(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公表特許公報(A)　　(11)公表番号
特表2022-539248
(P2022-539248A)
(43)公表日　令和4年9月7日(2022.9.7)

| (51)国際特許分類 | | FI | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|
| *Ｃ１２Ｎ* | *15/861 (2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 15/861 | ＺＺＮＡ　４Ｂ０６５ |
| *Ｃ１２Ｎ* | *15/34 (2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 15/34 | ４Ｃ０８４ |
| *Ｃ１２Ｎ* | *7/01 (2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 7/01 | ４Ｃ０８６ |
| *Ａ６１Ｋ* | *48/00 (2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 48/00 | ４Ｃ２０６ |
| *Ａ６１Ｐ* | *35/00 (2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 35/00 | |

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全484頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-500051(P2022-500051)
(86)(22)出願日　令和2年7月2日(2020.7.2)
(85)翻訳文提出日　令和4年3月3日(2022.3.3)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/040756
(87)国際公開番号　WO2021/003432
(87)国際公開日　令和3年1月7日(2021.1.7)
(31)優先権主張番号　62/869,907
(32)優先日　令和1年7月2日(2019.7.2)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/935,507
(32)優先日　令和1年11月14日(2019.11.14)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/009,385
最終頁に続く

(71)出願人　506139369
フレッド ハッチンソン キャンサー リサーチ センター
アメリカ合衆国 ワシントン州 シアトル フェアビュー アベニュー ノース １１００
(71)出願人　517075883
ユニバーシティ オブ ワシントン
Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ
アメリカ合衆国 ９８１０５ ワシントン，シアトル，スイート ４００，ルーズベルト ウェイ エヌイー ４５４５
４５４５ Ｒｏｏｓｅｖｅｌｔ Ｗａｙ ＮＥ，Ｓｕｉｔｅ ４００，Ｓｅａｔ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　組換えＡＤ３５ベクター及び関連遺伝子治療改善

(57)【要約】
本開示は、とりわけ、ヘルパー依存型アデノウイルス血清型３５型（Ａｄ３５）ベクターを提供する。さまざまな実施形態において、ヘルパー依存型Ａｄ３５ベクターは、治療用ペイロードを、それを必要とする対象に送達するために使用され得る。ペイロードの例は、補充タンパク質をコードするもの、抗体をコードするもの、ＣＡＲをコードするもの、ＴＣＲをコードするもの、低分子ＲＮＡをコードするもの、及びゲノム編集系をコードするものであり得る。ある特定の実施形態では、ヘルパー依存型Ａｄ３５ベクターは、ペイロードが宿主細胞ゲノムに組み込まれるように操作される。本開示は、ヘルパー依存型Ａｄ３５ベクターを、それを必要とする対象に投与することを含む遺伝子治療方法をさらに含む。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
組換えアデノウイルス血清型３５型（Ａｄ３５）ベクター産生系であって、
Ａｄ３５ファイバーシャフトをコードする核酸配列、
Ａｄ３５ファイバーノブをコードする核酸配列、及び
Ａｄ３５パッケージング配列の少なくとも一部と隣接するリコンビナーゼ同方向反復配列（ＤＲ）、
を含む組換えＡｄ３５ヘルパーゲノムと、
５’Ａｄ３５逆方向末端反復配列（ＩＴＲ）、
３’Ａｄ３５　ＩＴＲ、
Ａｄ３５パッケージング配列、及び
少なくとも１つの異種発現産物をコードする核酸配列
を含む組換えヘルパー依存型Ａｄ３５ドナーゲノムと、
を含む、前記組換えＡｄ３５ベクター産生系。
【請求項２】
組換えアデノウイルス血清型３５型（Ａｄ３５）ヘルパーベクターであって、
Ａｄ３５ファイバーシャフトと、
Ａｄ３５ファイバーノブと、
Ａｄ３５パッケージング配列の少なくとも一部と隣接するリコンビナーゼ同方向反復配列（ＤＲ）を含むＡｄ３５ゲノムと、
を含む、前記組換えＡｄ３５ヘルパーベクター。
【請求項３】
組換えアデノウイルス血清型３５型（Ａｄ３５）ヘルパーゲノムであって、
Ａｄ３５ファイバーシャフトをコードする核酸配列と、
Ａｄ３５ファイバーノブをコードする核酸配列と、
Ａｄ３５パッケージング配列の少なくとも一部と隣接するリコンビナーゼ同方向反復配列（ＤＲ）と、
を含む、前記組換えＡｄ３５ヘルパーゲノム。
【請求項４】
組換えヘルパー依存型アデノウイルス血清型３５型（Ａｄ３５）ドナーベクターであって、
５’Ａｄ３５逆方向末端反復配列（ＩＴＲ）、
３’Ａｄ３５　ＩＴＲ、
Ａｄ３５パッケージング配列、及び
ゲノムに、Ａｄ３５ウイルス構造タンパク質をコードする核酸配列を含まない、少なくとも１つの異種発現産物をコードする核酸配列、
を含む核酸配列と、
Ａｄ３５ファイバーシャフト及び／またはＡｄ３５ファイバーノブと、
を含む、前記組換えヘルパー依存型Ａｄ３５ドナーベクター。
【請求項５】
組換えヘルパー依存型アデノウイルス血清型３５型（Ａｄ３５）ドナーゲノムであって、
５’Ａｄ３５逆方向末端反復配列（ＩＴＲ）と、
３’Ａｄ３５　ＩＴＲと、
Ａｄ３５パッケージング配列と、
少なくとも１つの異種発現産物をコードする核酸配列と、
を含み、
前記Ａｄ３５ドナーゲノムが、野生型Ａｄ３５ゲノムによってコードされる発現産物をコードする核酸配列を含まない、前記組換えヘルパー依存型Ａｄ３５ドナーゲノム。
【請求項６】

組換えヘルパー依存型アデノウイルス血清型３５型（Ａｄ３５）ドナーベクターを産生させる方法であって、前記方法が、細胞の培養物から前記組換えヘルパー依存型Ａｄ３５ドナーベクターを単離することを含み、前記細胞が、
Ａｄ３５ファイバーシャフトをコードする核酸配列、
Ａｄ３５ファイバーノブをコードする核酸配列、及び
Ａｄ３５パッケージング配列の少なくとも一部と隣接するリコンビナーゼ同方向反復配列（ＤＲ）
を含む組換えＡｄ３５ヘルパーゲノムと、
５’Ａｄ３５逆方向末端反復配列（ＩＴＲ）、
３’Ａｄ３５　ＩＴＲ、
Ａｄ３５パッケージング配列、及び
少なくとも１つの異種発現産物をコードする核酸配列
を含む組換えヘルパー依存型Ａｄ３５ドナーゲノムと、
を含む、前記方法。
【請求項７】
組換えアデノウイルス血清型３５型（Ａｄ３５）産生系であって、
Ａｄ３５ファイバーシャフトをコードする核酸配列、
Ａｄ３５ファイバーノブをコードする核酸配列、及び
前記Ａｄ３５パッケージングシグナルは機能的に破壊するが、前記５’Ａｄ３５逆方向末端反復配列（ＩＴＲ）は機能的に破壊しない、Ａｄ３５ゲノムの５’末端から５５０ヌクレオチド以内に位置するリコンビナーゼ同方向反復配列（ＤＲ）
を含む組換えＡｄ３５ヘルパーゲノムと、
５’Ａｄ３５　ＩＴＲ、
３’Ａｄ３５　ＩＴＲ、
Ａｄ３５パッケージング配列、及び
少なくとも１つの異種発現産物をコードする核酸配列
を含む組換えＡｄ３５ドナーゲノムと、
を含む、前記組換えＡｄ３５産生系。
【請求項８】
組換えアデノウイルス血清型３５型（Ａｄ３５）ヘルパーベクターであって、
Ａｄ３５ファイバーシャフトと、
Ａｄ３５ファイバーノブと、
前記Ａｄ３５パッケージングシグナルは機能的に破壊するが、前記５’Ａｄ３５逆方向末端反復配列（ＩＴＲ）は機能的に破壊しない、Ａｄ３５ゲノムの５’末端から５５０ヌクレオチド以内に位置するリコンビナーゼ同方向反復配列（ＤＲ）を含むＡｄ３５ゲノムと、
を含む、前記組換えＡｄ３５ヘルパーベクター。
【請求項９】
組換えアデノウイルス血清型３５型（Ａｄ３５）ヘルパーゲノムであって、
Ａｄ３５ファイバーシャフトをコードする核酸配列と、
Ａｄ３５ファイバーノブをコードする核酸配列と、
前記Ａｄ３５パッケージングシグナルは機能的に破壊するが、前記５’Ａｄ３５逆方向末端反復配列（ＩＴＲ）は機能的に破壊しない、Ａｄ３５ゲノムの５’末端から５５０ヌクレオチド以内に位置するリコンビナーゼ同方向反復配列（ＤＲ）と、
を含む、前記組換えＡｄ３５ヘルパーゲノム。
【請求項１０】
組換えヘルパー依存型アデノウイルス血清型３５型（Ａｄ３５）ドナーベクターを産生させる方法であって、前記方法が、細胞の培養物から前記組換えヘルパー依存型Ａｄ３５ドナーベクターを単離することを含み、前記細胞が、
Ａｄ３５ファイバーシャフトをコードする核酸配列、

Ａｄ３５ファイバーノブをコードする核酸配列、及び
前記Ａｄ３５パッケージングシグナルは機能的に破壊するが、前記５’Ａｄ３５逆方向末端反復配列（ＩＴＲ）は機能的に破壊しない、Ａｄ３５ゲノムの５’末端から５５０ヌクレオチド以内に位置するリコンビナーゼ同方向反復配列（ＤＲ）
を含む組換えＡｄ３５ヘルパーゲノムと、
５’Ａｄ３５　ＩＴＲ、
３’Ａｄ３５　ＩＴＲ、
Ａｄ３５パッケージング配列、及び
少なくとも１つの異種発現産物をコードする核酸配列
を含む組換えＡｄ３５ドナーゲノムと、
を含む、前記方法。
【請求項１１】
前記Ａｄ３５ファイバーノブが、野生型Ａｄ３５ファイバーノブであるか、または
前記Ａｄ３５ファイバーノブが、操作されたＡｄ３５ファイバーノブであり、前記操作されたファイバーノブが、前記ファイバーノブとＣＤ４６との親和性を上昇させる変異を含む、請求項１～４または請求項６～１０のいずれか１項に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、ドナーベクター、または方法。
【請求項１２】
前記変異が、
Ｉｌｅ１９２Ｖａｌ、Ａｓｐ２０７Ｇｌｙ（もしくはＧｌｕ２０７Ｇｌｙ）、Ａｓｎ２１７Ａｓｐ、Ｔｈｒ２２６Ａｌａ、Ｔｈｒ２４５Ａｌａ、Ｔｈｒ２５４Ｐｒｏ、Ｉｌｅ２５６Ｌｅｕ、Ｉｌｅ２５６Ｖａｌ、Ａｒｇ２５９Ｃｙｓ、及びＡｒｇ２７９Ｈｉｓから選択される変異を含むか、または
Ｉｌｅ１９２Ｖａｌ、Ａｓｐ２０７Ｇｌｙ（もしくはＧｌｕ２０７Ｇｌｙ）、Ａｓｎ２１７Ａｓｐ、Ｔｈｒ２２６Ａｌａ、Ｔｈｒ２４５Ａｌａ、Ｔｈｒ２５４Ｐｒｏ、Ｉｌｅ２５６Ｌｅｕ、Ｉｌｅ２５６Ｖａｌ、Ａｒｇ２５９Ｃｙｓ、及びＡｒｇ２７９Ｈｉｓである変異のそれぞれを含む、請求項１１に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、ドナーベクター、または方法。
【請求項１３】
前記異種発現産物が、制御配列と機能可能なように連結された治療用発現産物を含み、任意選択で、前記治療用発現産物が、
（ａ）β－グロビンタンパク質またはγ－グロビンタンパク質、
（ｂ）抗体またはその免疫グロブリン鎖であって、任意選択で、前記抗体が抗ＣＤ３３抗体である、前記抗体またはその免疫グロブリン鎖、
（ｃ）第１の抗体またはその免疫グロブリン鎖及び第２の抗体またはその免疫グロブリン鎖であって、任意選択で、前記抗体が抗ＣＤ３３抗体である、前記第１の抗体またはその免疫グロブリン鎖及び前記第２の抗体またはその免疫グロブリン鎖、
（ｄ）ＣＲＩＳＰＲ関連ＲＮＡガイド型エンドヌクレアーゼ及び／またはガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）であって、任意選択で、前記ＣＲＩＳＰＲ関連ＲＮＡガイド型エンドヌクレアーゼがＣａｓ９またはｃｐｆ１を含む、前記ＣＲＩＳＰＲ関連ＲＮＡガイド型エンドヌクレアーゼ及び／または前記ｇＲＮＡ、
（ｅ）塩基エディター及び／またはｇＲＮＡであって、任意選択で、前記塩基エディターがシトシン塩基エディター（ＣＢＥ）またはアデニン塩基エディター（ＡＢＥ）であり、任意選択で、前記塩基エディターが、無能化Ｃａｓ９及び無能化ｃｐｆ１から選択される触媒的に無能化されたヌクレアーゼを含む、前記塩基エディター及び／または前記ｇＲＮＡ、
（ｆ）凝固因子、またはウイルス感染を遮断もしくは低減するタンパク質であって、任意選択で、前記治療用発現産物が第ＶＩＩ因子補充タンパク質または第ＶＩＩＩ因子補充タンパク質を含む、前記凝固因子、または前記ウイルス感染を遮断もしくは低減するタンパク質、

（ｇ）チェックポイント阻害剤、
（ｈ）キメラ抗原受容体または操作されたＴ細胞受容体、あるいは
（ｉ）γＣ、ＪＡＫ３、ＩＬ７ＲＡ、ＲＡＧ１、ＲＡＧ２、ＤＣＬＲＥ１Ｃ、ＰＲＫＤＣ、ＬＩＧ４、ＮＨＥＪ１、ＣＤ３Ｄ、ＣＤ３Ｅ、ＣＤ３Ｚ、ＣＤ３Ｇ、ＰＴＰＲＣ、ＺＡＰ７０、ＬＣＫ、ＡＫ２、ＡＤＡ、ＰＮＰ、ＷＨＮ、ＣＨＤ７、ＯＲＡＩ１、ＳＴＩＭ１、ＣＯＲＯ１Ａ、ＣＩＩＴＡ、ＲＦＸＡＮＫ、ＲＦＸ５、ＲＦＸＡＰ、ＲＭＲＰ、ＤＫＣ１、ＴＥＲＴ、ＴＩＮＦ２、ＤＣＬＲＥ１Ｂ、ＳＬＣ４６Ａ１、ＦａｎｃＡ、ＦａｎｃＢ、ＦａｎｃＣ、ＦａｎｃＤ１、ＦａｎｃＤ２、ＦａｎｃＥ、ＦａｎｃＦ、ＦａｎｃＧ、ＦａｎｃＩ、ＦａｎｃＪ、ＦａｎｃＬ、ＦａｎｃＭ、ＦａｎｃＮ、ＦａｎｃＯ、ＦａｎｃＰ、ＦａｎｃＱ、ＦａｎｃＲ、ＦａｎｃＳ、ＦａｎｃＴ、ＦａｎｃＵ、ＦａｎｃＶ、ＦａｎｃＷ、可溶性ＣＤ４０、ＣＴＬＡ、ＦａｓＬ、ＰＤ－Ｌ１に対する抗体、ＣＤ４に対する抗体、ＣＤ５に対する抗体、ＣＤ７に対する抗体、ＣＤ５２に対する抗体、ＩＬ－１に対する抗体、ＩＬ－２に対する抗体、ＩＬ－４に対する抗体、ＩＬ－６に対する抗体、ＩＬ－１０に対する抗体、ＴＮＦに対する抗体、自己反応性Ｔ細胞上に特異的に存在するＴＣＲに対する抗体、グロビンファミリー遺伝子、ＷＡＳ、ｐｈｏｘ、ジストロフィン、ピルビン酸キナーゼ、ＣＬＮ３、ＡＢＣＤ１、アリールスルファターゼＡ、ＳＦＴＰＢ、ＳＦＴＰＣ、ＮＬＸ２．１、ＡＢＣＡ３、ＧＡＴＡ１、リボソームタンパク質遺伝子、ＴＥＲＴ、ＴＥＲＣ、ＤＫＣ１、ＴＩＮＦ２、ＣＦＴＲ、ＬＲＲＫ２、ＰＡＲＫ２、ＰＡＲＫ７、ＰＩＮＫ１、ＳＮＣＡ、ＰＳＥＮ１、ＰＳＥＮ２、ＡＰＰ、ＳＯＤ１、ＴＤＰ４３、ＦＵＳ、ユビキリン２、及び／またはＣ９ＯＲＦ７２からなる群から選択されるタンパク質であって、任意選択で、前記タンパク質がＦａｎｃＡタンパク質である、前記タンパク質、
を含む、請求項１、請求項４～７、または請求項１０のいずれか１項に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ドナーゲノム、ドナーベクター、または方法。
【請求項１４】
前記ｇＲＮＡが、ＨＢＧ１、ＨＢＧ２、及び／または赤血球エンハンサーｂｃｌ１１ａの標的核酸配列に結合し、任意選択で、前記ｇＲＮＡが、γ－グロビンの発現が増加するように操作されるか、または前記ｇＲＮＡが、ＣＤ３３の一部をコードする標的核酸配列に結合し、任意選択で、前記ＣＤ３３がヒトＣＤ３３である、請求項１３（ｄ）または請求項１３（ｅ）に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ドナーゲノム、ドナーベクター、または方法。
【請求項１５】
前記治療用発現産物が、
β－グロビンタンパク質またはγ－グロビンタンパク質、ならびに
ＣＲＩＳＰＲ関連ＲＮＡガイド型エンドヌクレアーゼと、
ＨＢＧ１の標的核酸配列に結合するｇＲＮＡ、
ＨＢＧ２の標的核酸配列に結合するｇＲＮＡ、及び／または
Ｂｃｌ１１ａの標的核酸配列に結合するｇＲＮＡ
のうちの１つ、２つ、または３つと、
を含むＣＲＩＳＰＲ系
を含み、任意選択で、前記ｇＲＮＡが、γ－グロビンの発現が増加するように操作される、請求項１３に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ドナーゲノム、ドナーベクター、または方法。
【請求項１６】
前記制御配列（複数可）がプロモーターを含み、任意選択で、前記プロモーターがβ－グロビンプロモーターであり、任意選択で、前記β－グロビンプロモーターが、約１．６ｋｂの長さを有し、及び／または１１番染色体の位置５２２８６３１～５２２７０２３の核酸を含む、請求項１３に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ドナーゲノム、ドナーベクター、または方法。
【請求項１７】

前記制御配列（複数可）が遺伝子座制御領域（ＬＣＲ）を含み、任意選択で、前記ＬＣＲがβ－グロビンＬＣＲである、請求項１３に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ドナーゲノム、ドナーベクター、または方法。

【請求項１８】

前記β－グロビンＬＣＲが、高感受性部位（ＨＳ）１、ＨＳ２、ＨＳ３、及びＨＳ４を含むもしくはＨＳ１、ＨＳ２、ＨＳ３、及びＨＳ４からなるβ－グロビンＬＣＲ　ＤＮＡｓｅＩ　ＨＳを含み、任意選択で、前記β－グロビンＬＣＲは、約４．３ｋｂの長さを有するか、

前記β－グロビンＬＣＲが、ＨＳ１、ＨＳ２、ＨＳ３、ＨＳ４、及びＨＳ５を含むβ－グロビンＬＣＲ　ＤＮＡｓｅＩ　ＨＳを含み、任意選択で、前記β－グロビンＬＣＲは、約２１．５ｋｂの長さを有するか、または

前記β－グロビンＬＣＲが、１１番染色体の位置５２９２３１９～５２７０７８９の配列を含む、請求項１３に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ドナーゲノム、ドナーベクター、または方法。

【請求項１９】

前記制御配列（複数可）が３’ＨＳ１を含み、任意選択で、前記３’ＨＳ１が、１１番染色体の位置５２０６８６７～５２０３８３９の配列を含む、請求項１３または請求項１４に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ドナーゲノム、ドナーベクター、または方法。

【請求項２０】

前記制御配列（複数可）がｍｉＲＮＡ結合部位を含み、任意選択で、

前記ｍｉＲＮＡ結合部位が、目的種が天然に発現するｍｉＲＮＡに対する結合部位であり、

前記ｍｉＲＮＡが、血中と腫瘍微小環境中または標的組織中とでは異なる占有率プロファイルを示し、任意選択で、前記占有率プロファイルが、前記腫瘍微小環境中または前記標的組織中と比較して血中で高く、

