改善することができる。場合によって、gRNAは、公知のSNPを有する領域をターゲティングしないで、組み込まれたベクターのトランス遺伝子の発現を改善するように設計することができる。PD-1、CISH、AAVS1、およびCTLA-4などのチェックポイント遺伝子におけるSNPの頻度を決定することができる（図141A、図141B、および図142）。

【0253】

アデノ随伴ウイルス（AAV）は、非病原性の一本鎖DNAパルボウイルスであり得る。AAVは、約26nmのカプシド直径を有し得る。場合によって、カプシド直径はまた、約20nm～約50nmであり得る。AAV一本鎖DNAゲノムの各末端はITR（inverted terminal repeat）を含有し得、これはゲノム複製およびパッケージングに必要とされる唯一のシス作用性エレメントであり得る。ゲノムは2つのウイルス遺伝子：repおよびcapを保有する。ウイルスは、2つのプロモーターおよび選択的スプライシングを用いて、複製に必要な4つのタンパク質（Rep78、Rep68、Rep52、およびRep40）を産生し、一方で第3のプロモーターは、選択的スプライシングおよび代替翻訳開始コドンの組合せを通じて、3つのウイルスカプシド構造タンパク質1、2、および3（VP1、VP2、およびVP3）の転写物を産生する。3つのカプシドタンパク質は、同一のC末端533アミノ酸を共有し、一方でVP2およびVP1は、それぞれ65アミノ酸および202アミノ酸の、追加のN末端配列を含有する。AAVビリオンは、T=1の正二十面体対称に配置されている、全部で60コピーのVP1、VP2、およびVP3を、1：1：20の比率で含むことができる。

【0254】

細胞レベルにおいて、AAVは、遺伝子発現を達成する前に5つの主要なステップを経ることができる：1）細胞表面受容体への結合または付着、2）エンドサイトーシス、3）核へのトラフィッキング、4）ゲノムを放出するためのウイルスの脱コート、および5）一本鎖から、核内での転写のための鋳型としての二本鎖DNAへのゲノムの変換。rAAVが各個別のステップを成功裏に実行することができる累積効率により、全体の形質導入効率を決定することができる。rAAVの形質導入における律速ステップには、ウイル

スの付着および内在化に必要な細胞表面受容体が存在しないまたは少量であること、リソソーム分解をもたらす非効率的なエンドソーム脱出、および一本鎖から二本鎖DNA鋳型への遅い変換が含まれ得る。したがって、遺伝子治療のための、細胞または組織へのより効率的な、またはより特異的な形質導入を容易にするために、ゲノムおよび／またはカプシドに対する修飾を有するベクターを設計することができる。

【0255】

場合によって、ウイルスカプシドは修飾されていてもよい。修飾は、カプシド構成要素の組合せを修飾することを含み得る。例えば、モザイクカプシドAAVは、異なる血清型由来のウイルスカプシドタンパク質の混合物から構成され得るビリオンである。カプシドタンパク質は、種々の比率で混合された個別のプラスミドによる補完によって提供され得る。ウイルスのアセンブリー中、補完プラスミドの比率を化学量論的に反映したサブユニット比率で、異なる血清型のカプシドタンパク質を各ビリオンに混合することができる。モザイクカプシドは、非修飾カプシドと比較して、ある特定の細胞型に対する結合効率の増大または性能の向上をもたらすことができる。

【0256】

場合によって、キメラカプシドAAVを作製することができる。キメラカプシドは、別の野生型(wt)AAV配列または無関係のタンパク質のいずれかに由来する外来タンパク質配列の、カプシド遺伝子のオープンリーディングフレームへの挿入を有し得る。キメラ修飾は、特定の機能を欠いており、別のカプシド由来のDNA配列と共トランスフェクトされるAAVカプシド配列を含み得る、天然に存在する血清型の、鋳型としての使用を含み得る。相同組換えは交叉点で起こり、新たな特色および固有の特性を有するカプシドをもたらす。他の場合には、カプシドコード配列のNまたはC末端のいずれかに融合したエピトープコード配列を使用して、遺伝子機能に影響を及ぼさずにウイルスカプシドの表面に新たなペプチドを露出させることを試みている。しかしながら、場合によって、カプシドコード配列の特定の位置へと挿入されたエピトープ配列の使用は、コード配列自体にエピトープをタグ付けする異なる手法を使用して実施することができる。キメラカプシドはまた、カプシドコード配列中の特定の位置へと挿入されたペプチドライブラリーから同定されたエピトープの使用を含み得る。スクリーニングのための遺伝子ライブラリーの使用も実施することができる。スクリーニングにより、意図通りに機能しない挿入を捕捉することができ、続いてこれを除去することができる。rAAVベクター中のキメラカプシドは、トランスフェクトすることができる細胞型の範囲を拡大することができ、形質導入の効率を増大させることができる。形質導入の増大は、非修飾カプシドを使用した形質導入と比較して、約10%の増大〜約300%の増大であり得る。キメラカプシドは、縮重、組換え、シャッフルまたは他の方法で修飾されたCapタンパク質を含有し得る。例えば、VPタンパク質のN末端への受容体特異的リガンドまたは単鎖抗体の挿入のターゲティングを実施することができる。リンパ球抗体または標的のAAVへの挿入は、T細胞の結合および感染を改善するために実施することができる。

【0257】

場合によって、キメラAAVは、少なくとも1つのAAVカプシドタンパク質における修飾(例えば、VP1、VP2、および／またはVP3カプシドタンパク質における修飾)を有し得る。場合によって、AAVベクターは、VP1、VP2、およびVP3カプシド遺伝子配列の少なくとも1つにおける修飾を含む。場合によって、少なくとも1つのカプシド遺伝子は、AAVから除去され得る。場合によって、AAVベクターは、1または複数のカプシド遺伝子配列の欠失を含み得る。場合によって、AAVベクターは、VP1、VP2、およびVP3カプシド遺伝子配列のうちの少なくとも1つにおける少なくとも1つのアミノ酸置換、欠失、および／または挿入を有し得る。

【0258】

場合によって、キメラカプシド(例えば、縮重または他の方法で修飾されたCapタンパク質を含有するカプシド)を有するビリオンを作製することができる。そのようなビリオンのカプシドをさらに変更するために、例えば、リンパ球などの特定の細胞型に対する

結合親和性を増強または修飾するために、さらなる変異をビリオンのカプシドへと導入することができる。例えば、適切なキメラカプシドは、特定の細胞型に対するウイルスのターゲティングを容易にするためにリガンド挿入変異を有し得る。挿入変異体、アラニンスクリーニング変異体、およびエピトープタグ変異体を含むAAVカプシド変異体の構築および特徴付けについては、Wuら、J. Virol. 74巻：8635～45頁、2000年に記載されている。AAVカプシド変異体を作製する方法は公知であり、部位特異的変異誘発（Wuら、J. Virol. 72巻：5919～5926頁）；分子育種、核酸、エクソン、およびDNAファミリーシャッフリング（Soongら、Nat. Genet. 25巻：436～439頁、2000年；Cocoら、Nature Biotech. 2001年；19巻：354頁；ならびに米国特許第5,837,458号；同第5,811,238号；および同第6,180,406号；KolkmanおよびStemmer、Nat. Biotech. 19巻：423～428頁、2001年；Fischら、Proceedings of the National Academy of Sciences 93巻：7761～7766頁、1996年；Christiansら、Nat. Biotech. 17巻：259～264頁、1999年）；リガンド挿入（Girodら、Nat. Med. 9巻：1052～1056頁、1999年）；カセット変異誘発（Ruedaら、Virology 263巻：89～99頁、1999年；Boyerら、J. Virol. 66巻：1031～1039頁、1992年）；ならびに短いランダムオリゴヌクレオチド配列の挿入を含む。

【0259】

場合によって、カプシド転換を実施することができる。カプシド転換は、ある血清型のAAVのITRを異なる血清型のカプシドにパッケージングすることを含むプロセスであり得る。別の場合には、AAVカプシド表面への受容体リガンドの吸着を実施することができ、AAVカプシドの表面への外来ペプチドの付加であり得る。場合によって、これは、AAV血清型が現在指向性を有していない細胞に対して特異的にターゲティングする能力を付与することができ、これは遺伝子治療ツールとしてのAAVの使用を大幅に拡大することができる。

【0260】

場合によって、rAAVベクターを修飾することができる。例えば、rAAVベクターは、挿入、欠失、化学的変更、または合成修飾などの修飾を含み得る。場合によって、単一ヌクレオチドがrAAVベクターへと挿入される。他の場合には、複数のヌクレオチドがベクターへと挿入される。挿入することができるヌクレオチドは、約1ヌクレオチド～約5kbの範囲であり得る。挿入することができるヌクレオチドは、機能的タンパク質をコードし得る。挿入することができるヌクレオチドは、ベクターを受容する対象にとって内因性または外因性であり得る。例えば、ヒト細胞は、トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）の一部などのマウスゲノムの少なくとも一部を含有し得るrAAVベクターを受容し得る。場合によって、rAAVベクターの挿入または欠失などの修飾は、ベクターのタンパク質コード領域または非コード領域を含み得る。場合によって、修飾は、細胞へと導入された場合にベクターの活性を改善し得る。例えば、修飾は、ヒト細胞へと導入された場合にベクターのタンパク質コード領域の発現を改善することができる。

【0261】

場合によって、本開示は、rAAVベクター（例えば、外因性受容体配列をコードするベクター）およびキメラカプシド（例えば、縮重、組換え、シャッフルまたは他の方法で修飾されたCapタンパク質を含有するカプシド）から構成されるビリオンのストックを産生するためのAAVのRepおよびCapタンパク質をもたらすヘルパーベクターの構築を提供する。場合によって、修飾は、修飾されているAAVのcap核酸、例えば、1つより多いAAV血清型（例えば、AAV血清型1～8）に由来する配列の一部を含有するcap核酸の産生を含み得る。そのようなキメラ核酸は、いくつかの変異誘発技術によって産生することができる。キメラcap遺伝子を作製するための方法は、in vitro DNA増幅反応における縮重オリゴヌクレオチドの使用を含み得る。縮重変異（例えば、異なるAAV血清型由来の多型）の核酸配列への組込みのためのプロトコールは、

Cocoら (Nature Biotechnology 20 巻: 1246~1250 頁、2002 年) において記載される。縮重ホモ二本鎖組換えとして公知の、この方法では、遺伝子ファミリー内の遺伝子由来の多型 (縮重) を含有する「トップストランド」オリゴヌクレオチドが構築される。相補的縮重が、複数の架橋「足場」オリゴヌクレオチドに、操作により導入されている。アニーリング、ギャップ充填、およびライゲーションステップの単一の配列は、親多型のあらゆる可能な順列を捕捉する核酸のライブラリーの産生をもたらす。カプシド遺伝子の任意の部分は、縮重ホモ二本鎖組換えなどの方法を使用して変異させることができる。しかしながら、特定のカプシド遺伝子配列が好ましい。例えば、AAV2 カプシドの、その細胞表面受容体のヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) への結合を担う重要な残基がマッピングされている。585 位および 588 位のアルギニン残基は、これらの残基内の非保存的変異がヘパリン-アガロースへの結合を排除するので、結合に重要であると思われる。AAV2 および AAV4 原子構造のコンピューターによるモデリングは、アルギニン残基 585 および 588 と重複し、カプシドの表面に露出している 7 つの超可変領域を同定した。これらの超可変領域は、受容体結合を媒介するカプシドの表面ループとして露出していると考えられている。したがって、これらのループは、野生型ビリオンとは異なる指向性を有するキメラビリオンを産生する方法における変異誘発のための標的として使用され得る。場合によって、修飾は、AAV 血清型 6 カプシドのものであり得る。

10

【0262】

本開示の方法において使用され得る別の変異誘発技術は DNA シャフリングである。DNA または遺伝子シャフリングは、遺伝子ファミリーのメンバーのランダム断片の創出およびこれらの組換えを含み、多くの新たな組合せをもたらす。AAV カプシド遺伝子をシャッフルするためには、3 つのカプシドタンパク質 VP1、VP2、および VP3 の関与ならびに 8 つの血清型間の異なる程度の相同性を含む、いくつかのパラメータを考慮することができる。細胞特異的または組織特異的指向性を有する生存可能な rcAAV ベクターを得る可能性を高めるために、例えば、高い多様性および多数の順列をもたらすシャフリングプロトコルが好ましい。キメラ rcAAV の作製のための DNA シャフリングプロトコルの例は、一過性の鋳型でのランダムキメラ生成 (RACHITT) である (Cocoら、Nat. Biotech. 19 巻: 354~358 頁、2001 年)。RACHITT 法は、2 つの異なる血清型 (例えば、AAV5d AAV6) の AAV ゲノム由来の 2 つの PCR 断片を組み換えるために使用できる。例えば、85% 同一であり、約 1 kbp にわたり、3 つ全ての遺伝子 (VP1、VP2、および VP3) の開始コドンを含むセグメントである cap 遺伝子の保存領域は、in vivo シャフリングプロトコル (米国特許第 5,093,257 号; Volkovら、NAR 27 巻: e18 頁、1999 年; および、Wang P. L.、Dis. Markers 16 巻: 3~13 頁 2000 年) を含む、RATCHITT または他の DNA シャフリングプロトコルを使用して、シャッフルすることができる。得られたコンビナトリアルキメラライブラリーは、WT AAV ゲノムのそれぞれの断片を置き換えるために適切な AAV-TR 含有ベクターにクローニングすることができる。ランダムクローンは、Vector NTI 7 Suite Software の AlignX アプリケーションを使用してシーケンシングし、親ゲノムとアラインメントさせることができる。シーケンシングおよびアラインメントから、1 Kbp の遺伝子当たりの組換え交叉の数を決定することができる。代替的に、AAV ゲノムの可変ドメインは、本開示の方法を使用してシャッフルすることができる。例えば、変異は、VP3 において粒子表面ループを形成する可能性のある、AAV の 2 つのアミノ酸クラスター (アミノ酸 509~522 および 561~591) 内に作製することができる。この低相同性ドメインをシャッフルするために、親の相同性と無関係である組換えプロトコル (Ostermeierら、Nat. Biotechnol. 17 巻: 1205~1209 頁、1999 年; Lutzら、Proceedings of the National Academy of Sciences 98 巻: 11248~11253 頁、2001 年; および Lutzら、NAR 29 巻: E16 頁、2001 年)、または、低相同性の DNA 断片をアニールおよび組換えするよう修飾された RACHITT プロトコルを用いる

20

30

40

50

ことができる。

【0263】

場合によって、AAVカプシドのS/T/K残基の標的変異を実施することができる。受容体を媒介するエンドサイトーシスによるAAVの、細胞中への内在化に続いて、AAVは、放出される前にエンドソーム内で酸性化を受けながらサイトゾルを通過して移動することができる。エンドソーム脱出後、AAVは核のトラフィッキングを受け、そこでウイルスカプシドが脱コートされ、そのゲノムの放出および遺伝子発現の誘導が起きる。S/T/K残基は、リン酸化およびそれに続くカプシドタンパク質のプロテアソーム分解の手がかりとして役立つポリユビキチン化のための潜在的な部位である。これは、そのトランス遺伝子、外因性トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）を発現するための核内へのベクターのトラフィッキングを防止し、低い遺伝子発現をもたらし得る。また、プロテアソーム分解されたカプシド断片は、CD8 T細胞認識のために細胞表面のMHCクラスI分子によって提示され得る。これは免疫応答を導き、それによって形質導入された細胞を破壊し、さらに持続的なトランス遺伝子発現を低減する。S/TからAへの、およびKからRへの点変異は、カプシドのリン酸化部位を防止/低減し得る。これはユビキチン化およびプロテオソーム分解の低減をもたらし得、より多くの無傷のベクターが核に入ってトランス遺伝子を発現することを可能にする。全体的なカプシド分解を防止/低下させることはまた、T細胞に対する抗原提示を低減し、結果として、ベクターに対する宿主の免疫応答が低下する。

10

【0264】

一部の態様では、AAV ITRに挟まれる目的のヌクレオチド配列を含むAAVベクターは、異種配列をAAVベクターへと直接挿入することによって構築することができる。これらの構築物は当技術分野で周知の技術を使用して設計することができる。例えば、Carter B, Adeno-associated virus vectors, Curr. Opin. Biotechnol., 3巻: 533~539頁(1992年); およびKotin RM, Prospects for the use of adeno-associated virus as a vector for human gene therapy, Hum Gene Ther 5巻: 793~801頁(1994年)を参照されたい。

20

【0265】

場合によって、AAV発現ベクターは、治療効果を有するトランス遺伝子などの目的の異種核酸配列を含む。rAAVビリオンは、当技術分野で公知の方法を使用して構築することができる。例えば、Koerberら(2009年) Mol. Ther. 17巻: 2088頁; Koerberら(2008年) Mol. Ther. 16巻: 1703~1709頁; 米国特許第7, 439, 065号および同第6, 491, 907号を参照されたい。例えば、外因性配列または異種性配列は、AAVゲノムへと挿入することができ、そこではその主要なAAVオープンリーディングフレームがこれらから切り出されている。AAVゲノムの他の部分も削除することができ、ITRのある特定の部分は複製およびパッケージング機能を支援するために無傷のままである。そのような構築物は当技術分野で周知の技術を使用して設計することができる。例えば、米国特許第5, 173, 414号および同第5, 139, 941号; Lebkowskiら(1988年) Molec. Cell. Biol. 8巻: 3988~3996頁を参照されたい。

30

40

【0266】

本開示は、細胞において、1または複数の目的のタンパク質を発現することができる組換えAAVを産生するための方法および材料を提供する。本明細書に記載されるように、本明細書で開示される方法および材料は、in vivoで治療効果を達成するであろうレベルで目的のタンパク質の高い産生または産生を可能にする。目的のタンパク質の例は外因性受容体である。外因性受容体はTCRであり得る。外因性受容体はがん遺伝子であり得る。

【0267】

一般に、rAAVビリオンもしくはrAAVウイルス粒子、またはAAV発現ベクターは、トランスフェクションによるなどの公知の技術を使用して適切な宿主細胞へと導入さ

50

れる。トランスフェクション技術は当技術分野で公知である。例えば、Grahamら（1973年）Virology、52巻：456頁、Sambrookら（1989年）Molecular Cloning, A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratories、New York、Davisら（1986年）Basic Methods in Molecular Biology、Elsevier、およびChuら（1981年）Gene 13巻：197頁を参照されたい。適切なトランスフェクション方法には、リン酸カルシウム共沈法、直接マイクロインジェクション、電気穿孔、リポソームを媒介する遺伝子導入、および高速マイクロプロジェクタイルを使用した核酸送達が含まれ、これらは当技術分野で公知である。

【0268】

場合によって、組換えAAVを産生するための方法は、本明細書に記載されるようなAAVの5' ITR (inverted terminal repeat) および3' AAV ITRを含むウイルス構築物、増殖性AAV感染を生じさせるためのヘルパー機能、ならびにAAV cap遺伝子を有するパッケージング細胞株を提供するステップと、パッケージング細胞株の上清から組換えAAVを回収するステップとを含む。パッケージング細胞株としては様々な種類の細胞を使用することができる。例えば、使用することができるパッケージング細胞株には、ほんの数例を挙げると、HEK293細胞、HeLa細胞、およびVero細胞が含まれるが、これらに限定されない。場合によって、パッケージング細胞株の上清を、ウイルスを濃縮するためにPEG沈殿によって処理する。他の場合には、遠心分離ステップを使用してウイルスを濃縮することができる。例えば、カラムを使用して遠心分離中にウイルスを濃縮することができる。場合によって、沈殿は、約4℃以下（例えば、約3℃、約2℃、約1℃、または約1℃）で少なくとも約2時間、少なくとも約3時間、少なくとも約4時間、少なくとも約6時間、少なくとも約9時間、少なくとも約12時間、または少なくとも約24時間で起きる。場合によって、組換えAAVを、PEG沈殿上清から、低速遠心分離とそれに続くCsCl勾配によって単離する。低速遠心分離は、約4000rpm、約4500rpm、約5000rpm、または約6000rpmで、約20分間、約30分間、約40分間、約50分間または約60分間であり得る。場合によって、約5000rpmで約30分間の遠心分離とそれに続くCsCl勾配により、組換えAAVをPEG沈殿上清から単離する。

【0269】

場合によって、ヘルパー機能は、アデノウイルスヘルパー遺伝子を含む1または複数のヘルパープラスミドまたはヘルパーウイルスによって提供される。アデノウイルスヘルパー遺伝子の非限定的な例には、E1A、E1B、E2A、E4、およびVAが含まれ、これらは、AAVパッケージングにヘルパー機能を提供することができる。場合によって、AAV cap遺伝子はプラスミド中に存在し得る。プラスミドはAAV rep遺伝子をさらに含み得る。

【0270】

血清学は、ある血清型のウイルスカプシドタンパク質に反応する抗体が、別の血清型のこれらを中和することができないこととして規定することができる。場合によって、任意のAAV血清型（AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、およびこれらの任意の変異体または誘導体を含むが、これらに限定されない）由来のcap遺伝子および／またはrep遺伝子は、本明細書において、目的の1または複数のタンパク質を発現するための、本明細書で開示される組換えAAVを産生するのに使用することができる。アデノ随伴ウイルスは、AAV5もしくはAAV6またはこれらの変異体であり得る。場合によって、AAV cap遺伝子は、血清型1、血清型2、血清型3、血清型4、血清型5、血清型6、血清型7、血清型8、血清型9、血清型10、血清型11、血清型12、またはこれらの変異体由来のカプシドをコードし得る。場合によって、パッケージング細胞株に、ヘルパープラスミドまたはヘルパーウイルス、ウイルス構築物、およびAAV cap遺伝子をコードするプラスミドをトランスフェクトすることができ、共トランスフェクション後の様々な時点で組換えAAVウイルスを回収することができる。例えば、組換え

AAVウイルスは、共トランスフェクション後、約12時間、約24時間、約36時間、約48時間、約72時間、約96時間、約120時間、またはこれら2つの時点のいずれかの間の時間で収集することができる。

【0271】

AAVのヘルパーウイルスは当技術分野で公知であり、例えば、アデノウイルス科およびヘルペスウイルス科に由来するウイルスが含まれる。AAVのヘルパーウイルスの例には、米国特許出願公開第20110201088号に記載されるSAdV-13ヘルパーウイルスおよびSAdV-13様ヘルパーウイルス、ヘルパーベクターpHELP (Applied Viromics)が含まれるが、これらに限定されない。当業者は、AAVに十分なヘルパー機能を提供することができるAAVの任意のヘルパーウイルスまたはヘルパープラスミドを本明細書において使用できることを理解するであろう。本明細書で開示される組換えAAVウイルスはまた、感染性組換えAAVを産生するのに適した当技術分野で公知の任意の従来の方法を使用して産生され得る。場合によって、組換えAAVは、AAV粒子産生のために必要な構成要素のいくつかを安定に発現する細胞株を使用することによって産生され得る。例えば、AAVのrepおよびcap遺伝子、ならびにネオマイシン耐性遺伝子などの選択用マーカーを含むプラスミド（または複数のプラスミド）は、細胞（パッケージング細胞）のゲノムへと組み込むことができる。したがって、パッケージング細胞株は、ヘルパーウイルス（例えば、ヘルパー機能を提供するアデノウイルス）、ならびに5'および3' AAV ITRおよび目的のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むウイルスベクターによって共感染することができる。別の非限定的な例では、プラスミドではなくアデノウイルスまたはバキュロウイルスを使用して、パッケージング細胞へとrepおよびcap遺伝子を導入することができる。さらに別の非限定的な例として、5'および3' AAV ITRを含有するウイルスベクターとrep-cap遺伝子を含有するウイルスベクターとの両方が産生細胞のDNAへと安定に組み込まれ得、組換えAAVを産生するためにヘルパー機能を野生型アデノウイルスによって提供することができる。

【0272】

rAAVビリオンまたはウイルス粒子を産生するのに使用することができる適切な宿主細胞には、酵母細胞、昆虫細胞、微生物、および哺乳動物細胞が含まれる。293細胞を含むがこれに限定されない、様々な安定なヒト細胞株を使用することができる。宿主細胞は、ウイルス粒子またはAAVビリオンを産生するために、AAV ITRに挟まれるヌクレオチド配列を複製およびカプシド形成するためのヘルパー機能を提供するように操作することができる。AAVヘルパー機能は、AAV複製およびパッケージングのためにトランスにAAV遺伝子産物を提供するために、宿主細胞において発現するAAVに由来するコード配列によって提供され得る。AAVウイルスは、複製可能または複製欠損にすることができる。一般に、複製欠損AAVウイルスは、1または複数のAAVパッケージング遺伝子を欠いている。細胞は、in vitro、ex vivo、またはin vivoで、本明細書に記載されるようにウイルスベクター、ウイルス粒子、またはウイルスと接触させることができる。場合によって、in vitroで接触させる細胞は、確立された細胞株または対象由来の初代細胞に由来し得、対象に戻すためにex vivoで修飾されるか、またはin vitroで培養中で増殖させ得る。一部の態様では、ウイルスを使用してウイルスベクターを初代細胞へとex vivoで送達して細胞を修飾し、例えば外因性核酸配列、トランス遺伝子、または操作細胞受容体を免疫細胞、または特にT細胞へと導入し、そのような修飾細胞が対象に戻される前に、拡大、選択、または限られた数の継代培養が続く。一部の態様では、そのような修飾細胞を、細胞ベースの治療において使用して、がんを含む疾患または状態を処置する。場合によって、初代細胞は初代リンパ球であり得る。場合によって、初代細胞集団は、初代リンパ球集団であり得る。

【0273】

場合によって、組換えAAVは、自己相補的AAV (scAAV)ではない。AAVを精製するために適した任意の従来の方法は、組換えAAVを精製するために本明細書で記

載される実施形態において使用され得る。例えば、組換え体は、パッケージング細胞および／またはパッケージング細胞の上清から単離および精製することができる。場合によって、AAVは、CsCl勾配を使用する分離方法によって精製され得る。同様に、米国特許出願公開第20020136710号は、AAV付着を媒介する人工受容体または受容体様分子が固定化されているマトリックスを含む固体支持体を使用して、試料からAAVを単離および精製する、AAVを精製するための方法の別の非限定的な例を記載する。

【0274】

場合によって、細胞集団は、例えば、ウイルスベクター、AAV、修飾AAV、またはrAAVによって形質導入され得る。ウイルスによる形質導入は、CRISPR系によるゲノム破壊の前、CRISPR系によるゲノム破壊の後、またはCRISPR系によるゲノム破壊と同時に起こり得る。例えば、CRISPR系によるゲノム破壊は、ゲノムの一部への外因性ポリ核酸の組込みを容易にし得る。場合によって、CRISPR系は、免疫チェックポイント遺伝子またはセーフハーバー遺伝子座などの遺伝子を含むゲノムの一部に二本鎖切断を導入するのに使用することができる。場合によって、CRISPR系は、少なくとも1つの遺伝子（例えば、PD-1、CTLA-4、および／またはAAVS1）に、切断を導入するのに使用することができる。場合によって、二本鎖切断は、ウイルスベクター、AAV、または修飾AAVもしくはrAAVによって細胞に送達される外因性受容体配列を導入することによって修復することができる。場合によって、二本鎖切断は、前記切断に外因性トランス遺伝子を組み込むことによって修復することができる。AAVまたは修飾AAVもしくはrAAVは、CRISPR系によって破壊された遺伝子の一部への組換えアームを有するポリ核酸を含み得る。場合によって、CRISPR系は、ガイドポリ核酸を含む。場合によって、ガイドポリ核酸は、ガイドリボ核酸（gRNA）および／またはガイドデオキシリボ核酸（gDNA）である。例えば、CRISPR系は、PD-1、CTLA-4、および／またはAAVS1の遺伝子に二本鎖切断を導入し得る。次いで、PD-1、CTLA-4、および／またはAAVS1遺伝子を、トランス遺伝子（例えば、外因性TCR、外因性トランス遺伝子、がん遺伝子をコードするトランス遺伝子）の導入によって修復することができ、トランス遺伝子は、CRISPR系によって以前に破壊されたゲノムの一部に相補的である領域を有する組換えアームによって挟まれ得る。ゲノム破壊およびウイルス導入を含む細胞集団は、形質導入することができる。形質導入された細胞集団は、約5%～約100%であり得る。例えば、細胞集団は、約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または最大で約100%形質導入され得る。

【0275】

場合によって、ウイルス（例えば、AAVまたは修飾AAV）および／またはウイルスベクター（例えば、AAVベクターまたは修飾AAVベクター）、および／または、非ウイルスベクター（例えば、ミニサークルベクター）は、細胞または細胞集団に、CRISPR系、および／またはヌクレアーゼもしくはヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド、および／またはガイドポリ核酸を前記細胞または前記細胞集団へと導入した後、約1～3時間、3～6時間、6～9時間、9～12時間、12～15時間、15～18時間、18～21時間、21～23時間、23～26時間、26～29時間、29～31時間、31～33時間、33～35時間、35～37時間、37～39時間、39～41時間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、14日間、16日間、20日間、または20日間よりも長い期間、ほぼこれらの期間から、少なくともほぼこれらの期間、または最大でほぼこれらの期間で、導入する。場合によって、ウイルスベクターは、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を含む（例えば、AAVベクターは少なくとも1つの外因性トランス遺伝子（例えば、がん遺伝子）を含む）。場合によって、非ウイルスベクターは、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を含む（例えば、ミニサークルベクターは少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を含む）。場合によって、AAVベクター（例えば、修飾AAVベクター）は、少なくとも1つの外因性核酸を含む。場合によって、AAVベクター（例えば、修飾AAVベクター）を、細胞集団内

の少なくとも1つの細胞へと導入して、少なくとも1つの外因性核酸を少なくとも1つの細胞のゲノム遺伝子座へと組み込む。

【0276】

場合によって、核酸は、バーコードまたはバーコード配列を含み得る。バーコードまたはバーコード配列とは、ポリヌクレオチドにより構成される、天然または合成の核酸配列であって、前記バーコード配列を有するポリヌクレオチドにより構成される、ポリヌクレオチドおよび他の配列の一義的な識別を可能とする核酸配列に関する。例えば、バーコードを含む核酸は、コードされるトランス遺伝子の識別を可能とし得る。バーコード配列は、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、45、または50もしくはそれよりも多い連続ヌクレオチドの配列を含み得る。核酸は、2つまたはそれよりも多いバーコード配列またはそれらの相補体を含み得る。バーコード配列は、ランダムにアセンブルされたヌクレオチド配列を含み得る。バーコード配列は、縮重配列であり得る。バーコード配列は、公知の配列であり得る。バーコード配列は、あらかじめ規定された配列であり得る。

【0277】

場合によって、本明細書で開示される方法は、核酸（例えば、第1の核酸および／または第2の核酸）を含み得る。場合によって、核酸はトランス遺伝子をコードし得る。一般に、トランス遺伝子は、複数のヌクレオチドサブユニットを含む直線状ポリマーを指し得る。場合によって、トランス遺伝子はがん遺伝子である。トランス遺伝子は、任意の数のヌクレオチドを含み得る。場合によって、トランス遺伝子は、約100未満のヌクレオチドを含み得る。場合によって、トランス遺伝子は、少なくとも約100のヌクレオチドを含み得る。場合によって、トランス遺伝子は、少なくとも約200のヌクレオチドを含み得る。場合によって、トランス遺伝子は、少なくとも約300のヌクレオチドを含み得る。場合によって、トランス遺伝子は、少なくとも約400のヌクレオチドを含み得る。場合によって、トランス遺伝子は、少なくとも約500のヌクレオチドを含み得る。場合によって、トランス遺伝子は、少なくとも約1000のヌクレオチドを含み得る。場合によって、トランス遺伝子は、少なくとも約5000のヌクレオチドを含み得る。場合によって、トランス遺伝子は、少なくとも約10,000のヌクレオチドを含み得る。場合によって、トランス遺伝子は、少なくとも約20,000のヌクレオチドを含み得る。場合によって、トランス遺伝子は、少なくとも約30,000のヌクレオチドを含み得る。場合によって、トランス遺伝子は、少なくとも約40,000のヌクレオチドを含み得る。場合によって、トランス遺伝子は、少なくとも約50,000のヌクレオチドを含み得る。場合によって、トランス遺伝子は、約500～約5000の間のヌクレオチドを含み得る。場合によって、トランス遺伝子は、約5000～約10,000の間のヌクレオチドを含み得る。本明細書で開示される場合のうちのいずれかでは、トランス遺伝子は、DNA、RNA、またはDNAとRNAのハイブリッドを含み得る。場合によって、トランス遺伝子は一本鎖であり得る。場合によって、トランス遺伝子は二本鎖であり得る。

【0278】

a. ランダム挿入

本明細書で記載される方法の、1または複数のトランス遺伝子は、細胞ゲノムへと、ランダムに挿入することができる。これらのトランス遺伝子は、ゲノム内のいずれの場所に挿入されても機能的であり得る。例えば、トランス遺伝子は、それ自体のプロモーターをコードする場合もあり、内因性プロモーターの制御下にある位置へと挿入される場合もある。代替的に、トランス遺伝子は、遺伝子のイントロン、遺伝子のエクソン、プロモーター、または非コード領域などの遺伝子へと挿入することができる。

【0279】

トランス遺伝子配列をコードする核酸、例えば、RNAは、細胞の染色体へと、ランダムに挿入することができる。ランダムな組込みは、核酸、例えば、RNAを、細胞へと導入する任意の方法から得ることができる。例えば、方法は、電気穿孔、超音波穿孔、遺伝子銃の使用、リポトランスフェクション、リン酸カルシウムトランスフェクション、デン

ドリマーの使用、マイクロインジェクション、ならびにアデノウイルスベクター、AAVベクター、およびレトロウイルスベクターを含むウイルスベクターの使用、ならびに／またはII群のリボザイムであり得るがこれらに限定されない。

【0280】

トランス遺伝子をコードするRNAはまた、レポーター遺伝子の活性化を介して、トランス遺伝子またはその発現産物の存在を検出し得るよう、レポーター遺伝子を含むようにデザインすることもできる。上記で開示したレポーター遺伝子など、任意のレポーター遺伝子を使用することができる。細胞培養物中で、レポーター遺伝子が活性化した細胞を選択することにより、トランス遺伝子を含有する細胞を選択することができる。

【0281】

挿入されるトランス遺伝子は、ゲノム内の標的二本鎖切断部位と類似する操作部位で挟んで、トランス遺伝子をポリ核酸から切り出し得るので、二本鎖切断領域に挿入することができる。場合によって、トランス遺伝子は、ウイルスにより導入することができる。例えば、AAVウイルスを用いて、細胞に、トランス遺伝子を感染させることができる。AAVウイルスによって組み込まれたトランス遺伝子発現を測定するためにフローサイトメトリーを用いることができる(図107A、図107B、および図128)。AAVウイルスによるトランス遺伝子の組み込みは、細胞毒性を誘導しない(図108)。場合によって、AAVウイルスを用いて操作された細胞集団のフローサイトメトリーによって測定される細胞生存率は、約30%~100%生存可能であり得る。操作細胞集団のフローサイトメトリーによって測定される細胞生存率は、約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%~約100%であり得る。場合によって、rAAVウイルスは、細胞のゲノムへとトランス遺伝子を導入することができる(図109、図130、図131、および図132)。組み込まれたトランス遺伝子は、ゲノム導入の直後から、操作細胞の寿命まで、操作細胞によって発現することができる。例えば、組み込まれたトランス遺伝子は、細胞のゲノムへの導入の後、約0.1分から、トランス遺伝子の細胞への最初の導入後、1時間~5時間、5時間~10時間、10時間~20時間、20時間~1日、1日~3日、3日~5日、5日~15日、15日~30日、30日~50日、50日~100日、または、1000日まで測定することができる。トランス遺伝子の発現は、3日目から検出することができる(図110、および図112)。トランス遺伝子の発現は、7日目から検出することができる(図111、および図113)。トランス遺伝子の発現は、細胞のゲノムへのトランス遺伝子の導入の後、約4時間、6時間、8時間、12時間、18時間~約24時間検出することができる(図114A、図114B、図115A、および図115B)。場合によって、ウイルス力価は、トランス遺伝子の発現のパーセントに影響を及ぼし得る(図116、図117A、図117B、図118、図119A、図120A、図120B、図121A、図121B、図122A、図122B、図123A、図123B、図124、図125、図126、図127、図129A、図129B、図130A、図130B)。

【0282】

場合によって、目的の遺伝子、または本明細書で記載されるトランス遺伝子を含有する、AAVウイルスベクターなどのウイルスベクターは、ウイルスベクターを含有するウイルス粒子による細胞のトランスフェクションに続いて、細胞のゲノムへとランダムに挿入され得る。そのような挿入のランダム部位は、二本鎖切断を有するゲノム部位を含む。レトロウイルスなどの一部のウイルスは、ウイルスベクターのランダム挿入をもたらし得るインテグラーゼなどの因子を含む。

【0283】

場合によって、修飾AAVウイルスまたは操作AAVウイルスを使用して、トランス遺伝子を、細胞へと導入することができる(図83Aおよび図83B)。修飾AAVまたは野生型AAVは、少なくとも1つのゲノム位置に対する相溶性アームを含み得る(図84~図86D)。

【0284】

トランス遺伝子をコードするRNAは、電気穿孔を介して、細胞へと導入することができる。RNAはまた、リポフェクション、感染、または形質転換を介して、細胞へと導入することもできる。電気穿孔および／またはリポフェクションを使用して、初代細胞にトランスフェクトすることができる。電気穿孔および／またはリポフェクションを使用して、初代造血系細胞にトランスフェクトすることができる。場合によって、RNAは、細胞内で、DNAへと逆転写することができる。次いで、DNA基質を、相同組換え反応において使用することができる。DNAはまた、相同組換えを使用せずに、細胞ゲノムへと導入することもできる。場合によって、DNAは、ゲノム内の標的二本鎖切断領域と相補的な操作部位で挟むことができる。場合によって、DNAは、ポリ核酸から切り出すことができるので、相同組換えを伴わずに、二本鎖切断領域に挿入することができる。

10

【0285】

トランス遺伝子の発現は、発現アッセイ、例えば、qPCRによって、またはRNAのレベルを測定することによって検証され得る。発現レベルはまた、コピー数も示し得る（図143および図144）。例えば、発現レベルが極度に高度である場合、これは、トランス遺伝子の1つを超えるコピーが、ゲノム内に組み込まれたことを指し示し得る。代替的に、高度な発現は、トランス遺伝子が、高度な転写領域内に、例えば、高度に発現するプロモーターの近傍に組み込まれたことを指し示し得る。発現はまた、ウェスタンブロット法を介するなど、タンパク質レベルを測定することにより検証することもできる。場合によって、スプライスアクセプターアッセイを、トランス遺伝子の組み込みを測定するレポーター系と共に使用することができる（図94）。場合によって、トランス遺伝子がAAV系を使用してゲノムへと導入される場合、スプライスアクセプターアッセイを、トランス遺伝子の組み込みを測定するレポーター系と共に使用することができる（図106）。

20

【0286】

b. 部位特異的挿入

本明細書で開示される方法のうちのいずれかにおける、1または複数のトランス遺伝子の挿入は、部位特異的であり得る。例えば、1または複数のトランス遺伝子は、プロモーターと隣接して、またはこの近傍に挿入することができる。別の例では、1または複数のトランス遺伝子は、遺伝子（例えば、PD-1遺伝子）のエクソンと隣接して、この近傍に、またはこの中に挿入することができる。このような挿入を使用して、トランス遺伝子（例えば、がん特異的TCRトランス遺伝子、またはがん遺伝子）をノックインしながら、同時に、別の遺伝子（例えば、PD-1遺伝子）を破壊することができる。別の例では、1または複数のトランス遺伝子は、遺伝子のイントロンと隣接して、この近傍に、またはこの中に挿入することができる。トランス遺伝子は、AAVウイルスベクターにより導入することができ、標的ゲノム位置へと組み込むことができる（図87）。場合によって、rAAVベクターを用いて、トランス遺伝子のある特定の位置へと直接挿入することができる。例えば、場合によって、トランス遺伝子を、rAAVによって、CTLA4、PD-1、AAVS1、またはCISH遺伝子の少なくとも一部へと組み込むことができる（図136A、図136B、図137A、および図137B）。

30

【0287】

細胞のターゲティングされた遺伝子座の修飾は、標的遺伝子座に対する相同性を有するDNAを、細胞へと導入することによりもたらし得る。DNAは、構築物の組み込みを含む細胞の選択を可能とするマーカー遺伝子を含み得る。標的ベクター内の相補的DNAは、標的遺伝子座において、染色体DNAを組み換えうる。マーカー遺伝子は、相補的DNA配列、3'側組換えアーム、および5'側組換えアームで挟むことができる。細胞内の複数の遺伝子座をターゲティングすることができる。例えば、複数のゲノムの修飾が、単一のステップで生じるように、1つまたは複数の標的遺伝子座に特異的な組換えアームを伴うトランス遺伝子を、一度に導入することができる。

40

【0288】

場合によって、特定のゲノム部位に対する組換えアームまたは相同性アームは、約0.2 kb～約5 kbの長さであり得る。組換えアームは、約0.2 kb、0.4 kb、0.

50

6 kb、0.8 kb、1.0 kb、1.2 kb、1.4 kb、1.6 kb、1.8 kb、2.0 kb、2.2 kb、2.4 kb、2.6 kb、2.8 kb、3.0 kb、3.2 kb、3.4 kb、3.6 kb、3.8 kb、4.0 kb、4.2 kb、4.4 kb、4.6 kb、4.8 kb～約5.0 kbの長さであり得る。

【0289】

様々な酵素が、外来DNAの、宿主ゲノムへの挿入を触媒し得る。例えば、部位特異的リコンビナーゼは、顕著に異なる生化学的特性を伴う、2つのタンパク質ファミリー、すなわちチロシンリコンビナーゼ（この場合、DNAを、チロシン残基へと共有結合的に接合させる）と、セリンリコンビナーゼ（この場合共有結合的接合は、セリン残基において生じる）とへとクラスター分けすることができる。場合によって、リコンビナーゼは、Cre、fC31インテグラーゼ（Streptomyces属ファージfC31に由来するセリンリコンビナーゼ）、またはバクテリオファージ由来の部位特異的リコンビナーゼ（Flp、ラムダインテグラーゼ、バクテリオファージHK022リコンビナーゼ、バクテリオファージR4インテグラーゼ、およびファージTP901-1インテグラーゼを含む）を含み得る。

10

【0290】

構築物内では、発現制御配列もまた使用することができる。例えば、発現制御配列は、多種多様な細胞型内で発現する、構成的プロモーターを含み得る。組織特異的プロモーターもまた、使用することができ、発現を、特異的細胞系統へと導くのに使用することができる。

20

【0291】

部位特異的遺伝子編集は、CRISPR、TALEN（米国特許第14／193,037号を参照されたい）、トランスポゾンベースのZEN、メガヌクレアーゼ、またはMega-TAL、またはトランスポゾンベースの系など、非ウイルス的遺伝子編集を使用して達成することができる。例えば、PiggyBacトランスポゾン系（Moriarty, B. S.ら、「Modular assembly of transposon integratable multigene vectors using RecWay assembly」、Nucleic Acids Research、(8号)：e92頁（2013年）を参照されたい）またはSleeping beautyトランスポゾン系（Aronovich, E. Lら、「The Sleeping Beauty transposon system: a non-viral vector for gene therapy」、Hum. Mol. Genet.、20巻（R1号）：R14～R20頁（2011年）を参照されたい）を使用することができる。

30

【0292】

部位特異的遺伝子編集はまた、相同組換えを伴わずに達成することもできる。外因性ポリ核酸は、相同組換えを使用せずに、細胞ゲノムへと導入することができる。場合によって、トランス遺伝子は、ゲノム内の標的二本鎖切断領域と相補的な操作部位で挟むことができる。トランス遺伝子は、ポリ核酸から切り出すことができるので、相同組換えを伴わずに、二本鎖切断領域に挿入することができる。

40

【0293】

場合によって、トランス遺伝子のゲノム組込みが望まれる場合、ヌクレアーゼがゲノムDNAを切断する部位におけるトランス遺伝子の組込みを容易にするために、外因性ヌクレアーゼまたは操作ヌクレアーゼを、トランス遺伝子を含むプラスミド、直線状ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチド、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターに加えて細胞へと導入することができる。細胞のゲノムへのトランス遺伝子の組込みは、トランス遺伝子の長期にわたる安定的な発現を可能にする。一部の態様では、ウイルスベクターを使用して、トランス遺伝子に作動可能に連結されたプロモーターを導入することができる。他の場合には、ウイルスベクターはプロモーターを含んでおらず、挿入されたトランス遺伝子を発現するために、内因性プロモーターを含む標的遺伝子座におけるトランス

50

遺伝子の挿入を必要とする。

【0294】

場合によって、ウイルスベクター（図138）は、標的ゲノム遺伝子座、例えば、PD-1および／またはCTLA-4および／またはAAVS1部位および／またはセーフハーバー部位へのトランス遺伝子の組込みを導く相同性アームを含む。場合によって、第1のヌクレアーゼは、抑制するために（例えば、遺伝子（例えば、PD-1および／またはCTLA-4および／またはAAVS1）の部分的または完全な抑制）、またはがん遺伝子、チェックポイント阻害遺伝子、もしくはがんなどの疾患もしくは状態に關与する遺伝子などの有害な遺伝子を無効にするために、特定のゲノム部位で切断するよう操作される。ヌクレアーゼによってそのようなゲノム遺伝子座において二本鎖切断が生成した後、非ウイルスまたはウイルスベクター（例えば、AAVウイルスベクター）は、ヌクレアーゼによって生成したDNA切断部位または二本鎖切断部位における、治療効果を有するトランス遺伝子または任意の外因性核酸配列の組込みを可能にするよう導入され得る。代替的に、トランス遺伝子を、AAVS1部位またはセーフハーバー遺伝子座などの所望の挿入部位と相補的な配列を含む相同性アームを使用する相同組換えを介した部位特異的挿入などの当技術分野で公知の方法を使用して、異なるゲノム部位に挿入することができる。場合によって、第2のヌクレアーゼが、第1のヌクレアーゼによるDNA切断部位とは異なる遺伝子座において、トランス遺伝子の部位特異的挿入を容易にするために提供され得る。場合によって、T細胞受容体などのトランス遺伝子を導入するための送達系として、AAVウイルスまたはAAVウイルスベクターを使用することができる。rAAVドナー上の相同性アームは、500塩基対～2000塩基対であり得る。例えば、rAAVドナー上の相同性アームは、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1000bp、1100bp、1200bp、1300bp、1400bp、1500bp、1600bp、1700bp、1800bp、1900bp、または最大2000bpの長さであり得る。相同性アームの長さは850bpであり得る。他の場合には、相同性アームの長さは1040bpであり得る。場合によって、相同性アームは、ドナーの正確な組込みを可能にするために拡張される。他の場合には、相同性アームは、ドナーの組込みを改善するために拡張される。場合によって、ドナーポリ核酸のサイズに関して妥協することなく相同性アームの長さを増大させるために、ドナーポリ核酸の、代替部分を排除することができる。場合によって、相同性アーム長の増大を可能にするためにポリAテールを低減することができる。

c. 目的のトランス遺伝子または核酸配列

【0295】

トランス遺伝子は、内因性遺伝子を、トランス遺伝子を伴わない場合より高レベルで発現させる、例えば、過剰発現させるために有用であり得る。加えて、トランス遺伝子を使用して、バックグラウンド、すなわち、トランス遺伝子をトランスフェクトされていない細胞より高レベルで、外因性遺伝子を発現させることができる。トランス遺伝子はまた、他の種類の遺伝子、例えば、ドミナントネガティブの遺伝子も包含し得る。

【0296】

トランス遺伝子の産物を産生するように、トランス遺伝子を生物、細胞、組織、または臓器へと入れることができる。ポリ核酸は、トランス遺伝子を含み得る。ポリ核酸は、外因性受容体をコードし得る（図57A、図57B、および図57C）。例えば、本明細書では、アデノシンA2a受容体、CD276、Vセットドメイン含有T細胞活性化インヒビター1、Bリンパ球およびTリンパ球関連、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4、インドールアミン2，3-ジオキシゲナーゼ1、キラー細胞免疫グロブリン様受容体、3ドメイン、長細胞質テール、1、リンパ球活性化遺伝子3、プログラム細胞死1、A型肝炎ウイルス細胞受容体2、T細胞活性化のVドメイン免疫グロブリンサブレッサー、またはナチュラルキラー細胞受容体2B4であるゲノム配列内のポリヌクレオチドと相補的な配列を有する、少なくとも2つの組換えアームで挟んだ、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）配列を含むポリ核酸が開示

される。1または複数のトランス遺伝子は、1または複数の破壊と組み合わせることができる。

【0297】

場合によって、トランス遺伝子（例えば、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子）または核酸（例えば、少なくとも1つの外因性核酸）は、非ウイルス組込みまたはウイルス組込みの方法を使用して、ゲノム遺伝子座および／または遺伝子（例えば、PD-1、AAVS1、またはCTLA-4）内の切断へと組み込むことができる。場合によって、ウイルス組込みは、AAV（例えばAAVベクターまたは修飾AAVベクター）を含む。場合によって、AAVベクターは、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を含む。場合によって、トランス遺伝子はがん遺伝子である。場合によって、細胞生存率は、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子（例えば、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子）を含むAAVベクターを細胞または細胞集団へと導入した後に測定される。場合によって、細胞生存率は、トランス遺伝子を、（例えば、ウイルス法または非ウイルス法によって）細胞集団の少なくとも1つの細胞のゲノム遺伝子座へと組み込んだ後に測定される。場合によって、細胞生存率は、蛍光活性化細胞分取（FACS）によって測定される。場合によって、細胞生存率は、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を含むウイルスベクターまたは非ウイルスベクターが細胞または細胞集団へと導入された後に測定される。場合によって、ウイルスベクター（例えば、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を含むAAVベクター）または非ウイルスベクター（例えば、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を含むミニサークルベクター）を細胞または細胞集団へと導入した後、細胞集団中の、少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8%、または100%の細胞、または最大でほぼこれらの比率の細胞、またはほぼこれらの比率の細胞が、生存可能である。場合によって、細胞生存率は、ウイルス（例えば、AAV）ベクターまたは非ウイルス（例えば、ミニサークル）ベクターを、細胞および／または細胞集団へと導入した後、約4時間、6時間、8時間、10時間、12時間、18時間、20時間、24時間、30時間、36時間、40時間、48時間、54時間、60時間、72時間、84時間、96時間、108時間、120時間、132時間、144時間、156時間、168時間、180時間、192時間、204時間、216時間、228時間、240時間、または240時間よりも長い期間、少なくともほぼこれらの期間、または最大でほぼこれらの期間で測定される。場合によって、細胞生存率は、ウイルス（例えば、AAV）ベクターまたは非ウイルス（例えば、ミニサークル）ベクターを、細胞および／または細胞集団へと導入した後、約1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、31日、45日、50日、60日、70日、90日、または90日より長い期間、少なくともほぼこれらの期間、または最大でほぼこれらの期間で測定される。場合によって、細胞生存率は、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を細胞集団中の少なくとも1つの細胞へと導入した後に測定される。場合によって、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターは、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を含む。場合によって、細胞生存率および／または細胞毒性は、非ウイルス法（例えばミニサークルベクター）を使用する場合と比較して、ウイルス法（例えば、AAVベクター）を使用して少なくとも1つの外因性トランス遺伝子が細胞および／または細胞集団へと組み込まれる場合、改善される。場合によって、細胞毒性は、フローサイトメトリーによって測定される。場合によって、細胞毒性は、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を含むウイルスベクターまたは非ウイルスベクターが細胞または細胞集団へと導入された後に測定される。場合によって、細胞毒性は、非ウイルスベクター（例えば、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を含むミニサークル）が導入される場合と比較して、ウイルスベクター（例えば、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子を含むAAVベクター）が細胞または細胞集

10

20

30

40

50

団へと導入される場合、少なくとも約 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、99.5 %、99.8 %、または 100 %、または最大でほぼこれらの比率、またはほぼこれらの比率だけ低減される。場合によって、細胞毒性は、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを細胞または細胞集団へと導入した後（例えば、細胞または細胞集団への、少なくとも 1 つの外因性トランス遺伝子を含む AAV ベクターの導入後、または少なくとも 1 つの外因性トランス遺伝子を含むミニサークルベクターの導入後）、約 4 時間、6 時間、8 時間、12 時間、18 時間、24 時間、30 時間、36 時間、42 時間、48 時間、54 時間、60 時間、66 時間、72 時間、78 時間、84 時間、90 時間、96 時間、102 時間、108 時間、114 時間、120 時間、126 時間、132 時間、138 時間、144 時間、150 時間、156 時間、168 時間、180 時間、192 時間、204 時間、216 時間、228 時間、240 時間、または 240 時間よりも長い期間、少なくともほぼこれらの期間、または最大でほぼこれらの期間で測定される。場合によって、細胞毒性は、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを、細胞または細胞集団へと導入した後（例えば、細胞または細胞集団への、少なくとも 1 つの外因性トランス遺伝子を含む AAV ベクターの導入後、または少なくとも 1 つの外因性トランス遺伝子を含むミニサークルベクターの導入後）、約 1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、6 日、7 日、8 日、9 日、10 日、11 日、12 日、13 日、14 日、15 日、16 日、17 日、18 日、19 日、20 日、21 日、22 日、23 日、24 日、25 日、26 日、27 日、28 日、29 日、30 日、31 日、45 日、50 日、60 日、70 日、90 日、または 90 日よりも長い期間、少なくともほぼこれらの期間、または最大でほぼこれらの期間で測定される。場合によって、細胞毒性は、少なくとも 1 つの外因性トランス遺伝子が細胞集団の少なくとも 1 つの細胞へと組み込まれた後に測定される。

【0298】

場合によって、トランス遺伝子は、ランダム挿入または部位特異的挿入を使用して、細胞のゲノム（例えば、T 細胞）へと挿入することができる。場合によって、挿入はウイルス挿入を介し得る。場合によって、トランス遺伝子のウイルス挿入は、特定のゲノム部位へとターゲティングすることができ、他の場合には、トランス遺伝子のウイルス挿入は、ゲノム部位へのランダム挿入であり得る。場合によって、トランス遺伝子は、細胞のゲノムへと 1 回挿入される。場合によって、トランス遺伝子は、ゲノムの遺伝子座へとランダムに挿入される。場合によって、トランス遺伝子は、ゲノムの 1 を超える遺伝子座へとランダムに挿入される。場合によって、トランス遺伝子は、遺伝子（例えば、PD-1、CTLA-4、および／または AAVS1）に挿入される。場合によって、トランス遺伝子は、遺伝子（例えば、PD-1、CTLA-4、および／または AAVS1）内の切断に挿入される。場合によって、1 つを超えるトランス遺伝子は、細胞のゲノムへと挿入される。場合によって、1 つを超えるトランス遺伝子は、ゲノムの 1 または複数の遺伝子座へと挿入される。場合によって、トランス遺伝子は、少なくとも 1 つの遺伝子内に挿入される。場合によって、トランス遺伝子は、2 つまたはそれを超える遺伝子（例えば、PD-1、CTLA-4、および／または AAVS1）に挿入される。場合によって、トランス遺伝子または少なくとも 1 つのトランス遺伝子は、細胞のゲノムへと、ランダムおよび／または特異的に挿入される。場合によって、トランス遺伝子は外因性トランス遺伝子である。場合によって、トランス遺伝子はがん遺伝子である。場合によって、トランス遺伝子は、遺伝子（例えば、PD-1、CTLA-4、および／または AAVS1）の少なくとも一部と相補的な操作部位で挟まれる。場合によって、トランス遺伝子は、遺伝子（例えば、PD-1、CTLA-4、および／または AAVS1）内の切断と相補的な操作部位で挟まれる。場合によって、トランス遺伝子は、遺伝子内に挿入されない（例えば、PD-1、CTLA-4、および／または AAVS1 遺伝子内に挿入されない）。場合によって、トランス遺伝子は、遺伝子内の切断（例えば、PD-1、CTLA-4、および／または AAVS1 内の切断）に挿入されない。場合によって、トランス遺伝子は、ゲノム遺

伝子座内の切断と相補的な操作部位で挟まれる。

【0299】

場合によって、トランス遺伝子は、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子である。場合によって、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子または少なくとも1つの外因性核酸は、アデノシンA2a受容体(ADORA)、CD276、Vセットドメイン含有T細胞活性化インヒビター1(VTCN1)、Bリンパ球およびTリンパ球関連(BTLA)、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ1(IDO1)、KIR3DL1(キラー細胞免疫グロブリン様受容体、3ドメイン、長細胞質テール、1)、リンパ球活性化遺伝子3(LAG3)、A型肝炎ウイルス細胞受容体2(HAVCR2)、VISTA(T細胞活性化のVドメイン免疫グロブリンサプレッサー)、ナチュラルキラー細胞受容体2B4(CD244)、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ1(HPR1)、アデノ随伴ウイルス組込み部位1(AAVS1)、またはケモカイン(C-Cモチーフ)受容体5(遺伝子/偽遺伝子)(CCR5)、CD160分子(CD160)、TIGIT(IgおよびITIMドメインを有するT細胞免疫受容体)、CD96分子(CD96)、CRTAM(細胞傷害性および制御性T細胞分子)、白血球関連免疫グロブリン様受容体1(LAIR1)、シアル酸結合Ig様レクチン7(SIGLEC7)、シアル酸結合Ig様レクチン9(SIGLEC9)、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー10b(TNFRSF10B)、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー10a(TNFRSF10A)、カスパーゼ8(CASP8)、カスパーゼ10(CASP10)、カスパーゼ3(CASP3)、カスパーゼ6(CASP6)、カスパーゼ7(CASP7)、FADD(Fas関連細胞死ドメイン)、Fas細胞表面細胞死受容体(FAS)、形質転換増殖因子ベータ受容体II(TGFBRII)、形質転換増殖因子ベータ受容体I(TGFBRI)、SMADファミリーメンバー2(SMAD2)、SMADファミリーメンバー3(SMAD3)、SMADファミリーメンバー4(SMAD4)、SKIがん原遺伝子(SKI)、SKI様がん原遺伝子(SKIL)、TGIF1(TGFB誘導因子ホメオボックス1)、プログラム細胞死1(PD-1)、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4(CTLA4)、インターロイキン10受容体サブユニットアルファ(IL10RA)、インターロイキン10受容体サブユニットベータ(IL10RB)、HMOX2(ヘムオキシゲナーゼ2)、インターロイキン6受容体(IL6R)、IL6ST(インターロイキン6シグナル伝達因子)、c-srcチロシンキナーゼ(CSK)、PAG1(グリコスフィンゴ脂質ミクロドメインにより膜アンカーされるリンタンパク質1)、SIT1(シグナル閾値調節膜貫通アダプター1)、FOXP3(フォークヘッドボックスP3)、PRドメイン1(PRDM1)、BATF(塩基性ロイシンジッパー転写因子、ATF様)、可溶性グアニル酸シクラーゼ1アルファ2(GUCY1A2)、可溶性グアニル酸シクラーゼ1アルファ3(GUCY1A3)、可溶性グアニル酸シクラーゼ1ベータ2(GUCY1B2)、タンパク質のプロリルヒドロキシラーゼドメイン(PHD1、PHD2、PHD3)ファミリー、または可溶性グアニル酸シクラーゼ1ベータ3(GUCY1B3)、T細胞受容体アルファ遺伝子座(TRA)、T細胞受容体ベータ遺伝子座(TRB)、egl-9ファミリーの低酸素症誘導性因子1(EGLN1)、egl-9ファミリーの低酸素症誘導性因子2(EGLN2)、egl-9ファミリーの低酸素症誘導性因子3(EGLN3)、PPP1R12C(タンパク質ホスファターゼ1調節サブユニット12C)、およびこれらの任意の組合せまたは誘導体からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子または少なくとも1つのゲノム遺伝子座内に特異的またはランダムに挿入される。

【0300】

T細胞受容体(TCR)

T細胞は、1または複数のトランス遺伝子を含み得る。1または複数のトランス遺伝子は、抗原上の少なくとも1つのエピトープ(例えば、がんエピトープ)を認識し、これらに結合するか、または抗原上の変異エピトープに結合する、TCRアルファ鎖タンパク質、TCRベータ鎖タンパク質、TCRガンマ鎖タンパク質、および/またはTCRデルタ

鎖タンパク質を発現させうる。TCRは、がんネオ抗原に結合し得る。TCRは、図22および図26に示される通り、機能的TCRであり得る。TCRは、本明細書で規定されるアルファ鎖配列またはベータ鎖配列（例えば、それぞれ、さらなるアルファ鎖またはベータ鎖と組み合わせた）のうちの1つだけを含む場合もあり、両方の鎖を含む場合もある。TCRは、本明細書で規定されるガンマ鎖配列またはデルタ鎖配列（例えば、それぞれ、さらなるガンマ鎖またはデルタ鎖と組み合わせた）のうちの1つだけを含む場合もあり、両方の鎖を含む場合もある。機能的TCRは、融合タンパク質内の、少なくとも実質的な生体活性を維持する。TCRのアルファ鎖および／またはベータ鎖の場合、これは、両方の鎖が、その生物学的機能、特に、TCRの特異的ペプチド-MHC複合体への結合、および／またはペプチド活性化における機能的シグナル伝達を果たす、T細胞受容体を形成する（非修飾アルファ鎖および／もしくはベータ鎖と共に、または別の融合タンパク質のアルファ鎖および／もしくはベータ鎖と共に）ことがなおも可能であることを意味する。TCRのガンマ鎖および／またはデルタ鎖の場合、これは、両方の鎖が、その生物学的機能、特に、TCRの特異的ペプチド-MHC複合体への結合、および／またはペプチド活性化における機能的シグナル伝達を果たす、T細胞受容体を形成する（非修飾ガンマ鎖および／もしくはデルタ鎖と共に、または別の融合タンパク質のガンマ鎖および／もしくはデルタ鎖と共に）ことがなおも可能であることを意味する。T細胞はまた、1または複数のTCRも含み得る。T細胞はまた、1つを超える標的に特異的な、単一のTCRも含み得る。

10

【0301】

20

TCRは、様々な方法を使用して同定することができる。場合によって、TCRは、全エクソームシーケンシングを使用して同定することができる。例えば、TCRは、全エクソームシーケンシングにより同定されたE805G変異を含有する、ERBB2IP (Erbb2 interacting protein) 抗原をターゲティングし得る。代替的に、TCRは、自家レパトリーから同定することもでき、同種レパトリーから同定することもでき、異種レパトリーから同定することもできる。自家および同種の同定は、マルチステップの工程を伴いうる。自家および同種のいずれの同定においても、CD14で選択した単球から、樹状細胞(DC)を作製し、成熟の後、特異的ペプチドでパルスするか、またはこれをトランスフェクトすることができる。ペプチドでパルスしたDCを使用して、自家T細胞または同種T細胞を刺激することができる。限界希釈法により、単一細胞のペプチド特異的T細胞クローンを、これらのペプチドでパルスしたT細胞株から単離することができる。目的のTCRを、同定および単離することができる。目的のTCRのα鎖およびβ鎖は、クローニングし、コドン最適化し、ベクターまたはトランス遺伝子へとコードすることができる。TCRの一部は、置き換えることができる。例えば、ヒトTCRの定常領域は、対応するマウス領域で置き換えることができる。ヒト定常領域の、対応するマウス領域による置換を実施して、TCRの安定性を増大させることができる。TCRはまた、ex vivoにおいて、高アビディティーまたは超生理学的アビディティーで同定することもできる。

30

【0302】

腫瘍特異的TCRの作製に成功するには、適切な標的配列を同定すべきである。配列は、希少な腫瘍反応性T細胞の単離により見出すこともでき、これが可能でない場合、代替的な技術を利用して、高活性の抗腫瘍T細胞抗原を作製することもできる。1つの手法は、ヒト白血球抗原(HLA)系を発現するトランスジェニックマウスを、ヒト腫瘍タンパク質で免疫化して、ヒト抗原に対するTCRを発現するT細胞を作製するステップを伴いうる（例えば、Stanislawskiら、「Circumventing tolerance to a human MDM2-derived tumor antigen by TCR gene transfer」、Nature Immunology 2巻、962～970頁（2001年）を参照されたい）。代替的な手法は、腫瘍特異的T細胞を、腫瘍の寛解を経つつある患者から単離し、反応性のTCR配列を、疾患は共有するが、非応答性であり得る、別の患者に由来するT細胞へと移入し得る、同種

40

50

TCR遺伝子移入であり得る (de Witte, M. A. ら、「Targeting self-antigens through allogeneic TCR gene transfer」、Blood、108巻、870～877頁(2006年))。最後に、in vitro技術を利用して、TCRの配列を変更し、反応性の弱い腫瘍特異的TCRの、標的抗原との相互作用(アビディティ)の強度を増大させることにより、それらの腫瘍殺滅活性を増強することができる (Schmid, D. A. ら、「Evidence for a TCR affinity threshold delimiting maximal CD8 T cell function」、J. Immunol.、184巻、4936～4946頁(2010年))。代替的に、TCRは、全エクソームシーケンシングを使用して同定することができる。

10

【0303】

本機能的TCR融合タンパク質は、MHCにより提示されたエピトープに対しするものとしてすることができる。MHCは、クラスI分子、例えば、HLA-Aであり得る。MHCは、クラスII分子であり得る。本機能的TCR融合タンパク質はまた、抗原をターゲティングするために、ペプチドベースの機能またはペプチドにガイドされる機能も有し得る。本機能的TCRは、連結することができ、例えば、本機能的TCRは、2A配列と連結することができる。本機能的TCRはまた、図26に示される通り、フリナーV5-SGSGF2Aと連結することもできる。本機能的TCRはまた、哺乳動物性構成要素も含有し得る。例えば、本機能的TCRは、マウス定常領域を含有し得る。本機能的TCRはまた、場合によって、ヒト定常領域も含有し得る。ペプチドにガイドされる機能は、原理的に、ペプチド配列を、TCRへと導入し、これらのペプチド配列により、腫瘍をターゲティングすることにより達成することができる。これらのペプチドは、ファージディスプレイライブラリーまたは合成ペプチドライブラリーに由来し得る (例えば、Arap, W. ら、「Cancer Treatment by Targeted Drug Delivery to Tumor Vasculature in a Mouse Model」、Science、279巻、377～380頁(1998年); Scott, C. P. ら、「Structural requirements for the biosynthesis of backbone cyclic peptide libraries」、8巻: 801～815頁(2001年)を参照されたい)。とりわけ、乳癌、前立腺癌、および結腸癌に特異的なペプチドのほか、血管新生に特異的なペプチドも、既に単離に成功しており、本開示で使用するすることができる (Samoylova, T. I. ら、「Peptide Phage Display: Opportunities for Development of Personalized Anti-Cancer Strategies」、Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry、6巻(1号): 9～17頁(2006年9月))。本機能的TCR融合タンパク質は、変異させたがんエピトープまたは変異させたがん抗原に対するものとしてすることができる。

20

30

【0304】

使用することが可能であり、具体的に想定されるトランス遺伝子は、本明細書で開示される遺伝子、例えば、TCR遺伝子に対する、一定の同一性および／または相同性を呈する遺伝子を含み得る。したがって、遺伝子は、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性、または少なくともほぼこれらの比率の相同性(核酸レベルまたはタンパク質レベルで)を呈する場合、トランス遺伝子として使用し得ることが想定される。また、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性、または少なくともほぼこれらの比率の同一性(核酸レベルまたはタンパク質レベルで)を呈する遺伝子は、トランス遺伝子として使用し得

40

50

ることも想定される。場合によって、トランス遺伝子は、機能的であり得る。

【0305】

トランス遺伝子は、細胞へと組み込むことができる。例えば、トランス遺伝子は、生物の生殖細胞系列へと組み込むことができる。細胞へと挿入されると、トランス遺伝子は、メッセンジャーRNA (mRNA) のコピーである、相補的DNA (cDNA) セグメントの場合もあり、ゲノムDNA (イントロンを伴うかまたは伴わない) の、その元の領域内に存在する遺伝子自体の場合もある。Xタンパク質のトランス遺伝子とは、Xタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むトランス遺伝子を指す場合がある。場合によって、本明細書で使用される、Xタンパク質をコードするトランス遺伝子は、Xタンパク質のアミノ酸配列の100%または約100%をコードするトランス遺伝子であり得る。他の場合には、Xタンパク質をコードするトランス遺伝子は、Xタンパク質のアミノ酸配列のうちの、少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、もしくは1%、または少なくともほぼこれらの比率のアミノ酸配列をコードするトランス遺伝子であり得る。トランス遺伝子の発現は最終的に、機能的タンパク質、例えば、部分的に、完全に、または過剰に機能的なタンパク質を結果としてもたらし得る。上記で論じた通り、部分配列を発現させる場合、最終結果は、非機能的タンパク質またはドミナントネガティブのタンパク質であり得る。非機能的タンパク質またはドミナントネガティブのタンパク質はまた、機能的 (内因性または外因性) タンパク質と競合する場合もある。トランス遺伝子はまた、RNA (例えば、mRNA、shRNA、siRNA、またはマイクロRNA) もコードし得る。場合によって、トランス遺伝子が、mRNAをコードする場合、これを、ポリペプチド (例えば、タンパク質) へと翻訳することができる。したがって、トランス遺伝子は、タンパク質をコードし得ることが想定される。場合によって、トランス遺伝子は、タンパク質をコードする場合もあり、タンパク質の部分をコードする場合もある。加えて、タンパク質は、野生型ポリペプチドと比較して、1または複数の変異 (例えば、欠失、挿入、アミノ酸の置換、または再配列) を有し得る。タンパク質は、天然ポリペプチドの場合もあり、人工ポリペプチド (例えば、組換えポリペプチド) の場合もある。トランス遺伝子は、2つまたはそれよりも多いポリペプチドにより形成される融合タンパク質をコードし得る。T細胞は、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、もしくはそれよりも多いトランス遺伝子を含むか、またはほぼこれらの数のトランス遺伝子を含み得る。例えば、T細胞は、TCR遺伝子を含む、1または複数のトランス遺伝子を含み得る。

【0306】

トランス遺伝子 (例えば、TCR遺伝子またはがん遺伝子) は、セーフハーバー遺伝子座内に挿入することができる。セーフハーバーは、トランス遺伝子が、内因性活性を攪乱されずに、組み込まれ、機能し得る、ゲノム位置を含み得る。例えば、1または複数のトランス遺伝子を、HPRT、AAVS部位 (例えば、AAVS1、AAVS2など)、CCR5、hROSA26のうちのいずれか1つ、および/またはこれらの任意の組合せへと挿入することができる。トランス遺伝子 (例えば、TCR遺伝子) を、内因性免疫チェックポイント遺伝子内に挿入することもできる。内因性免疫チェックポイント遺伝子は、刺激性チェックポイント遺伝子または阻害性チェックポイント遺伝子であり得る。トランス遺伝子 (例えば、TCR遺伝子またはがん遺伝子) を、CD27、CD40、CD122、OX40、GITR、CD137、CD28、またはICOSなどの刺激性チェックポイント遺伝子内に挿入することもできる。免疫チェックポイント遺伝子の位置は、Genome Reference Consortium Human Build 38 patch release 2 (GRCh38, p2) アセンブリーを使用して提供される。トランス遺伝子 (例えば、TCR遺伝子またはがん遺伝子) は、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、VISTAまたはCISHなどの内因性阻害性チェックポイント遺伝子内に

挿入することもできる。例えば、1または複数のトランス遺伝子は、CD27、CD40、CD122、OX40、GITR、CD137、CD28、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、VISTA、HPRT、AAVS部位（例えば、AAVS1、AAVS2など）、PHD1、PHD2、PHD3、CCR5、CISH、PPP1R12Cのうちのいずれか1つ、および／またはこれらの任意の組合せへと挿入することができる。トランス遺伝子は、内因性TCR遺伝子内に挿入することができる。トランス遺伝子は、コードゲノム領域内に挿入することができる。トランス遺伝子はまた、非コードゲノム領域内に挿入することもできる。トランス遺伝子は、相同組換えを伴わずに、ゲノムへと挿入することができる。トランス遺伝子の挿入は、細胞内ゲノム移植のステップを含み得る。トランス遺伝子は、PD-1遺伝子に挿入することができる（図46Aおよび図46B）。場合によって、1つを超えるガイドは、免疫チェックポイントをターゲティングし得る（図47）。他の場合には、トランス遺伝子は、CTLA-4遺伝子に組み込むことができる（図48および図50）。他の場合には、トランス遺伝子は、CTLA-4遺伝子およびPD-1遺伝子に組み込むことができる（図49）。トランス遺伝子はまた、AAVS1などのセーフハーバーへと組み込むこともできる（図96および図97）。トランス遺伝子は、AAV組込み部位へと挿入することができる。場合によって、AAV組込み部位は、セーフハーバーであり得る。第5染色体上のAAVS2または第3染色体上のAAVS3など、代替的なAAV組込み部位も存在し得る。AAVS2、AAVS3、AAVS4、AAVS5、AAVS6、AAVS7、AAVS8など、さらなるAAV組込み部位もまた、TCRまたはがん遺伝子などの外因性受容体のための、可能な組込み部位と考えられる。本明細書で使用されるAAVSとは、AAVS1ならびに類縁のアデノ随伴ウイルス（AAVS）組込み部位を指す場合がある。

【0307】

キメラ抗原受容体は、細胞外抗原認識ドメイン、膜貫通ドメイン、およびT細胞の活性化を制御するシグナル伝達領域から構成され得る。細胞外抗原認識ドメインは、マウスモノクローナル抗体に由来する場合もあり、ヒト化モノクローナル抗体に由来する場合もあり、完全ヒトモノクローナル抗体に由来する場合もある。具体的には、細胞外抗原認識ドメインは、モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖の可変領域であって、一本鎖可変断片（scFv）の形態でクローニングされ、ヒンジドメインおよび膜貫通ドメインを介して、T細胞受容体（TCR）複合体の細胞内シグナル伝達分子および少なくとも1つの共刺激性分子へと結合した可変領域からなる。場合によって、共刺激性ドメインは使用しない。

【0308】

本開示のCARは、真核細胞、例えば、哺乳動物細胞の細胞膜内に存在することが可能であり、この場合、適する哺乳動物細胞は、細胞傷害性細胞、Tリンパ球、幹細胞、幹細胞の子孫細胞、前駆細胞、前駆細胞の子孫細胞、およびNK細胞を含むがこれらに限定されない。真核細胞の細胞膜内に存在する場合、CARは、それが結合する標的の存在下で活性であり得る。標的は、膜上で発現し得る。標的はまた、可溶性でもあり得る（例えば、細胞に結合していない場合もある）。標的は、標的細胞など、細胞の表面上に存在し得る。標的は、脂質二重層など、固体表面上に提示することができる。標的は、可溶性抗原など、可溶性であり得る。標的は、抗原であり得る。抗原は、標的細胞など、細胞の表面上に存在し得る。抗原は、脂質二重層など、固体表面上に提示することができる。場合によって、標的は、抗原のエピトープであり得る。場合によって、標的は、がんネオ抗原であり得る。

近年におけるいくつかの進歩は、場合によって、抗腫瘍T細胞応答を誘発する、腫瘍特異的変異の同定に焦点を当てている。例えば、これらの内因性変異は、全エクソームシーケンシング法を使用して同定することができる（Tranら、「Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer」、Science、344巻：641～644頁（2014年））。

したがって、CARは、腫瘍特異的ネオ抗原を標的とするscFvから構成され得る。

【0309】

方法は、*in vitro*アッセイ（例えば、全エクソームシーケンシング）を使用して、がん患者から得られた試料に由来する、がん関連標的配列を同定し得る。方法はさらに、標的配列を認識する第1のT細胞に由来するトランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）も同定し得る。がん関連標的配列およびトランス遺伝子（例えば、TCRトランス遺伝子またはがん遺伝子）は、同一の患者の試料から得ることもでき、異なる患者の試料から得ることもできる。がん関連標的配列は、CARトランス遺伝子上でコードされて、CARを、標的配列に特異的とし得る。方法は、CARトランス遺伝子を含む核酸を、T細胞の膜を越えて、効率的に送達し得る。場合によって、第1のT細胞と、第2のT細胞とは、同一の患者から得ることができる。他の場合には、第1のT細胞と、第2のT細胞とは、異なる患者から得ることができる。他の場合には、第1のT細胞と、第2のT細胞とは、異なる患者から得ることができる。方法は、操作T細胞を作製するように、非ウイルス性組込み系またはウイルス性組込み系を使用して、CARトランス遺伝子を、安全かつ効率的に、T細胞のゲノムへと組み込むことが可能であり、したがって、CARトランス遺伝子を、操作T細胞内で、確実に発現させることができる。

10

【0310】

T細胞は、1または複数の遺伝子の破壊、および1または複数のトランス遺伝子を含み得る。例えば、それらの発現が破壊される、1または複数の遺伝子は、CD27、CD40、CD122、OX40、GITR、CD137、CD28、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、PHD1、PHD2、PHD3、VISTA、CISH、PPP1R12Cのうちのいずれか1つ、および／またはこれらの任意の組合せを含み得る。例えば、様々な組合せを例示するためだけに述べると、それらの発現が破壊される、1または複数の遺伝子は、PD-1を含むことが可能であり、1または複数のトランス遺伝子は、TCRおよび／またはがん遺伝子を含む。別の例では、それらの発現が破壊される、1または複数の遺伝子はまた、CTLA-4も含むことが可能であり、1または複数のトランス遺伝子は、TCRおよび／またはがん遺伝子を含む。破壊は、破壊された遺伝子またはその一部のゲノム転写物のコピー数の低減をもたらし得る。例えば、破壊され得る遺伝子は、破壊されていない細胞内の同一の遺伝子と比較して、転写物の量が低減している場合がある。破壊は、145コピー／ μ L、140コピー／ μ L、135コピー／ μ L、130コピー／ μ L、125コピー／ μ L、120コピー／ μ L、115コピー／ μ L、110コピー／ μ L、105コピー／ μ L、100コピー／ μ L、95コピー／ μ L、190コピー／ μ L、185コピー／ μ L、80コピー／ μ L、75コピー／ μ L、70コピー／ μ L、65コピー／ μ L、60コピー／ μ L、55コピー／ μ L、50コピー／ μ L、45コピー／ μ L、40コピー／ μ L、35コピー／ μ L、30コピー／ μ L、25コピー／ μ L、20コピー／ μ L、15コピー／ μ L、10コピー／ μ L、5コピー／ μ L、1コピー／ μ L、または0.05コピー／ μ L未満の破壊の結果をもたらし得る。場合によって、破壊は、100コピー／ μ L未満をもたらし得る。

20

30

【0311】

T細胞は、1または複数の遺伝子の抑制、および1または複数のトランス遺伝子を含み得る。例えば、それらの発現が抑制される、1または複数の遺伝子は、CD27、CD40、CD122、OX40、GITR、CD137、CD28、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、PHD1、PHD2、PHD3、VISTA、CISH、PPP1R12Cのうちのいずれか1つ、および／またはこれらの任意の組合せを含み得る。例えば、様々な組合せを例示するためだけに述べると、それらの発現が抑制される、1または複数の遺伝子は、PD-1を含むことが可能であり、1または複数のトランス遺伝子は、TCRおよび／またはがん遺伝子を含む。別の例では、それらの発現が抑制される、1または複数の遺伝子はまた、CTLA-4も含むことが可能であり、1または複数のトランス遺伝

40

50

子は、T C Rおよび／またはがん遺伝子を含む。

【0312】

T細胞はまた、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、もしくはそれよりも多いドミナントネガティブのトランス遺伝子も含み得るか、または、ほぼこれらの数のドミナントネガティブのトランス遺伝子も含み得る。ドミナントネガティブのトランス遺伝子の発現は、ドミナントネガティブのトランス遺伝子の野生型対応物の発現および／または機能を抑制し得る。したがって、例えば、ドミナントネガティブのトランス遺伝子Xを含むT細胞は、その発現が抑制されるX遺伝子を含む、異なるT細胞と比較して、類似の表現型を有する。1または複数のドミナントネガティブのトランス遺伝子は、ドミナントネガティブのC D 2 7、ドミナントネガティブのC D 4 0、ドミナントネガティブのC D 1 2 2、ドミナントネガティブのO X 4 0、ドミナントネガティブのG I T R、ドミナントネガティブのC D 1 3 7、ドミナントネガティブのC D 2 8、ドミナントネガティブのI C O S、ドミナントネガティブのA 2 A R、ドミナントネガティブのB 7-H 3、ドミナントネガティブのB 7-H 4、ドミナントネガティブのB T L A、ドミナントネガティブのC T L A-4、ドミナントネガティブのI D O、ドミナントネガティブのK I R、ドミナントネガティブのL A G 3、ドミナントネガティブのP D-1、ドミナントネガティブのT I M-3、ドミナントネガティブのV I S T A、ドミナントネガティブのP H D 1、ドミナントネガティブのP H D 2、ドミナントネガティブのP H D 3、ドミナントネガティブのC I S H、ドミナントネガティブのC C R 5、ドミナントネガティブのH P R T、ドミナントネガティブのA A V S部位（例えば、A A V S 1、A A V S 2など）、ドミナントネガティブのP P P 1 R 1 2 C、またはこれらの任意の組合せであり得る。

【0313】

また、遺伝子発現を抑制し得る、例えば、遺伝子をノックダウンし得る、1または複数の核酸をコードする、1または複数のトランス遺伝子を含むT細胞も提示される。遺伝子発現を抑制するRNAは、s h RNA、s i RNA、RNA i、およびマイクロRNAを含むがこれらに限定されない。例えば、s i RNA、RNA i、および／またはマイクロRNAを、T細胞へと送達して、遺伝子発現を抑制することができる。さらに、T細胞は、s h RNAをコードする、1または複数のトランス遺伝子も含み得る。s h RNAは、特定の遺伝子に特異的であり得る。例えば、s h RNAは、本出願で記載される任意の遺伝子であって、C D 2 7、C D 4 0、C D 1 2 2、O X 4 0、G I T R、C D 1 3 7、C D 2 8、I C O S、A 2 A R、B 7-H 3、B 7-H 4、B T L A、C T L A-4、I D O、K I R、L A G 3、P D-1、T I M-3、V I S T A、H P R T、A A V S部位（例えば、A A V S 1、A A V S 2など）、P H D 1、P H D 2、P H D 3、C C R 5、C I S H、P P P 1 R 1 2 C、および／またはこれらの任意の組合せを含むがこれらに限定されない遺伝子に特異的であり得る。

【0314】

1または複数のトランス遺伝子は、異なる種に由来し得る。例えば、1または複数のトランス遺伝子は、ヒト遺伝子、マウス遺伝子、ラット遺伝子、ブタ遺伝子、ウシ遺伝子、イヌ遺伝子、ネコ遺伝子、サル遺伝子、チンパンジー遺伝子、またはこれらの任意の組合せを含み得る。例えば、トランス遺伝子は、ヒト遺伝子の配列を有するヒトに由来し得る。1または複数のトランス遺伝子は、ヒト遺伝子を含み得る。場合によって、1または複数のトランス遺伝子は、アデノウイルス遺伝子ではない。

【0315】

トランス遺伝子は、上記で記載した通り、T細胞のゲノムへと、ランダムに挿入することもでき、部位特異的に挿入することもできる。例えば、トランス遺伝子は、T細胞のゲノム内のランダムな遺伝子座へと挿入することができる。これらのトランス遺伝子は、機能的、例えば、ゲノム内のいずれの場所に挿入されても完全に機能的であり得る。例えば、トランス遺伝子は、それ自体のプロモーターをコードする場合もあり、内因性プロモーターの制御下にある位置へと挿入される場合もある。代替的に、トランス遺伝子は、遺伝

子のイントロンもしくは遺伝子のエクソン、プロモーター、または非コード領域などの遺伝子へと挿入することができる。トランス遺伝子は、挿入が、遺伝子、例えば、内因性チェックポイントを破壊するように挿入することができる。トランス遺伝子の挿入は、内因性チェックポイント領域を含み得る。トランス遺伝子の挿入は、トランス遺伝子を挟みうる組換えアームでガイドすることができる。

【0316】

ある場合には、トランス遺伝子の1つを超えるコピーを、ゲノム内の、1つを超えるランダムな遺伝子座へと挿入することができる。例えば、複数のコピーを、ゲノム内のランダムな遺伝子座へと挿入することができる。これは、トランス遺伝子を、ランダムに、1回挿入する場合と比較した、全発現の増大をもたらし得る。代替的に、トランス遺伝子の10
コピーを、ある遺伝子へと挿入し、トランス遺伝子の別のコピーを、異なる遺伝子へと挿入することもできる。トランス遺伝子は、T細胞のゲノム内の特異的遺伝子座へと挿入され得るようにターゲティングすることができる。

【0317】

トランス遺伝子の発現は、1または複数のプロモーターにより制御することができる。プロモーターは、遍在性プロモーター、構成的プロモーター（関連遺伝子の連続的転写を可能とする非調節性プロモーター）、組織特異的プロモーター、または誘導性プロモーターであり得る。プロモーターと隣接して、またはこの近傍に挿入されるトランス遺伝子の20
発現は、調節することができる。例えば、トランス遺伝子は、遍在性プロモーターの近傍に、またはこの隣に挿入することができる。一部の遍在性プロモーターは、CAGGSプロモーター、hCMVプロモーター、PGKプロモーター、SV40プロモーター、またはROSA26プロモーターであり得る。

【0318】

プロモーターは、内因性プロモーターの場合もあり、外因性プロモーターの場合もある。例えば、1または複数のトランス遺伝子は、内因性または外因性のROSA26プロモーターと隣接して、またはこれらの近傍に挿入することができる。さらに、プロモーターは、T細胞に特異的であり得る。例えば、1または複数のトランス遺伝子は、ブタROSA26プロモーターと隣接して、またはこれらの近傍に挿入することができる。

【0319】

組織特異的プロモーターまたは細胞特異的プロモーターを使用して、発現の位置を制御30
することができる。例えば、1または複数のトランス遺伝子は、組織特異的プロモーターと隣接して、またはこれらの近傍に挿入することができる。組織特異的プロモーターは、FABPプロモーター、Lckプロモーター、CamKIIプロモーター、CD19プロモーター、ケラチンプロモーター、アルブミンプロモーター、aP2プロモーター、インスリンプロモーター、MCKプロモーター、MyHCプロモーター、WAPプロモーター、またはCol2Aプロモーターであり得る。

【0320】

組織特異的プロモーターまたは細胞特異的プロモーターを使用して、発現の位置を制御40
することができる。例えば、1または複数のトランス遺伝子は、組織特異的プロモーターと隣接して、またはこれらの近傍に挿入することができる。組織特異的プロモーターは、FABPプロモーター、Lckプロモーター、CamKIIプロモーター、CD19プロモーター、ケラチンプロモーター、アルブミンプロモーター、aP2プロモーター、インスリンプロモーター、MCKプロモーター、MyHCプロモーター、WAPプロモーター、またはCol2Aプロモーターであり得る。

【0321】

誘導性プロモーターも同様に、使用することができる。これらの誘導性プロモーターは、所望の場合、誘導剤を添加または除去することにより、オンにすることもでき、オフにすることもできる。誘導性プロモーターは、Lac、tac、trc、trp、araBAD、phoA、recA、proU、cst-1、tetA、cadA、nar、PL、cspA、T7、VHB、Mx、および／またはTrexであり得るがこれらに限定さ50

れないことが想定される。

【0322】

細胞は、内因性遺伝子をノックアウトするように操作することができる。ノックアウトされ得る内因性遺伝子は、免疫チェックポイント遺伝子を含み得る。免疫チェックポイント遺伝子は、刺激性チェックポイント遺伝子の場合もあり、阻害性チェックポイント遺伝子の場合もある。免疫チェックポイント遺伝子の位置は、Genome Reference Consortium Human Build 38 patch release 2 (GRCh38. p2) アセンブリーを使用して提示することができる。

【0323】

ノックアウトされる遺伝子は、データベースを使用して選択することができる。場合によって、ある特定の内因性遺伝子は、ゲノム操作により適する。データベースは、エピジェネティクスにより許容性の標的部位を含み得る。データベースは、場合によって、ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) (<http://www.genome.gov/10005107>) であり得る。データベースは、ゲノム操作の許容性がより大きい可能性がある、オープンクロマチンを伴う領域を同定し得る。

【0324】

T細胞は、1または複数の遺伝子の破壊を含み得る。例えば、それらの発現が破壊される、1または複数の遺伝子は、アデノシンA2a受容体 (ADORA)、CD276、Vセットドメイン含有T細胞活性化インヒビター1 (VTCN1)、Bリンパ球およびTリンパ球関連 (BTLA)、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4 (CTLA4)、インドールアミン2, 3-ジオキシゲナーゼ1 (IDO1)、KIR3DL1 (キラー細胞免疫グロブリン様受容体、3ドメイン、長細胞質テール、1)、リンパ球活性化遺伝子3 (LAG3)、プログラム細胞死1 (PD-1)、A型肝炎ウイルス細胞受容体2 (HAVCR2)、VISTA (T細胞活性化のVドメイン免疫グロブリンサプレッサー)、ナチュラルキラー細胞受容体2B4 (CD244)、CISH (サイトカイン誘導性SH2含有タンパク質)、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ1 (HPR1)、アデノ随伴ウイルス組込み部位 (AAVS部位 (例えば、AAVS1、AAVS2など))、またはケモカイン (C-Cモチーフ) 受容体5 (遺伝子/偽遺伝子) (CCR5)、CD160分子 (CD160)、TIGIT (IgおよびITIMドメインを有するT細胞免疫受容体)、CD96分子 (CD96)、CRTAM (細胞傷害性および制御性T細胞分子)、白血球関連免疫グロブリン様受容体1 (LAIR1)、シアル酸結合Ig様レクチン7 (SIGLEC7)、シアル酸結合Ig様レクチン9 (SIGLEC9)、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー10b (TNFRSF10B)、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー10a (TNFRSF10A)、カスパーゼ8 (CASP8)、カスパーゼ10 (CASP10)、カスパーゼ3 (CASP3)、カスパーゼ6 (CASP6)、カスパーゼ7 (CASP7)、FADD (Fas関連細胞死ドメイン)、Fas細胞表面細胞死受容体 (FAS)、形質転換増殖因子ベータ受容体II (TGFBRII)、形質転換増殖因子ベータ受容体I (TGFBRI)、SMADファミリーメンバー2 (SMAD2)、SMADファミリーメンバー3 (SMAD3)、SMADファミリーメンバー4 (SMAD4)、SKIがん原遺伝子 (SKI)、SKI様がん原遺伝子 (SKIL)、TGIF1 (TGFB誘導因子ホメオボックス1)、インターロイキン10受容体サブユニットアルファ (IL10RA)、インターロイキン10受容体サブユニットベータ (IL10RB)、HMOX2 (ヘムオキシゲナーゼ2)、インターロイキン6受容体 (IL6R)、IL6ST (インターロイキン6シグナル伝達因子)、c-srcチロシンキナーゼ (CSK)、PAG1 (グリコスフィンゴ脂質ミクロドメインにより膜アンカーされるリンタンパク質1)、SIT1 (シグナル閾値調節膜貫通アダプター1)、FOX P3 (フォークヘッドボックスP3)、PRドメイン1 (PRDM1)、BATF (塩基性ロイシンジッパー転写因子、ATF様)、可溶性グアニル酸シクラーゼ1アルファ2 (GUCY1A2)、可溶性グアニル酸シクラーゼ1アルファ3 (GUCY

10

20

30

40

50

1 A 3)、可溶型グアニル酸シクラーゼ1ベータ2 (GUCY1B2)、可溶型グアニル酸シクラーゼ1ベータ3 (GUCY1B3)、CISH (サイトカイン誘導性SH2含有タンパク質)、タンパク質のプロリルヒドロキシラーゼドメイン (PHD1、PHD2、PHD3) ファミリーのうちのいずれか1つ、またはこれらの任意の組合せを含み得る。場合によって、内因性TCRもまた、ノックアウトすることができる。例えば、多様な組合せを例示するためだけに述べると、それらの発現が破壊される、1または複数の遺伝子は、PD-1、CTLA-4、およびCISHを含み得る。

【0325】

T細胞は、1または複数の遺伝子の抑制を含み得る。例えば、それらの発現が抑制される、1または複数の遺伝子は、アデノシンA2a受容体 (ADORA)、CD276、Vセッ
ドドメイン含有T細胞活性化インヒビター1 (VTCN1)、Bリンパ球およびTリン
パ球関連 (BTLA)、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4 (CTLA4)、イン
ドールアミン2, 3-ジオキシゲナーゼ1 (IDO1)、KIR3DL1 (キラー細胞免
疫グロブリン様受容体、3ドメイン、長細胞質テール、1)、リンパ球活性化遺伝子3 (LAG3)、
プログラム細胞死1 (PD-1)、A型肝炎ウイルス細胞受容体2 (HAVCR2)、T細胞活性化のVドメイン免疫グロブリンサプレッサー (VISTA)、ナチ
ュラルキラー細胞受容体2B4 (CD244)、CISH (サイトカイン誘導性SH2含有タンパク質)、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ1 (HPR1)、ア
デノ随伴ウイルス組込み部位 (AAVS1)、またはケモカイン (C-Cモチーフ) 受容
体5 (遺伝子/偽遺伝子) (CCR5)、CD160分子 (CD160)、TIGIT (I
gおよびITIMドメインを有するT細胞免疫受容体)、CD96分子 (CD96)、
CRTAM (細胞傷害性および制御性T細胞分子)、白血球関連免疫グロブリン様受容体
1 (LAIR1)、シアル酸結合Ig様レクチン7 (SIGLEC7)、シアル酸結合Ig
様レクチン9 (SIGLEC9)、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー1
0b (TNFRSF10B)、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー10a (TNFRSF10A)、カスパーゼ8 (CASP8)、カスパーゼ10 (CASP10)、
カスパーゼ3 (CASP3)、カスパーゼ6 (CASP6)、カスパーゼ7 (CASP7)、FADD (Fas関連細胞死ドメイン)、Fas細胞表面細胞死受容体 (FAS)、
形質転換増殖因子ベータ受容体II (TGFBRII)、形質転換増殖因子ベータ受容体I (TGFBRI)、SMADファミリーメンバー2 (SMAD2)、SMADファミリー
メンバー3 (SMAD3)、SMADファミリーメンバー4 (SMAD4)、SKI
がん原遺伝子 (SKI)、SKI様がん原遺伝子 (SKIL)、TGIF1 (TGFB誘
導因子ホメオボックス1)、インターロイキン10受容体サブユニットアルファ (IL10RA)、インターロイキン10受容体サブユニットベータ (IL10RB)、HMOX
2 (ヘムオキシゲナーゼ2)、インターロイキン6受容体 (IL6R)、IL6ST (イン
ターロイキン6シグナル伝達因子)、c-srcチロシンキナーゼ (CSK)、PAG
1 (グリコスフィンゴ脂質ミクロドメインにより膜アンカーされるリンタンパク質1)、
SIT1 (シグナル閾値調節膜貫通アダプター1)、FOXP3 (フォークヘッドボック
SP3)、PRドメイン1 (PRDM1)、BATF (塩基性ロイシンジッパー転写因子、ATF様)、可溶型グアニル酸シクラーゼ1アルファ2 (GUCY1A2)、可溶型グ
アニル酸シクラーゼ1アルファ3 (GUCY1A3)、可溶型グアニル酸シクラーゼ1ベ
ータ2 (GUCY1B2)、可溶型グアニル酸シクラーゼ1ベータ3 (GUCY1B3)、
タンパク質のプロリルヒドロキシラーゼドメイン (PHD1、PHD2、PHD3) ファ
ミリー、CISH (サイトカイン誘導性SH2含有タンパク質) のうちのいずれか1つ
、またはこれらの任意の組合せを含み得る。例えば、多様な組合せを例示するためだけに
述べると、それらの発現が抑制される、1または複数の遺伝子は、PD-1、CTLA-
4、およびCISHを含み得る。

【0326】

d. がん標的

操作細胞は、抗原をターゲティングし得る。操作細胞はまた、エピトープもターゲティ

10

20

30

40

50

ングし得る。抗原は、腫瘍細胞抗原であり得る。エピトープは、腫瘍細胞エピトープであり得る。このような腫瘍細胞エピトープは、変異から生じる腫瘍に由来する抗原（ネオ抗原またはネオエピトープ）、共通の腫瘍特異的抗原、分化抗原、および腫瘍内で過剰発現する抗原など、多種多様な腫瘍抗原に由来し得る。これらの抗原は、例えば、少数を挙げれば、アルファアクチニン-4、ARTC1、BCR-ABL融合タンパク質（b3a2）、B-RAF、CASP-5、CASP-8、ベータカテニン、Cdc27、CDK4、CDKN2A、COA-1、deckan融合タンパク質、EFTUD2、伸長因子2、ETV6-AML1融合タンパク質、FLT3-ITD、FN1、GPNMB、LDLR-フコシルトランスフェラーゼ融合タンパク質、HLA-A2d、HLA-A11d、hsp70-2、KIAA0205、MART2、ME1、MUM-1f、MUM-2、MUM-3、neo-PAP、ミオシンクラスI、NFYC、OGT、OS-9、p53、pml-RARアルファ融合タンパク質、PRDX5、PTPRK、K-ras、N-ras、RBAF600、SIRT2、SNRPD1、SYT-SSX1融合タンパク質またはSYT-SSX2融合タンパク質、TGF-ベータRII、トリオースリンサンイソメラーゼ、BAGE-1、GAGE-1、2、8、Gage 3、4、5、6、7、GnTVf、HERV-K-MEL、KK-LC-1、KM-HN-1、LAGE-1、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A12、MAGE-C2、mucin、NA-88、NY-ESO-1/LAGE-2、SAGE、Sp17、SSX-2、SSX-4、TAG-1、TAG-2、TRAG-3、TRP2-INT2g、XAGE-1b、CEA、gp100/Pmel17、カリクレイン4、マンマグロビンA、Melan-A/MART-1、NY-BR-1、OA1、PSA、RAB38/NY-MEL-1、TRP-1/gp75、TRP-2、チロシナーゼ、adipophilin、AIM-2、ALDH1A1、BCLX(L)、BCMA、BING-4、CPSF、サイクリンD1、DKK1、ENAH(hMena)、EP-CAM、EphA3、EZH2、FGF5、G250/MN/CAIX、HER-2/neu、IL13Rアルファ2、腸カルボキシルエステラーゼ、アルファフェトタンパク質、M-CSFT、MCSP、mdm-2、MMP-2、MUC1、p53、PBF、PRAME、PSMA、RAGE-1、RGS5、RNF43、RU2AS、セセルニン1、SOX10、STEAP1、スルビピン、テロメラーゼ、VEGF、および/またはWT1に由来し得る。腫瘍関連抗原は、宿主が正常では発現しない抗原の場合もあり；変異しているか、切断されているか、ミスフォールディングしているか、または他の形で、宿主が正常では発現しない分子の異常な兆候の場合もあり；正常でも発現するが、異常な高レベルで発現する分子と同一な場合もあり；異常な関連または環境で発現する場合もある。腫瘍関連抗原は、例えば、タンパク質もしくはタンパク質断片、複合体炭水化物、ガングリオシド、ハプテン、核酸、他の生物学的分子、またはこれらの任意の組合せであり得る。

【0327】

場合によって、標的は、ネオ抗原またはネオエピトープである。例えば、ネオ抗原は、ERBB2IP内のE805G変異であり得る。場合によって、ネオ抗原およびネオエピトープは、全エクソームシーケンシングにより同定することができる。場合によって、ネオ抗原標的およびネオエピトープ標的は、消化器がん細胞が発現し得る。ネオ抗原およびネオエピトープは、上皮癌において発現し得る。

【0328】

e. 他の標的

エピトープは、間質エピトープであり得る。このようなエピトープは、腫瘍微小環境の間質上にあり得る。抗原は、間質抗原であり得る。このような抗原は、腫瘍微小環境の間質上にあり得る。これらの抗原およびこれらのエピトープは、少数を挙げれば、例えば、腫瘍内皮細胞、腫瘍血管系、腫瘍線維芽細胞、腫瘍周皮細胞、腫瘍間質、および/または腫瘍間葉細胞において存在し得る。これらの抗原は、例えば、CD34、MCSP、FAP、CD31、PCNA、CD117、CD40、MMP4、および/またはテネイシン

を含み得る。

【0329】

f. 遺伝子の破壊

トランス遺伝子の挿入は、遺伝子の破壊を伴って行うこともでき、これを伴わずに行うこともできる。トランス遺伝子を、CD27、CD40、CD122、OX40、GITR、CD137、CD28、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、VISTA、HPRT、AAVS部位（例えば、AAVS1、AAVS2など）、CCR5、PPP1R12C、またはCISHなどの遺伝子と隣接して、これらの近傍に、またはこれらの中に挿入して、遺伝子の活性または発現を低減するかまたは消失させることができる。例えば、がん特異的トランス遺伝子（例えば、TCRまたはがん遺伝子）を、遺伝子（例えば、PD-1）と隣接して、この近傍に、またはこの中に挿入して、遺伝子の活性または発現を低減するかまたは消失させることができる。トランス遺伝子の挿入は、内因性TCR遺伝子において行うことができる。

10

【0330】

遺伝子の破壊は、任意の特定の遺伝子の破壊であり得る。本出願内の遺伝子の遺伝子相同体（例えば、遺伝子の任意の哺乳動物形）を対象とすることが想定される。例えば、破壊される遺伝子は、本明細書で開示される遺伝子、例えば、CD27、CD40、CD122、OX40、GITR、CD137、CD28、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、VISTA、HPRT、CCR5、AAVS部位（例えば、AAVS1、AAVS2など）、PPP1R12C、またはCISHに対する、一定の同一性および／または相同性を呈し得る。したがって、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を呈するか、またはほぼこれらの比率の相同性（核酸レベルまたはタンパク質レベルで）を呈する遺伝子は、破壊し得ることが想定される。また、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性を呈するか、またはほぼこれらの比率の同一性（核酸レベルまたはタンパク質レベルで）を呈する遺伝子は、破壊し得ることも想定される。当技術分野では、一部の遺伝子相同体は公知であるが、場合によって、相同体は公知ではない。しかし、哺乳動物の間で相同な遺伝子は、NCBIのBLASTなど、公表されているデータベースを使用して、核酸（DNAまたはRNA）配列またはタンパク質配列を比較することにより見出すことができる。

20

30

【0331】

破壊され得る遺伝子は、遺伝子ファミリーのメンバーであり得る。例えば、破壊され得る遺伝子は、がん免疫療法の治療可能性を改善し得る。場合によって、遺伝子は、CISHであり得る。CISH遺伝子は、SOCS（suppressor of cytokine signaling）タンパク質ファミリーまたはSTAT誘導性STATインヒビター（SSI）タンパク質ファミリーとしてもまた公知である、サイトカイン誘導性STATインヒビター（CIS）タンパク質ファミリーのメンバーであり得る（例えば、Palmerら、Cish actively silences TCR signaling in CD8+ T cells to maintain tumor tolerance.、The Journal of Experimental Medicine、202巻（12号）、2095～2113頁（2015年）を参照されたい）。遺伝子は、サイトカインによるシグナル伝達を調節し得る、古典的な負のフィードバック系の一部を形成し得る、SOCSタンパク質ファミリーの一部であり得る。破壊される遺伝子は、CISHであり得る。CISHは、エリスロポエチン、プロラクチン、またはインターロイキン3（IL-3）受容体など、JAK-STAT5経路を介してシグ

40

50

ナル伝達するサイトカインの負の調節に関与し得る。遺伝子は、そのチロシンリン酸化を抑制することにより、S T A T 5のトランス活性化を阻害し得る。C I S Hファミリーメンバーは、サイトカインによるシグナル伝達の、サイトカイン誘導性の負の調節因子であることが公知である。遺伝子の発現は、造血系細胞内のI L 2、I L 3、G M - C S F、またはE P Oにより誘導することができる。プロテアソームを媒介する、遺伝子のタンパク質の分解は、エリスロポエチン受容体の不活化に関与し得る。場合によって、ターゲティングされる遺伝子は、腫瘍特異的T細胞内で発現し得る。ターゲティングされる遺伝子は、破壊されると、操作細胞の、抗原に関連する腫瘍への浸潤を増大させることができる。場合によって、ターゲティングされる遺伝子は、C I S Hであり得る。

【0332】

破壊され得る遺伝子は、T C Rシグナル伝達、機能的アビディティ、またはがんに対する免疫の減衰に関与し得る。場合によって、破壊される遺伝子は、T C Rが刺激されると、上方調節される。遺伝子は、細胞の拡大、機能的アビディティ、またはサイトカインの多機能性の阻害に関与し得る。遺伝子は、細胞によるサイトカインの産生を負に調節することに関与し得る。例えば、遺伝子は、例えば、エフェクターサイトカイン、I F N - ガンマ、および／またはT N Fの産生の阻害に関与し得る。遺伝子はまた、T C Rの刺激の後で、I L - 2など、補助的サイトカインの発現の阻害にも関与し得る。このような遺伝子は、C I S Hであり得る。

【0333】

遺伝子の抑制はまた、多数の方式で行うこともできる。例えば、遺伝子の発現は、ノックアウトにより抑制することもでき、遺伝子のプロモーターを変更することにより抑制することもでき、かつ／または干渉性R N Aを投与することにより抑制することもできる。これは、生物レベルで行うこともでき、組織レベル、臓器レベル、および／または細胞レベルで行うこともできる。細胞内、組織内、および／または臓器内で、1または複数の遺伝子をノックダウンする場合、1または複数の遺伝子は、R N A干渉性試薬、例えば、s i R N A、s h R N A、またはマイクロR N Aを投与することにより抑制することができる。例えば、s h R N Aを発現させる核酸を、細胞へと、安定的にトランスフェクトして、発現をノックダウンすることができる。さらに、s h R N Aを発現させる核酸を、T細胞のゲノムへと挿入し、これにより、T細胞内の遺伝子をノックダウンすることもできる。

【0334】

破壊法はまた、ドミナントネガティブのタンパク質を過剰発現させるステップも含み得る。この方法は、機能的な野生型遺伝子の機能の、全体的な減殺を結果としてもたらし得る。加えて、ドミナントネガティブの遺伝子が発現させるステップは、ノックアウトおよび／またはノックダウンの表現型と類似の表現型を結果としてもたらし得る。

【0335】

ある場合には、終止コドンを、1または複数の遺伝子内に、挿入または創出（例えば、ヌクレオチドの置換により）することができ、これは、非機能的転写物または非機能的タンパク質を結果としてもたらし得る（ある場合には、ノックアウトと称する）。例えば、終止コドンを、1または複数の遺伝子の中央部において創出する場合、結果として得られる転写および／またはタンパク質は切断される可能性があり、非機能的であり得る。しかし、場合によって、切断は、活性（部分的に活性であるか、または過剰に活性の）タンパク質をもたらし得る。タンパク質が過剰に活性である場合、これは、ドミナントネガティブのタンパク質を結果としてもたらし得る。

【0336】

このドミナントネガティブのタンパク質は、任意のプロモーターの制御下にある核酸内で発現させる。例えば、プロモーターは、遍在性プロモーターであり得る。プロモーターはまた、誘導性プロモーター、組織特異的プロモーター、細胞特異的プロモーター、および／または発生特異的プロモーターでもあり得る。

【0337】

次いで、ドミナントネガティブのタンパク質をコードする核酸を、細胞へと挿入することができる。任意の方法を使用することができる。例えば、安定的なトランスフェクションを使用することができる。加えて、ドミナントネガティブのタンパク質をコードする核酸は、T細胞のゲノムへも挿入することができる。

【0338】

T細胞内の1または複数の遺伝子は、任意の方法を使用して、ノックアウトまたは破壊することができる。例えば、1または複数の遺伝子のノックアウトは、1または複数の遺伝子を、T細胞のゲノムから欠失させることを含み得る。ノックアウトはまた、遺伝子配列の全部または一部を、T細胞から除去することも含み得る。また、ノックアウトは、T細胞のゲノム内の遺伝子の全部または一部を、1または複数のヌクレオチドで置き換えることを含み得ることも想定される。1または複数の遺伝子のノックアウトはまた、配列を、1または複数の遺伝子内に挿入し、これにより、1または複数の遺伝子の発現を破壊することも含み得る。例えば、配列の挿入は、終止コドンを、1または複数の遺伝子の中央部に作製し得る。配列の挿入はまた、1または複数の遺伝子のオープンリーディングフレームもシフトさせる。

【0339】

ノックアウトは、任意の細胞内、臓器内、および／または組織内、例えば、T細胞内、造血幹細胞内、骨髄中、および／または胸腺内で行うことができる。例えば、ノックアウトは、全身におけるノックアウトであることが可能であり、例えば、1または複数の遺伝子の発現が、ヒトの全ての細胞内で抑制される。ノックアウトはまた、ヒトの、1または複数の細胞、組織、および／または臓器に特異的でもあり得る。これは、1または複数の遺伝子の発現を、1または複数の臓器、組織、または細胞型において選択的に抑制する、条件的ノックアウトにより達成することができる。条件的ノックアウトは、creを、細胞特異的プロモーター、組織特異的プロモーター、および／または臓器特異的プロモーターの制御下で発現させる、Cre-lox系により実施することができる。例えば、1または複数の遺伝子を、1または複数の組織内または臓器内でノックアウトし得る（または発現を抑制し得る）が、この場合、1または複数の組織または臓器は、脳、肺、肝臓、心臓、脾臓、膵臓、小腸、大腸、骨格筋、平滑筋、皮膚、骨、脂肪組織、毛髪、甲状腺、気管、胆嚢、腎臓、尿管、膀胱、大動脈、静脈、食道、横隔膜、胃、直腸、副腎、気管支、耳、眼、網膜、生殖器、視床下部、喉頭、鼻、舌、脊髄、または尿管、子宮、卵巣、精巣、および／またはこれらの任意の組合せを含み得る。また、1つの細胞型内の、1または複数の遺伝子も、ノックアウトし得る（または発現を抑制し得る）が、この場合、1または複数の細胞型は、毛胞、角化細胞、性腺刺激物質産生細胞、副腎皮質刺激ホルモン産生細胞(corticotrope)、甲状腺刺激ホルモン産生細胞、ソマトトロピン産生細胞、プロラクチン産生細胞、クロム親和性細胞、傍濾胞細胞、グロムス細胞、メラニン細胞、母斑細胞、メルケル細胞、象牙芽細胞、セメント芽細胞、角膜実質細胞、網膜ミュラー細胞、網膜色素上皮細胞、ニューロン、グリア（例えば、希突起膠細胞、星状細胞）、脳室上衣細胞、松果体細胞、肺細胞（例えば、I型肺細胞およびII型肺細胞）、クララ細胞、杯細胞、G細胞、D細胞、腸管クロム親和性細胞、胃主細胞、壁細胞、胃小窩細胞、K細胞、D細胞、I細胞、杯細胞、パネート細胞、腸細胞、M細胞、肝細胞、肝星細胞（例えば、中胚葉に由来するクッパー細胞）、胆嚢細胞、腺房中心細胞、膵星細胞、膵α細胞、膵β細胞、膵δ細胞、膵F細胞、膵ε細胞、甲状腺（例えば、濾胞細胞）、副甲状腺（例えば、上皮小体主細胞）、好酸性細胞、尿路上皮細胞、骨芽細胞、骨細胞、軟骨芽細胞、軟骨細胞、線維芽細胞、線維細胞、筋芽細胞、筋細胞、筋サテライト細胞、腱細胞、心筋細胞、脂肪芽細胞、脂肪細胞、カハール介在細胞、血管芽細胞、内皮細胞、メサングウム細胞（例えば、糸球体内メサングウム細胞および糸球体外メサングウム細胞）、傍糸球体細胞、緻密斑細胞、間質細胞(stromal cell)、間質細胞(interstitial cell)、テロサイト、単純上皮細胞、有足細胞、腎近位尿細管刷子縁細胞、セルトリ細胞、ライディッヒ細胞、顆粒膜細胞、非繊毛性上皮細胞、胚細胞、精子、卵子、リンパ球、骨髓性細胞、内皮前駆細胞、内皮幹細胞、血管芽細胞、中胚葉

性血管芽細胞、周皮細胞、壁細胞、および／またはこれらの任意の組合せを含む。

【0340】

場合によって、本開示の方法は、1または複数の細胞を、対象から得るステップを含み得る。細胞は一般に、膜内に封入された、細胞質、タンパク質、核酸、および／または細胞小器官を含む、任意の生物学的構造を指す場合がある。場合によって、細胞は、哺乳動物細胞であり得る。場合によって、細胞とは、免疫細胞を指す場合がある。細胞の非限定的な例は、B細胞、好塩基球、樹状細胞、好酸球、ガンマデルタT細胞、顆粒球、ヘルパーT細胞、ランゲルハンス細胞、リンパ系細胞、生得的リンパ系細胞（ILC）、マクロファージ、マスト細胞、巨核球、メモリーT細胞、単球、骨髄細胞、ナチュラルキラーT細胞、好中球、前駆体細胞、形質細胞、前駆細胞、調節性T細胞、T細胞、胸腺細胞、これらの任意の分化細胞もしくは脱分化細胞、またはこれらの任意の細胞の混合物もしくは組合せを含み得る。

10

【0341】

場合によって、細胞は、ILCであることが可能であり、ILCは、群1 ILC、群2 ILC、または群3 ILCである。群1 ILCは一般に、T-bet転写因子により制御され、細胞内の病原体に応答して、IFN-ガンマおよびTNF-アルファなど、1型サイトカインを分泌する細胞として記載することができる。群2 ILCは一般に、GATA-3転写因子およびROR-アルファ転写因子に依拠し、細胞外の寄生虫感染症に応答して、2型サイトカインを産生する細胞として記載することができる。群3 ILCは一般に、ROR-ガンマ転写因子により制御され、IL-17および／またはIL-22を産生する細胞として記載することができる。

20

【0342】

場合によって、細胞は、所与の因子について陽性の細胞の場合もあり、所与の因子について陰性の細胞の場合もある。場合によって、細胞は、CD3+細胞、CD3-細胞、CD5+細胞、CD5-細胞、CD7+細胞、CD7-細胞、CD14+細胞、CD14-細胞、CD8+細胞、CD8-細胞、CD103+細胞、CD103-細胞、CD11b+細胞、CD11b-細胞、BDCA1+細胞、BDCA1-細胞、L-セレクチン+細胞、L-セレクチン-細胞、CD25+、CD25-細胞、CD27+、CD27-細胞、CD28+細胞、CD28-細胞、CD44+細胞、CD44-細胞、CD56+細胞、CD56-細胞、CD57+細胞、CD57-細胞、CD62L+細胞、CD62L-細胞、CD69+細胞、CD69-細胞、CD45RO+細胞、CD45RO-細胞、CD127+細胞、CD127-細胞、CD132+細胞、CD132-細胞、IL-7+細胞、IL-7-細胞、IL-15+細胞、IL-15-細胞、レクチン様受容体G1陽性細胞、レクチン様受容体G1陰性細胞、またはこれらの分化細胞もしくは脱分化細胞であり得る。細胞が発現する因子の例は、限定的であることを意図するものではなく、当業者は、細胞が、当技術分野で公知の任意の因子について陽性的場合もあり、陰性的場合もあることを察知するであろう。場合によって、細胞は、2つまたはそれよりも多い因子について陽性であり得る。例えば、細胞は、CD4+およびCD8+であり得る。場合によって、細胞は、2つまたはそれよりも多い因子について陰性であり得る。例えば、細胞は、CD25-、CD44-、およびCD69-であり得る。場合によって、細胞は、1または複数の因子について陽性であり得、かつ、1または複数の因子について陰性であり得る。例えば、細胞は、CD4+およびCD8-であり得る。次いで、選択した細胞を、対象へと注入することができる。場合によって、細胞を、1または複数の所与の因子を有するかまたは有さないことについて選択することができる（例えば、細胞を、1または複数の因子の有無に基づき分離することができる）。分離効率は、細胞の生存率と、トランス遺伝子を、細胞のゲノムへと組み込み、かつ／または発現させ得る効率とに影響を及ぼし得る。場合によって、選択した細胞はまた、in vitroで拡大することもできる。選択した細胞は、注入の前に、in vitroで拡大することができる。本明細書で開示される方法のうちのいずれかにおいて使用される細胞は、本明細書で開示される細胞のうちのいずれかの混合物（例えば、2つまたはそれよりも多い異なる細胞）であり得るこ

30

40

50

とを理解されたい。例えば、本開示の方法は、細胞を含むことが可能であり、細胞は、C D 4 + 細胞と、C D 8 + 細胞との混合物である。別の例では、本開示の方法は、細胞を含むことが可能であり、細胞は、C D 4 + 細胞と、ナイーブ細胞との混合物である。

【0343】

ナイーブ細胞は、本明細書で開示される方法に特に有用であり得る、いくつかの特性を保持する。例えば、ナイーブ細胞は、*in vitro*における拡大およびT細胞受容体トランス遺伝子の発現がたやすく可能であり、少数の末端分化マーカーを呈し（細胞の注入後におけるより大きな効能と関連し得る資質）、増殖のより大きな潜在的可能性を示唆する、長いテロメアを保持する（Hinrichs, C.S.ら、「Human effector CD8+ T cells derived from naive rather than memory subsets possess superior traits for adoptive immunotherapy」、Blood、117巻（3号）：808～14頁（2011年））。本明細書で開示される方法は、ナイーブ細胞に特異的なマーカーの選択または負の選択を含み得る。場合によって、細胞は、ナイーブ細胞であり得る。ナイーブ細胞は一般に、抗原へと曝露されていない、任意の細胞を指す場合がある。本開示における任意の細胞は、ナイーブ細胞であり得る。一例では、細胞は、ナイーブT細胞であり得る。ナイーブT細胞は一般に、骨髄中で分化し、胸腺内の中枢性選択の正の過程および負の過程を経ることに成功し、かつ／または特異的なマーカーの発現もしくは非存在（例えば、L-セレクトインの表面発現、活性化マーカーである、C D 2 5、C D 4 4、またはC D 6 9の非存在、メモリーC D 4 5 R Oアイソフォームの非存在）によって特徴付けられ得る細胞であると記載することができる。

【0344】

場合によって、細胞は、細胞株（例えば、不死化細胞株）を含み得る。細胞株の非限定的な例は、ヒトB C - 1細胞、ヒトB J A B細胞、ヒトI M - 9細胞、ヒトJ i y o y e細胞、ヒトK - 5 6 2細胞、ヒトL C L細胞、マウスM P C - 1 1細胞、ヒトR a j i細胞、ヒトR a m o s細胞、マウスR a m o s細胞、ヒトR P M I 8 2 2 6細胞、ヒトR S 4 - 1 1細胞、ヒトS K W 6 . 4細胞、ヒト樹状細胞、マウスP 8 1 5細胞、マウスR B L - 2 H 3細胞、ヒトH L - 6 0細胞、ヒトN A M A L W A細胞、ヒトマクロファージ細胞、マウスR A W 2 6 4 . 7細胞、ヒトK G - 1細胞、マウスM 1細胞、ヒトP B M C細胞、マウスB W 5 1 4 7 (T 2 0 0 - A) 5 . 2細胞、ヒトC C R F - C E M細胞、マウスE L 4細胞、ヒトJ u r k a t細胞、ヒトS C I D . a d h細胞、ヒトU - 9 3 7細胞、またはこれらの細胞の任意の組合せを含む。

【0345】

幹細胞は、様々な体細胞をもたらすことが可能であり、したがって、原理的に、事実上任意の種類の治療用細胞の、無限の供給源として用いられる潜在的可能性を有し得る。幹細胞の再プログラム能力はまた、再プログラム細胞の治療的価値を増強するように、さらなる操作も可能とする。本開示の方法のうちのいずれかにおいて、1または複数の細胞は、幹細胞に由来し得る。幹細胞の非限定的な例は、胚性幹細胞、成体幹細胞、組織特異的な幹細胞、神経幹細胞、同種幹細胞、全能性幹細胞、複能性幹細胞、多能性幹細胞、人工多能性幹細胞、造血幹細胞、表皮幹細胞、臍帯幹細胞、上皮幹細胞、または脂肪由来幹細胞を含む。一例では、細胞は、造血幹細胞由来のリンパ系前駆細胞であり得る。別の例では、細胞は、胚性幹細胞由来のT細胞であり得る。さらに別の例では、細胞は、人工多能性幹細胞（i P S C）由来のT細胞であり得る。

【0346】

条件的ノックアウトは、例えば、テトラサイクリン誘導性プロモーター、発生特異的なプロモーターを使用することによる、誘導性ノックアウトであり得る。これは、任意の時点または特異的な時点において、遺伝子／タンパク質の発現を消失させるか、または抑制することを可能とし得る。例えば、テトラサイクリン誘導性プロモーターの場合、テトラサイクリンは、生後任意の時点において、T細胞へ与えることができる。c r e / l o x系はまた、発生特異的なプロモーターの制御下も可能である。例えば、一部のプロモーターは、生後なおまたは思春期の開始後にオンとなる。これらのプロモーターは、c r e発現を制

御するのに使用することができ、したがって、発生特異的ノックアウトにおいて使用することができる。

【0347】

また、ノックアウト技術の任意の組合せを実行し得ることも想定される。例えば、組織特異的ノックアウトまたは細胞特異的ノックアウトを、誘導技術と組み合わせ、組織特異的または細胞特異的な誘導性ノックアウトを創出することができる。さらに、発生特異的プロモーターなどの他の系を、組織特異的プロモーターおよび／または誘導性ノックアウトと組み合わせて使用することもできる。

【0348】

ノックアウト技術はまた、遺伝子編集も含み得る。例えば、遺伝子編集は、CRISPR関連タンパク質（Casタンパク質、例えば、Cas9）、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、およびメガヌクレアーゼを含むヌクレアーゼを使用して実施することができる。ヌクレアーゼは、天然で存在するヌクレアーゼの場合もあり、遺伝子改変ヌクレアーゼの場合もあり、かつ／または組換えヌクレアーゼの場合もある。遺伝子編集はまた、トランスポゾンベースの系（例えば、PiggyBac、Sleeping beauty）を使用して実施することもできる。例えば、遺伝子編集は、トランスポザーゼを使用して実施することができる。

【0349】

場合によって、ヌクレアーゼまたはヌクレアーゼをコードするポリペプチドは、少なくとも1つの遺伝子（例えば、CTLA-4、AAVS1、および／またはPD-1）へと切断を導入する。場合によって、ヌクレアーゼまたはヌクレアーゼをコードするポリペプチドは、少なくとも1つの遺伝子（例えば、CTLA-4、AAVS1、および／またはPD-1）の不活化または発現の低減を含み、かつ／またはそれらをもたらし。場合によって、遺伝子は、アデノシンA2a受容体（ADORA）、CD276、Vセットドメイン含有T細胞活性化インヒビター1（VTCN1）、Bリンパ球およびTリンパ球関連（BTLA）、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ1（IDO1）、KIR3DL1（キラー細胞免疫グロブリン様受容体、3ドメイン、長細胞質テール、1）、リンパ球活性化遺伝子3（LAG3）、A型肝炎ウイルス細胞受容体2（HAVCR2）、VISTA（T細胞活性化のVドメイン免疫グロブリンサプレッサー）、ナチュラルキラー細胞受容体2B4（CD244）、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ1（HPR1）、アデノ随伴ウイルス組込み部位1（AAVS1）、またはケモカイン（C-Cモチーフ）受容体5（遺伝子／偽遺伝子）（CCR5）、CD160分子（CD160）、TIGIT（IgおよびITIMドメインを有するT細胞免疫受容体）、CD96分子（CD96）、CRTAM（細胞傷害性および制御性T細胞分子）、白血球関連免疫グロブリン様受容体1（LAIR1）、シアル酸結合Ig様レクチン7（SIGLEC7）、シアル酸結合Ig様レクチン9（SIGLEC9）、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー10b（TNFRSF10B）、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー10a（TNFRSF10A）、カスパーゼ8（CASP8）、カスパーゼ10（CASP10）、カスパーゼ3（CASP3）、カスパーゼ6（CASP6）、カスパーゼ7（CASP7）、FADD（Fas関連細胞死ドメイン）、Fas細胞表面細胞死受容体（FAS）、形質転換増殖因子ベータ受容体II（TGFBRII）、形質転換増殖因子ベータ受容体I（TGFBRI）、SMADファミリーメンバー2（SMAD2）、SMADファミリーメンバー3（SMAD3）、SMADファミリーメンバー4（SMAD4）、SKIがん原遺伝子（SKI）、SKI様がん原遺伝子（SKIL）、TGIF1（TGFB誘導因子ホメオボックス1）、プログラム細胞死1（PD-1）、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（CTLA4）、インターロイキン10受容体サブユニットアルファ（IL10RA）、インターロイキン10受容体サブユニットベータ（IL10RB）、HMOX2（ヘムオキシゲナーゼ2）、インターロイキン6受容体（IL6R）、IL6ST（インターロイキン6シグナル伝達因子）、c-srcチロシンキナーゼ

10

20

30

40

50

(CSK)、PAG1 (グリコスフィンゴ脂質ミクロドメインにより膜アンカーされるリントタンパク質1)、SIT1 (シグナル閾値調節膜貫通アダプター1)、FOXP3 (フォークヘッドボックスP3)、PRドメイン1 (PRDM1)、BATF (塩基性ロインジッパー転写因子、ATF様)、可溶型グアニル酸シクラーゼ1アルファ2 (GUCY1A2)、可溶型グアニル酸シクラーゼ1アルファ3 (GUCY1A3)、可溶型グアニル酸シクラーゼ1ベータ2 (GUCY1B2)、タンパク質のプロリルヒドロキシラーゼドメイン (PHD1、PHD2、PHD3) ファミリー、または可溶型グアニル酸シクラーゼ1ベータ3 (GUCY1B3)、T細胞受容体アルファ遺伝子座 (TRA)、T細胞受容体ベータ遺伝子座 (TRB)、egl-9ファミリーの低酸素症誘導性因子1 (EGLN1)、egl-9ファミリーの低酸素症誘導性因子2 (EGLN2)、egl-9ファミリーの低酸素症誘導性因子3 (EGLN3)、PPP1R12C (タンパク質ホスファターゼ1調節サブユニット12C)、およびそれらの任意の組合せまたは誘導体からなる群から選択される。

【0350】

CRISPR系

本明細書で記載される方法は、CRISPR系を利用し得る。少なくとも5つの種類のCRISPR系が存在し、これらは全て、RNAタンパク質およびCasタンパク質を包含する。I型、III型、およびIV型は、crRNAと相補的な核酸を切断することが可能な、多Casタンパク質複合体をアセンブルする。I型およびIII型はいずれも、プロセシングされたcrRNAを、多Casタンパク質複合体へとアセンブリする前に、precrRNAのプロセシングを要求する。II型およびV型のCRISPR系は、少なくとも1つのガイドRNAと複合体化させた、単一のCasタンパク質を含む。

【0351】

CRISPR系の一般的な機構および近年における進歩については、Cong, L. ら、「Multiplex genome engineering using CRISPR systems」、Science、339巻(6121号):819~823頁(2013年);Fu, Y. ら、「High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells」、Nature Biotechnology、31巻、822~826頁(2013年);Chu, VT ら、「Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells」、Nature Biotechnology、33巻、543~548頁(2015年);Shmakov, S. ら、「Discovery and functional characterization of diverse Class 2 CRISPR-Cas systems」、Molecular Cell、60巻、1~13頁(2015年);Makarova, KS ら、「An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems」、Nature Reviews Microbiology、13巻、1~15頁(2015年)において論じられている。標的DNAの部位特異的切断は、1)ガイドRNAと標的DNA(また、プロトスペーサーとも呼ばれる)との塩基対合相補性、および2)プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)と称する、標的DNA内の短いモチーフの両方により決定される位置において生じる。例えば、操作細胞は、CRISPR系、例えば、III型CRISPR系を使用して作製することができる。本明細書で開示される方法において使用されるCas酵素は、DNAの切断を触媒するCas9であり得る。Streptococcus pyogenesに由来するCas9、または任意の近縁のCas9による酵素作用により、20ヌクレオチドのガイド配列にハイブリダイズし、20ヌクレオチドの標的配列に後続してプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)を有する標的部位配列において、二本鎖切断を生じることができる。

10

20

30

40

50

【0352】

CRISPR系は、任意の手段を使用して細胞または細胞集団へと導入することができる。場合によって、CRISPR系は、電気穿孔またはヌクレオフェクションによって導入し得る。電気穿孔は、例えば、Neon（登録商標）Transfection System（ThermoFisher Scientific）を使用して実施することができ、またはAMAXA（登録商標）Nucleofector（AMAXA（登録商標）Biosystems）もまた、細胞への核酸の送達のために使用することができる。電気穿孔パラメータは、トランスフェクション効率および／または細胞生存率を最適化するように調整することができる。電気穿孔デバイスは、指数関数的減衰、時定数、および方形波など、複数の電気波形パルスの設定項目を有し得る。あらゆる細胞型は、適用されるパルスパラメータ（例えば、電圧、キャパシタンス、および抵抗）に依存する、固有の最適電界強度（E）を有する。最適電界強度の適用は、膜貫通電圧の誘導による電気透過化であって、核酸が細胞膜を通過することを可能とする電気透過化を引き起こす。場合によって、電気穿孔パルスの電圧、電気穿孔パルス幅、パルス数、細胞密度、およびチップ型は、トランスフェクション効率および／または細胞生存率を最適化するように調整することができる。

10

【0353】

a. Casタンパク質

ベクターは、Casタンパク質（CRISPR関連タンパク質）など、CRISPR酵素をコードする、酵素コード配列に作動可能に連結することができる。場合によって、ヌクレアーゼまたはヌクレアーゼをコードするポリペプチドはCRISPR系に由来する（例えば、CRISPR酵素）。Casタンパク質の比限定的な例は、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9（Csn1またはCsx12としてもまた公知である）、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx1S、Csf1、Csf2、CsO、Csf4、Cpf1、c2c1、c2c3、Cas9HiFi、それらの相同体、またはそれらの修飾形を含み得る。場合によって、触媒不活性なCasタンパク質を使用することができる（例えば、触媒不活性なCas9（dCas9））。Cas9などの非修飾のCRISPR酵素は、DNA切断活性を有し得る。場合によって、ヌクレアーゼはCas9である。場合によって、ポリペプチドはCas9をコードする。場合によって、ヌクレアーゼまたはヌクレアーゼをコードするポリペプチドは、触媒不活性である。場合によって、ヌクレアーゼは、触媒不活性なCas9（dCas9）である。場合によって、ポリペプチドは、触媒不活性なCas9（dCas9）をコードする。CRISPR酵素は、標的配列内および／または標的配列の相補体内などの、標的配列の一方または両方の鎖の切断を導くことができる。例えば、CRISPR酵素は、標的配列の最初または最後のヌクレオチドから、塩基対内の、または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50、100、200、500もしくはそれより多くの塩基対内の一方または両方の鎖の切断を導くことができる。変異体CRISPR酵素が標的配列を含む野生型酵素と比べて変異させたCRISPR酵素をコードするベクターを使用することができる。Casタンパク質は、Cas9HiFiなど、高忠実度のCasタンパク質であり得る。

20

30

40

【0354】

1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10を超えるNLS、またはほぼこれらの数を超えるNLSなど、1または複数の核局在化配列（NLS）を含むCRISPR酵素をコードするベクターを使用することができる。例えば、CRISPR酵素は、アミノ末端において、またはこの近傍に、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、

50

7つ、8つ、9つ、10を超えるNLS、またはほぼこれらの数を超えるNLSを含む場合もあり、カルボキシル末端において、またはこの近傍に、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10を超えるNLS、またはほぼこれらの数を超えるNLSを含む場合もあり、これらの任意の組合せ（例えば、アミノ末端における1または複数のNLSと、カルボキシル末端における1または複数のNLSとの組合せ）を含む場合もある。1つを超えるNLSが存在する場合、単一のNLSが、1つを超えるコピーで、かつ／または1もしくは複数のコピーで存在する、他の1もしくは複数のNLSと組み合わせて存在し得るように、各NLSは、他のNLSから独立に選択することができる。

【0355】

Cas9とは、例示的な野生型のCas9ポリペプチド（例えば、S. pyogenesに由来するCas9）に対して、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、100%の配列同一性および／もしくは配列類似性、または少なくともほぼこれらの比率の配列同一性および／もしくは配列類似性を伴うポリペプチドを指す場合がある。Cas9とは、例示的な野生型のCas9ポリペプチド（例えば、S. pyogenesに由来する）に対して、最大で50%、60%、70%、80%、90%、100%の配列同一性および／もしくは配列類似性、または最大でほぼこれらの比率の配列同一性および／もしくは配列類似性を伴うポリペプチドを指す場合がある。Cas9とは、Cas9タンパク質の野生型形態を指す場合もあり、欠失、挿入、置換、変異体、変異、融合、キメラ、またはこれらの任意の組合せなどのアミノ酸変化を含み得る、Cas9タンパク質の修飾形態を指す場合もある。

【0356】

ヌクレアーゼまたはエンドヌクレアーゼ（例えば、Cas9などのCasタンパク質）をコードするポリヌクレオチドは、真核細胞など、特定の細胞内の発現のために、コドンを最適化することができる。この種の最適化は、同一のタンパク質をコードしながら、意図される宿主生物または宿主細胞のコドン優先性を模倣するように、外来由来の（例えば、組換え）DNAの変異を伴い得る。

【0357】

方法において使用されるCRISPR酵素は、NLSを含み得る。NLSは、ポリペプチド鎖内の任意の位置、例えば、N末端またはC末端の近傍に位置し得る。例えば、NLSは、N末端またはC末端から、ポリペプチド鎖に沿って、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、40、50アミノ酸以内であるか、またはほぼこれらの数のアミノ酸以内であり得る。ある場合には、NLSは、N末端またはC末端から、50アミノ酸もしくはそれよりも多い数のアミノ酸、例えば、100、200、300、400、500、600、700、800、900、もしくは1000アミノ酸以内であるか、またはほぼこれらの数のアミノ酸以内であり得る。

【0358】

ヌクレアーゼまたはエンドヌクレアーゼは、例示的な野生型の部位指向型ポリペプチド（例えば、S. pyogenesに由来するCas9）のヌクレアーゼドメインに対して、少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、もしくは100%のアミノ酸配列同一性、または少なくともほぼこれらの比率のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。

【0359】

S. pyogenes Cas9 (SpCas9) (表11)を一般に、ゲノム操作のためのCRISPRエンドヌクレアーゼとして使用するが、どの標的切出し部位にも最良のエンドヌクレアーゼではない場合もある。例えば、SpCas9のためのPAM配列（5' NGG 3'）は、ヒトゲノム全体を通して夥多であるが、NGG配列は、修飾に所望される遺伝子を適正にターゲティングするように位置しない場合がある。場合によって、異なるエンドヌクレアーゼを使用して、ある特定のゲノム標的をターゲティングすることができる。場合によって、NGG以外のPAM配列を伴う、合成SpCas9由来の変異体を使用することができる。加えて、多様な種に由来する、他のCas9オースログも同

定されており、これらの「非 SpCas9」は、様々な PAM 配列に結合し、これらもまた、本開示に有用であり得るだろう。例えば、SpCas9 の比較的大きなサイズ（約 4 kb のコード配列）は、SpCas9 cDNA を保有するプラスミドは、細胞内で効率的に発現しえないことを意味する。逆に、Staphylococcus aureus Cas9 (SaCas9) のコード配列はおおよそ、SpCas9 より 1 キロベース短く、おそらく、細胞内の効率的な発現を可能とする。SpCas9 と同様に、SaCas9 エンドヌクレアーゼも、in vitro の哺乳動物細胞内、およびマウスの in vivo において、標的遺伝子を修飾することが可能である。

【0360】

S. pyogenes Cas9 への代替法は、Cpf1 ファミリーに由来する、RNA にガイドされるエンドヌクレアーゼであって、哺乳動物細胞内の切断活性を提示するエンドヌクレアーゼを含み得る。Cas9 ヌクレアーゼと異なり、Cpf1 を媒介する DNA の切断の結果は、短い 3' 突出を伴う二本鎖切断である。Cpf1 の付着末端型切断パターンは、従来の制限酵素クロニングと類似する指向性遺伝子移入であって、遺伝子編集の効率を増大させる指向性遺伝子移入の可能性を開きうる。上記で記載した Cas9 の変異体およびオソログと同様に、Cpf1 もまた、CRISPR により、SpCas9 が優先する NGG PAM 部位を欠く、AT リッチ領域または AT リッチゲノムへとターゲティングし得る部位の数を拡大し得る。

【0361】

任意の機能的濃度の Cas タンパク質を、細胞へと導入することができる。例えば、15 マイクログラムの Cas mRNA を、細胞へと導入することができる。他の場合には、0.5 マイクログラム～100 マイクログラムの Cas mRNA を導入することができる。0.5、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または 100 マイクログラムの Cas mRNA を導入することができる。

【0362】

場合によって、二重ニカーゼ法を使用して、二本鎖切断またはゲノム切断を導入することができる。Cas タンパク質は、いずれかのヌクレアーゼドメイン内の公知のアミノ酸において変異させ、これにより、1 つのヌクレアーゼドメインの活性を欠失させ、一本鎖切断を生じることが可能な、ニカーゼ Cas タンパク質を作製することができる。2 つの顕著に異なるガイド RNA ターゲティング逆鎖を伴うニカーゼは、標的部位内で二本鎖切断 (DSB) を生成するのに使用することができる（「二重ニック」CRISPR 系または「二重ニカーゼ」CRISPR 系と称することが多い）。この手法は、2 つのオフターゲットニックが、DSB を引き起こすのに十分に近接して作製される可能性は小さいので、標的特異性を増大させ得る。

【0363】

b. ガイディングポリ核酸（例えば、gRNA または gDNA）

ガイディングポリ核酸（またはガイドポリ核酸）は、DNA または RNA であり得る。ガイディングポリ核酸は、一本鎖または二本鎖であり得る。場合によって、ガイディングポリ核酸は、一本鎖領域と二本鎖領域との領域を含有し得る。ガイディングポリ核酸はまた、二次構造を形成し得る。場合によって、ガイディングポリ核酸は、ホスホロチオエートであり得るヌクレオチド間連結を含有し得る。任意の数のホスホロチオエートが存在し得る。例えば、1～約 100 のホスホロチオエートが、ガイディングポリ核酸配列内に存在し得る。場合によって、1～10 のホスホロチオエートが存在する。場合によって、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 のホスホロチオエートがガイディングポリ核酸配列内に存在する。

【0364】

本明細書で使用される「ガイド RNA (gRNA)」という用語、およびその文法的同等物は、標的 DNA に特異的であることが可能であり、Cas タンパク質などのヌクレア

ーゼと複合体を形成し得るRNAを指す場合がある。ガイドRNAは、標的部位を指定し、RNA/Cas複合体を、切断のために指定される標的DNAへとガイドする、ガイド配列またはスパーサー配列を含み得る。例えば、図15は、ガイドRNAが、CRISPR複合体を、3つの遺伝子へとターゲティングし、ターゲティングされた二本鎖切断を実施し得ることを裏付ける。標的DNAの部位特異的切断は、1) ガイドRNAと標的DNAとの塩基対合相補性（また、プロトスパーサーとも呼ばれる）、および2) プロトスパーサー隣接モチーフ（PAM）と称する、標的DNA内の短いモチーフの両方により決定される位置において生じる。同様に、ガイドRNA（「gDNA」）は、標的DNAに特異的であり得、ヌクレアーゼと複合体を形成して、その核酸切断活性を導くことができる。

10

【0365】

本明細書で開示される方法はまた、細胞もしくは胚へと、または細胞集団へと、少なくとも1つのガイドポリ核酸（例えば、ガイドDNAまたはガイドRNA）、または核酸（例えば、少なくとも1つのガイドRNAをコードするDNA）を導入するステップも含み得る。ガイドRNAは、RNAにガイドされるエンドヌクレアーゼまたはヌクレアーゼと相互作用して、エンドヌクレアーゼまたはヌクレアーゼを、その部位において、ガイドRNAの5'末端が、染色体配列内の特異的プロトスパーサー配列と塩基対合する、特異的標的部位へと導き得る。場合によって、ガイドポリ核酸はgRNAおよび／またはgDNAであり得る。場合によって、ガイドポリ核酸は、少なくとも1つの遺伝子と相補的な配列を有し得る。場合によって、前記少なくとも1つの遺伝子は、アデノシンA2a受容体（ADORA）、CD276、Vセットドメイン含有T細胞活性化インヒビター1（VTGN1）、Bリンパ球およびTリンパ球関連（BTLA）、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ1（IDO1）、KIR3DL1（キラー細胞免疫グロブリン様受容体、3ドメイン、長細胞質テール、1）、リンパ球活性化遺伝子3（LAG3）、A型肝炎ウイルス細胞受容体2（HAVCR2）、VISTA（T細胞活性化のVドメイン免疫グロブリンサプレッサー）、ナチュラルキラー細胞受容体2B4（CD244）、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ1（HPR1）、アデノ随伴ウイルス組込み部位1（AAVS1）、またはケモカイン（C-Cモチーフ）受容体5（遺伝子／偽遺伝子）（CCR5）、CD160分子（CD160）、TIGIT（IgおよびITIMドメインを有するT細胞免疫受容体）、CD96分子（CD96）、CRTAM（細胞傷害性および制御性T細胞分子）、白血球関連免疫グロブリン様受容体1（LAIR1）、シアル酸結合Ig様レクチン7（SIGLEC7）、シアル酸結合Ig様レクチン9（SIGLEC9）、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー10b（TNFRSF10B）、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー10a（TNFRSF10A）、カスパーゼ8（CASP8）、カスパーゼ10（CASP10）、カスパーゼ3（CASP3）、カスパーゼ6（CASP6）、カスパーゼ7（CASP7）、FADD（Fas関連細胞死ドメイン）、Fas細胞表面細胞死受容体（FAS）、形質転換増殖因子ベータ受容体II（TGFBRII）、形質転換増殖因子ベータ受容体I（TGFBRI）、SMADファミリーメンバー2（SMAD2）、SMADファミリーメンバー3（SMAD3）、SMADファミリーメンバー4（SMAD4）、SKIがん原遺伝子（SKI）、SKI様がん原遺伝子（SKIL）、TGIF1（TGFB誘導因子ホメオボックス1）、プログラム細胞死1（PD-1）、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（CTLA4）、インターロイキン10受容体サブユニットアルファ（IL10RA）、インターロイキン10受容体サブユニットベータ（IL10RB）、HMOX2（ヘムオキシゲナーゼ2）、インターロイキン6受容体（IL6R）、IL6ST（インターロイキン6シグナル伝達因子）、c-srcチロシンキナーゼ（CSK）、PAG1（グリコスフィンゴ脂質ミクロドメインにより膜アンカーされるリンタンパク質1）、SIT1（シグナル閾値調節膜貫通アダプター1）、FOX P3（フォークヘッドボックスP3）、PRドメイン1（PRDM1）、BATF（塩基性ロイシンジッパー転写因子、ATF様）、可溶性グアニル酸シクラーゼ1アルファ2（GUCY1A2）、可溶性グアニル酸シクラーゼ1

20

30

40

50

アルファ 3 (GUCY1A3)、可溶型グアニル酸シクラーゼ 1 ベータ 2 (GUCY1B2)、タンパク質のプロリルヒドロキシラーゼドメイン (PHD1、PHD2、PHD3) ファミリー、または可溶型グアニル酸シクラーゼ 1 ベータ 3 (GUCY1B3)、T 細胞受容体アルファ遺伝子座 (TRA)、T 細胞受容体ベータ遺伝子座 (TRB)、e g l-9 ファミリーの低酸素症誘導性因子 1 (EGLN1)、e g l-9 ファミリーの低酸素症誘導性因子 2 (EGLN2)、e g l-9 ファミリーの低酸素症誘導性因子 3 (EGLN3)、PPP1R12C (タンパク質ホスファターゼ 1 調節サブユニット 12C)、およびこれらの任意の組合せまたは誘導体からなる群から選択される。場合によって、ガイドポリ核酸は、PD-1、CTLA-4、および／もしくはAAVS1、またはこれらの組合せから選択される少なくとも 1 つの遺伝子と相補的な配列を含む。場合によって、ガイドポリ核酸は、少なくとも 1 つの遺伝子 (例えば、PD-1、CTLA-4、および／またはAAVS1) と相補的な配列を含む。場合によって、CRISPR 系は、ガイドポリ核酸を含む。場合によって、CRISPR 系は、ガイドポリ核酸および／またはヌクレアーゼもしくはヌクレアーゼをコードするポリペプチドを含む。場合によって、本開示の方法または系は、ガイドポリ核酸および／またはヌクレアーゼもしくはヌクレアーゼをコードするポリペプチドをさらに含む。場合によって、ガイドポリ核酸は、ヌクレアーゼまたはヌクレアーゼをコードするポリペプチドを細胞または細胞集団へと導入するのと同時に、その前に、またはその後に導入される。場合によって、ガイドポリ核酸は、ウイルス (例えば、AAV) ベクター、または非ウイルス (例えば、ミニサークル) ベクターを細胞または細胞集団へと導入するのと同時に、その前に、またはその後に導入される (例えば、ガイドポリ核酸は、少なくとも 1 つの外因性トランス遺伝子を含む AAV ベクターを細胞または細胞集団へと導入するのと同時に、その前に、またはその後に導入される)。

10

20

【0366】

ガイド RNA は、2 つの RNA、例えば、CRISPR RNA (crRNA) およびトランス活性化 crRNA (tracrRNA) を含む得る。ガイド RNA は、ある場合には、crRNA および tracrRNA の部分 (例えば、機能的な部分) の融合により形成される、単一のガイド RNA (sgRNA) を含む得る。ガイド RNA はまた、crRNA および tracrRNA を含む二重 RNA でもあり得る。ガイド RNA は、crRNA を含むことが可能であり、tracrRNA を欠きうる。さらに、crRNA は、標的 DNA またはプロトスペーサー配列とハイブリダイズし得る。

30

【0367】

上記で論じた通り、ガイド RNA は、発現産物であり得る。例えば、ガイド RNA をコードする DNA は、ガイド RNA をコードする配列を含むベクターであり得る。ガイド RNA は、細胞または生物に、ガイド RNA をコードする配列およびプロモーターを含む単離ガイド RNA または単離プラスミド DNA をトランスフェクトすることにより、細胞または生物へと移入させることができる。ガイド RNA はまた、ウイルスを媒介する遺伝子送達を使用するなど、他の形で、細胞または生物へと移入させることもできる。

【0368】

ガイド RNA は、単離ガイド RNA であり得る。例えば、ガイド RNA は、単離 RNA の形態で、細胞または生物へとトランスフェクトすることができる。ガイド RNA は、任意の in vitro 転写系を使用する、in vitro 転写により調製することができる。ガイド RNA は、細胞へと、ガイド RNA のコード配列を含むプラスミドの形態ではなく、単離 RNA の形態で移入させることができる。

40

【0369】

ガイド RNA は、DNA ターゲティングセグメントおよびタンパク質結合性セグメントを含む得る。DNA ターゲティングセグメント (または DNA ターゲティング配列、またはスペーサー配列) は、標的 DNA 内の特異的配列 (例えば、プロトスペーサー) と相補的であり得るヌクレオチド配列を含む。タンパク質結合性セグメント (またはタンパク質結合性配列) は、部位指向型修飾性ポリペプチド、例えば、Cas タンパク質など、RNA にガイドされるエンドヌクレアーゼと相互作用し得る。「セグメント」とは、分子のセ

50

グメント／区画／領域、例えば、RNA内のヌクレオチドの連続的連なりを意味する。セグメントはまた、セグメントが、1つを超える分子の領域を含み得るように、複合体の領域／区画も意味する。例えば、場合によって、DNAターゲティングRNAのタンパク質結合性セグメントは、1つのRNA分子およびタンパク質結合性セグメントであり、したがって、このRNA分子の領域を含む。他の場合には、DNAターゲティングRNAのタンパク質結合性セグメントは、相補性領域に沿ってハイブリダイズさせた、2つの個別の分子を含む。

【0370】

ガイドRNAは、2つの個別のRNA分子を含む場合もあり、単一のRNA分子を含む場合もある。例示的な単一分子のガイドRNAは、DNAターゲティングセグメントおよびタンパク質結合性セグメントの両方を含む。

10

【0371】

例示的な2分子型DNAターゲティングRNAは、crRNA様（「CRISPR RNA」または「ターゲターRNA」または「crRNA」または「crRNAリピート」）分子および対応するtracrRNA様（「トランス活性化CRISPR RNA」または「アクチベーターRNA」または「tracrRNA」）分子を含み得る。第1のRNA分子は、DNAターゲティングセグメント（例えば、スペーサー）を含み得るcrRNA様分子（ターゲターRNA）と、ガイドRNAのタンパク質結合性セグメントを含む二本鎖RNA（dsRNA）による二重鎖の半分を形成し得る、ヌクレオチドの連なりとであり得る。第2のRNA分子は、ガイドRNAのタンパク質結合性セグメントのdsRNA二重鎖の他の半分を形成し得る、ヌクレオチドの連なりを含み得る、対応するtracrRNA様分子（アクチベーターRNA）であり得る。言い換えれば、crRNA様分子のヌクレオチドの連なりは、tracrRNA様分子のヌクレオチドの連なりと相補的であることが可能であり、これとハイブリダイズして、ガイドRNAのタンパク質結合性ドメインのdsRNA二重鎖を形成し得る。したがって、各crRNA様分子は、対応するtracrRNA様分子を有するということができる。加えて、crRNA様分子は、一本鎖DNAターゲティングセグメントまたはスペーサー配列ももたらし得る。したがって、crRNA様分子と、tracrRNA様分子（対応する対としての）とは、ハイブリダイズして、ガイドRNAを形成し得る。対象の2分子型ガイドRNAは、任意の対応する、crRNAとtracrRNAとの対を含み得る。

20

30

【0372】

ガイドRNAのDNAターゲティングセグメントまたはスペーサー配列は、ガイドRNAのDNAターゲティングセグメントが、標的部位またはプロトスペーサーと塩基対合し得るように、染色体配列内の標的部位における配列、例えば、プロトスペーサー配列と相補的であり得る。場合によって、ガイドRNAのDNAターゲティングセグメントは、10ヌクレオチドまたはほぼこの数のヌクレオチド〜25もしくはほぼこの数のヌクレオチドまたはそれよりも多いヌクレオチドを含み得る。例えば、ガイドRNAの第1の領域と、染色体配列内の標的部位との塩基対合の領域は、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、23、24、25、もしくは25を超えるヌクレオチドの長さであり得るか、またはほぼこの長さであり得る。ある場合には、ガイドRNAの第1の領域は、19、20、もしくは21ヌクレオチドの長さであり得るか、またはほぼこの長さであり得る。

40

【0373】

ガイドRNAは、20ヌクレオチドの核酸配列をまたはほぼこの長さの核酸配列をターゲティングし得る。標的核酸は、20ヌクレオチド未満またはほぼこの長さ未満であり得る。標的核酸は、少なくとも5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、もしくはそれよりも多いヌクレオチド、または少なくともほぼこの長さであり得る。標的核酸は、最大で、5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、もしくはそれよりも多いヌクレオチド、または最大でこの長さであり得る。標的核酸配列は、PAMの最初のヌクレオチドのす

50

ぐの 5' 側の 20 塩基であり得るか、またはほぼこの長さであり得る。ガイド RNA は、核酸配列をターゲティングし得る。場合によって、ガイド RNA などのガイディングポリ核酸は、約 1 塩基対～約 20 塩基対、PAM から離れたゲノム領域に結合し得る。ガイドは、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または最大約 20 塩基対、PAM から離れたゲノム領域に結合し得る。

【0374】

ガイド核酸、例えば、ガイド RNA は、別の核酸、例えば、細胞ゲノム内の標的核酸またはプロトスペーサーにハイブリダイズし得る核酸を指す場合がある。ガイド核酸は、RNA であり得る。ガイド核酸は、DNA であり得る。ガイド核酸は、核酸部位の配列に特異的に結合するように、プログラムまたはデザインすることができる。ガイド核酸は、ポリヌクレオチド鎖を含むことが可能であり、単一のガイド核酸と呼ばれうる。ガイド核酸は、2 つのポリヌクレオチド鎖を含むことが可能であり、二重ガイド核酸と呼ばれうる。

【0375】

ガイド核酸は、核酸に新たな特色または増強された特色をもたらす、1 または複数の修飾を含み得る。ガイド核酸は、核酸アフィニティータグを含み得る。ガイド核酸は、合成ヌクレオチド、合成ヌクレオチド類似体、ヌクレオチド誘導体、および／または修飾ヌクレオチドを含み得る。

【0376】

ガイド核酸は、例えば、5' 末端もしくは 3' 末端において、またはこの近傍に、標的核酸内の配列（例えば、プロトスペーサー）にハイブリダイズし得るヌクレオチド配列（例えば、スペーサー）を含み得る。ガイド核酸のスペーサーは、ハイブリダイゼーション（すなわち、塩基対合）を介して、配列特異的に、標的核酸と相互作用し得る。スペーサー配列は、プロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）の 5' 側または 3' 側に位置する標的核酸にハイブリダイズし得る。スペーサー配列の長さは、少なくとも 5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、もしくはそれよりも多いヌクレオチド、または少なくともほぼこの長さであり得る。スペーサー配列の長さは、最大で 5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、もしくはそれよりも多いヌクレオチド、または最大でほぼこの長さであり得る。

【0377】

ガイド RNA はまた、二次構造を形成する dsRNA 二重鎖領域も含み得る。例えば、ガイド RNA により形成される二次構造は、ステム（またはヘアピン）およびループを含み得る。ループおよびステムの長さは、変動し得る。例えば、ループは、約 3～約 10 ヌクレオチドの長さの範囲であることが可能であり、ステムは、約 6～約 20 塩基対の長さの範囲であり得る。ステムは、1～約 10 ヌクレオチドの、1 または複数のバルジを含み得る。第 2 の領域の全長は、約 16～約 60 ヌクレオチドの長さの範囲であり得る。例えば、ループは、4 ヌクレオチドの長さであり得るか、またはほぼこの長さであることが可能であり、ステムは、12 塩基対であり得るか、またはほぼこの長さであり得る。dsRNA 二重鎖領域は、RNA にガイドされるエンドヌクレアーゼ、例えば、Cas タンパク質など、RNA 結合性タンパク質と複合体を形成し得る、タンパク質結合性セグメントを含み得る。