前記ｍｉＲＮＡ結合部位が、ｍｉＲ４２３－５結合部位、ｍｉＲ４２３－５ｐ結合部位、ｍｉＲ４２－２結合部位、ｍｉＲ１８１ｃ結合部位、ｍｉＲ１２５ａ結合部位、もしくはｍｉＲ１５ａ結合部位を含み、及び／または

前記ｍｉＲＮＡ結合部位が、ｍｉＲ１８７結合部位もしくはｍｉＲ２１８結合部位を含む、請求項１３に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ドナーゲノム、ドナーベクター、または方法。

【請求項２１】

前記異種発現産物をコードする前記核酸がペイロードの一部であり、前記ペイロードが組み込みエレメントをさらに含み、任意選択で、前記組み込みエレメントが発現産物を含む、請求項１、請求項４～７、または請求項１０のいずれか１項に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ドナーゲノム、ドナーベクター、または方法。

【請求項２２】

前記組み込みエレメントが、相同組換えによって標的ゲノムに組み込まれるように操作され、前記組み込みエレメントが、前記標的ゲノムの連続的に連結された配列に対応するホモロジーアームと隣接し、任意選択で

前記ホモロジーアームが、０．８～１．８ｋｂであり、及び／または

前記ホモロジーアームが、前記標的ゲノムのうちで染色体セーフハーバー遺伝子座と隣接する核酸配列と相同的であり、任意選択で、前記セーフハーバー遺伝子座が、ＡＡＶＳ１、ＣＣＲ５、ＨＰＲＴ、またはＲｏｓａから選択される、請求項２１に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ドナーゲノム、ドナーベクター、または方法。

【請求項２３】

前記組み込みエレメントが、転位によって標的ゲノムに組み込まれるように操作され、前記組み込みエレメントが、トランスポゾン逆方向反復配列（ＩＲ）と隣接し、任意選択で、前記トランスポゾンＩＲが、リコンビナーゼＤＲと隣接する、請求項２１に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ドナーゲノム、ドナーベクター、または方法。

【請求項２４】
前記トランスポゾンＩＲが、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙ（ＳＢ）ＩＲであり、任意選択で、前記ＳＢ ＩＲがｐＴ４ ＩＲであるか、または
前記トランスポゾンＩＲが、ｐｉｇｇｙｂａｃｋ ＩＲ、Ｍａｒｉｎｅｒ ＩＲ、ｆｒｏｇ ｐｒｉｎｃｅ ＩＲ、Ｔｏｌ２ ＩＲ、ＴｃＢｕｓｔｅｒ ＩＲ、もしくはｓｐｉｎＯＮ ＩＲである、請求項２３に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ドナーゲノム、ドナーベクター、または方法。
【請求項２５】
前記トランスポゾンＩＲと隣接する前記組み込みエレメントの転位を媒介するトランスポゼースをコードする核酸を含み、任意選択で、前記トランスポゼースをコードする前記核酸が、サポートベクターまたはサポートベクターゲノムに含まれる、請求項２１のいずれか１項に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ドナーゲノム、ドナーベクター、または方法。
【請求項２６】
前記トランスポゼースが、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ ｂｅａｕｔｙトランスポゼース、ｐｉｇｇｙｂａｃｋトランスポゼース、Ｍａｒｉｎｅｒトランスポゼース、ｆｒｏｇ ｐｒｉｎｃｅトランスポゼース、Ｔｏｌ２トランスポゼース、ＴｃＢｕｓｔｅｒトランスポゼース、またはｓｐｉｎＯＮトランスポゼースであり、任意選択で、前記トランスポゼースが、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙ １００ｘ（ＳＢ１００ｘ）トランスポゼースである、請求項２５に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ドナーゲノム、ドナーベクター、または方法。
【請求項２７】
前記トランスポゼースをコードする前記核酸が、ＰＧＫプロモーターと機能可能なように連結される、請求項２５または請求項２６に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ドナーゲノム、ドナーベクター、または方法。
【請求項２８】
前記Ａｄ３５パッケージング配列の少なくとも一部と隣接し、及び／または前記Ａｄ３５ゲノムの５’末端から５５０ヌクレオチド以内に位置し、前記Ａｄ３５パッケージングシグナルは機能的に破壊するが、前記５’Ａｄ３５ ＩＴＲは機能的に破壊しない前記リコンビナーゼＤＲが、ＦＲＴ部位、ｌｏｘＰ部位、ｒｏｘ部位、ｖｏｘ部位、ＡｔｔＢ部位、またはＡｔｔＰ部位である、請求項１～３または請求項６～１０のいずれか１項に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、または方法。
【請求項２９】
前記Ａｄ３５パッケージング配列の前記少なくとも一部を切除するためのリコンビナーゼをコードする核酸が、前記ヘルパーゲノムを含む細胞の核酸配列によってコードされる、請求項２８に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、または方法。
【請求項３０】
前記トランスポゾンＩＲと隣接する前記リコンビナーゼＤＲが、ＦＲＴ部位、ｌｏｘＰ部位、ｒｏｘ部位、ｖｏｘ部位、ＡｔｔＢ部位、またはＡｔｔＰ部位である、請求項２３のいずれか１項に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、または方法。
【請求項３１】
前記組み込みエレメントを含む核酸を切除するためのリコンビナーゼをコードする前記核酸が、サポートベクターまたはサポートベクターゲノムに含まれる、請求項２１のいずれか１項に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、または方法。
【請求項３２】
前記リコンビナーゼが、Ｆｌｐリコンビナーゼ、Ｃｒｅリコンビナーゼ、Ｄｒｅリコンビナーゼ、Ｖｉｋａリコンビナーゼ、またはＰｈｉＣ３１リコンビナーゼである、請求項

２９または請求項３１に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、または方法。
【請求項３３】
前記リコンビナーゼをコードする前記核酸が、ＥＦ１αプロモーターと機能可能なように連結される、請求項３２に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、または方法。
【請求項３４】
前記ペイロードが、前記異種発現産物を含む組み込みエレメントを含み、
前記異種発現産物が、β－グロビンプロモーター及びβ－グロビン長鎖ＬＣＲと機能可能なように連結されたβ－グロビンタンパク質を含み、
前記組み込みエレメントが、ＳＢ　ＩＲと隣接し、
前記ＳＢ　ＩＲが、リコンビナーゼＤＲと隣接し、任意選択で、前記リコンビナーゼＤＲが、ＦＲＴ部位である、請求項２１のいずれか１項に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、または方法。
【請求項３５】
前記ペイロードが、
組み込みエレメントと、
発現産物をコードし、前記組み込みエレメントに含まれず、かつ前記組み込みエレメントが標的ゲノムに組み込まれることによって非機能性となる位置に存在する、条件的に発現する核酸配列と、
を含む、請求項２１のいずれか１項に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、または方法。
【請求項３６】
前記条件的に発現する核酸配列によってコードされる前記発現産物が、ＣＲＩＳＰＲ系構成要素または塩基エディター系構成要素を含み、任意選択で、前記構成要素が、ＣＲＩＳＰＲ関連ＲＮＡガイド型エンドヌクレアーゼ、塩基エディター酵素、またはｇＲＮＡである、請求項３５に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、または方法。
【請求項３７】
前記ペイロードが選択カセットを含み、任意選択で、前記選択カセットが前記組み込みエレメントに含まれる、請求項２１のいずれか１項に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、または方法。
【請求項３８】
前記選択カセットが、ｍｇｍｔ$^{Ｐ１４０Ｋ}$をコードする核酸配列を含むか、または前記選択カセットが、抗ＣＤ３３　ｓｈＲＮＡをコードする核酸配列を含む、請求項３７に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、または方法。
【請求項３９】
リコンビナーゼＤＲと隣接する、前記Ａｄ３５パッケージング配列の前記少なくとも一部が、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＡＸ０４９９８３のＡｄ３５配列のヌクレオチド１３８～４８１に対応する、請求項１～３または請求項６～１０のいずれか１項に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、または方法。
【請求項４０】
リコンビナーゼＤＲと隣接する、前記Ａｄ３５パッケージング配列の前記少なくとも一部が、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＡＸ０４９９８３のＡｄ３５配列のヌクレオチド１７９～３４４、ヌクレオチド３６６～４８１、ヌクレオチド１５５～４８１、ヌクレオチド１５９～４８０、ヌクレオチド１５９～４４６、ヌクレオチド１８０～４８０、ヌクレオチド２０７～４８０、ヌクレオチド１４０～４４６、ヌクレオチド１５９～４４６、ヌクレオチド１８０～４４６、ヌクレオチド２０２～４４６、ヌクレオチド１５９～４８１、ヌクレオチド１８０～３８４、ヌクレオチド１８０～４８１、またはヌクレオチド２０７～４８１に対応する、請求項１～３または請求項６～１０のいずれか１項に記載の組換えＡｄ

３５ベクター産生系、ヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、または方法。
【請求項４１】
前記リコンビナーゼＤＲが、ＬｏｘＰ部位である、請求項１～３または請求項６～１０のいずれか１項に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、または方法。
【請求項４２】
前記Ａｄ３５ヘルパーゲノムが、２９３Ｔ細胞における増幅のためのＡｄ５　Ｅ４ｏｒｆ６を含む、請求項２、請求項３、請求項８、または請求項９のいずれか１項に記載のヘルパーベクターまたはヘルパーゲノム。
【請求項４３】
前記ヘルパーゲノムが、配列番号５１～６５のいずれか１つに示される配列を含むか、または生成させる、請求項２、請求項３、請求項８、または請求項９のいずれか１項に記載のヘルパーベクターまたはヘルパーゲノム。
【請求項４４】
請求項２～５、請求項８、または請求項９のいずれか１項に記載のヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、ドナーベクター、またはドナーゲノムを含む細胞であって、任意選択で、前記細胞が、ＨＥＫ２９３細胞である、前記細胞。
【請求項４５】
請求項１、請求項４、請求項６、請求項７、請求項１０、請求項１３～２７、または請求項４４のいずれか１項に記載のドナーゲノムを含む細胞であって、任意選択で、前記細胞が赤血球であり、任意選択で、前記細胞が造血幹細胞、Ｔ細胞、Ｂ細胞、または骨髄系細胞であり、任意選択で、前記細胞が前記発現産物を分泌する、前記細胞。
【請求項４６】
前記細胞が、ＨＥＫ２９３細胞である、請求項６または請求項１０に記載の方法。
【請求項４７】
細胞を改変する方法であって、前記方法が、請求項５または請求項１１～２７のいずれか１項に記載のＡｄ３５ドナーベクターと前記細胞とを接触させることを含む、前記方法。
【請求項４８】
対象の細胞を改変する方法であって、前記方法が、請求項５または請求項１１～２７のいずれか１項に記載のＡｄ３５ドナーベクターを前記対象に投与することを含み、任意選択で、前記方法が、前記対象から前記細胞を単離することを含まない、前記方法。
【請求項４９】
疾患または状態の治療を必要とする対象において当該治療を行う方法であって、前記方法が、請求項５または請求項１１～２７のいずれか１項に記載のＡｄ３５ドナーベクターを前記対象に投与することを含み、任意選択で、前記投与が、静脈内に対して行われる、前記方法。
【請求項５０】
前記方法が、前記対象に動員剤を投与することを含み、任意選択で、前記動員剤が、顆粒球コロニー刺激因子、ＧＭ－ＣＳＦ、Ｓ－ＣＳＦ、ＣＸＣＲ４アンタゴニスト、及びＣＸＣＲ２アゴニストの１つ以上を含み、任意選択で、前記ＣＸＣＲ４アンタゴニストがＡＭＤ３１００であり、及び／または前記ＣＸＣＲ２アゴニストがＧＲＯ－βである、請求項４９に記載の方法。
【請求項５１】
前記Ａｄ３５ドナーベクターが選択カセットを含み、任意選択で、前記方法が、前記対象に選択剤を投与することをさらに含み、任意選択で、前記選択カセットが$mgmt^{P140K}$をコードし、前記選択剤が$O^6$ＢＧ／ＢＣＮＵである、請求項４９または請求項５０に記載の方法。
【請求項５２】
前記方法が、前記対象に免疫抑制剤を投与することをさらに含み、任意選択で、前記免

疫抑制レジメンが、ステロイド、ＩＬ－６受容体アンタゴニスト、及び／またはＩＬ－１Ｒ受容体アンタゴニストを含み、任意選択で、前記ステロイドが、糖質コルチコイドまたはデキサメタゾンを含む、請求項４９のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５３】

前記Ａｄ３５ドナーベクターが組み込みエレメントを含み、前記方法によって、ＣＤ４６を発現する細胞の少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、もしくは少なくとも９５％、造血幹細胞の少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、もしくは少なくとも９５％、及び／または赤血球Ｔｅｒ１１９$^{+}$細胞の少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、もしくは少なくとも９５％においてその前記組み込みエレメントのコピーの組み込み及び／または発現が生じる、請求項４９のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５４】

前記方法によって、前記組み込みエレメントのコピーを少なくとも１つ含む標的細胞ゲノムへと前記組み込みエレメントのコピーが平均で少なくとも２つまたは少なくとも２．５個組み込まれる、請求項４９のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５５】

前記方法によって、前記ペイロードまたはその組み込みエレメントによってコードされる発現産物の発現が、参照のレベルの少なくとも約２０％または参照のレベルの少なくとも約２５％であるレベルで生じ、任意選択で、前記参照が、前記対象または参照集団における内在性参照タンパク質の発現である、請求項４９のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５６】

前記疾患または前記状態が、異常ヘモグロビン症、血小板障害、貧血、免疫不全、凝固因子欠乏症、ファンコニ貧血、α１－アンチトリプシン欠乏症、鎌状赤血球貧血、サラセミア、中間型サラセミア、血友病Ａ、血友病Ｂ、フォン・ヴィレブランド病、第Ｖ因子欠乏症、第ＶＩＩ因子欠乏症、第Ｘ因子欠乏症、第ＸＩ因子欠乏症、第ＸＩＩ因子欠乏症、第ＸＩＩＩ因子欠乏症、ベルナール・スーリエ症候群、灰色血小板症候群、またはムコ多糖症である、請求項４９のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５７】

前記対象が、がんを患っている対象であり、前記方法によって、がんが治療、阻止、もしくは遅延されるか、またはがん再発が遅延され、

任意選択で、前記対象が、がんの発症と関連する１つ以上の生殖細胞系列変異の保因者であり、

任意選択で、前記がんが、退形成性星細胞腫、乳癌、卵巣癌、結腸直腸癌、びまん性内在脳幹グリオーマ、ユーイング肉腫、多形神経膠芽腫、悪性神経膠腫、黒色腫、転移性悪性黒色腫、鼻咽頭癌、または小児がんであり、

任意選択で、前記対象に対して、$O^{6}$ＢＧ、ＴＭＺ（テモゾロミド）、及び／またはＢＣＮＵ（カルムスチン）が投与されているか、または投与される、請求項４９のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５８】

前記疾患または前記状態が中間型サラセミアであり、任意選択で、

前記ベクターまたは前記ゲノムが、

内在性γ－グロビンの発現を増加または再活性化させる発現産物（複数可）であって、任意選択で、内在性γ－グロビンの発現を増加または再活性化させる前記発現産物（複数可）は、

ＣＲＩＳＰＲ関連ＲＮＡガイド型エンドヌクレアーゼまたは塩基エディターと、

ＨＢＧ１の核酸配列と結合し、前記標的核酸配列と機能可能なように連結されたコード配列からの発現を増加させるように操作された、ｇＲＮＡ、

ＨＢＧ２の核酸配列と結合し、前記標的核酸配列と機能可能なように連結されたコード配列からの発現を増加させるように操作された、ｇＲＮＡ、及び
ＢＣＬ１１Ａ発現を低減するように操作された、赤血球エンハンサーｂｃｌ１１ａの核酸配列に結合するｇＲＮＡ、
のうちの１つ以上と、
を含む、前記発現産物（複数可）、
γ－グロビン、ならびに
β－グロビン、
から選択される１つ以上の発現産物をコードする核酸を含み、
任意選択で、前記方法によって、中間型サラセミアの症状が低減され、及び／または中間型サラセミアが治療され、及び／またはＨｂＦが増加する、請求項４９のいずれか１項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願の相互参照

本出願は、２０１９年７月２日出願の米国仮出願第６２／８６９，９０７号、２０１９年１１月１４日出願の米国仮出願第６２／９３５，５０７号、及び２０２０年４月１３日出願の米国仮出願第６３／００９，３８５号の利益を主張し、これらの出願のそれぞれの開示内容は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【０００２】

政府による支援

本発明は、国立衛生研究所によって付与された助成金番号ＨＬ１３００４０、同ＨＬ１４１７８１、及び同ＣＡ２０４０３６の下で政府の支援を受けてなされたものである。政府は、本発明に一定の権利を有する。

【０００３】

配列表に関する記述

本出願に付随する配列表は、紙面コピーの代わりにテキスト形式で提供されており、参照によって本明細書に組み込まれる。この配列表を含むテキストファイルの名称は、Ｆ０５３－０１０７ＰＣＴ＿ＳＴ２５．ｔｘｔである。このテキストファイル（９４５ＫＢ）は２０２０年７月２日に作成されたものであり、ＥＦＳ－Ｗｅｂを介して電子的に提出されている。

【背景技術】

【０００４】

医学的状態の多くが、遺伝子変異によって引き起こされ、及び／または遺伝子治療によって少なくとも部分的には治療可能なものである。そのような状態には、例えば、異常ヘモグロビン症、免疫不全、及びがんが含まれる。異常ヘモグロビン症として知られる遺伝性障害は、世界的に最も一般的な型の遺伝性障害の１つであり、その生存率は、発展途上国で生まれた患者では著しく低くなる。異常ヘモグロビン症の例としては、鎌状赤血球症及びサラセミアが挙げられる。免疫不全は原発性または続発性であり得る。世界保健機関によって認知されている原発性免疫不全症の数は８０を超える。遺伝子変異によって引き起こされ、及び／または遺伝子治療によって少なくとも部分的には治療可能な医学的状態のための予防的治療及び治療的処置が必要とされている。

【発明の概要】

【０００５】

遺伝子治療は、遺伝的エレメントを有する状態の多くを治療可能なものであり、こうした状態には、限定されないが、異常ヘモグロビン症、免疫不全、及びがんが含まれる。分子生物学には遺伝的操作のためのさまざまなツールが存在する一方で、遺伝子治療状況（例えば、エクスビボ及びインビボ）においてそうしたツールを適用することは、遺伝子治療ベクターにおいて使用するための遺伝的コンストラクトの開発ならびにそうしたベクタ

ー自体の開発と少なくとも部分的には関連して、新たな機会及び課題を生じさせる。

【０００６】

本開示は、とりわけ、標的細胞において塩基エディターを発現させるためのアデノウイルスベクター及びアデノウイルスゲノム（例えば、「組換え」または「操作された」アデノウイルスベクター及びアデノウイルスゲノム）を含む。本開示は、とりわけ、ＣＲＩＳＰＲ関連ＲＮＡガイド型エンドヌクレアーゼであるＣＲＩＳＰＲ酵素及び／またはガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含むＣＲＩＳＰＲ系を標的細胞において発現させるためのアデノウイルスベクター及びアデノウイルスゲノムを含み、任意選択で、このＣＲＩＳＰＲ系の構成要素の少なくとも１つの発現は自己不活型である。本開示は、とりわけ、塩基編集系酵素及び／またはガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含む塩基編集系を標的細胞において発現させるためのアデノウイルスベクター及びアデノウイルスゲノムを含み、任意選択で、この塩基編集系の構成要素の少なくとも１つの発現は自己不活型である。本開示は、とりわけ、標的細胞において発現産物（例えば、治療用発現産物）を発現させるための制御配列を含むアデノウイルスベクター及びアデノウイルスゲノムを含み、この制御配列は、ｍｉＲＮＡ結合部位またはβ－グロビン遺伝子座制御領域（ＬＣＲ）（β－グロビン長鎖ＬＣＲなど）を含む。本開示は、とりわけ、疾患または状態の治療に共に寄与する複数の治療用発現産物（例えば、治療用発現産物）を標的細胞において発現する統合アデノウイルスベクター及び統合アデノウイルスゲノムを含む。本開示は、とりわけ、β－グロビン長鎖ＬＣＲを含むペイロードを標的細胞ゲノムに組み込むためのアデノウイルスベクター及びアデノウイルスゲノムを含む。本開示は、とりわけ、ある特定の現存ベクター（例えば、Ａｄ５ベクター）と比較して免疫原性が低減されたアデノウイルスベクター及びそのアデノウイルスゲノムを含む。本開示は、とりわけ、Ａｄ３５アデノウイルスベクター、Ａｄ３５アデノウイルスゲノム、ＨＤＡｄ３５アデノウイルスベクター、ＨＤＡｄ３５アデノウイルスゲノム、サポートベクター、サポートゲノム、Ａｄ３５ヘルパーベクター、及びＡｄ３５ヘルパーゲノムを含み、ＨＤＡｄ３５ベクターは、ある特定の現存ベクター（例えば、Ａｄ５ベクターまたはＡｄ５／３５ベクター）と比較して免疫原性が低減されたものであり得る。

【０００７】

本開示では、とりわけ、造血幹細胞をインビボで遺伝子編集するためのＣＤ４６標的指向性組換えＡｄ３５ベクター及び関連遺伝子治療改善について記載される。本明細書に開示のベクター設計の特定の実施形態では、タンパク質はすべて、血清型３５型に由来する。本明細書に記載のＡｄ３５ベクターの特定の実施形態では、ベクター中にウイルス遺伝子は残存しない。特定の実施形態では、ＩＴＲ及びパッケージング配列はＡｄ３５に由来する。特定の実施形態では、Ａｄ３５送達ベクターは、ウイルスタンパク質をコードする遺伝子がすべて除去され、治療用途と関連する構成要素で置き換えられたものである。

【０００８】

特定の実施形態では、Ａｄ３５ベクターはヘルパー依存型であり、本開示は、新たに設計されたＡｄ３５ヘルパーベクターも提供する。特定の実施形態では、ヘルパー依存型の導入遺伝子プラスミドが最適な比で与えられてＡｄ３５が調製される。

【０００９】

本開示内に記載の関連遺伝子治療改善は、下記のものの１つ以上に関する：（ｉ）ＣＤ４６との結合を増加させる新規のＡｄ３５ノブタンパク質変異、（ｉｉ）インビボで改変された細胞の陽性選択を可能にするベクター特徴、（ｉｉｉ）臨床的に適切な時間枠の中での治療用タンパク質の発現を調節するマイクロＲＮＡ制御系、（ｉｖ）ゲノムの規定部位を標的とする挿入を促進するためのホモロジーアームの使用、（ｖ）ゲノムサプレッサー領域を不活化して内在性遺伝子の発現増加を可能にするためのＣＲＩＳＰＲの使用、（ｖｉ）標的ＣＤ４６発現細胞へのＡｄ３５ベクターの送達を増加させるための動員方針の使用、（ｖｉｉ）遺伝子発現を増加させるための小型形態または長鎖形態の遺伝子座制御領域の使用、（ｖｉｉｉ）トランスポゼース系を用いて挿入し得るトランスポゾンのサイズを増加させるためのリコンビナーゼ系の使用、（ｉｘ）ベクター送達前のステロイド送

達（例えば、糖質コルチコイド、デキサメタゾン）、ならびに（ｘ）治療用タンパク質を生成及び分泌させるための赤血球。こうした関連遺伝子治療改善はそれぞれ、本明細書に記載のＡｄ３５ベクターを用いて実践できると共に、他のウイルスベクター送達系で利用することもできる。一例として、ＣＤ４６との結合が増加した変異Ａｄ３５ノブタンパク質をレンチウイルス送達系または泡沫送達系で利用することができる。

【００１０】

本明細書に記載の進歩は、（ｉ）ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを使用してＳＢ１００ｘ介在性に導入遺伝子を付加するためのインビボＨＳＣ形質導入／選択技術、（ｉｉ）赤血球ｂｃｌ１１ａエンハンサーを標的とすること（これによって、例えば、ＢＣＬ１１Ａの発現を低減する）及びＨＢＧ１／２プロモーター領域を標的とすること（これによってγ－グロビンの発現を増加させる）を同時に行うことによってＨｂＦの再活性化を増加させること、（ｉｉｉ）ＣＲＩＳＰＲによるインビボでのゲノム操作、（ｉｖ）サラセミアの修正（ｖ）γ遺伝子の付加及び再活性化の統合（ＳＢ１００ｘ系）、（ｖｉ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９の自己不活化、（ｖｉｉ）自己遊離カセットを含むドナーベクターとしてＨＤＡｄを使用する標的指向化組み込み、（ｖｉｉｉ）分泌治療用タンパク質を高レベルで産生させるための工場として赤血球細胞を使用するインビボＨＳＣ遺伝子治療、（ｉｘ）がんを治療するための治療手法（予防的及び治療的なもの）、ならびに（ｘ）ＨＤＡｄ３５＋＋ベクター、にも関する。

【００１１】

ある特定の実施形態は、ＣＤ４６を標的とする結合の増加によって治療用遺伝子送達の標的指向化及び特異性を向上させることが可能な変異ノブタンパク質に関する。

【００１２】

ある特定の実施形態は、ゲノムへの標的指向化挿入を促進するためのホモロジーアーム（ゲノムセーフハーバーを対象とする染色体への組み込みを生じさせるために使用することができる）の使用に関し、この標的指向化挿入は、典型的には、導入遺伝子の発現レベルを高めることが可能なオープンクロマチンに対して行われる。本明細書に記載のように、特定の実施形態では、１．８ｂのホモロジーアームが良好に機能し、そのサイズ下限値は０．８である。ホモロジーアームが１．８ｂを超えると単一ヌクレオチド多型が組み込みに影響を及ぼし始め得る。

【００１３】

ある特定の実施形態は、移植前処理の必要性を軽減するための動員レジメンの使用に関する。

【００１４】

特定の実施形態では、（ｉ）低用量のＯ$^{6}$－ベンジルグアニン＋ビス－クロロエチルニトロソ尿素での短期処理による治療効果を向上させることが可能なＭＧＭＴ$^{Ｐ１４０Ｋ}$系、（ｉｉ）ＳＢ１００Ｘトランスポゼースベースの組み込み機構、及び（ｉｉｉ）マイクロＬＣＲ促進性γ－グロビン遺伝子を用いるＡｄ３５インビボ遺伝子治療が提供される。

【００１５】

特定の実施形態は、（ｉ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９カセット（ＨＢＧ１／２プロモーター中のＢＣＬ１１Ａ結合部位を標的として内在性遺伝子の抑制を解除する）と、（ｉｉ）γ－グロビン遺伝子カセット（５ｋｂのβ－グロビン小型ＬＣＲによって促進される）と、ＥＦ１α－ＭＧＭＴ$^{Ｐ１４０Ｋ}$発現カセット（ＦＲＴ部位及びトランスポゾン部位と隣接する後者２つのカセットで形質導入された細胞をインビボで選択することを可能にする）と、を含むＡｄ３５アデノウイルスベクター（ＨＤＡｄ－統合）を含む。

【００１６】

特定の実施形態では、赤血球における胎児型γ－グロビンの発現を再活性化することを目的とする成体型ＣＤ３４＋細胞におけるＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９介在性のゲノム編集手法が提供される。ＣＤ３４＋細胞の赤血球分化が生じるモデルにはγ－グロビン再活性化の評価を行う上で制限が存在するため、ヒトβ－グロビン遺伝子座トランスジェニック体において、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を発現するヘルパー依存型ヒトＣＤ４６標的指向性ア

デノウイルスベクター（ＨＤＡｄ－ＨＢＧ－ＣＲＩＳＰＲ）を使用してγ－グロビンプロモーター中のリプレッサー結合領域を破壊した。

【００１７】

特定の実施形態では、ＣＤ４６標的指向化組み込みＡｄ３５ベクター系が提供され、この系には、（ｉ）γグロビン遺伝子の発現を促進するβ－グロビン遺伝子座制御領域（ＬＣＲ）、及び（ｉｉ）インビボで遺伝子改変されたＨＳＣを陽性選択するためのＭＧＭＴ$^{Ｐ１４０Ｋ}$カセットの発現を促進するＥＦ１－α（構成的プロモーター）が導入遺伝子として含まれる。

【００１８】

特定の実施形態では、ＣＤ４６標的指向化組み込みＡｄ３５ベクター系が提供され、この系には、（ｉ）γグロビン遺伝子の発現を促進する２１．５ｋｂ（長鎖）ヒトβ－グロビン遺伝子座制御領域（ＬＣＲ（ＨＳ１～ＨＳ５））及びβ－グロビンプロモーター（１．６ｋｂ）（任意選択でその３’ＵＴＲを含む）、ならびに（ｉｉ）インビボで遺伝子改変されたＨＳＣを陽性選択するためのＭＧＭＴ$^{Ｐ１４０Ｋ}$カセットの発現を促進するＥＦ１－α（構成的プロモーター）が導入遺伝子として含まれる。いくつかの実施形態は、３’ＨＳ１（ヒトβ－グロビン３’ＨＳ１（３ｋｂ）（例えば、３’ＨＳ１は、１１番染色体の位置５２０６８６７～５２０３８３９の配列を有する））をさらに含み得る。さまざまな実施形態において、３’ＨＳ１は、配列番号２８７に示される核酸配列または配列番号２８７との配列同一性％が少なくとも８０％である配列を有し、例えば、配列番号２８７との同一性％が少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％である配列を有する。こうした実施形態では、リコンビナーゼ系（例えば、Ｆｌｐ／Ｆｒｔ；Ｃｒｅ／Ｌｏｘ）と組み合わせて高活性トランスポゼース（例えば、ＳＢ１００Ｘ）が利用され得る。したがって、特定の一実施形態では、Ａｄ３５ベクター系は、例えば、長鎖ヒトβ－グロビン遺伝子座制御領域（２１．５ｋｂ）、ヒトβ－グロビンプロモーター（１．６ｋｂ）、ヒトγグロビン遺伝子（その３’ＵＴＲ（２．７ｋｂ）を一緒に有する）、ヒトβ－グロビン３’ＵＴＲ、及び３’ＨＳ１（３ｋｂ）、を含む転位性導入遺伝子インサートを含み得る。転位性導入遺伝子インサートは、例えば、ＭＧＭＴ$^{Ｐ１４０Ｋ}$の発現を促進するＥＦ１－α（構成的プロモーター）をさらに含み得る。さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ベクター系は、例えば、３２．４ｋｂの転位性導入遺伝子インサートを含み得る。

【００１９】

特定の実施形態では、ＨＳＰＣが腫瘍に動員された場合にのみ活性化されて治療用導入遺伝子の発現を制御するｍｉＲＮＡ制御系が提供される。本開示のこうした特徴は、抗ＰＤＬ１－γ１を導入遺伝子として用いて実証されている。こうした系を使用することで、腫瘍微小環境の状況下で治療用導入遺伝子の発現が制御され得る。

【００２０】

さまざまな実施形態において、マイクロＲＮＡ制御系は、マイクロＲＮＡ部位（例えば、マイクロＲＮＡが相互作用し得る核酸配列）の存在によって遺伝子の発現が制御される方法または組成物を指し得、実施例５にはこうしたものの一例が示されている。特定の実施形態では、標的細胞（ＨＳＰＣ（例えば、腫瘍浸潤性ＨＳＰＣ）など）において遺伝子が排他的に発現するように当該遺伝子の発現がマイクロＲＮＡ制御系によって制御された。いくつかの実施形態では、目的タンパク質または目的核酸（例えば、抗がん剤（ＣＡＲ、ＴＣＲ、抗体、及び／またはチェックポイント阻害剤（例えば、チェックポイント阻害剤であるαＰＤ－Ｌ１抗体（例えば、αＰＤ－Ｌ１γ１抗体））など）をコードする核酸（例えば、治療用遺伝子）は、マイクロＲＮＡ部位、複数の同じマイクロＲＮＡ部位、もしくは複数の異なるマイクロＲＮＡ部位を含むか、それと結び付けられるか、またはそれと機能可能なように連結される。目的遺伝子をコードする配列を有する核酸またはその一部とマイクロＲＮＡ部位とを結び付ける手段及び手法を当業者なら知っているであろうが

、本明細書ではある特定の非限定的な例が示される。例えば、目的遺伝子（例えば、αＰＤ－Ｌ１γ１抗体をコードする配列）は、腫瘍浸潤性白血球細胞ではない細胞での発現は抑制するが、腫瘍浸潤性白血球での発現は抑制しない１つ以上のマイクロＲＮＡ部位が存在することによって目的遺伝子の発現が制御されるように核酸中に存在し得る。ある特定の具体例では、目的遺伝子（例えば、αＰＤ－Ｌ１γ１抗体をコードする配列）は、腫瘍浸潤性白血球細胞ではない細胞での発現は抑制するが、腫瘍浸潤性白血球での発現は抑制しない１つ以上のｍｉＲ４２３－５ｐマイクロＲＮＡ部位が存在することによって目的遺伝子の発現が制御されるように核酸中に存在し得る。さまざまな実施形態において、マイクロＲＮＡ制御系は、１つ以上のマイクロＲＮＡ部位（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０個、もしくはそれを超える数のマイクロＲＮＡ部位）を含む核酸を含むか、または１つ以上のマイクロＲＮＡ部位（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０個、もしくはそれを超える数のマイクロＲＮＡ部位）によって目的タンパク質もしくは目的核酸の発現が制御される核酸を含み得る。さまざまな実施形態において、マイクロＲＮＡ制御系は、１つ以上のｍｉＲ４２３－５ｐマイクロＲＮＡ部位（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０個、もしくはそれを超える数のｍｉＲ４２３－５ｐマイクロＲＮＡ部位）を含む核酸を含むか、または１つ以上のｍｉＲ４２３－５ｐマイクロＲＮＡ部位（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０個、もしくはそれを超える数のｍｉＲ４２３－５ｐマイクロＲＮＡ部位）によって目的タンパク質もしくは目的核酸の発現が制御される核酸を含み得る。いくつかの特定の実施形態では、マイクロＲＮＡ制御系は、１つ以上のｍｉＲ４２３－５ｐマイクロＲＮＡ部位（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０個、もしくはそれを超える数のｍｉＲ４２３－５ｐマイクロＲＮＡ部位（例えば、ｍｉＲ４２３－５ｐマイクロＲＮＡ部位））を含むαＰＤ－Ｌ１γ１抗体コード核酸を含むか、または１つ以上のｍｉＲ４２３－５ｐマイクロＲＮＡ部位（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０個、もしくはそれを超える数のｍｉＲ４２３－５ｐマイクロＲＮＡ部位（例えば、ｍｉＲ４２３－５ｐマイクロＲＮＡ部位））によってαＰＤ－Ｌ１γ１抗体の発現が制御されるαＰＤ－Ｌ１γ１抗体コード核酸を含み得る。

【００２１】

本開示では、造血幹細胞をインビボで遺伝子編集するためのＣＤ４６標的指向性組換えＡｄ３５ベクター及び関連遺伝子治療改善について記載される。特定の実施形態では、Ａｄ３５送達ベクターは、ウイルスタンパク質をコードする遺伝子がすべて除去され、治療用途と関連する構成要素で置き換えられたものである。ウイルスタンパク質をコードする遺伝子をすべて除去することで、３０ｋｂという収容能力を保有するベクターが得られ、この３０ｋｂというスペースは、他のウイルスベクター送達プラットホームで利用可能なものよりも相当大きなスペースである。特定の実施形態では、Ａｄ３５ベクターはヘルパー依存型であり、本開示は、新たに設計されたＡｄ３５ヘルパーベクターも提供する。誤解を避けるために記載すると、本明細書で使用される「遺伝子編集」という用語は、限定されないが、核酸配列を改変するためにベクターまたは薬剤を任意に使用することを含む。

【００２２】

本明細書では、本明細書で提供される核酸（限定されないが、マイクロＲＮＡ制御系、及び本明細書に開示のマイクロＲＮＡ（本明細書ではｍｉＲＮＡとも称される）部位（本明細書では標的部位とも称される）を含む他の核酸を含む）であるか、もしくは当該核酸を含み、及び／または本明細書に開示の薬剤（限定されないが、抗体（αＰＤ－Ｌ１抗体（例えば、αＰＤ－Ｌ１γ１抗体）など）を含む）をコードするベクターがさらに提供される。本開示のさまざまな実施形態のいずれかでは、ベクターはＡｄ５／３５ベクターであり得、任意選択で、Ａｄ５／３５ベクターはヘルパー依存型Ａｄ５／３５（ＨＤＡｄ５／３５）である。本開示のさまざまな実施形態のいずれかでは、ベクターは、本明細書で提供されるバリエーション（例えば、アミノ酸変異）を含むＡｄ５／３５ベクター（例え

ば、ＨＤＡｄ５／３５ベクター）であり得、そのようなベクターのある特定のものは、Ａｄ５／３５＋＋（例えば、ＨＤＡｄ５／３５＋＋）と呼ばれ得る。誤解を避けるために記載すると、いずれかのベクターを使用する実施形態（Ａｄ５／３５ベクター以外のベクター（例えば、Ａｄ５／３５＋＋ベクター以外のベクターまたはＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクター以外のベクター）が指定される実施形態を含む）はいずれも、関連テキストに記載のそのようなベクターに加えて、Ａｄ５／３５ベクター（例えば、ＨＤＡｄ５／３５ベクター、Ａｄ５／３５＋＋ベクター、及びＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターをいずれも含む）であるベクターも開示するものと明確に判読されることになると、本開示から当業者が理解することが意図される。

【００２３】

本開示のさまざまな実施形態のいずれかでは、ベクターはＡｄ３５ベクターであり得、任意選択で、Ａｄ３５ベクターはＨＤＡｄ３５である。本開示のさまざまな実施形態のいずれかでは、ベクターは、本明細書で提供されるバリエーション（例えば、アミノ酸変異）を含むＡｄ３５ベクター（例えば、ＨＤＡｄ３５ベクター）であり得、そのようなベクターのある特定のものはＡｄ３５＋＋（例えば、ＨＤＡｄ３５＋＋）と呼ばれ得る。誤解を避けるために記載すると、いずれかのベクターを使用する実施形態（Ａｄ３５ベクター以外のベクター（例えば、Ａｄ３５＋＋ベクター以外のベクターまたはＨＤＡｄ３５＋＋ベクター以外のベクター）が指定される実施形態を含む）はいずれも、関連テキストに記載のそのようなベクターに加えて、Ａｄ３５ベクター（例えば、ＨＤＡｄ３５ベクター、Ａｄ３５＋＋ベクター、及びＨＤＡｄ３５＋＋ベクターをいずれも含む）であるベクターも開示するものと明確に判読されることになると、本開示から当業者が理解することが意図される。

【００２４】

示されるように、本明細書に記載のベクターは、鎌状赤血球症の治療、γグロビン遺伝子の付加及び再活性化、ならびにγグロビンを再活性化するための複数の標的部位の標的化を含めて、多くの用途を有する。さらに、開示の手法は、第ＶＩＩＩ因子（ＦＶＩＩＩ）に加えて、他の分泌タンパク質に対しても適用することができ、こうした他の適用対象には、例えば、（ｉ）他の凝固因子（具体的には、ＦＸＩ、ＦＶＩＩ、フォン・ヴィレブランド因子（ＶＷＦ）、及び微量凝固因子（すなわち、第Ｉ因子、第ＩＩ因子、第Ｖ因子、第Ｘ因子、第ＸＩ因子、または第ＸＩＩＩ因子））、（ｉｉ）ポンペ病、ゴーシェ病、ファブリー病、及びムコ多糖症Ｉ型のようなリソソーム蓄積症に対する酵素補充療法（ＥＲＴ）（交差補正機構を利用するもの）に現在使用されている酵素（上記のリソソーム蓄積症については、それぞれ酸性アルファ（α）－グルコシダーゼ、グルコセレブロシダーゼ、α－ガラクトシダーゼＡ、及びα－Ｌ－イズロニダーゼ）、（ｉｉｉ）免疫不全（例えば、ＳＣＩＤ－ＡＤＡ（アデノシンデアミナーゼ））、（ｉｖ）循環器疾患（例えば、家族性アポリポタンパク質Ｅ（ＡｐｏＥ）欠損症及びアテローム性動脈硬化）、（ｖ）ＨＩＶ感染症、慢性ＨＣＶ感染症、またはＨＢＶ感染症でのウイルスデコイ受容体（例えば、ＨＩＶ－可溶性ＣＤ４または広域中和抗体（ｂＮＡｂ））の発現によるウイルス感染、（ｖｉ）がん（例えば、モノクローナル抗体（例えば、トラスツズマブ）もしくはチェックポイント阻害剤（例えば、ａＰＤＬ１）による発現制御、または治療用量の化学療法を許容するためのＨＳＣの保護）、ならびに（ｖｉｉ）ファンコニ貧血に対するＦＡＮＣＡ遺伝子、（ｖｉｉｉ）血友病Ａ、血友病Ｂ、またはフォン・ヴィレブランド病から任意選択で選択される凝固因子欠乏症、（ｉｘ）血小板障害、（ｘ）貧血、（ｘｉ）α１－アンチトリプシン欠乏症、あるいは（ｘｉｉ）免疫不全、が含まれる。他の追加の使用については、本明細書の他の箇所に、より詳細に記載される。