【0378】

ガイド RNA はまた、5' 末端または 3' 末端において、本質的に一本鎖であり得るテール領域も含み得る。例えば、テール領域は、ある場合には、目的の細胞内の任意の染色体配列と相補性ではなく、ある場合には、ガイド RNA の残余部分と相補性ではない。さらに、テール領域の長さは、変動し得る。テール領域は、4 ヌクレオチドの長さを超えうるか、またはほぼこの長さを超えうる。例えば、テール領域の長さは、5 または約 5～60 または約 60 ヌクレオチドの長さの範囲であり得る。

【0379】

ガイドRNAは、細胞または胚へと、RNA分子として導入することができる。例えば、RNA分子は、*in vitro*で転写することもでき、かつ／または化学的に合成することもできる。次いで、ガイドRNAは、細胞または胚へと、RNA分子として導入することができる。ガイドRNAはまた、細胞または胚へと、RNA以外の核酸分子、例えば、DNA分子の形態で導入することもできる。例えば、ガイドRNAをコードするDNAは、目的の細胞内または胚内のガイドRNAの発現のためのプロモーター制御配列に作動可能に連結することができる。RNAコード配列は、RNAポリメラーゼIII（Pol III）により認識されるプロモーター配列に作動可能に連結することができる。

【0380】

ガイドRNAをコードするDNA分子はまた、直鎖状でもあり得る。ガイドRNAをコードするDNA分子はまた、環状でもあり得る。

10

【0381】

ガイドRNAをコードするDNA配列はまた、ベクターの一部でもあり得る。ベクターの一部の例は、プラスミドベクター、ファージミド、コスミド、人工／ミニ染色体、トランスポゾン、およびウイルスベクターを含み得る。例えば、RNAにガイドされるエンドヌクレアーゼをコードするDNAは、プラスミドベクター内に存在する。適切なプラスミドベクターの、他の非限定的な例は、pUC、pBR322、pET、pBluescript、およびこれらの変異体を含む。さらに、ベクターは、さらなる発現制御配列（例えば、エンハンサー配列、Kozak配列、ポリアデニル化配列、転写終結配列など）、選択用マーカー配列（例えば、抗生物質耐性遺伝子）、複製起点などを含み得る。

20

【0382】

RNAにガイドされるエンドヌクレアーゼおよびガイドRNAの両方を、細胞へと、DNA分子として導入する場合、各々は、個別の分子（例えば、融合タンパク質のコード配列を含有する1つのベクターと、ガイドRNAのコード配列を含有する第2のベクターと）の一部の場合もあり、同じ分子（例えば、融合タンパク質およびガイドRNAの両方のコード（および調節）配列を含有する1つのベクター）の一部の場合もある。

【0383】

Cas9タンパク質またはその任意の誘導体などのCasタンパク質は、リボ核タンパク質（RNP）複合体を形成するように、ガイドRNAと、あらかじめ複合体化させることができる。RNP複合体は、初代免疫細胞へと導入することができる。RNP複合体の導入は、時限的であり得る。細胞は、細胞周期のG1期、S期、および／またはM期において、他の細胞と同期し得る。RNP複合体は、HDRを増強するような細胞期において送達することができる。RNP複合体は、相同性により導かれる修復を容易とし得る。

30

【0384】

ガイドRNAはまた、修飾することもできる。修飾は、化学的変更、合成修飾、ヌクレオチド付加、および／またはヌクレオチド控除を含み得る。修飾はまた、CRISPRゲノムの操作も増強し得る。修飾は、gRNAのキラリティーを変更し得る。場合によって、キラリティーは、修飾後において、一様または立体的に純粋であり得る。ガイドRNAは、合成したものであり得る。合成ガイドRNAは、CRISPRゲノムの操作を増強し得る。ガイドRNAはまた、切断型でもあり得る。切断を使用して、所望されないオフターゲットの変異誘発を低減することができる。切断は、任意の数のヌクレオチド欠失を含み得る。例えば、切断は、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、40、50、またはそれよりも多いヌクレオチドを含み得る。ガイドRNAは、任意の長さの標的相補性領域を含み得る。例えば、標的相補性領域は、20ヌクレオチド未満の長さであり得る。標的相補性領域は、20ヌクレオチドを超える長さであり得る。標的相補性領域は、PAM配列に直接近接した約5bp～約20bpをターゲティングし得る。標的相補性領域は、PAM配列に直接近接した約13bpをターゲティングし得る。

40

【0385】

場合によって、GUIDE-Seq解析を実施して、操作ガイドRNAの特異性を決定することができる。CRISPR系ヌクレアーゼによる、オフターゲット切断についての

50

、GUIDE-Seqプロファイリングの一般的な機構およびプロトコールについては、Tsai, S. ら、「GUIDE-Seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR system nucleases」、Nature、33巻：187～197頁（2015年）において論じられている。

【0386】

gRNAは、任意の機能的な濃度で導入することができる。例えば、gRNAは、細胞へと、10マイクログラムで導入することができる。他の場合には、gRNAは、0.5マイクログラム～100マイクログラムで導入することができる。gRNAは、0.5、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100マイクログラムで導入することができる。

10

【0387】

場合によって、方法は、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx1S、Csf1、Csf2、CsO、Csf4、Cpf1、c2c1、c2c3、Cas9HiFi、これらの相同体、またはこれらの修飾形からなる群から選択されるヌクレアーゼまたはエンドヌクレアーゼを含み得る。Casタンパク質は、Cas9であり得る。場合によって、方法は、少なくとも1つのガイドRNA（gRNA）をさらに含み得る。gRNAは、少なくとも1つの修飾を含み得る。外因性TCRは、がんネオ抗原に結合し得る。外因性トランス遺伝子（例えば、TCRまたはがん遺伝子）は、がんネオ抗原に結合し得る。

20

【0388】

本明細書では、操作細胞を作製する方法であって、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子（例えば、T細胞受容体（TCR）またはがん遺伝子）配列をコードする、少なくとも1つのポリ核酸を導入するステップと；少なくとも1つの修飾を含む、少なくとも1つのガイドRNA（gRNA）を導入するステップと；少なくとも1つのエンドヌクレアーゼを導入するステップとを含み；gRNAが、少なくとも1つの内因性ゲノムと相補的な、少なくとも1つの配列を含む方法が開示される。場合によって、修飾は、5'末端上の修飾、3'末端上の修飾、5'末端～3'末端における修飾、単一塩基の修飾、2'ーリボース修飾、またはこれらの任意の組合せである。修飾は、塩基の置換、挿入、欠失、化学修飾、物理修飾、安定化、精製、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択することができる。

30

【0389】

場合によって、修飾は、化学修飾である。修飾は、5'アデニル酸、5'グアノシン三リン酸キャップ、5'N7-メチルグアノシン三リン酸キャップ、5'三リン酸キャップ、3'リン酸、3'チオリン酸、5'リン酸、5'チオリン酸、Cis-Synチミジン二量体、三量体、C12スペーサー、C3スペーサー、C6スペーサー、dSpacer、PCスペーサー、rSpacer、Spacer18、Spacer9、3'-3'修飾、5'-5'修飾、脱塩基、アクリジン、アゾベンゼン、ビオチン、ビオチンBB、ビオチンTEG、コレステリルTEG、デスチオビオチンTEG、DNP TEG、DNP-X、DOTA、dT-ビオチン、二重ビオチン、PCビオチン、ソラーレンC2、ソラーレンC6、TINA、3'DABCYL、Black Hole Quencher1、Black Hole Quencher2、DABCYL SE、dT-DABCYL、IRDye QC-1、QSY-21、QSY-35、QSY-7、QSY-9、カルボキシリリンカー、チオールリリンカー、2'デオキシリボヌクレオシド類似体プリン、2'デオキシリボヌクレオシド類似体ピリミジン、リボヌクレオシド類似体、2

40

50

’-0-メチルリボヌクレオシド類似体、糖修飾類似体、ゆらぎ／ユニバーサル塩基、蛍光色素標識、2’フルオロRNA、2’O-メチルRNA、メチルホスホネート、ホスホジエステルDNA、ホスホジエステルRNA、ホスホチオエート（phosphothioate）DNA、ホスホロチオエートRNA、UNA、シュードウリジン-5’-三リン酸、5-メチルシチジン-5’-三リン酸、2-O-メチル3ホスホロチオエート、またはこれらの任意の組合せから選択することができる。修飾は、図98に示される、シュードウリジン（pseudouride）修飾であり得る。場合によって、修飾は、生存率に影響を及ぼさなくてもよい（図99Aおよび図99B）。

【0390】

場合によって、修飾は、2-O-メチル3ホスホロチオエート付加である。2-O-メチル3ホスホロチオエート付加は、1塩基～150塩基において実施することができる。2-O-メチル3ホスホロチオエート付加は、1塩基～4塩基において実施することができる。2-O-メチル3ホスホロチオエート付加は、2つの塩基上で実施することができる。2-O-メチル3ホスホロチオエート付加は、4つの塩基上で実施することができる。修飾はまた、切断でもあり得る。切断は、5つの塩基の切断であり得る。

【0391】

場合によって、5つの塩基の切断（truncation）は、Casタンパク質による切断（cut）の実施を防止し得る。エンドヌクレアーゼまたはヌクレアーゼもしくはヌクレアーゼをコードするポリペプチドは、CRISPR系、TALEN、亜鉛フィンガー、トランスポゾンベースのZEN、メガヌクレアーゼ、Mega-TAL、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択することができる。場合によって、エンドヌクレアーゼまたはヌクレアーゼもしくはヌクレアーゼをコードするポリペプチドは、CRISPR系由来であり得る。エンドヌクレアーゼまたはヌクレアーゼもしくはヌクレアーゼをコードするポリペプチドは、CasまたはCasをコードするポリペプチドであり得る。場合によって、エンドヌクレアーゼまたはヌクレアーゼもしくはヌクレアーゼをコードするポリペプチドは、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx1S、Csfl、Csfl2、CsO、Csfl4、Cpf1、c2c1、c2c3、Cas9HiFi、それらの相同体、またはそれらの修飾形からなる群から選択され得る。Casの修飾形は、図100Aおよび100Bにおいて示される、キャップ除去型Casであり得る。Casタンパク質は、Cas9であり得る。Cas9は、前記少なくとも1つの内因性ゲノム内で、二本鎖切断を創出し得る。場合によって、エンドヌクレアーゼまたはヌクレアーゼもしくはヌクレアーゼをコードするポリペプチドは、Cas9またはCas9をコードするポリペプチドであり得る。場合によって、エンドヌクレアーゼまたはヌクレアーゼもしくはヌクレアーゼをコードするポリペプチドは、触媒不活性な場合もある。場合によって、エンドヌクレアーゼまたはヌクレアーゼもしくはヌクレアーゼをコードするポリペプチドは、触媒不活性なCas9または、触媒不活性なCas9をコードするポリペプチドであり得る。場合によって、内因性ゲノムは、少なくとも1つの遺伝子を含む。遺伝子は、CISH、PD-1、TRA、TRB、またはこれらの組合せであり得る。場合によって、二本鎖切断は、相同性により導かれる修復（HR）、非相同末端結合（NHEJ）、マイクロ相同性媒介型末端結合（MMJ）、またはこれらの任意の組合せもしくは誘導体を使用して修復することができる。トランス遺伝子（例えば、TCRまたはがん遺伝子）は、二本鎖切断へと組み込むことができる。

【0392】

c. トランス遺伝子

トランス遺伝子の挿入（例えば、外因性配列）は、例えば、ポリペプチドを発現させる

ために使用することもでき、変異体遺伝子を是正するために使用することもでき、野生型遺伝子の発現を増大させるために使用することもできる。トランス遺伝子は、それが置かれるゲノム配列とは同一でないことが典型的である。ドナートランス遺伝子は、目的の場所において、効率的H D Rを可能とするように、相同性である2つの領域で挟んだ非相同配列を含有し得る。加えて、トランス遺伝子配列は、細胞内クロマチンの、目的の領域と相同ではない配列を含有するベクター分子を含み得る。トランス遺伝子は、細胞内クロマチンと相同性である、いくつかの不連続領域を含有し得る。例えば、目的の領域内に正常では存在しない配列のターゲティング挿入のために、配列は、ドナー核酸分子内に存在することが可能であり、目的の領域内の配列に対して相同性の領域で挟むことができる。

【0393】

トランス遺伝子のポリ核酸は、DNAまたはRNA、一本鎖または二本鎖であることが可能であり、細胞へと、直鎖状形態または環状形態で導入することができる。トランス遺伝子配列は、細胞へと、環状形態または直鎖状形態で導入され得る、DNAミニサークル内に含有され得る。直鎖状形態で導入する場合、トランス遺伝子配列の末端を、任意の方法で保護する（例えば、エキソヌクレアーゼ分解から）ことができる。例えば、1または複数のジデオキシヌクレオチド残基を、直鎖状分子の3'末端へと付加することもでき、かつ／または自己相補的オリゴヌクレオチドを、一方または両方の末端へとライゲーションすることもできる。外因性ポリヌクレオチドを、分解から保護するためのさらなる方法は、末端アミノ基の付加、ならびに、例えば、ホスホロチオエート残基、ホスホルアミダイト残基、およびO-メチルリボース残基またはデオキシリボース残基など、修飾ヌクレオチド間連結の使用を含むがこれらに限定されない。

【0394】

トランス遺伝子は、組換えアームで挟むことができる。場合によって、組換えアームは、トランス遺伝子を、所望の組込み部位へとターゲティングする、相補的領域を含み得る。トランス遺伝子はまた、挿入が、内因性遺伝子を破壊するように、ゲノム領域へと組み込むこともできる。トランス遺伝子は、任意の方法、例えば、非組換え末端結合および／または組換え指向修復により組み込むことができる。トランス遺伝子はまた、二本鎖切断を修復する組換えイベント時に組み込むこともできる。トランス遺伝子はまた、相同組換えエンハンサーを使用することにより組み込むこともできる。例えば、エンハンサーは、相同性により導かれる修復を実施して、二本鎖切断を修復するように、非相同末端結合を遮断し得る。

【0395】

トランス遺伝子は、組換えアームで挟むことができ、この場合、アームと、その相補的配列との相同性の程度は、2つの間の相同組換えを可能とするのに十分である。例えば、アームと、その相補的配列との相同性の程度は、50%またはこれを超えうる。2つの相同な非同一配列は、任意の長さであることが可能であり、それらの非相同性の程度は、単一のヌクレオチドという低度の場合（例えば、ターゲティングされた相同組換えにより、ゲノムの点変異を是正する場合）もあり、10キロベースまたはそれよりも多いという高度な場合（例えば、染色体内の所定の異所性部位に遺伝子を挿入する場合）もある。相同な非同一配列を含む、2つのポリヌクレオチドは、同じ長さである必要がない。例えば、CCR5に対する組換えアームを伴う、代表的なトランス遺伝子を、図16に示す。他の任意の遺伝子、例えば、本明細書に記載される遺伝子を使用して、組換えアームを作製することができる。

【0396】

トランス遺伝子は、ゲノム内の標的二本鎖切断領域と相補的な操作部位で挟むことができる。場合によって、操作部位は、組換えアームではない。操作部位は、二本鎖切断領域に対する相同性を有し得る。操作部位は、遺伝子に対する相同性を有し得る。操作部位は、ゲノムコード領域に対する相同性を有し得る。操作部位は、ゲノム非コード領域に対する相同性を有し得る。場合によって、トランス遺伝子は、ポリ核酸から切り出すことができるので、相同組換えを伴わずに、二本鎖切断領域に挿入することができる。トランス

遺伝子は、相同組換えを伴わずに、二本鎖切断へと組み込むことができる。

【0397】

ポリヌクレオチドは、細胞へと、例えば、複製起点、プロモーター、および抗生物質耐性をコードする遺伝子など、さらなる配列を有するベクター分子の一部として導入することができる。さらに、トランス遺伝子のポリヌクレオチドは、ネイキッド核酸として導入することもでき、リポソームまたはポロキサマーなどの薬剤と複合体化させた核酸として導入することもでき、ウイルス（例えば、アデノウイルス、AAV、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、およびインテグラーゼ欠損レンチウイルス（IDLV））により送達することもできる。トランス遺伝子を送達し得るウイルスは、AAVウイルスであり得る。

10

【0398】

トランス遺伝子は一般に、その発現が、組込み部位における内因性プロモーター、すなわち、トランス遺伝子が挿入される内因性遺伝子（例えば、AAVS部位（例えば、AAVS1、AAVS2など）、CCR5、HPRT）の発現を駆動するプロモーターにより駆動されるように挿入する。トランス遺伝子は、プロモーターおよび／またはエンハンサー、例えば、構成的プロモーターもしくは誘導性プロモーターまたは組織／細胞特異的プロモーターを含み得る。ミニサークルベクターは、トランス遺伝子をコードし得る。

【0399】

非コード核酸配列の挿入のターゲティングもまた達成することができる。アンチセンスRNA、RNAi、shRNA、およびマイクロRNA（miRNA）をコードする配列もまた、挿入のターゲティングに使用することができる。

20

【0400】

トランス遺伝子は、内因性遺伝子の全て、一部を発現させるように、内因性遺伝子へと挿入することもでき、内因性遺伝子が発現させないように内因性遺伝子へと挿入することもできる。例えば、本明細書で記載されるトランス遺伝子は、内因性配列のうちの一部（トランス遺伝子に対するN末端側および／またはC末端側）を、例えば、トランス遺伝子との融合体として発現させるように、内因性遺伝子座へと挿入することもでき、内因性配列を、例えば、トランス遺伝子との融合体として発現させないように、内因性遺伝子座へと挿入することもできる。他の場合には、トランス遺伝子（例えば、内因性遺伝子などの、さらなるコード配列を伴うかまたは伴わない）を、任意の内因性遺伝子座、例えば、セーフハーバー遺伝子座へと組み込む。例えば、TCRトランス遺伝子は、内因性TCR遺伝子へと挿入することができる。例えば、図17は、トランス遺伝子を、内因性CCR5遺伝子へと挿入し得ることを示す。トランス遺伝子は、任意の遺伝子、例えば、本明細書で記載される遺伝子へと挿入することができる。

30

【0401】

内因性配列をトランス遺伝子と共に（内因性配列またはトランス遺伝子の一部を）発現させる場合、内因性配列は、全長配列（野生型または変異体）の場合もあり、部分配列の場合もある。内因性配列は、機能的であり得る。これらの全長配列または部分配列の機能の非限定的な例は、トランス遺伝子（例えば、治療用遺伝子）が発現するポリペプチドの血清半減期を延長すること、および／または担体として作用することを含む。

40

【0402】

さらに、発現には要求されないが、外因性配列はまた、転写調節配列または翻訳調節配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、インシュレーター、内部リポソーム進入部位、2Aペプチドおよび／またはポリアデニル化シグナルをコードする配列も含み得る。

【0403】

場合によって、外因性配列（例えば、トランス遺伝子）は、目的のタンパク質の融合体と、その融合パートナーとして、融合タンパク質を細胞の表面に位置させる、膜タンパク質の細胞外ドメインとを含む。場合によって、トランス遺伝子は、TCRをコードするが、この場合、TCRを発現させるように、TCRコード配列を、セーフハーバーへと挿入する。場合によって、トランス遺伝子は、がん遺伝子をコードするが、この場合、がん遺

50

伝子を発現させるように、がん遺伝子コード配列を、セーフハーバーへと挿入する。場合によって、TCRおよび／またはがん遺伝子コード配列を、PD1遺伝子座および／またはCTLA-4遺伝子座へと挿入する。場合によって、トランス遺伝子を、PD1遺伝子座および／またはCTLA-4遺伝子座へと挿入する。場合によって、TCRおよび／またはがん遺伝子を、ランダム挿入のために、レンチウイルスで、細胞へと送達するが、PD1特異的ヌクレアーゼまたはCTLA-4特異的ヌクレアーゼを、mRNAとして供給することができる。場合によって、トランス遺伝子を、ランダム挿入のために、レンチウイルスで、細胞へと送達するが、PD1特異的ヌクレアーゼまたはCTLA-4特異的ヌクレアーゼを、mRNAとして供給することができる。場合によって、TCRおよび／またはがん遺伝子および／またはトランス遺伝子を、レトロウイルス、AAV、またはアデノウイルスなどのウイルスベクター系を介して、セーフハーバー（例えば、AAVS部位（例えば、AAVS1、AAVS2など）、CCR5、アルブミン、またはHPRT）に特異的なヌクレアーゼをコードするmRNAと共に送達する。細胞はまた、PD1特異的ヌクレアーゼおよび／またはCTLA-4特異的ヌクレアーゼをコードするmRNAで処置することもできる。場合によって、TCRおよび／またはがん遺伝子および／またはトランス遺伝子をコードするポリヌクレオチドを、ウイルス送達系を介して、HPRT特異的ヌクレアーゼおよびPD1特異的ヌクレアーゼまたはCTLA-4特異的ヌクレアーゼをコードするmRNAと併せて供給する。HPRT遺伝子座へと組み込んだ、TCRをコードするヌクレオチドを含む細胞は、細胞の停止を結果としてもたらし得、かつ／または無傷HPRT遺伝子を有する細胞内でアポトーシスを惹起し得るグアニン類似体である6-チオグアニンを使用して選択することができる。本開示の方法および組成物と共に使用され得るTCRは、第1世代、第2世代、および第3世代のデザインを含むこれらのキメラタンパク質の全ての種類を含む。本開示ではまた、受容体、リガンド、および操作ポリペプチドに由来する特異性ドメインも想定され得るが、抗体に由来する特異性ドメインを含むTCRが、特に有用であり得る。細胞間シグナル伝達ドメインは、ゼータ鎖、ならびにγ鎖およびE鎖などのCD3複合体の他のメンバーなどのTCR鎖に由来し得る。場合によって、TCRは、CD28、CD137（4-1BBとしてもまた公知である）、またはCD134に由来する細胞間ドメインなど、さらなる共刺激性ドメインを含み得る。なおさらなる場合には、2つの種類の共刺激因子ドメインを同時に使用することもできる（例えば、CD28+CD137と共に使用されるCD3ゼータ）。

【0404】

場合によって、操作細胞は、CD45RO（-）、CCR7（+）、CD45RA（+）、CD62L+（L-セレクトイン）、CD27+、CD28+、およびIL-7Rα+から構成される、ステムメモリー（stem memory）T_{SCM}細胞であることが可能であり、ステムメモリー細胞はまた、CD95、IL-2Rβ、CXCR3、およびLFA-1も発現することが可能であり、ステムメモリー細胞特有の、多数の機能的な属性を示す。操作細胞はまた、L-セレクトインおよびCCR7を含む、セントラルメモリー細胞であるT_{CM}細胞でもあることが可能であり、この場合、セントラルメモリー細胞は、例えば、IL-2を分泌し得るが、IFNγまたはIL-4は分泌しえない。操作細胞はまた、L-セレクトインまたはCCR7を含む、エフェクターメモリー細胞であるT_{EM}細胞でもあることが可能であり、例えば、IFNγおよびIL-4など、エフェクターサイトカインを産生し得る。場合によって、細胞集団を、対象へと導入することができる。例えば、細胞集団は、T細胞とNK細胞との組合せであり得る。他の場合には、集団は、ナイーブ細胞とエフェクター細胞との組合せであり得る。

【0405】

相同組換えHRエンハンサーの送達

場合によって、相同組換えHRエンハンサーを使用して、非相同末端結合（NHEJ）を抑制することができる。非相同末端結合は、二本鎖切断部の末端におけるヌクレオチドの喪失を結果としてもたらすことが可能であり、非相同末端結合はまた、フレームシフトも結果としてもたらし得る。したがって、相同性により導かれる修復は、遺伝子をノック

インする場合に使用するのに、より魅力的な機構であり得る。非相同末端結合を抑制するために、HRエンハンサーを送達することができる。場合によって、1つを超えるHRエンハンサーを送達することができる。HRエンハンサーは、非相同末端結合に関与するタンパク質、例えば、KU70、KU80、および／またはDNAリガーゼIVを阻害し得る。場合によって、Scr7などのリガーゼIVインヒビターを送達することができる。場合によって、HRエンハンサーは、L755507であり得る。場合によって、異なるリガーゼIVインヒビターを使用することができる。場合によって、HRエンハンサーは、4型アデノウイルスのタンパク質、例えば、E1B55Kおよび／またはE4orf6であり得る。場合によって、化学的インヒビターを使用することができる。

【0406】

KU70、KU80、および／またはDNAリガーゼIVなどの非相同末端結合分子は、様々な方法を使用することにより抑制することができる。例えば、KU70、KU80、および／またはDNAリガーゼIVなどの非相同末端結合分子は、遺伝子サイレンシングにより抑制することができる。例えば、非相同末端結合分子である、KU70、KU80、および／またはDNAリガーゼIVは、因子の転写または翻訳時において、遺伝子サイレンシングにより抑制することができる。非相同末端結合分子である、KU70、KU80、および／またはDNAリガーゼIVはまた、因子の分解により抑制することもできる。非相同末端結合分子である、KU70、KU80、および／またはDNAリガーゼIVはまた、阻害することもできる。KU70、KU80、および／またはDNAリガーゼIVのインヒビターは、E1B55Kおよび／またはE4orf6を含み得る。非相同末端結合分子である、KU70、KU80、および／またはDNAリガーゼIVはまた、封鎖により阻害することもできる。遺伝子の発現は、ノックアウトにより抑制することもでき、遺伝子のプロモーターを変更することにより抑制することもでき、かつ／または因子に対する干渉性RNAを投与することにより抑制することもできる。

【0407】

非相同末端結合を抑制するHRエンハンサーは、プラスミドDNAにより送達することができる。ある場合には、プラスミドは、二本鎖DNA分子であり得る。プラスミド分子はまた、一本鎖DNAでもあり得る。プラスミドはまた、少なくとも1つの遺伝子も保有し得る。プラスミドはまた、1つを超える遺伝子も保有し得る。少なくとも1つのプラスミドもまた、使用することができる。1つを超えるプラスミドもまた、使用することができる。非相同末端結合を抑制するHRエンハンサーは、プラスミドDNAにより、CRISPR-Cas、プライマー、および／または修飾剤化合物と共に送達することができる。修飾剤化合物は、プラスミドDNAの細胞毒性を低減することが可能であり、細胞生存率を改善し得る。HRエンハンサーおよび修飾剤化合物は、ゲノム操作の前に、細胞へと導入することができる。HRエンハンサーは、低分子であり得る。場合によって、HRエンハンサーは、T細胞懸濁液へと送達することができる。HRエンハンサーは、二本鎖DNAをトランスフェクトされた細胞の生存率を改善し得る。場合によって、二本鎖DNAの導入は、毒性であり得る（図81Aおよび図81B）。

【0408】

非相同末端結合を抑制するHRエンハンサーは、組み込まれるHR基質と共に送達することができる。基質は、ポリ核酸であり得る。ポリ核酸は、トランス遺伝子（例えば、TCRまたはがん遺伝子）を含み得る。ポリ核酸は、mRNAとして送達することができる（図10および図14を参照されたい）。ポリ核酸は、トランス遺伝子（例えば、TCRまたはがん遺伝子）の組み込みのための、ゲノムの内因性領域に対する組換えアームを含み得る。ポリ核酸は、ベクターであり得る。ベクターは、センスまたはアンチセンスの配向性で、別のベクター（例えば、ウイルスベクター）へと挿入することができる。ウイルスカセットの、in vitroにおける転写のために、ウイルスゲノムの5'LTR領域の上流に、T7、T3、または他の転写開始配列を置くことができる（図3を参照されたい）。次いで、このベクターカセットを、in vitroにおける、mRNAの転写のための鋳型として使用することができる。例えば、このmRNAを、任意の細胞へと、そ

のコグネイトの逆転写酵素と共に送達する場合、また、mRNAまたはタンパク質としても送達する場合、トランス遺伝子カセットを、ゲノム内の意図される標的部に組み込むのに所望される、相同組換えイベントのためのHR基質として使用され得る、二本鎖DNA (dsDNA) の形態で、数百〜数千コピーを作製するための鋳型として、一本鎖mRNAカセットを使用することができる。この方法は、CRISPRを媒介する相同組換えのための、毒性のプラスミドDNAの送達への必要性を回避し得る。加えて、各mRNA鋳型は、数百または数千コピーのdsDNAへとなるので、細胞内で利用可能な相同組換え鋳型の量は、極めて高量であり得る。高量の相同組換え鋳型は、所望の相同組換えイベントを駆動し得る。さらに、mRNAはまた、一本鎖DNAも作製し得る。一本鎖DNAはまた、例えば、組換えAAV (rAAV) による遺伝子ターゲティングと共に、相同組換えのための鋳型として使用することもできる。mRNAは、in situにおいて、DNA相同組換えのためのHRエンハンサーへと逆転写することができる。この戦略により、毒性のプラスミドDNAの送達を避けることができる。加えて、mRNAにより、相同組換え基質を、プラスミドDNAより高レベルへと増幅することもでき、かつ／または相同組換えの効率を改善することもできる。

10

【0409】

非相同末端結合を抑制するHRエンハンサーは、化学的インヒビターとして送達することができる。例えば、HRエンハンサーは、リガーゼI V-DNA間結合に干渉することにより作用し得る。HRエンハンサーはまた、内因性アポトーシス経路も活性化させる。HRエンハンサーはまた、リガーゼI Vインヒビターのペプチド模倣剤でもあり得る。HRエンハンサーはまた、Cas9系と共に共発現させることもできる。HRエンハンサーはまた、E1B55Kおよび／またはE4orf6など、ウイルスタンパク質と共に共発現させることもできる。HRエンハンサーはまた、SCR7、L755507、またはこれらの任意の誘導体でもあり得る。HRエンハンサーは、外因性DNAの挿入の毒性を低減する化合物と共に送達することができる。

20

【0410】

万一、細胞内で、一本鎖DNAの頑健な逆転写だけが生じる場合は、ウイルスベクターのセンス鎖およびアンチセンス鎖の両方をコードするmRNAを導入することができる (図3を参照されたい)。この場合、両方のmRNA鎖を、細胞内で逆転写して、dsDNAを作製することもでき、かつ／または自然にアニールさせて、dsDNAを作製することもできる。

30

【0411】

HRエンハンサーは、初代細胞へと送達することができる。相同組換えHRエンハンサーは、任意の適切な手段によって送達することができる。相同組換えHRエンハンサーは、mRNAとしてもまた送達することができる。相同組換えHRエンハンサーは、プラスミドDNAとしてもまた送達することができる。相同組換えHRエンハンサーはまた、免疫細胞へと、CRISPR-Casと共に送達することもできる。相同組換えHRエンハンサーはまた、免疫細胞へと、CRISPR-Cas、TCR配列および／もしくはトランス遺伝子配列および／もしくはがん遺伝子配列を含むポリ核酸、ならびに／または外因性DNA挿入の毒性を低減する化合物と共に送達することもできる。

40

【0412】

相同組換えHRエンハンサーは、任意の細胞、例えば、免疫細胞へと送達することができる。例えば、相同組換えHRエンハンサーは、初代免疫細胞へと送達することができる。相同組換えHRエンハンサーはまた、T細胞株を含むがこれらに限定されないT細胞および初代T細胞へと送達することもできる。相同組換えHRエンハンサーはまた、CD4+細胞、CD8+細胞、および／または腫瘍浸潤細胞 (TIL) へと送達することもできる。相同組換えHRエンハンサーはまた、免疫細胞へと、CRISPR-Casと共に送達することもできる。

【0413】

場合によって、相同組換えHRエンハンサーを使用して、非相同末端結合を抑制するこ

50

とができる。場合によって、相同組換えHRエンハンサーを使用して、相同性により導かれる修復を促進することができる。場合によって、相同組換えHRエンハンサーを使用して、CRISPR-Casによる二本鎖切断の後における、相同性により導かれる修復を促進することができる。場合によって、相同組換えHRエンハンサーを使用して、CRISPR-Casによる二本鎖切断の後における、1または複数の遺伝子の、相同性により導かれる修復、ならびにノックインおよびノックアウトを促進することができる。ノックインされる遺伝子は、TCRであり得る。ノックインされる遺伝子は、トランス遺伝子（例えば、TCRまたはがん遺伝子）であり得る。ノックアウトされる遺伝子はまた、任意の数の内因性チェックポイント遺伝子でもあり得る。例えば、内因性チェックポイント遺伝子は、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、VISTA、AAVS部位（例えば、AAVS1、AAVS2など）、CCR5、HPRT、PPP1R12C、またはCISHからなる群から選択することができる。場合によって、遺伝子は、PD-1であり得る。場合によって、遺伝子は、内因性TCRであり得る。場合によって、遺伝子は、コード領域を含み得る。場合によって、遺伝子は、非コード領域を含み得る。

10

【0414】

HRエンハンサーによるHR効率の増大は、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%であり得るか、またはほぼこの比率であり得る。

【0415】

HRエンハンサーによるNHEJの減少は、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%であり得るか、またはほぼこの比率であり得る。

20

【0416】

低毒性の細胞操作

外因性ポリ核酸への細胞毒性を緩和して、T細胞を含む細胞の操作を改善することができる。例えば、細胞毒性は、ポリ核酸への細胞応答を変更することにより低減することができる。

【0417】

ポリ核酸は、細胞と接触させることができる。次いで、ポリ核酸を、細胞へと導入することができる。場合によって、ポリ核酸を用いて、細胞ゲノムを変更する。ポリ核酸の挿入の後、細胞は、死滅する場合がある。例えば、ポリ核酸の挿入は、図18に示される通り、細胞のアポトーシスを引き起こし得る。ポリ核酸に誘導される毒性は、修飾剤化合物を使用することにより低減することができる。

30

【0418】

例えば、修飾剤化合物は、細胞の免疫センシング応答を破壊し得る。修飾剤化合物はまた、細胞のアポトーシスおよびピロトーシスも低減し得る。状況に応じて、修飾剤化合物は、アクチベーターの場合もあり、インヒビターの場合もある。修飾剤化合物は、図19に示される経路の任意の構成要素に作用し得る。例えば、修飾剤化合物は、カスパーゼ1、TBK1、IRF3、STING、DDX41、DNA-PK、DAI、IFI16、MRE11、cGAS、2'3'-cGAMP、TREX1、AIM2、ASC、またはこれらの任意の組合せに作用し得る。修飾剤はTBK1修飾剤であり得る。修飾剤はカスパーゼ1修飾剤であり得る。修飾剤化合物はまた、生得的シグナル伝達系にも作用する場合があります、したがって、生得的シグナル伝達修飾剤であり得る。場合によって、外因性核酸は、細胞に対して毒性であり得る。細胞の生得的免疫センシング応答を阻害する方法は、操作細胞生成物の細胞生存率を改善し得る。修飾剤化合物は、プレフェルジンAおよび／またはATM経路のインヒビターであり得る（図92A、図92B、図93A、および図93B）。

40

【0419】

外因性ポリ核酸への毒性の低減は、化合物と細胞とを接触させることにより実施するこ

50

とができる。場合によって、細胞は、ポリ核酸と接触させる前に、化合物で前処置することができる。場合によって、化合物とポリ核酸とを、細胞へと、同時に導入（例えば、同時に導入）する。修飾化合物は、ポリ核酸内に含ませることができる。場合によって、ポリ核酸は修飾化合物を含む。場合によって、化合物は、ポリ核酸、HRエンハンサー、および／またはCRISPR-Casを含むカクテルとして導入することができる。本明細書で開示される、組成物および方法は、効率的かつ低毒性の方法であって、それにより、細胞療法、例えば、がん特異的細胞療法を案出し得る方法をもたらし得る。

【0420】

本明細書で記載される方法および／または系および／または組成物において使用され得る化合物は、以下の特徴のうちの1または複数を有することが可能であり、本明細書で記載される機能のうちの1または複数を有し得る。その1または複数の機能にも拘らず、本明細書で記載される化合物は、外因性ポリヌクレオチドの毒性を減少させ得る。例えば、化合物は、外因的に導入されたポリ核酸に由来する毒性を結果としてもたらず経路をモジュレートし得る。場合によって、ポリ核酸は、DNAであり得る。ポリ核酸はまた、RNAでもあり得る。ポリ核酸は、一本鎖であり得る。ポリ核酸はまた、二本鎖でもあり得る。ポリ核酸は、ベクターであり得る。ポリ核酸はまた、ネイキッドポリ核酸でもあり得る。ポリ核酸は、タンパク質をコードし得る。ポリ核酸はまた、任意の数の修飾も有し得る。ポリ核酸の修飾は、脱メチル化、CpGメチル化の付加、細菌性メチル化の除去、および／または哺乳動物性メチル化の付加であり得る。ポリ核酸はまた、細胞へと、さらなるポリ核酸、任意の数のHRエンハンサー、および／またはCRISPR-Casを含む試験薬カクテルとして導入することもできる。ポリ核酸はまた、トランス遺伝子も含み得る。ポリ核酸は、TCR配列を有するトランス遺伝子を含み得る。ポリ核酸は、がん遺伝子配列を有するトランス遺伝子を含み得る。

【0421】

化合物はまた、外因性DNAへの毒性の惹起に關与する経路もモジュレートし得る。経路は、任意の数の因子を含有し得る。例えば、因子は、DAI（IFN調節因子のDNA依存性アクチベーター）、IFN誘導性タンパク質16（IFI16）、DEADボックスポリペプチド41（DDX41）、AIM2（absent in melanoma 2）、DNA依存性タンパク質キナーゼ、環状グアノシンーリン酸ーアデノシンーリン酸シンターゼ（cGAS）、STING（IFN遺伝子の刺激因子）、TANK結合性キナーゼ（TBK1）、インターロイキン1β（IL-1β）、MRE11（減数分裂組み換え11）、Trex1、アスパルテート特異性を有するシステインプロテアーゼ（カスパーゼ1）、3'修復エキソヌクレアーゼ、DAI（DNA-dependent activator of IRF）、IFI16、DDX41、DNA依存性タンパク質キナーゼ（DNA-PK）、MRE11（減数分裂組み換え11）相同体A、および／またはIFN調節因子（IRF）3もしくは7、および／またはこれらの任意の誘導体を含み得る。

【0422】

場合によって、DNAセンシング経路は一般に、細胞内核酸の検出に關与する、1または複数のタンパク質（例えば、DNAセンシングタンパク質）を含む、任意の細胞シグナル伝達経路を指す場合があり、場合によって、外因性核酸を指す場合がある。場合によって、DNAセンシング経路は、インターフェロン（STING）の刺激因子を含み得る。場合によって、DNAセンシング経路は、DAI（DNA-dependent activator of IFN-regulatory factor）を含み得る。DNAセンシングタンパク質の非限定的な例は、3'修復エキソヌクレアーゼ1（TREX1）、DEADボックスヘリカーゼ41（DDX41）、DAI（DNA-dependent activator of IFN-regulatory factor）、Z型DNA結合性タンパク質1（ZBP1）、インターフェロンガンマ誘導性タンパク質16（IFI16）、LRRFIP1（leucine rich repeat (In FLII) interacting protein 1）、DEAHボックスヘリカー

ゼ9 (DHX9)、DEAHボックスヘリカーゼ36 (DHX36)、Ku70 (Lupus Ku autoantigen protein p70)である、XRCC6 (X-ray repair complementing defective repair in chinese hamster cells 6)、STING (stimulator of interferon gene)、膜貫通タンパク質173 (TMEM173)、TRIM32 (tripartite motif containing 32)、TRIM56 (tripartite motif containing 56)、 β -カテニン (CTNNB1)、MyD88 (myeloid differentiation primary response 88)、AIM2 (absent in melanoma 2)、ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD)、プロカスパーゼ1 (pro-CASP1)、カスパーゼ1 (CASP1)、プロインターロイキン1ベータ (pro-IL-1 β)、プロインターロイキン18 (pro-IL-18)、インターロイキン1ベータ (IL-1 β)、インターロイキン18 (IL-18)、インターフェロン調節因子1 (IRF1)、インターフェロン調節因子3 (IRF3)、インターフェロン調節因子7 (IRF7)、ISRE7 (interferon-stimulated response element 7)、ISRE1/7 (interferon-stimulated response element 1/7)、NF- κ B (nuclear factor kappa B)、RNAポリメラーゼIII (RNA Pol III)、黒色腫分化関連タンパク質5 (MDA-5)、LGP2 (Laboratory of Genetics and Physiology 2)、レチノイン酸誘導性遺伝子1 (RIG-I)、IPS-1 (mitochondrial antiviral-signaling protein)、TNF受容体関連因子3 (TRAF3)、TANK (TRAF family member associated NF κ B activator)、NAP1 (nucleosome assembly protein 1)、TANK結合キナーゼ1 (TBK1)、Atg9a (autophagy related 9A)、腫瘍壊死因子アルファ (TNF- α)、インターフェロンラムダ1 (IFN λ 1)、環状GMP-AMPシターゼ (cGAS)、AMP、GMP、環状GMP-AMP (cGAMP)、これらのタンパク質のリン酸化形態、またはこれらの任意の組合せもしくは誘導体を含む。DNAセンシング経路の一例では、DAIは、I型インターフェロンおよび他のサイトカインの産生をもたらす、IRFおよびNF- κ B転写因子を活性化させる。DNAセンシング経路の別の例では、外因性の細胞内DNAを感知すると、AIM2は、インフラマソームのアセンブリーを誘発し、インターロイキンの成熟およびピロトーシスに至る。DNAセンシング経路のさらに別の例では、Pol IIIのRNAは、外因性DNAを、RNAセンサーであるRIG-Iによる認識のために、RNAへと転換し得る。

【0423】

一部の態様では、本開示の方法は、1または複数の細胞へと、少なくとも1つの抗DNAセンシングタンパク質をコードする、第1のトランス遺伝子を含む核酸を導入するステップを含む。

【0424】

抗DNAセンシングタンパク質は一般に、DNAセンシング経路（例えば、DNAセンシングタンパク質）に対応するタンパク質の活性または発現レベルを変更する、任意のタンパク質を指す場合がある。場合によって、抗DNAセンシングタンパク質は、1または複数のDNAセンシングタンパク質を分解し得る（例えば、これらの全タンパク質レベルを低減し得る）。場合によって、抗DNAセンシングタンパク質は、1または複数のDNAセンシングタンパク質を完全に阻害し得る。場合によって、抗DNAセンシングタンパク質は、1または複数のDNAセンシングタンパク質を部分的に阻害し得る。場合によって、抗DNAセンシングタンパク質は、少なくとも1つのDNAセンシングタンパク質の活性を、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約85%、少なくとも約

80%、少なくとも約75%、少なくとも約70%、少なくとも約65%、少なくとも約60%、少なくとも約55%、少なくとも約50%、少なくとも約45%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約25%、少なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%、または少なくとも約5%阻害し得る。場合によって、抗DNAセンシングタンパク質は、少なくとも1つのDNAセンシングタンパク質の量を、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約85%、少なくとも約80%、少なくとも約75%、少なくとも約70%、少なくとも約65%、少なくとも約60%、少なくとも約55%、少なくとも約50%、少なくとも約45%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約25%、少なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%、または少なくとも約5%減少させる。

10

【0425】

細胞生存率は、ゲノム操作手順中に、外因性DNAを検出する細胞の能力を阻害し得るウイルスタンパク質を導入することにより増大させることができる。場合によって、抗DNAセンシングタンパク質は、1または複数のDNAセンシングタンパク質の翻訳を促進し得る（例えば、これらの全タンパク質レベルを上昇させる）。場合によって、抗DNAセンシングタンパク質は、1または複数のDNAセンシングタンパク質を保護するか、またはこれらの活性を増大させる。場合によって、抗DNAセンシングタンパク質は、少なくとも1つのDNAセンシングタンパク質の活性を、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約85%、少なくとも約80%、少なくとも約75%、少なくとも約70%、少なくとも約65%、少なくとも約60%、少なくとも約55%、少なくとも約50%、少なくとも約45%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約25%、少なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%、または少なくとも約5%増大させる。場合によって、抗DNAセンシングタンパク質は、少なくとも1つのDNAセンシングタンパク質の量を、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約85%、少なくとも約80%、少なくとも約75%、少なくとも約70%、少なくとも約65%、少なくとも約60%、少なくとも約55%、少なくとも約50%、少なくとも約45%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約25%、少なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%、または少なくとも約5%増大させる。場合によって、抗DNAセンシングタンパク質は、少なくとも1つのDNAセンシングタンパク質の量を、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約85%、少なくとも約80%、少なくとも約75%、少なくとも約70%、少なくとも約65%、少なくとも約60%、少なくとも約55%、少なくとも約50%、少なくとも約45%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約25%、少なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%、または少なくとも約5%増大させる。場合によって、抗DNAセンシングタンパク質は、1または複数のDNAセンシングタンパク質の、競合的インヒビターまたはアクチベーターであり得る。場合によって、抗DNAセンシングタンパク質は、DNAセンシングタンパク質の、非競合的インヒビターまたはアクチベーターであり得る。

20

30

【0426】

本開示の場合によって、抗DNAセンシングタンパク質はまた、DNAセンシングタンパク質（例えば、TREX1）でもあり得る。抗DNAセンシングタンパク質の非限定的な例は、c-FLIP (cellular FLICE-inhibitory protein)、ヒトサイトメガロウイルスステグメントタンパク質 (HCMV pUL83)、デングウイルス特異的NS2B-NS3 (DENV NS2B~NS3)、18型ヒトパピローマウイルスE7タンパク質 (HPV18 E7)、hAd5 E1A、単純ヘルペスウイルス即初期タンパク質ICP0 (HSV1 ICP0)、ワクシニアウイルスB13 (VACV B13)、ワクシニアウイルスC16 (VACV C16)、3'修復エキソヌクレアーゼ1 (TREX1)、ヒトコロナウイルスNL63 (HCoV-NL63)、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス (SARS-CoV)、B型肝炎ウイルスDNAポリメラーゼ (HBV Pol)、ブタ伝染性下痢症ウイルス (PEDV)、アデノシンデアミナーゼ (ADAR1)、E3L、p202、これらのタンパク質のリン酸化形態、およびこれらの任意の組合せまたは誘導体を含む。場合によって、HCMV pUL83は、パイリンドメインであるIFI16（例えば、核内のIFI16）と相互作用し、そのオリゴマー化、および後続の下流における活性化を遮断することにより、STIN

40

50

G-TBK1-IRF3経路の活性化を阻害することにより、DNAセンシング経路を破壊し得る。場合によって、DENV NS2B-NS3は、STINGを分解することにより、DNAセンシング経路を破壊し得る。場合によって、HPV18 E7は、STINGに結合することにより、cGAS/STING経路シグナル伝達を遮断することにより、DNAセンシング経路を破壊し得る。場合によって、hAd5 E1Aは、STINGに結合することにより、cGAS/STING経路シグナル伝達を遮断することにより、DNAセンシング経路を破壊し得る。例えば、図104Aおよび図104Bは、CRISPR系、外因性ポリ核酸、およびhAd5 E1Aタンパク質またはHPV18 E7タンパク質をトランスフェクトされた細胞を示す。場合によって、HSV1 ICP0は、IFI16の分解により、かつ/またはウイルスゲノムへのIFI16の動員を遅延させることにより、DNAセンシング経路を破壊し得る。場合によって、VACV B13は、カスパーゼ1依存性のインフラマソームの活性化およびカスパーゼ8依存性の外因性アポトーシスを遮断することにより、DNAセンシング経路を破壊し得る。場合によって、VACV C16は、DNAに対する生得的免疫応答を遮断し、サイトカイン発現の低下をもたらすことにより、DNAセンシング経路を破壊し得る。

10

【0427】

化合物は、インヒビターであり得る。化合物はまた、アクチベーターでもあり得る。化合物は、第2の化合物と組み合わせることができる。化合物はまた、少なくとも1つの化合物と組み合わせることができる。場合によって、1または複数の化合物は、相乗作用的に挙動し得る。例えば、1または複数の化合物は、図20に示される通り、細胞へと一度に導入されると、細胞毒性を低減し得る。

20

【0428】

化合物は、汎カスパーゼインヒビターであるZ-VAD-FMK、および/またはZ-VAD-FMKであり得る。化合物は、外因性DNAへの毒性の惹起に参与する経路をモジュレートする、任意の数の公知の化合物の誘導体であり得る。化合物はまた、修飾することもできる。化合物は、任意の数の手段により修飾することができ、例えば、化合物への修飾は、重水素化、脂質化、グリコシル化、アルキル化、PEG化、酸化、リン酸化、硫酸化、アミド化、ビオチニル化、シトルリン化、異性体化、ユビキチン化、プロトン化、低分子のコンジュゲーション、還元、脱リン酸化、ニトロシル化、および/またはタンパク質分解を含み得る。修飾はまた、翻訳後修飾でもあり得る。修飾は、翻訳前修飾であり得る。修飾は、顕著に異なるアミノ酸側鎖またはペプチド連結において生じる場合があり、酵素的活性により媒介され得る。

30

【0429】

修飾は、化合物の合成内の任意のステップにおいて生じ得る。例えば、タンパク質内では、適正な化合物のフォールディングもしくは安定性を媒介するか、または新生化合物を、顕著に異なる細胞的コンパートメントへと導くように、翻訳が進行中であるかまたは完了した直後に、多くの化合物が修飾される。他の修飾は、触媒活性を活性化もしくは不活化させるか、または化合物の生体活性に他の形で影響を及ぼすように、フォールディングおよび局在化が完了した後で生じる。化合物はまた、分解のために化合物をターゲティングするタグへと、共有結合的に連結することもできる。単一の修飾のほかに、化合物は、翻訳後切断と、化合物の成熟または活性化の段階的機構を介する官能基の付加との組合せを介して修飾されることが多い。

40

【0430】

化合物は、I型インターフェロン(IFN)、例えば、IFN- α および/またはIFN- β の産生を低減し得る。化合物はまた、腫瘍壊死因子- α (TNF- α)および/またはインターロイキン-1 β (IL-1 β)など、炎症促進性サイトカインの産生も低減し得る。化合物はまた、Janusキナーゼ(JAK)-シグナル伝達兼転写アクチベーター(STAT)経路のモジュレーションを介して、抗ウイルス遺伝子の誘導もモジュレートし得る。化合物はまた、転写因子である、NF- κ B(nuclear factor κ -light-chain enhancer of activated B

50

cells)、ならびにIFN調節因子のIRF3およびIRF7もモジュレートし得る。化合物はまた、例えば、IKK複合体によるIKKのリン酸化を修飾して、NF- κ Bの活性化もモジュレートし得る。化合物はまた、IKKのリン酸化をモジュレートする場合もあり、IKKのリン酸化を防止する場合もある。化合物はまた、IRF3および/またはIRF7の活性化もモジュレートし得る。例えば、化合物は、IRF3および/またはIRF7の活性化をモジュレートし得る。化合物は、TBK1および/またはIKK ϵ を活性化させる。化合物はまた、TBK1および/またはIKK ϵ も阻害し得る。化合物は、IRF3、IRF7、NF- κ B、およびI型IFN遺伝子の転写をオンにする他の転写因子から構成される、エンハンソーム複合体の形成を防止し得る。修飾化合物は、TBK1化合物および少なくとも1つのさらなる化合物であり得る(図88Aおよび図88B)。場合によって、TBK1化合物およびカスパーゼインヒビター化合物を使用して、二本鎖DNAの毒性を低減することができる(図89)。

10

【0431】

化合物は、細胞のアポトーシスおよび/またはピロトーシスを防止し得る。化合物はまた、インフラマソームの活性化も防止し得る。インフラマソームは、タンパク質分解酵素カスパーゼ1の活性化およびIL-1 β の成熟を媒介する、細胞内多タンパク質複合体であり得る。化合物はまた、AIM2(absent in melanoma 2)もモジュレートし得る。例えば、化合物は、AIM2が、アダプタータンパク質であるASC(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD)と会合することを防止し得る。化合物はまた、PYD:PYD間同型相互作用もモジュレートし得る。化合物はまた、CARD:CARD間同型相互作用もモジュレートし得る。化合物は、カスパーゼ1をモジュレートし得る。例えば、化合物は、カスパーゼ1が、IL-1 β およびIL-18の不活性の前駆体を、成熟サイトカインへと変換する過程を阻害し得る。

20

【0432】

化合物は、GMP適合性細胞療法を作製するためのプラットフォームの構成要素であり得る。化合物を使用して、細胞療法を改善することができる。化合物は、試薬として使用することができる。化合物は、組合せ療法として組み合わせることができる。化合物は、ex vivoで用いることができる。化合物は、免疫療法のために使用することができる。化合物は、それを必要とする患者のためのT細胞療法を作製する工程の一部であり得る。

30

【0433】

場合によって、毒性を低減するのに、化合物を使用しない。場合によって、ポリ核酸を修飾してまた、毒性も低減することができる。例えば、ポリ核酸を修飾して、ポリ核酸、例えば、外因性ポリ核酸の検出を低減することができる。ポリ核酸を修飾してまた、細胞毒性も低減することができる。例えば、ポリ核酸は、図21に描示される方法のうちの1または複数により修飾することができる。ポリ核酸はまた、in vitroで修飾することもでき、in vivoで修飾することもできる。

【0434】

化合物または修飾剤化合物は、プラスミドDNAの細胞毒性を、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、もしくは100%、またはほぼこれらの比率だけ低減し得る。修飾剤化合物は、細胞生存率を、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、もしくは100%、またはほぼこれらの比率だけ改善し得る。

40

【0435】

非メチル化ポリ核酸もまた、毒性を低減し得る。例えば、少なくとも1つのゲノム領域と相補的な、少なくとも2つの組換えアームで挟んだ、少なくとも1つの操作抗原受容体を含む、非メチル化ポリ核酸を使用して、細胞毒性を低減することができる。ポリ核酸はまた、ネイキッドポリ核酸でもあり得る。ポリ核酸はまた、哺乳動物性メチル化も有することが可能であり、場合によって、これも同様に、毒性を低減するであろう。場合によ

50

て、ポリ核酸はまた、細菌性メチル化を除去し、哺乳動物性メチル化を導入するように修飾することもできる。本明細書で記載される修飾のうちのいずれかを、本明細書で記載されるポリ核酸のうちのいずれかへと適用することができる。

【0436】

ポリ核酸の修飾は、脱メチル化、CpGメチル化の付加、細菌性メチル化の除去、および／または哺乳動物性メチル化の付加を含み得る。修飾は、二本鎖ポリ核酸の、一本鎖ポリ核酸への転換であり得る。また、一本鎖ポリ核酸を、二本鎖ポリ核酸へと転換することもできる。

【0437】

ポリ核酸は、メチル化（例えば、ヒト性メチル化）させて、細胞毒性を低減することができる。修飾ポリ核酸は、TCR配列またはキメラ抗原受容体（CAR）を含み得る。修飾ポリ核酸は、トランス遺伝子配列（例えば、TCRまたはがん遺伝子）を含み得る。修飾ポリ核酸は、がん遺伝子配列を含み得る。ポリ核酸はまた、操作細胞外受容体も含み得る。

【0438】

少なくとも1つの操作抗原受容体を含む、哺乳動物性メチル化ポリ核酸を使用して、細胞毒性を低減することができる。ポリ核酸は、哺乳動物性メチル化を含むように修飾することができる。ポリ核酸は、細胞により外来として認識されないように、哺乳動物性メチル化によるメチル化であり得る。

【0439】

ポリ核酸の修飾はまた、培養工程の一部として実施することもできる。ポリ核酸の脱メチル化は、ゲノム修飾された細菌培養物であって、細菌性メチル化を導入しない細菌培養物によりもたらすことができる。これらのポリ核酸は、哺乳動物性メチル化、例えば、ヒト性メチル化を含有するように、後で修飾することができる。

【0440】

毒性はまた、ゲノム操作手順時に、ウイルスタンパク質を導入することにより低減することもできる。例えば、ウイルスタンパク質を使用して、DNAセンシングを遮断し、外因性TCRおよび／または外因性トランス遺伝子および／またはがん遺伝子またはCRISPR系をコードするドナー核酸の毒性を低減することができる。DNAセンシングを遮断するように、ウイルスにより利用される逃避戦略は、ウイルス核酸の封鎖もしくは修飾；PRRもしくはそれらのアダプタータンパク質の特異的翻訳後修飾への干渉；パターン認識受容体（PRR）もしくはそれらのアダプタータンパク質の分解もしくは切断；PRRの封鎖もしくは再局在化、またはこれらの任意の組合せであり得る。場合によって、ウイルスにより利用される逃避戦略のうちのいずれかにより、DNAセンシングを遮断し得る、ウイルスタンパク質を導入することができる。

【0441】

場合によって、ウイルスタンパク質は、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）、デングウイルス（DENV）、ヒトパピローマウイルス（HPV）、1型単純ヘルペスウイルス（HSV1）、ワクシニアウイルス（VACV）、ヒトコロナウイルス（HCoV）、重症急性呼吸器症候群（SARS）コロナウイルス（SARS-CoV）、B型肝炎ウイルス、ブタ伝染性下痢症ウイルス、またはこれらの任意の組合せなどのウイルスであり得るか、またはこれらに由来し得る。

【0442】

導入されるウイルスタンパク質は、細胞膜により密閉され得る、特異的複製コンパートメントの形成を誘導することにより、または、他の場合には、小胞体、ゴルジ装置、ミトコンドリア、またはこれらの任意の組合せなどの細胞小器官上で複製されるように、RIG-I様受容体（RLR）が、ウイルスRNAに接近することを防止し得る。例えば、本開示のウイルスは、RLRによる検出を防止するか、またはRLRの活性化を妨げる修飾を有し得る。他の場合には、RLRシグナル伝達経路を阻害し得る。例えば、Lys63結合型RIG-Iのユビキチン化を阻害または遮断して、RIG-Iシグナル伝達の活性

化を防止することができる。他の場合には、ウイルスタンパク質は、R I G－I のユビキチン化の一因となり得る、細胞内E3ユビキチンリガーゼをターゲティングし得る。ウイルスタンパク質はまた、R I G－I のユビキチン化も除去し得る。さらに、ウイルスは、細胞内マイクロRNAの存在度をモジュレートすることにより、またはRNA－タンパク質間相互作用を介して、タンパク質間相互作用とは独立に、R I G－I のユビキチン化（例えば、L y s 6 3 結合型）を阻害し得る。

【0443】

場合によって、R I G－I の活性化を防止するために、ウイルスタンパク質が、ウイルスRNA内の5'－三リン酸部分をプロセシングする場合もあり、ウイルス的ヌクレアーゼが、遊離二本鎖RNA（dsRNA）を消化する場合もある。さらに、ウイルスタンパク質は、ウイルスRNAに結合して、R I G－I による病原体関連分子パターン（PAMP）の認識も阻害し得る。一部のウイルスタンパク質は、R I G－I および／またはMDA5の特異的翻訳後修飾を操り、これにより、これらのシグナル伝達能を遮断し得る。例えば、ウイルスは、ウイルス性脱ユビキチン化酵素（DUB）をコードすることにより、L y s 6 3 結合型R I G－I のユビキチン化を防止し得る。他の場合には、ウイルスタンパク質は、細胞内E3ユビキチンリガーゼ、TRIM25（tripartite motif protein 25）、および／またはRipletをアンタゴナイズすることが可能であり、これにより、また、R I G－I のユビキチン化も阻害し、したがって、その活性化も阻害し得る。さらに、他の場合には、ウイルスタンパク質は、TRIM25に結合して、持続的なR I G－I シグナル伝達も遮断し得る。MDA5の活性化を抑制するために、ウイルスタンパク質は、PP1αを媒介するかまたはPP1γを媒介する、MDA5の脱リン酸化を防止し、MDA5を、そのリン酸化不活性状態に保つことができる。例えば、中東呼吸器症候群コロナウイルス（MERS-CoV）は、プロテインキナーゼRアクチベーター（PACT）をターゲティングして、R I G－I をアンタゴナイズし得る。DENVウイルスに由来するNS3タンパク質は、トラフィッキング因子である14-3-3εをターゲティングして、ミトコンドリアのMAVSへの、R I G－I の転移を防止し得る。場合によって、ウイルスタンパク質は、R I G－I、MDA5、および／またはMAVSを切断し得る。細胞内の分解経路を壊滅させて、RLR－MAVS依存性シグナル伝達を阻害するように、他のウイルスタンパク質を導入することもできる。例えば、B型肝炎ウイルス（HBV）に由来するXタンパク質と、重症急性呼吸器症候群（SARS）関連コロナウイルス（SARS-CoV）に由来する9bタンパク質とは、MAVSのユビキチン化および分解を促進し得る。

【0444】

場合によって、導入されるウイルスタンパク質は、cGAS、IFI16、STING、またはこれらの任意の組合せの免疫逃避を可能とし得る。例えば、環状GMP－AMPシンターゼ（cGAS）の活性化を防止するため、ウイルスタンパク質は、逆転写された過剰なウイルスDNAを分解するのに、細胞内3'修復エキソヌクレアーゼ1（TREX1）を使用し得る。加えて、ウイルスカプシドは、逆転写されたDNAの、cGASによるセンシングを防止し得る、シクロフィリンA（CYPA）など、宿主コード因子を動員し得る。さらに、導入されるウイルスタンパク質は、ウイルスDNAおよびcGASの両方に結合して、cGASの活性を阻害し得る。他の場合には、STING（stimulator of interferon（IFN）genes）の活性化をアンタゴナイズするために、例えば、B型肝炎ウイルス（HBV）のポリメラーゼ（Pol）、およびヒトコロナウイルスNL63（HCoV-NL63）、重症急性呼吸器症候群（SARS）関連コロナウイルス（SARS-CoV）のパバイン様プロテアーゼ（PLP）は、STINGのL y s 6 3 結合型ユビキチン化を防止または除去する。導入されるウイルスタンパク質はまた、STINGに結合し、その活性化を阻害することもでき、STINGを切断して、それを不活化させることもできる。場合によって、IFI16を不活化させることができる。例えば、ウイルスタンパク質は、プロテアソーム分解のためにIFI16をターゲティングすることもでき、IFI16に結合して、そのオリゴマー化を防止し、

これにより、その活性化を防止することもできる。

【0445】

例えば、導入されるウイルスタンパク質は、HCMV pUL83、DENV NS2B~NS3、HPV18 E7、hAd5 E1A、HSV1 ICP0、VACV B13、VACV C16、TREX1、HCov-NL63、SARS-CoV、HBV Pol、PEDV、またはこれらの任意の組合せであるか、またはこれらに由来し得る。ウイルスタンパク質は、アデノウイルスタンパク質であり得る。アデノウイルスタンパク質は、4型アデノウイルスのE1B55Kタンパク質、E4orf6タンパク質であり得る。ウイルスタンパク質は、B13ワクチンウイルスタンパク質であり得る。導入されるウイルスタンパク質は、細胞質DNAの認識、センシング、またはこれらの組合せを阻害し得る。場合によって、細胞を操作する場合、ウイルスタンパク質を利用してウイルス組込み生物学の条件を再現することができる。CRISPRを利用して、トランス遺伝子組込みまたはゲノム修飾の間にウイルスタンパク質を細胞へと導入することができる（図133A、図133B、図134、図135Aおよび図135B）。

【0446】

場合によって、RIP経路を阻害し得る。他の場合には、c-FLIP (cellular FLICE (FADD-like IL-1ベーターconverting enzyme) - inhibitory protein) 経路を、細胞へと導入することができる。c-FLIPは、ヒト細胞内で、長型スプライス変異体 (c-FLIPL)、短型スプライス変異体 (c-FLIPS)、およびc-FLIPRスプライス変異体として発現し得る。c-FLIPは、スプライス変異体として発現し得る。c-FLIPはまた、Casper、iFLICE、FLAME-1、CASH、CLARP、MRIT、またはusurpinとしても公知であり得る。c-FLIPは、FADDおよび/またはカスパーゼ8もしくはカスパーゼ10およびTRAIL受容体5 (DR5) に結合し得る。この相互作用は、DISC (Death-Inducing Signaling Complex) の形成と、後続するカスパーゼカスケードの活性化とを防止する。c-FLIPLおよびc-FLIPSはまた、多様なシグナル伝達経路のほか、Akt、ERK、およびNF-κBを含むいくつかの細胞保護性および生存促進性のシグナル伝達タンパク質の活性化および/または上方調節においても、多機能性の役割を有することが公知である。場合によって、c-FLIPを、細胞へと導入して、生存率を増大させることができる。

【0447】

他の場合には、STINGを阻害し得る。場合によって、カスパーゼ経路を阻害する。DNAセンシング経路は、サイトカインベースの炎症経路および/またはインターフェロンアルファ発現経路であり得る。場合によって、少なくとも1つのDNAセンシング経路インヒビターを細胞へと導入する、多モード法を採る。場合によって、DNAセンシングのインヒビターは、細胞死を低減することが可能であり、外因性トランス遺伝子（例えば、TCRまたはがん遺伝子）の組込みの改善を可能とする。多モード法は、TBKインヒビターと組み合わせた、STINGおよびカスパーゼインヒビターであり得る。

【0448】

正確な遺伝子改変の挿入を可能とするHDRを増強するために、本発明者らは、遺伝子サイレンシング、リガーゼIVインヒビターSCR7、または4型アデノウイルスE1B55Kタンパク質およびE4orf6タンパク質の共発現により、NHEJのカギとなる分子である、KU70、KU80、またはDNAリガーゼIVを抑制した。

【0449】

導入されるウイルスタンパク質は、プラスミドDNAの細胞毒性を、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、もしくは100%、またはほぼこれらの比率だけ低減し得る。ウイルスタンパク質は、細胞生存率を、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、もしくは100%、またはほぼこれらの比率だけ改善し得る。

【0450】

場合によって、gRNAを使用して、毒性を低減することができる。例えば、gRNAは、ベクターのフィラー領域内に結合するように操作することができる。ベクターは、ミニサークルDNAベクターであり得る。場合によって、ミニサークルベクターは、ウイルスタンパク質と共に使用することができる。他の場合には、ミニサークルベクターは、ウイルスタンパク質、および少なくとも1つのさらなる毒性低減剤と共に使用することができる。場合によって、二本鎖DNAなど、外因性DNAと関連する毒性を低減することにより、ゲノム破壊を、より効率的に実施することができる。

【0451】

場合によって、酵素を使用して、DNAの毒性を低減することができる。例えば、DpnIなどの酵素を用いて、DNAベクター上またはトランス遺伝子上のメチル化標的を除去することができる。電気穿孔の前に、ベクターまたはトランス遺伝子を、DpnIで前処理することができる。DpnIなどのIIM型制限エンドヌクレアーゼは、メチル化DNAを認識および切断することが可能である。場合によって、ミニサークルDNAを、DpnIで処理する。天然の制限エンドヌクレアーゼは、4つの群（I型、II型、III型、およびIV型）へと類別される。場合によって、DpnIなどの制限エンドヌクレアーゼ、またはCRISPR系エンドヌクレアーゼを用いて、操作細胞を調製する。

【0452】

本明細書では、操作細胞を作製する方法であって、少なくとも1つの操作アデノウイルスタンパク質またはその機能的部分を導入するステップと；少なくとも1つの外因性受容体配列をコードする、少なくとも1つのポリ核酸を導入するステップと；少なくとも1つのゲノムを、少なくとも1つのエンドヌクレアーゼまたはその部分で、ゲノム的に破壊するステップとを含む方法が開示される。場合によって、アデノウイルスタンパク質またはその機能的部分は、E1B55K、E4orf6、Scrf7、L755507、NS2B3、HPV18 E7、hAd5 E1A、またはこれらの組合せである。アデノウイルスタンパク質は、血清型1～57から選択することができる。場合によって、アデノウイルスタンパク質の血清型は、血清型5である。

【0453】

場合によって、操作アデノウイルスタンパク質またはその部分は、少なくとも1つの修飾を有する。修飾は、前記アデノウイルスタンパク質の配列の、置換、挿入、欠失、または修飾であり得る。修飾は、挿入であり得る。挿入は、AGIPAの挿入であり得る。場合によって、修飾は、置換である。置換は、タンパク質配列のアミノ酸373位における、HからAへの置換であり得る。ポリ核酸は、DNAの場合もあり、RNAの場合もある。ポリ核酸は、DNAであり得る。DNAは、ミニサークルDNAであり得る。場合によって、外因性受容体配列は、T細胞受容体（TCR）、B細胞受容体（BCR）、キメラ抗原受容体（CAR）、がん遺伝子受容体、およびこれらの任意の部分または誘導体の配列からなる群から選択することができる。外因性受容体配列は、TCR配列であり得る。外因性受容体配列はがん遺伝子配列であり得る。外因性受容体配列は、トランス遺伝子配列であり得る。エンドヌクレアーゼは、CRISPR、TALEN、トランスポゾンベースのZEN、メガヌクレアーゼ、Mega-TAL、およびこれらの任意の部分または誘導体からなる群から選択することができる。エンドヌクレアーゼは、CRISPRであり得る。CRISPRは、少なくとも1つのCasタンパク質を含み得る。Casタンパク質は、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx1S、Cs f1、Cs f2、CsO、Cs f4、Cpf1、c2c1、c2c3、Cas9HiFi、これらの相同体、またはこれらの修飾形からなる群から選択することができる。Casタンパク質は、Cas9であり得る。

10

20

30

40

50

【0454】

場合によって、CRISPRは、ゲノム内に、二本鎖切断を創出する。ゲノムは、少なくとも1つの遺伝子を含み得る。場合によって、外因性受容体配列を、少なくとも1つの遺伝子へと導入する。導入は、少なくとも1つの遺伝子を破壊し得る。遺伝子は、CISH、PD-1、TRA、TRB、またはこれらの組合せであり得る。細胞は、ヒト細胞であり得る。ヒト細胞は、免疫細胞であり得る。免疫細胞は、CD3+、CD4+、CD8+、またはこれらの任意の組合せであり得る。方法は、細胞を拡大するステップをさらに含み得る。

【0455】

本明細書では、操作細胞を作製する方法であって、少なくとも1つの外因性トランス遺伝子（例えば、T細胞受容体（TCR）またはがん遺伝子）配列をコードする、少なくとも1つのポリ核酸を、ウイルスにより導入するステップと；少なくとも1つの遺伝子を、少なくとも1つのエンドヌクレアーゼまたはその機能的な部分によりゲノム破壊するステップとを含む方法が開示される。場合によって、ウイルスは、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、またはこれらの任意の誘導体から選択することができる。ウイルスは、アデノ随伴ウイルス（AAV）であり得る。AAVは、血清型5であり得る。AAVは、血清型6であり得る。AAVは、少なくとも1つの修飾を含み得る。修飾は、化学修飾であり得る。ポリ核酸は、DNA、RNA、またはこれらの任意の修飾体であり得る。ポリ核酸は、DNAであり得る。場合によって、DNAは、ミニサークルDNAである。場合によって、ポリ核酸は、TCR配列を挟む、少なくとも1つの相同性アームをさらに含み得る。場合によって、ポリ核酸は、トランス遺伝子配列を挟む、少なくとも1つの相同性アームをさらに含み得る。相同性アームは、少なくとも1つの遺伝子において、相補配列を含み得る。遺伝子は、内因性遺伝子であり得る。内因性遺伝子は、チェックポイント遺伝子であり得る。

【0456】

場合によって、本開示の任意の実施形態による方法または系は、少なくとも1つの毒性低減剤をさらに含み得る。場合によって、AAVベクターは、少なくとも1つのさらなる毒性低減剤と共に使用することができる。他の場合には、ミニサークルベクターは、少なくとも1つのさらなる毒性低減剤と共に使用することができる。毒性低減剤は、ウイルスタンパク質、または細胞質DNAセンシング経路のインヒビターであり得る。ウイルスタンパク質は、E1B55K、E4orf6、Scrf7、L755507、NS2B3、HPV18 E7、hAd5 E1A、またはこれらの組合せであり得る。方法は、細胞の拡大をさらに含み得る。場合によって、細胞質DNAセンシング経路のインヒビターを使用することができる、それは、c-FLIP（cellular FLICE（FADD-like IL-1 β -converting enzyme）-inhibitory protein）であり得る。

【0457】

細胞生存率、および／または1もしくは複数の細胞のゲノムへのトランス遺伝子の組込みの効率は、当技術分野で公知の任意の方法を使用して測定することができる。場合によって、細胞生存率および／または組込みの効率は、トリバンプルー排除、terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling（TUNEL）、所与の細胞表面マーカー（例えば、CD4またはCD8）の有無、テロメアの長さ、蛍光活性化細胞分取（FACS）、リアルタイムPCR、またはDroplet Digital PCRを使用して測定することができる。例えば、FACSを使用して、電気穿孔後における、トランス遺伝子の組込みの効率を検出することができる。別の例では、アポトーシスは、TUNELを使用して測定することができる。場合によって、毒性は細胞のゲノム操作によって起こり得る（D.R. Senら、Science 10.1126/science.aae0491（2016年））。毒性は、腫瘍標的に対する細胞の細胞傷害性に影響を及ぼし得る細胞の疲弊をもたらし得る。場合によって、疲弊したT細胞は、機能的メモリーT細胞とは異なる分化状態を占め得る。場合によって、変更

10

20

30

40

50

した細胞状態を同定すること、およびそれをベースラインに戻す方法は、本明細書中の方法によって記載され得る。例えば、疲弊したT細胞における状態特異的エンハンサーのマッピングは、養子T細胞療法のための改善されたゲノム編集を可能にし得る。場合によって、T細胞を疲弊に耐性にするためのゲノム編集は、養子T細胞療法を改善し得る。場合によって、疲弊したT細胞は、機能的メモリーT細胞と比較した場合、変更したクロマチンランドスケープを有し得る。クロマチンランドスケープの変更には、エピジェネティックな変化が含まれ得る。

【0458】

ベクターの細胞膜への送達

ヌクレアーゼおよび転写因子、これらをコードするポリヌクレオチド、ならびに／または任意のトランス遺伝子のポリヌクレオチド、ならびに本明細書で記載されるタンパク質および／またはポリヌクレオチドを含む組成物は、任意の適切な手段により、標的細胞へと送達することができる。

【0459】

適切な細胞は、真核細胞および／または真核細胞株、ならびに原核細胞および／または原核細胞株を含み得るがこれらに限定されない。このような細胞、またはこのような細胞から作製された細胞株の非限定的な例は、COS、CHO（例えば、CHO-S、CHO-K1、CHO-DG44、CHO-DUXB11、CHO-DUKX、CHOK1SV）、VERO、MDCK、WI38、V79、B14AF28-G3、BHK、HaK、NSO、SP2/0-Ag14、HeLa、HEK293（例えば、HEK293-F、HEK293-H、HEK293-T）、およびperC6細胞のほか、Spodoptera frugiperda (Sf)などの昆虫細胞、またはSaccharomyces属、Pichia属、およびSchizosaccharomyces属などの真菌細胞を含む。場合によって、細胞株は、CHO-K1細胞株、MDCK細胞株、またはHEK293細胞株である。場合によって、細胞または細胞集団は、初代細胞または初代細胞集団である。場合によって、初代細胞または初代細胞集団は、初代リンパ球または初代リンパ球集団である。場合によって、適切な初代細胞は、末梢血単核細胞(PBMC)、末梢血リンパ球(PBL)、およびT細胞、ナチュラルキラー細胞、単球、ナチュラルキラーT細胞、単球前駆細胞、造血幹細胞、または非多能性幹細胞などであるがこれらに限定されない、他の血液細胞サブセットを含む。場合によって、細胞は、CD3+T細胞、CD4+T細胞、CD8+T細胞などの腫瘍浸潤細胞(TIL)、または他の任意の種類のT細胞など、任意のT細胞を含む、任意の免疫細胞であり得る。T細胞はまた、メモリーT細胞、メモリーステムT細胞、またはエフェクターT細胞も含み得る。T細胞はまた、バルク集団から選択することもでき、例えば、T細胞を、全血液から選択することもできる。T細胞はまた、バルク集団から拡大することもできる。T細胞はまた、特定の集団および表現型に偏る場合もある。例えば、T細胞は、CD45RO(-)、CCR7(+)、CD45RA(+)、CD62L(+)、CD27(+)、CD28(+)、および／またはIL-7Rα(+)を表現型的に含むように、偏り得る。CD45RO(-)、CCR7(+)、CD45RA(+)、CD62L(+)、CD27(+)、CD28(+)、および／またはIL-7Rα(+)を含むリストから選択される、1または複数のマーカーを含む、適切な細胞を選択することができる。適切な細胞はまた、例示を目的として述べると、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、造血幹細胞、神経幹細胞、および間葉幹細胞などの幹細胞も含み得る。適切な細胞は、ヒト細胞、非ヒト細胞、および／またはマウス細胞など、任意の数の初代細胞を含み得る。適切な細胞は、前駆細胞であり得る。適切な細胞は、処置される対象(例えば、患者)に由来し得る。適切な細胞は、ヒトドナーに由来し得る。適切な細胞は、CD45RO(-)、CCR7(+)、CD45RA(+)、CD62L+(L-セレクトイン)、CD27+、CD28+、およびIL-7Rα+から構成される、ステムメモリーT_{SCM}細胞であることが可能であり、ステムメモリー細胞はまた、CD95、IL-2Rβ、CXCR3、およびLFA-1も発現することが可能であり、ステムメモリー細胞固有の、多数の機能的な属性を示す。適切な細胞は、L-セ