【００２５】

したがって、一実施形態では、造血幹細胞をインビボで遺伝子編集するためのＣＤ４６標的指向性組換え血清型３５型アデノウイルス（Ａｄ３５）ベクターが提供される。

【００２６】

別の実施形態は、治療用タンパク質を発現するように遺伝子改変された赤血球である。

例として、治療用タンパク質は、場合によっては、凝固因子を含むか、またはウイルス感染を遮断もしくは低減するタンパク質を含む。任意選択で、赤血球は、治療用タンパク質を分泌する。

【００２７】

本明細書に記載の組換えＡｄ３５ベクターまたは赤血球の使用も提供される。こうした使用には、赤血球ｂｃｌ１１ａエンハンサー及びＨＢＧプロモーター領域を同時に標的とすることによってＨｂＦの再活性化を増加させるための使用、γ－グロビン遺伝子の付加及び内在性γ－グロビン遺伝子の再活性化を統合するための使用、インビボでのＣＲＩＳＰＲゲノム操作のための使用、治療用遺伝子を提供するための使用、（ｉ）異常ヘモグロビン症、（ｉｉ）ファンコニ貧血、（ｉｉｉ）血友病Ａ、血友病Ｂ、もしくはフォン・ヴィレブランド病から任意選択で選択される凝固因子欠乏症、（ｉｖ）血小板障害、（ｖ）貧血、（ｖｉ）α１－アンチトリプシン欠乏症、または（ｖ）免疫不全を治療するための使用、サラセミアを治療するための使用、がんの治療、がん再発の阻止もしくは遅延、または高リスクの生殖細胞系列変異の保因者におけるがん発症の阻止もしくは遅延のための使用（任意選択で、がんは、乳癌または卵巣癌である）、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を自己不活化させるための使用、ならびに自己遊離カセットを含むドナーベクターとしてＨＤＡｄを使用する標的指向化組み込みのための使用、が含まれる。こうした使用はいずれも、任意選択で動員を含み得、例えば、動員は、Ｇｒｏ－ベータ、ＧＭ－ＣＳＦ、Ｓ－ＣＳＦ、及び／またはＡＭＤ３１００を投与することを含む。

【００２８】

さらに別の使用実施形態は、本明細書に記載の組換えＡｄ３５ベクターまたは赤血球のいずれかの使用であり、この使用は、Ａｄ３５ベクター及び／または赤血球が投与されている対象に対してステロイド（例えば、糖質コルチコイドもしくはデキサメタゾン）、ＩＬ－６受容体アンタゴニスト、及び／またはＩＬ－１Ｒ受容体アンタゴニストを投与することを含む。

【００２９】

本明細書に記載の組換えＡｄ３５ベクターまたは赤血球のいずれかを用いる使用実施形態も提供され、この使用実施形態は、Ａｄ３５ベクター及び／または赤血球が投与されている対象に対して$O^6$ＢＧ及びＴＭＺ（テモゾロミド）またはＢＣＮＵ（カルムスチン）を投与することを含む。そのような使用実施形態の例として、対象は、退形成性星細胞腫、乳癌、結腸直腸癌、びまん性Yj内在脳幹グリオーマ、ユーイング肉腫、多形神経膠芽腫（ＧＢＭ）、悪性神経膠腫、黒色腫、転移性悪性黒色腫、鼻咽頭癌、または小児がんの治療として$O^6$ＢＧ及びＴＭＺまたはＢＣＮＵを投与されている。

【００３０】

さらに別の実施形態は、組換えアデノウイルス血清型３５型（Ａｄ３５）ベクター産生系であり、この組換えＡｄ３５ベクター産生系は、Ａｄ３５ファイバーシャフトをコードする核酸配列、Ａｄ３５ファイバーノブをコードする核酸配列、及びＡｄ３５パッケージング配列の少なくとも一部と隣接するリコンビナーゼＤＲ、を含む組換えＡｄ３５ヘルパーゲノムと、５’Ａｄ３５　ＩＴＲ、３’Ａｄ３５　ＩＴＲ、Ａｄ３５パッケージング配列、及び少なくとも１つの異種発現産物をコードする核酸配列、を含む組換えヘルパー依存型Ａｄ３５ドナーゲノムと、を含む。

【００３１】

アデノウイルス血清型３５型（Ａｄ３５）ファイバーシャフトと、Ａｄ３５ファイバーノブと、Ａｄ３５パッケージング配列の少なくとも一部と隣接するリコンビナーゼＤＲを含むＡｄ３５ゲノムと、を含む組換えＡｄ３５ヘルパーベクター実施形態も提供される。

【００３２】

Ａｄ３５ファイバーシャフトをコードする核酸配列と、Ａｄ３５ファイバーノブをコードする核酸配列と、Ａｄ３５パッケージング配列の少なくとも一部と隣接するリコンビナーゼＤＲと、を含む組換えＡｄ３５ヘルパーゲノム実施形態も提供される。

【００３３】

５’Ａｄ３５　ＩＴＲ、３’Ａｄ３５　ＩＴＲ、Ａｄ３５パッケージング配列、及び少なくとも１つの異種発現産物をコードする核酸配列、を含む核酸配列（このゲノムは、Ａｄ３５ウイルス構造タンパク質をコードする核酸配列を含まない）と、Ａｄ３５ファイバーシャフト及び／またはＡｄ３５ファイバーノブと、を含む組換えヘルパー依存型Ａｄ３５ドナーベクター実施形態も提供される。

【００３４】

５’Ａｄ３５　ＩＴＲと、３’Ａｄ３５　ＩＴＲと、Ａｄ３５パッケージング配列と、少なくとも１つの異種発現産物をコードする核酸配列と、を含む組換えヘルパー依存型Ａｄ３５ドナーゲノム実施形態も提供され、このＡｄ３５ドナーゲノムは、野生型Ａｄ３５ゲノムによってコードされる発現産物をコードする核酸配列を含まない。

【００３５】

別の実施形態は、組換えヘルパー依存型Ａｄ３５ドナーベクターの産生方法であり、この方法は、細胞の培養物から組換えヘルパー依存型Ａｄ３５ドナーベクターを単離することを含み、この細胞は、Ａｄ３５ファイバーシャフトをコードする核酸配列、Ａｄ３５ファイバーノブをコードする核酸配列、及びＡｄ３５パッケージング配列の少なくとも一部と隣接するリコンビナーゼＤＲ、を含む組換えＡｄ３５ヘルパーゲノムと、５’Ａｄ３５　ＩＴＲ、３’Ａｄ３５　ＩＴＲ、Ａｄ３５パッケージング配列、及び少なくとも１つの異種発現産物をコードする核酸配列、を含む組換えヘルパー依存型Ａｄ３５ドナーゲノムと、を含む。

【００３６】

組換えＡｄ３５産生系実施形態も提供され、この組換えＡｄ３５産生系実施形態は、Ａｄ３５ファイバーシャフトをコードする核酸配列、Ａｄ３５ファイバーノブをコードする核酸配列、及びＡｄ３５パッケージングシグナルは機能的に破壊するが、５’Ａｄ３５　ＩＴＲは機能的に破壊しない、Ａｄ３５ゲノムの５’末端から５５０ヌクレオチド以内に位置するリコンビナーゼＤＲ、を含む組換えＡｄ３５ヘルパーゲノムと、５’Ａｄ３５　ＩＴＲ、３’Ａｄ３５　ＩＴＲ、Ａｄ３５パッケージング配列、及び少なくとも１つの異種発現産物をコードする核酸配列、を含む組換えＡｄ３５ドナーゲノムと、を含む。

【００３７】

別の実施形態は、組換えＡｄ３５ヘルパーベクターであり、この組換えＡｄ３５ヘルパーベクターは、Ａｄ３５ファイバーシャフトと、Ａｄ３５ファイバーノブと、Ａｄ３５パッケージングシグナルは機能的に破壊するが、５’Ａｄ３５　ＩＴＲは機能的に破壊しない、Ａｄ３５ゲノムの５’末端から５５０ヌクレオチド以内に位置するリコンビナーゼＤＲを含むＡｄ３５ゲノムと、を含む。

【００３８】

別の実施形態は、組換えＡｄ３５ヘルパーゲノムであり、この組換えＡｄ３５ヘルパーゲノムは、Ａｄ３５ファイバーシャフトをコードする核酸配列と、Ａｄ３５ファイバーノブをコードする核酸配列と、Ａｄ３５パッケージングシグナルは機能的に破壊するが、５’Ａｄ３５　ＩＴＲは機能的に破壊しない、Ａｄ３５ゲノムの５’末端から５５０ヌクレオチド以内に位置するＤＲと、を含む。

【００３９】

別の実施形態は、組換えヘルパー依存型Ａｄ３５ドナーベクターの産生方法であり、この方法は、細胞の培養物から組換えヘルパー依存型Ａｄ３５ドナーベクターを単離することを含み、この細胞は、Ａｄ３５ファイバーシャフトをコードする核酸配列、Ａｄ３５ファイバーノブをコードする核酸配列、及びＡｄ３５パッケージングシグナルは機能的に破壊するが、５’Ａｄ３５　ＩＴＲは機能的に破壊しない、Ａｄ３５ゲノムの５’末端から５５０ヌクレオチド以内に位置するリコンビナーゼＤＲ、を含む組換えＡｄ３５ヘルパーゲノムと、５’Ａｄ３５　ＩＴＲ、３’Ａｄ３５　ＩＴＲ、Ａｄ３５パッケージング配列、及び少なくとも１つの異種発現産物をコードする核酸配列、を含む組換えＡｄ３５ドナーゲノムと、を含む。

【００４０】

さらに別の実施形態は、本明細書に記載のヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、ドナーベクター、またはドナーゲノムを含む細胞であり、任意選択で、細胞は、ＨＥＫ２９３細胞である。

【００４１】

別の実施形態は、本明細書に記載の実施形態のいずれか１つのドナーゲノムを含む細胞であり、任意選択で、細胞は赤血球であり、任意選択で、細胞は造血幹細胞、Ｔ細胞、Ｂ細胞、または骨髄系細胞であり、任意選択で、細胞は発現産物を分泌する。

【００４２】

細胞を改変する方法も提供され、この方法は、提供されるＡｄ３５ドナーベクター実施形態のいずれか１つによるＡｄ３５ドナーベクターと細胞とを接触させることを含む。

【００４３】

対象の細胞を改変する方法も提供され、この方法は、Ａｄ３５ドナーベクター実施形態のいずれか１つによるＡｄ３５ドナーベクターを対象に投与することを含み、任意選択で、この方法は、対象から細胞を単離することを含まない。

【００４４】

さらに別の実施形態は、疾患または状態の治療を必要とする対象において当該治療を行う方法であり、この方法は、本明細書で提供されるＡｄ３５ドナーベクター実施形態のいずれか１つによるＡｄ３５ドナーベクターを対象に投与することを含み、任意選択で、投与することは、静脈内に対して行われる。

【００４５】

定義

Ａ、Ａｎ、Ｔｈｅ：本明細書で使用される「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」は、そうした冠詞の文法的対象の１つまたは複数（すなわち、少なくとも１つ）を指す。例として、「エレメント（ａｎ　ｅｌｅｍｅｎｔ）」は、厳密に１つのエレメントの実施形態、及び複数のエレメントを含む実施形態を開示する。

【００４６】

約：本明細書で使用される「約」という用語は、値に関して使用される場合、言及される値に照らして同様である値を指す。一般に、当業者なら、文脈を加味して、その文脈中の「約」によって包含される適切な変動度を理解するであろう。例えば、いくつかの実施形態では、「約」という用語は、言及される値の２５％以内、２０％以内、１９％以内、１８％以内、１７％以内、１６％以内、１５％以内、１４％以内、１３％以内、１２％以内、１１％以内、１０％以内、９％以内、８％以内、７％以内、６％以内、５％以内、４％以内、３％以内、２％以内、１％以内、またはそれ未満に収まる値の変動範囲を包含し得る。

【００４７】

投与：本明細書で使用される「投与」という用語は、典型的には、組成物である薬剤または組成物に含められる薬剤の送達を達成するために組成物を対象または系に投与することを指す。

【００４８】

養子細胞療法：本明細書で使用される「養子細胞療法」または「ＡＣＴ」は、治療活性を有する細胞を対象（例えば、状態、障害、または疾患の治療を必要とする対象）に移入することを含む。いくつかの実施形態では、ＡＣＴは、エクスビボ及び／またはインビトロで細胞の操作及び／または増殖を行った後に細胞を対象に移入することを含む。

【００４９】

親和性：本明細書で使用される「親和性」は、特定の結合薬剤（例えば、ウイルスベクター）及び／またはその結合部分と結合標的（例えば、細胞）との間で生じる非共有結合性相互作用の総和の強度を指す。別段の指定がない限り、本明細書で使用される「結合親和性」は、結合薬剤とその結合標的との間の１：１の相互作用（例えば、ウイルスベクターとウイルスベクターの標的細胞との間の１：１の相互作用）を指す。親和性の変化は、参照との比較（例えば、参照に対する増加もしくは減少）によって説明され得るか、また

は数値的に説明され得ることを当業者なら理解するであろう。親和性は、限定されないが、平衡解離定数（$K_D$）及び／または平衡結合定数（$K_A$）を含めて、当該技術分野で知られる多くの方法で測定及び／または表現され得る。$K_D$は、$k_{off}$／$k_{on}$の商であり、$K_A$は、$k_{on}$／$k_{off}$の商であり、ここで、$k_{on}$は、結合速度定数（例えば、ウイルスベクターと標的細胞との結合速度定数）を指し、$k_{off}$は、解離速度定数（例えば、標的細胞からのウイルスベクターの解離速度定数）を指す。$k_{on}$及び$k_{off}$は、当業者に知られる手法によって決定され得る。

【００５０】

薬剤：本明細書で使用される「薬剤」という用語は、任意の化学物質を指し得、こうした化学物質には、限定されないが、原子、分子、化合物、アミノ酸、ポリペプチド、ヌクレオチド、核酸、タンパク質、タンパク質複合体、液体、溶液、糖、多糖、脂質、またはそれらの組み合わせもしくは複合体、のうちの１つ以上のいずれも含まれる。

【００５１】

同種異系：本明細書で使用される「同種異系」という用語は、ある対象から任意の材料が得られ、その後にこの材料が別の対象に導入されること（例えば、同種異系Ｔ細胞移植）を指す。

【００５２】

間またはから：本明細書で使用される「間」という用語は、文脈内容が、示される上限と下限との間に入るものであるか、または第１の境界と第２の境界との間（境界を含む）に入るものであることを指す。同様に、「から」という用語は、値の範囲の文脈で使用される場合、そうした範囲が含む文脈内容が、示される上限と下限との間に入るものであるか、または第１の境界と第２の境界との間（境界を含む）に入るものであることを示す。

【００５３】

結合：本明細書で使用される「結合」という用語は、２つ以上の薬剤の間での非共有結合性の結び付きを指す。「直接的な」結合は、薬剤間の物理的接触を伴い、間接的な結合は、１つ以上の中間薬剤との物理的接触によって生じる物理的相互作用を伴う。２つ以上の薬剤の間での結合は、さまざまな状況のいずれかにおいて生じ、及び／または評価され得るものであり、こうした状況には、相互作用薬剤が単離状態で試験される場合、あるいは相互作用薬剤が、より複雑な系の状況（例えば、担体薬剤と共有結合もしくはその他の結合で結び付いており、及び／または生物学的系中もしくは細胞中に存在する状況）で試験される場合が含まれる。

【００５４】

がん：本明細書で使用される「がん」という用語は、比較的異常であり、無制御及び／または自律的な増殖を細胞が示し、その結果、そうした細胞が、細胞増殖の制御が著しく失われることによって特徴付けられる異常な増殖速度上昇及び／または異常な増殖表現型を示す状態、障害、または疾患を指す。いくつかの実施形態では、がんは、１つ以上の腫瘍を含み得る。いくつかの実施形態では、がんは、前がん性（例えば、良性）、悪性、前転移性、転移性、及び／または非転移性である細胞であるか、あるいは当該細胞を含み得る。いくつかの実施形態では、がんは、固形腫瘍であるか、または固形腫瘍を含み得る。いくつかの実施形態では、がんは、血液系腫瘍であるか、または血液系腫瘍を含み得る。

【００５５】

キメラ抗原受容体：本明細書で使用される「キメラ抗原受容体」または「ＣＡＲ」は、（ｉ）標的抗原に結合する部分を含む細胞外ドメイン、（ｉｉ）膜貫通ドメイン、及び（ｉｉｉ）細胞外結合部分が標的抗原と結合することによってＣＡＲが刺激されると活性化シグナルを発する細胞内シグナル伝達ドメイン、を含む操作されたタンパク質を指す。キメラ抗原受容体を発現するように遺伝子操作されているＴ細胞は、ＣＡＲ　Ｔ細胞と称され得る。したがって、例えば、ある特定のＣＡＲをＴ細胞が発現する場合、ＣＡＲ細胞外結合部分が標的抗原と結合するとＴ細胞が活性化され得る。ＣＡＲは、キメラＴ細胞受容体またはキメラ免疫受容体としても知られる。

【００５６】

併用療法：本明細書で使用される「併用療法」という用語は、２つ以上の薬剤またはレジメンによって対象の状態、障害、または疾患が一緒に治療されるように２つ以上の薬剤またはレジメンを対象に施すことを指す。いくつかの実施形態では、２つ以上の治療剤またはレジメンは、同時に投与されるか、連続的に投与されるか、または重複する投薬レジメンにおいて投与され得る。併用療法は、単一の組成物において２つの薬剤もしくはレジメンを一緒に施すこと、または２つの薬剤もしくはレジメンを同時に施すことを含むが、そうしたことが必ずしも必要なわけではないことを当業者なら理解するであろう。

【００５７】

発現または活性の制御：本明細書で使用されるように、少なくとも１組の条件の下で第１のエレメント（例えば、タンパク質（転写因子など）または核酸配列（プロモーターなど））の状況（例えば、存在、不在、立体構造、化学的修飾、相互作用、または他の活性）に第２のエレメント（例えば、タンパク質、または薬剤（タンパク質など）をコードする核酸）の発現または活性が完全または部分的に依存するのであれば、第１のエレメントは、第２のエレメントの発現または活性を「制御」または「促進」する。発現または活性の制御は、例えば、少なくとも１組の条件の下で、第１のエレメントの状況が変化する結果、参照対照と比較して第２のエレメントの発現または活性が少なくとも１０％（例えば、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、１００％、少なくとも２倍、少なくとも３倍、少なくとも４倍、少なくとも５倍、少なくとも１０倍、少なくとも２０倍、少なくとも３０倍、少なくとも４０倍、少なくとも５０倍、少なくとも１００倍）変化し得るという点において、発現または活性の実質的な制御であり得る。

【００５８】

に対応する：本明細書で使用される「に対応する」という用語は、適切な参照化合物または参照組成物との比較を通じて化合物中または組成物中の構造エレメントの位置／同一性を指定するために使用され得る。例えば、いくつかの実施形態では、ポリマー中の単量体残基（例えば、ポリペプチド中のアミノ酸残基またはポリヌクレオチド中の核酸残基）は、適切な参照ポリマー中の残基「に対応する」と特定され得る。例えば、提供されるポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列の中の残基は、関連参照配列のスキームに従って指定（例えば、番号付けまたは標識化）されることが多い（仮に、例えば、そのような指定が、提供される配列の文献上の番号付けを反映しないものだとしてもそうされることが多い）ことを当業者なら理解するであろう。例として、参照配列が位置１００～１１０に特定のアミノ酸モチーフを含み、第２の関連配列が位置１１０～１２０に同じモチーフを含む場合、第２の関連配列のモチーフ位置は、参照配列の位置１００～１１０「に対応する」と言われ得る。対応位置は容易に特定することができ（例えば、配列のアライメントをとることによって特定される）、そのようなアライメントは、さまざまな既知のツール、方針、及び／またはアルゴリズムのいずれかによって一般に達成されることを当業者なら理解するであろう。こうしたツール、方針、及び／またはアルゴリズムには、限定されないが、ソフトウェアプログラム（例えば、ＢＬＡＳＴ、ＣＳ－ＢＬＡＳＴ、ＣＵＤＡＳＷ＋＋、ＤＩＡＭＯＮＤ、ＦＡＳＴＡ、ＧＧＳＥＡＲＣＨ／ＧＬＳＥＡＲＣＨ、Ｇｅｎｏｏｇｌｅ、ＨＭＭＥＲ、ＨＨｐｒｅｄ／ＨＨｓｅａｒｃｈ、ＩＤＦ、Ｉｎｆｅｒｎａｌ、ＫＬＡＳＴ、ＵＳＥＡＲＣＨ、ｐａｒａｓａｉｌ、ＰＳＩ－ＢＬＡＳＴ、ＰＳＩ－Ｓｅａｒｃｈ、ＳｃａｌａＢＬＡＳＴ、Ｓｅｑｕｉｌａｂ、ＳＡＭ、ＳＳＥＡＲＣＨ、ＳＷＡＰＨＩ、ＳＷＡＰＨＩ－ＬＳ、ＳＷＩＭＭ、またはＳＷＩＰＥなど）が含まれる。