10

20

30

40

50

レクチンおよびCCR7を含む、セントラルメモリー細胞であるT_{CM}細胞であることが可能であり、セントラルメモリー細胞は、例えば、IL-2を分泌し得るが、IFN γ またはIL-4は分泌し得ない。適切な細胞はまた、L-セレクチンまたはCCR7を含む、エフェクターメモリー細胞であるT_{EM}細胞でもあることが可能であり、例えば、IFN γ およびIL-4など、エフェクターサイトカインを産生し得る。場合によって、初代細胞は初代リンパ球であり得る。場合によって、初代細胞集団は、リンパ球集団であり得る。

【0460】

適切な細胞を獲得する方法は、細胞を選択するステップを含み得る。場合によって、細胞は、細胞に対して選択され得るマーカーを含み得る。例えば、このようなマーカーは、GFP、耐性遺伝子、細胞表面マーカー、内因性タグを含み得る。細胞は、任意の内因性マーカーを使用して選択することができる。適切な細胞は、任意の技術を使用して選択することができる。このような技術は、フローサイトメトリーおよび／または磁気カラムを含み得る。次いで、選択した細胞を、対象へと注入することができる。選択した細胞はまた、大きな個数へと拡大することもできる。選択した細胞は、注入の前に拡大することができる。

【0461】

本明細書で記載される転写因子およびヌクレアーゼは、例えば、タンパク質のうちの1または複数をコードする配列を含有するベクターを使用して送達することができる。トランス遺伝子をコードするポリヌクレオチドも、同様に送達することができる。プラスミドベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ポックスウイルスベクター；ヘルペスウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルスベクターなどを含むがこれらに限定されない、任意のベクター系を使用することができる。さらに、これらのベクターのうちのいずれかは、1または複数の転写因子、ヌクレアーゼ、および／またはトランス遺伝子も含み得る。したがって、1または複数の、CRISPR、TALEN、トランスポゾンベースのZEN、メガヌクレアーゼ、もしくはMega-TAL分子、および／またはトランス遺伝子を、細胞へと導入する場合、CRISPR、TALEN、トランスポゾンベースのZEN、メガヌクレアーゼ、もしくはMega-TAL分子、および／またはトランス遺伝子は、同じベクター上に保有される場合もあり、異なるベクター上に保有される場合もある。複数のベクターを使用する場合、各ベクターは、1または複数の、CRISPR、TALEN、トランスポゾンベースのZEN、メガヌクレアーゼ、もしくはMega-TAL分子、および／またはトランス遺伝子をコードする配列を含み得る。

【0462】

従来型のウイルスベースの遺伝子導入法および非ウイルスベースの遺伝子移入法を使用して、操作されたCRISPR分子、TALEN分子、トランスポゾンベースのZEN分子、メガヌクレアーゼ分子、もしくはMega-TAL分子、および／またはトランス遺伝子をコードする核酸を、細胞（例えば、哺乳動物細胞）内および標的組織内に導入することができる。このような方法はまた、CRISPR分子、TALEN分子、トランスポゾンベースのZEN分子、メガヌクレアーゼ分子、もしくはMega-TAL分子、および／またはトランス遺伝子をコードする核酸を、*in vitro*で、細胞へと投与するのに使用することもできる。一部の例では、CRISPR分子、TALEN分子、トランスポゾンベースのZEN分子、メガヌクレアーゼ分子、もしくはMega-TAL分子、および／またはトランス遺伝子をコードする核酸を、*in vivo*または*ex vivo*における免疫療法への使用のために投与することができる。非ウイルスベクター送達系は、DNAプラスミド、ネイキッド核酸、およびリポソームまたはポロキサマーなど、送達媒体と複合体化させた核酸を含み得る。ウイルスベクター送達系は、エピソードゲノム、または細胞への送達の後で組み込まれたゲノムを有する、DNAウイルスおよびRNAウイルスを含み得る。

【0463】

核酸のウイルスまたは非ウイルスの送達法は、電気穿孔、リポフェクション、ヌクレオフェクション、金ナノ粒子送達、マイクロインジェクション、遺伝子銃、ウィロソーム、リポソーム、イムノリポソーム、ポリカチオンまたは脂質：核酸コンジュゲート、ネイキッドDNA、mRNA、人工ビリオン、および薬剤増強型DNA取込みを含む。核酸を送達するために、例えば、Sonitron 2000システム（Rich-Mar）を使用する超音波穿孔もまた、使用することができる。

【0464】

さらなる例示的な核酸送達系は、AMAXA（登録商標）Biosystems（Cologne, Germany）、Life Technologies（Frederick, Md.）、MAXCYTE, Inc.（Rockville, Md.）、BTX Molecular Delivery Systems（Holliston, Mass.）、およびCopernicus Therapeutics Inc.（例えば、米国特許第6,008,336号を参照されたい）により提供されている核酸送達系を含む。リポフェクション試薬は、市販されている（例えば、TRANSFECTAM（登録商標）およびLIPOFECTIN（登録商標））。送達は、細胞への送達（ex vivo投与）の場合もあり、標的組織への送達（in vivo投与）の場合もある。さらなる送達法は、送達される核酸の、EnGeneIC送達媒体（EDV）へのパッケージングの使用を含む。これらのEDVは、抗体の1つのアームが、標的組織に対する特異性を有し、他のアームがEDVに対する特異性を有する、二特異性抗体を使用して、標的組織へと特異的に送達される。抗体により、EDVは、標的細胞の表面に至り、次いで、EDVは、エンドサイトーシスにより、細胞内に至る。

【0465】

操作されたCRISPR分子、TALEN分子、トランスポゾンベースのZEN分子、メガヌクレアーゼ分子、もしくはMega-TAL分子、トランスポゾン、および／またはトランス遺伝子をコードする核酸を含有する、ウイルスベクターおよび非ウイルスベクターを含むベクターもまた、in vivoにおける細胞への形質導入のために、生物へと、直接投与することができる。代替的に、ネイキッドDNAまたはmRNAも投与することができる。投与は、分子を、血液または組織細胞と、最終的に接触させるために通常使用される経路であって、注射、注入、局所適用、および電気穿孔を含むがこれらに限定されない経路のうちのいずれかによる。1つを超える経路を使用して、特定の組成物を投与することができる。薬学的に許容される担体は、投与される特定の組成物、ならびに組成物を投与するのに使用される特定の方法により、部分的に決定される。

【0466】

場合によって、外因性トランス遺伝子（例えば、TCRまたはがん遺伝子）をコードするベクターは、細胞内ヌクレアーゼへとシャトリングすることができる。例えば、ベクターは、核局在化配列（NLS）を含有し得る。ベクターはまた、タンパク質またはタンパク質複合体によりシャトリングすることもできる。場合によって、Cas9は、ミニサークルベクターをシャトリングする手段として使用することができる。Casは、NLSを含み得る。場合によって、ベクターは、電気穿孔の前に、Casタンパク質とあらかじめ複合体化させることができる。シャトリングのために使用され得るCasタンパク質は、ヌクレアーゼ欠損Cas9（dCas9）タンパク質であり得る。シャトリングのために使用され得るCasタンパク質は、ヌクレアーゼコンピテントCas9であり得る。場合によって、Casタンパク質は、ガイドRNA、および外因性トランス遺伝子（例えば、TCRまたはがん遺伝子）をコードするプラスミドと、あらかじめ混合することができる。

【0467】

本明細書で開示される、ある特定の態様は、ベクターを用いる。例えば、使用され得るベクターは、細菌用：pBs、pQE-9（Qiagen）、phagescript、PsiX174、pBluescriptSK、pBsKS、pNH8a、pNH16a、pNH18a、pNH46a（Stratagene）；pTrc99A、pKK2

23-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5 (Pharmacia)。真核細胞用：pWL-neo、pSv2cat、pOG44、pXT1、pSG (Stratagene) pSVK3、pBPv、pMSG、pSVL (Pharmacia) を含むがこれらに限定されない。それらが、選択された宿主内で、複製可能であり、生存する限りにおいて、他の任意のプラスミドおよびベクターもまた、使用することができる。任意のベクターおよび市販のベクター（およびこれらの変異体または誘導体）は、方法における使用のための、1または複数の組換え部位を含むように操作することができる。このようなベクターは、例えば、Vector Laboratories Inc.、Invitrogen、Promega、Novagen、NEB、Clontech、Boehringer Mannheim、Pharmacia、EpiCenter、OriGenes Technologies Inc.、Stratagene、PerkinElmer、Pharmingen、およびResearch Geneticsから得ることができる。目的の他のベクターは、pFastBac、pFastBacHT、pFastBacDUAL、pSFV、およびpTet-Splice (Invitrogen)、pEUK-C1、pPUR、pMAM、pMAMneo、pBI101、pBI121、pDR2、pCMVEBNA、およびpYACneo (Clontech)、pSVK3、pSVL、pMSG、pCH110、およびpKK232-8 (Pharmacia, Inc.)、p3'SS、pXT1、pSG5、pPbac、pMbac、pMC1neo、およびpOG44 (Stratagene, Inc.)、およびpYES2、pAC360、pBlueBacHis A、B、およびC、pVL1392、pBlueBac111、pCDM8、pcDNA1、pZeoSV、pcDNA3 pREP4、pCEP4、およびpEBVHis (Invitrogen, Corp.)、ならびにこれらの変異体または誘導体などの真核細胞用発現ベクターを含む。他のベクターは、pUC18、pUC19、pBlueScript、pSPORT、コスミド、ファージミド、YAC (酵母人工染色体)、BAC (細菌的人工染色体)、P1 (Escherichia coliファージ)、pQE70、pQE60、pQE9 (Quagant)、pBSベクター、PhageScriptベクター、BlueScriptベクター、pNH8A、pNH16A、pNH18A、pNH46A (Stratagene)、pcDNA3 (Invitrogen)、pGEX、pTrsfus、pTrc99A、pET-5、pET-9、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5 (Pharmacia)、pSPORT1、pSPORT2、pCMVSPORT2.0およびpSYSPORT1 (Invitrogen)、ならびにこれらの変異体または誘導体を含む。さらなる目的のベクターはまた、Invitrogen製のpTrxFus、pThioHis、pLEX、pTrcHis、pTrcHis2、pRSET、pBlueBacHis2、pcDNA3.1/His、pcDNA3.1(-)/Myc-His、pSecTag、pEBVHis、pPIC9K、pPIC3.5K、pA081S、pPICZ、pPICZA、pPICZB、pPICZC、pGAPZA、pGAPZB、pGAPZC、pBlue-Bac4.5、pBlueBacHis2、pMelBac、pSinRep5、pSinHis、pIND、pIND (SP1)、pVgRXXR、pcDNA2.1、pYES2、pZer01.1、pZerO-2.1、pCR-Blunt、pSE280、pSE380、pSE420、pVL1392、pVL1393、pCDM8、pcDNA1.1、pcDNA1.1/Amp、pcDNA3.1、pcDNA3.1/Zeo、pSe、SV2、pRc/CMV2、pRc/R5V、pREP4、pREP7、pREP8、pREP9、pREP10、pCEP4、pEBVHis、pCR3.1、pCR2.1、pCR3.1-Uni、およびpCRBac; Pharmacia製のX-ExCell1、X-gt11、pTrc99A、pKK223-3、pGEX-1XT、pGEX-2T、pGEX-2TK、pGEX-4T-1、pGEX-4T-2、pGEX-4T-3、pGEX-3X、pGEX-5X-1、pGEX-5X-2、pGEX-5X-3、pEZZ18、pRIT2T、pMC1871、pSVK3、pSVL、pMSG、pCH110、pKK232-8、pS

10

20

30

40

50

L1180、pNEO、およびpUC4K；Novagen製のpSCREEN-1b (+)、pT7Blue (R)、pT7Blue-2、pCITE-4-abc (+)、pOCUS-2、pTA_g、pET-32LIC、pET-30LIC、pBAC-2 cp LIC、pBACgus-2 cp LIC、pT7Blue-2 LIC、pT7Blue-2、X SCREEN-1、X BlueSTAR、pET-3abcd、pET-7abc、pET9abcd、pET11abcd、pET12abc、pET-14b、pET-15b、pET-16b、pET-17b-pET-17xb、pET-19b、pET-20b (+)、pET-21abcd (+)、pET-22b (+)、pET-23abcd (+)、pET-24abcd (+)、pET-25b (+)、pET-26b (+)、pET-27b (+)、pET-28abc (+)、pET-29abc (+)、pET-30abc (+)、pET-31b (+)、pET-32abc (+)、pET-33b (+)、pBAC-1、pBACgus-1、pBAC4x-1、pBACgus4x-1、pBAC-3 cp、pBACgus-2 cp、pBACsurf-1、plg、Signal plg、pYX、Selecta Vecta-Neo、Selecta Vecta-Hyg、およびSelecta Vecta-Gpt；Clontech製のpLexA、pB42AD、pGBT9、pAS2-1、pGAD424、pACT2、pGAD GL、pGAD GH、pGAD10、pGilda、pEZM3、pEGFP、pEGFP-1、pEGFPN、pEGFP-C、pEBFP、pGFPUv、pGFP、p6xHis-GFP、pSEAP2-Basic、pSEAP2-Contral、pSEAP2-Promoter、pSEAP2-Enhancer、pI3gal-Basic、pI3gal-Contral、pI3gal-Promoter、pI3gal-Enhancer、pCMV、pTet-Off、pTet-On、pTK-Hyg、pRetro-Off、pRetro-On、pIRES1neo、pIRES1hyg、pLXSN、pLNCX、pLAPSN、pMAMneo、pMAMneo-CAT、pMAMneo-LUC、pPUR、pSV2neo、pYEX4T-1/2/3、pYEX-S1、pBacPAK-His、pBacPAK8/9、pAcUW31、BacPAK6、pTriplex、2Xgt10、Xgt11、pWE15、およびX Triplex；Stratagene製のLambda ZAP II、pBK-CMV、pBK-RSV、pBluescript II KS+/-、pBluescript II SK+/-、pAD-GAL4、pBD-GAL4 Cam、pSurfscrip、Lambda FIX II、Lambda DASH、Lambda EMBL3、Lambda EMBL4、SuperCos、pCR-Scrip Amp、pCR-Scrip Cam、pCR-Scrip Direct、pBS+/-、pBC KS+/-、pBC SK+/-、Phag-escrip、pCAL-n-EK、pCAL-n、pCAL-c、pCAL-kc、pET-3abcd、pET-11abcd、pSPUTK、pESP-1、pCMVLacI、pOPRSVI/MCS、pOPI3 CAT、pXT1、pSG5、pPbac、pMbac、pMC1neo、pMC1neo Poly A、pOG44、pOG45、pFRTI3GAL、pNEOI3GAL、pRS403、pRS404、pRS405、pRS406、pRS413、pRS414、pRS415、およびpRS416；pPC86、pDBLeu、pDBTrp、pPC97、p2.5、pGAD1-3、pGAD10、pAct、pACT2、pGADGL、pGADGH、pAS2-1、pGAD424、pGBT8、pGBT9、pGAD-GAL4、pLexA、pBD-GAL4、pHISi、pHISi-1、placZi、pB42AD、pDG202、pJK202、pJG4-5、pNLexA、pYESTrp、ならびにこれらの変異体または誘導体も含み得る。

【0468】

これらのベクターを使用して、目的の遺伝子、例えば、トランス遺伝子、または目的の遺伝子の部分を発現させることができる。遺伝子の部分または遺伝子は、任意の方法を使用することにより挿入することができる。例えば、方法は、制限酵素ベースの技法であり

得る。

【0469】

ベクターは、下記で記載される通り、*in vivo*において、個別の患者への投与により、典型的に、全身投与（例えば、静脈内注入、腹腔内注入、筋内注入、皮下注入、または頭蓋内注入）または局所適用により送達することができる。代替的に、ベクターは、*ex vivo*において、個別の患者から外植された細胞（例えば、リンパ球、T細胞、骨髓吸引物、組織生検）などの細胞へと送達することもできるが、通例、ベクターを組み込んだ細胞についての選択の後、患者への細胞の再移植がこれに続く。選択の前に、または選択の後で、細胞は、拡大することができる。ベクターは、ミニサークルベクターであり得る（図43）。

10

【0470】

細胞に、ミニサークルベクターおよびCRISPR系をトランスフェクトすることができる。場合によって、ミニサークルベクターは、CRISPR系ならびに／またはヌクレアーゼもしくはヌクレアーゼをコードするポリペプチドを細胞または細胞集団へと導入すると同時に、その前に、またはその後に、細胞または細胞集団へと導入される。ミニサークルベクターの濃度は、0.5ナノグラム～50マイクログラムであり得る。場合によって、電気穿孔により細胞へと導入され得る核酸（例えば、ssDNA、dsDNA、RNA）の量を変動させて、トランスフェクション効率および／または細胞生存率を最適化することができる。場合によって、約100ピコグラム未満の核酸を、各細胞試料（例えば、電気穿孔される、1または複数の細胞）へと添加することができる。場合によって、少なくとも約100ピコグラム、少なくとも約200ピコグラム、少なくとも約300ピコグラム、少なくとも約400ピコグラム、少なくとも約500ピコグラム、少なくとも約600ピコグラム、少なくとも約700ピコグラム、少なくとも約800ピコグラム、少なくとも約900ピコグラム、少なくとも約1マイクログラム、少なくとも約1.5マイクログラム、少なくとも約2マイクログラム、少なくとも約2.5マイクログラム、少なくとも約3マイクログラム、少なくとも約3.5マイクログラム、少なくとも約4マイクログラム、少なくとも約4.5マイクログラム、少なくとも約5マイクログラム、少なくとも約5.5マイクログラム、少なくとも約6マイクログラム、少なくとも約6.5マイクログラム、少なくとも約7マイクログラム、少なくとも約7.5マイクログラム、少なくとも約8マイクログラム、少なくとも約8.5マイクログラム、少なくとも約9マイクログラム、少なくとも約9.5マイクログラム、少なくとも約10マイクログラム、少なくとも約11マイクログラム、少なくとも約12マイクログラム、少なくとも約13マイクログラム、少なくとも約14マイクログラム、少なくとも約15マイクログラム、少なくとも約20マイクログラム、少なくとも約25マイクログラム、少なくとも約30マイクログラム、少なくとも約35マイクログラム、少なくとも約40マイクログラム、少なくとも約45マイクログラム、または少なくとも約50マイクログラムの核酸を、各細胞試料（例えば、電気穿孔される、1または複数の細胞）へと添加することができる。例えば、1マイクログラムのdsDNAを、電気穿孔のために、各細胞試料へと添加することができる。場合によって、最適のトランスフェクション効率および／または細胞生存率に要求される核酸（例えば、dsDNA）の量は、細胞型に特異的であり得る。場合によって、各試料のために使用される核酸（例えば、dsDNA）の量は、トランスフェクション効率および／または細胞生存率に直接対応し得る。例えば、ミニサークルトランスフェクションの濃度範囲を、図70A、図70B、および図73に示す。5および20マイクログラムの濃度でトランスフェクトされた、ミニサークルベクターの組み込みの効率についての概要について描示する、代表的なフローサイトメトリー実験を、図74、図78、および図79に示す。ミニサークルベクターによりコードされるトランス遺伝子は、細胞ゲノムへと組み込まれ得る。場合によって、ミニサークルベクターによりコードされるトランス遺伝子の組み込みは、順方向でなされる（図75）。他の場合には、ミニサークルベクターによりコードされるトランス遺伝子の組み込みは、逆方向でなされる。場合によって、非ウイルス系（例えば、ミニサークル）は、細胞または細胞集団へと、CRISPR系

20

30

40

50

、またはヌクレアーゼもしくはヌクレアーゼをコードするポリ核酸を前記細胞または前記細胞集団へと導入した後、約1～3時間、3～6時間、6～9時間、9～12時間、12～15時間、15～18時間、18～21時間、21～23時間、23～26時間、26～29時間、29～31時間、31～33時間、33～35時間、35～37時間、37～39時間、39～41時間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、14日間、16日間、20日間、または20日間よりも長い期間、ほぼこれらの期間から、少なくともほぼこれらの期間、または最大で、導入する。

【0471】

本明細書で記載される核酸送達プラットフォーム、例えば、ヌクレオフェクションまたは電気穿孔のうちのいずれかによる、細胞のトランスフェクション効率は、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、もしくは99.9%を超えうるか、またはほぼこれらの比率であり得る。

【0472】

例えば、Neon（登録商標）Transfection System（ThermoFisher Scientific）またはAMAXA（登録商標）Nucleofector（AMAXA（登録商標）Biosystems）を使用する電気穿孔もまた、細胞への核酸の送達のために使用することができる。電気穿孔パラメータは、トランスフェクション効率および／または細胞生存率を最適化するように調整することができる。電気穿孔デバイスは、指数関数的減衰、時定数、および方形波など、複数の電気波形パルスの設定項目を有し得る。あらゆる細胞型は、適用されるパルスパラメータ（例えば、電圧、キャパシタンス、および抵抗）に依存する、固有の最適電界強度（E）を有する。最適電界強度の適用は、膜貫通電圧の誘導による電気透過化であって、核酸が細胞膜を通過することを可能とする電気透過化を引き起こす。場合によって、電気穿孔パルスの電圧、電気穿孔パルス幅、パルス数、細胞密度、およびチップ型は、トランスフェクション効率および／または細胞生存率を最適化するように調整することができる。

【0473】

場合によって、電気穿孔パルスの電圧を変動させて、トランスフェクション効率および／または細胞生存率を最適化することができる。場合によって、電気穿孔電圧は、約500ボルト未満であり得る。場合によって、電気穿孔電圧は、少なくとも約500ボルト、少なくとも約600ボルト、少なくとも約700ボルト、少なくとも約800ボルト、少なくとも約900ボルト、少なくとも約1000ボルト、少なくとも約1100ボルト、少なくとも約1200ボルト、少なくとも約1300ボルト、少なくとも約1400ボルト、少なくとも約1500ボルト、少なくとも約1600ボルト、少なくとも約1700ボルト、少なくとも約1800ボルト、少なくとも約1900ボルト、少なくとも約2000ボルト、少なくとも約2100ボルト、少なくとも約2200ボルト、少なくとも約2300ボルト、少なくとも約2400ボルト、少なくとも約2500ボルト、少なくとも約2600ボルト、少なくとも約2700ボルト、少なくとも約2800ボルト、少なくとも約2900ボルト、または少なくとも約3000ボルトであり得る。場合によって、最適のトランスフェクション効率および／または細胞生存率に要求される電気穿孔パルスの電圧は、細胞型に特異的であり得る。例えば、1900ボルトの電気穿孔電圧は、マクロファージ細胞に最適であり得る（例えば、最高の生存率および／またはトランスフェクション効率をもたらし得る）。別の例では、約1350ボルトの電気穿孔電圧は、Jurkat細胞、またはT細胞などの初代ヒト細胞に最適であり得る（例えば、最高の生存率および／またはトランスフェクション効率をもたらし得る）。場合によって、電気穿孔電圧の範囲は、所与の細胞型に最適であり得る。例えば、約1000ボルト～約1300ボルトの間の電気穿孔電圧は、ヒト578T細胞に最適であり得る（例えば、最高の生存率および／またはトランスフェクション効率をもたらし得る）。場合によって、初代細胞は初代リンパ球であり得る。場合によって、初代細胞集団は、リンパ球集団であり得る。

【0474】

場合によって、電気穿孔パルス幅を変動させて、トランスフェクション効率および／または細胞生存率を最適化することができる。場合によって、電気穿孔パルス幅は、約5ミリ秒未満であり得る。場合によって、電気穿孔幅は、少なくとも約5ミリ秒、少なくとも約6ミリ秒、少なくとも約7ミリ秒、少なくとも約8ミリ秒、少なくとも約9ミリ秒、少なくとも約10ミリ秒、少なくとも約11ミリ秒、少なくとも約12ミリ秒、少なくとも約13ミリ秒、少なくとも約14ミリ秒、少なくとも約15ミリ秒、少なくとも約16ミリ秒、少なくとも約17ミリ秒、少なくとも約18ミリ秒、少なくとも約19ミリ秒、少なくとも約20ミリ秒、少なくとも約21ミリ秒、少なくとも約22ミリ秒、少なくとも約23ミリ秒、少なくとも約24ミリ秒、少なくとも約25ミリ秒、少なくとも約26ミリ秒、少なくとも約27ミリ秒、少なくとも約28ミリ秒、少なくとも約29ミリ秒、少なくとも約30ミリ秒、少なくとも約31ミリ秒、少なくとも約32ミリ秒、少なくとも約33ミリ秒、少なくとも約34ミリ秒、少なくとも約35ミリ秒、少なくとも約36ミリ秒、少なくとも約37ミリ秒、少なくとも約38ミリ秒、少なくとも約39ミリ秒、少なくとも約40ミリ秒、少なくとも約41ミリ秒、少なくとも約42ミリ秒、少なくとも約43ミリ秒、少なくとも約44ミリ秒、少なくとも約45ミリ秒、少なくとも約46ミリ秒、少なくとも約47ミリ秒、少なくとも約48ミリ秒、少なくとも約49ミリ秒、または少なくとも約50ミリ秒であり得る。場合によって、最適のトランスフェクション効率および／または細胞生存率に要求される電気穿孔パルス幅は、細胞型に特異的であり得る。例えば、30ミリ秒の電気穿孔パルス幅は、マクロファージ細胞に最適であり得る（例えば、最高の生存率および／またはトランスフェクション効率をもたらし得る）。別の例では、約10ミリ秒の電気穿孔幅は、Jurkat細胞に最適であり得る（例えば、最高の生存率および／またはトランスフェクション効率をもたらし得る）。場合によって、電気穿孔幅の範囲は、所与の細胞型に最適であり得る。例えば、約20ミリ秒～約30ミリ秒の間の電気穿孔幅は、ヒト578T細胞に最適であり得る（例えば、最高の生存率および／またはトランスフェクション効率をもたらし得る）。

10

20

【0475】

場合によって、電気穿孔パルスの数を変動させて、トランスフェクション効率および／または細胞生存率を最適化することができる。場合によって、電気穿孔は、単一のパルスを含み得る。場合によって、電気穿孔は、1つを超えるパルスを含み得る。場合によって、電気穿孔は、2つのパルス、3つのパルス、4つのパルス、5つのパルス6つのパルス、7つのパルス、8つのパルス、9つのパルス、または10もしくはそれよりも多いパルスを含み得る。場合によって、最適のトランスフェクション効率および／または細胞生存率に要求される電気穿孔パルスの数は、細胞型に特異的であり得る。例えば、単一のパルスによる電気穿孔は、マクロファージ細胞に最適であり得る（例えば、最高の生存率および／またはトランスフェクション効率をもたらし得る）。別の例では、3つのパルスによる電気穿孔は、初代細胞に最適であり得る（例えば、最高の生存率および／またはトランスフェクション効率をもたらし得る）。場合によって、電気穿孔幅の範囲は、所与の細胞型に最適であり得る。例えば、約1つ～約3つの間のパルスによる電気穿孔は、ヒト細胞に最適であり得る（例えば、最高の生存率および／またはトランスフェクション効率をもたらし得る）。

30

40

【0476】

場合によって、電気穿孔のための出発細胞密度を変動させて、トランスフェクション効率および／または細胞生存率を最適化することができる。場合によって、電気穿孔のための出発細胞密度は、細胞約 1×10^5 個未満であり得る。場合によって、電気穿孔のための出発細胞密度は、細胞少なくとも約 1×10^5 個、細胞少なくとも約 2×10^5 個、細胞少なくとも約 3×10^5 個、細胞少なくとも約 4×10^5 個、細胞少なくとも約 5×10^5 個、細胞少なくとも約 6×10^5 個、細胞少なくとも約 7×10^5 個、細胞少なくとも約 8×10^5 個、細胞少なくとも約 9×10^5 個、細胞少なくとも約 1×10^6 個、細胞少なくとも約 1.5×10^6 個、細胞少なくとも約 2×10^6 個、細胞少なくとも約2

50

5×10^6 個、細胞少なくとも約 3×10^6 個、細胞少なくとも約 3.5×10^6 個、細胞少なくとも約 4×10^6 個、細胞少なくとも約 4.5×10^6 個、細胞少なくとも約 5×10^6 個、細胞少なくとも約 5.5×10^6 個、細胞少なくとも約 6×10^6 個、細胞少なくとも約 6.5×10^6 個、細胞少なくとも約 7×10^6 個、細胞少なくとも約 7.5×10^6 個、細胞少なくとも約 8×10^6 個、細胞少なくとも約 8.5×10^6 個、細胞少なくとも約 9×10^6 個、細胞少なくとも約 9.5×10^6 個、細胞少なくとも約 1×10^7 個、細胞少なくとも約 1.2×10^7 個、細胞少なくとも約 1.4×10^7 個、細胞少なくとも約 1.6×10^7 個、細胞少なくとも約 1.8×10^7 個、細胞少なくとも約 2×10^7 個、細胞少なくとも約 2.2×10^7 個、細胞少なくとも約 2.4×10^7 個、細胞少なくとも約 2.6×10^7 個、細胞少なくとも約 2.8×10^7 個、細胞少なくとも約 3×10^7 個、細胞少なくとも約 3.2×10^7 個、細胞少なくとも約 3.4×10^7 個、細胞少なくとも約 3.6×10^7 個、細胞少なくとも約 3.8×10^7 個、細胞少なくとも約 4×10^7 個、細胞少なくとも約 4.2×10^7 個、細胞少なくとも約 4.4×10^7 個、細胞少なくとも約 4.6×10^7 個、細胞少なくとも約 4.8×10^7 個、または細胞少なくとも約 5×10^7 個であり得る。場合によって、最適のトランスフェクション効率および／または細胞生存率に要求される電気穿孔のための出発細胞密度は、細胞型に特異的であり得る。例えば、電気穿孔のための出発細胞密度であって、細胞 1.5×10^6 個の出発細胞密度は、マクロファージ細胞に最適であり得る（例えば、最高の生存率および／またはトランスフェクション効率をもたらし得る）。別の例では、電気穿孔のための出発細胞密度であって、細胞 5×10^6 個の出発細胞密度は、ヒト細胞に最適であり得る（例えば、最高の生存率および／またはトランスフェクション効率をもたらし得る）。場合によって、電気穿孔のための出発細胞密度の範囲は、所与の細胞型に最適であり得る。例えば、電気穿孔のための出発細胞密度であって、細胞 $5.6 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$ 個の間の出発細胞密度は、T細胞などのヒト細胞に最適であり得る（例えば、最高の生存率および／またはトランスフェクション効率をもたらし得る）。

【0477】

例えば、CRISPR系による、外因性トランス遺伝子（例えば、TCRまたはがん遺伝子）をコードする核酸配列の、細胞のゲノムへの組込みの効率は、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、もしくは99.9%を超え得るか、またはほぼこれらの比率であり得る。

【0478】

トランス遺伝子（例えば、TCRまたはがん遺伝子）など、外因性ポリ核酸の組込みは、任意の技法を使用して測定することができる。例えば、組込みは、フローサイトメトリー、Surveyorヌクレアーゼアッセイ（図56）、TIDE（tracking of indels by decomposition）（図71および図72）、ジャンクションPCR、またはこれらの任意の組合せにより測定することができる。代表的なTIDE解析を、PD-1ガイドRNAおよびCTLA-4ガイドRNAについて示される、遺伝子編集効率パーセントについて示す（図35および図36）。CISHガイドRNAについての代表的なTIDE解析を、図62～図67Aおよび67Bにより示す。他の場合には、トランス遺伝子の組込みは、PCRにより測定することができる（図77、図80、および図95）。TIDE解析はまた、rAAV遺伝子導入、続けて、内因性チェックポイント遺伝子のCRISPRによるノックアウトによって外因性トランス遺伝子（例えば、TCRまたはがん遺伝子）を発現するよう操作された細胞で実施することもできる（図146Aおよび図146B）。

【0479】

診断法、研究、または遺伝子治療のために、ex vivoにおける細胞へのトランスフェクション（例えば、トランスフェクトされた細胞の、宿主生物への再注入を介する）もまた、使用することができる。場合によって、細胞は、対象生物から単離し、核酸（例

えば、遺伝子またはcDNA)をトランスフェクトし、対象生物(例えば、患者)へと再注入し戻すことができる。

【0480】

患者において治療的に有効であるのに必要な細胞の量は、細胞の生存率と、細胞を遺伝子改変した効率(例えば、トランス遺伝子が1または複数の細胞へと組み込まれた効率)とに応じて変動し得る。場合によって、遺伝子改変後における細胞の生存率と、トランス遺伝子の組み込みの効率との積(例えば、乗算の結果)は、対象への投与に利用可能な細胞の治療用アリコートに対応し得る。場合によって、遺伝子改変後における細胞生存率の増大は、患者において治療的に有効な投与に必要な細胞の量の減少に対応し得る。場合によって、トランス遺伝子が1または複数の細胞へと組み込まれた効率の増大は、患者において治療的に有効な投与に必要な細胞の量の減少に対応し得る。場合によって、治療的に有効であるのに必要な細胞の量の決定は、細胞生存率の、時間経過にわたる変化に対応する関数の決定を含み得る。場合によって、治療的に有効であるのに必要な細胞の量の決定は、トランス遺伝子を1または複数の細胞へと組み込みうる効率の、時間依存的な変数(例えば、細胞の培養時間、電気穿孔時間、細胞の刺激時間)に対する変化に対応する関数の決定を含み得る。

【0481】

本明細書で記載される、rAAVなどのウイルス粒子を使用して、目的の遺伝子またはトランス遺伝子を含むウイルスベクターを、*ex vivo*または*in vivo*の細胞へと送達することができる(図105)。場合によって、本明細書で開示されるウイルスベクターは、pfu(プラーク形成単位)として測定され得る。場合によって、本開示の組成物および方法の組換えウイルスまたはウイルスベクターのpfuは、約 10^8 ~約 5×10^{10} pfuであり得る。場合によって、本開示の組換えウイルスは、少なくとも約 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、および 5×10^{10} pfuである。場合によって、本開示の組換えウイルスは、最大で約 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、および 5×10^{10} pfuである。一部の態様では、本開示のウイルスベクターは、ベクターゲノムとして測定され得る。場合によって、本開示の組換えウイルスは、 1×10^{10} ~ 3×10^{12} ベクターゲノム、または 1×10^9 ~ 3×10^{13} ベクターゲノム、または 1×10^8 ~ 3×10^{14} ベクターゲノム、または少なくとも約 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1×10^{13} 、 1×10^{14} 、 1×10^{15} 、 1×10^{16} 、 1×10^{17} 、および 1×10^{18} ベクターゲノムであるか、または 1×10^8 ~ 3×10^{14} ベクターゲノムであるか、または最大で約 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1×10^{13} 、 1×10^{14} 、 1×10^{15} 、 1×10^{16} 、 1×10^{17} 、および 1×10^{18} ベクターゲノムである。

【0482】

場合によって、本開示のウイルスベクター(例えば、AAVまたは修飾AAV)は、感染多重度(MOI)を使用して測定され得る。場合によって、MOIは、ベクターまたはウイルスゲノムの、核が送達され得る細胞に対する比率または倍数を指し得る。場合によって、MOIは 1×10^6 であり得る。場合によって、MOIは 1×10^5 ~ 1×10^7 であり得る。場合によって、MOIは 1×10^4 ~ 1×10^8 であり得る。場合によって、本開示の組換えウイルスは、少なくとも約 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10}

、 1×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1×10^{13} 、 1×10^{14} 、 1×10^{15} 、 1×10^{16} 、 1×10^{17} 、および 1×10^{18} MOIである。場合によって、本開示の組換えウイルスは、 $1 \times 10^8 \sim 3 \times 10^{14}$ MOIであるか、または最大で約 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1×10^{13} 、 1×10^{14} 、 1×10^{15} 、 1×10^{16} 、 1×10^{17} 、および 1×10^{18} MOIである。場合によって、AAVおよび／または修飾AAVベクターは、約 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 から、または細胞当たり最大で約 9×10^9 ゲノムコピー／ウイルス粒子の感染多重度(MOI)で、導入される。

【0483】

一部の態様では、非ウイルスベクターまたは核酸は、ウイルスを使用することなく送達され得、核酸の量に従って測定され得る。一般に、核酸の任意の適切な量が、本開示の組成物および方法と共に使用され得る。場合によって、核酸は、少なくとも約1 pg、10 pg、100 pg、1 pg、10 pg、100 pg、200 pg、300 pg、400 pg、500 pg、600 pg、700 pg、800 pg、900 pg、1 μg、10 μg、100 μg、200 μg、300 μg、400 μg、500 μg、600 μg、700 μg、800 μg、900 μg、1 ng、10 ng、100 ng、200 ng、300 ng、400 ng、500 ng、600 ng、700 ng、800 ng、900 ng、1 mg、10 mg、100 mg、200 mg、300 mg、400 mg、500 mg、600 mg、700 mg、800 mg、900 mg、1 g、2 g、3 g、4 g、または5 gであり得る。場合によって、核酸は、最大で約1 pg、10 pg、100 pg、1 pg、10 pg、100 pg、200 pg、300 pg、400 pg、500 pg、600 pg、700 pg、800 pg、900 pg、1 μg、10 μg、100 μg、200 μg、300 μg、400 μg、500 μg、600 μg、700 μg、800 μg、900 μg、1 ng、10 ng、100 ng、200 ng、300 ng、400 ng、500 ng、600 ng、700 ng、800 ng、900 ng、1 mg、10 mg、100 mg、200 mg、300 mg、400 mg、500 mg、600 mg、700 mg、800 mg、900 mg、1 g、2 g、3 g、4 g、または5 gであり得る。

【0484】

場合によって、ウイルス(AAVまたは修飾AAV)または非ウイルスベクターは、細胞または細胞集団へと導入される。場合によって、細胞毒性は、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターが細胞または細胞集団へと導入された後に測定される。場合によって、細胞毒性は、野生型AAVまたは非ウイルスベクター(例えば、ミニサークル)が、同等の細胞または同等の細胞集団へと導入される場合より、修飾AAVベクターが使用される場合に低い。場合によって、細胞毒性は、フローサイトメトリーによって測定される。場合によって、細胞毒性は、野生型または非修飾AAVまたはミニサークルと比較して、修飾AAVが使用される場合、約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、12%、15%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、82%、85%、88%、90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくは100%、少なくともほぼこれらの比率、または最大でほぼこれらの比率だけ低減される。場合によって、細胞毒性は、ミニサークルベクターまたは非ウイルスベクターが使用される場合と比較して、AAVベクターが使用される場合、約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、12%、15%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、82%、85%、88%、90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくは100%、少なくともほぼこれらの比率、または最大でほぼこれらの比率だ

け低減される。

【0485】

a. 機能的移植

移植前、移植後、および／または移植時における細胞（例えば、操作細胞または操作された初代T細胞）は、機能的であり得る。例えば、移植された細胞は、移植後、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、6、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90、もしくは100日間、または少なくともほぼこれらの期間にわたり機能的であり得る。移植された細胞は、移植後、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、もしくは12カ月間、または少なくともほぼこれらの期間にわたり機能的であり得る。移植された細胞は、移植後、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、もしくは30年間、または少なくともほぼこれらの期間にわたり機能的であり得る。場合によって、移植された細胞は、最長でレシピエントの生涯にわたり機能的であり得る。

10

【0486】

さらに、移植された細胞は、その意図される正常な働きの100%で機能し得る。移植された細胞はまた、その意図される正常な働きの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%でも機能し得る。

20

【0487】

移植された細胞はまた、その意図される正常な働きの100%を超えても機能し得る。例えば、移植された細胞は、その意図される正常な働きの110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1000%、またはそれよりも多く機能し得る。

30

【0488】

医薬組成物および医薬製剤

全体を通して記載される組成物は、医薬への製剤化であることが可能であり、それを必要とするヒトまたは哺乳動物であって、疾患、例えば、がんを伴うと診断されたヒトまたは哺乳動物を処置するのに使用することができる。これらの医薬は、1または複数のT細胞（例えば、操作T細胞）と共に、1または複数の化学療法剤または化学療法化合物と併せて、ヒトまたは哺乳動物へと共投与することができる。

【0489】

本明細書で使用される「化学療法剤」または「化学療法化合物」およびこれらの文法的同等物は、がんの処置において有用な化合物であり得る。開示されるT細胞と組み合わせて使用され得るがん化学療法剤は、有糸分裂インヒビター（ビンカアルカロイド）を含むがこれらに限定されない。これらは、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、およびNavelbine（商標）（ビノレルビン；5'-ノルアンヒドロブラスチン）を含む。さらに他の場合には、がん化学療法剤は、カンプトテシン化合物などのトポイソメラーゼIインヒビターを含む。本明細書で使用される「カンプトテシン化合物」は、Camptosar（商標）（イリノテカンHCL）、Hycamtin（商標）（トポテカンHCL）、ならびにカンプトテシンおよびその類似体由来する他の化合物を含む。本明細書で開示される方法および組成物において使用され得るがん化学療法剤の別の類別は、エトポシド、テニポシド、およびミトポドジドなどのポドフィロトキシン誘導体である。本開示はさらに、アルキル化剤として公知の、他のがん化学療法剤であって、腫瘍細胞

40

50

内の遺伝子素材をアルキル化するがん化学療法剤も包含する。これらは、限定なしに、シスプラチン、シクロホスファミド、窒素マスタード、トリメチレンチオホスホルアミド、カルムスチン、ブスルファン、クロラムブシル、ベルスチン、ウラシルマスタード、クロマファジン、およびダカルバジンを含む。本開示は、化学療法剤としての代謝拮抗剤を包含する。これらの種類の薬剤の例は、シトシンアラビノシド、フルオロウラシル、メトトレキサート、メルカプトプリン、アザチオプリン、およびプロカルバジンを含む。本明細書で開示される方法および組成物において使用され得るがん化学療法剤のさらなる類別は、抗生物質を含む。例は、限定なしに、ドキソルビシン、ブレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ミトラマイシン、マイトマイシン、マイトマイシンC、およびダウノマイシンを含む。これらの化合物のために、多数のリボソーム製剤が市販されている。本開示はさらに、限定なしに、抗腫瘍抗体、ダカルバジン、アザシチジン、アムサクリン、メルファラン、イホスファミド、およびミトキサントロンを含む、他のがん化学療法剤も包含する。

【0490】

本明細書で開示されるT細胞は、細胞傷害剤／抗新生物剤および抗血管新生剤を含む、他の抗腫瘍剤と組み合わせて投与することができる。細胞傷害剤／抗新生物剤は、がん細胞を攻撃し、死滅させる薬剤と規定することができる。一部の細胞傷害剤／抗新生物剤は、腫瘍細胞内の遺伝子素材をアルキル化するアルキル化剤、例えば、シスプラチン、シクロホスファミド、窒素マスタード、トリメチレンチオホスホルアミド、カルムスチン、ブスルファン、クロラムブシル、ベルスチン、ウラシルマスタード、クロマファジン、およびダカルバジン(dacarbazine)であり得る。他の細胞傷害剤／抗新生物剤は、腫瘍細胞のための代謝拮抗剤、例えば、シトシンアラビノシド、フルオロウラシル、メトトレキサート、メルカプトプリン、アザチオプリン、およびプロカルバジンであり得る。他の細胞傷害剤／抗新生物剤は、抗生物質、例えば、ドキソルビシン、ブレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ミトラマイシン、マイトマイシン、マイトマイシンC、およびダウノマイシンであり得る。これらの化合物のために、多数のリボソーム製剤が市販されている。さらに他の細胞傷害剤／抗新生物剤は、有糸分裂インヒビター(ビンカアルカロイド)であり得る。これらは、ビンクリスチン、ビンブラスチン、およびエトポシドを含む。種々の細胞傷害剤／抗新生物剤は、タキソールおよびその誘導体、L-アスパラギナーゼ、抗腫瘍抗体、ダカルバジン、アザシチジン、アムサクリン、メルファラン、VM-26、イホスファミド、ミトキサントロン、およびビンデシンを含む。

【0491】

抗血管新生剤もまた、使用することができる。開示される方法および組成物における使用に適する抗血管新生剤は、ヒト化抗体およびキメラ抗体を含む抗VEGF抗体、抗VEGFアプタマー、ならびにアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。他の血管新生インヒビターは、アンジオスタチン、エンドスタチン、インターフェロン、インターロイキン1(α および β を含む)、インターロイキン12、レチノイン酸、ならびにTIMP-1およびTIMP-2(tissue inhibitors of metalloproteinase-1およびtissue inhibitors of metalloproteinase-2)を含む。抗血管新生活性を伴うトポイソメラーゼIIインヒビターである、ラゾキサンなどのトポイソメラーゼインヒビターを含む低分子もまた使用することができる。

【0492】

開示されるT細胞と組み合わせて使用され得る他の抗がん剤は、アシビシン；アクリラルビシン；アコダゾール塩酸塩；アクロニン；アドゼレシン；アデルスロイキン；アルトレタミン；アンボマイシン；アメタントロン酢酸塩；アミノグルテチミド；アムサクリン；アナストロゾール；アントラマイシン；アスパラギナーゼ；アスペルリン；アバスチン；アザシチジン；アゼテパ；アゾトマイシン；バチマスタット；ベンゾデパ；ビカルタミド；ピサントレン塩酸塩；ビスナフィドジメシレート；ビゼレシン；ブレオマイシン硫酸塩；ブレキナルナトリウム；プロピリミン；ブスルファン；カクチノマイシン；カルステロ

ン；カラセミド；カルベチマー；カルボプラチン；カルムスチン；カルビシン塩酸塩；カルゼレシン；セデフィンゴール；クロラムブシル；シロレマイシン；シスプラチン；クラドリピン；メシル酸クリスナトール；シクロホスファミド；シタラビン；ダカルバジン；ダクチノマイシン；ダウノルビシン塩酸塩；デシタビン；デキソルマプラチン；デザグアニン；メシル酸デザグアニン；ジアジコン；ドセタキセル；ドキソルビシン；ドキソルビシン塩酸塩；ドロロキシフェン；ドロロキシフェンクエン酸塩；プロピオン酸ドロモスタノロン；ズアゾマイシン；エダトレキサート；エフロルニチン塩酸塩；エルサミトルシン；エンロプラチン；エンプロメート；エピプロピジン；エピルビシン塩酸塩；エルプロゾール；エソルビシン塩酸塩；エストラムスチン；エストラムスチンリン酸エステルナトリウム；エタニダゾール；エトポシド；エトポシドリル酸塩；エトプリン；ファドロゾール塩酸塩；ファザラビン；フェンレチニド；フロクスウリジン；フルダラビンリン酸エステル；フルオロウラシル；フルロシタビン；フォスキドン；フォストリエシンナトリウム；ゲムシタビン；ゲムシタビン塩酸塩；ヒドロキシ尿素；イダルビシン塩酸塩；イホスファミド；イルモフォシン；インターロイキン I I（組換えインターロイキン I I または r I L 2 を含む）、インターフェロンアルファ-2 a；インターフェロンアルファ-2 b；インターフェロンアルファ-n 1；インターフェロンアルファ-n 3；インターフェロンベーター I a；インターフェロンガンマー I b；イプロプラチン；イリノテカン塩酸塩；ランレオチド酢酸塩；レトロゾール；ロイプロリド酢酸塩；リアロゾール塩酸塩；ロメトレキソールナトリウム；ロムスチン；ロソキサントロン塩酸塩；マソプロコール；メイタンシン；メクロレタミン塩酸塩；メゲストロール酢酸塩；メレンゲストロール酢酸エステル；メルファラン；メノガリル；メルカプトプリン；メトトレキサート；メトトレキサートナトリウム；メトプリン；メツレデバ；ミチンドミド；マイトカルシン；マイトクロミン；マイトギリン；マイトマルシン；マイトマイシン；マイトスペル；ミトタン；ミトキサントロン塩酸塩；ミコフェノール酸；ノコダゾール；ノガラマイシン；オルマプラチン；オキシスラン；パクリタキセル；ペガスパルガーゼ；ペリオマイシン；ペンタムスチン；ペプロマイシン硫酸塩；ペルホスファミド；ピボプロマン；ピボスルファン；ピロキサントロン塩酸塩；プリカマイシン；プロメスタン；ポルフィマーナトリウム；ポルフィロマイシン；プレドニムスチン；プロカルバジン塩酸塩；ピューロマイシン；ピューロマイシン塩酸塩；ピラゾフリン；リボプリン；ログレチミド；サフィンゴール；サフィンゴール塩酸塩；セムスチン；シムトラゼン；スパルホセートナトリウム；スパルソマイシン；スピロゲルマニウム塩酸塩；スピロムスチン；スピロプラチン；ストレプトニグリン；ストレプトゾシン；スロフェヌル；タリソマイシン；テコガラナトリウム；テガフル；テロキサントロン塩酸塩；テモポルフィン；テニポシド；テロキシロン；テストラクトン；チアミプリン；チオグアニン；チオテパ；チアゾフリン；チラパザミン；トレミフェンクエン酸塩；酢酸トレストロン；リン酸トリシリピン；トリメトレキサート；グルクロン酸トリメトレキサート；トリプトレリン；ツプロゾール塩酸塩；ウラシルマスタード；ウレデバ；パブレオチド；ベルテポルフィン；ビンブラスチン硫酸塩；ビンクリスチン硫酸塩；ビンデシン；ビンデシン硫酸塩；ビネピジン硫酸塩；硫酸ビングリシネート；硫酸ビンレウロシン；ビノレルビン酒石酸塩；硫酸ビンロシジン；ビンゾリジン硫酸塩；ボロゾール；ゼニプラチン；ジノスタチン；ゾルビシン塩酸塩を含むがこれらに限定されない。他の抗がん薬は、20-epi-1, 25ジヒドロキシビタミン D 3；5-エチニルウラシル；アビラテロン；アクラルビシン；アシルフルベン；アデシペノール；アドゼレシン；アデルスロイキン；ALL-TKアンタゴニスト；アルトレタミン；アンバムスチン；アミドックス；アミホスチン；アミノレブリン酸；アムルビシン；アムサクリン；アナグレリド；アナストロゾール；アンドログラホリド；血管新生インヒビター；アンタゴニスト D；アンタゴニスト G；アントラレリックス；ADMP (anti-dorsalizing morphogenetic protein)-1；前立腺癌用の抗アンドロゲン；抗エストロゲン；抗ネオプラストン；アンチセンスオリゴヌクレオチド；アフィジコリングリシネート；アポトーシス遺伝子モジュレーター；アポトーシス調節剤；アプリン酸；ara-CDP-DL-PTBA；アルギニンデアミナーゼ；アスラクリン；アタメ

10

20

30

40

50

スタン；アトリムスチン；アキシナスタチン1；アキシナスタチン2；アキシナスタチン
 3；アザセトロン；アザトキシシン；アザチロシン；バックアチンI I I誘導体；バラノール
 ；バチマスタット；BCR／ABLアンタゴニスト；ベンゾクロリン；ベンゾイルスタウ
 ロスポリン；ベータラクタム誘導体；ベータアレチン；ベータクラマイシンB；ベツリ
 ン酸；b F G Fインヒビター；ビカルタミド；ビスアントレン；ビスジリジニルスベルミン
 ；ビスナフィド；ビストラテンA；ビゼレシン；ブレフレート；プロピリミン；ブドチタ
 ン；ブチオニンスルホキシミン；カルシポトリオール；カルホスチンC；カンプトテシン
 誘導体；カナリボックスI L-2；カペシタビン；カルボキサミドアミノートリアゾー
 ル；カルボキサミドトリアゾール；Ca R e s t M3；C A R N 700；軟骨由来イ
 ンヒビター；カルゼレシン；カゼインキナーゼインヒビター（I C O S）；カスタノスベ
 ルミン；セクロピンB；セトロレリックス；クロリン；クロロキノキサリンスルホンアミ
 ド；シカプロスト；c i s-ボルフィリン；クラドリピン；クロミフェン類似体；クロト
 リマゾール；コリスマイシンA；コリスマイシンB；コンプレタスタチンA4；コンプレ
 タスタチン類似体；コナゲニン；克蘭ベシジン816；クリスナトール；クリプトフィ
 シン8；クリプトフィシンA誘導体；クラシンA；シクロペントアントラキノン；シクロ
 プラタム；シペマイシン；シタラビンオクホスフェート；細胞溶解因子；サイトスタチン
 ；ダクリキシマブ；デシタビン；デヒドロジデムニンB；デスロレリン；デキサメタゾン
 ；デキシホスファミド；デクスラゾキサシン；デクスベラパミル；ジアジコン：ジデムニン
 B；ジドックス；ジエチルノルスベルミン；ジヒドロ-5-アザシチジン；9-ジヒドロ
 タキソール；ジオキサマイシン；ジフェニルスピロムスチン；ドセタキセル；ドコサノー
 ル；ドラセトロン；ドキシフルリジン；ドロロキシフェン；ドロナビノール；デュオカル
 マイシンS A；エブセレン；エコムスチン；エデルフォシン；エドレコロマブ；エフロル
 ニチン；エレメン；エミテフル；エピルビシン；エプリステリド；エストラムスチン類似
 体；エストロゲンアゴニスト；エストロゲンアンタゴニスト；エタニダゾール；エトボシ
 ドリン酸塩；エキセメスタン；ファドロゾール；ファザラビン；フェンレチニド；フィル
 グラスチム；フィナステリド；フラボピリドール；フレゼラスチン；フルアステロン；フ
 ルダラビン；フルオロダウノルニシン塩酸塩；フォルフェニメックス；ホルメスタン；フ
 オストリエシン；ホテムスチン；ガドリニウムテキサフィリン；硝酸ガリウム；ガロシタ
 ビン；ガニレリックス；ゼラチナーゼインヒビター；ゲムシタビン；グルタチオンインヒ
 ビター；ヘプスルファム；ヘレグリン；ヘキサメチレンビスアセトアミド；ヒペリシン；
 イバンドロン酸；イダルビシン；イドキシフェン；イドラマントン；イルモフォシン；イ
 ロマスタット；イミダゾアクリドン；イミキモド；免疫刺激ペプチド；インスリン様成長
 因子1受容体インヒビター；インターフェロンアゴニスト；インターフェロン；インター
 ロイキン；イオベングアン；ヨードドキソルビシン；4-イボメアノール；イロブラクト
 ；イルソグラジン；イソベンガゾール；イソホモハリコンドリノB；イタセトロン；ジャ
 スプラキノリド；カハラリドF；ラメラリンNトリアセテート；ランレオチド；レイナマ
 イシン；レノグラスチム；レンチナン硫酸塩；レプトルスタチン；レトロゾール；白血病
 阻害性因子；白血球アルファインターフェロン；ロイボロリド+エストロゲン+プロゲス
 テロン；リユープロレリン；レバミソール；リアロゾール；直鎖状ポリアミン類似体；親
 油性二糖ペプチド；親油性白金化合物；リソクリナミド7；ロバブラチン；ロンブリシン
 ；ロメトレキソール；ロニダミン；ロソキサントロン；ロバスタチン；ロキシリピン；ル
 ルトテカン；ルテチウムテキサフィリン；リソフィリン；溶解性ペプチド；メイタンシン
 ；マンノスタチンA；マリマスタット；マソプロコール；マスピン；マトリリシンインヒ
 ビター；マトリックスメタロプロテインナーゼインヒビター；メノガリル；メルバロン；メ
 テレリン；メチオニナーゼ；メトクロブラミド；M I Fインヒビター；ミフェプリストン
 ；ミルテホシン；ミリモスチム；ミスマッチ二本鎖RNA；ミトグアゾン；ミトラクトー
 ル；マイトマイシン類似体；ミトナフィド；マイトトキシシンである線維芽細胞成長因子-
 サポリン；ミトキサントロン；モファロテン；モルグラモスチム；ヒト絨毛性ゴナドトロ
 ピンに対するモノクローナル抗体；モノホスホリルリピドA+ミオバクテリウム細胞壁s
 k；モピダモール；多剤耐性遺伝子インヒビター；multiple tumor su

10

20

30

40

50

p p r e s s o r 1 ベースの治療；マスタード系抗がん剤；ミカペロキシド B；マイコバクテリア細胞壁抽出物；ミリアポロン；N-アセチルジナリン；N置換ベンザミド；ナファレリン；ナグレスチップ；ナロキソン+ペンタゾシン；ナパビン；ナフテルピン；ナルトグラスチム；ネダプラチン；ネモルビシン；ネリドロロン酸；中性エンドペプチダーゼ；ニルタミド；ニサマイシン；一酸化窒素モジュレーター；窒素酸化物による抗酸化剤；ニトルリン；O 6-ベンジルグアニン；オクトレオチド；オキセノン；オリゴヌクレオチド；オナプリストン；オンダンセトロン；オンダンセトロン；オラシン；経口サイトカイン誘導剤；オルマプラチン；オサテロン；オキサリプラチン；オキサウノマイシン；パクリタキセル；パクリタキセル類似体；パクリタキセル誘導體；パラウアミン；パルミトイルリゾキシシン；パミドロロン酸；パナキシトリオール；パノミフェン；パラバクチン；パゼリプチン；ペガスパルガーゼ；ペルデシン；ポリ硫酸ペントサンナトリウム；ペントスタチン；ペントロゾール；ペルフルブロン；ペルホスファミド；ペリリルアルコール；フェナジノマイシン；酢酸フェニル；ホスファターゼインヒビター；ピシバニール；ピロカルピン塩酸塩；ピラルビシン；ピリトレキシム；プラセチン A；プラセチン B；プラスミノゲンアクチベーターインヒビター；白金複合体；白金化合物；白金-トリアミン複合体；ポルフィマーナトリウム；ポルフィロマイシン；プレドニゾン；プロピルビス-アクリドン；プロスタグランジン J 2；プロテアソームインヒビター；プロテイン A ベースの免疫モジュレーター；プロテインキナーゼ C インヒビター；小型藻類のプロテインキナーゼ C インヒビター；プロテインチロシンホスファターゼインヒビター；プリンヌクレオシドホスホリラーゼインヒビター；プルプリン；ピラゾロアクリジン；ピリドキシル化ヘモグロビンポリオキシエチレンコンジュゲート；r a f アンタゴニスト；ラルチトレキセド；ラ

10

20

モセトロン；r a s ファルネシルプロテイントランスフェラーゼインヒビター；r a s インヒビター；r a s - G A P インヒビター；脱メチル化レテリプチン；レニウム (R e 1 8 6) エチドロネート；リゾキシシン；リボザイム；R I I レチナミド；ログレチミド；ロヒツキン；ロムルチド；ロキニメックス；ルビジノン B 1；ルボキシル；サフィンゴール；サイントピン；S a r C N U；サルコフィトール A；サルグラモスチム；S d i 1 模倣体；セムスチン；老齢由来インヒビター 1；センスオリゴヌクレオチド；シグナル伝達インヒビター；シグナル伝達モジュレーター；単鎖抗原結合性タンパク質；シゾフィラン；ソブゾキサシン；ボロカプテートナトリウム；フェニル酢酸ナトリウム；ソルベロール；ソマトメジン結合性タンパク質；ソネルミン；スパルホス酸；スピカマイシン D；スピロムスチン；スプレノベンチン；スポンギスタチン 1；スクアラミン；幹細胞インヒビター；幹細胞分裂インヒビター；スチピアミド；ストロメリシンインヒビター；スルフィノシン；過活動血管作動性腸管ペプチドアンタゴニスト；スラジスタ；スラミン；スワインソニン；合成グリコサミノグリカン；タリムスチン；タモキシフェンメチオジド；タウロムスチン；タザロテン；テコガランナトリウム；テガフル；テルラピリリウム；テロメラゼインヒビター；テモボルフィン；テモゾロミド；テニボシド；テトラクロロデカオキシド；テトラゾミン；タリブラスチン；チロコラリン；トロンボポエチン；トロンボポエチン模倣体；チマルファシン；チモポエチン受容体アゴニスト；チモトリナン；甲状腺刺激性ホルモン；エチルエチオプルプリンすず；チラパザミン；チタノセンジクロリド；トプセンチン；トレミフェン；全能性幹細胞因子；翻訳インヒビター；トレチノイン；トリアセチルウリジン；トリシリピン；トリメトレキサート；トリプトレリン；トロピセトロン；ツロステリド；チロシンキナーゼインヒビター；チルホスチン；U B C インヒビター；ウベニメクス；尿生殖洞由来成長阻害因子；ウロキナーゼ受容体アンタゴニスト；バブレオチド；バリオリン B；赤血球遺伝子治療のためのベクター系；ベラレソール；ベラミン；ベルジン；ベルテボルフィン；ビノレルビン；ビンキサルチン；ビタキシシン；ボロゾール；ザノテロン；ゼニプラチン；ジラスコルブ；およびジノスタチンスチマラーを含むがこれらに限定されない。一実施形態では、抗がん薬は、5-フルオロウラシル、タキソール、またはロイコボリンである。

30

40

50

【0493】

場合によって、例えば、がんを処置する組成物、製剤、および方法において、投与される組成物または製剤の単位投与量は、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100mgであり得る。場合によって、投与される組成物または製剤の総量は、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90、または100gであり得る。

【0494】

場合によって、本開示は、T細胞を含む医薬組成物であって、単独で、または薬学的に許容される担体または賦形剤と併せて、任意の経路により投与され得る医薬組成物を提供するが、このような投与は、単回投与および複数回投与の両方で実行することができる。より特定すると、医薬組成物は、多様な薬学的に許容される不活性の担体であって、錠剤、カプセル、薬用ドロップ、トローチ、ハンドキャンディー、粉剤、スプレー、水性懸濁液、注射用溶液、エリキシル剤、シロップなどの形態の担体と組み合わせることができる。このような担体は、固体の希釈剤または充填剤、滅菌水性媒体、および多様な非毒性有機溶媒などを含む。さらに、このような経口医薬製剤は、このような目的で一般に利用される多様な種類の薬剤により、適切に甘味および／または芳香添加することができる。

【0495】

例えば、細胞は、患者へと、任意の数の妥当な処置モダリティーであって、抗ウイルス療法であるシドフォビルおよびインターロイキン2またはシタラビン（ARA-Cとしてもまた公知である）などの薬剤による処置を含むがこれらに限定されないモダリティーと共に（例えば、これらの前に、これらと同時に、またはこれらの後で）投与することができる。場合によって、操作細胞は、化学療法、放射線、シクロスポリンなどの免疫抑制剤、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノレート、およびFK506、抗体、またはCAMPATHなど、他の免疫除去剤、抗CD3抗体または他の抗体療法、細胞毒素（cytotoxin）、フルダラビン、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸（mycophenolic acid）、ステロイド、FR901228、サイトカイン、および放射線照射と組み合わせて使用することができる。操作細胞組成物はまた、患者へと、骨髓移植、フルダラビンなどの化学療法剤、外部ビーム放射線療法（XRT）、シクロホスファミド、またはOKT3もしくはCAMPATHなどの抗体を使用するT細胞除去療法と共に（例えば、これらの前に、これらと同時に、またはこれらの後で）投与することもできる。場合によって、本開示の操作細胞組成物は、CD20と反応する薬剤、例えば、RituxanなどのB細胞除去療法の後で投与することができる。例えば、対象は、高用量化学療法による標準的な処置に続き、末梢血幹細胞移植を経る場合がある。ある特定の場合には、移植後、対象は、本開示の操作細胞、例えば、拡大された操作細胞の注入を受けることができる。加えて、拡大された操作細胞は、手術の前に投与することもでき、手術の後で投与することもできる。本開示の特定の態様では、それを必要とする患者を、宿主対移植片（HvG）拒絶および移植片対宿主病（GvHD）に対して処置するために、本明細書で記載される方法のうちのいずれか1つにより得られる操作細胞を使用することができる。したがって、それを必要とする患者を、宿主対移植片（HvG）拒絶および移植片対宿主病（GvHD）に対して処置する方法であって、患者へと、有効量の操作細胞であり、不活化TCRアルファ遺伝子および／または不活化TCRベータ遺伝子を含む操作細胞を投与することにより患者を処置するステップを含む方法が想定される。

【0496】

使用法

細胞は、本明細書で記載される通り、ヒトから抽出することができる。細胞は、*ex vivo*において遺伝子的に変更し、状況に応じて使用することができる。これらの細胞

10

20

30

40

50

は、細胞ベースの治療のために使用することができる。これらの細胞を使用して、レシピエント（例えば、ヒト）における疾患を処置することができる。例えば、これらの細胞を使用して、がんを処置することができる。

【0497】

本明細書では、レシピエントにおける疾患（例えば、がん）を処置する方法であって、レシピエントへの、操作細胞を含む、1または複数の細胞（臓器および／または組織を含む）の移植を含む方法について記載される。細胞内ゲノム移植により調製される細胞を使用して、がんを処置することができる。

【0498】

本明細書では、レシピエントにおける疾患（例えば、がん）を処置する方法であって、レシピエントへの、操作細胞を含む、1または複数の細胞（臓器および／または組織を含む）の移植を含む方法について記載される。場合によって、細胞 5×10^{10} 個を、患者へと投与する。他の場合には、細胞 5×10^{11} 個を、患者へと投与する。

【0499】

場合によって、細胞約 5×10^{10} 個を、対象へと投与する。場合によって、細胞約 5×10^{10} 個は、対象へと投与される細胞の量の中央値を表す。場合によって、細胞約 5×10^{10} 個は、対象において、治療応答をもたらすのに必要である。場合によって、細胞少なくとも約 1×10^7 個、細胞少なくとも約 2×10^7 個、細胞少なくとも約 3×10^7 個、細胞少なくとも約 4×10^7 個、細胞少なくとも約 5×10^7 個、細胞少なくとも約 6×10^7 個、細胞少なくとも約 6×10^7 個、細胞少なくとも約 8×10^7 個、細胞少なくとも約 9×10^7 個、細胞少なくとも約 1×10^8 個、細胞少なくとも約 2×10^8 個、細胞少なくとも約 3×10^8 個、細胞少なくとも約 4×10^8 個、細胞少なくとも約 5×10^8 個、細胞少なくとも約 6×10^8 個、細胞少なくとも約 6×10^8 個、細胞少なくとも約 8×10^8 個、細胞少なくとも約 9×10^8 個、細胞少なくとも約 1×10^9 個、細胞少なくとも約 2×10^9 個、細胞少なくとも約 3×10^9 個、細胞少なくとも約 4×10^9 個、細胞少なくとも約 5×10^9 個、細胞少なくとも約 6×10^9 個、細胞少なくとも約 6×10^9 個、細胞少なくとも約 8×10^9 個、細胞少なくとも約 9×10^9 個、細胞少なくとも約 1×10^{10} 個、細胞少なくとも約 2×10^{10} 個、細胞少なくとも約 3×10^{10} 個、細胞少なくとも約 4×10^{10} 個、細胞少なくとも約 5×10^{10} 個、細胞少なくとも約 6×10^{10} 個、細胞少なくとも約 6×10^{10} 個、細胞少なくとも約 8×10^{10} 個、細胞少なくとも約 9×10^{10} 個、細胞少なくとも約 1×10^{11} 個、細胞少なくとも約 2×10^{11} 個、細胞少なくとも約 3×10^{11} 個、細胞少なくとも約 4×10^{11} 個、細胞少なくとも約 5×10^{11} 個、細胞少なくとも約 6×10^{11} 個、細胞少なくとも約 6×10^{11} 個、細胞少なくとも約 8×10^{11} 個、細胞少なくとも約 9×10^{11} 個、または細胞少なくとも約 1×10^{12} 個である。例えば、細胞約 5×10^{10} 個を、対象へと投与することができる。別の例では、細胞 3×10^6 個で始めて、細胞を、細胞約 5×10^{10} 個へと拡大し、対象へと投与することができる。場合によって、細胞は、治療に十分な数へと拡大する。例えば、細胞 5×10^7 個は急速な拡大を経て、治療的使用に十分な数を作製することができる。場合によって、治療的使用に十分な数は、 5×10^{10} 個であり得る。任意の数の細胞を、治療的使用のために注入することができる。例えば、患者に、端点を含む、 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^{12}$ 個の間の数の細胞を注入することができる。患者に、患者のために作製し得るだけの数の細胞を注入することができる。場合によって、患者へと注入される細胞は、全てが操作細胞であるわけではない。例えば、患者へと注入される細胞のうちの、少なくとも90%は、操作細胞であり得る。他の場合には、患者へと注入される細胞のうちの、少なくとも40%は、操作細胞であり得る。

【0500】

場合によって、本開示の方法は、対象へと、対象において治療的応答をもたらすのに必要な量の操作細胞を計算および／または投与するステップを含む。場合によって、治療的応答をもたらすのに必要な操作細胞の量の計算は、細胞の生存率および／またはトランス

10

20

30

40

50

遺伝子が細胞ゲノムへと組み込まれた効率を含む。場合によって、対象において治療的応答をもたらすために、対象へと投与される細胞は、生細胞であり得る。場合によって、対象において治療的応答をもたらすために、細胞のうちの、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約85%、少なくとも約80%、少なくとも約75%、少なくとも約70%、少なくとも約65%、少なくとも約60%、少なくとも約55%、少なくとも約50%、少なくとも約45%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約25%、少なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%は、生細胞である。一部の場合、対象において治療的応答をもたらすために、対象へと投与される細胞は、細胞ゲノムへの、1または複数のトランス遺伝子の組み込みに成功した細胞であり得る。場合によって、対象において治療的応答をもたらすために、細胞のうちの、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約85%、少なくとも約80%、少なくとも約75%、少なくとも約70%、少なくとも約65%、少なくとも約60%、少なくとも約55%、少なくとも約50%、少なくとも約45%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約25%、少なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%は、細胞ゲノムへの、1または複数のトランス遺伝子の組み込みに成功している。

10

【0501】

本明細書で開示される方法を、がん、心血管疾患、肺疾患、肝臓疾患、皮膚疾患、または神経疾患を含むがこれらに限定されない疾患を処置または予防するために使用することができる。

20

【0502】

移植は、任意の種類 of 移植による移植であり得る。部位は、肝臓被膜下腔、脾臓被膜下腔、腎臓被膜下腔、網、胃または腸粘膜下層、小腸の血管セグメント、静脈囊、精巣、脳、脾臓、または角膜を含み得るがこれらに限定されない。例えば、移植は、被膜下移植であり得る。移植はまた、筋内移植でもあり得る。移植は、門脈内移植であり得る。

【0503】

移植は、ヒトに由来する1または複数の細胞の移植であり得る。例えば、1または複数の細胞は、脳、心臓、肺、眼、胃、脾臓、腎臓、肝臓、腸、子宮、膀胱、皮膚、毛髪、爪、耳、腺、鼻、口腔、口唇、脾臓、歯茎、歯、舌、唾液腺、扁桃腺、咽頭、食道、大腸、小腸、直腸、肛門、甲状腺、胸腺、骨、軟骨、腱、靱帯、腎上体、骨格筋、平滑筋、血管、血液、脊髄、気管、尿管、尿道、視床下部、下垂体、幽門、副腎、卵巣、卵管、子宮、陰腔、乳腺、精巣、精囊、陰茎、リンパ、リンパ節、またはリンパ管であり得る臓器に由来し得る。1または複数の細胞はまた、脳、心臓、肝臓、皮膚、腸、肺、腎臓、眼、小腸、または脾臓にも由来し得る。1または複数の細胞は、脾臓、腎臓、眼、肝臓、小腸、肺、または心臓に由来し得る。1または複数の細胞は、脾臓に由来し得る。1または複数の細胞は、脾臓細胞、例えば、脾β細胞であり得る。1または複数の細胞は、末梢血単核細胞(PBMC)、リンパ球、単球、またはマクロファージなど、任意の血液細胞であり得る。1または複数の細胞は、リンパ球、B細胞、またはT細胞など、任意の免疫細胞であり得る。

30

【0504】

本明細書で開示される方法はまた、1または複数の細胞を移植するステップも含むことが可能であり、この場合、1または複数の細胞は、任意の細胞型であり得る。例えば、1または複数の細胞は、上皮細胞、線維芽細胞、神経細胞、角化細胞、造血系細胞、メラニン細胞、軟骨細胞、リンパ球(Bリンパ球およびTリンパ球)、マクロファージ、単球、単核細胞、心筋細胞(cardiac muscle cell)、他の筋肉細胞、顆粒膜細胞、卵丘細胞、表皮細胞、内皮細胞、脾臓細胞、血液細胞、血液前駆体細胞、骨細胞、骨前駆体細胞、神経幹細胞、始原幹細胞、肝細胞、角化細胞、臍帯静脈内皮細胞、大動脈内皮細胞、細小血管内皮細胞、線維芽細胞、肝星細胞、大動脈平滑筋細胞、心筋細胞(cardiac myocyte)、ニューロン、クッパー細胞、平滑筋細胞、シュワン細胞、および上皮細胞、赤血球、血小板、好中球、リンパ球、単球、好酸球、好塩基球、

40

50

脂肪細胞、軟骨細胞、膵島細胞、甲状腺細胞、副甲状腺細胞、耳下腺細胞、腫瘍細胞、グリア細胞、星状細胞、赤血球、白血球、マクロファージ、上皮細胞、体細胞、下垂体細胞、副腎細胞、毛髪細胞、膀胱細胞、腎細胞、網膜細胞、杆体細胞、錐体細胞、心臓細胞、ペースメーカー細胞、脾臓細胞、抗原提示細胞、メモリー細胞、T細胞、B細胞、形質細胞、筋肉細胞、卵巣細胞、子宮細胞、前立腺細胞、腔上皮細胞、精子細胞、精巣細胞、胚細胞、卵細胞、ライディッヒ細胞、精管周囲細胞、セルトリ細胞、黄体細胞、子宮頸部細胞、子宮内膜細胞、乳腺細胞、濾胞細胞、粘膜細胞、繊毛細胞、非角化上皮細胞、角化上皮細胞、肺細胞、杯細胞、円柱上皮細胞、ドーパミン作動性 (dopaminergic) 細胞、扁平上皮細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、ドーパミン作動性細胞、胚性幹細胞、線維芽細胞、および胎児線維芽細胞であり得る。さらに、1または複数の細胞は、膵島細胞および／または膵α細胞、膵β細胞、膵δ細胞、膵F細胞（例えば、PP細胞）、もしくは膵ε細胞を含むがこれらに限定されない細胞クラスターなどであり得る。1つの場合には、1または複数の細胞は、膵α細胞であり得る。別の場合には、1または複数の細胞は、膵β細胞であり得る。

10

【0505】

ドナーは、胎児、新生児、若齢者、および成年者を含むがこれらに限定されない、任意の発生段階にあり得る。例えば、ドナーT細胞は、成体ヒトから単離することができる。ドナーヒトT細胞は、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1歳未満であり得る。例えば、T細胞は、6歳未満のヒトから単離することができる。T細胞はまた、3歳未満のヒトから単離することもできる。ドナーは、10歳より高齢であり得る。

20

【0506】

a. 移植

本明細書で開示される方法は、移植を含み得る。移植は、自家移植、同種移植、異種移植、または他の任意の移植であり得る。例えば、移植は、異種移植であり得る。移植はまた、同種移植でもあり得る。

【0507】

本明細書で使用される「異種移植 (xenotransplantation)」およびその文法的同等物は、細胞、組織、または臓器の、レシピエントへの、移植、植込み、または注入を伴う任意の手順であって、レシピエントとドナーとが異なる種である手順を包含し得る。本明細書で記載される、細胞、臓器、および／または組織の移植は、ヒトへの異種移植 (xenotransplantation) のために使用することができる。異種移植 (xenotransplantation) は、血管化異種移植 (xenotransplant)、部分血管化異種移植 (xenotransplant)、非血管化異種移植 (xenotransplant)、異種ドレッシング、異種バンデッジ、および異種構造を含むがこれらに限定されない。

30

【0508】

本明細書で使用される「同種移植 (allotransplantation)」およびその文法的同等物（例えば、同種移植 (allogenic transplantation)）は、細胞、組織、または臓器の、レシピエントへの、移植、植込み、または注入を伴う任意の手順であって、レシピエントとドナーとが同じ種であるが異なる個体である手順を包含し得る。本明細書で記載される、細胞、臓器、および／または組織の移植は、ヒトへの同種移植 (allotransplantation) のために使用することができる。同種移植 (allotransplantation) は、血管化同種移植 (allotransplant)、部分血管化同種移植 (allotransplant)、非血管化同種移植 (allotransplant)、同種ドレッシング、同種バンデッジ、および同種構造を含むがこれらに限定されない。

40

【0509】

本明細書で使用される「自家移植 (autotransplantation)」およびその文法的同等物（例えば、自家移植 (autologous transplantation)）は、細胞、組織、または臓器の、レシピエントへの、移植、植込み、また

50

は注入を伴う任意の手順であって、レシピエントとドナーとが同じ個体である手順を包含し得る。本明細書で記載される、細胞、臓器、および／または組織の移植は、ヒトへの自家移植 (autotransplantation) のために使用することができる。自家移植 (autotransplantation) は、血管化自家移植 (autotransplantation)、部分血管化自家移植 (autotransplantation)、非血管化自家移植 (autotransplantation)、自家ドレッシング、自家バンデッジ、および自家構造を含むがこれらに限定されない。