【００５９】

投薬レジメン：本明細書で使用される「投薬レジメン」という用語は、１つ以上の同じまたは異なる単位用量のセットを対象に投与することを指し得、こうした投与は、典型的には、各投与がその他の投与と期間によって分離された複数の単位用量の投与を含む。さまざまな実施形態において、投薬レジメンの単位用量の１つ以上またはすべてが同じであり得るか、あるいは異なり得る（例えば、経時的に増やされるか、経時的に減らされるか、あるいは対象及び／または医師の決定に従って調整され得る）。さまざまな実施形態に

おいて、各用量の間の期間の１つ以上またはすべてが同じであり得るか、あるいは異なり得る（例えば、経時的に長期化されるか、経時的に短期化されるか、あるいは対象及び／または医師の決定に従って調整され得る）。いくつかの実施形態では、所与の治療剤は推奨投薬レジメンを有し、こうした推奨投薬レジメンは、１つ以上の用量を含み得る。典型的には、市販薬物には当業者に知られる推奨投薬レジメンが少なくとも１つは存在する。いくつかの実施形態では、投薬レジメンは、関連集団にわたって投与された場合、所望の転帰または有益な転帰と相関する（すなわち、治療的投薬レジメンである）。

【００６０】

下流及び上流：本明細書で使用される「下流」という用語は、第１のＤＮＡ領域及び第２のＤＮＡ領域を含む核酸のＣ末端に、第２のＤＮＡ領域と比較して第１のＤＮＡ領域の方が近いことを意味する。本明細書で使用される「上流」という用語は、第１のＤＮＡ領域及び第２のＤＮＡ領域を含む核酸のＮ末端に、第２のＤＮＡ領域と比較して第１のＤＮＡ領域の方が近いことを意味する。

【００６１】

有効量：「有効量」は、対象において所望の生理学的変化をもたらす上で必要な製剤の量である。有効量は、研究目的で投与されることが多い。

【００６２】

操作された：本明細書で使用される「操作された」という用語は、人工的に処理されているという側面を指す。例えば、２つ以上の配列が、天然ではその順序で一緒に連結されないものであり、人工的に処理されることで、操作されるポリヌクレオチドにおいて互いに直接的に連結される場合、そのポリヌクレオチドは、「操作された」と見なされる。「操作された」核酸配列または「操作された」アミノ酸配列は、組換え核酸配列または組換えアミノ酸配列であり得、「遺伝子操作された」と称され得ることを当業者なら理解するであろう。いくつかの実施形態では、第１の配列とは機能可能なように連結された状態で天然に見られるが、第２の配列とは機能可能なように連結された状態で天然に見られないコード配列及び／または制御配列を、操作されたポリヌクレオチドは含み、このコード配列及び／または制御配列は、この操作されたポリヌクレオチド中で人工的に第２の配列と機能可能なように連結された状態で存在する。いくつかの実施形態では、細胞または生物は、その遺伝情報が変化するように処理されている場合（例えば、それまでは存在しなかった新たな遺伝物質が導入されている場合（この導入は、例えば、形質転換、交配、体細胞交雑、トランスフェクション、形質導入、もしくは他の機構によって行われる）、または既に存在した遺伝物質が改変もしくは除去されている場合（この改変もしくは除去は、例えば、置換、欠失、もしくは交配によって行われる））、「操作された」または「遺伝子操作された」と見なされる。一般的に行われることであり、当業者なら理解していることであるが、操作されたポリヌクレオチドまたは細胞の子孫またはコピー（完全なものまたは不完全なもの）は、直接的な処理が前の実体に対して行われたものであったとしても、典型的には、依然として「操作された」と称される。

【００６３】

添加物：本明細書で使用される「添加物」は、医薬組成物に含められ得る非治療剤を指し、こうした非治療剤を医薬組成物に含めることで、例えば、所望の一貫性または安定化効果が得られるか、またはその一助となる。いくつかの実施形態では、適切な医薬品添加物には、例えば、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、脂肪粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノール、または同様のものが含まれ得る。

【００６４】

発現：本明細書で使用される「発現」は、コードされる薬剤（タンパク質など）がその核酸配列から生じる１つ以上の生物学的プロセスを個々及び／または累積的に指す。発現は、具合的には、転写及び翻訳の一方または両方を含む。

【００６５】

隣接する：本明細書で使用されるように、第２のエレメント及び第３のエレメントを含む連続配列の中に存在する第１のエレメント（例えば、核酸配列またはアミノ酸配列）は、それが連続配列中で第２のエレメントと第３のエレメントとの間に位置する場合、第２のエレメント及び第３のエレメントと「隣接する」。したがって、そのような配置では、第２のエレメント及び第３のエレメントは、第１のエレメントと「隣接する」と称され得る。隣接するエレメントは、隣接されるエレメントのすぐ隣に位置するか、または１つ以上の関連単位によって隣接されるエレメントと分離されて位置し得る。連続配列が核酸配列またはアミノ酸配列であり、関連単位が、それぞれ塩基またはアミノ酸残基であるさまざまな例では、隣接されるエレメントと第１の隣接するエレメントとの間、及び／または当該隣接されるエレメントと第２の隣接するエレメントとの間に存在する連続配列中単位の数は、独立して、例えば、５０単位以下（例えば、５０単位以下、４５単位以下、４０単位以下、３５単位以下、３０単位以下、２５単位以下、２０単位以下、１５単位以下、１０単位以下、５単位以下、４単位以下、３単位以下、２単位以下、１単位以下、または０単位）であり得る。

【００６６】

断片：本明細書で使用される「断片」は、参照薬剤（「親」薬剤と称されることもある）の分離部分を含む及び／または当該分離部分からなる構造を指す。いくつかの実施形態では、断片には、参照薬剤に見られる１つ以上の部分が存在しない。いくつかの実施形態では、断片は、参照薬剤に見られる１つ以上の部分を含むか、または参照薬剤に見られる１つ以上の部分からなる。いくつかの実施形態では、参照薬剤は、ポリマー（ポリヌクレオチドまたはポリペプチドなど）である。いくつかの実施形態では、ポリマーの断片は、参照ポリマーの単量体単位（例えば、残基）を含むか、または当該単量体単位からなるものであり、当該単量体単位の数は、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２５、少なくとも３０、少なくとも３５、少なくとも４０、少なくとも４５、少なくとも５０、少なくとも５５、少なくとも６０、少なくとも６５、少なくとも７０、少なくとも７５、少なくとも８０、少なくとも８５、少なくとも９０、少なくとも９５、少なくとも１００、少なくとも１１０、少なくとも１２０、少なくとも１３０、少なくとも１４０、少なくとも１５０、少なくとも１６０、少なくとも１７０、少なくとも１８０、少なくとも１９０、少なくとも２００、少なくとも２１０、少なくとも２２０、少なくとも２３０、少なくとも２４０、少なくとも２５０、少なくとも２７５、少なくとも３００、少なくとも３２５、少なくとも３５０、少なくとも３７５、少なくとも４００、少なくとも４２５、少なくとも４５０、少なくとも４７５、少なくとも５００、またはそれを超える数である。いくつかの実施形態では、ポリマーの断片は、参照ポリマーに見られる単量体単位（例えば、残基）の少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも２５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、またはそれを超える％を含むか、またはそれからなるのものである。参照ポリマーの断片は、参照ポリマーの対応部分と必ずしも同一ではない。例えば、参照ポリマーの断片は、参照ポリマーとの同一性％が少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも２５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、またはそれを超える％である残基の配列を有するポリマーであり得る。断片は、参照薬剤の物理的断片化に

よって生成される場合もそうでない場合もあり得る。場合によっては、断片は、参照薬剤の物理的断片化によって生成される。場合によっては、断片は、参照薬剤の物理的断片化によって生成されるものではなく、代わりに、例えば、デノボ合成または他の手段によって生成され得る。

【００６７】

遺伝子、導入遺伝子：本明細書で使用される「遺伝子」という用語は、コード配列（すなわち、発現産物（ＲＮＡ産物及び／またはポリペプチド産物など）をコードするＤＮＡ配列）であるＤＮＡ配列を指すか、またはコード配列を含むＤＮＡ配列を指し、こうしたコード配列は、任意選択で、こうしたコード配列の発現を制御する制御配列のいくつかまたはすべてと一緒になったものである。いくつかの実施形態では、遺伝子は、非コード配列（限定されないが、イントロンなど）を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子は、コード配列（例えば、エクソン配列）及び非コード配列（例えば、イントロン配列）の両方を含み得る。いくつかの実施形態では、遺伝子は、プロモーターである制御配列を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子は、（ｉ）参照環境（起源ゲノムなど）中でコード配列の所定ヌクレオチド数分上流に伸びているＤＮＡヌクレオチド、及び（ｉｉ）参照環境（起源ゲノムなど）中でコード配列の所定ヌクレオチド数分下流に伸びているＤＮＡヌクレオチド、の一方または両方を含む。さまざまな実施形態において、所定ヌクレオチド数は、５００ｂｐ、１ｋｂ、２ｋｂ、３ｋｂ、４ｋｂ、５ｋｂ、１０ｋｂ、２０ｋｂ、３０ｋｂ、４０ｋｂ、５０ｋｂ、７５ｋｂ、または１００ｋｂであり得る。本明細書で使用される「導入遺伝子」は、参照環境中に存在するか、または操作によって参照環境に配置されるが、参照環境に内在するものではないか、または参照環境に元から存在するものではない遺伝子を指す。

【００６８】

遺伝子産物または発現産物：本明細書で使用される「遺伝子産物」または「発現産物」という用語は、一般に、遺伝子から転写されるＲＮＡ（プロセシング前及び／またはプロセシング後）を指すか、あるいは遺伝子から転写されるＲＮＡによってコードされるポリペプチド（修飾前及び／または修飾後）を指す。

【００６９】

宿主細胞、標的細胞：本明細書で使用される「宿主細胞」は、外来性ＤＮＡ（組換えまたはその他のもの）（導入遺伝子など）が導入されている細胞を指す。「宿主細胞」は、外来性ＤＮＡが最初に導入された細胞及び／またはその完全もしくは不完全な子孫もしくはコピーであり得ることを当業者なら理解するであろう。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、１つ以上のウイルス遺伝子または導入遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、所期の宿主細胞または潜在的な宿主細胞は、標的細胞と称され得る。

【００７０】

さまざまな実施形態において、宿主細胞または標的細胞は、さまざまな表面マーカーの存在、不在、または発現レベルによって同定される。

【００７１】

細胞または細胞集団が特定のマーカーに「陽性」である、または特定のマーカーを発現している、という記載は、特定のマーカーの細胞上または細胞内の存在が検出可能であることを指す。表面マーカーへの言及がある場合、この用語は、フローサイトメトリーによって検出されるものとしての表面発現が存在することを指し得、この検出は、例えば、マーカーに特異的に結合する抗体での染色を行い、当該抗体を検出することによって行われ、この染色は、アイソタイプが一致する対照を用いてその他は同一の条件の下で同じ手順を実施して検出される染色を実質的に超えるレベル、及び／またはマーカーに陽性であることが知られる細胞のレベルと実質的に同様のレベル、及び／またはマーカーに陰性であることが知られる細胞のレベルと比較して実質的に高いレベルで、フローサイトメトリーによって検出可能である。

【００７２】

細胞または細胞集団が特定のマーカーに「陰性」である、またはマーカーを発現しない

、という記載は、特定のマーカーの細胞上または細胞内の存在が実質的に検出不可能であることを指す。表面マーカーへの言及がある場合、この用語は、フローサイトメトリーによって検出されるものとしての表面発現が存在しないことを指し得、この検出は、例えば、マーカーに特異的に結合する抗体での染色を行い、当該抗体を検出することによって行われ、この染色は、アイソタイプが一致する対照を用いてその他は同一の条件の下で同じ手順を実施して検出される染色を実質的に超えるレベル、及び／またはマーカーに陽性であることが知られる細胞のレベルと比較して実質的に低いレベル、及び／またはマーカーに陰性であることが知られる細胞のレベルと比較して実質的に同様レベルで、フローサイトメトリーによって検出されない。

【００７３】

同一性：本明細書で使用される「同一性」という用語は、ポリマー分子間（例えば、核酸分子間（例えば、ＤＮＡ分子間及び／またはＲＮＡ分子間）及び／またはポリペプチド分子間）の全体的な関連性を指す。当該技術分野では、提供される２つの配列の間での同一性パーセントを計算するための方法が知られている。「配列同一性％」という用語は、２つ以上の配列を比較することによって決定されるそれらの配列の間の関連性を指す。当該技術分野では、「同一性」は、タンパク質配列の鎖間の一致及び核酸配列の鎖間の一致によって決定されるそのような配列の間の配列関連度も意味する。「同一性」（「類似性」と称されることが多い）は、既知の方法によって容易に計算でき、こうした方法には、Ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎａｌ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｌｅｓｋ，Ａ．Ｍ．，ｅｄ．）Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ（１９８８）に記載のもの、Ｂｉｏｃｏｍｐｕｔｉｎｇ：Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ａｎｄ Ｇｅｎｏｍｅ Ｐｒｏｊｅｃｔｓ（Ｓｍｉｔｈ，Ｄ．Ｗ．，ｅｄ．）Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ（１９９４）に記載のもの、Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ｄａｔａ，Ｐａｒｔ Ｉ（Ｇｒｉｆｆｉｎ，Ａ．Ｍ．，ａｎｄ Ｇｒｉｆｆｉｎ，Ｈ．Ｇ．，ｅｄｓ．）Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，ＮＪ（１９９４）に記載のもの、Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｖｏｎ Ｈｅｉｊｎｅ，Ｇ．，ｅｄ．）Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９８７）に記載のもの、及びＳｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｐｒｉｍｅｒ（Ｇｒｉｂｓｋｏｖ，Ｍ．ａｎｄ Ｄｅｖｅｒｅｕｘ，Ｊ．，ｅｄｓ．）Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ（１９９２）に記載のものが含まれる。好ましい同一性決定方法は、被検配列間の一致が最良となるように設計される。同一性及び類似性を決定するための方法は、公的に利用可能なコンピュータープログラムにおいて体系化されている。例えば、２つの核酸配列またはポリペプチド配列の同一性パーセントの計算は、例えば、最適な比較を目的として２つの配列（または一方もしくは両方の配列の相補配列）のアライメントをとることによって実施され得る（例えば、アライメントが最適化するように第１の配列及び第２の配列の一方または両方にギャップが導入される可能性があり、非同一配列は比較目的では無視され得る）。その後、対応位置でヌクレオチドまたはアミノ酸の比較が行われる。第１の配列中のある位置が第２の配列中の対応位置のものと同じ残基（例えば、ヌクレオチドまたはアミノ酸）によって占有されている場合、これらの分子は当該位置で同一である。２つの配列の間の同一性パーセントは、それらの配列によって共有される同一位置の数の関数であり、任意選択で、ギャップの数及び各ギャップの長さが考慮され、こうしたギャップは、２つの配列の間のアライメントが最適化するように導入される必要があり得る。２つの配列の間の配列比較及び同一性パーセントの決定は、計算アルゴリズム（ＢＬＡＳＴ（基本的局所アライメント検索ツール）など）を使用して達成され得る。配列アライメント及び同一性パーセント計算は、ＬＡＳＥＲＧＥＮＥバイオインフォマティクスコンピューティングスイート（ＤＮＡＳＴＡＲ，Ｉｎｃ．，Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ）のＭｅｇａｌｉｇｎプログラムを使用して実施され得る。デフォルトパラメーター（ギャップペナルティ＝１０、ギャップ長ペナルティ＝１０）を用いてＣｌｕｓｔａｌアライメント法（Ｈｉｇｇｉｎｓ ａｎｄ Ｓｈａｒｐ ＣＡＢＩＯＳ，５，１５１－１５３（１９８９））を使用して多重配列アライメントも実施され得る。関連プログ

ラムには、ＧＣＧプログラムスイート（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｐａｃｋａｇｅ Ｖｅｒｓｉｏｎ ９．０，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ（ＧＣＧ），Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ）、ＢＬＡＳＴＰ、ＢＬＡＳＴＮ、ＢＬＡＳＴＸ（Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０（１９９０））、ＤＮＡＳＴＡＲ（ＤＮＡＳＴＡＲ，Ｉｎｃ．，Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ）、及びＳｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズムが組み込まれたＦＡＳＴＡプログラム（Ｐｅａｒｓｏｎ，Ｃｏｍｐｕｔ．Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．，［Ｐｒｏｃ．Ｉｎｔ．Ｓｙｍｐ．］（１９９４），Ｍｅｅｔｉｎｇ Ｄａｔｅ １９９２，１１－２０．Ｅｄｉｔｏｒ（ｓ）：Ｓｕｈａｉ，Ｓａｎｄｏｒ．Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒ：Ｐｌｅｎｕｍ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．）も含まれる。本開示の文脈内では、解析に配列解析ソフトウェアが使用される場合、解析の結果は言及プログラムの「デフォルト値」に基づくものであることが理解されよう。「デフォルト値」は、任意の一連の値またはパラメーターを意味することになり、こうした一連の値またはパラメーターは、最初の初期化時にソフトウェアに最初に設定されるものである。

【００７４】

「改善する」、「増加させる」、「阻害する」、または「低減する」：本明細書で使用される「改善する」、「増加させる」、「阻害する」、及び「低減する」という用語、ならびにその文法的同等形態は、参照との定性的または定量的な差異を生じさせることを示す。

【００７５】

単離された：本明細書で使用される「単離された」は、物質及び／または実体が、（１）それが最初に生じたとき（天然及び／または実験的状況でのことであるかは無関係である）にはそれに付随していた成分の少なくともいくつかから分離されており、及び／または（２）人工的に設計、生成、調製、及び／または製造されたものであることを指す。単離された物質及び／または実体は、それに最初に付随したその他の成分の１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または９９％超が分離されたものであり得る。いくつかの実施形態では、単離された薬物の純度は８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または９９％超である。本明細書で使用されるように、物質は、それが他の成分を実質的に含まないのであれば、「純粋」である。いくつかの実施形態では、当業者なら理解するであろうが、物質は、ある特定の他の成分（例えば、１つ以上の担体または添加物（例えば、緩衝剤、溶媒、水など）など）と組み合わさった後でも依然として「単離された」と見なされるか、または「純粋」であるとさえ見なされ得る。そのような実施形態では、物質の単離パーセントまたは純度は、そのような担体または添加物を含めずに計算される。一例を挙げるにすぎないが、いくつかの実施形態では、天然に生じる生物学的ポリマー（ポリペプチドまたはポリヌクレオチドなど）は、ａ）その起源または由来元の理由で、天然におけるその天然状態ではそれに付随する成分のいくつかまたはすべてがそれに伴わない場合、ｂ）天然においてそれを産生する種と同じ種の他のポリペプチドまたは核酸をそれが実質的に含まない場合、ｃ）天然においてそれを産生する種のものではない細胞もしくは他の発現系によってそれが発現するか、または当該細胞もしくは他の発現系に由来する成分がその他の様式でそれに付随する場合、「単離された」と見なされる。したがって、例えば、いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、化学的に合成されたものであるか、またはそれを天然に産生するものとは異なる細胞系において合成されたものである場合、「単離された」ポリペプチドであると見なされる。代替的または付加的に、いくつかの実施形態では、１つ以上の精製手法に供されているポリペプチドは、ａ）天然ではそれに付随し、及び／またはｂ）それが最初に産生されたときにそれに付随した他の成分からそれが分離されている限りにおいては、「単離された」ポリペプチドであると見なされ得る。

【００７６】

機能可能なように連結された：本明細書で使用される「機能可能なように連結された（

ｏｐｅｒａｂｌｙ　ｌｉｎｋｅｄ）」または「機能可能なように連結された（ｏｐｅｒａｔｉｖｅｌｙ　ｌｉｎｋｅｄ）」は、少なくとも第１のエレメントと第２のエレメントとが結び付いており、その結果、これらの構成エレメントが、それらの所期の様式でそれらが機能することが可能になる関係性にあることを指す。例えば、核酸制御配列によって核酸コード配列の発現制御が可能になる様式で当該制御配列と当該コード配列とが結び付いている場合、当該制御配列は、当該コード配列と「機能可能なように連結されている」。いくつかの実施形態では、「機能可能なように連結された」制御配列は、（例えば、単一の核酸において）コード配列と直接的または間接的に共有結合で結び付いている。いくつかの実施形態では、制御配列は、トランスでコード配列の発現を制御し、コード配列の核酸と同じ核酸の中に制御配列が含まれることが機能可能な連結の要件ではない。