【0510】

処置 (例えば、本明細書で開示される処置のうちのいずれか) の後、移植片拒絶は、1 または複数の野生型細胞を、レシピエントへと移植する場合と比較して、改善され得る。例えば、移植片拒絶は、超急性拒絶であり得る。移植片拒絶はまた、急性拒絶でもあり得る。他の種類の拒絶は、慢性拒絶を含み得る。移植片拒絶はまた、細胞を媒介する拒絶または T 細胞を媒介する拒絶でもあり得る。移植片拒絶はまた、ナチュラルキラー細胞を媒介する拒絶でもあり得る。

10

【0511】

本明細書で使用される「～を改善すること」およびその文法的同等物は、当業者により認識される、任意の改善を意味し得る。例えば、移植の改善とは、超急性拒絶の減少であって、所望されない影響または症状の減殺、減少、または減弱を包含し得る減少を意味し得る。

【0512】

移植後、移植された細胞は、レシピエントにおいて機能的であり得る。機能性は、場合によって、移植が成功したのかどうかを決定し得る。例えば、移植された細胞は、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 日間、もしくはそれよりも多い期間、または少なくともほぼこれらの期間にわたり機能的であり得る。これは、移植が成功したことを指し示し得る。これはまた、移植された細胞、組織、および／または臓器の拒絶が、見られないことも指し示す。

20

【0513】

ある特定の場合には、移植された細胞は、少なくとも 1 日間にわたり機能的であり得る。移植された細胞はまた、少なくとも 7 日間にわたり機能的でもあり得る。移植された細胞は、少なくとも 14 日間にわたり機能的であり得る。移植された細胞は、少なくとも 21 日間にわたり機能的であり得る。移植された細胞は、少なくとも 28 日間にわたり機能的であり得る。移植された細胞は、少なくとも 60 日間にわたり機能的であり得る。

30

【0514】

移植の成功の別の指標は、レシピエントが免疫抑制療法を要求しない日数であり得る。例えば、本明細書で提供される処置 (例えば、移植) の後、レシピエントは、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 日間、もしくはそれよりも多い期間、または少なくともほぼこれらの期間にわたり、免疫抑制療法を要求しなくてもよい。これは、移植が成功したことを指し示し得る。これはまた、移植された細胞、組織、および／または臓器の拒絶が、見られないことも指し示す。

【0515】

場合によって、レシピエントは、少なくとも 1 日間にわたり、免疫抑制療法を要求しなくてもよい。レシピエントはまた、少なくとも 7 日間にわたり、免疫抑制療法を要求しなくてもよい。レシピエントは、少なくとも 14 日間にわたり、免疫抑制療法を要求しなくてもよい。レシピエントは、少なくとも 21 日間にわたり、免疫抑制療法を要求しなくてもよい。レシピエントは、少なくとも 28 日間にわたり、免疫抑制療法を要求しなくてもよい。レシピエントは、少なくとも 60 日間にわたり、免疫抑制療法を要求しなくてもよい。さらに、レシピエントは、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 年間、またはそれよりも多い期間にわたり、免疫抑制療法を要求しなくてもよい。

40

【0516】

移植の成功の別の指標は、レシピエントが、低減された免疫抑制療法を要求する日数で

50

あり得る。例えば、本明細書で提供される処置の後、レシピエントは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10日間、またはそれよりも多い期間にわたり、低減された免疫抑制療法を要求する場合がある。これは、移植が成功したことを指し示し得る。これはまた、移植された細胞、組織、および／または臓器の拒絶が、見られないか、または見られても最小限であることも指し示し得る。

【0517】

場合によって、レシピエントは、少なくとも1日間にわたり、免疫抑制療法を要求しなくてもよい。レシピエントはまた、少なくともまたは少なくとも約7日間にわたり、免疫抑制療法を要求しなくてもよい。レシピエントは、少なくともまたは少なくとも約14日間にわたり、免疫抑制療法を要求しなくてもよい。レシピエントは、少なくともまたは少なくとも約21日間にわたり、免疫抑制療法を要求しなくてもよい。レシピエントは、少なくともまたは少なくとも約28日間にわたり、免疫抑制療法を要求しなくてもよい。レシピエントは、少なくともまたは少なくとも約60日間にわたり、免疫抑制療法を要求しなくてもよい。さらに、レシピエントは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10年間、もしくはそれよりも多い期間、または少なくともほぼこれらの期間にわたり、免疫抑制療法を要求しなくてもよい。

【0518】

移植の成功の別の指標は、レシピエントが、低減された免疫抑制療法を要求する日数であり得る。例えば、本明細書で提供される処置の後、レシピエントは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10日間、もしくはそれよりも多い期間、または少なくともほぼこれらの期間にわたり、低減された免疫抑制療法を要求する場合がある。これは、移植が成功したことを指し示し得る。これはまた、移植された細胞、組織、および／または臓器の拒絶が、見られないか、または見られても最小限であることも指し示し得る。

【0519】

本明細書で使用される「低減された」およびその文法的同等物は、1または複数の野生型細胞を、レシピエントへと移植する場合に要求される免疫抑制療法と比較して、低用量の免疫抑制療法を指す場合がある。

【0520】

免疫抑制療法は、免疫系を抑制する任意の処置をさらに含み得る。免疫抑制療法は、レシピエントにおける移植片拒絶を軽減するか、最小化するか、または消失させる一助となりうる。例えば、免疫抑制療法は、免疫抑制薬を含み得る。移植前、移植時、および／または移植後に使用され得る免疫抑制薬は、MMF（ミコフェノール酸モフェチル（Cellcept））、ATG（抗胸腺細胞グロブリン）、抗CD154（CD4OL）、抗CD40（2C10、ASKP1240、CCFZ533X2201）、アレムツズマブ（Campath）、抗CD20（リツキシマブ）、抗IL-6R抗体（トシリズマブ；Actemra）、抗IL-6抗体（サリルマブ、オロキズマブ）、CTLA4-Ig（Batacept/Orencia）、ベラタセプト（LEA29Y）、シロリムス（Rapimmune）、エベロリムス、タクロリムス（Prograf）、ダクリズマブ（Zenapax）、バシリキシマブ（Simulect）、インフリキシマブ（Remicade）、シクロスポリン、デオキシスバガリン、可溶性補体受容体1、コブラ毒因子、コンプスタチン、抗C5抗体（エクリズマブ/Soliris）、メチルプレドニゾロン、FTY720、エベロリムス、レフルノミド、抗IL-2R-Ab、ラパマイシン、抗CXCR3抗体、抗ICOS抗体、抗OX40抗体、および抗CD122抗体を含むがこれらに限定されない。さらに、1つまたは1つを超える免疫抑制剤／薬物を、併せて使用することもでき、逐次的に使用することもできる。1つまたは1つを超える免疫抑制剤／薬物は、誘導療法のために使用することもでき、維持療法のために使用することもできる。同じ薬物または異なる薬物を、誘導期に使用することもでき、維持期に使用することもできる。場合によって、ダクリズマブ（Zenapax）は、誘導療法のために使用することができ、タクロリムス（Prograf）およびシロリムス（Rapimmune）は、維持療法のために使用することができる。ダクリズマブ（Zenapax）はまた、

誘導療法のために使用することもでき、低用量タクロリムス（Prograf）および低用量シロリムス（Rapimune）は、維持療法のために使用することができる。免疫抑制はまた、全身放射線照射、胸腺放射線照射、ならびに脾臓全摘出および／または脾臓部分摘出を含むがこれらに限定されない非薬物レジメンを使用して達成することもできる。これらの技法はまた、1または複数の免疫抑制薬と組み合わせて使用することもできる。

【実施例】

【0521】

（実施例1）

種々の核酸送達プラットフォームのトランスフェクション効率の決定

10

LeukoPakからの末梢血単核細胞（PBMC）の単離

本実施例では、正常末梢血から回収された、LeukoPakを使用した。血液細胞を、冷却した1倍濃度のPBSで、3対1に希釈した。希釈した血液を、50mLの三角フラスコ内の15mLのLYMPHOPREP（Stem Cell Technologies）上に、滴下により（例えば、極めてゆっくりと）添加した。細胞を、ブレーキなし、400×Gで、25分間にわたりスピンのした。バフィーコート、を、ゆっくりと除去し、滅菌三角フラスコに入れた。細胞を、冷却した1倍濃度のPBSで洗浄し、400×Gで、10分間にわたりスピンのした。上清を除去し、細胞を、培地中に再懸濁させ、カウントし、凍結培地（45mLの熱不活化FBSおよび5mLのDMSO）中で、生存可能な状態で凍結させた。

20

【0522】

CD3+T細胞の単離

PBMCを融解させ、培養培地（RPMI-1640（フェノールレッドを伴わない）、20%のFBS（熱不活化させた）、および1倍濃度のGluta-MAX）中、1～2時間にわたり播種した。細胞を回収し、カウントし、細胞密度を、 5×10^7 個/mLへと調整し、14mLの滅菌ポリスチレン丸底試験管へと移した。EasySep Human CD3 cell Isolation Kit（Stem Cell Technologies）を使用して、50uL/mLのIsolation Cocktailを、細胞へと添加した。混合物を、ピペッティングにより混合し、室温で5分間にわたりインキュベートした。インキュベーション後、RapidSpheresを、30秒間にわたりボルテックスし、50uL/mLで、試料へと添加し、ピペッティングにより混合した。混合物を、4mL未満の試料について、5mLまで満たすか、または4mLを超える試料について、10mLまで満たした。滅菌ポリスチレン試験管を、「Big Easy」磁石へと添加し、室温で3分間にわたりインキュベートした。磁石および試験管を、滑らかな動きで倒立させ、濃縮された細胞懸濁液を、未使用の滅菌試験管へと注ぎ込んだ。

30

【0523】

CD3+T細胞の活性化および刺激

単離されたCD3+T細胞をカウントし、24ウェルプレート内、細胞 2×10^6 個/mLの密度で播種した。Dynamagnetを使用して、0.2%BSAを伴う、1倍濃度のPBSで洗浄した後、Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 beads（Gibco、Life Technologies）を、3：1（ビーズ：細胞）で、細胞へと添加した。IL-2（PeproTech）を、300IU/mLの濃度で添加した。細胞を、48時間にわたりインキュベートし、次いで、Dynamagnetを使用して、ビーズを除去した。細胞を、電気穿孔またはヌクレオフェクションに先立って、さらに6～12時間にわたり培養した。

40

【0524】

CD3+ T細胞のAmaxaトランスフェクション

Amaxa Human T Cell Nucleofector Kit（Lonza、Switzerland）を使用して、非刺激T細胞または刺激T細胞にヌクレオ

50

フェクトした（図 8 2 A および図 8 2 B）。細胞をカウントし、室温の Amaxa 緩衝液 100 μ L 中に、細胞 $1 \sim 8 \times 10^6$ 個の密度で再懸濁させた。1 $\sim$ 15 μ g の mRNA またはプラスミドを、細胞混合物へと添加した。U-014 プログラムを使用して、細胞をヌクレオフェクトした。ヌクレオフェクション後、細胞を、6 ウェルプレート内の培養培地 2 mL 中に播種した。

【0525】

CD3+ T 細胞の Neon トランスフェクション

Neon Transfection System (10 μ L Kit, Invitrogen, Life Technologies) を使用して、非刺激 T 細胞または刺激 T 細胞に電気穿孔した。細胞をカウントし、10 μ L の T 緩衝液中に、細胞 2×10^5 個の密度で再懸濁させた。1 μ g の GFP プラスミドまたは mRNA または 1 μ g の Cas9 および 1 μ g の gRNA プラスミドを、細胞混合物へと添加した。細胞に、1400 V、10 ミリ秒間ずつ、3 つのパルスで電気穿孔した。トランスフェクション後、細胞を、48 ウェルプレート内の培養培地 200 μ L 中に播種した。

10

【0526】

リポフェクションによる、CD3+ T 細胞への、RNA およびプラスミド DNA のトランスフェクション

非刺激 T 細胞を、24 ウェルプレート内、1 mL 当たり細胞 5×10^5 個の密度で播種した。RNA トランスフェクションのために、製造元のプロトコールに従い、TransIT-mRNA Transfection Kit (Mirus Bio) を使用して、T 細胞に、500 ng の mRNA をトランスフェクトした。プラスミド DNA のトランスフェクションのために、製造元のプロトコールに従い、TransIT-X2 Dynamic Delivery System (Mirus Bio) を使用して、T 細胞に、500 ng のプラスミド DNA をトランスフェクトした。細胞を、37 $^{\circ}$ C で 48 時間にわたりインキュベートしてから、フローサイトメトリーで解析した。

20

【0527】

CD3+ T 細胞による、金ナノ粒子である SmartFlare の取込み

非刺激 T 細胞または刺激 T 細胞を、培養培地 200 μ L 中の 48 ウェルプレート内ウェル 1 つ当たり細胞 $1 \sim 2 \times 10^5$ 個の密度で播種した。Cy5 または Cy3 (Millipore, Germany) へと複合体化させた金ナノ粒子である、SmartFlare を、30 秒間にわたりボルテックスしてから、細胞へと添加した。1 μ L の金ナノ粒子である SmartFlare を、各ウェルの細胞へと添加した。プレートを、1 分間にわたりロッキングし、37 $^{\circ}$ C で 24 時間にわたりインキュベートしてから、フローサイトメトリーにより、Cy5 または Cy3 の発現について解析した。

30

【0528】

フローサイトメトリー

電気穿孔およびヌクレオフェクトされた T 細胞を、トランスフェクションの 24 $\sim$ 48 時間後、フローサイトメトリーにより、GFP の発現について解析した。0.5% FBS を伴う、1 倍濃度の冷却 PBS で洗浄することにより、細胞を調製し、APC anti-human CD3 ϵ (eBiosciences, San Diego) および Fixable Viability Dye eFlour 780 (eBiosciences, San Diego) で染色した。細胞は、LSR II (BD Biosciences, San Jose) および FlowJo v. 9 を使用して解析した。

40

【0529】

結果

表 2 に示す通り、4 つの例示的なトランスフェクションプラットフォームを使用して、細胞と DNA/RNA との合計 6 つの組合せについて調べた。細胞と DNA/RNA との 6 つの組合せは、EGFP プラスミド DNA の、非刺激 PBMC への添加；EGFP プラスミド DNA の、非刺激 T 細胞への添加；EGFP プラスミド DNA の、刺激 T 細胞への添加；EGFP mRNA の、非刺激 PBMC への添加；EGFP mRNA の、非刺激

50

T細胞への添加；およびEGFP mRNAの、刺激T細胞への添加であった。4つの例示的なトランスフェクションプラットフォームは、AMAXAヌクレオフェクション、NEON電気穿孔、脂質ベースのトランスフェクション、および金ナノ粒子の送達であった。種々の条件下における、トランスフェクション効率（トランスフェクト細胞の％）結果を、表1に列挙するが、AMAXAプラットフォームを使用して、mRNAの、刺激T細胞への添加が、最高の効率をもたらした。

【表2】

表2.多様な核酸送達プラットフォームのトランスフェクション効率

核酸送達プラットフォーム						
細胞型	DNA または RNA	Amaya	NEON	脂質ベース		金ナノ粒子
PBMCにロード (非刺激)	EGFP プ ラスミド	8.1% (CD3 T細胞)				
T細胞にロード (非刺激)	EGFP プ ラスミド	28.70%	>0.1%	>0.1% (DNA)	>0.1% (RNA)	54.8%の Cy5 陽 性
T細胞にロード (刺激、 CD3/CD28)	EGFP プ ラスミド		32.10%	>0.1% (DNA)	>0.1% (RNA)	
PBMCにロード (非刺激)	EGFP mRNA	28.1% (CD3 T細胞)				
T細胞にロード (非刺激)	EGFP mRNA	29.80%				
T細胞にロード (刺激、 CD3/CD28)	EGFP mRNA	90.30%	81.40%			29.1%の Cy5 陽 性

【0530】

将来的には、類似の方法を使用して、エクソソームを媒介するトランスフェクションを含む、他のトランスフェクション条件についても調べる。加えて、また、類似の方法を使用して、DNA Cas 9 / DNA gRNA、mRNA Cas 9 / DNA gRNA、タンパク質 Cas 9 / DNA gRNA、DNA Cas 9 / gRNAのPCR産物、DNA Cas 9 / gRNAのPCR産物、mRNA Cas 9 / gRNAのPCR産物、タンパク質 Cas 9 / gRNAのPCR産物、DNA Cas 9 / 修飾 gRNA、mRNA Cas 9 / 修飾 gRNA、およびタンパク質 Cas 9 / 修飾 gRNAを含む他の送達組合せについても調べる。本明細書で開示される方法では、送達効率の高い組合せを使用することができる。

【0531】

(実施例2)

T細胞内の、GFPプラスミドのトランスフェクション効率の決定

GFPプラスミドを使用する、Amayaヌクレオフェクションによる、初代T細胞のトランスフェクション効率である。図4は、この実験のために調製された4つのプラスミド：Cas 9ヌクレアーゼプラスミド、HPRT gRNAプラスミド（ヒトHPRT遺伝子をターゲティングするCRISPR gRNA）、Amaya EGFPmaxプラスミド、およびHPRT標的ベクターの構造を示した。HPRT標的ベクターは、0.5 kbのターゲティングアームを有した（図5）。試料の調製、フローサイトメトリー、および他の方法は、実験1と同様であった。プラスミドは、エンドトキシン非含有キット（Qiagen）を使用して調製した。細胞数およびプラスミドの組合せを含む、異なる条件（表3に示す）について調べた。

【表 3】

表3.実験で使用した異なる条件

試料の ID	PBMC 数	プラスミド	GFP'(ug)	Cas9'(ug)	gRNA'(ug)	標的(ug)
1	5x10 ⁶	GFP	5	0	0	0
2	2x10 ⁷	Cas9	0.1	20	0	0
3	2x10 ⁷	Cas9+gRNA	0.1	10	10	0
4	2x10 ⁷	Cas9+gRNA+標的	0.1	5	5	10
5	2x10 ⁷	Cas9+gRNA+標的	0.1	2.5	2.5	15
6	2x10 ⁷	GFP	5	0	0	0

10

【0532】

結果

図7は、Cas9+gRNA+標的プラスミド共トランスフェクションが、バルク集団内で、良好なトランスフェクション効率をもたらすことを裏付けた。図8は、CD3+T細胞についての、EGFPFACS解析の結果を示した。上記条件を使用して、異なるトランスフェクション効率を裏付けた。図40Aおよび図40Bは、CRISPRによる、ドナートランス遺伝子によるトランスフェクションの6日後における、生存率およびトランスフェクション効率（GFP+％）を示す。

【0533】

（実施例3）

20

各遺伝子部位において、二本鎖切断（DSB）誘導が最高度であるgRNAを同定する。ガイドRNAのデザインおよび構築：

CRISPR Design Program（Zhang Lab、MIT 2015）を使用して、所望の遺伝子領域へのガイドRNA（gRNA）をデザインした。オフターゲット位置により決定される、最高のランク付け値に基づき、gRNAを作製するための複数のプライマー（表4に示す）を選び出した。gRNAは、オリゴヌクレオチド対：5'-CACCG-gRNA配列-3'および5'-AAAC-逆相補体gRNA配列-C-3'により注文した（オリゴヌクレオチド対の配列を、表4に列挙する）。

【表 4 - 1】

表4. gRNAを作製するのに使用されるプライマー(クローニングの目的で、配列CACCGをセンス鎖へと付加し、AAACをアンチセンス鎖へと付加する)。

配列番号	プライマー名	5'~3'の配列
5	HPRT gRNA 1 センス鎖	CACCGCACGTGTGAACCAACCCGCC
6	HPRT gRNA 1 アンチセンス鎖	AAACGGCGGGTTGGTTCACACGTGC
7	HPRT gRNA 2 センス鎖	CACCGAAACAACAGGCCGGGCGGGT
8	HPRT gRNA 2 アンチセンス鎖	AAACACCCGCCCGGCCTGTTGTTTC
9	HPRT gRNA 3 センス鎖	CACCGACAAAAAAATTAGCCGGGTG
10	HPRT gRNA 3 アンチセンス鎖	AAACCACCCGGCTAATTTTTTTGT
11	HPRT gRNA 4 センス鎖	CACCGTAAATTTCTCTGATAGACTA
12	HPRT gRNA 4 アンチセンス鎖	AAACTAGTCTATCAGAGAAATTTAC
13	HPRT gRNA 5 センス鎖	CACCGTGTTCATGAGAGCATTAC
14	HPRT gRNA 5 アンチセンス鎖	AAACGTAATGCTCTCATTGAAACAC
15	HPRT gRNA 6 センス鎖	CACCGGTCTCGAACTCCTGAGCTC
16	HPRT gRNA 6 アンチセンス鎖	AAACGAGCTCAGGAGTTCGAGACC
17	HPRT Cell フォワード	AGTGAAGTGGCGCATTCTTG
18	HPRT Cell リバース	CACCCTTTCCAAATCCTCAGC
19	AAVS1 gRNA 1 センス鎖	CACCGTGGGGGTTAGACCCAATATC
20	AAVS1 gRNA 1 アンチセンス鎖	AAACGATATTGGGTCTAACCCCCAC
21	AAVS1 gRNA 2 センス鎖	CACCGACCCACAGTGGGGCCACTA
22	AAVS1 gRNA 2 アンチセンス鎖	AAACTAGTGGCCCCACTGTGGGGTC
23	AAVS1 gRNA 3 センス鎖	CACCGAGGGCCGGTTAATGTGGCTC
24	AAVS1 gRNA 3 アンチセンス鎖	AAACGAGCCACATTAACCGGCCCTC
25	AAVS1 gRNA 4 センス鎖	CACCGTCACCAATCCTGTCCCTAG
26	AAVS1 gRNA 4 アンチセンス鎖	AAACCTAGGGACAGGATTGGTGAC
27	AAVS1 gRNA 5 センス鎖	CACCGCCGGCCCTGGGAATATAAGG
28	AAVS1 gRNA 5 アンチセンス鎖	AAACCTTATATTTCCAGGGCCGGC
29	AAVS1 gRNA 6 センス鎖	CACCGCGGGCCCTATGTCCACTTC
30	AAVS1 gRNA 6 アンチセンス鎖	AAACGAAGTGGACATAGGGGCCCGC
31	AAVS1 Cell フォワード	ACTCCTTTTCAATTTGGGCAGC
32	AAVS1 Cell リバース	GGTTCTGGCAAGGAGAGAGA
33	PD-1 gRNA 1 センス鎖	CACCGCGGAGAGCTTCGTGCTAAAC
34	PD-1 gRNA 1 アンチセンス鎖	AAACGTTTAGCACGAAGCTCTCCGC
35	PD-1 gRNA 2 センス鎖	CACCGCCTGCTCGTGGTGACCGAAG
36	PD-1 gRNA 2 アンチセンス鎖	AAACCTTCGGTCACCACGAGCAGGC
37	PD-1 gRNA 3 センス鎖	CACCGCAGCAACCAGACGGACAAGC
38	PD-1 gRNA 3 アンチセンス鎖	AAACGCTTGTCCGTCTGGTTGCTGC
39	PD-1 gRNA 4 センス鎖	CACCGAGGCGGCCAGCTTGTCCGTC
40	PD-1 gRNA 4 アンチセンス鎖	AAACGACGGACAAGCTGGCCGCCTC
41	PD-1 gRNA 5 センス鎖	CACCGCGTTGGGCAGTTGTGTGACA
42	PD-1 gRNA 5 アンチセンス鎖	AAACTGTACACAACCTGCCAACGC
43	PD-1 gRNA 6 センス鎖	CACCGACGGAAGCGGCAGTCCTGGC
44	PD-1 gRNA 6 アンチセンス鎖	AAACGCCAGGACTGCCGCTTCCGTC
45	PD-1 Cell フォワード	AGAAGGAAGAGGCTCTGCAG
46	PD-1 Cell リバース	CTCTTTGATCTGCGCCTTGG
47	CTLA4 gRNA 1 センス鎖	CACCGCCGGGTGACAGTGCTTCGGC
48	CTLA4 gRNA 1 アンチセンス鎖	AAACGCCGAAGCACTGTCACCCGGC

10

20

30

40

【表 4 - 2】

配列番号	プライマー名	5'~3'の配列
49	CTLA4 gRNA 2 センス鎖	CACCGTGCGGCAACCTACATGATG
50	CTLA4 gRNA 2 アンチセンス鎖	AAACCATCATGTAGGTTGCCGCAC
51	CTLA4 gRNA 3 センス鎖	CACCGCTAGATGATTCCATCTGCAC
52	CTLA4 gRNA 3 アンチセンス鎖	AAACGTGCAGATGGAATCATCTAGC
53	CTLA4 gRNA 4 センス鎖	CACCGAGGTTCACTTGATTTCAC
54	CTLA4 gRNA 4 アンチセンス鎖	AAACGTGGAAATCAAGTGAACCTC
55	CTLA4 gRNA 5 センス鎖	CACCGCCGCACAGACTTCAGTCACC
56	CTLA4 gRNA 5 アンチセンス鎖	AAACGGTGACTGAAGTCTGTGCGGC
57	CTLA4 gRNA 6 センス鎖	CACCGCTGGCGATGCCTCGGCTGC
58	CTLA4 gRNA 6 アンチセンス鎖	AAACGCAGCCGAGGCATCGCCAGC
59	CTLA4 Cell フォワード	TGGGGATGAAGCTAGAAGGC
60	CTLA4 Cell リバース	AATCTGGGTTCCGTTGCCTA
61	CCR5 gRNA 1 センス鎖	CACCGACAATGTGTCAACTCTTGAC
62	CCR5 gRNA 1 アンチセンス鎖	AAACGTCAAGAGTTGACACATTGTC
63	CCR5 gRNA 2 センス鎖	CACCGTCATCCTCCTGACAATCGAT
64	CCR5 gRNA 2 アンチセンス鎖	AAACATCGATTGTCAGGAGGATGAC
65	CCR5 gRNA 3 センス鎖	CACCGGTGACAAGTGTGATCACTT
66	CCR5 gRNA 3 アンチセンス鎖	AAACAAGTGATCACACTTGTCCACC
67	CCR5 gRNA 4 センス鎖	CACCGACACAGCATGGACGACAGCC
68	CCR5 gRNA 4 アンチセンス鎖	AAACGGCTGTCTGTCATGCTGTGTC
69	CCR5 gRNA 5 センス鎖	CACCGATCTGGTAAAGATGATTCC
70	CCR5 gRNA 5 アンチセンス鎖	AAACGGAATCATCTTTACCAGATC
71	CCR5 gRNA 6 センス鎖	CACCGTTGTATTTCCAAAGTCCCAC
72	CCR5 gRNA 6 アンチセンス鎖	AAACGTGGGACTTTGGAAATACAAC
73	CCR5 Cell フォワード	CTCAACCTGGCCATCTCTGA
74	CCR5 Cell リバース	CCCGAGTAGCAGATGACCAT

【 0 5 3 4 】

標的配列クローニングプロトコール（Zhang Lab、MIT）を使用して、gRNAを、併せてクローニングした。略述すると、以下のプロトコール：37℃で30分間、95℃で5分間、次いで、5℃/分で、25℃へと降下することにより、サーモサイクラー内で、T4 PNK（NEB）および10倍濃度のT4 Ligation Buffer（NEB）を使用して、オリゴヌクレオチド対を、併せてリン酸化およびアニールさせた。pENTR1-U6-Stuffer-gRNAベクター（社内で作製した）を、Fast Digest BbsI（Fermentas）で消化し、Fast AP（Fermentas）および10倍濃度のFast Digest Bufferを、ライゲーション反応のために使用した。T4 DNA Ligase and Buffer（NEB）を使用して、消化されたpENTR1ベクターを、前のステップによる、リン酸化およびアニールさせたオリゴ二重鎖（希釈率を1：200とする）と併せてライゲーションした。ライゲーション物を、室温で1時間にわたりインキュベートし、次いで、形質転換し、その後、GeneJET Plasmid Miniprep Kit（Thermo Scientific）を使用して、Miniprepした。プラスミドをシーケンシングして、適正な挿入を確認した。

10

20

30

40

【表 5】

表5 操作CISHガイドRNA(gRNA)の標的配列

配列番号	gRNA 番号	エクソン	5' ~ 3' の標的
75	1	2	TTGCTGGCTGTGGAGCGGAC
76	2	2	GACTGGCTTGGGCAGTTCCA
77	3	2	TGCTGGGGCCTTCCTCGAGG
78	4	2	CCGAAGGTAGGAGAAGGICT
79	5	2	ATGCACAGCAGATCCTCCTC
80	6	2	AGAGAGTGAGCCAAAGGTGC
81	1	3	GGCATACTCAATGCGTACAT
82	2	3	GGGTTCCATTACGGCCAGCG
83	3	3	AAGGCTGACCACATCCGGAA
84	4	3	TGCCGACTCCAGCTTCCGTC
85	5	3	CTGTCAGTGAAAACCACTCG
86	6	3	CGTACTAAGAACGTGCCTTC

10

【0535】

操作 gRNA によりターゲティングされるゲノム配列を、表 5 および表 6 に示す。図 4 A および図 4 B は、修飾 gRNA による、CISH 遺伝子のターゲティングを示す。

【表 6】

表6 AAVS1 gRNAの標的配列

配列番号	遺伝子	gRNA 配列(5' ~ 3')
87	AAVS1	GTCACCAATCCTGTCCCTAG-

20

【0536】

gRNA の検証

HEK293T細胞を、24ウェルプレート内、ウェル1つ当たりの細胞 1×10^5 個の密度で播種した。150 μ LのOpti-MEM培地を、1.5 μ gのgRNAプラスミド、1.5 μ gのCas9プラスミドと組み合わせた。別の150 μ LのOpti-MEM培地を、5 μ LのLipofectamine 2000 Transfection試薬 (Invitrogen) と組み合わせた。溶液を、併せて組み合わせ、室温で15分間にわたりインキュベートした。DNA-脂質複合体を、滴下により、24ウェルプレートのウェルへと添加した。細胞を、37℃で3日間にわたりインキュベートし、GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) を使用して、ゲノムDNAを回収した。gRNAの活性を、Surveyor消化、ゲル電気泳動、および密度測定により定量化した (図60および図61) (Guschin, D. Y. ら、「A Rapid and General Assay for Monitoring Endogenous Gene Modification」、Methods in Molecular Biology、649巻：247~256頁(2010年))。

30

【0537】

プラスミドターゲティングベクターの構築

標的組込み部位の配列は、データベースの総体から収集した。Primer3ソフトウェアを使用して、これらの配列に基づき、1 kb、2 kb、および4 kbのサイズの長さを保有するターゲティングベクターを作製するように、PCRプライマーをデザインした。次いで、製造元の指示書に従い、Accuprime Taq HiFi (Invitrogen) を使用して、ターゲティングベクターアームをPCRにより増幅した。次いで、TOPO-PCR-Blunt II クローニングキット (Invitrogen) を使用して、結果として得られるPCR産物をサブクローニングし、配列を検証した。代表的なターゲティングベクター構築物を、図16に示す。

40

【0538】

50

結果

異なる gRNA 配列を一助とする、二本鎖切断 (DSB) の創出における Cas9 の効率を、表 7 に列挙した。表 7 中の百分率数は、試料中の遺伝子改変のパーセントを指し示した。

【表 7】

表 7. 各標的遺伝子部位において、二本鎖切断 (DSB) を創出するときの、Cas9/gRNA 対の効率。

	HPRT	AAVS1	CCR5	PD1	CTLA4
gRNA#1	27.85%	32.99%	21.47%	10.83%	40.96%
gRNA#2	30.04%	27.10%	>60%	>60%	56.10%
gRNA#3	<1%	39.82%	55.98%	37.42%	39.33%
gRNA#4	<5%	25.93%	45.99%	20.87%	40.13%
gRNA#5	<1%	27.55%	36.07%	30.60%	15.90%
gRNA#6	<5%	39.62%	33.17%	25.91%	36.93%

10

【0539】

5 つ全ての被験標的遺伝子部位において、DSB を創出した。これらのうちで、CCR5、PD1、および CTLA4 が、最高の DSB 効率をもたらした。本明細書で記載される方法と同じ方法を使用して、h Rosa26 を含む、他の標的遺伝子部位についても調べる。

【0540】

異なる gRNA 配列と共に二本鎖切断を創出する際の、Cas9 による比率を、図 15 に示す。ドナー対照および Cas9 だけによる対照と比較した、二本鎖切断のパーセントを列挙する。3 つの代表的な標的遺伝子部位（すなわち、CCR5、PD1、および CTLA4）について調べた。

20

【0541】

(実施例 4)

免疫チェックポイント遺伝子もまた破壊する、操作トランス遺伝子を含む T 細胞の作製

免疫チェックポイント遺伝子もまた破壊する操作トランス遺伝子（例えば、TCR）を発現する T 細胞集団を作製するために、CRISPR、TALEN、トランスポゾンベースの ZEN、メガヌクレアーゼ、または Mega-TAL 遺伝子編集法を使用する。PD-1 および他の内因性チェックポイントの概要を、表 9 に示す。細胞（例えば、PBMC、TIL、CD4+ または CD8+ 細胞などの T 細胞）を、がん患者（例えば、転移性黒色腫）から精製し、標準的な手順に従い培養および／または拡大する。細胞を、刺激する（例えば、抗 CD3 および抗 CD28 ビーズを使用して）、または刺激せずにおく。細胞に、TCR トランス遺伝子を有する標的ベクターをトランスフェクトする。例えば、MBVb22 の TCR トランス遺伝子配列を得て、IDT により gBLOCK として合成する。フランキング attB 配列を有する gBLOCK をデザインし、製造元の指示書に従い、LR Clonase 反応 (Invitrogen) を介して pENTR1 にクローニングし、配列を検証する。3 つの異なる方法で TCR トランス遺伝子を発現する、3 つのトランス遺伝子構成（図 6 を参照されたい）を調べる：1) 外因性プロモーター：TCR トランス遺伝子は、外因性プロモーターにより転写される；2) SA インフレーム転写：TCR トランス遺伝子は、スプライシングを介して内因性プロモーターにより転写される；および 3) 融合体インフレーム翻訳：TCR トランス遺伝子は、インフレーム翻訳を介して内因性プロモーターにより転写される。この実験では TCR トランス遺伝子を使用した。当業者は、他のトランス遺伝子（例えば、がん遺伝子）も使用し得ることを容易に理解するであろう。

30

40

【0542】

CRISPR 遺伝子編集法を使用する場合、Cas9 ヌクレアーゼプラスミドおよび gRNA プラスミド（図 4 に示すプラスミドと類似のプラスミド）にもまた、TCR トランス遺伝子を保有する標的ベクターを伴う DNA プラスミドをトランスフェクトする。10 マイクログラムの gRNA および 15 マイクログラムの Cas9 mRNA を用いること

50

ができる。gRNAは、Cas9ヌクレアーゼを、組込み部位、例えば、PD-1などの内因性チェックポイント遺伝子へとガイドする。代替的に、gRNAのPCR産物または修飾RNA (Hendel、Nature biotechnology、2015年により裏付けられている) も使用する。Cas9ヌクレアーゼ遺伝子およびgRNAの両方を伴う、別のプラスミドもまた調べる。プラスミドは、併せて、または別個にトランスフェクトする。代替的に、Cas9ヌクレアーゼまたはCas9ヌクレアーゼをコードするmRNAを使用して、Cas9ヌクレアーゼプラスミドを置き換える。

【0543】

CRISPR遺伝子編集法を使用して、組み込まれるTCRトランス遺伝子への相同組換え率を最適化するために、0.5kbp、1kbp、および2kbpを含む、異なる長さの標的ベクターアームについて調べる。例えば、アームの長さを0.5kbpとするターゲティングベクターを、図5に例示する。加えて、SCR7薬およびDNAリガーゼI Vインヒビター (例えば、アデノウイルスタンパク質) など、いくつかのCRISPRエンハンサーの効果についてもまた調べる。

10

【0544】

プラスミドを使用して、トランス遺伝子を保有する相同組換えHRエンハンサーを送達することに加えて、mRNAの使用についてもまた調べる。mRNA相同組換えHRエンハンサーの、DNAへの、in situにおける、高効率の転換が可能な、最適の逆転写プラットフォームを同定する。造血幹細胞および初代T細胞を操作するための逆転写プラットフォームもまた、最適化および実現する。

20

【0545】

トランスポゾンベースの遺伝子編集法 (例えば、PiggyBac、Sleeping Beauty) を使用する場合は、トランスポザーゼプラスミドにもまた、TCRトランス遺伝子を保有する標的ベクターを伴うDNAプラスミドをトランスフェクトする。図2は、TCRトランス遺伝子の組込みおよび発現のためのトランスポゾンベースの構築物のうちの一部について例示する。

【0546】

次いで、操作細胞を、PD1特異的ヌクレアーゼをコードするmRNAで処理し、集団を、Cell-Iアッセイにより解析して (図28~図30)、PD1の破壊およびTCRトランス遺伝子の挿入について検証する。次いで、検証の後、操作細胞を、in vitroにおいて、増殖させ、拡大する。T7エンドヌクレアーゼI (T7E1) アッセイを使用して、培養細胞内の、オンターゲットのCRISPRイベントを検出することができる (図34および図39)。二重シーケンシングによる欠失を、図37および図38に示す。

30

【0547】

一部の操作細胞は、自家移植において使用する (例えば、操作細胞を作製するのにその細胞が使用されるがん患者へと投与し戻す)。一部の操作細胞は、同種移植において使用する (例えば、異なるがん患者へと投与し戻す)。患者の処置における、T細胞の効能および特異性を決定する。遺伝子操作された細胞は、内因性チェックポイント遺伝子の発現を駆動するように、抗原または抗CD3および抗CD28で再刺激することができる (図90Aおよび図90B)。

40

結果

操作TCRによるT細胞の作製、および免疫チェックポイント遺伝子の破壊についての代表的な例を、図17に示す。陽性のPCR結果は、CCR5遺伝子における、組換えの成功を裏付ける。免疫チェックポイントノックアウトの効率を、図23A、図23B、図24A、および図24Bにおける代表的な実験に示す。フローサイトメトリーデータを、図25における代表的な実験について示す。図26Aおよび図26Bは、CRISPRによる処置後における、初代ヒトT細胞内の二重ノックアウトパーセントを示す。CRISPRおよび抗PD-1ガイドRNAのトランスフェクション後14日目における、フローサイトメトリー結果の代表例を、図45、図51、および図52に示す。トランスフェク

50

ションの14日後における細胞生存率および遺伝子編集効率を、CRISPR系と、CTL A-4およびPD-1をターゲティングするgRNAとをトランスフェクトした細胞について、図53、図54、および図55に示す。

【0548】

(実施例5)

T細胞内の相同組換えの検出

遺伝子もまた破壊する操作TCRを発現する操作T細胞集団を作製するために、CRISPR、TALEN、トランスポゾンベースのZEN、メガヌクレアーゼ、またはMega-TAL遺伝子編集法を使用する。相同組換えエンハンサーの使用により、相同組換えが容易になるかどうかを決定するために、以下の例では代表的な実験を具体化する。NEONトランスフェクションシステム(Invitrogen)を使用して、刺激CD3+

T細胞に電気穿孔した。細胞をカウントし、100uLのT緩衝液中に $1.0 \sim 3.0 \times 10^6$ 細胞の密度で再懸濁させた。15ug mRNA Cas9 (TriLink BioTechnologies)、10ug mRNA gRNA (TriLink BioTechnologies)、および10ugの相同組換え(HR)ターゲティングベクターを、HRを調べるために使用した。10ugのHRターゲティングベクター単独、または10ug mRNA gRNAを有する15ug Cas9を、対照として使用した。電気穿孔の後、細胞を4つの条件：1) DMSOのみ(媒体対照)、2) SCR7 (1uM)、3) L755507 (5uM)、ならびに4) SCR7およびL755507に分けて、HRを促進することが示唆される2つの薬物を調べた。Countess II Automated Cell Counter (Thermo Fisher)を使用して、3日ごとに細胞をカウントして、これらの多様な条件下における増殖をモニタリングした。HRについてモニタリングするために、細胞をフローサイトメトリーにより解析し、PCRにより調べた。フローサイトメトリーのために、細胞を毎週1回、3週間にわたり解析した。T細胞は、APC抗マウスTCR β (eBiosciences) およびFixable Viability Dye eFluor 780 (eBiosciences) で染色した。細胞を、LSR II (BD Biosciences) およびFlowJo v. 9を使用して解析した。PCRによりHRについて調べるために、gDNAをT細胞から単離し、AccuPrime Taq DNA polymerase, high fidelity (Thermo Fisher) を使用するPCRにより増幅した。CCR5遺伝子の両方およびHRターゲティングベクターの両方の末端に対するプライマーをデザインして、5'末端および3'末端の両方における適正な相同組換えを探索した。この実験ではTCRトランス遺伝子を使用した。当業者は、他のトランス遺伝子(例えば、がん遺伝子)も使用し得ることを容易に理解するであろう。

【0549】

(実施例6)

外因性プラスミドDNAにより誘導される毒性の防止

外因性プラスミドDNAは、T細胞内で毒性を誘導する。毒性が生じる機構は、図19および図69の生得的免疫センシング経路により説明される。外因性ポリ核酸に対する応答を修飾する化合物の付加により、細胞毒性を低減し得るのかどうかを決定するために、以下の代表的な実験を完遂した。NEONトランスフェクションシステム(Invitrogen)を使用して、CD3+ T細胞に、量を増大させるプラスミドDNA (0.1ug~40ug)を電気穿孔した(図91)。電気穿孔の後、細胞を4つの条件：1) DMSOだけ(媒体対照)、2) BX795 (1uM, InvivoGen)、3) Z-VAD-FMK (50uM, R&D Systems)、ならびに4) BX795およびZ-VAD-FMKへと分けて、二本鎖DNAにより誘導されるアポトーシスを遮断することが可能な、2つの薬物について調べた。細胞は、48時間後において、フローサイトメトリーにより解析した。T細胞は、Fixable Viability Dye eFluor 780 (eBiosciences) で染色し、LSR II (BD Bio

sciences) および FlowJo v. 9 を使用して解析した。

【0550】

結果

プラスミドDNAをトランスフェクトしたT細胞が被る毒性の代表的な例を、図18、図27、図32、および図33に示す。細胞数による生存率を、図86に示す。生得的免疫経路インヒビターを添加した後で、死を経るT細胞のパーセントは低減される。例示を目的として述べると、図20は、2つの異なるインヒビターで処理されたT細胞培養物のアポトーシスの低減を表したものを示す。

【0551】

(実施例7)

ゲノム領域に対する組換えアームを伴う、少なくとも1つの操作抗原受容体を含む、非メチル化ポリ核酸

ポリ核酸に対する修飾は、図21に示される通りに実施することができる。非メチル化ポリ核酸が、外因性プラスミドDNAにより誘導される毒性を低減し、ゲノム操作を改善し得るのかどうかを決定するために、以下の実施例を利用することができる。Maxiprepを開始するために、相同組換えターゲティングベクターを含有する細菌コロニーを採取し、カナマイシン(1:1000)を伴う、5mLのLB培養液中に接種し、37℃で、4~6時間にわたり増殖させた。次いで、出発培養物を、カナマイシンを伴う、250mLのLB培養液による大容量の培養物へと添加し、SsaI酵素の存在下、37℃で12~16時間にわたり増殖させた。1つの例外を除き、製造元のプロトコルに従い、HiSpeed Plasmid Maxi Kit (Qiagen) を使用して、Maxiprepを調製した。Maxiprepの溶解および中性化の後、2.5mLの内毒素除去緩衝液を、Maxiprepへと添加し、氷上で45分間にわたりインキュベートした。Maxiprepは、無菌性を維持するように、クリーンベンチ内で終えた。Maxiprepの濃度は、Nanodropを使用して決定した。

【0552】

(実施例8)

GUIDE-Seqライブラリーの調製

固相可逆性固定化磁気ビーズ(Agencourt DNAdvance)を使用して、ゲノムDNAを、トランスフェクトした、対照の(非トランスフェクト細胞および外因性TCR(表10)を保有するミニサークルDNAをトランスフェクトしたCRISPR細胞)単離ヒトT細胞から単離し、Covaris S200装置により、末端修復され、Aテールである、平均長500bpへとせん断処理し、8ヌクレオチドのランダム分子指標が組み込まれた半機能的アダプターへとライゲーションした。標的濃縮のために、オリゴタグと相補的なプライマーによる、2ラウンドのネステッドアンカーPCRを使用した。末端修復サーモサイクラープログラム: 12℃で15分間、37℃で15分間; 72℃で15分間; 4℃で保持する。

【0553】

ゲノムにマッピングし戻されたGUIDE-Seqリードの開始部位は、DSBの位置特定を数塩基対以内で可能とする。製造元の指示書に従い、Illumina Library Quantification kit用のKapa Biosystems kitを使用してライブラリーを定量する。各試料についてqPCRランにより与えられる、1μL当たりの分子数の平均量推定値を使用して、次にライブラリーの全セットを1.2×10¹⁰分子に正規化し、シーケンシングのために一緒にプールされるライブラリー数で除す。これは、各試料についての分子毎のインプットを与え、およびまた、各試料についての容量毎のインプットも与える。本発明者らがGUIDE-Seqにより評価した、切断gRNAにより誘導される3つのRGNのオンターゲットおよびオフターゲット部位のマッピングリードを示す。全ての場合において、標的部位配列をx軸の左側のプロトスペーサー配列および右側のPAM配列と共に示す。Illumina Miseq Reagent Kit V2によるシーケンシングのためのIlluminaの標準的

10

20

30

40

50

なプロトコールに従い、ライブラリーを変性させ、M i s e q にロードする（300サイクル（2×150bpのペアエンド））。図76Aおよび図76Bは、代表的なG U I D E - S e q 実験のデータを示す。この実験ではT C R トランス遺伝子を使用したか、当業者は、他のトランス遺伝子（例えば、がん遺伝子）も使用し得ることを容易に理解するであろう。

【0554】

（実施例9）

アデノウイルス血清型5変異体タンパク質の作製

I n t e g r a t e d DNA技術（I D T）により、変異体c D N A（表8）をコードン最適化し、g B l o c k断片として合成した。i n v i t r o mRNA合成のために、合成断片をm R N A 産生ベクターにサブクローニングした。

【表8-1】

表8:アデノウイルスタンパク質の変異体cDNA配列

配列番号	変異	名称	配列(5' ~ 3')
88	なし	アデノウイルス血清型5 <i>E4orf6</i>	atgacaacaagtggcgtgccattcggcatgactttgcgccccac gagatcacgactgtctcgccgaactccctacagccgggatcgac tccctccctttgagactgaaacacgggccacgatactcgaggac caccacttctgcggagtgtaacacctgacgatgcataacgtta gctatgtgagagggtctccctgttctgctcggtttacccttattcaag agtgggtcgtgccgtgggacatggttctcacgagagaggagctc gttatcctgagaaaatgtatgcacgtttgtcttctgtgcaaatata gatataatgacttctatgatgattcatgggtacgaatcttgggcctt gcactgccattgtagcagtcctggctccctccaatgcatcgcggg aggccaagtctcgtctcgtgtttagaatggctgtggacggagc aatgttcaaccagcgctttatctggtatcgcgaggtagtcaactata atatgccgaaggagggttatgtttatgtctagtgttcatgacgggg agacattgatttatttagactgtgtatgatgccatgtgggaag cgtagtccggcgatgtccttcggttactccgcattgcattgtggg atttgaataacatcgttgtactttgtttcatactgcgcccgatctgt cagaaataagggtacgatgctgcgcacggcgaaacccggaggct catgctgagagccgttcgaataatcgtgaagaaacgacagcaa tgttgtattcatgccgaactgaaggcgacggcaacagtttatacgc cgactcttgcagcaccacaggccgatcctgatgcactacg atagcactccgatgtag
89	アミノ酸373における H→A	アデノウイルス血清型 5 <i>H373A</i> 変異体	atggagagaagggaatcctagttagagggggagtgcccggcggg ttttctgtgcacgcctccgtggaatccggatgtgagactcaggagt cccccgccaccgtggtgttcgcccaccaggagacaacactga cgggtggcgcgggcgctgctgcagggtggaagccaagccgcccgc tgctggggccgagccgatggaacccgaatccagaccgggtccc tctggcatgaacgttctgcagggtcgagaactctacccgaactc cgcaggatcttgacaatcacggaggacggccaggggcctcaagg gagtgaagagagagagaggggcttgtgaggccactgaggaag ctcgcaatctggcgttttcattgatgacaaggcacaggccggaat gcattacattccaacagattaaggacaactgcgcaaacgagctc gatctcctggcccagaagtatagcatcgagcagctgacaacctat

10

20

30

40

【表 8 - 2】

配列番号	変異	名称	配列(5' ~ 3')
			tggctgcagcccggcgacgatttgaagaggccatccgcgtgta cgcaaagggtggccctgcgacctgactgcaaatataagattccaa actggttaacatccggaattgtgtatattagtgaaaatggcgag aagtggagattgacacagaggatcgagtcgtttccggtgctcta tgatcaacatgtggcccgtgtgtcggcatggatggcgtagtca ttatgaatgtgaggttcaccggacctaattttagcgaaccgtcttc ctggcaaacactaatctgatcctgcatggagtcttcttatggattt aataacacctgtgtgaagcttggaccgacgtgcgggttagagg gtgtgctttttattgctgctgaaaggcgctggtgttagaccaaa agtagagcttctatcaagaaatgcctgttcgagaggtgtactctgg gcattctcagtgaaggtaatagcagggtcaggcataacgtggcct cagattgcggatgtttatgttggttaaatccgtgctgtgatcaag cacaacatgtgtgtggcaattgtgaggaccggcctctcaaatg ctgacatgttccgatggcaactgtcactgtcctcaaacatgtccg ttgcgagccattctcggaaggcctggccagttttcgagcataacat cctgacgcgctgtagtctccacctgggtaacagacggggtgtttt cctgccatcagtgtaacctgtcacaaccaagatactcctggaa ccagaatctatgagtaagtgaaacctgaatgggtattcgatatga ccatgaagatatgaaagtctcctcgctatgacgaaactaggacta ggtgtaggccctgcgagtggtggcggaagcatatccgcaacca acccgtgatgtgacgtgaccgaggagctgcgccccgatcac ctggtgctggcctgcaccagagcagaattcgggagctcagacg aagacactgattaa
90	アミノ酸の挿入 (AGIPA)	アデノウイルス血清型5 H354 変異体	atggagagaaggaaatcctagttagaggaggagtgcccgccggg ttttctggtcacgcctccgtggaatccggatgtgagactcaggagt cccccgccaccgtgtgttccgcccaccaggagacaactga cgggtggcgccggcggtgctgcagggtggaagccaagccgccc tgcgtggggccgagccgatggaaccgaatccagaccgggtccc tctggcatgaacgttgtgcaggtcgagaaactctacccgaactc cgcaggatcttgacaatcacggaggacggccagggcctcaagg gagtgaagagagagagaggggcttgtgaggccactgagggaag ctgcgaatctggcggtttcattgatgacaaggcacaggccggaat gcattacattccaacagattgaaggacaactgcgcaaacgagctc gatctcctggcccagaagtagcatcgagcagctgacaacctat tggctgcagcccggcgacgatttgaagaggccatccgcgtgta cgcaaagggtggccctgcgacctgactgcaaatataagattccaa actggttaacatccggaattgtgtatattagtgaaaatggcgag aagtggagattgacacagaggatcgagtcgtttccggtgctcta tgatcaacatgtggcccgtgtgtcggcatggatggcgtagtca ttatgaatgtgaggttcaccggacctaattttagcgaaccgtcttc ctggcaaacactaatctgatcctgcatggagtcttcttatggattt aataacacctgtgtgaagcttggaccgacgtgcgggttagagg gtgtgctttttattgctgctgaaaggcgctggtgttagaccaaa agtagagcttctatcaagaaatgcctgttcgagaggtgtactctgg gcattctcagtgaaggtaatagcagggtcaggcataacgtggcct cagattgcggatgtttatgttggttaaatccgtgctgtgatcaag cacaacatgtgtgtggcaattgtgaggaccgggctggaattcc agcatctcaaatgctgacatgttccgatggcaactgtcactgtctc aaaacaattcacgttgcgagccattctcggaaggcctggccagtt ttcgagcataacatcctgacgcgctgtagtctccacctgggtaac agacggggcggtttctgccaatcagtgtaacctgtcacatacca agatactcctggaaccagaatctatgagtaagtgaaactgaatg gtgtattcgatatgaccatgaagatatgaaagtctcctcgctatga cgaaactaggactaggtgtaggccctgcgagtggtggcggaag calatccgcaaccaaccgtgatgtggacgtgaccgaggagct gcgccccgatcacctggtgctggcctgcaccagagcagaattcg ggagctcagacgaagacactgattaa

(実施例 10)

PD-1、CTLA-4、およびCISHをノックアウトするための、TILのゲノム操作

適切な腫瘍を、適格性の病期であるIIC-IV期のがん患者から切除し、3~5mm²の小さな断片へと切り刻み、増殖培地および高用量(HD)IL-2を伴う培養プレートまたは小型培養フラスコに入れた。まず、TILを、この「前急速拡大プロトコール」(前REP)期中の3~5週間にわたり、少なくとも細胞50×10⁶個へと拡大する。Neon Transfection System(100ul Kitまたは10ul Kit; Invitrogen、Life Technologies)を使用して、TILを電気穿孔する。TILをペレット化させ、T緩衝液で1回洗浄する。TILを、10ulのチップには、10ulのT緩衝液中の細胞2×10⁵個の密度で再懸濁させ、100ulチップには、100ul T緩衝液中の細胞3×10⁶個の密度で再懸濁させる。次いで、15ugのCas9 mRNA、ならびに10~50ugのPD-1、CTLA-4、およびCISH gRNA-RNA(100mc1のチップ)を用いて、TILを、1400V、10ミリ秒間ずつ、3つのパルスで電気穿孔する。トランスフェクション後、TILを、抗生物質非含有培養培地中、細胞1000個/u1で播種し、5%のCO₂中、30℃で24時間にわたりインキュベートする。回収の24時間後、TILを、抗生物質含有培地へと移し、5%のCO₂中、37℃で培養することができる。

【0556】

次いで、PBMCフィーダー細胞およびIL-2の存在下で、抗CD3を使用して、TILを刺激することにより、細胞を、2週間にわたり、急速拡大プロトコール(REP)にかけた。拡大されたTIL(ここでは、細胞数十億個)を洗浄し、プールし、患者へと注入し、1または2サイクルのHD IL-2療法が続いた。TILを移入させる前に、TILの存続を容易とするために、シクロホスファミド(Cy)およびフルダラビン(fludarabine)(Flu)を使用する準備レジメンであって、宿主リンパ球を一過性に枯渇させ、注入されるTILに「場所を空け」、サイトカインシンクおよび調節性T細胞を除去する準備レジメンで、患者を処置することができる。対象は、対象自身の修飾TIL細胞の注入を、30分間にわたり受け、処置から回復するまで、院内にとどまって、有害事象についてモニタリングされる。図102Aおよび図102Bは、2例の異なる対象のTILの細胞拡大を示す。図103Aおよび図103Bは、CRISPR系および抗PD-1ガイドを電気穿孔され、フィーダーの添加を伴う(A)か、またはフィーダーの添加を伴わずに(B)培養されたTILの細胞拡大を示す。

10

20

30

【表 9 - 1】

表9.内因性チェックポイントの概要

配列 番号	遺伝子 記号	略号	名称	NCBI 番号 (GRCh38.p2) *AC010327.8 ** GRCh38.p7	元の始点	元の終点	ゲノム内の位 置
91	ADORA 2A	A2aR; RDC8; ADORA2	アデノシンA2 a受容体	135	24423597	24442360	22q11.23
92	CD276	B7H3; B7-H3; B7RP-2; 4Ig-B7- H3	CD276分子	80381	73684281	73714518	15q23-q24
93	VTCN1	B7X; B7H4; B7S1; B7-H4; B7h.5; VCTN1; PRO1291	Vセットドメイ ン含有T細胞 活性化イン ヒビター1	79679	11714358 7	117270368	1p13.1
94	BTLA	BTLA1; CD272	Bリンパ球お よびTリンパ 球関連	151888	11246396 6	112499702	3q13.2
95	CTLA4	GSE; GRD4; ALPS5; CD152; CTLA-4; IDDM12; CELIAC3	細胞傷害性 Tリンパ球関 連タンパク質 4	1493	20386778 8	203873960	2q33
96	IDO1	IDO; INDO; IDO-1	インドールア ミン2,3-ジオ キシゲナーゼ 1	3620	39913809	39928790	8p12-p11
97	KIR3DL 1	KIR; NKB1; NKAT3; NKB1B; NKAT- 3; CD158E1; KIR3DL2; KIR3DL1/S1	キラー細胞 免疫グロブリン 様受容体 、3ドメイン、 長細胞質テ ール、1	3811	54816438	54830778	19q13.4
98	LAG3	LAG3;CD223	リンパ球活 性化遺伝子 3	3902	6772483	6778455	12p13.32
99	PDCD1	PD1; PD-1; CD279; SLEB2; hPD-1; hPD-l; hSLE1	プログラム細 胞死1	5133	24184988 1	241858908	2q37.3
100	HAVCR2	TIM3; CD366; KIM-3; TIMD3; Tim-3; TIMD-3; HAVcr-2	A型肝炎ウ イルス細胞 受容体2	84868	15708583 2	157109237	5q33.3
101	VISTA	C10orf54, ESC- 1の分化(Dies1); 血小板受容体 Gi24 前駆体; PD1 ホモログ (PD1H) B7H5; GI24; B7-H5; SISPI; PP2135	T細胞活性 化のVドメイ ン免疫グロブ リンサプレッ サー	64115	71747556	71773580	10q22.1
102	CD244	2B4; 2B4; NAIL; Nmrk; NKR2B4; SLAMF4	CD244分子 、ナチュラル キラー細胞 受容体2B4	51744	16083015 8	160862902	1q23.3

10

20

30

40

【表 9 - 2】

配列 番号	遺伝子 記号	略号	名称	NCBI 番号 (GRCh38.p2) *AC010327.8 ** GRCh38.p7	元の始点	元の終点	ゲノム内の位 置
103	CISH	CIS; G18; SOCS; CIS-1; BACTS2	サイトカイン 誘導性SH2 含有タンパク 質	1154	50606454	50611831	3p21.3
104	HPRT1	HPRT; HGPRT	ヒポキサンチ ンホスホリボ シルトランス フェラーゼ1	3251	13445284 2	134500668	Xq26.1
105	AAV*S1	AAV	アデノ随伴ウ イルス組込 み部位1	14	7774	11429	19q13
106	CCR5	CCR5; CCR-5; CD195; CKR-5; CCCKR5; CMKBR5; IDDM22; CC- CKR-5	ケモカイン(C- モチーフ)受 容体5(遺伝 子/偽遺伝 子)	1234	46370142	46376206	3p21.31
107	CD160	NK1; BY55; NK28	CD160分子	11126	14571943 3	145739288	1q21.1
108	TIGIT	VSIG9; VSTM3; WUCAM	IgおよびITI Mドメインを 有するT細胞 免疫受容体	201633	11429398 6	114310288	3q13.31
109	CD96	TACTILE	CD96分子	10225	11154207 9	111665996	3q13.13- q13.2
110	CRTAM	CD355	細胞傷害性 および制御 性T細胞分 子	56253	12283843 1	122872643	11q24.1
111	LAIR1	CD305; LAIR-1	白血球関連 免疫グロブリン 様受容体 1	3903	54353624	54370556	19q13.4
112	SIGLEC7	p75; QA79; AIRM1; CD328; CDw328; D- siglec; SIGLEC- 7; SIGLECP2; SIGLEC19P; p75/AIRM1	シアル酸結 合Ig様レク チン7	27036	51142294	51153526	19q13.3
113	SIGLEC9	CD329; CDw329; FOAP-9; siglec- 9; OBBP-LIKE	シアル酸結 合Ig様レク チン9	27180	51124880	51141020	19q13.41

10

20

30

40

【表 9 - 3】

配列 番号	遺伝子 記号	略号	名称	NCBI 番号 (GRCh38.p2) *AC010327.8 ** GRCh38.p7	元の始点	元の終点	ゲノム内の位 置
114	TNFRSF 10B	DR5; CD262; KILLER; TRICK2; TRICKB; ZTNFR9; TRAILR2; TRICK2A; TRICK2B; TRAIL-R2; KILLER/DR5	腫瘍壊死因 子受容体ス ーパーファミ ーメンバー 10b	8795	23006383	23069187	8p22-p21
115	TNFRSF 10A	DR4; APO2; CD261; TRAILR1; TRAILR-1	腫瘍壊死因 子受容体ス ーパーファミ ーメンバー 10a	8797	23191457	23225167	8p21
116	CASP8	CAP4; MACH; MCH5; FLICE; ALPS2B; Casp- 8	カスパーゼ 8	841	20123344 3	201287711	2q33-q34
117	CASP10	MCH4; ALPS2; FLICE2	カスパーゼ 10	843	20118289 8	201229406	2q33-q34
118	CASP3	CPP32; SCA-1; CPP32B	カスパーゼ 3	836	18462769 6	184649475	4q34
119	CASP6	MCH2	カスパーゼ 6	839	10968862 8	109713904	4q25
120	CASP7	MCH3; CMH-1; LICE2; CASP-7; ICE-LAP3	カスパーゼ 7	840	11367916 2	113730909	10q25
121	FADD	GIG3; MORT1	Fas 関連細 胞死ドメイン	8772	70203163	70207402	11q13.3
122	FAS	APT1; CD95; FAS1; APO-1; FASTM; ALPS1A; TNFRSF6	Fas 細胞表 面細胞死受 容体	355	88969801	89017059	10q24.1
123	TGFBRII	AAT3; FAA3; LDS2; MFS2; RIIC; LDS1B; LDS2B; TAAD2; TGFR- 2; TGFbeta-RII	形質転換増 殖因子ベータ受容体 II	7048	30606493	30694142	3p22
124	TGFBR1	AAT5; ALK5; ESS1; LDS1; MSSE; SKR4; ALK-5; LDS1A; LDS2A; TGFR- 1; ACVRLK4; tbetaR-I	形質転換増 殖因子ベータ受容体 I	7046	99104038	99154192	9q22
125	SMAD2	JV18; MADH2; MADR2; JV18- 1; hMAD-2; hSMAD2	SMAD ファミ リーメンバー 2	4087	47833095	47931193	18q21.1

10

20

30

40

【表 9 - 4】

配列 番号	遺伝子 記号	略号	名称	NCBI 番号 (GRCh38.p2) *AC010327.8 ** GRCh38.p7	元の始点	元の終点	ゲノム内の位 置
126	SMAD3	LDS3; LDS1C; MADH3; JV15- 2; HSPC193; HsT17436	SMAD ファミ リーメンバー3	4088	67065627	67195195	15q22.33
127	SMAD4	JIP; DPC4; MADH4; MYHRS	SMAD ファミ リーメンバー4	4089	51030213	51085042	18q21.1
128	SKI	SGS; SKV	S K I が ん 原 遺伝子	6497	2228695	2310213	1p36.33
129	SKIL	SNO; SnoA; SnoI; SnoN	S K I 様 が ん 原遺伝子	6498	17035767 8	170396849	3q26
130	TGIF1	HPE4; TGIF	T G F B 誘 導 因子ホメオボ ックス1	7050	3411927	3458411	18p11.3
131	IL10RA	CD210; IL10R; CD210a; CDW210A; HIL-10R; IL- 10R1	インターロイ キン10受容 体サブユニッ トアルファ	3587	11798639 1	118001483	11q23
132	IL10RB	CRFB4; CRF2- 4; D21S58; D21S66; CDW210B; IL- 10R2	インターロイ キン10受容 体サブユニッ トベータ	3588	33266360	33297234	21q22.11
133	HMOX2	HO-2	ヘムオキシゲ ナーゼ2	3163	4474703	4510347	16p13.3
134	IL6R	IL6Q; gp80; CD126; IL6RA; IL6RQ; IL-6RA; IL-6R-1	インターロイ キン6受容 体	3570	15440519 3	154469450	1q21
135	IL6ST	CD130; GPI30; CDW130; IL- 6RB	インターロイ キン6シグナ ルトランスデ ューサー	3572	55935095	55994993	5q11.2
136	CSK	CSK	c-srcチロシン キナーゼ	1445	74782084	74803198	15q24.1
137	PAG1	CBP; PAG	グリコスフィン ゴ脂質ミクロ ドメインにより 膜アンカーさ れるリンタンパ ク質 1	55824	80967810	81112068	8q21.13
138	SIT1	SIT1	シグナル閾値 調節膜貫通 アダプター1	27240	35649298	35650950	9p13-p12
139	FOXP3	JM2; AIID; IPEX; PIDX; XPID; DIETER	フォークヘッド ボックスP3	50943	49250436	49269727	Xp11.23
140	PRDM1	BLIMP1; PRDI- BF1	PRドメイン	639	10608632 0	106109939	6q21

10

20

30

40

【表 9 - 5】

配列 番号	遺伝子 記号	略号	名称	NCBI 番号 (GRCh38.p2) *AC010327.8 ** GRCh38.p7	元の始点	元の終点	ゲノム内の位 置
141	BATF	SFA2; B-ATF; BATF1; SFA-2	塩 基 性ロイ シンジッパー 転写因子、 ATF様	10538	75522441	75546992	14q24.3
142	GUCY1 A2	GC-SA2; GUC1A2	可 溶 型グア ニル酸シクラ ーゼ1、アルフ ア2	2977	10667401 2	107018445	11q21-q22
143	GUCY1 A3	GUCA3; MYMY6; GC- SA3; GUC1A3; GUCSA3; GUCY1A1	可 溶 型グア ニル酸シクラ ーゼ1、アルフ ア3	2982	15566656 8	155737062	4q32.1
144	GUCY1B 2	GUCY1B2	可 溶 型グア ニル酸シクラ ーゼ1、ベー タ2(偽遺伝 子)	2974	50994511	51066157	13q14.3
145	GUCY1B 3	GUCB3; GC- SB3; GUC1B3; GUCSB3; GUCY1B1; GC- S-beta-1	可 溶 型グア ニル酸シクラ ーゼ1、ベー タ3	2983	15575897 3	155807642	4q31.3-q33
146	TRA	IMD7; TCRA; TCRD; TRAalpha; TRAC	T細胞受容 体アルファ遺 伝子座	6955	21621904	22552132	14q11.2
147	TRB	TCRB; TRBbeta	T細胞受容 体ベータ遺 伝子座	6957	14229901 1	142813287	7q34
148	EGLN1	HPH2; PHD2; SM20; ECYT3; HALAH; HPH- 2; HIFPH2; ZMYND6; C1orf12; HIF- PH2	egl-9 ファミリ ー低酸素症 誘導性因子 1	54583	23136375 1	231425044	1q42.1
149	EGLN2	EIT6; PHD1; HPH-1; HPH-3; HIFPH1; HIF- PH1	egl-9 ファミリ ー低酸素症 誘導性因子 2	112398	40799143	40808441	19q13.2
150	EGLN3	PHD3; HIFPH3; HIFP4H3	egl-9 ファミリ ー低酸素症 誘導性因子 3	112399	33924215	33951083	14q13.1
151	PPP1R12 C**	p84; p85; LENG3; MBS85	タンパク質ホ スファターゼ 1 調節サブ ユニット 12C	54776	55090913	55117600	19q13.42

10

20

30

40

【表 10】

表10 操作T細胞受容体(TCR)

配列番号	5'~3'の配列
152	atggccttggtaacctctataactgtgctgctcagtcctgggatcatgggagatgctaagactactcagcctaatagtatggaaagt aatgaggaggagcctgtccacctgccttgtaatcactctaccataagcgggacagattacatacattggatcggcagctcccttc acaagggtccagagtatgtgattcatggcctcacatcaaatgtgaacaatcggaatggcttctcttgcattgcagaggatcggaaaa gctcaacactcatcctgcataggcgacactcagagatgcggccgtttatta

【表 11】

表 11 Streptococcus pyogenes Cas9 (*SpCas9*)

配列番号	5'~3'の配列
153	atggactataaggaccacgacggagactacaaggatcatgatattgattacaagacgatgacgataagatggcccaagaag aagcgggaagggtcggatccacggagtccagcagccgacaagaagtacagcatcggcctggacatcggcaccaactctgtgg gctgggcccgtgatcccgacg

【0557】

(実施例 11)

gRNA の修飾

修飾ガイドRNA のデザインおよび構築：

CRISPR Design Program (Zhang Lab, MIT 2015) を使用して、遺伝子の所望の領域へのガイドRNA (gRNA) をデザインした。オフターゲット位置により決定される、最高のランク付け値に基づき、複数の gRNA (表 12 に示す) を選び出した。PD-1、CTLA-4、および CISH の遺伝子配列をターゲットにする gRNA を、2'-O-メチル 3' ホスホロチオエート付加を含有するように修飾した (図 44 および図 59)。

【0558】

(実施例 12)

rAAV ターゲティングベクターの構築およびウイルス産生

図 138 に記載されているターゲティングベクターは、相同性アームの DNA 合成および mTCR 発現カセットの PCR 増幅により作製した。合成断片および mTCR カセットを、制限酵素消化および AAV-2 ITR 配列の 2 コピー間の pAAV-MCS 骨格プラスミド (Agilent) へのライゲーションによりクローニングして、ウイルスパッケージングを促進した。ライゲートしたプラスミドを、One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli (Thermo fisher) に形質転換した。EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) を使用して、ベクターごとに 1mg のプラスミド DNA を細菌から精製し、感染性 rAAV の産生のために Vigene Biosciences、MD USA へ送った。1ml 当たり 1×10^{13} ウイルスゲノムコピーを超える精製ウイルスの力価を決定し、凍結ストックを作製した。この実験では TCR トランス遺伝子を使用したが、当業者は、他のトランス遺伝子 (例えば、がん遺伝子) も使用し得ることを容易に理解するであろう。

【0559】

(実施例 13)

rAAV による T 細胞感染

ヒト T 細胞を、1 細胞当たり 1×10^6 ゲノムコピー/ウイルス粒子の感染多重度 (MOI) で精製 rAAV に感染させた。適切な容量のウイルスを、10% ヒト AB 血清 (Sigma)、300 単位/ml ヒト組換え IL-2、5 ng/ml ヒト組換え IL-7、および 5 ng/ml ヒト組換え IL-15 (Pepro tech) を含有する X-VIVO 15 培養培地 (Lonza) に希釈した。希釈したウイルスを、CRISPR 試薬による電気穿孔の 2 時間後に、6 ウェルディッシュ中の T 細胞に添加した。細胞を、5% CO₂ の加湿インキュベーターで 30℃、約 18 時間インキュベートした後、ウイルス含有培

10

20

30

40

50

地を、ウイルスなしの上記のような新鮮な培地で置き換えた。T細胞を戻して37℃でさらに14日間培養した。この間、細胞を一定の時点で解析して、フローサイトメトリーによりmTCR発現(図151、図152、図153)、およびデジタルドロップレットPCR(ddPCR)によりmTCR発現カセットのT細胞DNAへの組み込み(図145A、図145B、図147A、図147B、図148A、図148B、図149、図150A、および図150B)を測定した。この実験ではTCRトランス遺伝子を使用した、当業者は、他のトランス遺伝子(例えば、がん遺伝子)も使用し得ることを容易に理解するであろう。

【0560】

(実施例14)

mTCRカセットのヒトT細胞へのddPCR検出

mTCR発現カセットのT細胞標的遺伝子座への挿入は、mTCRカセット内に位置するフォワードプライマー、およびゲノムDNA領域内の右の相同性アームの外側に位置するリバースプライマーを使用してddPCRにより検出し、定量化した。全てのPCR反応は、ddPCR supermix (BIO-RAD、カタログ番号#186-3024)を用いて製造元により指定された条件を使用して行った。PCR反応は、20μl合計容量の液滴内で、以下のPCRサイクル条件: 96℃、10分間の1サイクル; 96℃、30秒間、55℃~61℃、30秒間、72℃、240秒間の40サイクル; 98℃、10分間の1サイクルを使用して行った。デジタルPCRデータは、QuantaSoft (BIO-RAD)を使用して解析した。この実験ではTCRトランス遺伝子を使用した、当業者は、他のトランス遺伝子(例えば、がん遺伝子)も使用し得ることを容易に理解するであろう。

【0561】

(実施例15)

単一細胞RT-PCR

培養液中の単一Tリンパ球におけるTCRノックイン発現を、単一細胞リアルタイムRT-PCRにより評価した。CRISPR (CISH KO) / rAAV操作細胞からの単一細胞内容物を回収した。略述すると、予め滅菌したガラス電極に、Ambion Single Cell-to-CT kit (Life Technologies、Grand Island、NY)からの溶解緩衝液を充填し、次いで、培養液中のリンパ球の全細胞パッチを得るために使用した。細胞内含量(約4~5μl)を、陰圧を加えてパッチピペットの先端に吸引し、次いで、RNase/DNaseフリーチューブに移した。各チューブの容量を、Single Cell DNase I / Single Cell Lysis solutionを添加して10μlに増やし、次いで、内容物を室温で5分間インキュベートした。サーマルサイクラーで逆転写を行なって(25℃、10分間、42℃、60分間、および85℃、5分間)cDNA合成後、TCR遺伝子発現プライマーを、キットからの指示書に基づき前増幅反応ミックスと混合した(95℃、10分間、95℃、15秒間、60℃、4分間、および60℃、4分間の14サイクル)。前増幅段階からの産物を、リアルタイムRT-PCR反応に使用した(50℃、2分間、95℃、10分間、および95℃、5秒間、および60℃、1分間の40サイクル)。リアルタイムRT-PCRからの産物を、1μl/ml臭化エチジウムを含有する3%アガロースゲルでの電気泳動により分離した。この実験ではTCRトランス遺伝子を使用した、当業者は、他のトランス遺伝子(例えば、がん遺伝子)も使用し得ることを容易に理解するであろう。

【0562】

結果

単一細胞RT-PCRデータは、CRISPRおよびrAAV修飾後、Tリンパ球が、電気穿孔および遺伝子導入後7日目に(図156、図157A、図157B、図158、および図159B)、25%で(図159A)外因性TCRを発現したことを示した。

【0563】

(実施例 16)

GUIDE-Seqライブラリー調製

ゲノムDNAを、トランスフェクト対照（非トランスフェクトおよび外因性TCRを有するrAAVとのCRISPRトランスフェクト細胞から単離した。8 pm ds TCRドナーまたは16 pmol ds TCRドナーを利用する遺伝子導入を比較した。固相可逆性固定化磁気ビーズ（Agencourt DNA Advance）を使用して単離したヒトT細胞を、Covaris S200装置で500 bpの平均長にせん断し、末端修復し、Aテール付加し、8-ntランダム分子指標を組み込む半機能的アダプターにライゲートした。オリゴタグに相補的なプライマーによる2ラウンドのネステッドアンカーPCRを、標的濃縮のために使用した。末端修復サーモサイクラープログラム：12℃、15分間、37℃、15分間；72℃、15分間；4℃で保持する。

【0564】

ゲノムにマッピングし戻されたGUIDE-Seqリードの開始部位は、DSBの位置特定を数塩基対内で可能にする。製造元の指示書に従い、Illumina Library Quantification kit用のKapa Biosystems kitを使用してライブラリーを定量する。各試料についてqPCRランにより与えられる、1 μL当たりの分子数の平均量推定値を使用して、次にライブラリーの全セットを 1.2×10^{10} 分子に正規化し、シーケンシングのために一緒にプールされるライブラリー数で除す。これは、各試料についての分子毎のインプットを与え、およびまた、各試料についての容量毎のインプットも与えた。本発明者らがGUIDE-Seqにより評価した、切断gRNAにより誘導される3つのRGNのオンターゲットおよびオフターゲット部位のマッピングリードを示す。全ての場合において、標的部位配列をx軸の左側のプロトスペーサー配列および右側のPAM配列と共に示す。Illumina Miseq Reagent Kit V2によるシーケンシングのためのIlluminaの標準的なプロトコルに従い、ライブラリーを変性させ、Miseqにロードする（300サイクル（ 2×150 bpのペアエンド））。図154は、代表的なGUIDE-Seq実験のデータを示す。この実験ではTCRトランス遺伝子を使用した。当業者は、他のトランス遺伝子（例えば、がん遺伝子）も使用し得ることを容易に理解するであろう。

【表12】

表12. PD-1、CTLA-4、AAVS1、またはCISH遺伝子をターゲティングする修飾gRNAの配列表

配列番号	gRNA	5'~3'の配列
154	PD-1 gRNA #2	gcctgctcgtggtgaccgaagguuuuagagcuagaaauagcaaguua aaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucg gugcuuuu
155	PD-1 gRNA #6	gacggaagcggcagtcctggcguuuuagagcuagaaauagcaaguuaa aaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggg gcuuuu
156	CTLA4 gRNA #3	gctagatgattccatctgcacguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaa uaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugc uuuu
157	CTLA4 gRNA #2	gtgcggcaacctacatgatggguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaa uaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugc uuuu
158	CISH gRNA #2	gggttcattacggccagcggguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaa uaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugc uuuu
159	AAVS1	gtcaccaatcctgtccctagguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaa uaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugc uuuu

【表 13 - 1】
表13.ベクター構築物

配列番号	構築物	5' ~ 3' の配列
174	pPBSB-Cagg-RTreporter (Puro)()	gtggcacttttcggggaatgtgcgcggaacccctattgtttatttttaaatacattcaaatatgtatccgctcatg agacaataaccctgataaatgttcaataatattgaaaaaggagagatgagattcaacatttcctgtcgcctt attccctttttgcggcattttgcttctgtttttgtcaccagaaacgctggtaagtaaaagatgctgaagatc agttgggtgcacgagtggtttacatgaactggatctcaacagcggtaagatcctgagagtttgcggcgaag aacgtttccaatgatgagcacttttaaagttctgtatgtggcgcggtattatccgattgacgcccggcaagag caactcggcgcgcatacactattctcagaatgacttgggtgagtactaccagtcacagaaaagcatcttacgg atggcatgacagtaagagaattatgcagtgtgtccataaccatgagtataacactgcggccaacttacttctgac aacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttg ggaaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgctgctgtagcaatggcaacaac gttgcgcaactattaactggcgaactacttactctgcttccggcaacaattaatagactggatggaggcggat aaagtgcaggaccacttctgcgtcggccttccggctgctggtttattgtctgataaatctggagccgggtgagc gtgggtctcgcggtatcattgcagcactgggcccagatggtgaagccctccgtatcgtagtattctacacgacgg ggagtgcaggcaactatggtgaacgaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattggtaac tgtcagaccaagtttactcatatatacttttagattgattaaaactcatttttaatttaaaggatctaggtgaagatcct tttgataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagtttctgctcactgagcgtcagaccctgtagaaaagatcaa aggatcttcttgagatcctttttctgcgcgtaatctgctgcttgcacaacaaaaaacaccgcctaccagcgggtgt ttgttgcggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaactg tcttctagttagcctgtaggttagccaccacttcaagaactctgtagaccgcctacatacctcgtctgctaacc tgttaccagtggctgctgacagtggtgataagtcgtgtcttaccgggttggaactcaagacgatatgaccggataa ggcgcagcggctgggctgaacgggggggttctgtcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaac tgagatacctacagcgtgagctatgagaagcgccacgcttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccgg taagcggcagggctgggaacaggagagcgacgagggagcttccagggggaacgcctggtatctttatagtc ctgtcgggtttcggccactctgacttgagcgtcgattttgtgatgctcgtcaggggggaggcctatggaaaaa cgccagcaacgcggccttttacggttctgctgcttctgctgcttctgctcacatgttcttctgctgtatccctg attctgtggataaccgtattacgcctttgagtgcgtgataccgctcgcgcagccgaacgaccgagcgcagc gagtcagtgcagcaggaagcgggaagagcgcccaatacgcgaacgcctctcccgcgcttgccgattcatt aatgcagctggcacgacaggttccgactggaaagcgggcagtgagcgaacgaattaatgtgagttagctc actcattaggcaccccaggctttacactttatgcttccggctcgtatgtgtgtggaattgtgagcggataacaattc acacaggaaacagctatgacatgattacgccaagcgcgcgcgggtaactcacgggtatccatgtccatt tctgcggcatccagccaggataccgctcctgctgacgtaatatccagcgcgcaccgctgctaataatctgca caccggcacggcagttccggctgtcgcgggtattgtgggtgtgatgcgcttccggctgaccatccggaact gtgtcgggaaaagccgcgacgaactggtatccaggtggcctgaacgaacagttaccgtaaaaggcgtgcat ggccacacctcccgaatcatcatgttaaactgtgcttctgctcaacgtcaatgcagcagcagtcattctcggca aactcttccatgcccgttcaacctcgcgggaaaaggcacgggcttcttctcctccgatgccagatagcgcag cttgggcgatgactgagccggaaaaaagaccgacgatatgatcctgatgcagctagattaaccctagaagat agtctgcgtaaaattgacgcatgcattcttgaatatgtctctcttctaaatagcgcgaatcctgctgtgcattt

10

20

30

10

20

30

40

【表 13-3】

配列番号	構築物	5' ~ 3' の配列
		aagctgggtgtgtatgtatctggagggcaggctggagctctcagctcactatgggttcatttattgtctcttcat ctcatcaggatgtcgaaggcgaaggcaggggggcgcccttggtcacgcggatctgcaccagctggtgccg aacaggatgttgccttgcgcagccctccatgtggaacacgtgtgttccaccacgcccaccaggttcacctga agctcatgatctctgcagggcggtgttcttcaggatctgtctcaccatgtgaattctcagacacctgaat ggaagaaaaaactttgaacctgtgtgaggtgagaatgaaccaagatccaaactcaaaaaggcgaattc caaggagaattacatcaagtccaagctggcctaactcagctccaccactcagtggtgggaaactccatcgc ataaaaccccccccccaacctaaagacgactactccaaaagctcgagaactaatcgagggtcctggacggc gcccgggtactccgtggagtcacatgaagcgacggctgagggacgggaaaggcccttttcttgggtgactca cccgccgctctcccgagcgccgctctccattttagctccctgcagcaggggcgagggaagcgccatttctc cgctcacgcaactggtgccgaccgggacagccttgcggccaggggcgggcgatacaggcgcgcgagg ccaggcaccagagcaggccggccagcttgcagactacccccgtccgattctcgttggccgctcgcaggccc cgctcgcgaacatgtgcgtgggacgcagggccccgtcgcggcccgcccaaaaaccgaatacc agtgtgcagatcttggccgcatttacaagactatcttgcagaaaaaagccttgcagaaaaaagcgtcgca gcaggtcatcaaaaattttaaattgctagagactatcgaaagcagcgagacaggcggaaggtgccaccagat tccgcacgcggcgccccagcgcccaggccaggcctcaactcaagcacgaggcgaaagggtctcctaagcg caaggcctcgaaactctccaccacttcaaccgaagctcgggatcaagaatcacgtactgcagccaggggc gtggaagttaattcaaggcacgcaaggccataaccgtaagaggccaggcccgcggggaaccacacaggc acttacctgtgttctggcgcaaacccgttgcgaaaaagaacgttcacggcgactactgcacttatataggtctc ccccacctcgggaaaaagcgaggccagctacacgacatcatttccagtttaccggcgccaccttctctag gcaccgggtcaattgccgacctctccccaacttctcggggactgtggcgatgtgcgtctgccactgacg ggcaccggagcctcacgcatgctcttccacctcagtgatgacgagagcgggcggtgaggggggcgggaac gcagcgatctctggttctacgttagtggagtttaacgacgggtccctgggattcccaaggcaggggcgagtc ctttgtatgaattactctcagctcgggtcgggcggttgggggggtgtgacggggaggccgcttgaag ggaggtgcagaatcttcccttaccattgtggttagctccaaaggtgtattgagattagggtgtaccttgcctc tcaatcagcctccgctcctcagccttgcctatctcgtagtcgggacaaatccctagagcgtcttctctcgggt ctcagcccagcccgggttggctctcctcgcggcccggttccgcggccctccgtgtggcaaggagtaccag gcccggggaccggagggtgtggggcgaaagggtcgggactggggcgctcctaaccggtcacggacttgc gagaggttcggctcgatggcggtgaaagcgacgaatcgctcctgtgtggtccttggctccttccattcaag ccagctgctttatggaagccgtaacacgtcatctccctggtactccagatgtccaggcttccagtttagaatag actcagctcactagtttagctttagatcaattctagttttgtacgcaaaaagtctcgcagtggtgtgtgtgctc atgtgtacttttaataaagggtgtacagttattgattgcaaacataaggaaacctaaatgctttcagatttccat gatctcatgtagaggctaaatctacagcatcagcaagttatccaccagtttccaaacccaaactgtcatga agtacacgcttctctatttaataaaggctctattatatttaataaagtgtgtctgttctgtatcctatcgattgaact gcattttagcataaattagggcaagattggatgagctggcccttttggatggtatcaaggcaggccttgggaaa tgctcctctgaggaaagaagacgtttatttttaagctaaacttagatcattatgtttcttccagctgtagaat atcattgccagcttctcgaacaaactatttataaagaattttgagaacctactatgtggccaacgtaagtac ctgcaggcatgcaagctgagcctattctaccaccacttgtacaagaagctgggtgatctagaggcccgcg ttcgaaggtgaagcctatccctaaccctcctcgtctcgattctacgcgtcagggtgcaggctgctcatcagaaggt gggtgctgtgtggcgaatgcctgtgctcacaataaccactgagatcttttccctctcgaataattatggggac atcatgaacgcagtgaaaaaattgtttattgtgaaattgtgatctattgtttattgttaaccattataagctgcaa taaacaagttctcgagaagttcctattctctagaaggtataggaactctggtctgcagggtcgtgaaattctaccgg gtaggggaggcgcttttccaaggcagctctggagcatgctttagcagccccgctgggcacttggcgctacac aagtggcctctggcctcgcacacattccacatccaccggtaggcgccaaccggctcgttcttgggtggccctt cgcgccaccttctactcctcccctagtcaggaagttccccccgccccgcagctcgcgtcgtgcaggacgtgac aatggaagtagcacgtctcactagctcgtgcagatggacagcaccgctgagcaatgggaagcggttaggcctt tggggcagcgccaatagcagcttggctccttgccttctggtgctcagaggctgggaagggtgggtccggg ggcggtcagggggcggtcagggcgggcgggcgccgaaggctcctccgaggccggcattctgca cgcttcaaaagcgacgtctcgcgtgttctctctctcctatctcgggcttctgacctgcatcatctagatc tcgagcagctgaagcttaccatgaccgagtacaagccacgggtgcgctcgcacaccgacgacgtcccca gggcccgtacgcacctcgcggcggttgcggactaccccgccacgcggccacaccgtcatccagaccgce acatcgagcggttcaccgagctgcaagaactctcctcacgcggtcgggtcgcacatcggaaggtgtgggt cgcgagcagcgcgagctggcggtctgacacgcggagagcgtcgaaagcgggggcggtgttctgc gagatcgcccgcgcatggcggtgagcgttccggctggcgcgagcaacagatggaagcctcctg gcgctcgaccggcccaaggagccggtgttctggtccaccgtcggtctcgcggccgacaccaggcgcaa gggtctgggcagcgccgtctgctcccgagtgaggcgggcgagcgcgcggggtgcccgtctctg agacctccgccccgcaacctcccttctacgagcggtcgtggttaccgtacccgacgtcaggtgccc cgaaggaccgacgttgggtcatgaccgcgaagcccggtgctgacgcccccaagaccgcagcg

10

20

30

40

10

20

30

40

【表 1 3 - 5】

配列番号	構築物	5' ~ 3' の配列
		cctgtggcccacgacaccaactaatgttgtaaccgactcagcttctgtagctaaaatgctcctgaaaatgggcccag gaagggggtcccatccactgcagctgcattatccttgaagacgcactcagccaaaggtcagcaatggctgcggt gctccatgtgcggtcccatccgaagtacctgtttctttacagagggaatgatgtgcgactctcaagcaacc ttccaggcgtatcctcttaggggaagctaaagacctccatacagctctcatataggctcagagctctgagcaagg cgtgtaattatgcatgcagcaagctaggagggtcgtccagacatgtccacactgtaactccgcacctgcccctcg aggcaggggttaaatccgaggggttggggccgctccagatctggcaactgattcacgttggaaaccaaggat ggctccgcgagttggctggcagtaaccgttagacacagcgtcttctgcaattgttgaactcagcatggccgct gactagcgtggccgagcagcatcactgggcaacggctatagcggctcctggagcactaaagcaataaagac ggacaatggcagttgtttactcaaatcaaccagagagtggtcgtcgtagggtgggcatagcacacacgactgg aatccccgtaataagccaagggcaggctatgtagagagagcaaatcgactgctcaagataagatccgggtc cttctgaaggggacggctttatgaagcggataccaactagtaaacaggagaactcttgaaggccatgtac gogctcaatcatttgaacgaggggaaatactaaaacccgatccaaaacactggcgacctaccgttggacg gagggacctccagtaaaaatcaggattgagacggcgagtggtggaaaaaggttggaaactgctggtctggggg cgagggtatgtgcagtaaaaaacagagacactgacaaagtaataatgggttccatctcgcaagggtlaaacggga catcgtctaaaagatgaagtgaacaaaaaacgaagcgtcaccactctttgcataatgaacccatagtactg gatatgttgttttacagtattatgtagtctgtttttatgcataaactaatttaataatattgatatattatattacgtt tcgttcagcttctgtacaaagtgtgtgatctagaggcccggttcgaaggtaagccatccctaacctctctct cggctcgtgattctacgcgtaccgggtcatcatcaccatcaccattgagtttaaacccgctgacagcctcgactgtc cttctagttgccagccatctgttgtttggcccctcccgtgcttctgacctggaagggtccactcccatgtcc tttctaataaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtgggggtggggcag gacagcaagggggaggttgggaagacaatagcaggcatgctggggatgcggtgggctctatgcttctgag gcccgaagaaccagctgggctctagggggtatcccccagcgcctctgtagcggcgcatgaagcgcggcggggt gtggtgtgtacgcgcagcgtgaccgtacacttgcagcgccttagcgcggcctcttctgcttcttcttcttctt ctgcccacgttgcggcttcccgtcaagctcaaatcgggggtcctcttaggggtccgatttagtgccttaacg gcacctcgaccccaaaaacttgattaggggtatggttcacgttagtggccatcgccctgatacaggttttctgc ccttgacgttggagtcacgttcttaatagtgactcttgttccaaactggaacaacactcaacccatctcggct attctttgattataagggttgcgatttcggtctattgttgaataaagagctgatttaacaaaatttaacgcga attaattctgtggaatgtgtgtcagttagggtgtgtggaagtcgccaggtcggcagcaggaagtatgcaag catgcatctcaattagtcagcaaccatagtcggcccttaactcggccatccggcccttaactcggcctggttccgc tgcattctcggcccatggtgctgactaattttttatgtatgagagcggcggcctctgctgctgactatccag aagtagtgaggaggttttttgaggcctaggttttgcataaagctccgggagctgtatataccatttccgatct gatcaagagacaggtatgaggttcgtcatgattgaacaagatggtatgcacgaggttctccggcggcttgg gtggagaggctattcgtatgactgggcacacagacaatcggctgctgtagcggcgtgttccggctgtca ggcagggggcggccgttctttgtcaagaccgacctgtccgggtccctgaatgaactgcaggacgaggcag cggcggtatcgtggtggccacgacggcggtccttgcgcagctgtgctgcagctgtgactgaagcgggaag ggactggctgtattggcggaagtgcggggcaggatctctgctatctcaccttgcctcgcgagaaagtatc catcatcgtgatcaatgcggcggtgcatagcgttgatccggctacctgcccattcgaccaccaagcgaac atgcacgcagcagcagcgtactcggatggaagcgggtctgtcgtatcaggatgatctggacgaagagcatcag gggctcgcggccagcgaactgttgcaggtcgaagcgcgcagctcccgacggcgaggatctcgtcgtgacc catggcgatgctgtgcccgaatatcatgttggaataatggcggcttttctggattcatcactgttggcggctgg gtgtggcggaccgctatcaggacatagcgttggctacccgtgatatgtgaaagcgttggcggcgaaatgggt gaccgcttctcgtgctttacgggtatcggcgtcctcgattcgcagcgcacgccttctatgccttcttgcaggttc ttctgagcgggactctgggttcgcgaatgaccgaccaagcgcagcggcccaacctgcatcagagatttcgatt ccaccgcggccttctatgaaagggttgggttcgggaatcgttttccgggacgcccgtgtagatcctccagcgcg gggatctcatgctgggttcttgcgccaccccaactgtttattgcagctataatggttacaaataaagcaatagca tcacaaatttcacaaataaagcatttttactgcattctagttgtgtttgttccaaactcatatgtattatcatgtc tgtataccgtcgacctctagctagagcttggcgtaatcatggtcatagctgttctcgtgtgaaattgtatccgtca caattccacacacatacagagcgggaagcataaagtgtaaagcctgggggtgcctaatgagtgaactaacaca ttaattgcgttgcgtcactgcccgttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaac gcgcggggagaggcgggttgcgtattggcgcttctcgttctcgtcactgactcgtcgtcgtcgtcgttctc ggctgcggcgagcgggtatcagctcactcaaaaggcggtaatacgggtatccacagaatcaggggataacagg aaagaaatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaacgttaaaaggccggttgcgttcttccat aggctccgccccctgacgacacacaaaatcgcgcctcaagtcagagggtggcgaacccgacaggacta taaagataccaggcgttccccctggaagctccctcgtgcgtctcgttccgacctgcccgttaccggatacc tgtccgcttctccttccgggaagcgtggcgcttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtagtgcg ttcgtcctcaagctggcgtgtgtgcagcaacccccgttcagcccgaccgctgcgcttaccggtaactatcgtct

10

20

30

40

【表 13 - 6】

配列番号	構築物	5' ~ 3' の配列
		tgagtccaaccggtaagacagactatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcagg tatgtaggcgggtctacagagttctgaagtggtggcctaactacggctacactagaagaacagtatttggtatctg cgctctgctgaagccagttaccttcggaagagtggttagctcttgatccggcaacaaaccaccgctgtag cgggtgttttttttgaagcagcagattacgcgagaaaaaaggatcagaagatcctttgatctttctac ggggtctgacgctcagtggaacgaaactcacgttaagggaatttggtcatgagattatcaaaaggatctcacc tagatccttttaattaaaaatgaagtttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaaccttggtctgacagttaccaatg cftaatcagtgaggcaccatctcagcgatctgtctatttcgttcacatagttgctgactccccgctgtagata actacgatacgggagggttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctc cagatttatcagcaataaacccagccagccggaaggccgagcgcagaagtggctgcaacttatccgcctcc atccagctctattaattgttgcgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgaacgttggccattg ctacaggcatcgtgtgtcagcgtcgtgttggtaggttcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagtt acatgatccccatgttgcgaagaaagcgggttagctcttcggtctcgcagctgtgtcagaagtaagtggccg cagtggtatcactcatgttatggcagcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaagatgctttctgtgact ggtgagtagtcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctctgcccggcgtaaacgg gataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtctcattggaacacgttctcggggcgaacacacacac ggatcttaccgctgtgagatccagttcgatgaacccactcgtgcacccaactgatcttcagcatctttacttcac cagcgtttctgggtgagcaaaacagggaaggcaaatgcccgaaggaaggaataaggcgacacgggaat gtgaatactcactcttcttttcaatattatgaagcattatcaggggtattgtctcagagcggatacatattga atgtatttagaaaaataaacaataggggtccgcgcacatttcccgaagtgccacctgacgtc
176	AMVsmall pcDNA Dest40	gacggatcgggagatctcccgatccccatgtgtgactctcagtaaatctgctcgtatgccgcatagtaagcca gtatctgctccctgctgtgtgttgagggtcgtgagtagtgcgcgagcaaaatgaagctacaacaggcaaggc ttgaccgacaattgcatgaagaatctgcttaggttagggcttttgcgtgcttcgcgcatgtacgggccagataac gcggtgacattgattatgactagttatfaatgaatcaatcacgggtcattagttcatagcccataatgaggtcc gcggtacataacttacggtaaatggcccgctgctgacgcgccacgacccccgcccattgacgtcaataatga cgtatgttccatagtaacgcaatagggacttccattgacgtcaatgggtggagtagttacggtaaaactgccac ttggcagtagacatcaagtgatcatatgccagtagccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgctggc attatgccagtagacatgaccttatgggacttctcacttggcagtagatctacgtattagtagcgtattacatgggtg atgcgggttttggcagtagacatcaatggcggtgtagcgtttgactacggggatttcaagctccacccattg acgtcaatgggagttgttttggcaccacaaatcaacgggacttccaaaatgctgaacaactcggccccattgac gcaaatggcggtgtagcgtgtacgggtggaggtctatataagcagagctctctggctaactagagaacccactg ctactggcttatcgaataatacagactcactatagggagaccaagctgctagttgaagctatcaacaagtttga caaaaaagctgaacgagaaacgtaaaatgatataaatatcaatataatgaattagatttgcataaaaaacagacta cataactgtataaacacaacatataccagtcactatggctgcccacatggactcaaaagcagtagcagacaagag cagggctgaccccaagaagaagaggaaggtgactgttgcgtccatcttgcgataccgtgaagtggaaacgg aatcacactcctgtgtggatcgaccagtgccactcccagaagggaactggtagcgtgacacaactgtgcgaa aaggagcttcaacttggccatatagaacctagtgttctgttggaaactcctgtgttgcacaggaagggctcc gggagttatcgctgttcacgacctcgagctgttaatgcaaaactcgtacccttggcgcggtgcaacaaggg gctccagttttagtgcatgctcgggggtggccgcttatgtcttggatcgaaggattgttttttagtatacctct ggcagagcaggatagagaggcctttgcttcacgcttctcagtgacaacacaggctccggccaggcggttcc aatggaaggttttcccgaaggatgactgtctcccgacgatatgcaactgacgtggccagatactggaac cactccgattgaagcacccttcttgcgcatgctccattacatggatgaccttgttggcgccagctcccatgac ggtctggaggcgcggtgaagagtgataagcaccctgggaacgagcgggattcacaatcagcccgacaa agtgcaagagagcccggagtcgaatctgggctacaagtgggttccacatacgtcgccctgtagccctgtg agcggaaaccgcgattgccacgttgtggatgtgcaaaaactcgttgatcttccaatggttgcggccgact ggggtatccaccagactgaggttcattctatgaacaactgaggggctctgacccgaatgaggcgcggggaat ggaatttggacatgaagatggcgtgcgcggaatagccaacttcaacaacggcggtcttgaaacgctgggat cctgccttgcgctgaaggcgtagccaggtgcgagcaggggagataggagtggtgggacaagggtctca gcacacaccgaggccgtgctgtgttgcagtagtcaacctacgaagcctttacagcatggtggaagtctct cacctgttgattacaaaactcagagcatctgcccgcaggaccttcggcaagggaagtagatacttcttctcccg cctgcttccggaagaccttcactgcccagagggaatactgcttgattgagggttttgcggtaagatccggtc cagcgatactccgagcatattgacatcgtagacctctcaggtctcactcaaggttcgctgactgaccacca gttccgggacccacgattacacgatgtagtagtagcactcataaagggttagtctgctggtgggaaggacc tgcgtgggagataaaggaaatagcagacttgggtccagcgtgcaacaactggaggcccgggcggtgcgat tggcactcctttgtggcaaacaccccgacgaacgtagttacagattcagcttctgtagcgaatgttggaaaa ttgggtcagggaaggtgtcccttccactgcccgcagcattcatattggaggatgcccagtagcaagaagtgcgaatg ccgagttctcagctgcgatccatagcgaagtacctggctttttactgagggcaatgatgtgctgactcacag gctacatttcaggcttattaatgaacccatagtagtggatattgtgttttacagttatgtagtctgtttttatgca

10

20

30

40

【表 13-8】

配列番号	構築物	5' ~ 3' の配列
		tcgtgcacccaactgactctcagcatcttttaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatg ccgcaaaaaagggaataaggcgacacggaaatgtgaatactcatactcttcttttcaattattgagcattt atcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaaatgatttagaaaaataaacaatagggttccgcgcacat ttccccgaaaagtgcacctgacgtc
177	HIVp51 pcDNA Dest40	gacggatcgggagatctcccgatcccctatggtgactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagcca gtatctgctccctgcttggtgtgagggtcgtgagtagtgcgcgagcaaaattaaagctacaacaaggcaaggc ttgaccgacaattgcatgaagaatctgcttaggttaggcgtttgcgctgcttcgcatgtacgggccagatatac gcgttgacatgattattgactagtattataatagtaataaattacggggctcattagttcatagcccatatattgagttcc gcgttacataacttacggtaaatggccgcttggtgacggcccaacgacccccgccattgacgtcaataatgga cgtatgttcccatagtaacgcaataggactttccattgacgtcaatgggtggagttattacggttaaaactgccac ttggcagtagacaaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggccgcctggc attatgccagtagacattatgggactttcctacttggcagtagacatctacgtattagtcacgtctattaccatggg atgcggttttggcagtagacatcaatggcggtgtagagcggttgactcaggggatttccaaagtctccacccattg acgtcaatgggaggtttgtttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgaacaactccgccccattgac gcaaatggcggttaggcgtgtacggtgggaggtctatataagcagagctctctggctaactagagaaccactg cttactggcttatcgaaatatacagactcactataggggagaccaagctggctagttaagctatcaacaagttgta caaaaaagctgaacgagaacgtaaaatgataaaatcaatataaattagattttgcataaaaaacagacta cataaactgtaaaacacaacatccagtcactatggctgcccacatggactacaagacgtagacgacaagag cagggctgacccaagaagaagagggaaggtgccaatctcaccatcgaaacagtcccccgtgaactcaagcc gggtatgtagtgccggaagggttaagcaatggcccttgactgaggaaaaataaaggcgctcgtagagatagc acggaaatggagaaaggagggaagataagcaagattggcccagagaatccctataatcccccggttttcgcat aaagaagaaggactcaaccaaatggcggaactgttagattttcgggaacttaataagcgaaccaagactctg ggagggtcaacttggcattccgcatcccgcgggtttgaaaaagaagaatcagttacggtgcttgacgttggcga cgcttattttagcgttctcttgacgaggacttttagaaaatacacagccttcacaataccaagtatttaacaacgaga caccgggaatccggtatcaatacaacgtgctccccaaggatggaaagggtctccagcaattttcagctagcat gaccaaaatcttggaactttccgcaagcagaacccggatattgtattatcagtagatgacgtttatgtcgt tcagatcttgaaattggtcagcaccgaacgaagatagaggaaacttcgacagcactgttgcgctgggtcttcaa ccccagacaaaaaacaccagaagggaaccacttttcttggatgggttatgaacttcaccagataagtggaaccg tgcaagccattgtcttgcggaaaaggactcctggacagtaaatgataatcagaagctcgttaggaaaactgaattg ggcaagccagatataccaggtattaaaggtaaggcaattgtgcaaaacttttgcgggcacgaaggcacttactga gggtataccactgactgaagaggcggtgactgaactcgcagagaatagagaataactcaagggaaccggtacatg ggctatactatgatacgaagtaaggatttgattgaggagattcagaacagggtcagggaacatggacgtaccaaa tttaccagaacctttcaaaaatcttaagacgggaaagtatgcacgaatgcggcgccacatagcaatgatgca agcagttgactgaagcagtagagaagattacaacgaaatctatcgttataatgggaaagactcccaaatttaagct cccaatacaaaaagaacttgggagacctggtggacgcaatattggcaggcgacatggataccggagtgga ttgttaacacaccccgctggttaaagtgtggtatcagctcgaaaaagagccaattgtgggagcagagacgttct aatgaaccatagtgactggatattgtgtttacagtattatgtagtctgtttttatgcaaaatctaattataattg atatattatcattttacgtttctcgttcagcttctgtacaaagtgttgatctagaggggccgcggttcgaaggtaa gcctatccctaacctctcctcgggtcgtgattctacggtacccggtcatcatcaccatcaccattgagttaaaccg ctgatcagcctcgtgcttcttagttgacagccatctgtttgttgcctcccccgtgcttcttacccttga agggtccactccactgtcttctcctaataaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctg gggggtgggtggggcaggacagcaaggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggatgcgg tgggctctatgcttctgaggcggaagaaccagctggggctctagggggtatcccacgcgcctgtagcgg cgcaatagcgcggtggtgtgtgttacgcgcagcgtgaccgctacactgacagcgccctagcgcccgt ccttctgctttctccttcttctcgcacgttccggttccccgtcaagctcaaatcgggggtcctttagg gttccgatttagtctttacggcacctcgcaccccaaaaactgattagggtgaggttcacgtagtgggccatcgc cctgatagacggttttccctttgacgttggagtcacgttcttaatagtgagactctgttccaaactggaacaac actcaaccctatctcgtctattctttgattataagggaatttgcgatttcggttggtaaaaaatgagctgat ttaaaaaaattaacgcgaattaattctgtggaatgtgtcagttagggtgtggaagtccccaggctccccagc aggcagaagtatgcaagcatgcatcctaattagtcagcaaccatagtcggcccttaactccgccatcccgccc ctaactccgccagttccgccattctccgcccatggctgactaattttttattatgagaggccgagggccgccc tctgctctgagctattccagaagtgtgaggaggctttttggaggcctaggcttttgcataaaagctcccgagg ctgtatataccatttctgcatcaagagacaggatgaggtatcttcgcatgattgaacaagtgtgattgac gcaggttctccggcggttgggtggagaggatttcggctatgactgggcacaacagacaatcggctgctctgat gcccgcgttccggctgtagcgagggcgcccgttcttttgcagaccgacctgctccggtgccctgaat gaactgcaggacgaggcagcgcggtatcgtggctggccacgacggcggttcttgcgagctgtgctgcac

10

20

30

40

【表 13-9】

配列番号	構築物	5' ~ 3' の配列
		gtgtctactgaagcgggaaggactggctgtatfaggcgaagtgcggggcaggatctctgtatctacatt gctcctgcgagaaagtatccatcatggctgatgcaatgcggcggctgcataccttgatccggctacctgccca ttcaccaccaagcgaacatcgcacgcagcagcagctactcggatggaagccggctctgtgatcaggatga tctggacgaagagcatcaggggctgcgccagccgaactgttcgccaggctcaaggcgcgatgccgacgg cgaggatctcgtcgtgacccatggcgtatgctgtccgaatatcatgtggaaaatggccgctttcttgattc atcgactgtggccggctgggtggtggcggaccgctatcaggacatagcgttggctacccgtgatattgctgaaga gcttggcggcgaatgggtgaccgctcctcgtgttctacggtatcgcgcgtcccgattcgcagcgcacgccttc tatcgcttcttgacgagttctctgagcgggactctgggttcggaatgaccgaccaagcgcgcccacact gccatcacgagatttcgattccacgcgccttctatgaaggttgggttcggaatcgtttccgggacgcgggc tggatgatctccagcgcggggtatcctgctgagttcttgcgccaccccaactgtttattgagcttataatgt tacaataaagcaatagcatcacaatttcacaataaagcattttttcactgcattctagtgtgtgttgcacaaact catcaatgtatctatcatgtctgtataccgtcgaccttagctagagcttggcgtaatcatggtcatagctgttctg tgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacatacagcgggaagcataaagtgtaaagcctgggggtccta atgagtgaactaactacattaattgcgttgcgtcactgcccgtttccagtcgggaacactgctgtgccagctg cattaatgaatcggccaacgcggggagaggcgggttgcgtattggcgctcttccgcttctcgtcactgact cgctgcgtcgtgctgctgcggctgcggcgagcgggtatcagctcactcaaaggcggtaatacgggtatccacagaa tcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccagggaaccgtaaaaggccg cgttgcgtgcgtttttccataggctccgccccctgacgagcatcaaaaaatcgacgctcaagtgcagaggtggc gaaacccgacaggactataagataccaggcgtttcccttggaagctcctcgtgcgtctcctgttccgaccc tgccgttacccgatacctgtccgcttctccttcgggaagcgtggcgcttctcatagctcacgctgtaggatc tcagttcgggtgtaggtcgttgcctcgaagctggcgtgtgtgcagaaacccccgttcagcccagaccgctgcgcct tatccggtaactatcgtcttgagtcacaacccggtaagacacgacttatgccactggcagcagccactggtaaca ggattagcagagcggaggtatgtaggcgggtctacagagttctgaagtgtggcctaactacggctacacatagaa gaacagtaattgtgtatcgtcgtctgtgaagccagttaccttcggaaaaagagttgtagctcttgatccggcaaa caaaccacgcgtgtagcgtgtgtttttgttgcagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatcgaagaa gatcctttgatctttctacggggtcgtacgctcagtggaacgaaaactcacgtaagggtatttggctatgagattat caaaaaggatcttcacgtatccttttaaatataaagtttaaatcaatcctaaagtatatgagtaaaacttgg ctgtacaggtacaaatgcttaacagtgaggcacctatctcagcgtatctgtctatcttctgttcacatagttgcctgact ccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagacc cacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagcgggaaggcgcgagcgcagaagtgtgtcctgc aaccttatccgctccatccagttcttaattgttgcgggaagctagagtaagtgttcgccaagttaagtgttgcg aacgttgttgcctacagcagcgtgtgtcagctcgtctgttgggtatggcttcaatcagctccggttccaa cgatcaaggcggagttacatgatcccatgttgtgcaaaaaagcggtagctccttcggtcctccgacgtgtgca gaagtgaagtggcgcagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaa gatgttttctgtgactgggtgagtaactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgtcttggcc cggcgtcaatacgggataataccgcgcacatagcagaactttaaagtgtcatcattggaacacgttcttgcg ggcgaaaaactcgaaggatctaccgctgtgtgagatccagttcgatgtaacccactcgtgcacccaactgatcttca gcacctttactttaccagcgttttctgggtgagcaaaaacagggaaggcaaaatgcgcgaaaaaagggaataagg gcgacacgggaatgtgaatactatactcttctttcaatattatgaagcattatcagggttatgtctcatgagc ggatacatattgaatgtatttagaaaaataaacaatagggttccgcgcacatttccccgaaaagtgcacactga cgtc
178	HIVp66 pcDNA Dest40	gacggatcgggagatctcccgatcccctatggtgactctcagtacaatctgctctgatccgcatagttaaagcca gtatctgtccctgcttgtgtgttggaggtgcgtgagtagtgcgcgagcaaaatttaagctacaacaaggcaaggc ttgaccgacaattgcatgaagaatctgcttaggttaggcgttttgcgctgcttcgcgatgtacggccagatatac gcgttgacatgattattgactagttatfaatagtaataaattacggggtcattagtcatagcccataataggattcc gcgttacataacttacgtaaatggcccgcctggctgaccgcccacgacccccgccttgcagtcataatga cgtatgttcccatagtaacccaatagggacttccatgacgtcaatgggtggagttatcggtaaaactgcccac ttggcagtagatcaagtgtatcatatccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggc attatcccagtagatgaccttatgggacttctacttggcagtagatctacgtattagtcacgtattaccatgggtg atgcgggttttggcagtagatcaatggcgtgtagcgggttgcactcaggggatttccaaagtctcacccttgc acgtcaatgggaggttgttttggcaccaaaatcaacgggacttccaaaatgtcgttaacaactccgcccattgac gcaaatggcggtaggcgtgtacgggtggaggtctatataagcagagctctctgtgtaactagagaacccactg cttactgtgtatcgaatfaatacgaactcactataggaggagacccaagctggctagttaagtatacaacaagtgtga caaaaaagctgaacgagaaaacgtaaaatgataaataatataaataaattagatttgcataaaaaacagacta cataaactgtaaaaacacaacatatccagtcactatggtcctctatctcctcaatcgaacagtcctccgtcaaatga aacggggaatggacggtccaaaagtcacaatggcctctaccgaggagaagattgaagcattgtgtcgaat ctgcactgagatggagaaaggagggaataatagcaaaatcgggccagagaacccctacaataacccgtattt

10

20

30

40

【表 13 - 10】

配列番号	構築物	5' ~ 3' の配列
		gccatcaaaaaaagatagcactaagtggcgaaagctcgtggactccgcgaactcaataaaagaacccagg atititgggaggtacagcttggcattccgcacccgaggaacttaagaagaaaaatccgtaaccgtgctggatgt ggcgcatgcatactttagcgtaccactggatgaggattttaggaagtatactgcattcacaataccccaataacaa cgaaacgcccaggataagggtaccataataacgtcctccccaaaggctggagggctctccagcgatcttcaggt cttcaatgactaagatacttgagccgttcagggaagcaaaacccgcacatcgttaattaccagtaacgtgacttg tacgtcggtagtgatctcgaattggccagcatcgaaacaaatcgaaggaaatgaggcaacaccttctcgggtgg gggtttgacgacgcccgcacaaaagcatcaaaaagagccgcttctggtggatgggttatgagctccatccgga caaatggacagtcagcccatcgtcttgcagaaaaagatagttggactgtaaatgacattcaaaaattggtcgg gaaattgaactggcgctccagatctatccaggaattaaagtcggcagctttgcaagcttctcgggggaacgaa ggcacttacagaggtcatacccttacggaagaagcggaaattggagcttgcggagAACCGGagatactaaa gagccggtccacgggtctactacgatacctcaagatcttattgcagagattcagaacaaaggcaggggtca atggacatatcagatctaccaagagccgttcaagaattgaagacaggaaagtacgcgaggatgagggcgca catactaacgatgttaaacactcactgaggctgtacaaaagattactacggagtcataatgatatggggcaaaa cacctaagttaagctccgatcaaaaggagacttggaaacctggtggaccgagttattgcaagctacgtgg attcctgagtggaatttgaacacacctccctcgtgaagctgtgtatcaactgaaaaggagccaatagtcg gcgcggagaccttctatgtggacggcgccgcgaaccgagagacaaagctcggcaaggcgggttatgtaacga accgaggtaggcaaaaggtcgaacgttactgatacgaacacaaaacgaactgcaggctatttatctcg cattgcaagactcaggactggaagtcaatatcgtgacggacagtcataatgcaactgggattattcaggcgcaac cggatcagagtgaaagcgagctgtgaaaccaaattattgagcagttgataaaaaggagaaagtgtatcttctt gggtaccagcccataagggtgacggaggtaatgaacaggttgataactgtgaagcgtggaattcggaaagta cttaccatagtgactggatattgtgtttacagattatgtagctgtttttatgcaaaatctaatatattgata tttatatcattttacgttctcgttcagcttctgtacaaagtgtgtatcagagggcccgcggttcgaaggtaac tatccctaaccctcctcgtcgtcgttctacgcgtaccggtcatcatcaccatcaccattgagttaaacccgctg atcagcctcagctgtgcttctaggtgacccatctgtgttgcctcccccgctgcttctcctgacctggaagg tgccactcccactgtccttcttaataaaatgaggaaattgcacgcattgtctgagtaggtgtcattctattctggg ggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggttggaagacaatagcaggcatgctggggatcgggtgg gctctatggcttctgaggcggaagaaacagctggggtctaggggtatccccacgcgcctgtagcggcg attaagcggcggtgtgtgtgtgtacgcgcagcgtgaccgctacacttgcagcgcctagcgcctgtcctt tcgcttctccttcttctcgcacgttcgcggcttccccgtcaagctctaaatcgggggtcctttaggggtt ccgatttagtgccttacggcacctcgcaccccaaaaacttgattaggggtgatgtgttcacgtatgggtccatccc tgatagacgggttttcgcttctgacgttggaggtccacgttcttaatagtgagcttcttccaaactggaaacac tcaacctatctcgtctattcttattgattataagggttttgcgatttcggcctattggttaaaaaatgagctgatt acaaaaatttaacgcgaatttaattctgtggaattgtgtgtcagttagggtgtgaaagtccccaggctcccagcag gcagaagtatgcaaaagcatcctcaattagtcagcaaccaggtgtggaaagtccccaggctcccagcagg cagaagtatgcaaaagcatcctcaattagtcagcaaccatagtcgcccttaactccgcccatccgccct aactccgcccagttccgcccatttccgcccctatggctgactaattttttatattgacagaggccgagggcgctc tgctctgagctattccagaagttagtgaggaggtttttggaggcctaggcttttgcacaaagctccgggagctt gtatatccattttcgatctgatcaagagacaggatgaggatcgtttcgcattgaaacagatggattgcacgca gggttccggcgcttgggtggagaggctattcggctatgactgggcacacagacaatcggtcgtctctgatgcc gcccgttccggctgtcagcgaggggcgcccgttcttttgcgaagaccgacctgtccgggtccctgaatgaa ctgcaggacgaggcgagcgcggtatcgtggctggccacgacggcgcttcttgcgcagctgtgtcgcagctgtg tactgaagcgggaaggactggctgtattgggcgaagtgccggggcaggatctcgtctcatctaccttgc ctgccgagaaagtatccatcatggtgatgcaatcgggcggtgcatacgttgatccggctacctgccattgc accaccaagcgaaacatcgcatcgagcgagcacgtactcggatggaagccggcttctgcatcaggatgatctg gacgaagagcatcaggggctcgcgcagccgaactgtcgcaggctcaaggcgcgcatgcccgcagggcgga ggatctcgtctgacccatggcgatgctgttgcgaatatcatgggtggaattggccgcttctggtgattcatcg actgtggccggctgggtgtggcgaccgctatcaggacatagcgttggctaccggtgatatgtgaagagcttg gcggcgaatgggtgaccgcttctcgtgttctacgggtatcgcgcctccgattcgcagcgcatcgcttctatcg ccttctgacgagttcttctgagcgggactctgggttcgcgaatgaccgacgaagcgacgcccacactgccat cagcagatttcgattccaccgccccttctatgaaagggttgggttcggaatcgttttccgggacgcccgtgga gatcttcagcggggatctcatgctggagttcttgcgccaccccaactgtttattgcagcttataatggttaca ataaagcaatagcatcacaatttcacaaaatgaagcaatttttctactgcattctagttgtgtgttgcacacatca atgtatcttcatgtctgtataccgtgcacctctagctagagcttggcgttaatcatggtcatagctgttctgtgtga aattgtatcgcctcacaattccacacacatcagagcgggaagcataaagtgaagcctgggggtcctaattga gtgagctaactcacattaattgcgttgcgtcactgcccgttccagtcgggaacctgtcgtgcagctgcatta atgaatcggccaacgcgggggagaggcggttgcgtattggcgcttcttccgttctcgtcactgactgcct gcgcctcgtctgtcggctcggcgagcgggtatcagctcactcaagcggtatatacgggttatccacagaatcag

10

20

30

40

【表 13 - 11】

配列番号	構築物	5' ~ 3' の配列
		gggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgctgtg ctggcgcttttccataggtccgccccctgacgagcaacacaaaaatcgacgtcaagtcagaggtggcgaaa cccgacaggactataaagataccaggcggttccccctggaagctccctctgctgctctctgttccgacctgcc gcttaccggatacctgtccgctttctccctcggaagcggtggcgctttctcatagctcagctgtaggtatctcag ttcgggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccgaccgctgcgccttacc cggtaactatcgtcttgagtcaccccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactgtaacaggat tagcagagcgaggatgtaggcgggtgctacagagttctgaagtggtggcctaactacggctacactagaagaa cagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtgactcttgatccggcaaacaa accaccgctggtagcggtgtttttgttgcagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatcagaagaagatc ctttgatcttttctacgggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggaatttggctagagattatcaa aaaggatctcacctagatccctttaaattaaaaatgaagttttaaataatcagaatataatagtaaaactgtgtct gacagttaccaatgcttaactcagtgaggcactatctcagcagctgtctatttcttcatccatagttgctgactcc ccgtcgtgtagataactacgatacgggagggttaccatctggcccagtgctgcaatgataccgcgagaccca cgctcaccggctccagattatcagcaataaaccagccagccggaaggccgagcgcagaagtgtgctcgtcaa ctttatccgctccatccagctatfaattgttgcgggaagctagagtaagtagtgcagtaataagtttgcgcaa cgtgtgtgccattgctacaggcatcgtgtgtgcacgctcgtgttggtaggttcattcagctccggttcccaacg ataaggcgagttacatgatccccatgtgtgcaaaaaagcggtagctccttcggtcctccgagctgtgtcagaa gtaagttggccgcaggttatcactcatgttatggcagcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaagat gctttctgtgactgtgagtgactcaaccaagtcattctgagaatagtgatgcgacgaggtgtcttgcctgg gcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaacttaaaagtgtcatcattggaaaaaggttcttcgggg cgaaaaactcgaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgalgtaaccactcgtgcacccaactgatcttcagc atcttttacttaccagcggttctgggtgagcaaaaacagggaaggcaaaatgcgcaaaaaagggaataaggggc gacacggaaatgtgaatactcactcttcttttcaatattatgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcgg atacatattgaatgtatttagaaaaataaacaatagggggtccgcgcacatttccccgaaaagtgcacactgacg tc
179	MLLV pcDNA Dest40	gacggatcgggagatctccgatccctatggtgcactctcagtacaatctgctctgacgcatagttaaagcca gtatctgctccctgctgtgtgttgagggtcgtgtagtgctgcgcagcaaaattaaagctacaacaaggcaaggc ttgaccgacaattgcatgaagaatctgcttaggggttaggcggtttgctgctgcttcgctgacggccagatatac gctgtgacattgattatgactagttataatagtaataacacgggggtcattagttcatagcccatatattgagttcc gcgttacataactacggtaaatggccgcctggtgacgcgcccaacgacccccgcccattgacgtcaataatga cgtatgttcccatagtaaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagttattacggttaaaactgccac ttggcagttacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatgcccgcctggc attatgccagttacatgaccttaaggactttcctacttggcagttacatctacgtattagtcacgtattacatggtg atgcggttttggcagttacatcaatggcggtgtagcgggttgcactcaggggatttccaaagttccacccattg acgtcaatgggagttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtctgaacaactccgccccattgac gcaaatggggcgttagcggtgacgggtgggaggtctatataagcagagctctctggctaactagagaaccactg cttactggcttatcgaaattaatacgaactcactataggagacccaagctggctagttaagctatcaacaagttgtat caaaaaagcgaacgagaacgtaaaatgataataatacaataatataaattagatttgcataaaaaacagacta cataactgtataaacacacatataccagtcactatggctgcccacatggactacaagacgatgacgacaagag cagggctgacccccagaagaagaggaaggtgggtagtcacatgacatggctgtctgactttcctcaggcatgg gcggaaactggaggtatgggttggcagtcaggcaggctccactattatccctcttaagcaacgtcaacgccg gtttctatcaagcaatccaatgagtcagaagctgcgctgggaatgaagcctcacatacaacgggtgtgtggtatca agggtattctgtgcccgtgccaatctccttggaaatacaccactccttctgtcaaaaaacccggaacaatgactacc gccccgtgcaagaccttgggaagtcataagagggtagaagatattcaccgacccgttccaaatccgtataatc tgtgttcaggactgccaccgtcccatcagttggtatctgtcctgacttgaaggtgctgttcttgcgctcc accctacgtcacagccccgttgcggttcgaatggagagacctgaatgggtatatacagggcagttgacttggga ccagacttccacaagggttcaaaaatagccctactcttttgatgaagccctccacagggacctcgcagatttcag gatccagcaccggacaccttactgtcgtcagtagcagatcttctgctggcgacagcgaactggattg ccagcagggcacgcgagctctcctccagacactgggttaacctgggttacaggcgctcagctaagaaggcaca aatatgccaaaaacaagtgaagtacctgggtatctcctgaagaggggcaacgggtggctcacagaagcccgga aaggagacggtgtagggacaacggacgcttaaaacgccaacgacaactgcgagaattttgggcaccgcccggg ttttccgcttggatccctggcttggcagatggctgctccattgtatccctgactaaaacaggtacgttggta attggggccagatcagcaaaaggcttaccagaataaacaagcgcttctactgctcggcactcggccttcc cggatttgactaagcccttttgagttgttgtagcagaagcagggtatagcgaagggtgttttgacgaagaagct cggcccttggcgacacccgtagcgtattgttctaaaaagctcgaccagtagcgccgggttggccaccatgtct tcggatgtcgtgctcatagcgggttcttaccagacgcggggaactgacaatgggacagcctcttgaataaaa ggcgccgcatgctgttgaagcactgggtgaagcagccaccagatcgatggctgagcaacgcaaggatgacaca

10

20

30

40

【表 1 3 - 1 2】

配列番号	構築物	5' ~ 3' の配列
		ctatcaggccctgcttctcgatacagatagatccaattcggccctgtgttgcttgaaccagctacgcttttgc tctccagaagagggttgcacaacattgcttggatatcttggcagaagcccacggcagcgccggatttgac ggaccagccgttgcggatgcccaccatacctggtatactgacgggtcctcattgctgcaggaggccagcgc aaagctggggcggcagtaactacggagaccgaagtcatttggcaaaagcactgccagcaggacacctgccc cagcggggcgagcttattgcttacacaggcattgaagatggcagaaggaaagaagctcaatgtctataccgga ttcccggtatgcatttgcccagggcgacattcacggcgagatctataggcgaaggaggactgcttacttcgaggg taaggagataaagaataaggatgaaatcctcgcccttcaaaagcccttttttgcgaaacgctgagcataatcc attgccctgtgtcaccaaaaggggcattctgcagaggcgcgaggcaacaggatggcagatcaggctgctaggga aggccgccattacggagacgctgatacagatgacgttgccttaatgaaccatagtgactggatatgtgtgttta cagtattatgtagtctgtttttatgcataaataaatttaataatattgatattatatactttacgtttctcgttcagcttctg tacaagtgtgtgatctagaggcccggttcgaaggtaagcctatccctaaccctctcctcggtctcgattctac cggtaccggtcatcatcaccatcaccattgagtttaaacccgctgacagcctcgactgtgcttctagtgtccagc catctgtgttttgcctcccccgtgcttctcgtgacccctggaagggtccactcccactgtcctttctaataaaatga ggaaattgcacgcattgctgtagtggtgtcattctattctgggggtgggggtggggcaggacagcaaggggg aggattgggaagacaatagcaggcatgctggggtgctggtgggtctatgcttctgaggcggaagaaccag ctggggctctagggggtatcccccagcgccctgtagcggcgcaatgaagcgcgcggtgtgtgtgttacgcgc agcgtgaccgtacacttgcagcgccctagcgcccgctcttctcgttcttcttcttcttctcgcacagctcgcc ggcttcccccgtcaagctctaatacgggggtccttttaggttccgatttagtctttacggcacctcgaccccaa aaaacttgattagggtgatgttcacgtatgtggccatcgccctgatagacggttttcgccccttgacgttgagg ccacgttcttaatagtggactctgttccaaactggaacaacactcaacctatctcggtctattctttgattataag ggatttgcgatttcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatgaacggaatattctgtggaat gtgtgtcagttagggtgtggaagtccccaggtccccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattag tcagcaaccagggtgtggaagtccccaggtccccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagtc agcaaccatagtcggccctaaactccgcccacccgcccctaactccgcccagttccgcccattctcggccca tggtgactaattttttattatgcagaggccgagggcgccctctgctctgagctattccagaagtgtgaggagg cttttttgaggccctaggtctttgcaaaaagctccgggagctgttatatccatttccgatctgataagagacagg atgaggatcgtttcgcagattgaacaagatgattgcacgcagggttccggcgcttgggtggagaggctattc ggctatgactgggcacaacagacaatcggtgctctgatgcgcggtgttccgctgtcagcgcagggggcgcc cggttcttttgcagaagaccgacctgtccggtgcccgaatgaactgaggacgagggcagcgcggtatcgtgtggc tggccacgacggcggttcttgcgagctgtgctgcagctgtgactgaagcggaagggactggtgctgtattg ggcgaagtgcggggcgaggtatcctctgcatctcacctgtcctgcgagaagatcatcatggtgctgatgca atgcggcgctgcatacgttgcagcgtacgtgcccattcgaccaccaagcgaaacatgcagcagcgag cacgtactcggatggaagccggtctgtgctgacaggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgcccagc cgaactgttgcaggctcaaggcgcgcatgcccagggcgaggatctgctgtgacctatggcgatgcctgc ttgcggaatatcatgttggaatggcggcttttctggtattcagactgtggtcggtggtgtggtggcgaccgt atcaggacatagcgttggctacccgtgatattgctgaagagcttggcggaatgggtgaccgtctcctgctgc tttacggatgcggctcccgattgcagcgcacgtcttctatgccttctgacgagttcttctgagcgggactct gggggttcgcgaatgaccgaccaagcgacgcccacactgcccacagagatttcgattccaccgccccttcta tgaagggttgggttgcgaatcgttttcgggacgcccgtggtgatcctccagcgcggggactcatgctgga gttcttcgcccacccaactgtttattgagcttataatgtttacaataaagcaatagcatcaaaatttcacaat aaagcatttttctactgcatctagttgtgtgttgcataactcatcaatgtatcttatcatgtctgtataccgctgacct ctagctagagcttggcgtaatcatggtcatagctgttctctgtgtgaaattgttatccgctcacaaftccacaacat acgagccgggaagcataaagtgaagcctgggtgccaatgagtgagctaacacatttaattgctgtgcgtc actgcccgttccagtcgggaaacctgtgctgcagctgcattaatgaatcgccaacgcgcgggagaggc ggttgcgtattgggctcttccgcttccgctcactgactcgtcgcgtcgttgcgtgctgagcggcgagcgg tatcagctcactcaaggcggtataacgggttatccagaaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagca aaaggccagcaaaaggccaggaaacgtaaaaggccggttgcgttgcgttcttccataggctccgccccctg acgagcatcacaaaaatcgacgtcaagtcagagggtggcgaacccgacaggactataaagataaccaggcgtt tccccctggaagctccctcgtgcgtctcctgttccgacctgcccgttaccggatacctgtccgcttctccttc ggggaagcgtggcgttctcalagctcacgctgtaggtatctcagttcgtgtgtaggtcgttcgctcgaagcgtggc tgtgtgcaggaacccccgttcagcccgacgctgccttatccggtaactatcgtcttgcgtcgaacccggtaa gacacgacttatccactgacgagccacgtgtaacaggattagcagagcgagggtatgtaggcgtgtgtac agagtcttgaagtgtgtgcttaactacggctacactagaagaacagtatttggatctgcgtctgtggaagcca gttaccttgcgaaaaagagttgtgtagctcttgcgtatccggcaaaccaaccacgctgtgtagcgtgtgtttttg aagcagcagattacgctgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacgggctgacgctcagt ggaacgaaaactcaggttaagggtatttgcgtatgagattatcaaaaggatcttcacctagatccttttaattaaa aatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaaccttggctgacagttacaaatccttaacagtgaggcacc

10

20

30

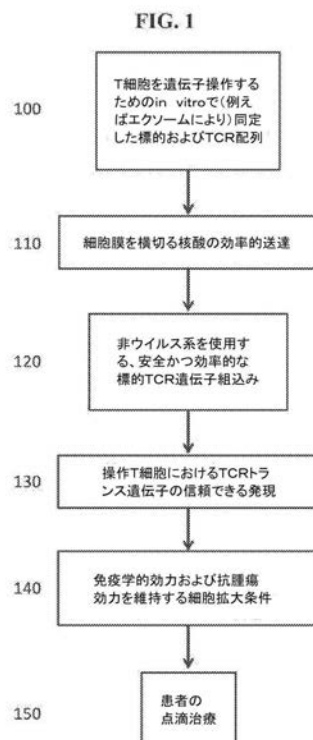
40

【表 13 - 13】

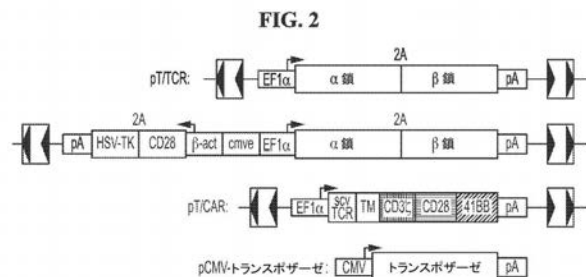
配列番号	構築物	5' ~ 3' の配列
		tatctcagcgatctgtctatttcgttcacatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggaggg cttaccatctgccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaa ccagccagccgggaaggccgagcgcagaagtggctctgcaactttatccgctccatccagctatttaattgtg ccgggaagctagagtaagtagtgcagtttaagtttgcgcaacgtgttgccattgctacaggcatcgtggtgt cagctcgtctgttggtagtgcctcattcagctcgggtcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgtgt gcaaaaaagcggtagctccttcggtcctccgatcgtgtgcagaagtaagttggccgcagtggtatcactcatggtt atggcagcactgcataattctcttactgtcatgccaatccgtaagatgctttctgtgactgggtgagtactcaaccaagt cattctgagaatagtgatgaggcgaccgagttgctcttgcgggcgtcaatacgggataataccgcgacata gcagaactttaaagtgtcatcattgaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgaga tccagttcgatgaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatctttactttaccagcgtttctgggtgagcaa aaacagggaaggcaaaatgcgcaaaaaagggaataaggcgacacgggaatgttgaatactcatactcttctt ttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataacaa atagggttcgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtc

10

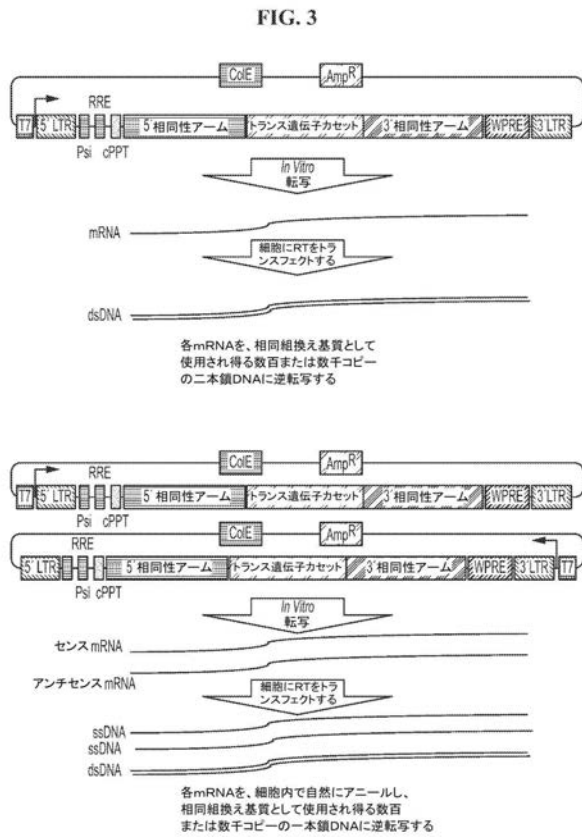
【図 1】



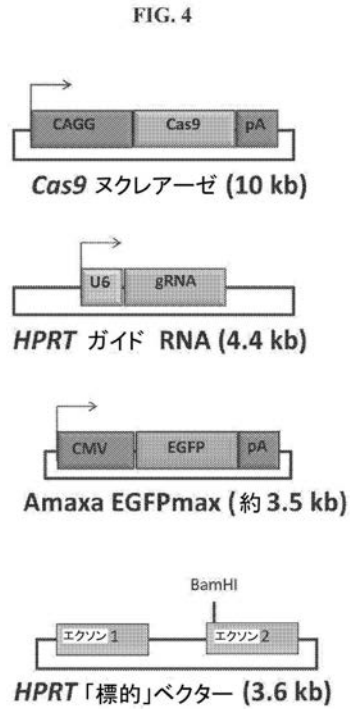
【図 2】



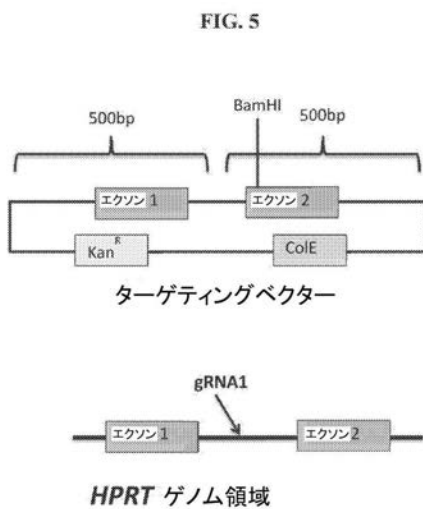
【図 3】



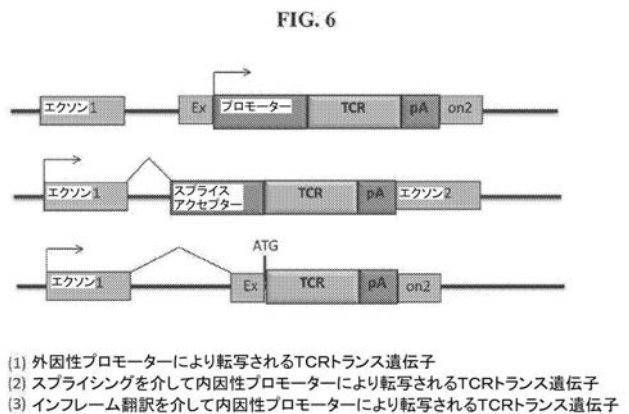
【図 4】



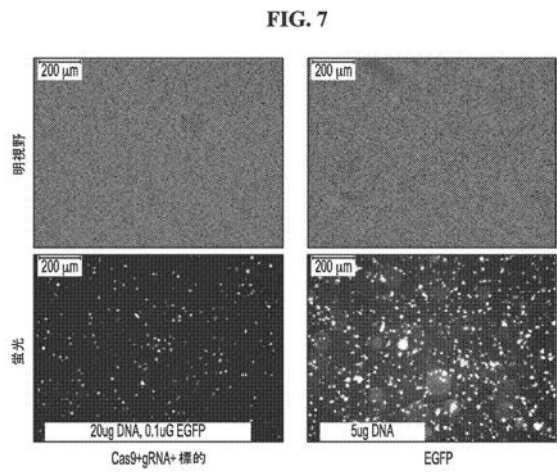
【図 5】



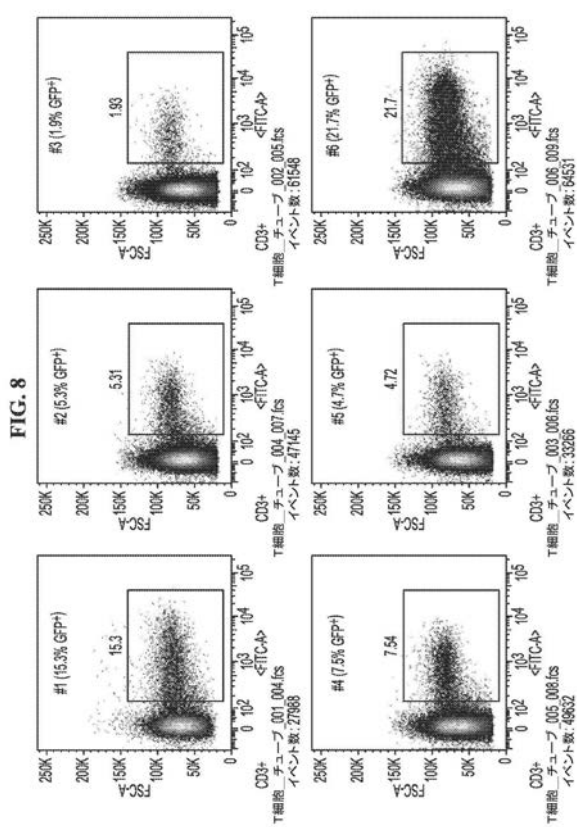
【図 6】



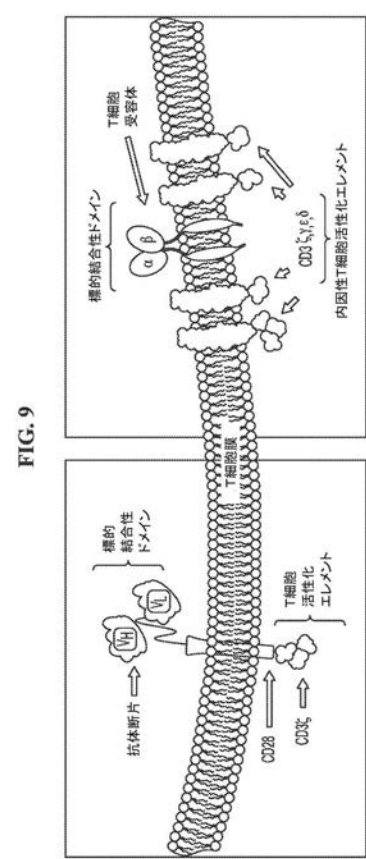
【 図 7 】



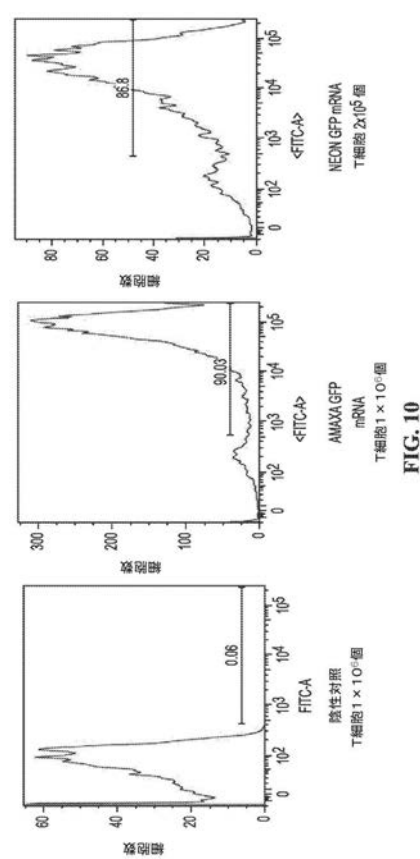
【 図 8 】



【 図 9 】

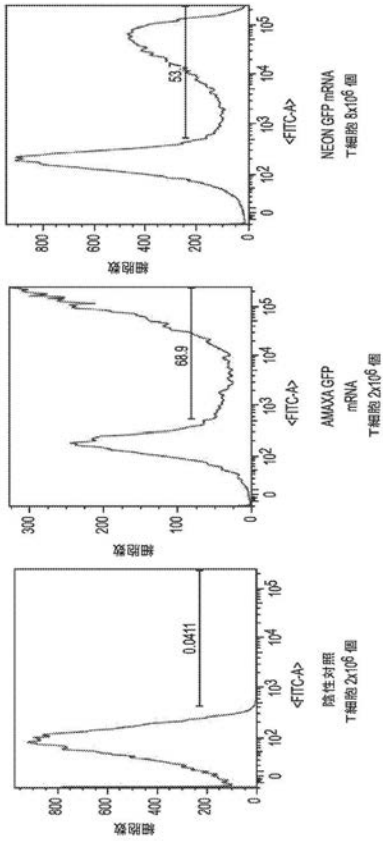


【 図 10 】



【図 1 1】

FIG. 11



【図 1 2】

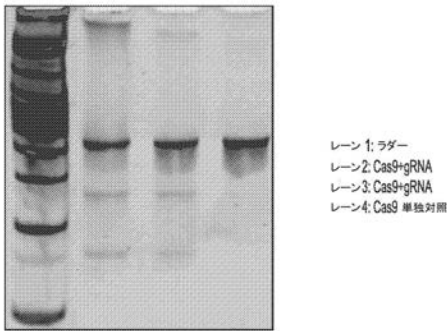
	HPRT	AARS1	CCR5	PD1	CTLA4
gRNA#1	27.65%	32.95%	21.47%	10.83%	40.96%
gRNA#2	30.04%	27.10%	>60%	>60%	36.10%
gRNA#3	<1%	39.82%	55.96%	37.42%	39.33%
gRNA#4	<1%	25.55%	45.96%	20.87%	40.13%
gRNA#5	<1%	27.55%	36.07%	30.60%	15.90%
gRNA#6	<1%	38.62%	33.17%	25.91%	36.53%

遺伝子発現%
0.10%
10.20%
20.30%
30.40%
40.50%
50.60%
>60%

FIG. 12

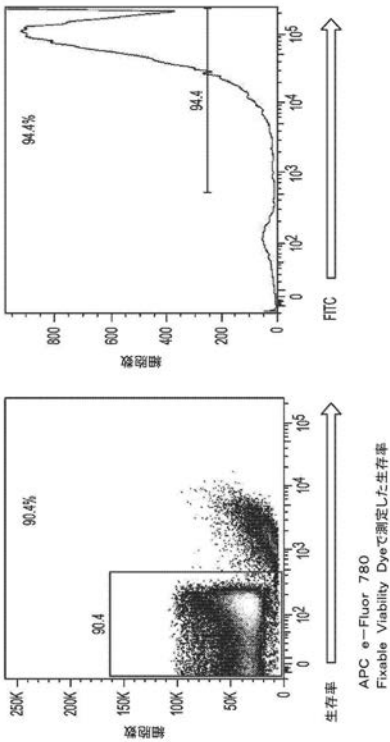
【図 1 3】

FIG. 13



【図 1 4】

FIG. 14



【図 15】

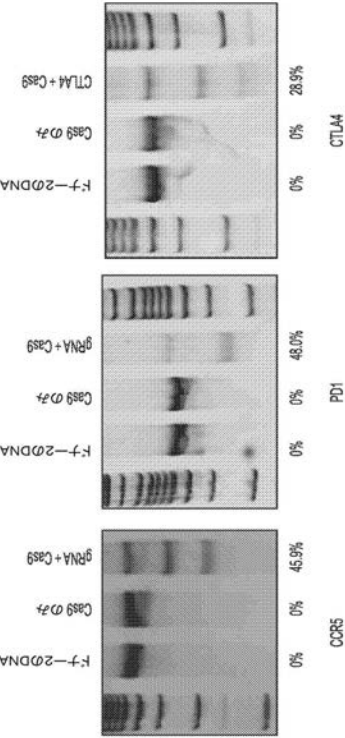


FIG. 15

【図 16】

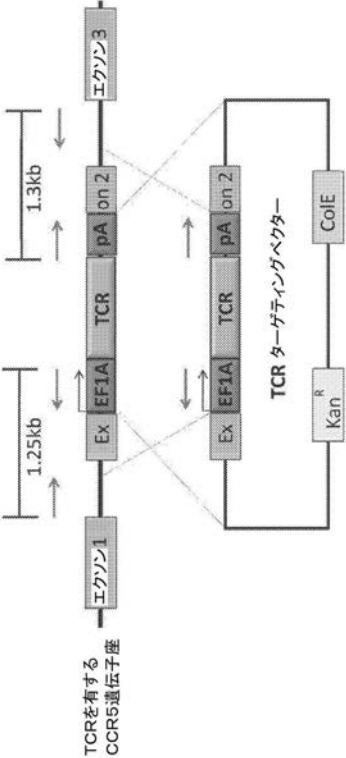


FIG. 16

【図 17】

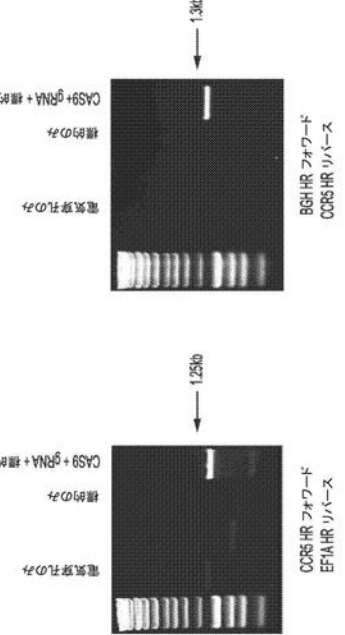


FIG. 17

【図 18】

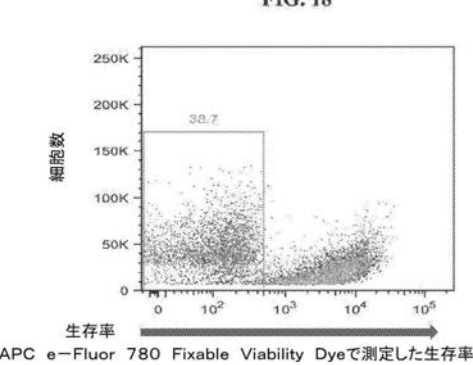
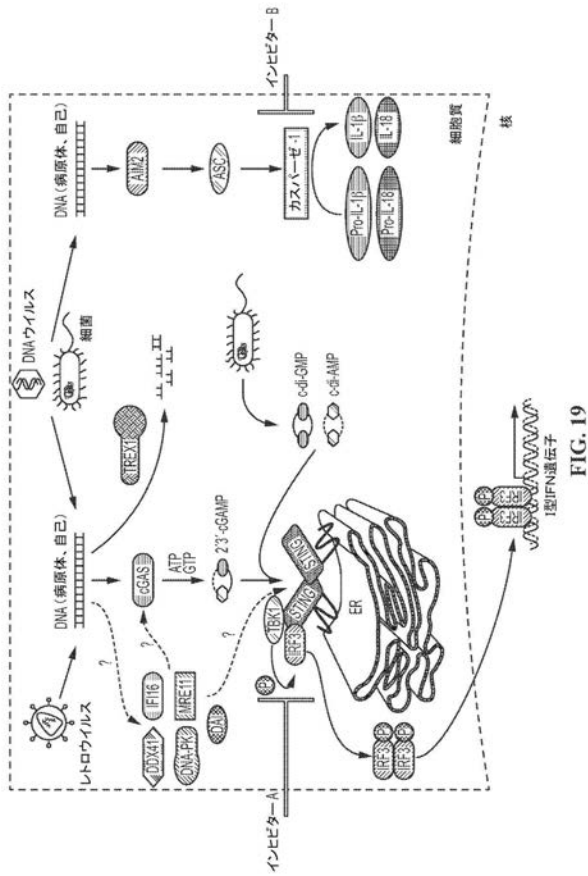


FIG. 18

【図 19】



【図 20】

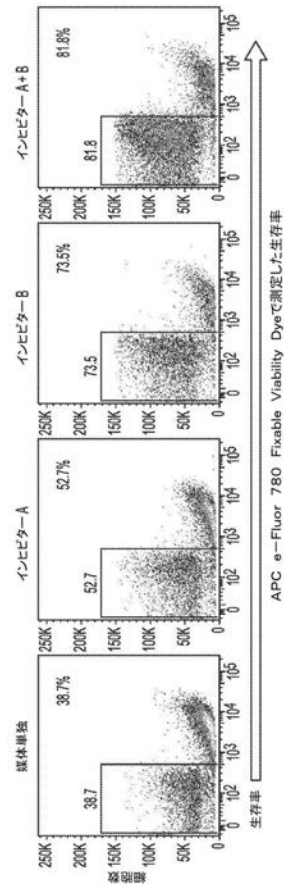


FIG. 20

【図 21】

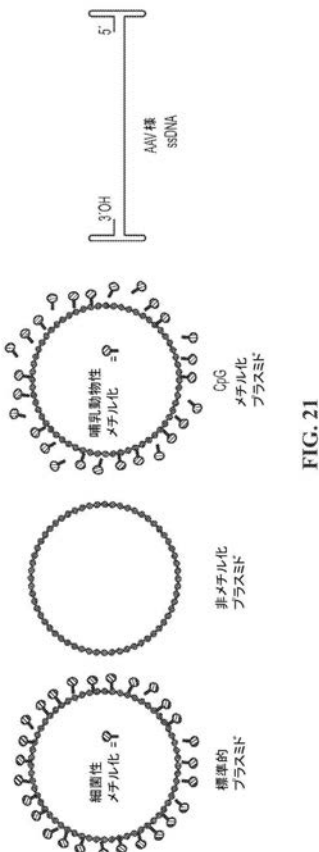


FIG. 21

【図 22】

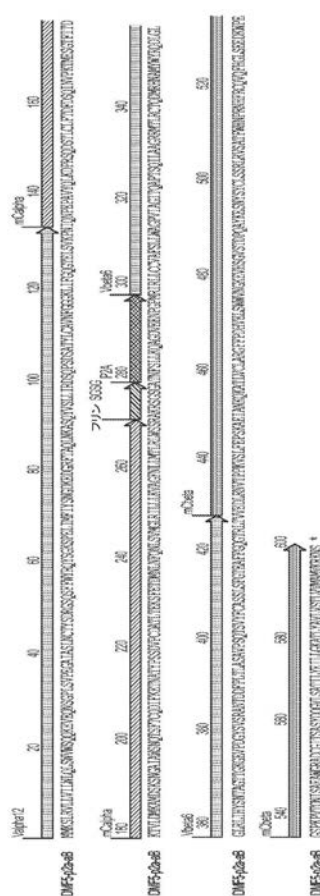


FIG. 22

【図 23】

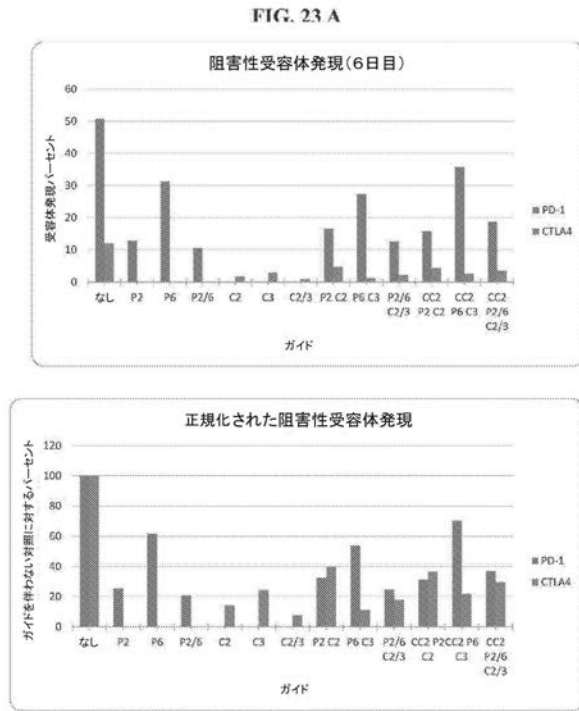


FIG. 23 B

【図 24】

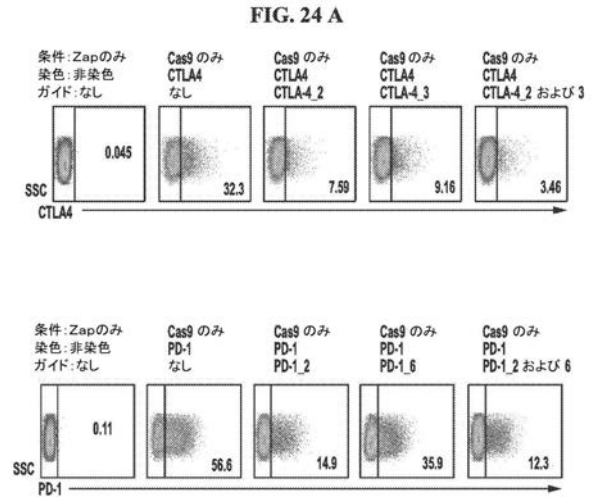
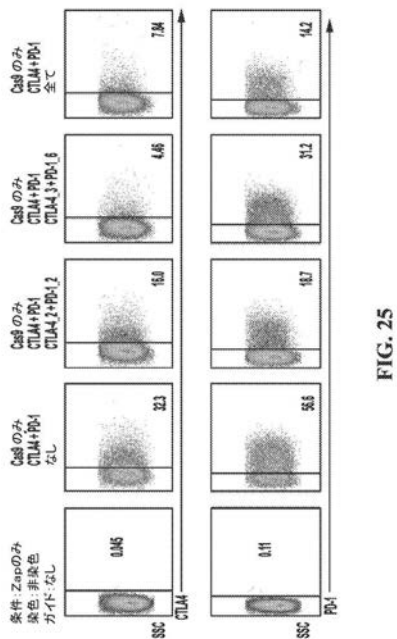
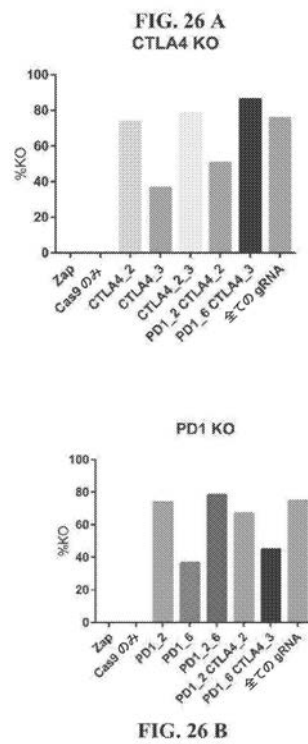