【００７７】

医薬的に許容可能な：本明細書で使用される「医薬的に許容可能な」という用語は、本明細書に開示の組成物の製剤の構成成分（複数可）の１つ以上またはすべてに適用される場合、各構成成分が組成物のその他の成分と適合し、そのレシピエントに無害でなくてはならないことを意味する。

【００７８】

医薬的に許容可能な担体：本明細書で使用される「医薬的に許容可能な担体」という用語は、薬剤（例えば、医薬物質）の製剤化を促進するか、薬剤のバイオアベイラビリティを改変するか、または対象の１つの臓器もしくは一部分から別の臓器もしくは一部分への薬剤の輸送を促進する医薬的に許容可能な物質、組成物、または媒体（液体または固体の増量剤、希釈剤、添加物、または溶媒封入物質など）を指す。医薬的に許容可能な担体として働き得る物質のいくつかの例としては、糖（ラクトース、グルコース、及びスクロースなど）、デンプン（コーンスターチ及びジャガイモデンプンなど）、セルロース及びその誘導体（カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、及び酢酸セルロースなど）、粉末トラガカント、麦芽、ゼラチン、タルク、添加物（ココアバター及び坐剤ワックスなど）、油（ピーナッツ油、綿実油、サフラワー油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油、及び大豆油など）、グリコール（プロピレングリコールなど）、ポリオール（グリセリン、ソルビトール、マンニトール、及びポリエチレングリコールなど）、エステル（オレイン酸エチル及びラウリン酸エチルなど）、寒天、緩衝剤（水酸化マグネシウム及び水酸化アルミニウムなど）、アルギン酸、パイロジェンフリー水、等張生理食塩水、リンゲル液、エチルアルコール、ｐＨ緩衝液、ポリエステル、ポリカーボネート、及び／またはポリ酸無水物、ならびに医薬製剤において用いられる他の無毒な適合物質が挙げられる。

【００７９】

医薬組成物：本明細書で使用される「医薬組成物」という用語は、活性薬剤が１つ以上の医薬的に許容可能な担体と一緒に製剤化された組成物を指す。

【００８０】

プロモーター：本明細書で使用される「プロモーター」または「プロモーター配列」は、コード配列の転写の開始及び／または処理能力に直接的または間接的に（例えば、プロモーターに結合するタンパク質または物質を介して）関与するＤＮＡ制御領域であり得る。プロモーターは、１つ以上の転写因子及び／または制御部分が当該プロモーターと結合するとコード配列の転写を適切な条件の下で開始し得る。コード配列の転写の開始に関与するプロモーターは、コード配列と「機能可能なように連結された」ものであり得る。ある特定の場合、プロモーターは、ＤＮＡ制御領域（このＤＮＡ制御領域は、（その３’末端に位置する）転写開始部位から上流（５’方向）位置へと伸びており、その結果、そのように呼ばれる配列は、転写事象の開始に必要な最小数の塩基もしくはエレメントの一方もしくは両方を含む）であるか、または当該ＤＮＡ制御領域を含み得る。プロモーターは、発現制御配列（エンハンサー配列及びリプレッサー配列など）であるか、発現制御配列（エンハンサー配列及びリプレッサー配列など）を含むか、または発現制御配列（エンハンサー配列及びリプレッサー配列など）と機能可能なように結び付けられるか、もしくは

機能可能なように連結され得る。いくつかの実施形態では、プロモーターは、誘導性であり得る。いくつかの実施形態では、プロモーターは、構成的プロモーターであり得る。いくつかの実施形態では、条件的（例えば、誘導性）プロモーターは、一方向性または双方向性であり得る。プロモーターは、特定の種のゲノム中に生じることが知られる配列と同一の配列であるか、または当該配列を含み得る。いくつかの実施形態では、プロモーターは、ハイブリッドプロモーターであるか、またはハイブリッドプロモーターを含み得、こうしたハイブリッドプロモーターでは、転写制御領域を含む配列は第１の起源から得られるものであり得、転写開始領域を含む配列は第２の起源から得られるものであり得る。制御エレメントを導入遺伝子内でコード配列と連結するための系については、当該技術分野でよく知られている（一般的な分子生物学的手法及び組換えＤＮＡ手法については、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｆｒｉｔｓｃｈ，ａｎｄ Ｍａｎｉａｔｉｓ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ，１９８９に記載されている）。

【００８１】

参照：本明細書で使用される「参照」は、比較の実施対象である基準または対照を指す。例えば、いくつかの実施形態では、薬剤、試料、配列、対象、動物、もしくは個体、またはその集団、あるいはその尺度または特徴的代表は、参照である薬剤、試料、配列、対象、動物、もしくは個体、またはその集団、あるいはその尺度または特徴的代表と比較される。いくつかの実施形態では、参照は、測定値である。いくつかの実施形態では、参照は、確立基準または予測値である。いくつかの実施形態では、参照は、歴史的参照である。参照は、定量的または定性的であり得る。典型的には、当業者なら理解するであろうが、参照及びその比較対象値は、同等の条件の下での尺度となる。信頼性及び／または比較の正当化に十分な類似性が存在する場合を当業者なら理解するであろう。いくつかの実施形態では、適切な参照は、薬剤、試料、配列、対象、動物、もしくは個体、またはその集団（（例えば、１つ以上の特定の変数（例えば、薬剤または条件の存在有無）を評価する目的について）当業者が同等であると認識するであろう条件の下にあるもの）、あるいはその尺度または特徴的代表であり得る。

【００８２】

制御配列：核酸コード配列の発現の文脈において本明細書で使用される制御配列は、コード配列の発現を制御する核酸配列である。いくつかの実施形態では、制御配列は、遺伝子発現の１つ以上の側面（例えば、細胞型特異的発現、誘導性発現など）を制御するか、またはそれに影響を与え得る。

【００８３】

対象：本明細書で使用される「対象」という用語は、生物、典型的には哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、またはマウス）を指す。いくつかの実施形態では、対象は、疾患、障害、または状態を患っている。いくつかの実施形態では、対象は、疾患、障害、または状態に易罹患性である。いくつかの実施形態では、対象は、疾患、障害、または状態の症状または特徴を１つ以上示す。いくつかの実施形態では、対象は、疾患、障害、または状態を患っていない。いくつかの実施形態では、対象は、疾患、障害、または状態の症状または特徴をいずれも示さない。いくつかの実施形態では、対象は、疾患、障害、もしくは状態への易罹患性またはそのリスクに特徴的な特徴を１つ以上有する。いくつかの実施形態では、対象は、疾患、障害、または状態について検査されており、及び／または治療が施されている対象である。場合によっては、ヒト対象は、「患者」または「個体」と互換的に称され得る。

【００８４】

治療剤：本明細書で使用される「治療剤」という用語は、対象に投与されると所望の薬理学的作用を誘発する任意の薬剤を指す。いくつかの実施形態では、薬剤は、適切な集団にわたって統計的に有意な作用を示す場合、治療剤と見なされる。いくつかの実施形態では、適切な集団は、モデル生物集団またはヒト集団であり得る。いくつかの実施形態では

、適切な集団は、さまざまな基準（ある特定の年齢層、性別、遺伝的背景、持病など）によって定義され得る。いくつかの実施形態では、治療剤は、疾患、障害、または状態の治療に使用され得る物質である。いくつかの実施形態では、治療剤は、ヒトへの投与を目的として市販され得る前に政府機関によって承認されているまたは承認される必要がある薬剤である。いくつかの実施形態では、治療剤は、ヒトに投与する上で医学的な処方が必要な薬剤である。

【００８５】

治療的に有効な量：本明細書で使用される「治療的に有効な量」は、その投与目的である所望の作用が得られる量を指す。いくつかの実施形態では、この用語は、疾患、障害、及び／または状態の罹患集団または易罹患性集団に対して治療的投薬レジメンに従って投与された場合に疾患、障害、及び／または状態を治療する上で十分な量を指す。いくつかの実施形態では、治療的に有効な量は、疾患、障害、及び／または状態の症状の１つ以上の発症率及び／または重症度を低減し、及び／またはその発症を遅延させる量である。「治療的に有効な量」という用語は、特定の個体において治療が成功裏に達成されることを実際に必要とするものではないことを当業者なら理解するであろう。むしろ、治療的に有効な量は、そのような治療を必要とする患者に投与されると顕著な数の対象において特定の所望の薬理学的応答が得られる量であり得る。いくつかの実施形態では、治療的に有効な量に対する言及は、１つ以上の特定の組織（例えば、疾患、障害、もしくは状態の患部組織）または体液（例えば、血液、唾液、血清、汗、涙、尿など）において測定される量に対する言及であり得る。いくつかの実施形態では、特定の薬剤または治療の治療的に有効な量は、単回用量において製剤化及び／または投与され得ることを当業者なら理解するであろう。いくつかの実施形態では、治療的に有効な薬剤は、（例えば、投薬レジメンの一部として）複数回用量において製剤化及び／または投与され得る。

【００８６】

治療：本明細書で使用される「治療／処置（ｔｒｅａｔｍｅｎｔ）」（「治療する（ｔｒｅａｔ）」または「治療すること（ｔｒｅａｔｉｎｇ）」とも称される）という用語は、特定の疾患、障害、及び／または状態の１つ以上の症状、特徴、及び／または原因の軽減、軽快、緩和、抑制、発症遅延、重症度低減、及び／または発症率低減を部分的または完全に生じさせる治療を施すこと、あるいはいずれかのそのような結果を達成することを目的として施される治療を施すこと、を指す。いくつかの実施形態では、そのような治療は、関連する疾患、障害、及び／または状態の徴候を示さない対象に対するものであり、及び／または疾患、障害、または状態の初期徴候のみを示す対象に対するものであり得る。代替的または付加的に、そのような治療は、関連する疾患、障害、及び／または状態の確立された徴候を１つ以上示す対象に対するものであり得る。いくつかの実施形態では、治療は、関連する疾患、障害、及び／または状態を患っていると診断された対象に対するものであり得る。いくつかの実施形態では、治療は、関連する疾患、障害、または状態の発症リスクの上昇と統計的に相関する１つ以上の易罹患性因子を有することが判明している対象に対するものであり得る。「予防的治療」は、治療すべき状態の徴候もしくは症状を示さない対象または治療すべき状態の初期の徴候もしくは症状のみを示す対象に施される治療を含み、こうした治療は、そうした状態の発症リスクの軽減、阻止、または低減を目的として施される。したがって、予防的治療は、状態に対する阻止的な治療として機能する。「治療的処置」は、状態の症状または徴候を示す対象に施される治療を含み、こうした治療は、そうした状態の重症度または進行を低減する目的で対象に施される。

【００８７】

単位用量：本明細書で使用される「単位用量」という用語は、医薬組成物の単回用量及び／または物理的に個別の単位として投与される量を指す。多くの実施形態では、単位用量は、所定量の活性薬剤を含み、例えば、所定のウイルス力価（所与の体積中のウイルス数、ビリオン数、またはウイルス粒子数）を有する。いくつかの実施形態では、単位用量は、全単回用量の薬剤を含む。いくつかの実施形態では、総単回用量を達成するために複数の単位用量が投与される。いくつかの実施形態では、所期の効果を達成するためには、

複数の単位用量の投与が必要であるか、または必要であると予想される。単位用量は、例えば、１つ以上の治療用部分を所定量で含む一定体積の液体（例えば、許容可能な担体）、１つ以上の治療用部分を所定量で含む固体形態、１つ以上の治療用部分を所定量で含む持続放出製剤または薬物送達デバイスなどであり得る。単位用量が存在し得る製剤には、治療用部分（複数可）に加えてさまざまな成分が任意に含められることが理解されよう。例えば、許容可能な担体（例えば、医薬的に許容可能な担体）、希釈剤、安定化剤、緩衝剤、保存剤などが含められ得る。多くの実施形態では、特定の治療剤の適切な日々の総用量は、一部または複数の単位用量を含み得、例えば、健全な医学的判断の範囲内で主治医によって決定され得ることを当業者なら理解するであろう。いくつかの実施形態では、任意の特定の対象または生物に対する特定の有効用量レベルは、さまざまな要因に依存し得、こうした要因には、治療される障害及び障害の重症度、用いられる特定の活性化合物の活性、用いられる特定の組成物、対象の年齢、体重、総体的な健康、性別、及び食事、用いられる特定の活性化合物の投与時間及び排泄速度、治療期間、用いられる特定の化合物（複数可）と併用または同時使用される薬物及び／または追加の治療、ならびに医学分野でよく知られる同様の要因が含まれる。

【００８８】

本明細書の提出図面の多くは、カラーの方が理解しやすいものである。出願人は、最初の提出の一部としての図面のカラーバージョンを検討し、後の手続きにおいて図面のカラー画像を提示する権利を留保する。

【図面の簡単な説明】

【００８９】

【図１－１】ベクター例の模式図を示す。これらのベクター例の模式図は、提供されるＡｄ３５ベクターの実施形態において有用な組み込みカセット及び一過性発現カセットにおける可能な構成要素配置を示す。組み込みカセットは、ｆｒｔ部位の間にトランスポゾン及び他の構成要素を含む。ＨＤＡｄベクターは、発現産物（Ｅｘｐ．Ｐｒｏｄｕｃｔ）（γ－グロビン、ＧＦＰ、ｍＣｈｅｒｒｙ、及びｈＦＶＩＩＩ（ＥＴ３）など）、プロモーター（複数可）（ＥＦ１αプロモーター、ＰＧＫプロモーター、またはβプロモーターなど）、選択マーカー（複数可）（ｍｇｍｔ$^{Ｐ１４０Ｋ}$など）、制御エレメント（Ｒｅｇ．Ｅｌｅｍｅｎｔ）（プロモーター、ポリＡ尾部など）、及び／またはインスレーター（ｃＨＳ４など）を含み得る。一過性発現カセットは、同様の構成要素、ならびにＤＮＡ切断分子（複数可）（例えば、ｓｐＣａｓ９）または塩基エディター（複数可）及びゲノム標的指向性ガイド（ＧＴＧ；例えば、ｓｇＲＮＡ）を含む。トランスポゼースベクターは、標的指向化リコンビナーゼ（例えば、ＦｌｐＥ）及びトランスポゼース（例えば、ＳＢ１００ｘ）を含む。これらのベクターは、一方の配向／方向で示されているが、代替的に逆方向でも提供され得る。

【図１－２】ベクター例の模式図を示す。これらのベクター例の模式図は、提供されるＡｄ３５ベクターの実施形態において有用な組み込みカセット及び一過性発現カセットにおける可能な構成要素配置を示す。組み込みカセットは、ｆｒｔ部位の間にトランスポゾン及び他の構成要素を含む。ＨＤＡｄベクターは、発現産物（Ｅｘｐ．Ｐｒｏｄｕｃｔ）（γ－グロビン、ＧＦＰ、ｍＣｈｅｒｒｙ、及びｈＦＶＩＩＩ（ＥＴ３）など）、プロモーター（複数可）（ＥＦ１αプロモーター、ＰＧＫプロモーター、またはβプロモーターなど）、選択マーカー（複数可）（ｍｇｍｔ$^{Ｐ１４０Ｋ}$など）、制御エレメント（Ｒｅｇ．Ｅｌｅｍｅｎｔ）（プロモーター、ポリＡ尾部など）、及び／またはインスレーター（ｃＨＳ４など）を含み得る。一過性発現カセットは、同様の構成要素、ならびにＤＮＡ切断分子（複数可）（例えば、ｓｐＣａｓ９）または塩基エディター（複数可）及びゲノム標的指向性ガイド（ＧＴＧ；例えば、ｓｇＲＮＡ）を含む。トランスポゼースベクターは、標的指向化リコンビナーゼ（例えば、ＦｌｐＥ）及びトランスポゼース（例えば、ＳＢ１００ｘ）を含む。これらのベクターは、一方の配向／方向で示されているが、代替的に逆方向でも提供され得る。

【図１－３】ベクター例の模式図を示す。これらのベクター例の模式図は、提供されるＡ

ｄ３５ベクターの実施形態において有用な組み込みカセット及び一過性発現カセットにおける可能な構成要素配置を示す。組み込みカセットは、ｆｒｔ部位の間にトランスポゾン及び他の構成要素を含む。ＨＤＡｄベクターは、発現産物（Ｅｘｐ．Ｐｒｏｄｕｃｔ）（γ－グロビン、ＧＦＰ、ｍＣｈｅｒｒｙ、及びｈＦＶＩＩＩ（ＥＴ３）など）、プロモーター（複数可）（ＥＦ１αプロモーター、ＰＧＫプロモーター、またはβプロモーターなど）、選択マーカー（複数可）（ｍｇｍｔ$^{Ｐ１４０Ｋ}$など）、制御エレメント（Ｒｅｇ．Ｅｌｅｍｅｎｔ）（プロモーター、ポリＡ尾部など）、及び／またはインスレーター（ｃＨＳ４など）を含み得る。一過性発現カセットは、同様の構成要素、ならびにＤＮＡ切断分子（複数可）（例えば、ｓｐＣａｓ９）または塩基エディター（複数可）及びゲノム標的指向性ガイド（ＧＴＧ；例えば、ｓｇＲＮＡ）を含む。トランスポゼースベクターは、標的指向化リコンビナーゼ（例えば、ＦｌｐＥ）及びトランスポゼース（例えば、ＳＢ１００ｘ）を含む。これらのベクターは、一方の配向／方向で示されているが、代替的に逆方向でも提供され得る。

【図２Ａ】異常ヘモグロビン症のＨＳＰＣ遺伝子治療のための組み込みＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを示す。ベクター構造を示す。ＨＤＡｄ－γ－グロビン／ｍｇｍｔでは、ＨＤＡｄ－ＳＢベクター（右パネル）から生じる高活性Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙトランスポゼース（ＳＢ１００Ｘ）を介する組み込みのための逆方向トランスポゾン反復配列（ＩＲ）及びＦＲＴ部位が１１．８ｋｂのトランスポゾンと隣接している。γ－グロビン発現カセットは、４つのＤＮａｓｅ高感受性（ＨＳ）領域を含む４．３ｋｂバージョンのβ－グロビンＬＣＲと、０．７ｋｂのβ－グロビンプロモーターとを含む。３’－ＵＴＲ（赤血球においてｍＲＮＡを安定化させるためのもの）を含む７６－Ｉｌｅ　ＨＢＧ１遺伝子を使用した。ＬＣＲ／β－プロモーターとＥＦ１Ａプロモーターとの間の干渉を避けるために、カセット間に１．２ｋｂのニワトリＨＳ４クロマチンインスレーター（Ｉｎｓ）を挿入した。ＨＤＡｄ－ＳＢベクターは、活性増強型ＳＢ１００Ｘトランスポゼースの遺伝子及びＦｌｐｅリコンビナーゼの遺伝子（それぞれ遍在性に活性なＰＧＫプロモーター及びＥＦ１Ａプロモーターの制御下にある）を含む。

【図２Ｂ】異常ヘモグロビン症のＨＳＰＣ遺伝子治療のための組み込みＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを示す。動員処理したＣＤ４６ｔｇマウスのインビボでの形質導入を示す。ヒト組換えＧ－ＣＳＦを４日間皮下注射することによってＨＳＰＣを動員した後、ＡＭＤ３１００を１回皮下注射した。ＡＭＤ３１００の注射から３０分後及び６０分後にＨＤＡｄ－γ－グロビン／ｍｇｍｔ及びＨＤＡｄ－ＳＢの１：１混合物を動物に静脈内注射した（注射回数計２回、各４×１０$^{10}$個のウイルス粒子）。次の４週間は免疫抑制（ＩＳ）剤でマウスを処理してヒトγ－グロビン及びＭＧＭＴ$^{Ｐ１４０Ｋ}$に対する免疫応答を回避した。Ｏ$^{6}$－ＢＧ／ＢＣＮＵ処理を４週目に開始し、２週間ごとに行って３回繰り返した。各サイクルに伴って、５ｍｇ／ｋｇ→７．５ｍｇ／ｋｇ→１０ｍｇ／ｋｇとなるようにＢＣＮＵ濃度を増加させた。最後のＯ$^{6}$－ＢＧ／ＢＣＮＵ注射から２週間後に免疫抑制を再開した。

【図２Ｃ】異常ヘモグロビン症のＨＳＰＣ遺伝子治療のための組み込みＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを示す。フローサイトメトリーによって測定したヒトγ－グロビン$^{+}$末梢ＲＢＣのパーセントを示す。各記号は個々の動物を表す。

【図２Ｄ】異常ヘモグロビン症のＨＳＰＣ遺伝子治療のための組み込みＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを示す。末梢血単核細胞（ＭＮＣ）、総細胞、赤血球Ｔｅｒ１１９$^{+}$細胞、及び非赤血球Ｔｅｒ１１９$^{－}$細胞におけるヒトγ－グロビン$^{+}$細胞のパーセントを示す。各記号は個々の動物を表す。