FIG. 24 B

【図 25】

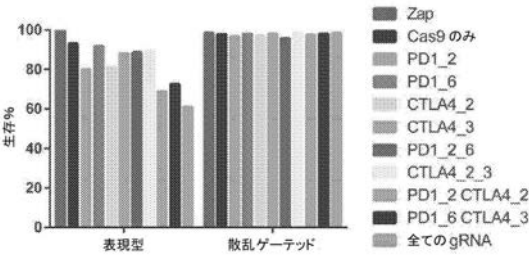


【図 26】



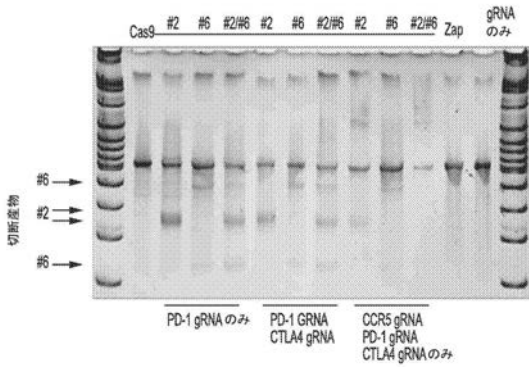
【図 27】

FIG. 27



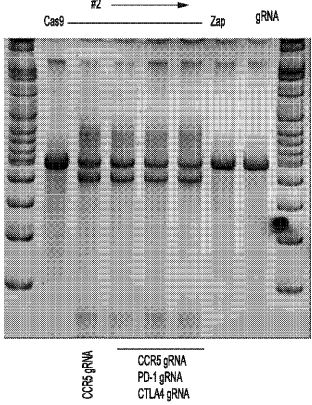
【図 28】

FIG. 28



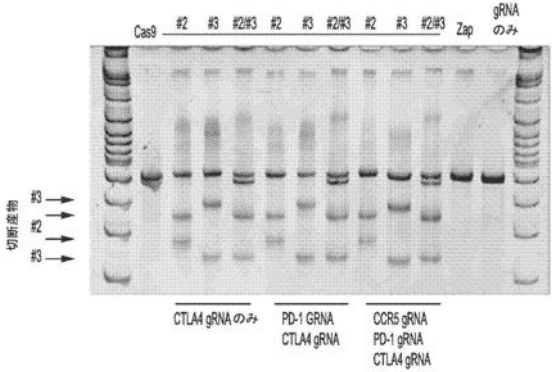
【図 30】

FIG. 30

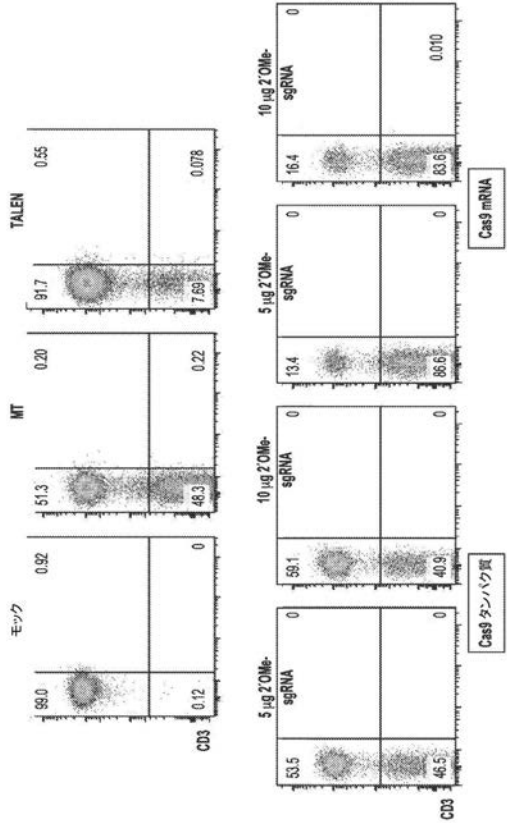


【図 29】

FIG. 29



【図 31】



【図 3 2】

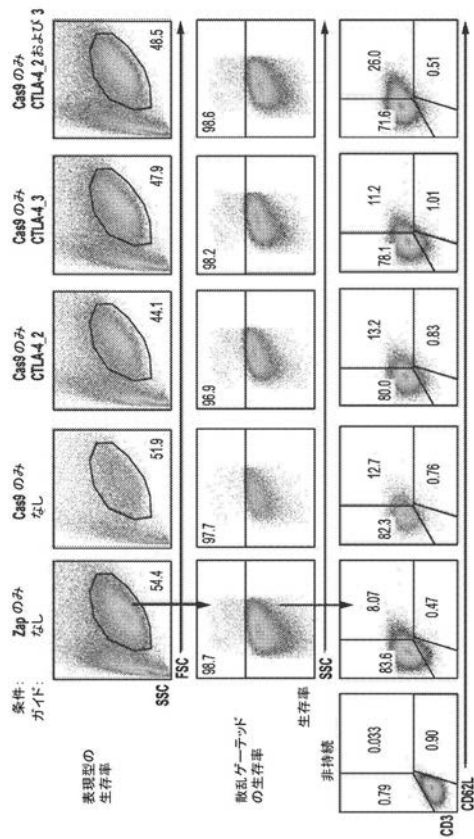


FIG. 32

【図 3 3】

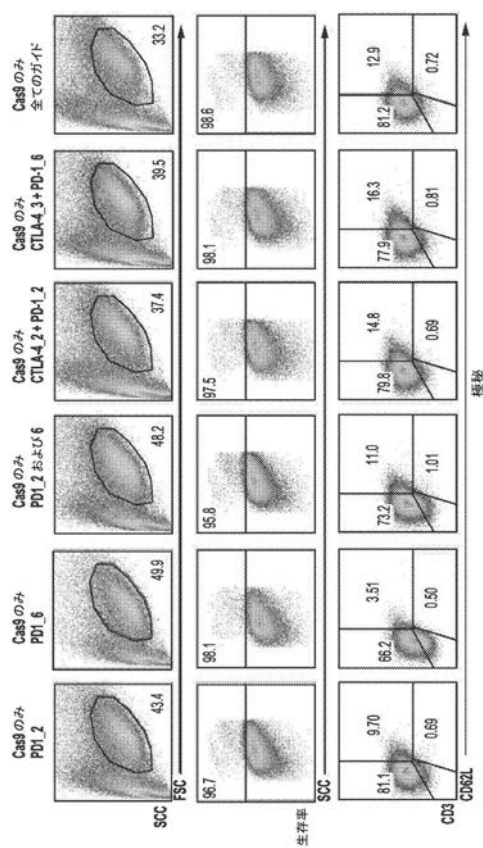


FIG. 33

【図 3 4】

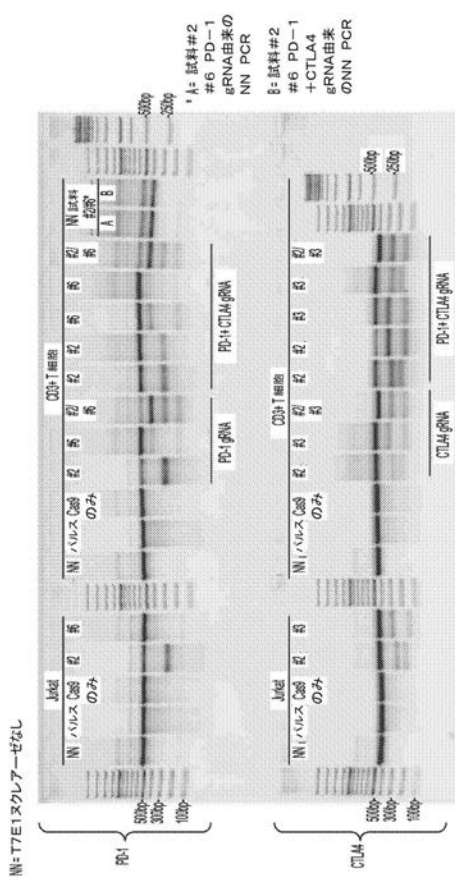


FIG. 34

【図 3 5】

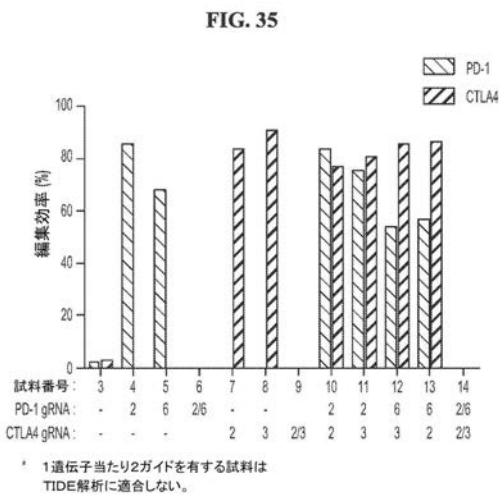


FIG. 35

【図 36】

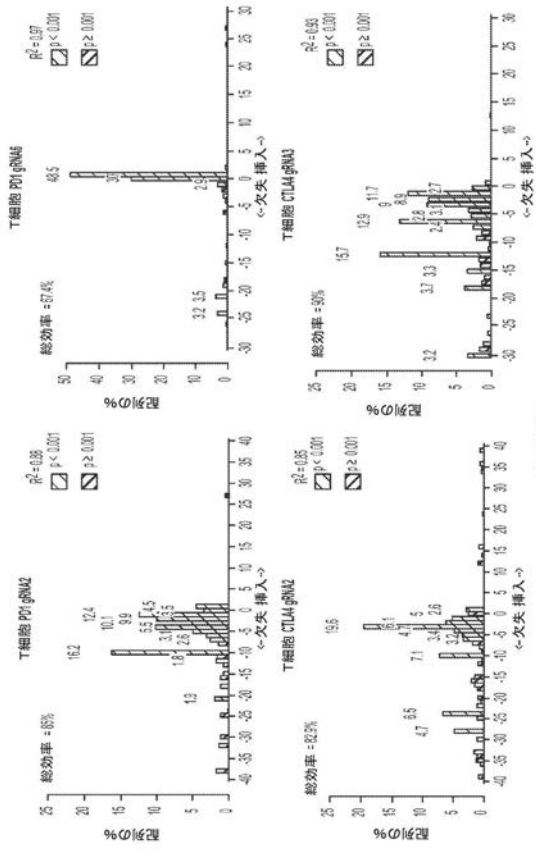


FIG. 36

【図 38】

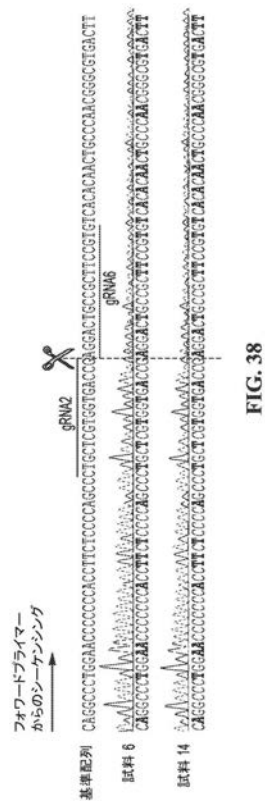


FIG. 38

【図 37】

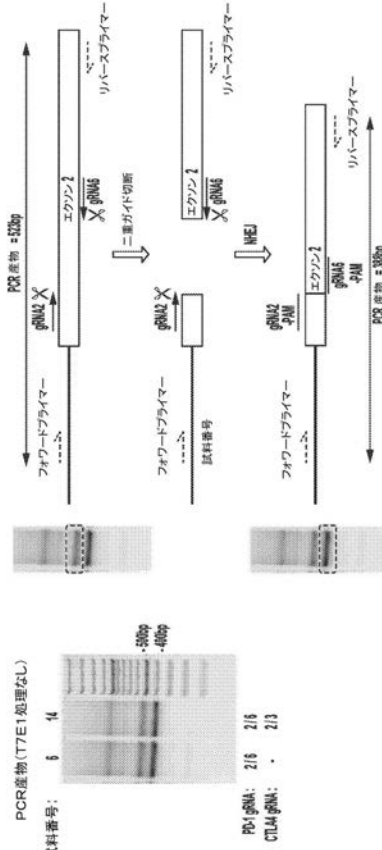


FIG. 37

【図 39】

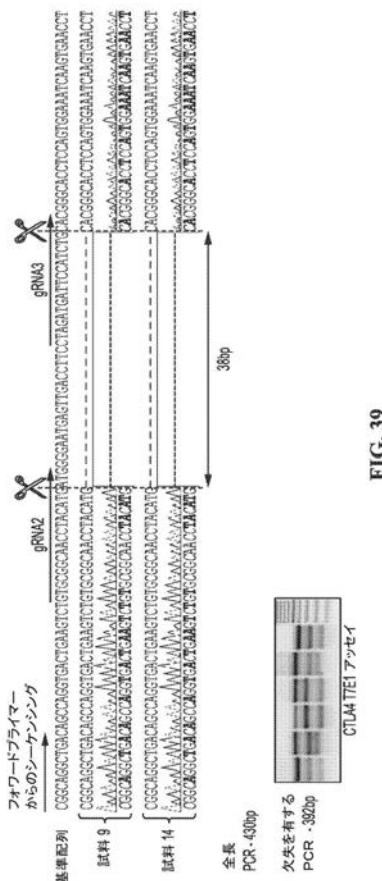


FIG. 39

【図 40】

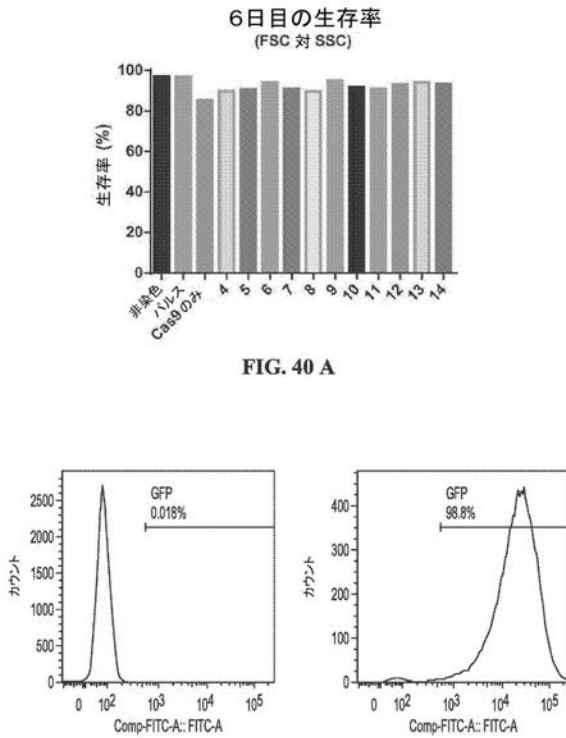


FIG. 40 A

FIG. 40 B

【図 41】

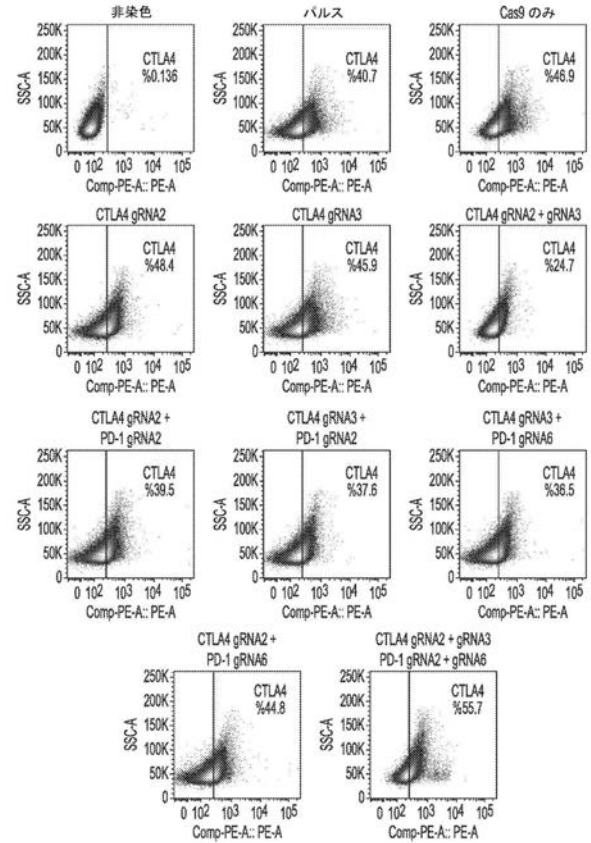


FIG. 41

【図 42】

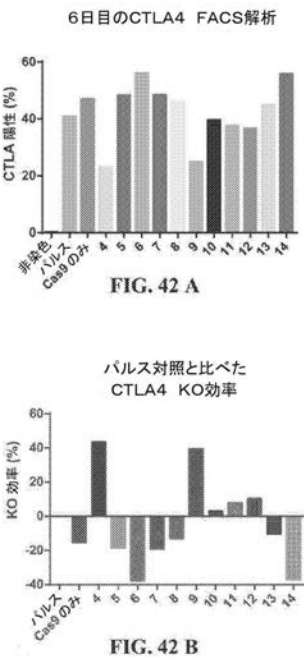
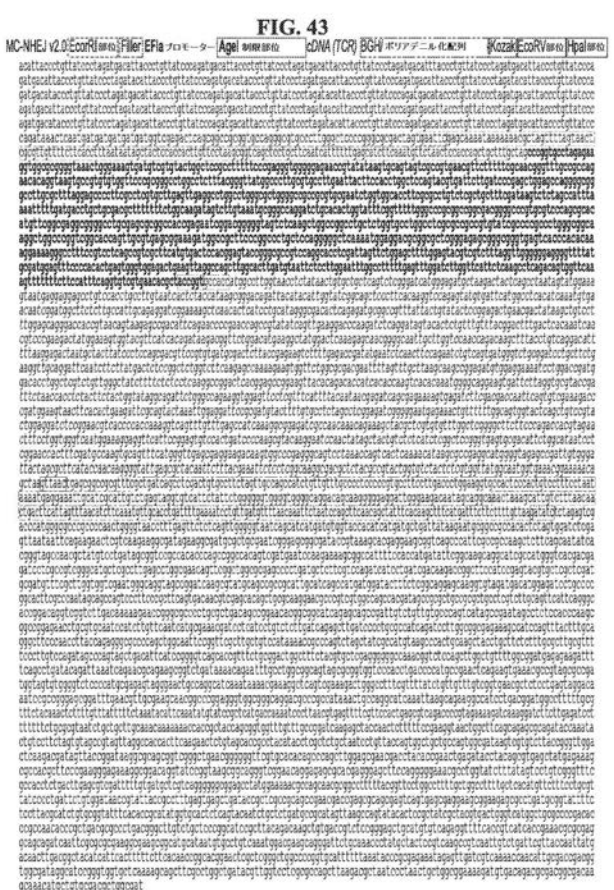


FIG. 42 A

FIG. 42 B

【図 43】



【図 4 4】

FIG. 44



【図 4 5】

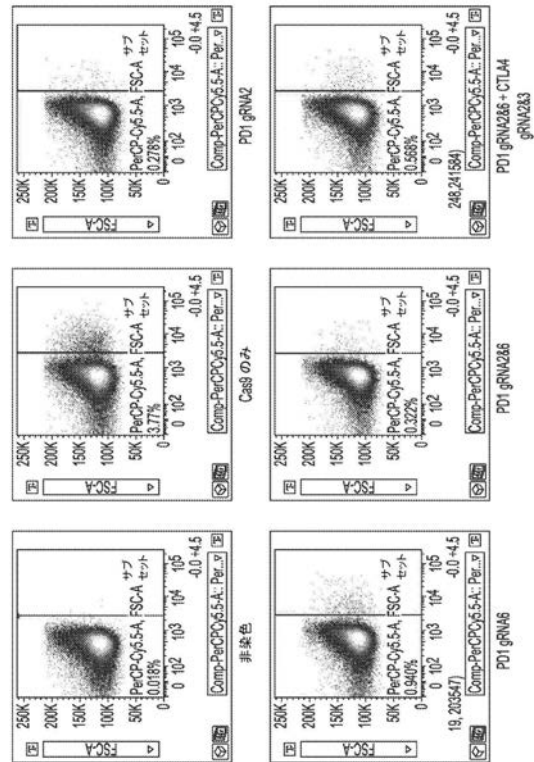


FIG. 45

【図 4 6】

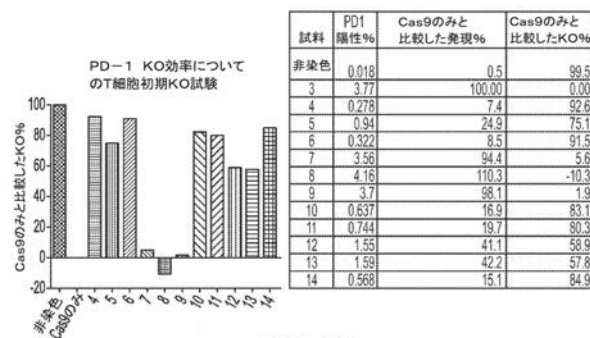


FIG. 46 A

PD-1発現についてのT細胞初期KO試験

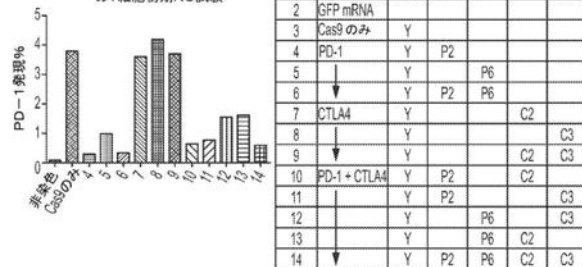


FIG. 46 B

【図 4 7】

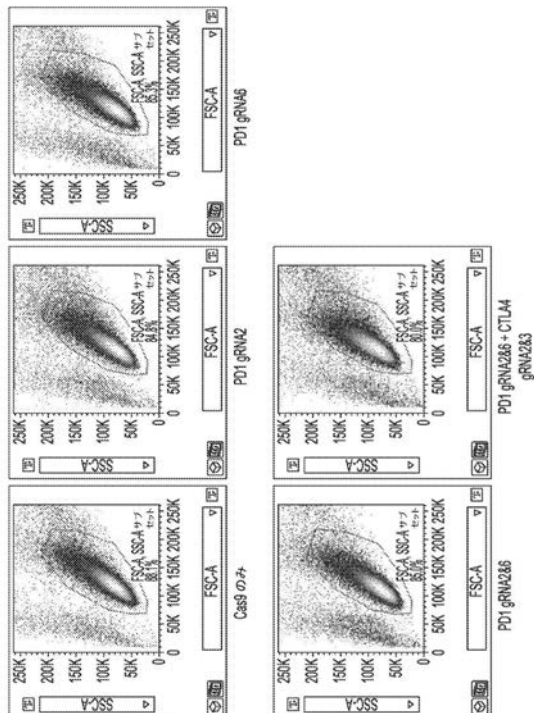


FIG. 47

【図 48】

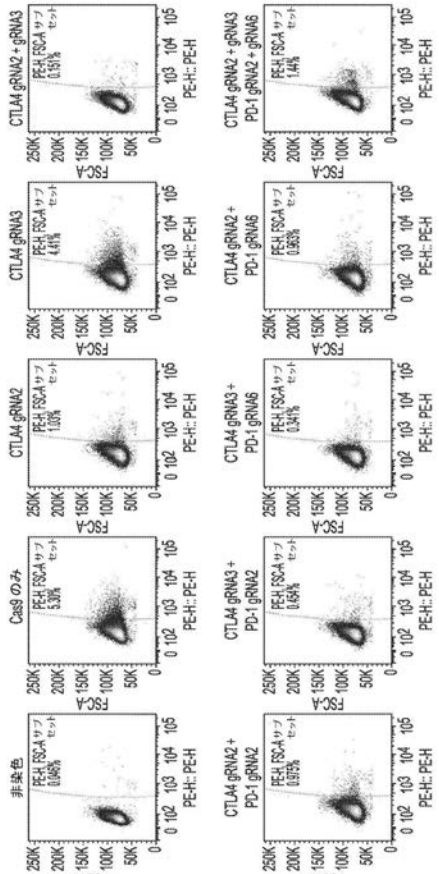


FIG. 48

【図 50】

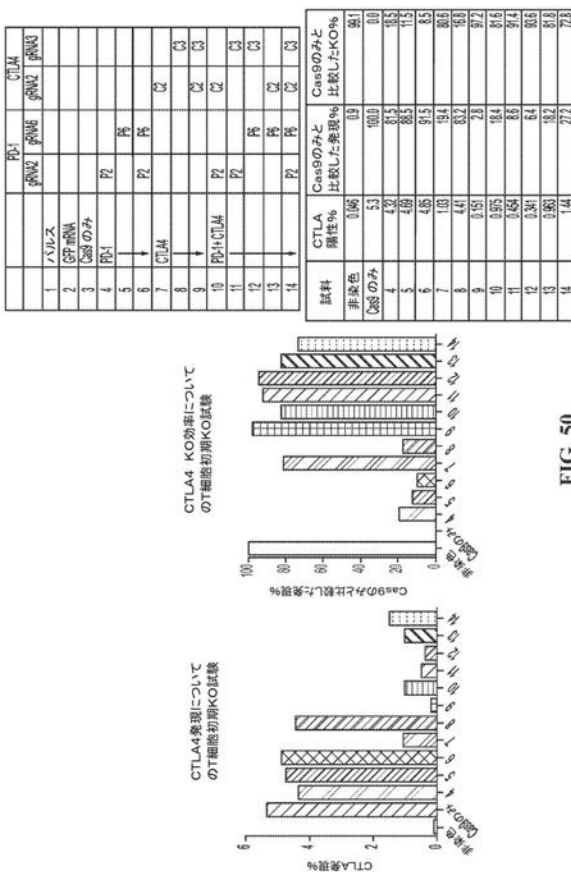


FIG. 50

【図 49】

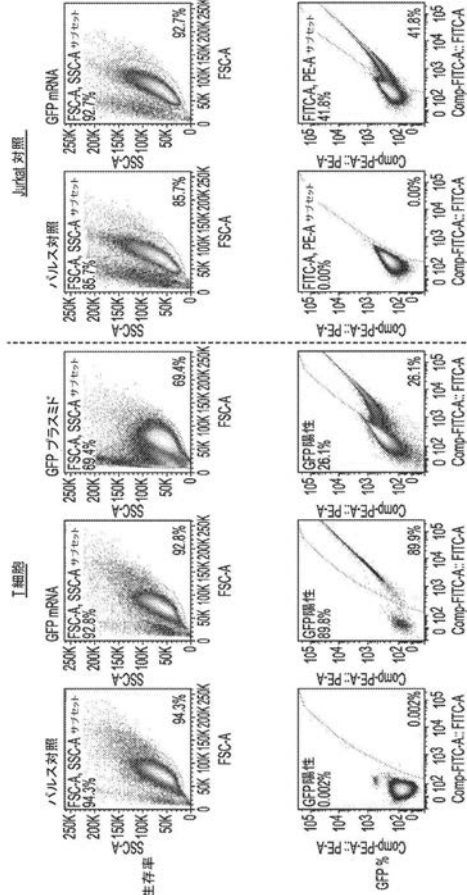


FIG. 49

【図 51】

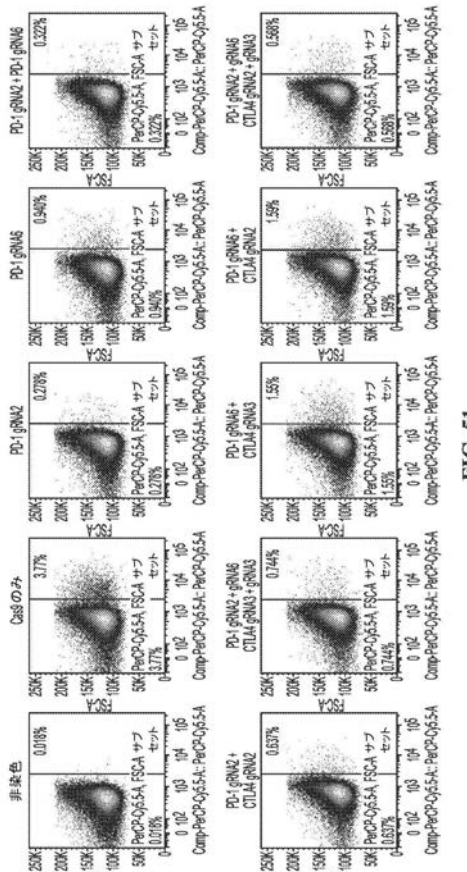


FIG. 51

【図 5 2】

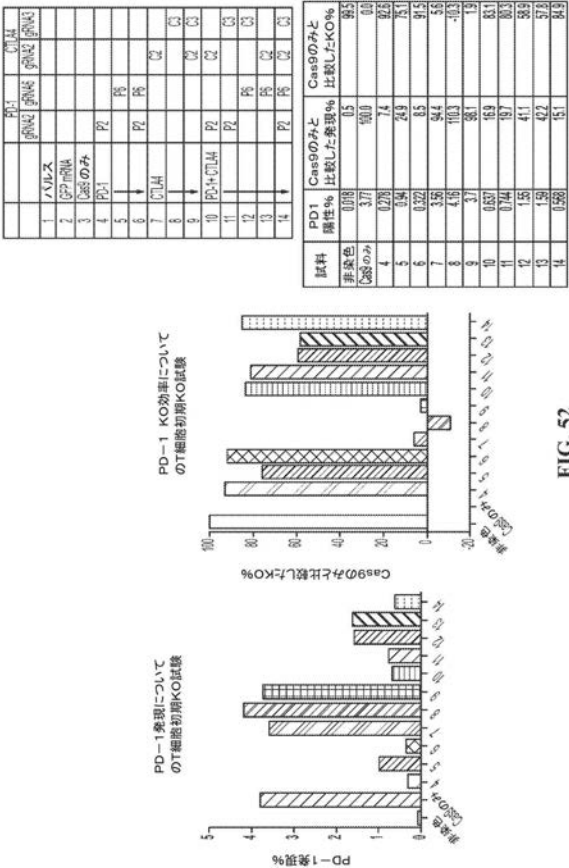


FIG. 52

【図 5 3】

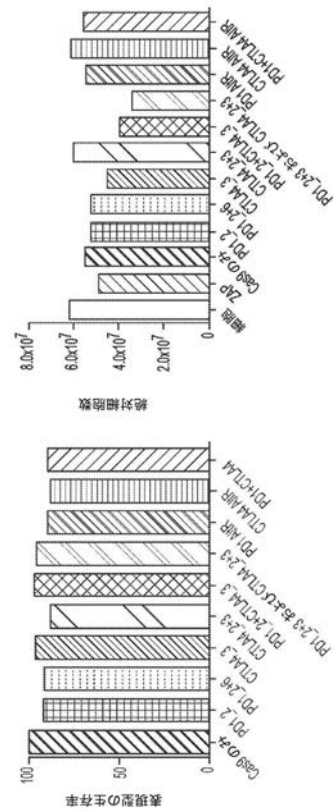


FIG. 53

【図 5 4】

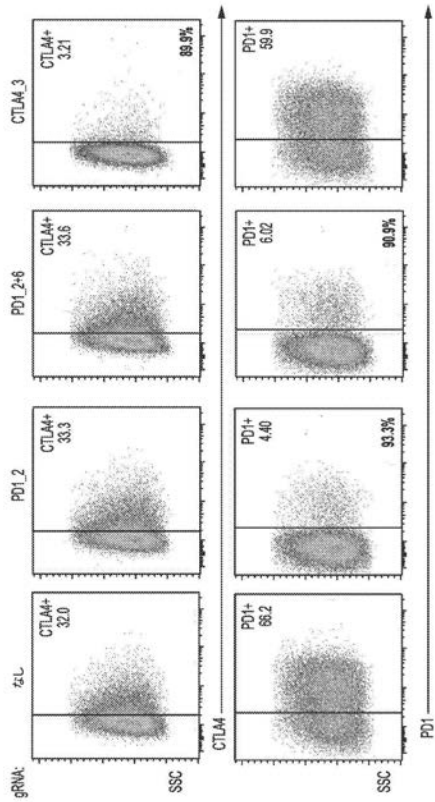


FIG. 54

【図 5 5】

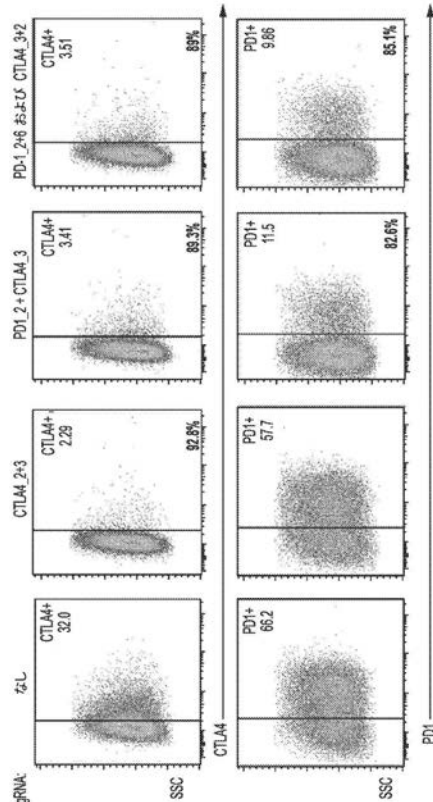
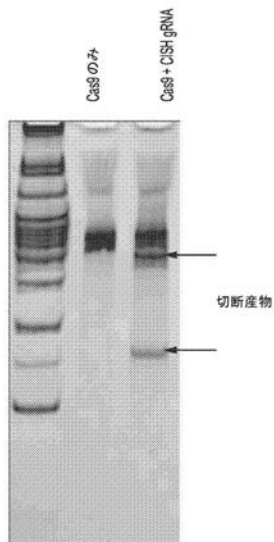


FIG. 55

【図 56】

FIG. 56



【図 57】

FIG. 57 C

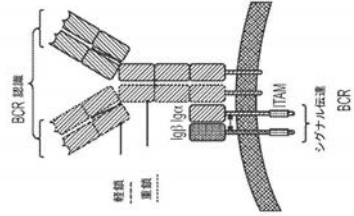


FIG. 57 B

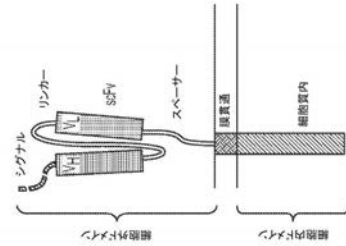
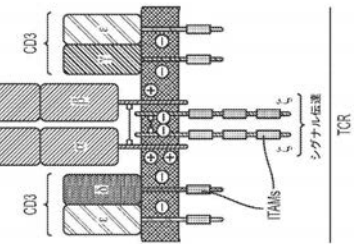


FIG. 57 A



【図 58】

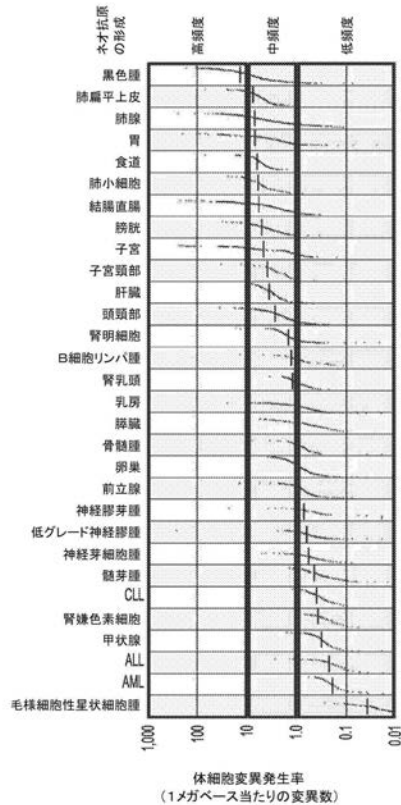
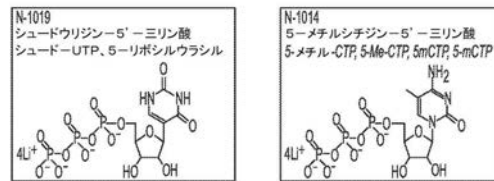


FIG. 58

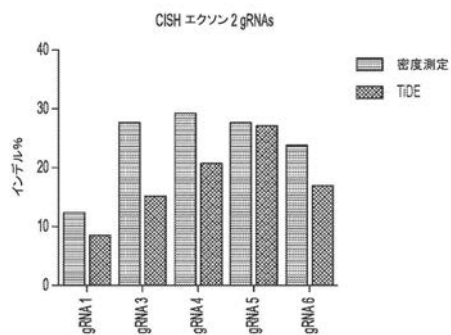
【図 59】

FIG. 59



【図 60】

FIG. 60



【図 6 1】

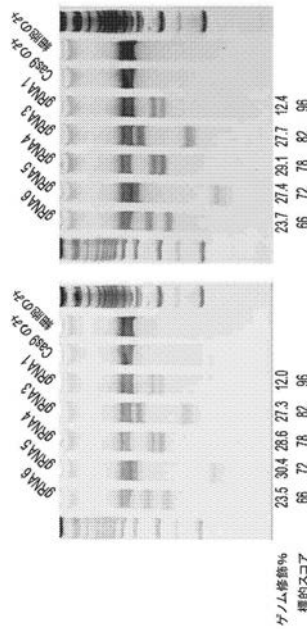


FIG. 61

【図 6 2】

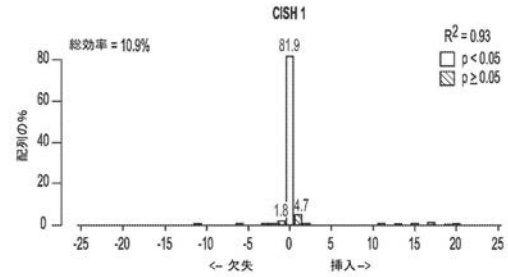


FIG. 62 A

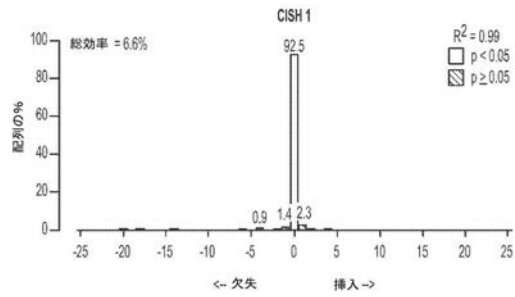


FIG. 62 B

【図 6 3】

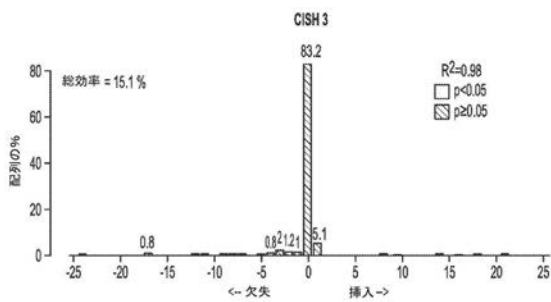


FIG. 63 A

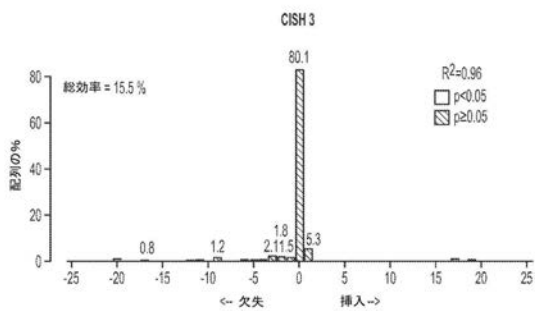


FIG. 63 B

【図 6 4】

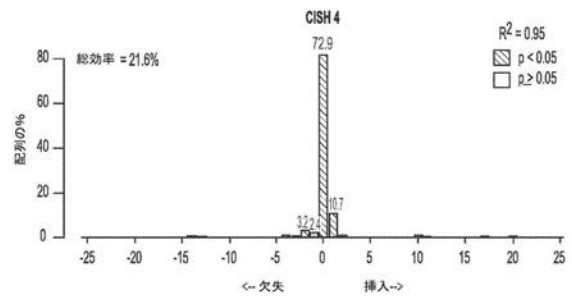


FIG. 64 A

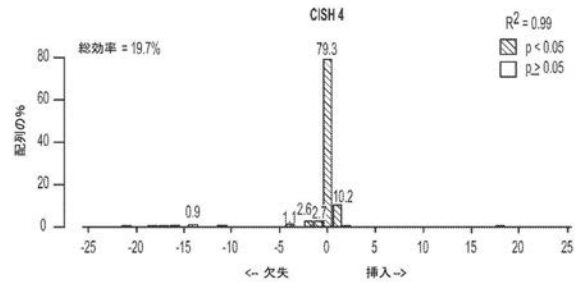


FIG. 64 B

【 図 6 5 】

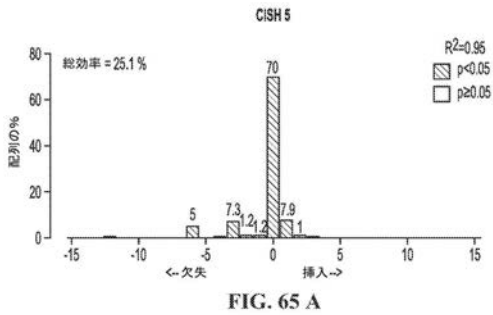


FIG. 65 A

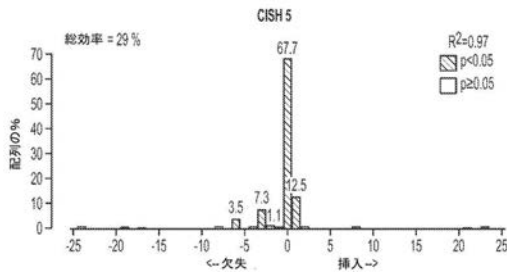


FIG. 65 B

【 図 6 6 】

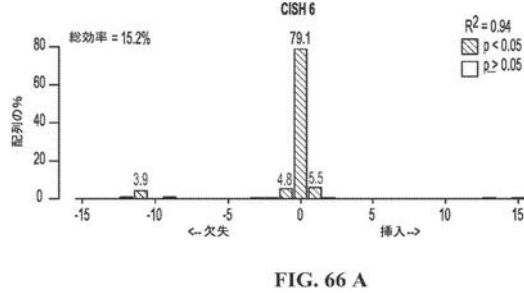


FIG. 66 A

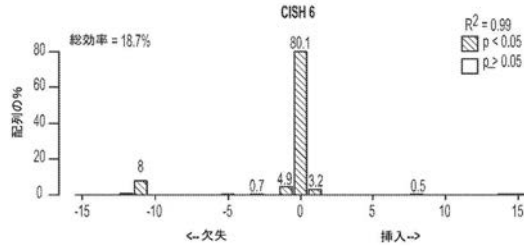
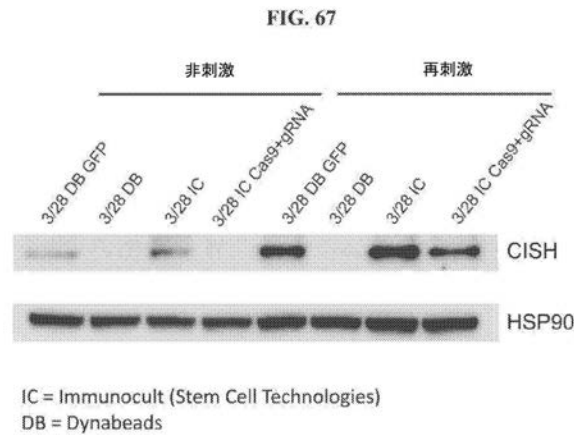
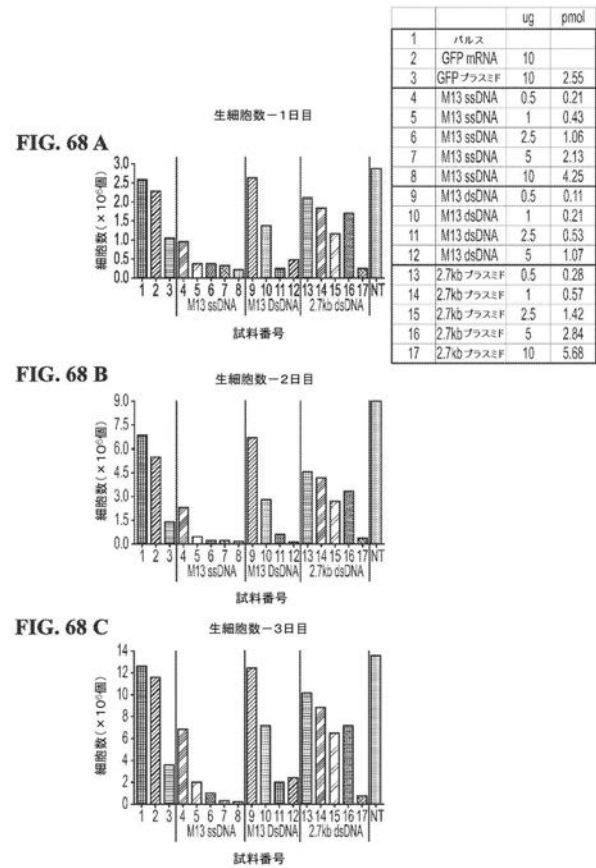


FIG. 66 B

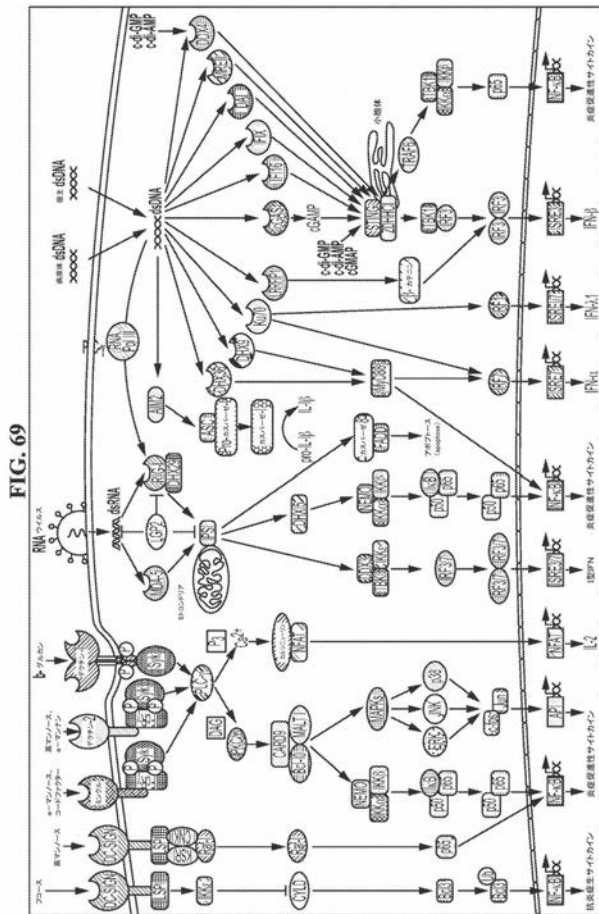
【 図 6 7 】



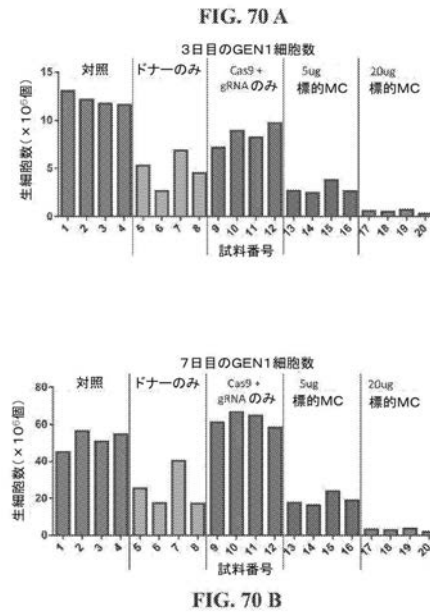
【 図 6 8 】



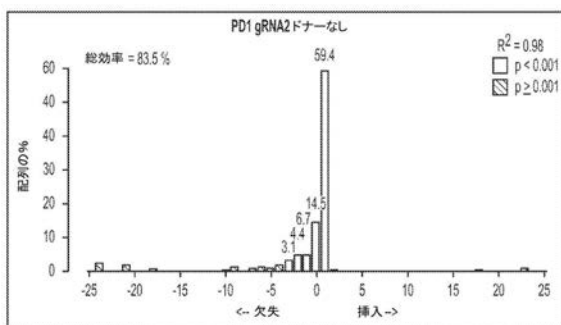
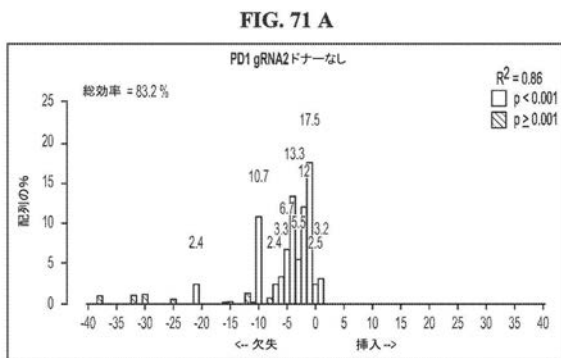
【図 69】



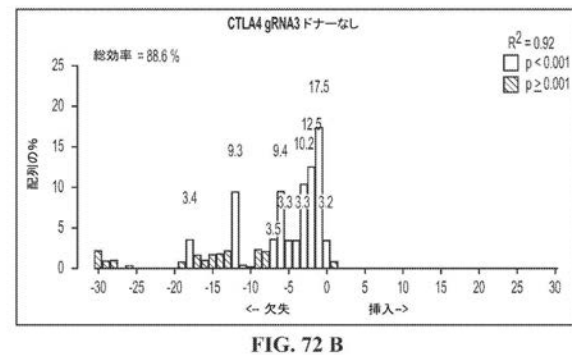
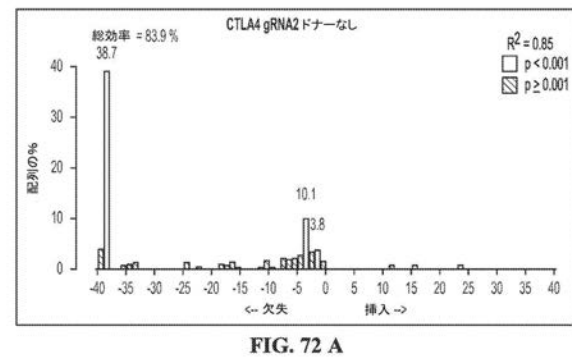
【図 70】



【図 71】



【図 72】



【図 73】

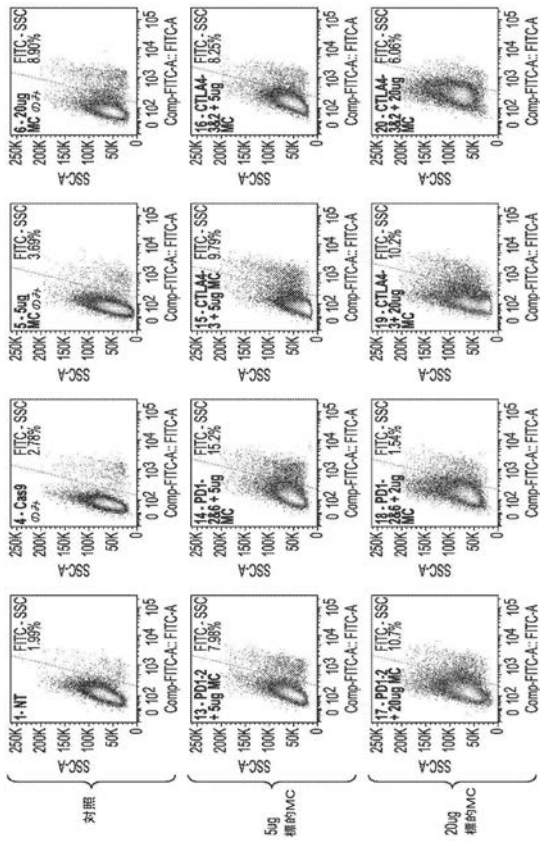


FIG. 73

【図 75】

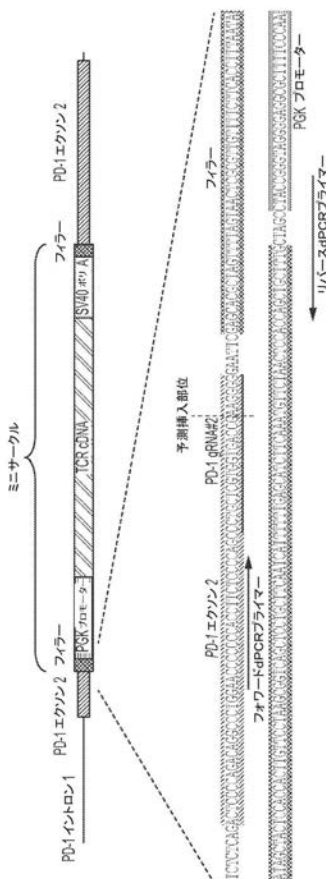


FIG. 75

【図 74】

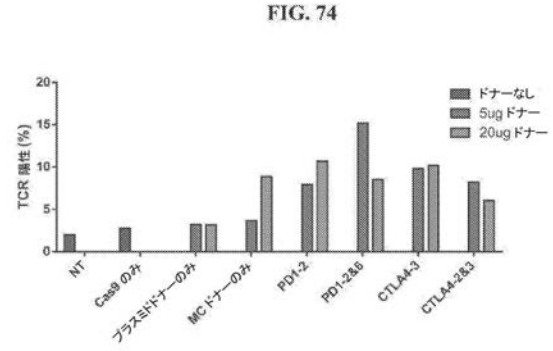


FIG. 74

【図 76】

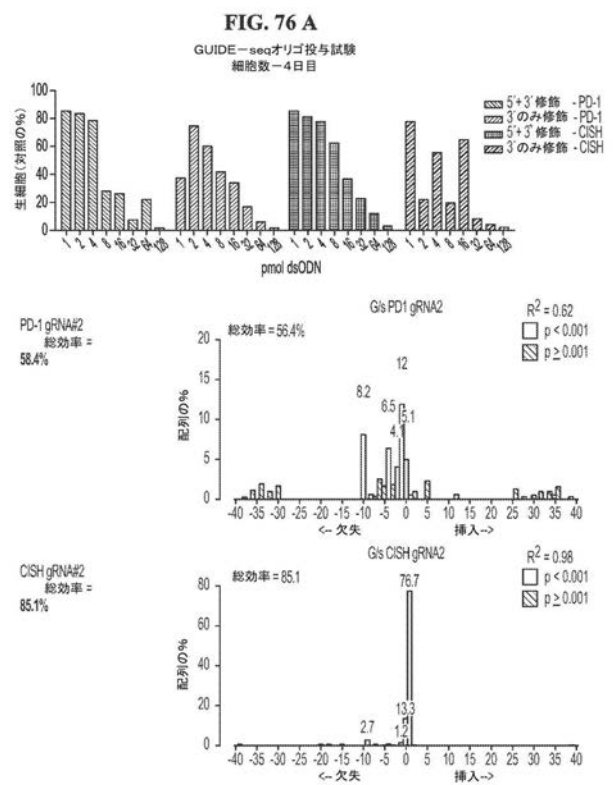


FIG. 76 A

GUIDE-seqオリゴ投与試験
細胞数4日目

FIG. 76 B

【図 77】

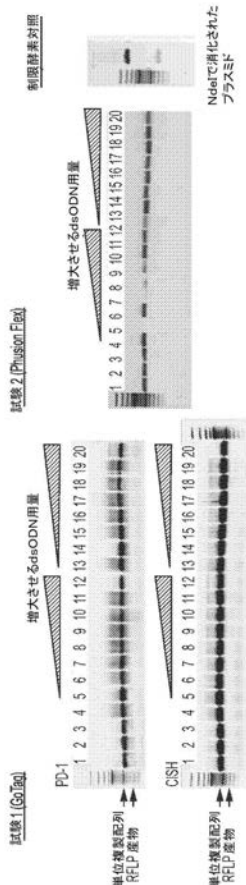


FIG. 77

【図 79】

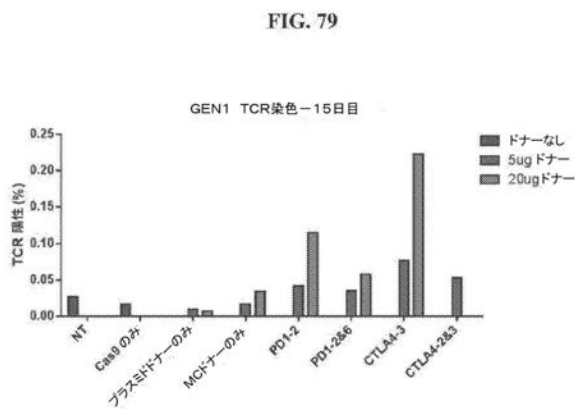
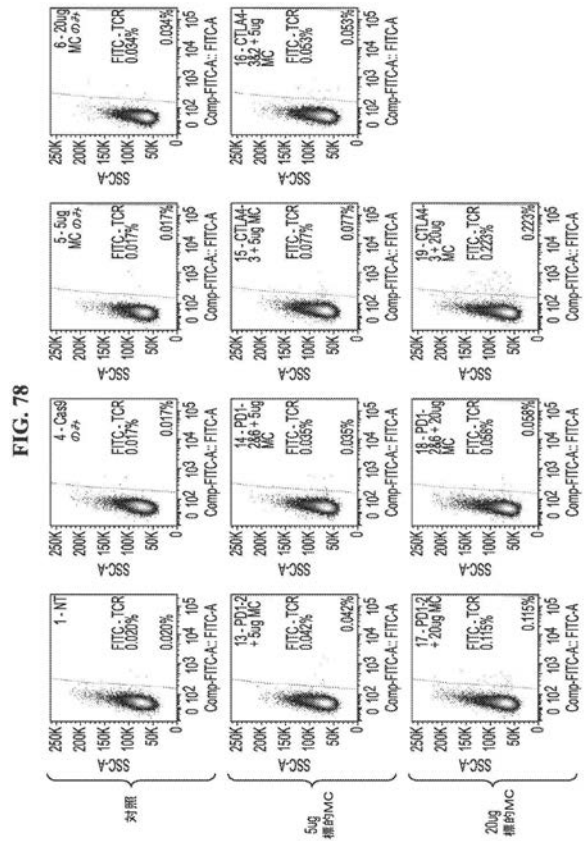


FIG. 79

【図 78】



【図 80】

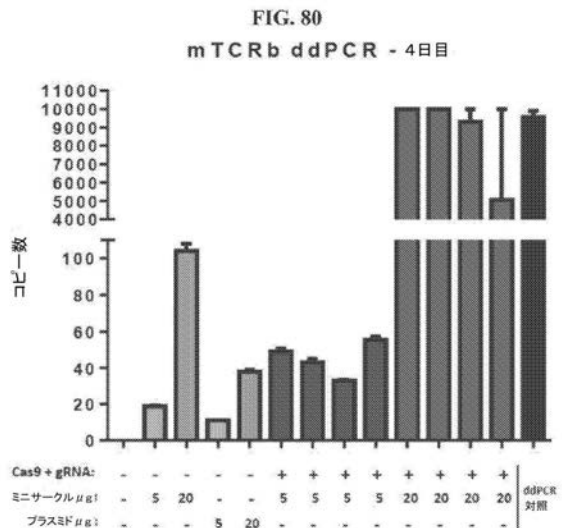


FIG. 80

【図 8 1】

FIG. 81 A

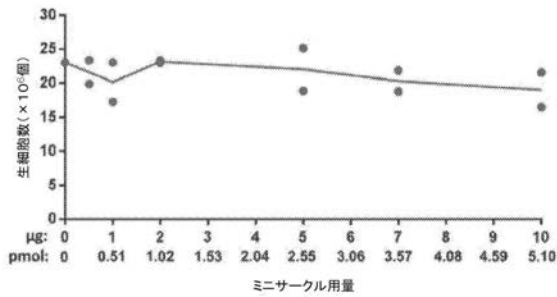
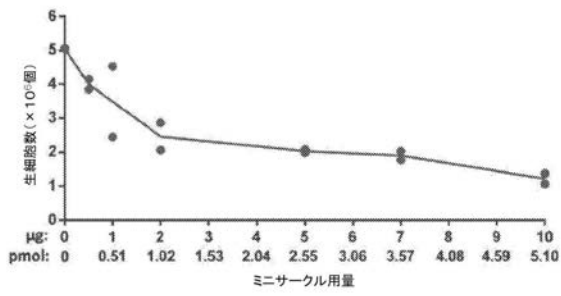


FIG. 81 B

【図 8 2】

FIG. 82 A

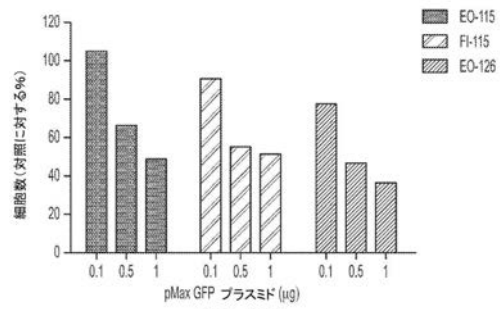
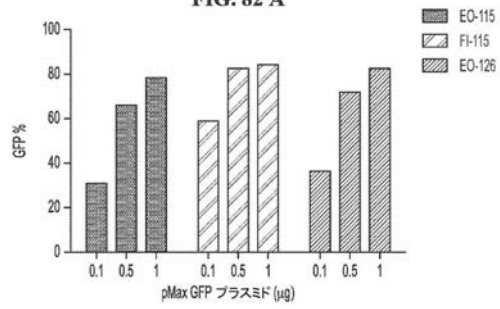


FIG. 82 B

【図 8 3】

FIG. 83 A

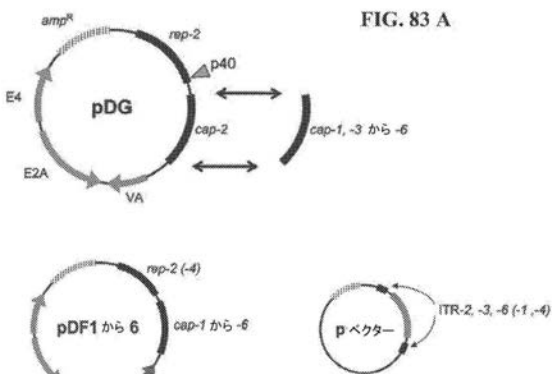
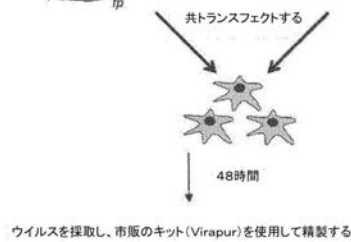
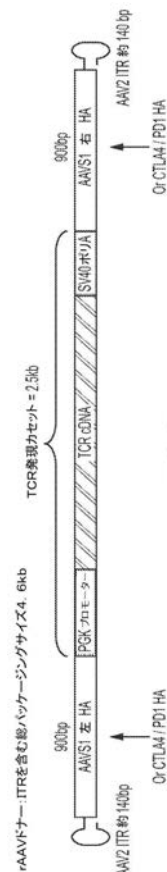


FIG. 83 B

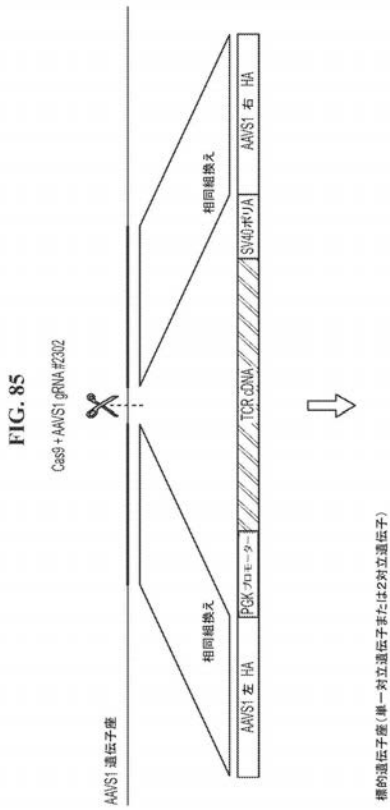


【図 8 4】

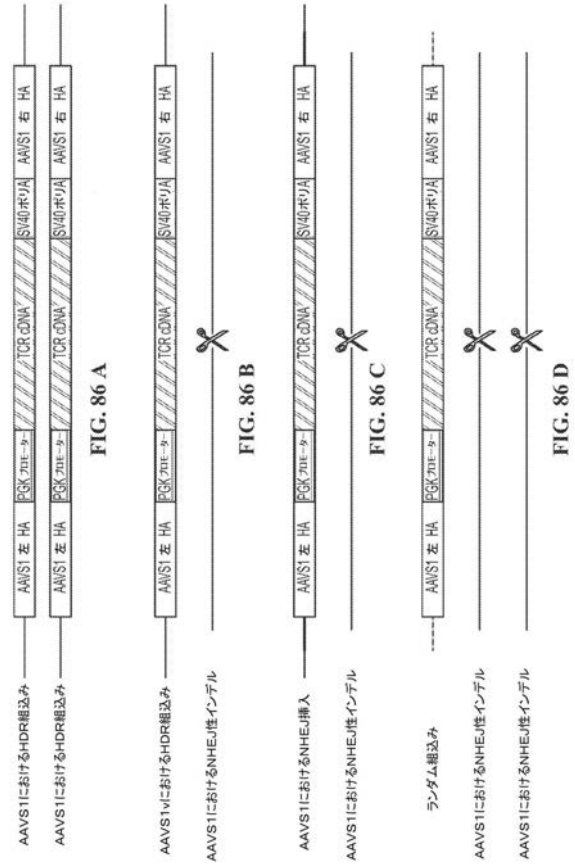
FIG. 84



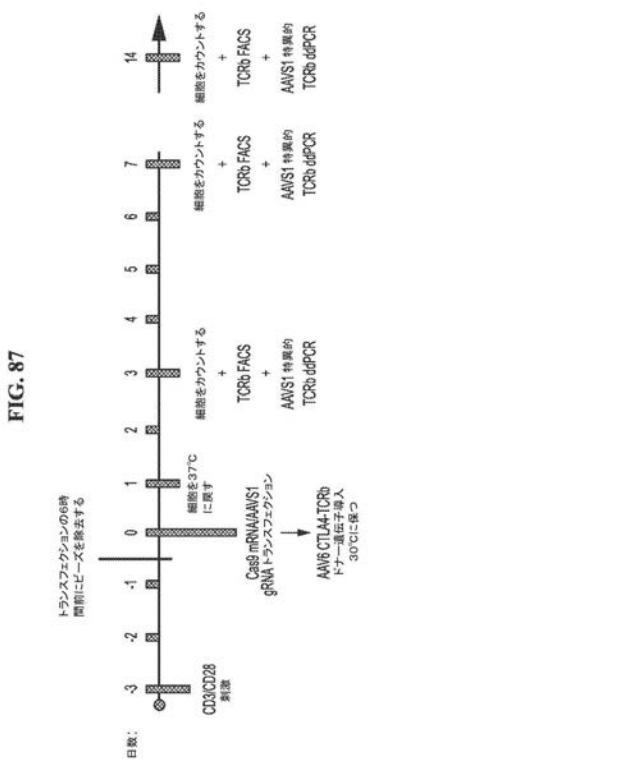
【図 8 5】



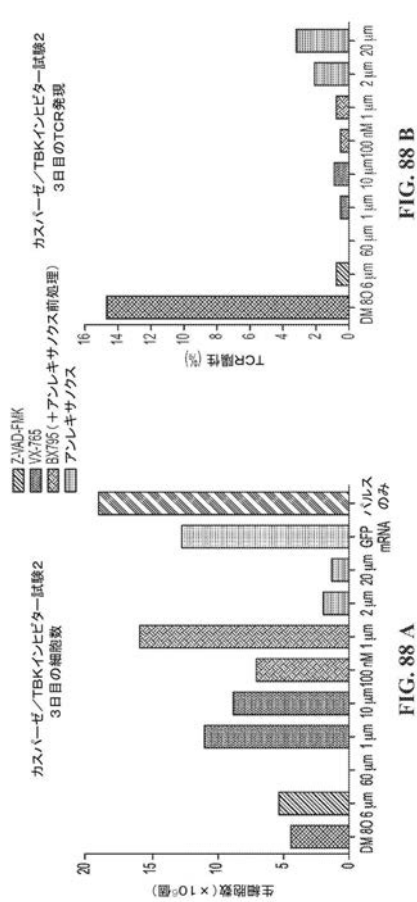
【図 8 6】



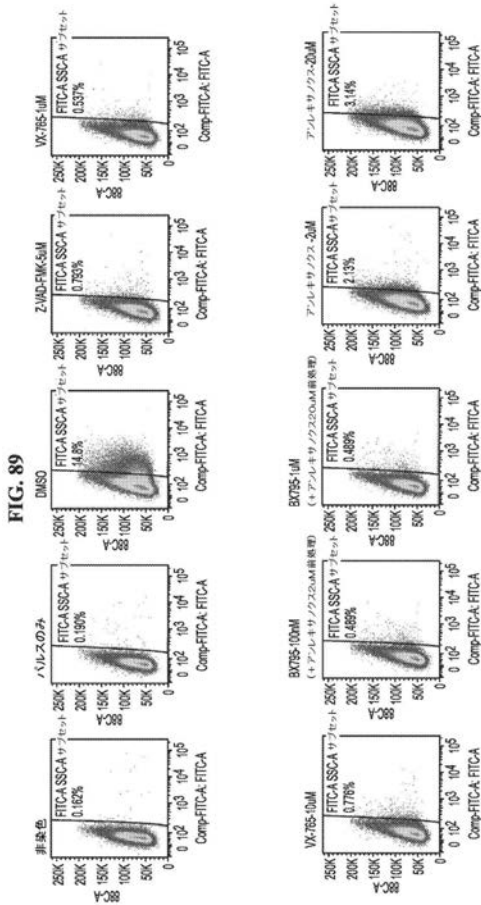
【图 8 7】



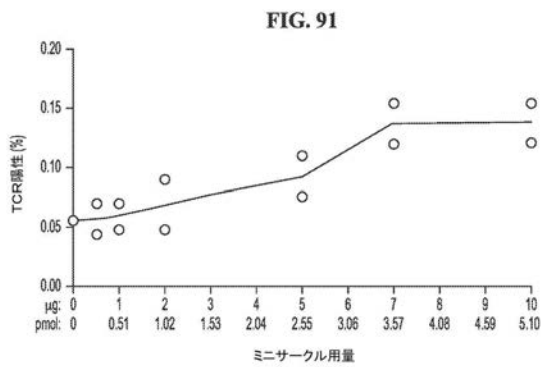
【图 8 8】



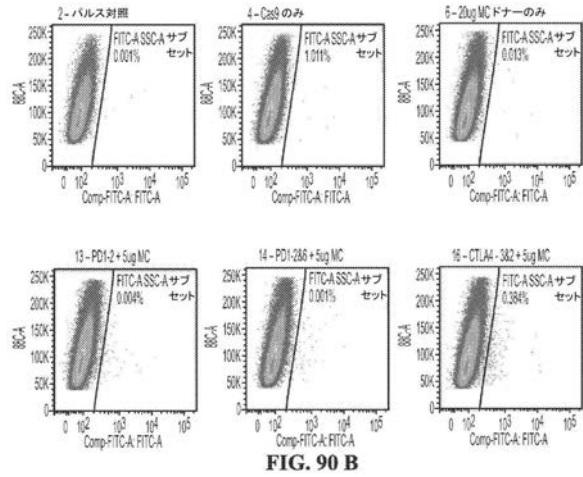
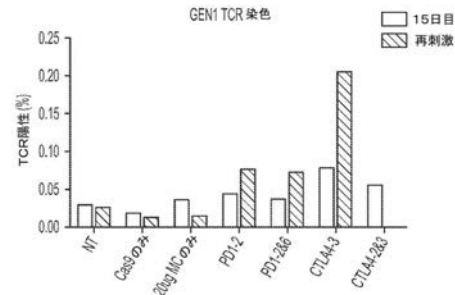
【図 89】



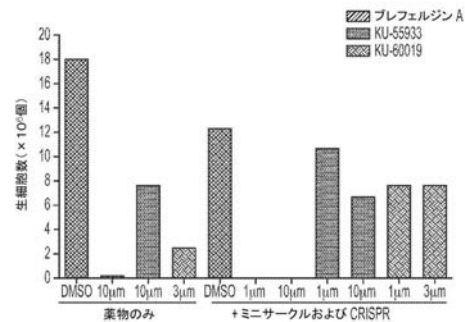
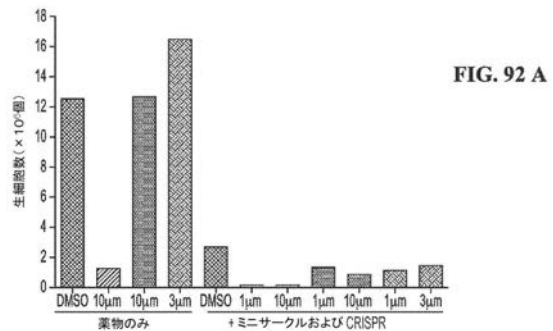
【図 91】



【図 90】



【図 92】



【图 9-3】

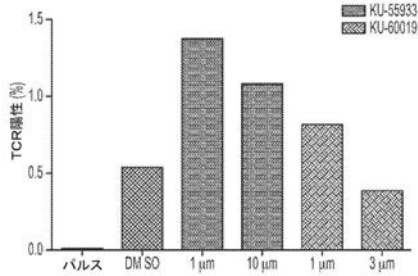
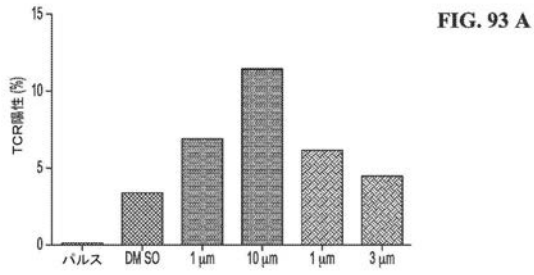
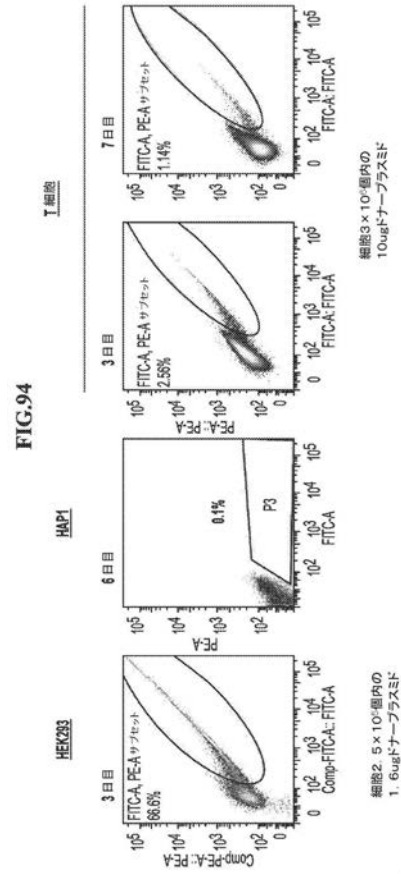
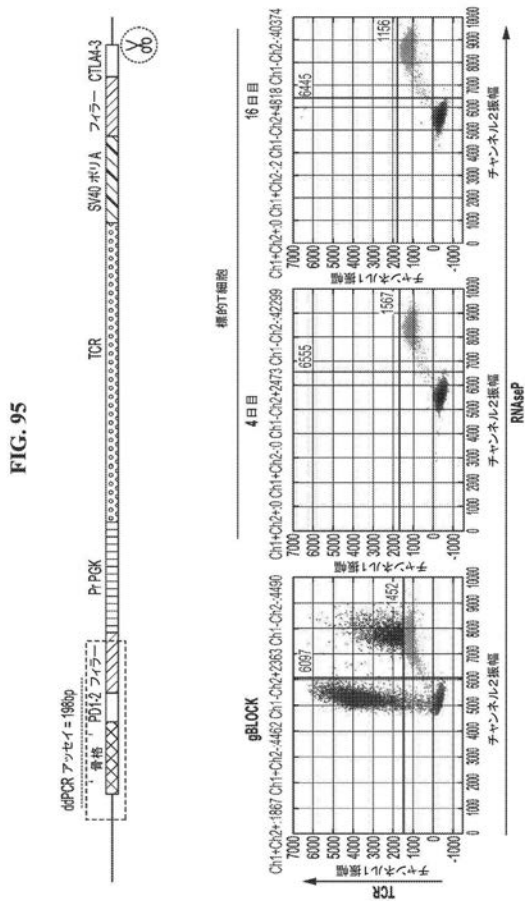


FIG. 93 B

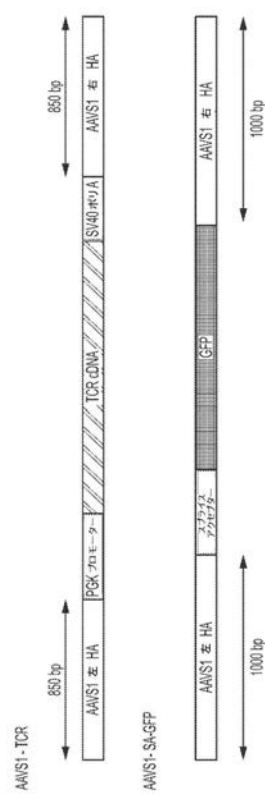
【図 9 4】



【図 9 5】



【图 9 6】



【図 97】

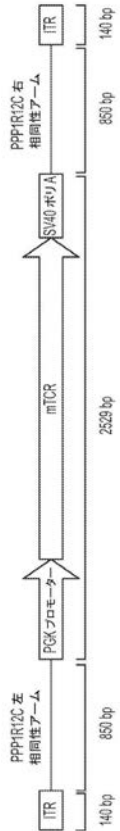


FIG. 97

【図 99】

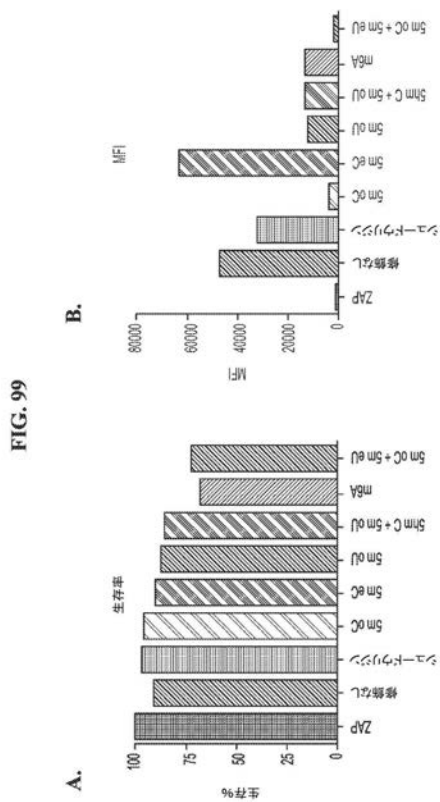


FIG. 99

【図 98】

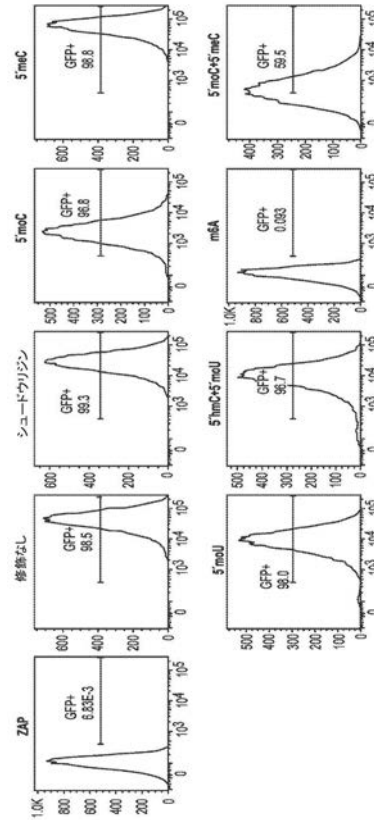
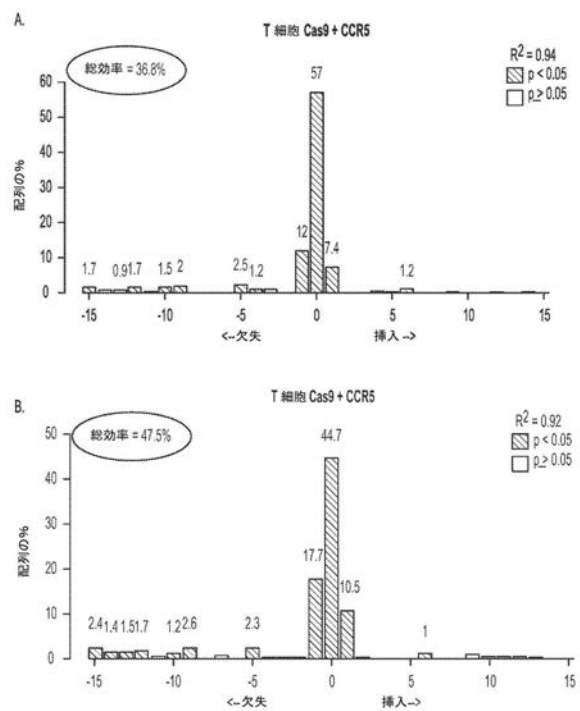


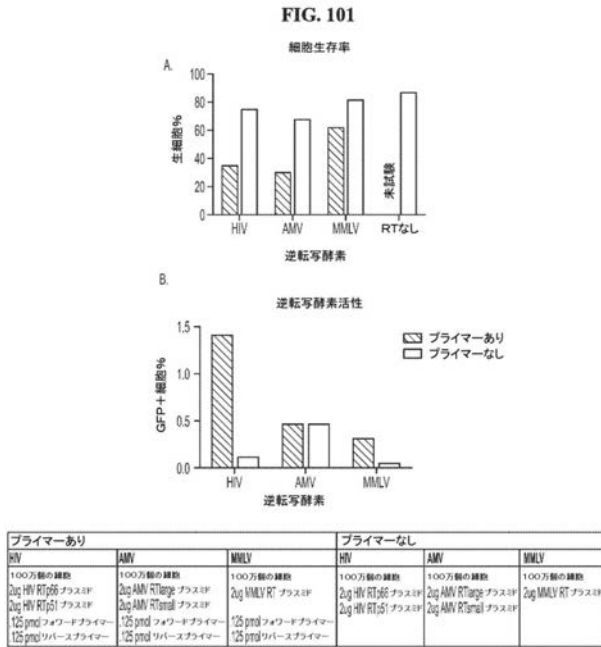
FIG. 98

【図 100】

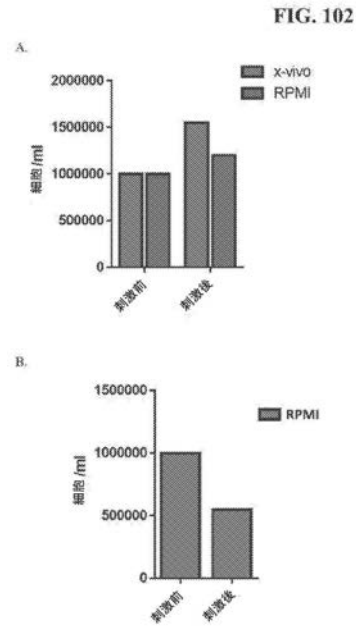
FIG. 100



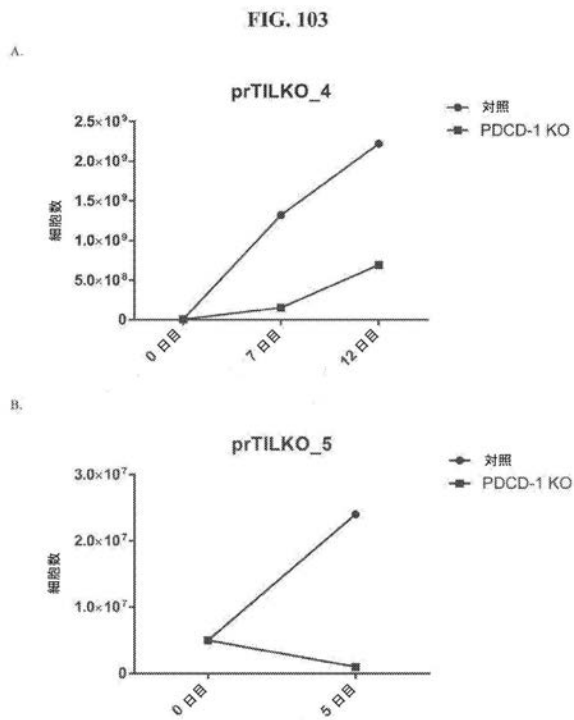
【図 101】



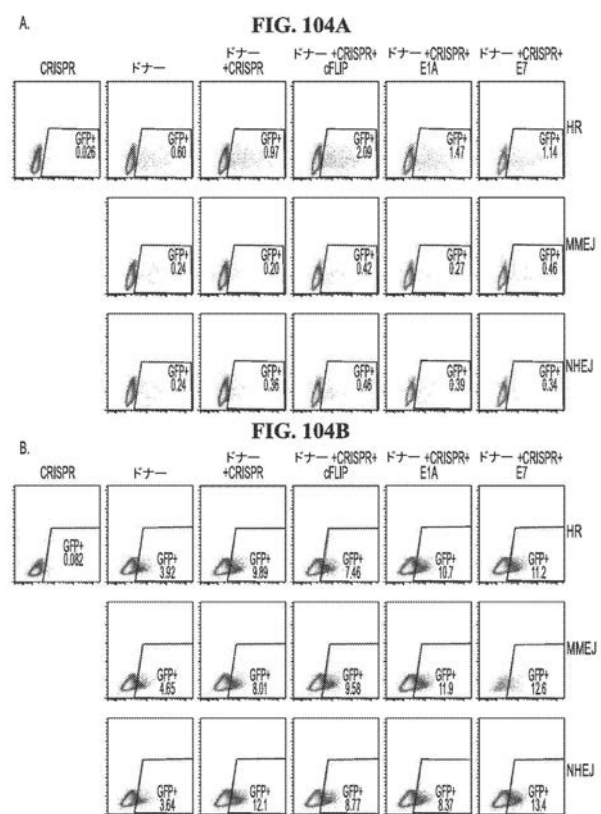
【図 102】



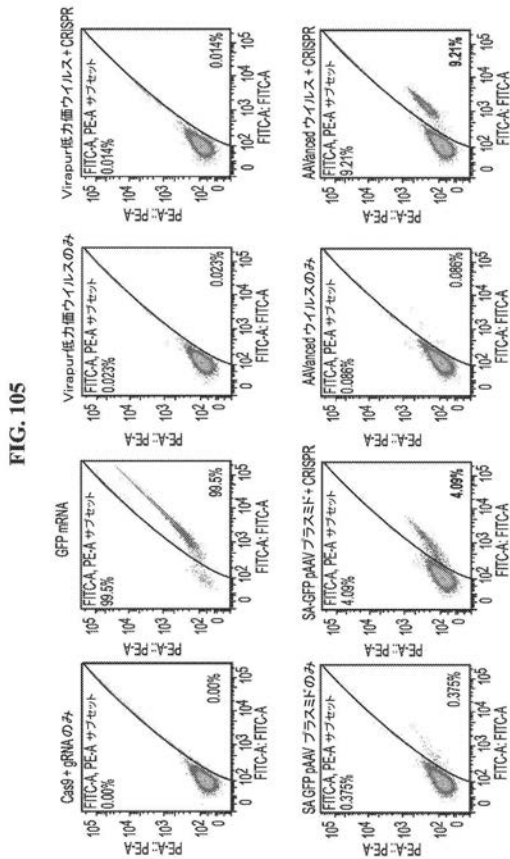
【図 103】



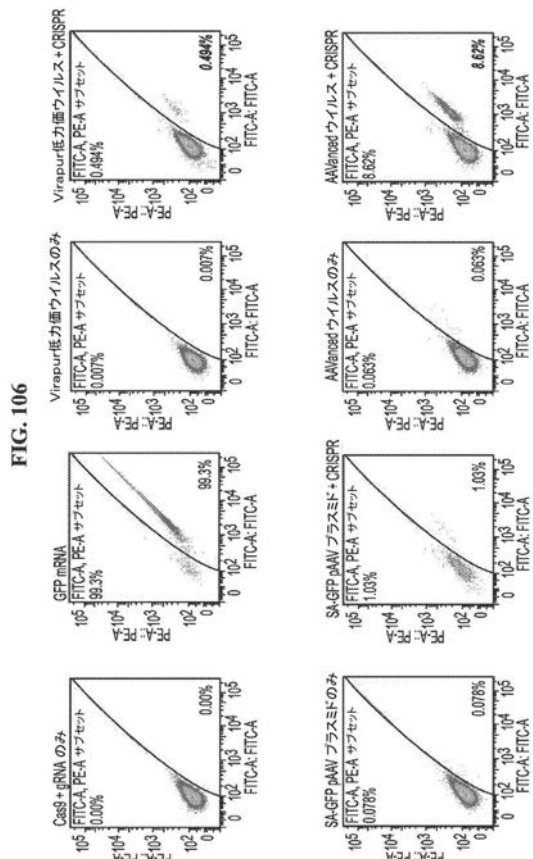
【図 104】



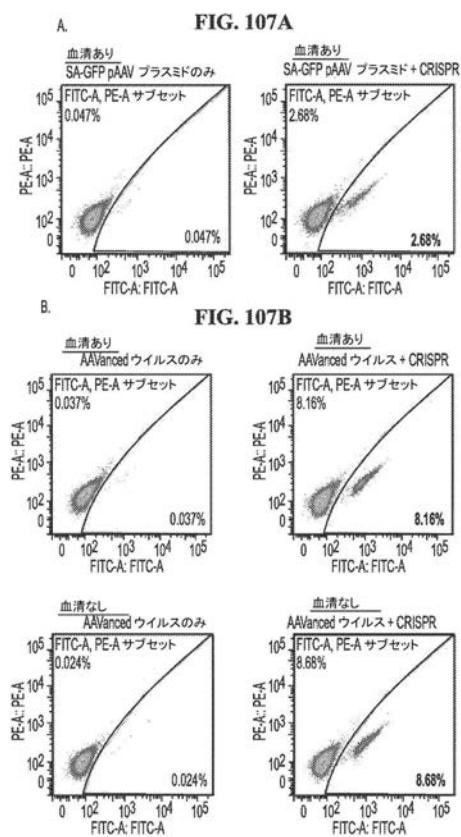
【図 105】



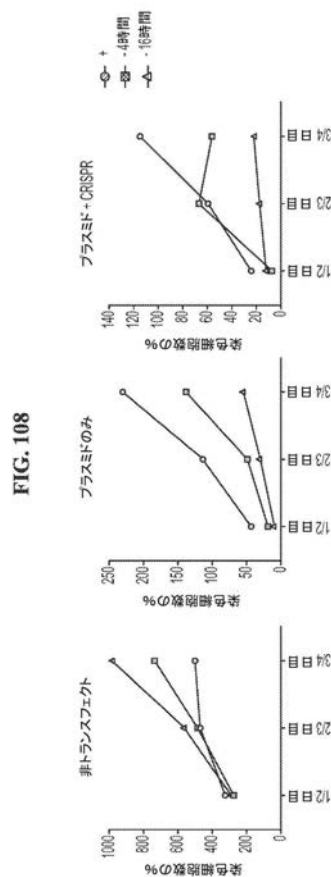
【図 106】



【図 107】

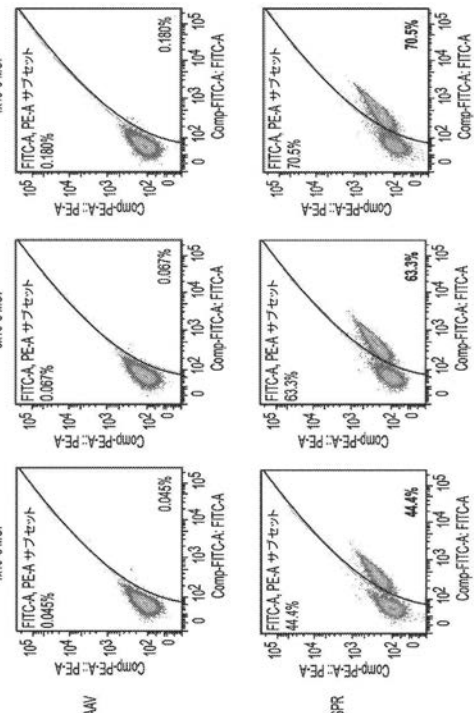


【図 108】



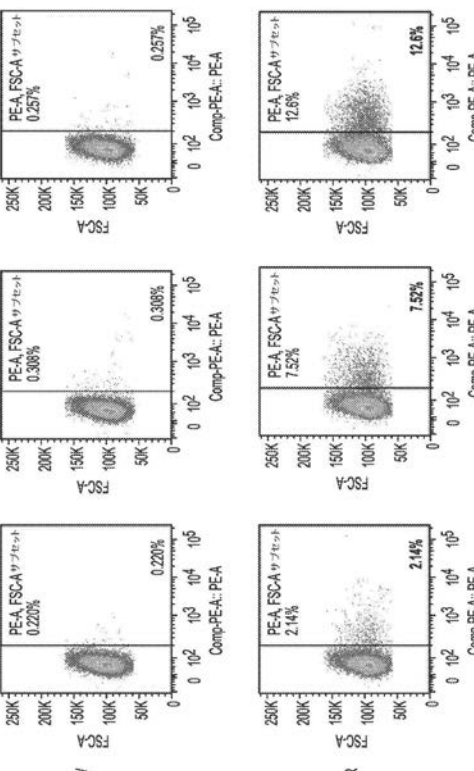
【 図 1 1 0 】

FIG. 110

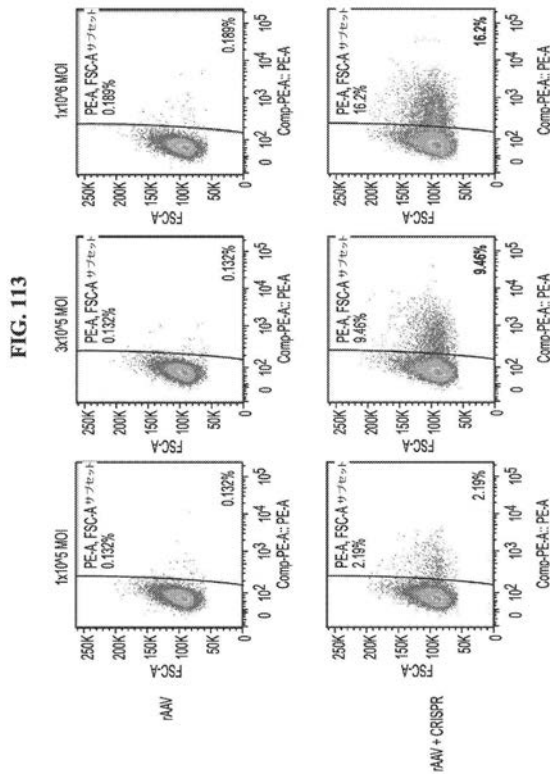


【图 1 1 2】

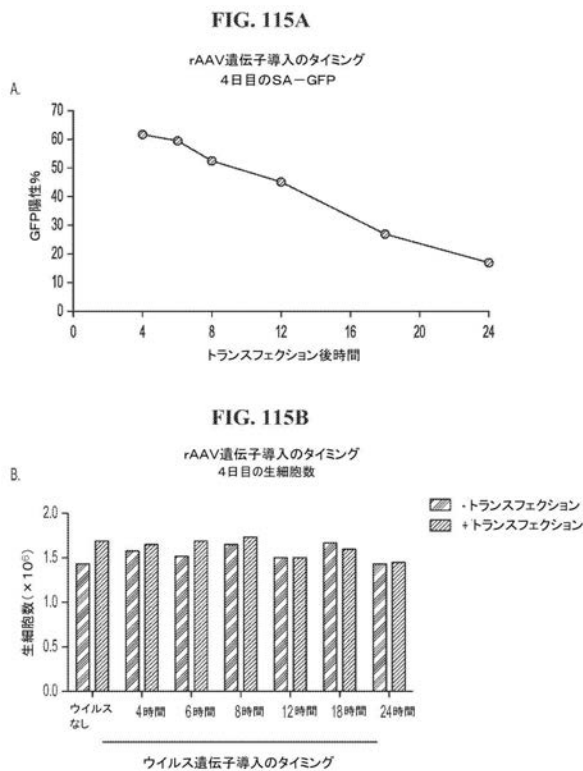
FIG. 112



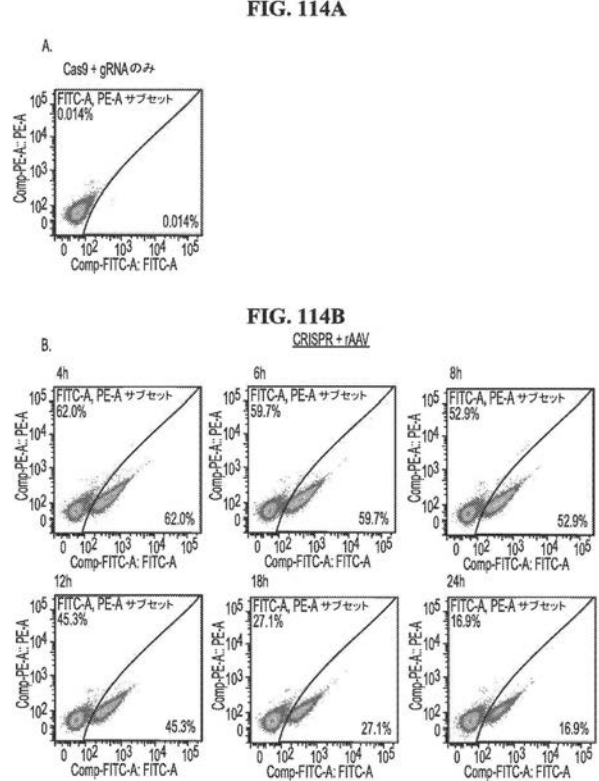
【図 1 1 3】



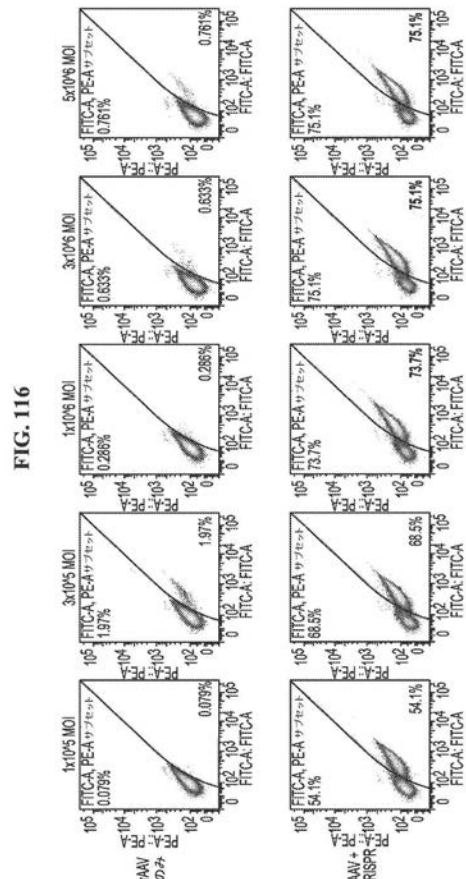
【図 1 1 5】



【図 1 1 4】



【図 1 1 6】



【図 117】

FIG. 117A

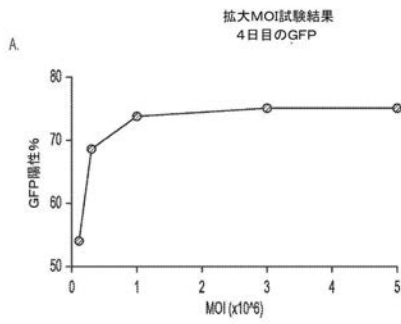
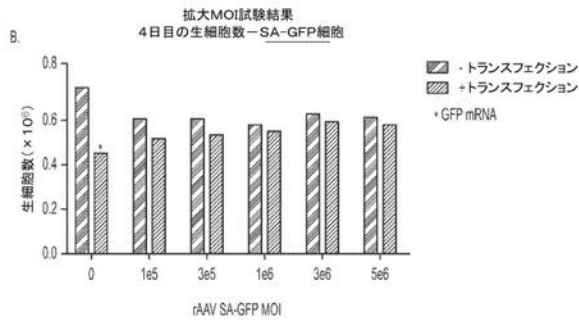
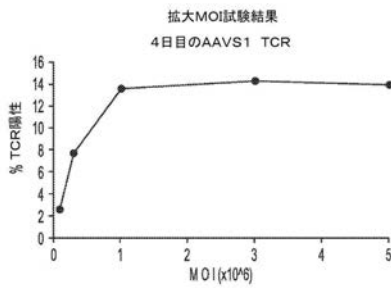


FIG. 117B



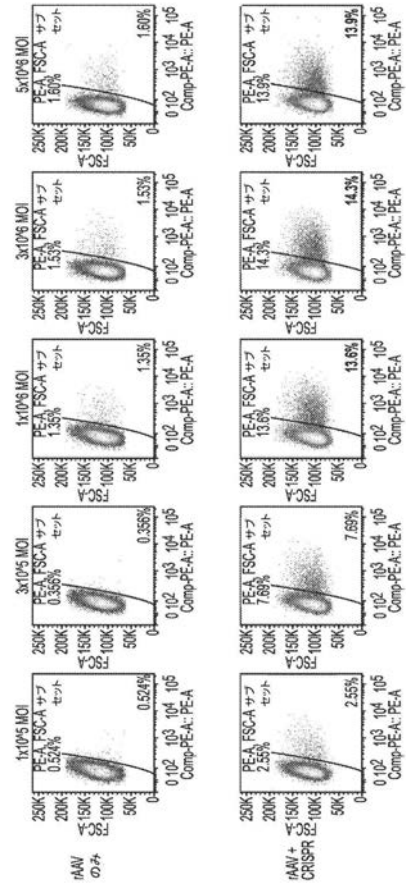
【図 119】

FIG. 119



【図 118】

FIG. 118



【図 120】

FIG. 120A

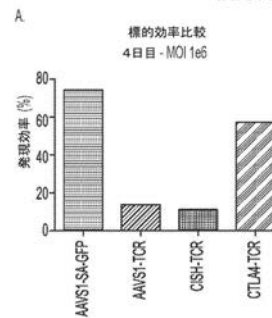
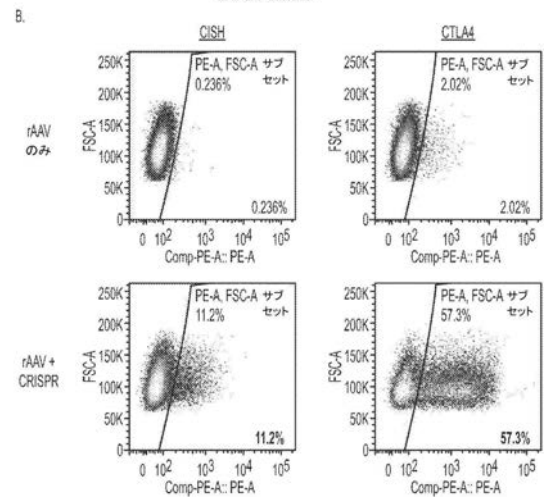
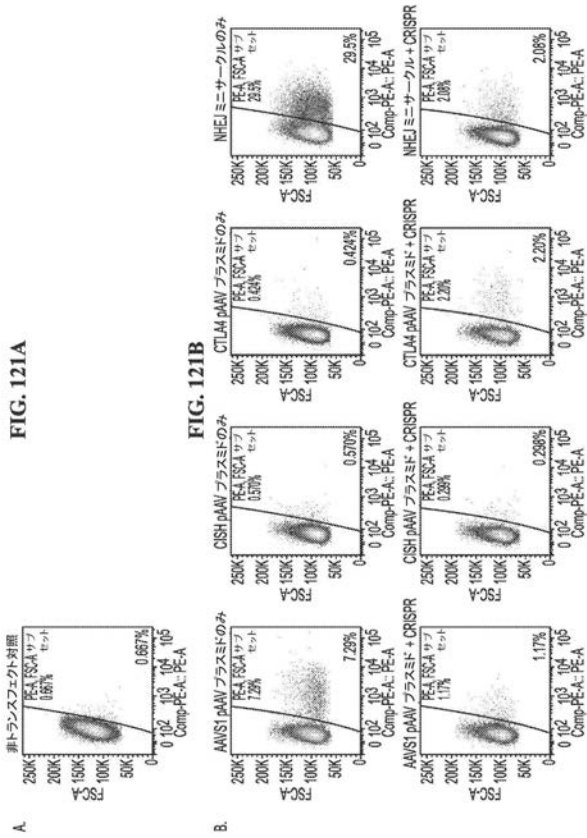


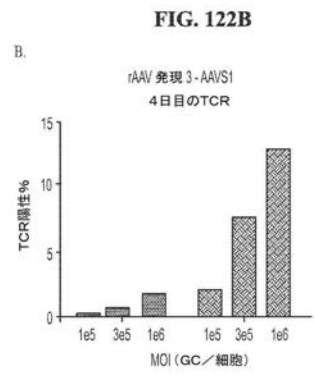
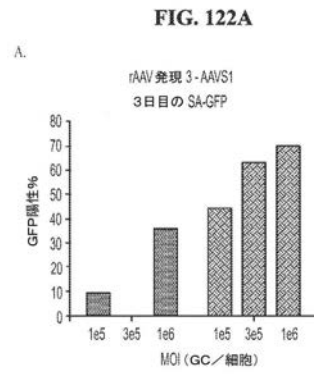
FIG. 120B



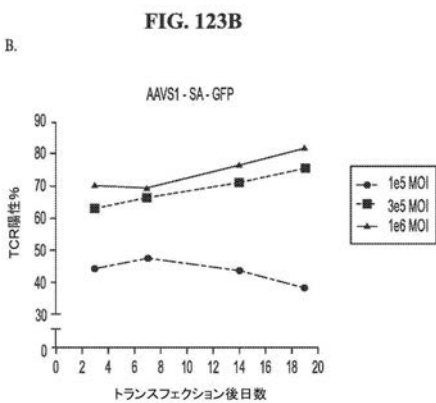
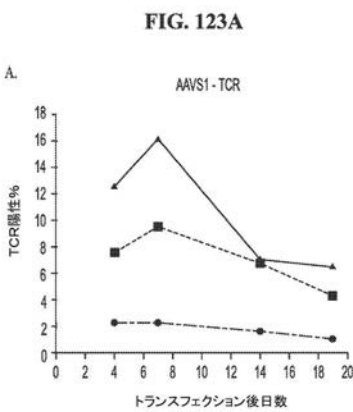
【図 1 2 1】



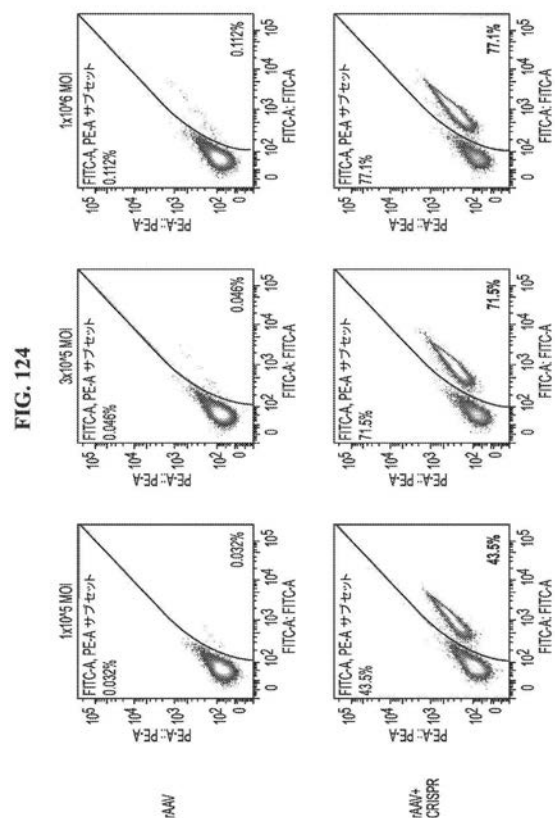
【図 1 2 2】



【図 1 2 3】

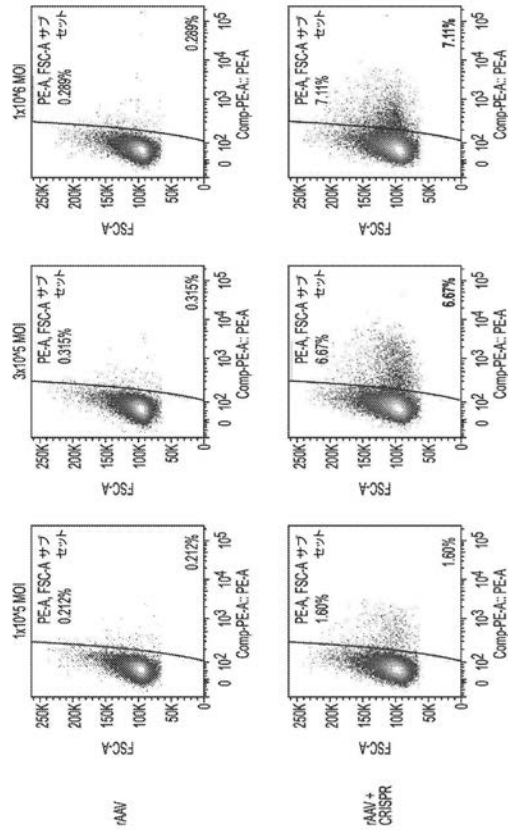


【図 1 2 4】



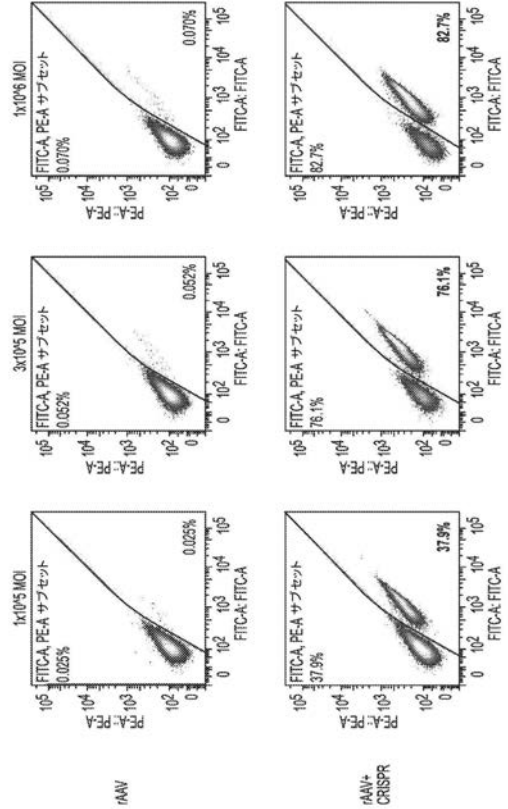
【図 125】

FIG. 125



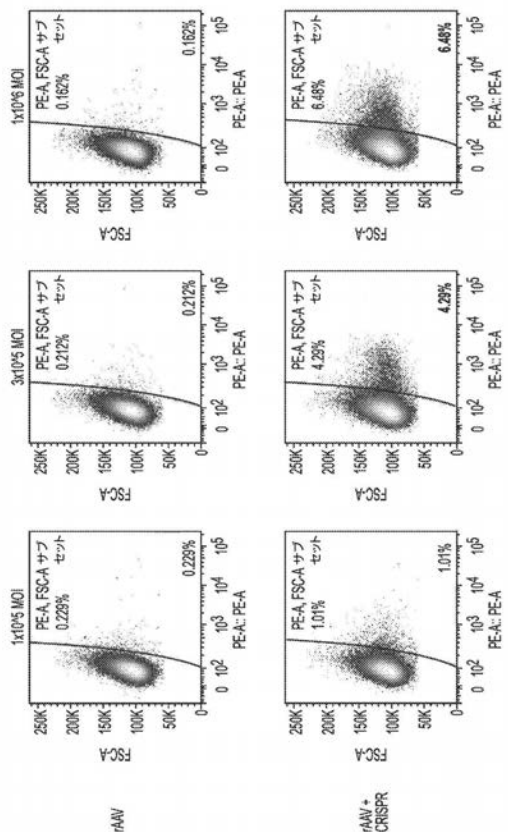
【図 126】

FIG. 126



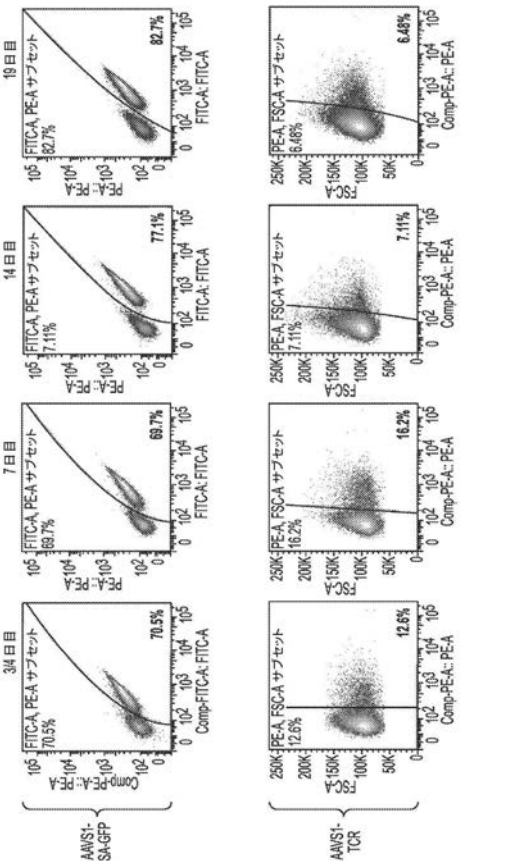
【図 127】

FIG. 127

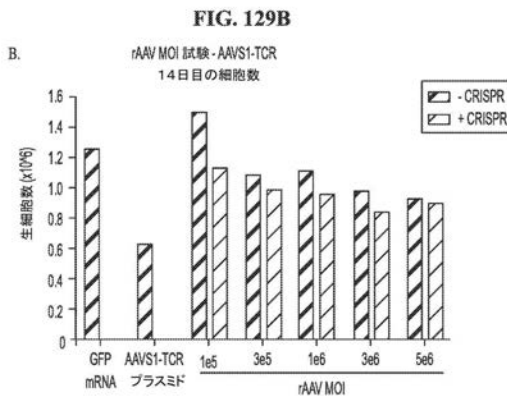
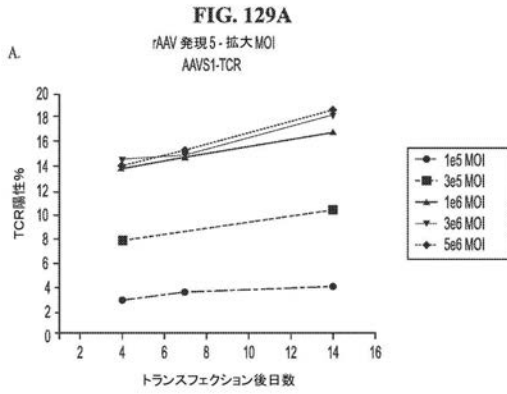


【図 128】

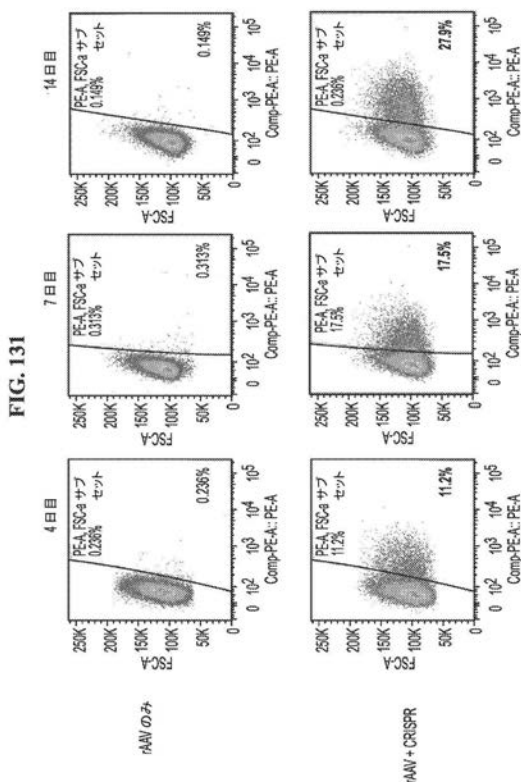
FIG. 128



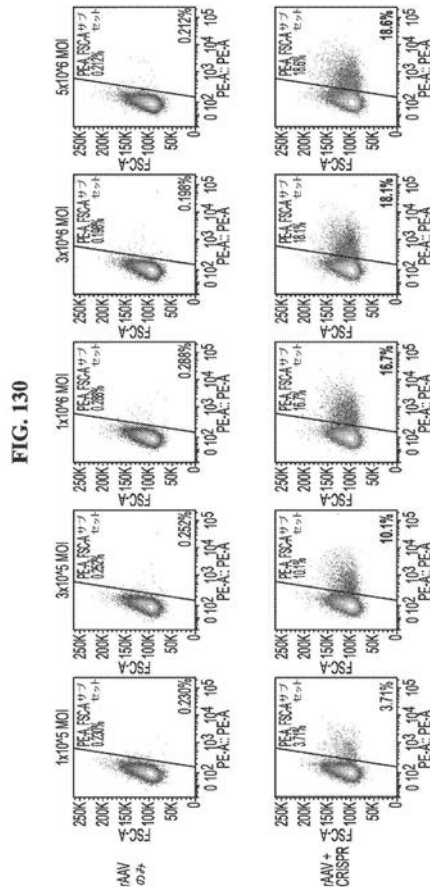
【図 129】



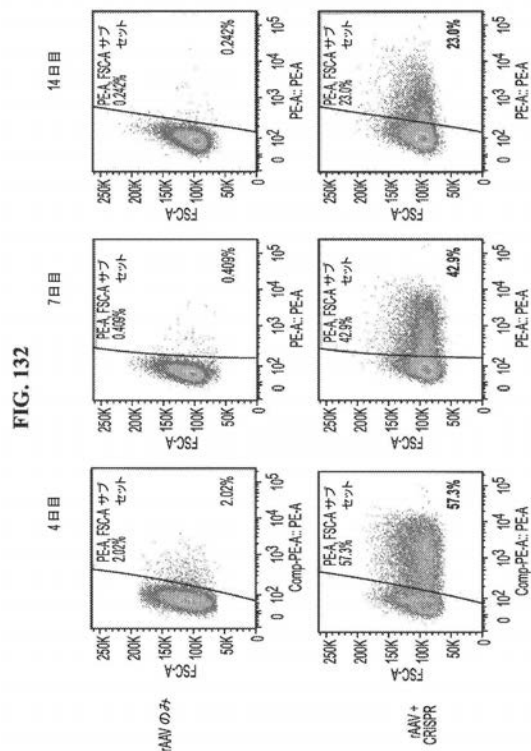
【図 131】



【図 130】



【図 132】



【図 1 3 3】

FIG. 133A

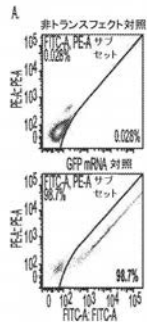
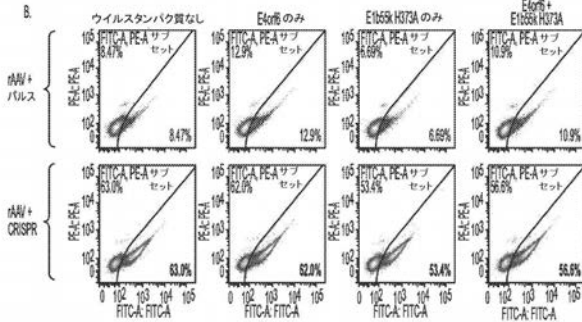
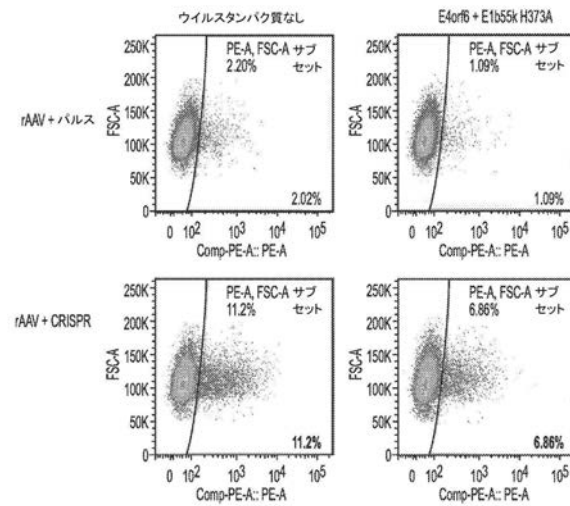


FIG. 133B



【図 1 3 4】

FIG. 134



【図 1 3 5】

FIG. 135A

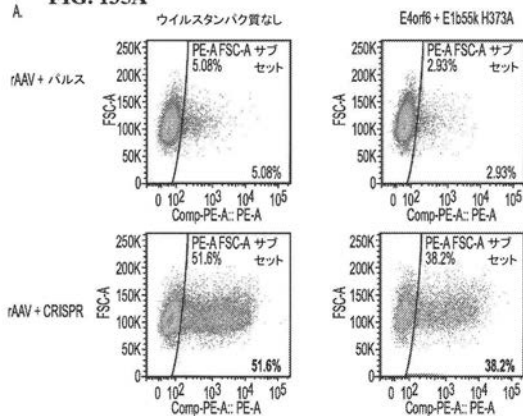
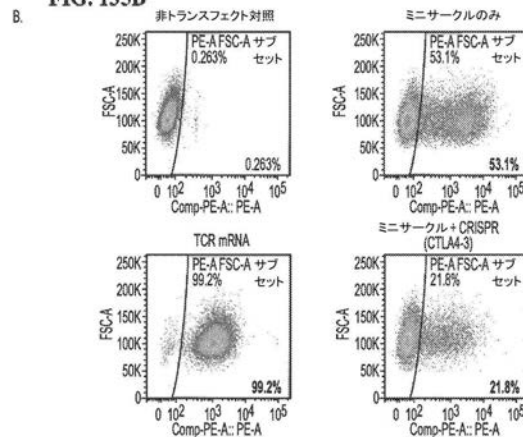


FIG. 135B



【図 1 3 6】

FIG. 136A

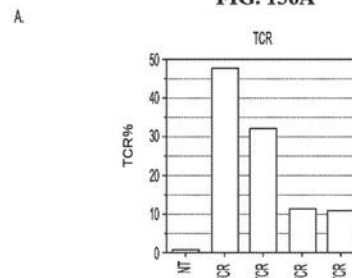
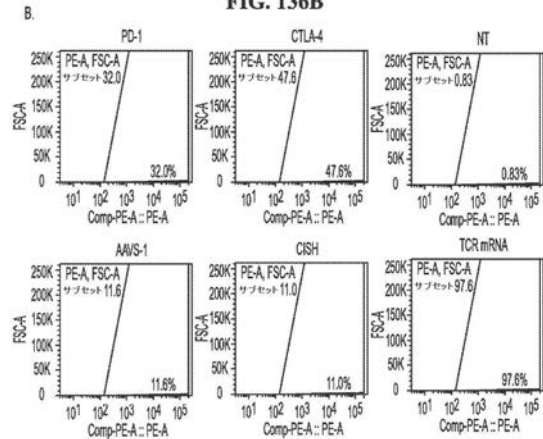
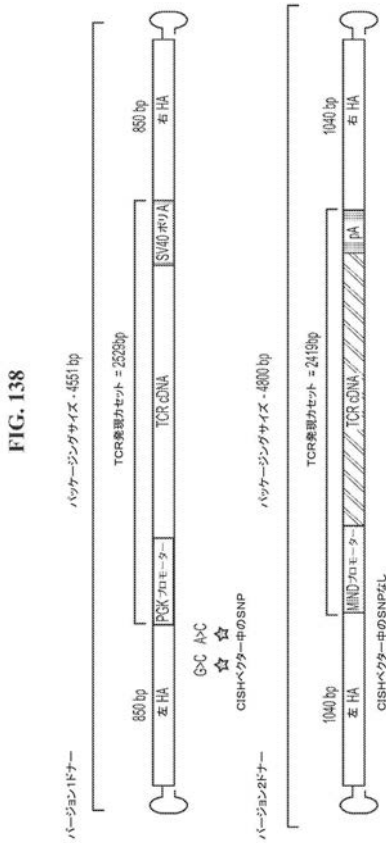


FIG. 136B



【图 1 3 8】



【図 1 4 0】

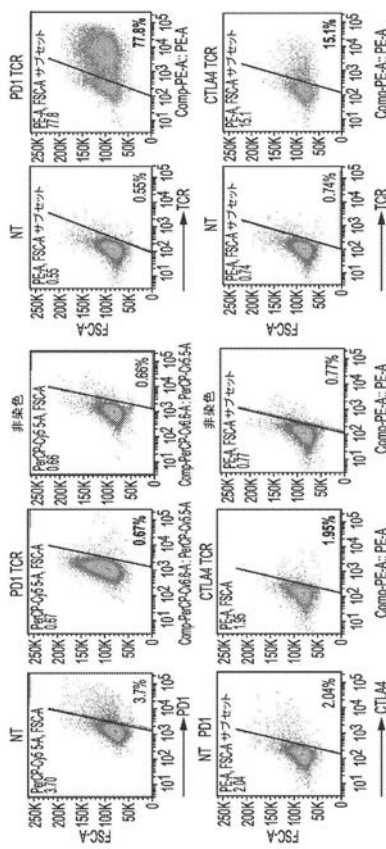


FIG. 140

【図 1 4 1】

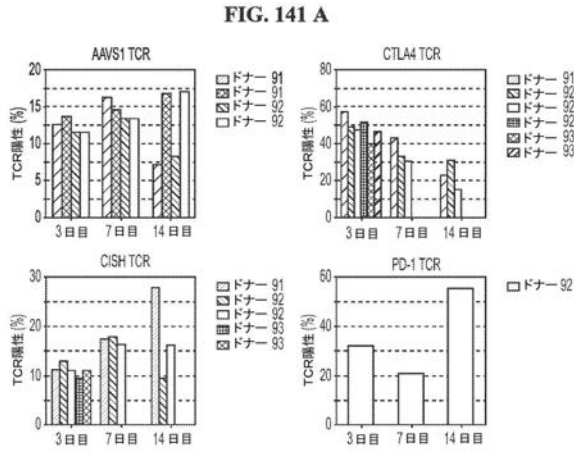
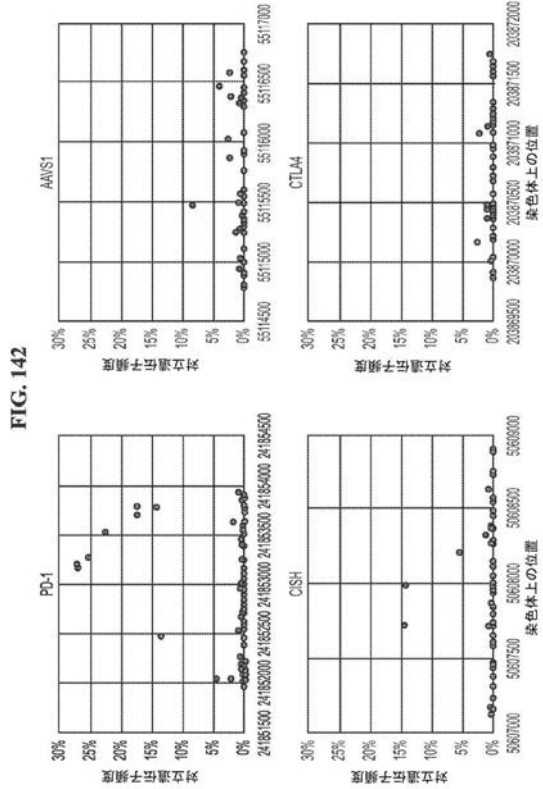


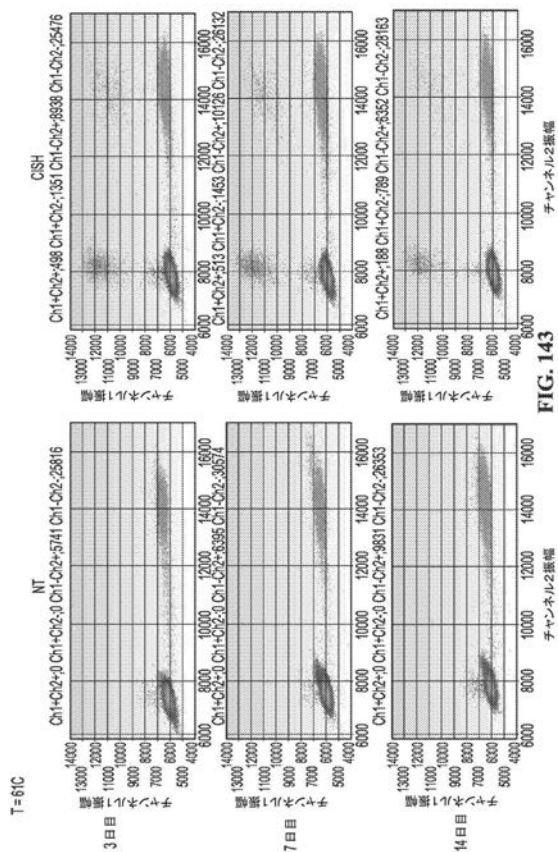
FIG. 141 B

	AAVS1	CTLA4	CISH	PD-1
ドナー 91	なし	なし	2 SNPs	5 SNPs
ドナー 92	なし	なし	2 SNPs	なし
ドナー 93	1 SNP	なし	2 SNPs	なし

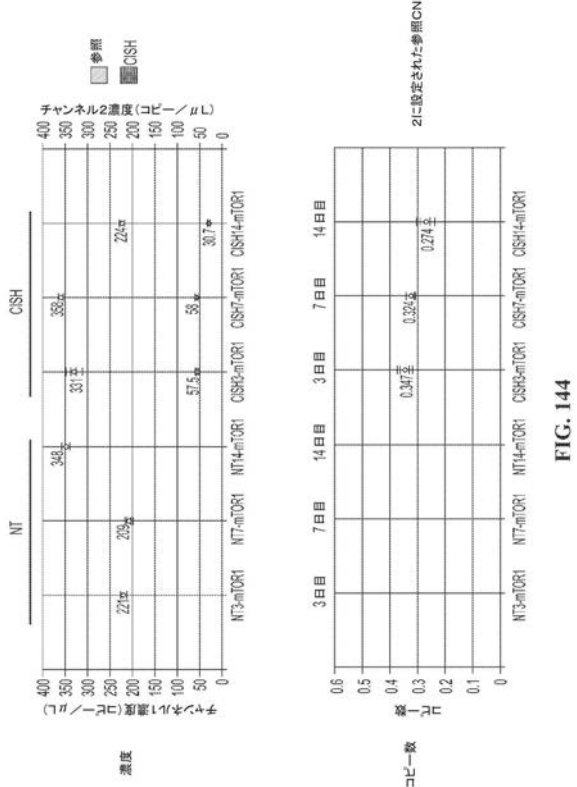
【図 1 4 2】



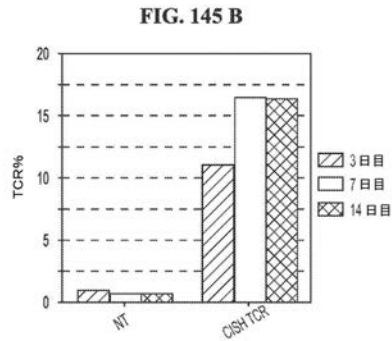
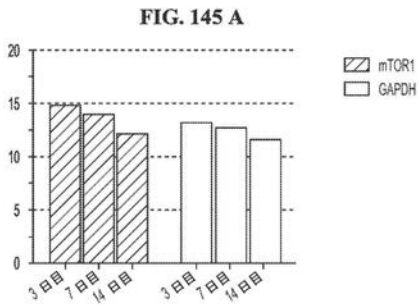
【図 1 4 3】



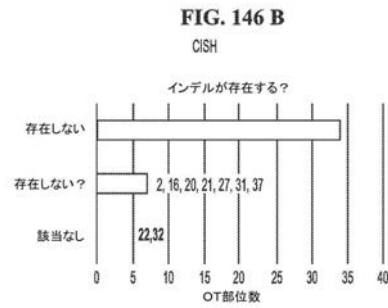
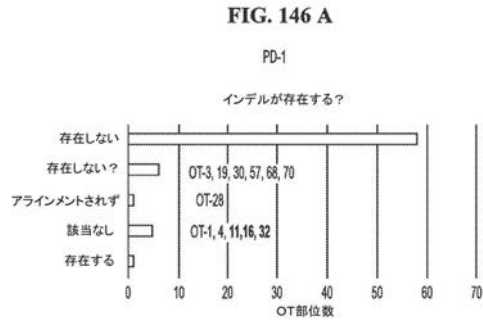
【図 1 4 4】



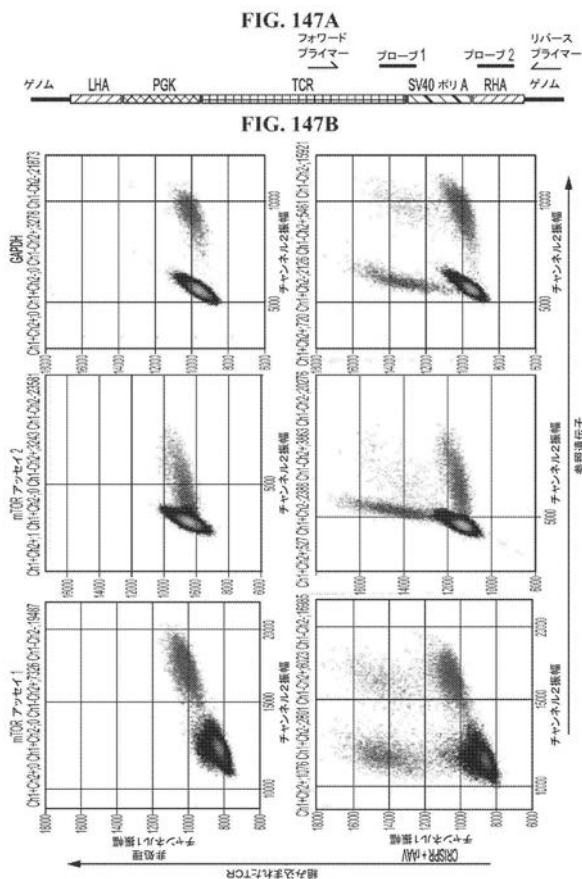
【図 1 4 5】



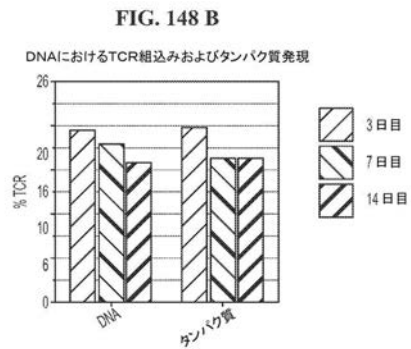
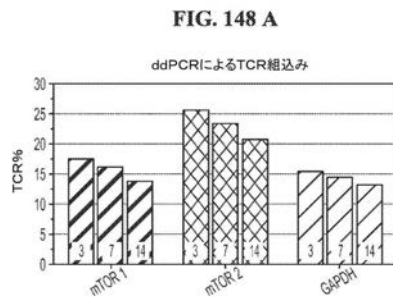
【図 1 4 6】



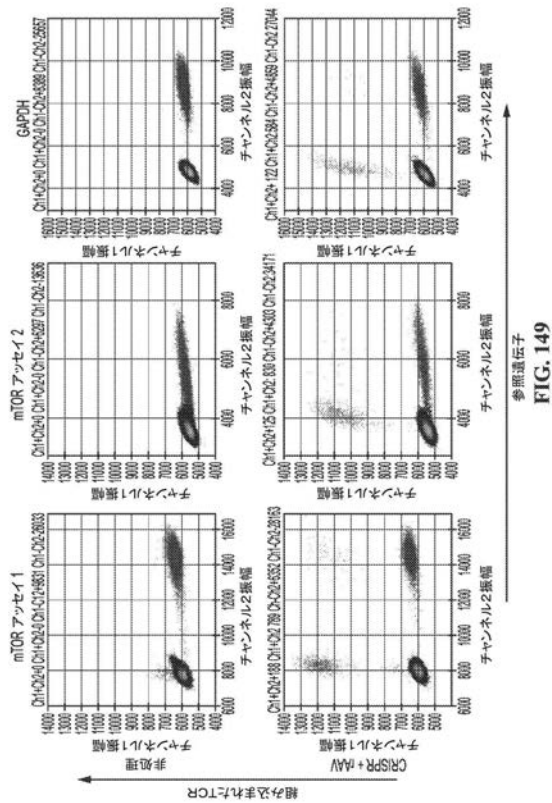
【図 1 4 7】



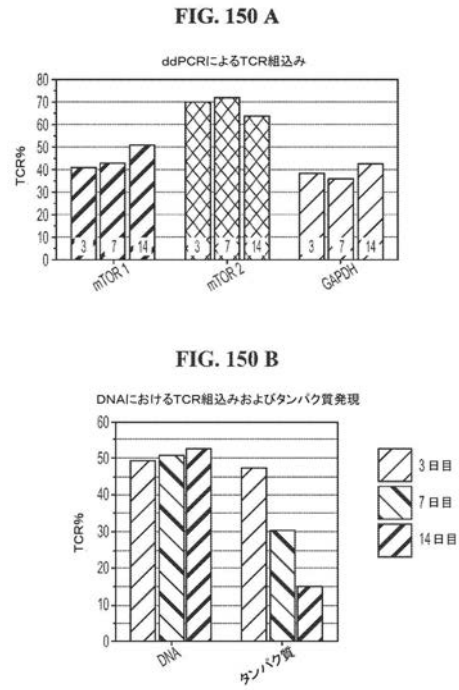
【図 1 4 8】



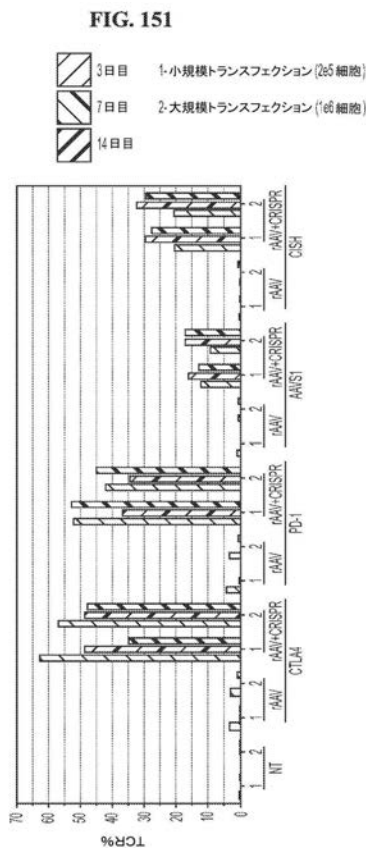
【 図 1 4 9 】



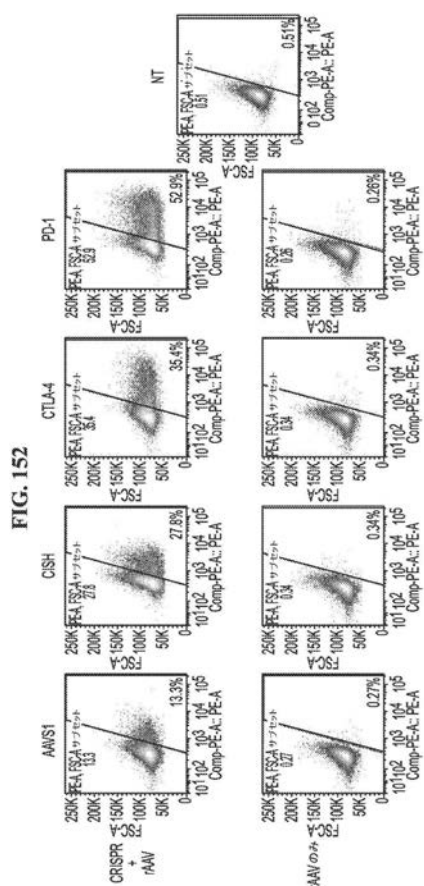
【図 1 5 0】



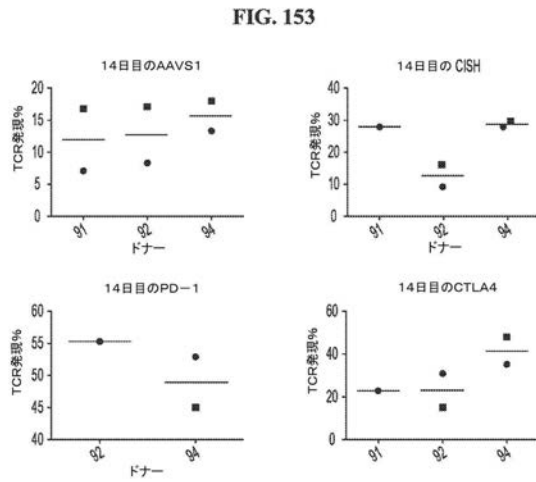
【 図 1 5 1 】



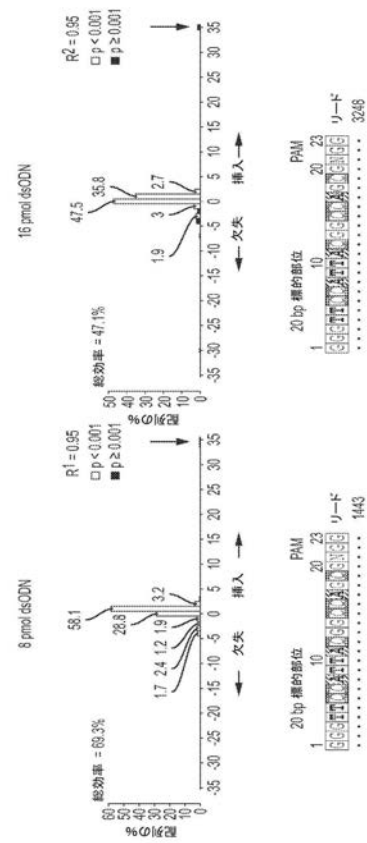
【図 1 5 2】



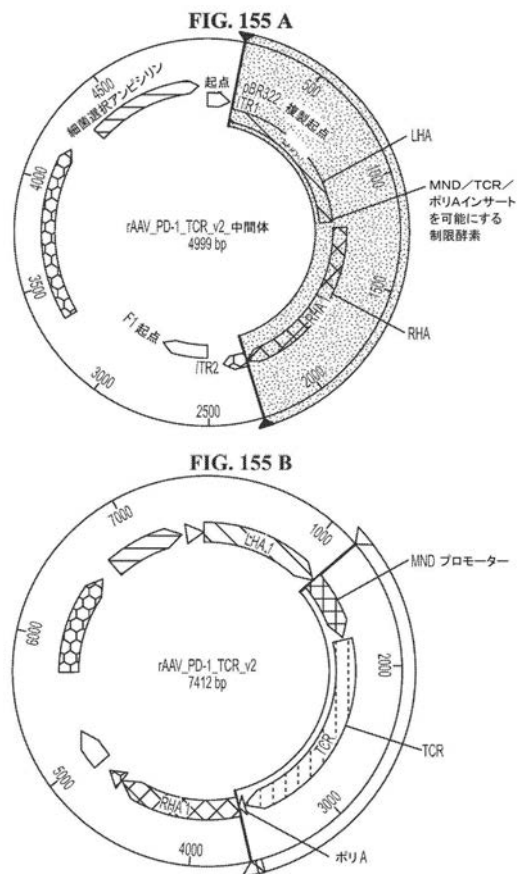
【図 153】



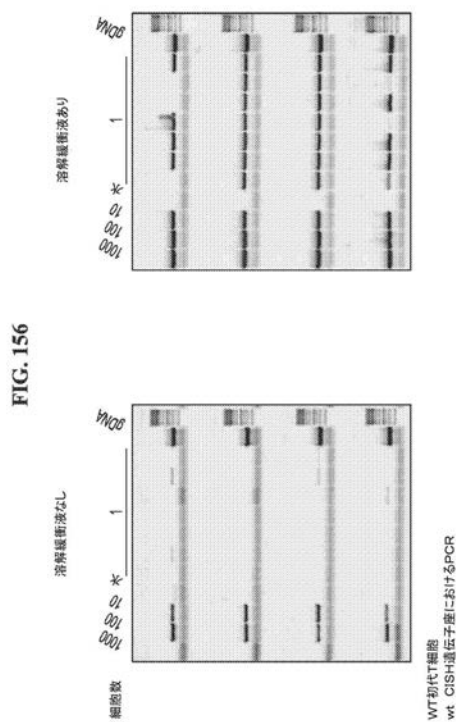
【図 154】



【図 155】

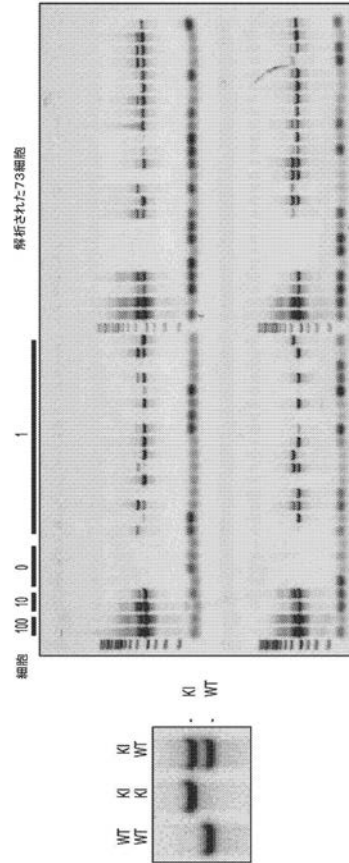


【図 156】

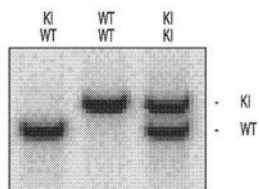
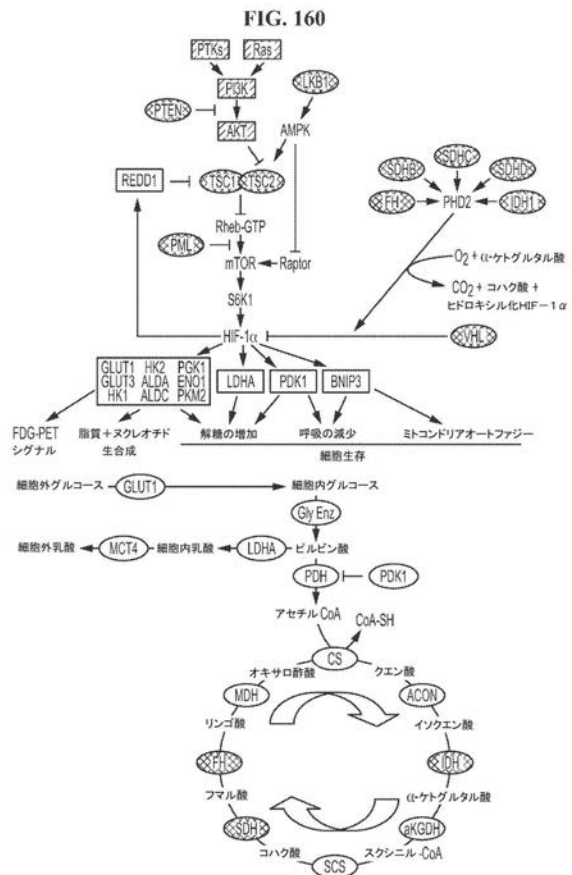


【图 1 5 8】

FIG. 158



【図 1 6 0】



【配列表】
2019531755000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/058605

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 35/12; A61K 48/00; C12N 15/64; C12N 15/86; C12N 15/90 (2017.01)

CPC - A61K 35/12; A61K 48/00; C12N 15/64; C12N 15/86; C12N 15/90; C12N 15/902; C12N 15/907; C12N 2750/14111; C12N 2750/14143; C12N 2800/80 (2017.08)

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)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

USPC - 424/93.7; 435/254.11; 435/325; 435/366 (keyword delimited)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GWIAZDA et al. "High Efficiency CRISPR/Cas9-mediated Gene Editing in Primary Human T-cells Using Mutant Adenoviral E4orf6/E1b55k "Helper" Proteins," Mol Ther, 16 May 2016 (16.05.2016), Vol. 24, No. 9, Pgs. 1570-1580. entire document	2, 6-8, 15
Y	CHEN et al. "Silencing of episomal transgene expression by plasmid bacterial DNA elements in vivo," Gene Ther, 01 May 2004 (01.05.2004), Vol. 11, No. 10, Pgs. 856-864. entire document	1, 3-5, 9-11, 14, 22, 29-33, 38, 47, 48, 54, 55, 63-67
Y	SATHER et al. "Efficient modification of CCR5 in primary human hematopoietic cells using a megaTAL nuclease and AAV donor template," Sci Transl Med, 30 September 2015 (30.09.2015), Vol. 7, No. 307ra156, Pgs. 1-14. entire document	1, 4, 5, 9-11, 14, 22, 29-33, 38, 47, 48, 54, 63-67
Y	MONJEZI et al. "Enhanced CAR T-cell engineering using non-viral Sleeping Beauty transposition from minicircle vectors," Leukemia, 24 June 2016 (24.06.2016), Vol. 31, No. 1, Pgs. 186-194. entire document	3, 29-32
Y	HIRATA et al. "Targeted transgene insertion into human chromosomes by adeno-associated virus vectors," Nat Biotechnol, 01 July 2002 (01.07.2002), Vol. 20, No. 7, Pgs. 735-738. entire document	5
Y	WO 2016/183345 A1 (SEATTLE CHILDREN'S HOSPITAL) 17 November 2016 (17.11.2016) entire document	54, 55, 63
P, X		1-11, 14, 15, 22, 29-33, 38, 47, 48, 54, 55, 63-67

☐ 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

"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

"G" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 December 2017

Date of mailing of the international search report

12 JAN 2018

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Blaine R. Copenheaver

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/058605

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 12, 13, 16-21, 23-28, 34-37, 39-46, 49-53, 56-62
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/12	(2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 0 0
A 6 1 K 35/12	(2015.01)	C 1 2 N	15/12	
		A 6 1 K	35/12	

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, 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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ヘンリー, トーマス

イギリス国 シービー7 5ゼットイー ケンブリッジシャー, ソハム, サイプリアン ラスト ウェイ 7 5

(72)発明者 ローズ, エリック

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 5 7 0 9, カミノ, ポニー エクスプレス トレイル 4 3 4 7

(72)発明者 チョードリー, モダシール

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 0 1 9, ニューヨーク, セントラル パーク サウス 1 0 6 ナンバー 2 6ディー

(72)発明者 モリアリティ, ブランデン

アメリカ合衆国 ミネソタ 5 5 1 2 6, ショアビュー, シェアウッド ロード 1 5 2 0

(72)発明者 ウェバー, ビュー

アメリカ合衆国 ミネソタ 5 5 4 4 8, クーン ラピッズ, 1 3 0ティーエイチ サークル エヌダブリュー 2 6 0 7

Fターム(参考) 4B065 AA93X AA93Y AA95X AA95Y AB01 BA01 BA02 CA24 CA44 CA46

4C087 AA03 AA10 BB65 CA12 CA20 NA20