【図２Ｅ】異常ヘモグロビン症のＨＳＰＣ遺伝子治療のための組み込みＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを示す。ＲＢＣ中の成体型マウスグロビン鎖（α、β－メジャー、β－マイナー）に対するヒトγ－グロビンタンパク質のパーセントを１８週目にＨＰＬＣによって測定したものを示す。各記号は個々の動物を表す。

【図２Ｆ】異常ヘモグロビン症のＨＳＰＣ遺伝子治療のための組み込みＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを示す。成体型マウスβ－メジャーグロビンｍＲＮＡに対するヒトγ－グロ

ビンｍＲＮＡのパーセントを１８週目に末梢血液細胞全体でのＲＴ－ｑＰＣＲによって測定したものを示す。いずれの処理も行わないマウスを対照として使用した。各記号は個々の動物を表す。

【図３－１】ｈＣＤ４６ｔｇ対照マウス、及びインビボでの形質導入／選択を行った後の代表的なＣＤ４６ｔｇマウス、から得られたＲＢＣ中のグロビン鎖をＨＰＬＣによって分析したものを示す。数値（ボルト）はピーク強度を示す。各郡由来の合計４匹のマウスを分析し、同様の結果が得られた。このデータのまとめは図２Ｅに示される。図３では、曲線下面積（ＡＵＣ）値は、対応ピークの左にずれて表示されている。

【図３－２】ｈＣＤ４６ｔｇ対照マウス、及びインビボでの形質導入／選択を行った後の代表的なＣＤ４６ｔｇマウス、から得られたＲＢＣ中のグロビン鎖をＨＰＬＣによって分析したものを示す。数値（ボルト）はピーク強度を示す。各郡由来の合計４匹のマウスを分析し、同様の結果が得られた。このデータのまとめは図２Ｅに示される。図３では、曲線下面積（ＡＵＣ）値は、対応ピークの左にずれて表示されている。

【図４】インビボ形質導入から１８週目に収集した骨髄Ｌｉｎ－細胞を移植したマウス（「二次レシピエント」）を分析したものを示す。（Ａ）ＰＢＭＣにおけるヒトＣＤ４６陽性細胞のパーセントに基づいて、示される時点での血液試料において生着を測定したものを示す。（Ｂ）２０週目の骨髄、脾臓、及びＰＢＭＣにおける生着を示す。（Ｃ）ＲＢＣ中のマウスα－グロビンタンパク質に対するヒトγ－グロビンタンパク質の比をＨＰＬＣによって測定したものを示す。各記号は個々の動物を表す。統計解析は、ノンパラメトリッククラスカル・ウォリス検定を用いて実施した。

【図５Ａ】２０週目の二次レシピエントの骨髄細胞における導入遺伝子組み込みの分析を示す。骨髄細胞のマウス染色体上での組み込み部位の局在を示す。代表的なマウスのものが示される。各線は組み込み部位である。この試料中の組み込み部位の数は２，１９７である。

【図５Ｂ】２０週目の二次レシピエントの骨髄細胞における導入遺伝子組み込みの分析を示す。ゲノム領域中の組み込みの分布を示す。５匹のマウスから得られた組み込み部位データをプールし、それらを使用してグラフを作成した。

【図５Ｃ】２０週目の二次レシピエントの骨髄細胞における導入遺伝子組み込みの分析を示す。連続ゲノム枠と重なる組み込みの数及び無作為化したマウスゲノム枠と重なる組み込みの数、ならびにサイズを比較した。プールデータは図５Ｂのものを使用した。類似度についてのピアソンの$\chi^2$検定によるＰ値は０．０６３８１であり、このことは、組み込みパターンが無作為に近いことを暗示している。

【図５Ｄ】２０週目の二次レシピエントの骨髄細胞における導入遺伝子組み込みの分析を示す。導入遺伝子コピー数を示す。非形質導入対照マウス及び２０週目の二次レシピエントに由来する全骨髄細胞から得られたゲノムＤＮＡを、ヒトγ－グロビン特異的プライマーを用いるｑＰＣＲに供した。個々の動物について細胞当たりのコピー数が示される。各記号は個々の動物を表す。

【図５Ｅ】２０週目の二次レシピエントの骨髄細胞における導入遺伝子組み込みの分析を示す。個々のクローン前駆細胞コロニーにおける導入遺伝子コピー数を示す。骨髄Ｌｉｎ－細胞をメチルセルロースに播種し、１５日後に個々のコロニーをピッキングした。ゲノムＤＮＡに対してｑＰＣＲを実施した。個々のコロニーにおけるｑＰＣＲシグナルを細胞当たりの導入遺伝子コピー数として正規化して表したものが示される（ｎ＝１１３）。各記号は、単一の細胞に由来する個々のコロニーにおけるコピー数を表す。

【図６】単一細胞由来の前駆細胞コロニーに対するｑＰＣＲによってＶＣＮを測定したものを示す（図７Ｅを参照のこと）。

【図７Ａ】ＣＤ４６ｔｇマウス（ＨＤＡｄ注射後１８週目）におけるインビボでのＨＳＰＣの形質導入／選択後の血液学的パラメーターを示す。ＷＢＣ数を示す。各記号は個々の動物を表す。ＮＥ：好中球、ＬＹ：リンパ球、ＭＯ：単球、ＢＡ：好塩基球。

【図７Ｂ】ＣＤ４６ｔｇマウス（ＨＤＡｄ注射後１８週目）におけるインビボでのＨＳＰＣの形質導入／選択後の血液学的パラメーターを示す。非処理マウス、及びＨＤＡｄ－γ

－グロビン／ｍｇｍｔ＋ＨＤＡｄ－ＳＢの注射後１８週目のマウス、から得られた代表的な血液塗抹標本を示す。スケールバー：２０μｍ。ＷＢＣの核は紫色に染まっている。

【図７Ｃ】ＣＤ４６ｔｇマウス（ＨＤＡｄ注射後１８週目）におけるインビボでのＨＳＰＣの形質導入／選択後の血液学的パラメーターを示す。血液学的パラメーターを示す。Ｈｂ：ヘモグロビン：ＨＣＴ：ヘマトクリット：ＭＣＶ：平均赤血球容積：ＭＣＨ：平均赤血球ヘモグロビン量：ＭＣＨＣ：平均赤血球ヘモグロビン濃度：ＲＤＷ：赤血球分布幅を示す。ｎ≧３、＊Ｐ＜０．０５。統計解析は、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。各記号は個々の動物を表す。ＮＥ：好中球、ＬＹ：リンパ球、ＭＯ：単球、ＢＡ：好塩基球。

【図７Ｄ】ＣＤ４６ｔｇマウス（ＨＤＡｄ注射後１８週目）におけるインビボでのＨＳＰＣの形質導入／選択後の血液学的パラメーターを示す。ナイーブマウス（対照）及び１８週目に　殺した処理マウスにおける骨髄細胞組成を示す。系譜マーカー陽性細胞（Ｔｅｒ１１９＋細胞、ＣＤ３＋細胞、ＣＤ１９＋細胞、及びＧｒ－１＋細胞）ならびにＨＳＰＣ（ＬＳＫ細胞）のパーセントが示される。各記号は個々の動物を表す。ＮＥ：好中球、ＬＹ：リンパ球、ＭＯ：単球、ＢＡ：好塩基球。

【図７Ｅ】ＣＤ４６ｔｇマウス（ＨＤＡｄ注射後１８週目）におけるインビボでのＨＳＰＣの形質導入／選択後の血液学的パラメーターを示す。インビボでの形質導入後１８週目に収集した骨髄Ｌｉｎ－細胞のコロニー形成能を示す。２，５００個のＬｉｎ－細胞の播種後に形成されたコロニーの数が示される。各記号は個々の動物を表す。ＮＥ：好中球、ＬＹ：リンパ球、ＭＯ：単球、ＢＡ：好塩基球。

【図８】ＣＤ４６＋＋／Ｂｈｈｔｈ－３サラセミアモデルの生成を示す。雌性ＣＤ４６ｔｇマウスを雄性Ｈｂｂｔｈ－３マウスと交配繁殖させた。Ｆ１雑種マウスをｈＣＤ４６＋／＋マウスと戻し交配させて、ｈＣＤ４６＋／＋（ホモ接合型）のＨｂｂｔｈ－３マウスを得た。

【図９Ａ】ＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスサラセミアモデルの表現型を示す。ＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウス（ｎ＝７）の血液学的パラメーターをＣＤ４６ｔｇ（ｎ＝３）及びＨｂｂｔｈ－３マウス（ｎ＝３）のものと比較したものを示す。各記号は個々の動物を表す。＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０００２、＊＊＊Ｐ≦０．０００３。統計解析は、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。ＲＥＴ：網状赤血球。

【図９Ｂ】ＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスサラセミアモデルの表現型を示す。メイ・グリュンワルド／ギムザ染色を行った後の代表的な末梢血塗抹標本を示す。スケールバー：２０μｍ。

【図９Ｃ】ＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスサラセミアモデルの表現型を示す。ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウスの肝臓切片及び脾臓切片に対するＨ＆Ｅ染色によって示した髄外造血（左下の２つのパネル）をＣＤ４６ｔｇマウスの肝臓切片及び脾臓切片（左上の２つのパネル）と比較したものを示す。スケールバー：２０μｍ。左下パネルでは肝臓中の赤芽球クラスターが示されている。下中央のパネル中では脾臓中の巨核球に丸印が付けられている。右上パネル（ＣＤ４６ｔｇマウス）及び右下パネル（ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウス）ではパールプルシアンブルー染色によって脾臓中の鉄沈着（青みがかった顆粒状沈着）が示される。スケールバー：２５μｍ。

【図１０】サラセミアマウス（Ｈｂｂｔｈ－３及びＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３）における白血球を分析して「健康な」ＣＤ４６ｔｇマウスのものと比較したものを示す。ＷＢＣ：白血球、ＮＥＵ：好中球、ＬＹ：リンパ球、ＭＯＮＯ：単球。＊ｐ≦０．０５、＊＊ｐ≦０．０００２、＊＊＊ｐ≦０．０００３。これらは、処理前のマウス（ＣＤ４６ｔｇ（ｎ＝８）、Ｈｂｂｔｈ３（ｎ＝４）、ＣＤ４６＋＋／Ｈｂｂｔｈ３（ｎ＝２０））におけるベースラインレベルである。各記号は個々の動物を表す。統計解析は、ノンパラメトリッククラスカル・ウォリス検定を用いて実施した。

【図１１】ＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスにおけるＨＳＰＣの動員を示す。最後のＡＭＤ３１００注射から１時間後に末梢血中に動員されたＬＳＫ（系譜－／Ｓｃａ－１＋／ｃ－Ｋｉｔ＋／）細胞の数が示される。動員処理マウスについてはｎ＝１７、非処理

マウスについてはｎ＝３。統計解析は、ノンパラメトリッククラスカル・ウォリス検定を用いて実施した。

【図１２】動員処理したＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスにおけるインビボでの形質導入／選択を示す。動員処理したＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ３マウスにおいてインビボでの形質導入を行った。ヒト組換えＧ－ＣＳＦを６日間（１～６日目）皮下注射した後、ＡＭＤ３１００／プレリキサホルを３回（５～７日目）皮下注射することによってＨＳＰＣを動員した。プレリキサホルの注射から３０分後及び６０分後にＨＤＡｄ－γ－グロビン／ｍｇｔｍ＋ＨＤＡｄ－ＳＢの１：１混合物を動物に静脈内注射（注射回数計２回、各４×１０$^{10}$ｖｐ）した。インビボでの形質導入後、１７週間の免疫抑制を行って、ヒトγ－グロビンタンパク質及びＭＧＭＴ$^{Ｐ１４０Ｋ}$タンパク質に対する免疫応答を回避した。１７週目の時点で、処理マウスを二次移植のドナーとするか、またはＯ$^{6}$－ＢＧ／ＢＣＮＵを用いるインビボでの選択に供した。二次Ｃ５７Ｂｌ／６レシピエントについては、免疫抑制を１６週間行った後に　　殺した。インビボでの選択に供したマウスについては、１週間おきに漸増用量（５ｍｇ／ｋｇ、７．５ｍｇ／ｋｇ、１０ｍｇ／ｋｇ、１０ｍｇ／ｋｇ）でのＯ$^{6}$－ＢＧ／ＢＣＮＵ処理を行った。最後のＯ$^{6}$－ＢＧ／ＢＣＮＵ用量から２週間後に免疫抑制を再開した。２９週目の時点でマウスを　　殺し、その骨髄をＣ５７Ｂｌ／６二次レシピエントに移植した。

【図１３Ａ】Ｏ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵ処理を行わなかったインビボ形質導入ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウスの分析を示す。末梢ＲＢＣ中のヒトγ－グロビンのパーセントをフローサイトメトリーによって測定したものを示す。実験は３回実施し、これらの実験は異なる記号形状によって示される。

【図１３Ｂ】Ｏ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵ処理を行わなかったインビボ形質導入ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウスの分析を示す。赤血球（Ｔｅｒ１１９$^{+}$）血液細胞及び非赤血球（Ｔｅｒ１１９$^{-}$）血液細胞におけるγ－グロビンの発現を示す。＊＊＊Ｐ≦０．０００３（一元配置ＡＮＯＶＡ検定によるもの）。

【図１３Ｃ】Ｏ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵ処理を行わなかったインビボ形質導入ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウスの分析を示す。健康な（ＣＤ４６ｔｇ）マウス（ｎ＝３）、動員及びインビボでの形質導入を行う前のＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウス（ｎ＝１４）、及びインビボでの形質導入を行い、１６週目で分析したＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウス（ｎ＝８）のＲＢＣを分析したものを示す。＊Ｐ≦０．０５。統計解析は、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。

【図１３Ｄ】Ｏ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵ処理を行わなかったインビボ形質導入ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウスの分析を示す。組織学的表現型を示す。上：血液塗抹標本。中央：網状赤血球を検出するために末梢血塗抹標本をブリリアントクレシルブルーで超生体染色したもの。代表的な塗抹標本において陽性染色された網状赤血球のパーセントは、ＣＤ４６ｔｇについては８％±０．８％、形質導入前のＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３については３９％±１．３％、形質導入後１６週目のＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３については２６％±０．４５％であった。下：髄外造血。スケールバー：２０μｍ。

【図１３Ｅ】Ｏ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵ処理を行わなかったインビボ形質導入ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウスの分析を示す。二次レシピエントの分析を示す。ブスルファンでの亜致死性の移植前処理を行ったＣ５７ＢＬ／６マウスに対して１６週目のインビボ形質導入マウスから得られた全骨髄を移植した。観察期間の間、マウスには免疫抑制を行った。ヒトＣＤ４６$^{+}$（ｈＣＤ４６$^{+}$）ＰＢＭＣのパーセントに基づく生着が示される。（Ｃ５７ＢＬ／６レシピエントはｈＣＤ４６を発現しないものである）。各記号は個々の動物を表す。

【図１３Ｆ】Ｏ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵ処理を行わなかったインビボ形質導入ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウスの分析を示す。二次レシピエントの分析を示す。ブスルファンでの亜致死性の移植前処理を行ったＣ５７ＢＬ／６マウスに対して１６週目のインビボ形質導入マウスから得られた全骨髄を移植した。観察期間の間、マウスには免疫抑制を行った。ヒトγ－グロビン$^{+}$ＲＢＣのパーセントが示される。各記号は個々の動物を表す。

【図１４Ａ】インビボでの選択後のインビボ形質導入ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウスにおけるγ－グロビンの発現を分析したものを示す。末梢ＲＢＣ中のヒトγ－グロビンのパーセントをフローサイトメトリーによって測定したものを示す。矢印は、Ｏ$^{6}$－ＢＧ／ＢＣＮＵ処理を行った時点を示す。異なる記号は、３つの独立した実験を表す。１６週目までのデータは図１３Ａのものと同一である。

【図１４Ｂ】インビボでの選択後のインビボ形質導入ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウスにおけるγ－グロビンの発現を分析したものを示す。　　殺時（２９週目）の造血組織におけるγ－グロビン発現細胞のパーセントをフローサイトメトリーによって分析したものを示す。＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０００２、＊＊＊Ｐ≦０．００００３。

【図１４Ｃ】インビボでの選択後のインビボ形質導入ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウスにおけるγ－グロビンの発現を分析したものを示す。ＭＡＣＳで精製したＴｅｒ１１９細胞におけるγ－グロビンの発現を示す。２９週目の一次レシピエントから得られた骨髄細胞において免疫磁気的にＴｅｒ１１９$^{+}$細胞を選択した。フローサイトメトリーによってＴｅｒ１１９$^{+}$細胞及びＴｅｒ１１９$^{-}$細胞におけるγ－グロビンの発現を測定した。＊＊＊Ｐ≦０．０００２。

【図１４Ｄ】インビボでの選択後のインビボ形質導入ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウスにおけるγ－グロビンの発現を分析したものを示す。末梢血、骨髄、及び脾臓におけるγ－グロビン$^{+}$赤血球（Ｔｅｒ１１９$^{+}$）細胞及びγ－グロビン$^{+}$非赤血球（Ｔｅｒ１１９$^{-}$）細胞における濃縮倍率をインビボ選択の前後で比較（１６週目と２９週目との比較）したものを示す。ｎ＝５、＊＊Ｐ≦０．０００２。

【図１４Ｅ】インビボでの選択後のインビボ形質導入ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウスにおけるγ－グロビンの発現を分析したものを示す。ＲＢＣ中のマウスα－グロビンタンパク質に対するヒトγ－グロビンタンパク質のパーセントをＨＰＬＣによって測定したものを示す。統計解析は、ノンパラメトリッククラスカル・ウォリス検定を用いて実施した。

【図１４Ｆ】インビボでの選択後のインビボ形質導入ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウスにおけるγ－グロビンの発現を分析したものを示す。末梢血液細胞中の成体型マウスβ－メジャーグロビンｍＲＮＡに対するヒトγ－グロビンｍＲＮＡのレベルをＲＴ－ｑＰＣＲによって測定したものを示す。非処理ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウスを対照として使用した。各記号は個々の動物を表す。

【図１５Ａ】ＲＢＣ中のグロビン鎖のＨＰＬＣ分析を示す。（図１５Ａ）対照ＣＤ４６ｔｇマウスにおけるマウスグロビンのピークを示す代表的なクロマトグラムを示す。成体型マウスアルファ（α）グロビン、ベータ（β）－マイナーグロビン、及びβ－メジャーグロビンのピークが標識されている。（図１５Ｂ～１５Ｄ）ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウス（＃７１）から得られたＲＢＣのクロマトグラムを示す。こうしたマウスは、β－マイナー遺伝子の欠失及びβ－メジャー遺伝子の欠失についてヘテロ接合型であることに留意されたい。２９分付近にさらなるピークが存在することはこのことと関連している可能性がある。（図１５Ｄ）では、ヒトγ－グロビンに特異的なピークが標識されている。示されているものは代表的なクロマトグラムである。値（ボルト）はピーク強度を示す。図１５Ｃ及び図１５Ｄでは、ＡＵＣ値は、対応ピークの左にずれて表示されている。

【図１５Ｂ】ＲＢＣ中のグロビン鎖のＨＰＬＣ分析を示す。（図１５Ａ）対照ＣＤ４６ｔｇマウスにおけるマウスグロビンのピークを示す代表的なクロマトグラムを示す。成体型マウスアルファ（α）グロビン、ベータ（β）－マイナーグロビン、及びβ－メジャーグロビンのピークが標識されている。（図１５Ｂ～１５Ｄ）ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウス（＃７１）から得られたＲＢＣのクロマトグラムを示す。こうしたマウスは、β－マイナー遺伝子の欠失及びβ－メジャー遺伝子の欠失についてヘテロ接合型であることに留意されたい。２９分付近にさらなるピークが存在することはこのことと関連している可能性がある。（図１５Ｄ）では、ヒトγ－グロビンに特異的なピークが標識されている。示されているものは代表的なクロマトグラムである。値（ボルト）はピーク強度を示す。図１５Ｃ及び図１５Ｄでは、ＡＵＣ値は、対応ピークの左にずれて表示されている。

【図１５Ｃ】ＲＢＣ中のグロビン鎖のＨＰＬＣ分析を示す。（図１５Ａ）対照ＣＤ４６ｔｇマウスにおけるマウスグロビンのピークを示す代表的なクロマトグラムを示す。成体型マウスアルファ（α）グロビン、ベータ（β）－マイナーグロビン、及びβ－メジャーグロビンのピークが標識されている。（図１５Ｂ～１５Ｄ）ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウス（＃７１）から得られたＲＢＣのクロマトグラムを示す。こうしたマウスは、β－マイナー遺伝子の欠失及びβ－メジャー遺伝子の欠失についてヘテロ接合型であることに留意されたい。２９分付近にさらなるピークが存在することはこのことと関連している可能性がある。（図１５Ｄ）では、ヒトγ－グロビンに特異的なピークが標識されている。示されているものは代表的なクロマトグラムである。値（ボルト）はピーク強度を示す。図１５Ｃ及び図１５Ｄでは、ＡＵＣ値は、対応ピークの左にずれて表示されている。

【図１５Ｄ】ＲＢＣ中のグロビン鎖のＨＰＬＣ分析を示す。（図１５Ａ）対照ＣＤ４６ｔｇマウスにおけるマウスグロビンのピークを示す代表的なクロマトグラムを示す。成体型マウスアルファ（α）グロビン、ベータ（β）－マイナーグロビン、及びβ－メジャーグロビンのピークが標識されている。（図１５Ｂ～１５Ｄ）ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウス（＃７１）から得られたＲＢＣのクロマトグラムを示す。こうしたマウスは、β－マイナー遺伝子の欠失及びβ－メジャー遺伝子の欠失についてヘテロ接合型であることに留意されたい。２９分付近にさらなるピークが存在することはこのことと関連している可能性がある。（図１５Ｄ）では、ヒトγ－グロビンに特異的なピークが標識されている。示されているものは代表的なクロマトグラムである。値（ボルト）はピーク強度を示す。図１５Ｃ及び図１５Ｄでは、ＡＵＣ値は、対応ピークの左にずれて表示されている。

【図１６】処理したＣＤ４６＋＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスを２９週目にＤＮＡ分析したものを示す。骨髄細胞当たりの導入遺伝子（γ－グロビン）コピー数が示される。各記号は個々の動物を表す。

【図１７Ａ】インビボでのＨＳＰＣの形質導入／選択によるＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスの表現型修正を示す。健康な（ＣＤ４６ｔｇ）マウス、動員及びインビボでの形質導入を行う前のＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウス、ならびにインビボでの形質導入／選択を行ったＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウス（ＨＤＡｄ注入後２９週目に分析した）のＲＢＣ分析（ｎ＝５）を示す。＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０００２、＊＊＊Ｐ≦０．０００３。統計解析は、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。

【図１７Ｂ】インビボでのＨＳＰＣの形質導入／選択によるＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスの表現型修正を示す。網状赤血球を検出するために末梢血塗抹標本をブリリアントクレシルブルーで超生体染色したものを示す。矢印は、特徴的な残存ＲＮＡ及びマイクロオルガネラを含む網状赤血球を示す。代表的な塗抹標本において陽性染色された網状赤血球のパーセントは、ＣＤ４６については７％、処理前のＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３については３１％、処理後のＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３については１２％であった。スケールバー：２０μｍ。

【図１７Ｃ】インビボでのＨＳＰＣの形質導入／選択によるＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスの表現型修正を示す。上：血液塗抹標本。スケールバー：２０μｍ。中央：骨髄のサイトスピン調製物。矢印は、成熟段階が異なる赤芽球を示すと共に、前赤芽球が優位な赤血球生成が処理マウスでは正常化する変化が生じていることを示す。スケールバー：２５μｍ。下：パール染色による組織中のヘモジデリン沈着。脾臓組織切片中の細胞質ヘモジデリンが青色色素で染まったものとして鉄沈着が示される。図１７Ｃ及び図１８Ｄにおける対照マウス（ＣＤ４６ｔｇ及び形質導入前のＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３）の血液塗抹標本画像は同じ試料から得られたものである。

【図１７Ｄ】インビボでのＨＳＰＣの形質導入／選択によるＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスの表現型修正を示す。１匹の代表的なＣＤ４６ｔｇマウス及び１匹の非処理ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウスならびに５匹の処理ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウスの巨視的な脾臓画像を示す。

【図１７Ｅ】インビボでのＨＳＰＣの形質導入／選択によるＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスの表現型修正を示す。総体重に対する脾臓重量の比（ｍｇ／ｇ）として　殺時

の脾臓サイズを決定した。各記号は個々の動物を表す。データは、平均値±ＳＥＭとして示される。＊Ｐ≦０．０５。統計解析は、一元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。
【図１８Ａ】処理ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウスから得られた骨髄細胞を移植した二次Ｃ５７ＢＬ／６レシピエントの分析を示す。（図１８Ａ）ブスルファンでの移植前処理または全身照射（ＴＢＩ）を行った後にＰＢＭＣにおけるヒトＣＤ４６$^{+}$（ｈＣＤ４６$^{+}$）細胞のパーセントに基づいて末梢において測定した生着率を示す（Ｃ５７ＢＬ／６レシピエントはｈＣＤ４６を発現しないものである）。（図１８Ｂ）ヒトγ－グロビン発現末梢血ＲＢＣのパーセントを示す。すべてのマウスにおいて移植後４週目から免疫抑制を開始した。（図１８Ｃ）ｈＣＤ４６$^{+}$（ドナー由来）細胞におけるγ－グロビン$^{+}$細胞のパーセントを示す。（図１８Ｃ及び図１８Ｄ）移植後２０週目（ブスルファンでの移植前処理）の二次Ｃ５７ＢＬ／６レシピエントにおけるγ－グロビン／ＣＤ４６の発現を示す。３匹の代表的な二次マウスのキメラ骨髄からＣＤ４６$^{+}$細胞を免疫磁気的に分離し、フローサイトメトリーによってγ－グロビンの発現について分析した。ヒトとは異なり、ｈｕＣＤ４６ｔｇマウスはＲＢＣ上にＣＤ４６を発現することは注目すべきことである。（図１８Ｃ）一次レシピエント及び二次レシピエントにおける　殺時のγ－グロビン／ＣＤ４６マーキング率を示す。（図１８Ｄ）二次レシピエント（２０週目）の造血組織からＣＤ４６$^{+}$で選択した細胞におけるγ－グロビン発現を示す。各記号は個々の動物を表す。（図１８Ｅ）新たな（２回目）のＨＳＰＣ動員／インビボ形質導入を行った二次レシピエント（ｎ＝５）におけるγ－グロビンの発現を示す。二次レシピエント（ブスルファンでの移植前処理を行った）を移植後２０週目にγ－グロビン及びＣＤ４６の発現について分析した（「インビボでの形質導入前」）。次に、こうしたマウスに対して動員処理を行い、ＨＤＡｄ－γ－グロビンベクター＋ＨＤＡｄ－ＳＢベクターを用いてインビボでの形質導入を行った。インビボでの形質導入から４週間後、マウスを　殺し、分析した（「インビボでの形質導入後４週目」）。＊＊＊Ｐ≦０．００００３。統計解析は、一元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。
【図１８Ｂ】処理ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウスから得られた骨髄細胞を移植した二次Ｃ５７ＢＬ／６レシピエントの分析を示す。（図１８Ａ）ブスルファンでの移植前処理または全身照射（ＴＢＩ）を行った後にＰＢＭＣにおけるヒトＣＤ４６$^{+}$（ｈＣＤ４６$^{+}$）細胞のパーセントに基づいて末梢において測定した生着率を示す（Ｃ５７ＢＬ／６レシピエントはｈＣＤ４６を発現しないものである）。（図１８Ｂ）ヒトγ－グロビン発現末梢血ＲＢＣのパーセントを示す。すべてのマウスにおいて移植後４週目から免疫抑制を開始した。（図１８Ｃ）ｈＣＤ４６$^{+}$（ドナー由来）細胞におけるγ－グロビン$^{+}$細胞のパーセントを示す。（図１８Ｃ及び図１８Ｄ）移植後２０週目（ブスルファンでの移植前処理）の二次Ｃ５７ＢＬ／６レシピエントにおけるγ－グロビン／ＣＤ４６の発現を示す。３匹の代表的な二次マウスのキメラ骨髄からＣＤ４６$^{+}$細胞を免疫磁気的に分離し、フローサイトメトリーによってγ－グロビンの発現について分析した。ヒトとは異なり、ｈｕＣＤ４６ｔｇマウスはＲＢＣ上にＣＤ４６を発現することは注目すべきことである。（図１８Ｃ）一次レシピエント及び二次レシピエントにおける　殺時のγ－グロビン／ＣＤ４６マーキング率を示す。（図１８Ｄ）二次レシピエント（２０週目）の造血組織からＣＤ４６$^{+}$で選択した細胞におけるγ－グロビン発現を示す。各記号は個々の動物を表す。（図１８Ｅ）新たな（２回目）のＨＳＰＣ動員／インビボ形質導入を行った二次レシピエント（ｎ＝５）におけるγ－グロビンの発現を示す。二次レシピエント（ブスルファンでの移植前処理を行った）を移植後２０週目にγ－グロビン及びＣＤ４６の発現について分析した（「インビボでの形質導入前」）。次に、こうしたマウスに対して動員処理を行い、ＨＤＡｄ－γ－グロビンベクター＋ＨＤＡｄ－ＳＢベクターを用いてインビボでの形質導入を行った。インビボでの形質導入から４週間後、マウスを　殺し、分析した（「インビボでの形質導入後４週目」）。＊＊＊Ｐ≦０．００００３。統計解析は、一元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。
【図１８Ｃ】処理ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウスから得られた骨髄細胞を移植した二次Ｃ５７ＢＬ／６レシピエントの分析を示す。（図１８Ａ）ブスルファンでの移植前

処理または全身照射（ＴＢＩ）を行った後にＰＢＭＣにおけるヒトＣＤ４６$^{+}$（ｈＣＤ４６$^{+}$）細胞のパーセントに基づいて末梢において測定した生着率を示す（Ｃ５７ＢＬ／６レシピエントはｈＣＤ４６を発現しないものである）。（図１８Ｂ）ヒトγ－グロビン発現末梢血ＲＢＣのパーセントを示す。すべてのマウスにおいて移植後４週目から免疫抑制を開始した。（図１８Ｃ）ｈＣＤ４６$^{+}$（ドナー由来）細胞におけるγ－グロビン$^{+}$細胞のパーセントを示す。（図１８Ｃ及び図１８Ｄ）移植後２０週目（ブスルファンでの移植前処理）の二次Ｃ５７ＢＬ／６レシピエントにおけるγ－グロビン／ＣＤ４６の発現を示す。３匹の代表的な二次マウスのキメラ骨髄からＣＤ４６$^{+}$細胞を免疫磁気的に分離し、フローサイトメトリーによってγ－グロビンの発現について分析した。ヒトとは異なり、ｈｕＣＤ４６ｔｇマウスはＲＢＣ上にＣＤ４６を発現することは注目すべきことである。（図１８Ｃ）一次レシピエント及び二次レシピエントにおける　　殺時のγ－グロビン／ＣＤ４６マーキング率を示す。（図１８Ｄ）二次レシピエント（２０週目）の造血組織からＣＤ４６$^{+}$で選択した細胞におけるγ－グロビン発現を示す。各記号は個々の動物を表す。（図１８Ｅ）新たな（２回目）のＨＳＰＣ動員／インビボ形質導入を行った二次レシピエント（ｎ＝５）におけるγ－グロビンの発現を示す。二次レシピエント（ブスルファンでの移植前処理を行った）を移植後２０週目にγ－グロビン及びＣＤ４６の発現について分析した（「インビボでの形質導入前」）。次に、こうしたマウスに対して動員処理を行い、ＨＤＡｄ－γ－グロビンベクター＋ＨＤＡｄ－ＳＢベクターを用いてインビボでの形質導入を行った。インビボでの形質導入から４週間後、マウスを　　殺し、分析した（「インビボでの形質導入後４週目」）。＊＊＊Ｐ≦０．０００００３。統計解析は、一元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。

【図１８Ｄ】処理ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウスから得られた骨髄細胞を移植した二次Ｃ５７ＢＬ／６レシピエントの分析を示す。（図１８Ａ）ブスルファンでの移植前処理または全身照射（ＴＢＩ）を行った後にＰＢＭＣにおけるヒトＣＤ４６$^{+}$（ｈＣＤ４６$^{+}$）細胞のパーセントに基づいて末梢において測定した生着率を示す（Ｃ５７ＢＬ／６レシピエントはｈＣＤ４６を発現しないものである）。（図１８Ｂ）ヒトγ－グロビン発現末梢血ＲＢＣのパーセントを示す。すべてのマウスにおいて移植後４週目から免疫抑制を開始した。（図１８Ｃ）ｈＣＤ４６$^{+}$（ドナー由来）細胞におけるγ－グロビン$^{+}$細胞のパーセントを示す。（図１８Ｃ及び図１８Ｄ）移植後２０週目（ブスルファンでの移植前処理）の二次Ｃ５７ＢＬ／６レシピエントにおけるγ－グロビン／ＣＤ４６の発現を示す。３匹の代表的な二次マウスのキメラ骨髄からＣＤ４６$^{+}$細胞を免疫磁気的に分離し、フローサイトメトリーによってγ－グロビンの発現について分析した。ヒトとは異なり、ｈｕＣＤ４６ｔｇマウスはＲＢＣ上にＣＤ４６を発現することは注目すべきことである。（図１８Ｃ）一次レシピエント及び二次レシピエントにおける　　殺時のγ－グロビン／ＣＤ４６マーキング率を示す。（図１８Ｄ）二次レシピエント（２０週目）の造血組織からＣＤ４６$^{+}$で選択した細胞におけるγ－グロビン発現を示す。各記号は個々の動物を表す。（図１８Ｅ）新たな（２回目）のＨＳＰＣ動員／インビボ形質導入を行った二次レシピエント（ｎ＝５）におけるγ－グロビンの発現を示す。二次レシピエント（ブスルファンでの移植前処理を行った）を移植後２０週目にγ－グロビン及びＣＤ４６の発現について分析した（「インビボでの形質導入前」）。次に、こうしたマウスに対して動員処理を行い、ＨＤＡｄ－γ－グロビンベクター＋ＨＤＡｄ－ＳＢベクターを用いてインビボでの形質導入を行った。インビボでの形質導入から４週間後、マウスを　　殺し、分析した（「インビボでの形質導入後４週目」）。＊＊＊Ｐ≦０．０００００３。統計解析は、一元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。

【図１８Ｅ】処理ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウスから得られた骨髄細胞を移植した二次Ｃ５７ＢＬ／６レシピエントの分析を示す。（図１８Ａ）ブスルファンでの移植前処理または全身照射（ＴＢＩ）を行った後にＰＢＭＣにおけるヒトＣＤ４６$^{+}$（ｈＣＤ４６$^{+}$）細胞のパーセントに基づいて末梢において測定した生着率を示す（Ｃ５７ＢＬ／６レシピエントはｈＣＤ４６を発現しないものである）。（図１８Ｂ）ヒトγ－グロビン発現末梢血ＲＢＣのパーセントを示す。すべてのマウスにおいて移植後４週目から免疫抑制

を開始した。（図１８Ｃ）ｈＣＤ４６$^{+}$（ドナー由来）細胞におけるγ－グロビン$^{+}$細胞のパーセントを示す。（図１８Ｃ及び図１８Ｄ）移植後２０週目（ブスルファンでの移植前処理）の二次Ｃ５７ＢＬ／６レシピエントにおけるγ－グロビン／ＣＤ４６の発現を示す。３匹の代表的な二次マウスのキメラ骨髄からＣＤ４６$^{+}$細胞を免疫磁気的に分離し、フローサイトメトリーによってγ－グロビンの発現について分析した。ヒトとは異なり、ｈｕＣＤ４６ｔｇマウスはＲＢＣ上にＣＤ４６を発現することは注目すべきことである。（図１８Ｃ）一次レシピエント及び二次レシピエントにおける　殺時のγ－グロビン／ＣＤ４６マーキング率を示す。（図１８Ｄ）二次レシピエント（２０週目）の造血組織からＣＤ４６$^{+}$で選択した細胞におけるγ－グロビン発現を示す。各記号は個々の動物を表す。（図１８Ｅ）新たな（２回目）のＨＳＰＣ動員／インビボ形質導入を行った二次レシピエント（ｎ＝５）におけるγ－グロビンの発現を示す。二次レシピエント（ブスルファンでの移植前処理を行った）を移植後２０週目にγ－グロビン及びＣＤ４６の発現について分析した（「インビボでの形質導入前」）。次に、こうしたマウスに対して動員処理を行い、ＨＤＡｄ－γ－グロビンベクター＋ＨＤＡｄ－ＳＢベクターを用いてインビボでの形質導入を行った。インビボでの形質導入から４週間後、マウスを　殺し、分析した（「インビボでの形質導入後４週目」）。＊＊＊Ｐ≦０．００００３。統計解析は、一元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。

【図１９Ａ】ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウスモデルにおけるインビボでの形質導入／選択の安全性を示す。（図１９Ａ）インビボでの選択中及び選択後のＷＢＣ数及び血小板（ＰＬＴ）数を示す。Ｏ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵ処理はアスタリスクによって示される。ｎ≧３。（図１９Ｂ）循環ＷＢＣ亜集団の絶対数を示す。ｎ≧３。（図１９Ｃ）対照マウス及び２９週目に　殺した処理マウスにおける骨髄細胞組成を示す。系譜マーカー陽性細胞（Ｔｅｒ１１９$^{+}$細胞、ＣＤ３$^{+}$細胞、ＣＤ１９$^{+}$細胞、及びＧｒ－１$^{+}$細胞）ならびにＨＳＰＣ（ＬＳＫ細胞）のパーセントが示される。（図１９Ｄ）２９週目に収集した骨髄細胞のコロニー形成能を示す。各記号は個々の動物を表す。＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０００２、＊＊＊Ｐ≦０．０００００３。統計解析は、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。ＮＥＵ：好中球、ＬＹ：リンパ球、ＭＯ：単球。

【図１９Ｂ】ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウスモデルにおけるインビボでの形質導入／選択の安全性を示す。（図１９Ａ）インビボでの選択中及び選択後のＷＢＣ数及び血小板（ＰＬＴ）数を示す。Ｏ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵ処理はアスタリスクによって示される。ｎ≧３。（図１９Ｂ）循環ＷＢＣ亜集団の絶対数を示す。ｎ≧３。（図１９Ｃ）対照マウス及び２９週目に　殺した処理マウスにおける骨髄細胞組成を示す。系譜マーカー陽性細胞（Ｔｅｒ１１９$^{+}$細胞、ＣＤ３$^{+}$細胞、ＣＤ１９$^{+}$細胞、及びＧｒ－１$^{+}$細胞）ならびにＨＳＰＣ（ＬＳＫ細胞）のパーセントが示される。（図１９Ｄ）２９週目に収集した骨髄細胞のコロニー形成能を示す。各記号は個々の動物を表す。＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０００２、＊＊＊Ｐ≦０．０００００３。統計解析は、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。ＮＥＵ：好中球、ＬＹ：リンパ球、ＭＯ：単球。

【図１９Ｃ】ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウスモデルにおけるインビボでの形質導入／選択の安全性を示す。（図１９Ａ）インビボでの選択中及び選択後のＷＢＣ数及び血小板（ＰＬＴ）数を示す。Ｏ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵ処理はアスタリスクによって示される。ｎ≧３。（図１９Ｂ）循環ＷＢＣ亜集団の絶対数を示す。ｎ≧３。（図１９Ｃ）対照マウス及び２９週目に　殺した処理マウスにおける骨髄細胞組成を示す。系譜マーカー陽性細胞（Ｔｅｒ１１９$^{+}$細胞、ＣＤ３$^{+}$細胞、ＣＤ１９$^{+}$細胞、及びＧｒ－１$^{+}$細胞）ならびにＨＳＰＣ（ＬＳＫ細胞）のパーセントが示される。（図１９Ｄ）２９週目に収集した骨髄細胞のコロニー形成能を示す。各記号は個々の動物を表す。＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０００２、＊＊＊Ｐ≦０．０００００３。統計解析は、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。ＮＥＵ：好中球、ＬＹ：リンパ球、ＭＯ：単球。

【図１９Ｄ】ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂｔｈ－３マウスモデルにおけるインビボでの形質導入／選択の安全性を示す。（図１９Ａ）インビボでの選択中及び選択後のＷＢＣ数及び血小板（ＰＬＴ）数を示す。Ｏ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵ処理はアスタリスクによって示される。ｎ

≧３。（図１９Ｂ）循環ＷＢＣ亜集団の絶対数を示す。ｎ≧３。（図１９Ｃ）対照マウス及び２９週目に　殺した処理マウスにおける骨髄細胞組成を示す。系譜マーカー陽性細胞（Ｔｅｒ１１９＋細胞、ＣＤ３＋細胞、ＣＤ１９＋細胞、及びＧｒ－１＋細胞）ならびにＨＳＰＣ（ＬＳＫ細胞）のパーセントが示される。（図１９Ｄ）２９週目に収集した骨髄細胞のコロニー形成能を示す。各記号は個々の動物を表す。＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０００２、＊＊＊Ｐ≦０．０００００３。統計解析は、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。ＮＥＵ：好中球、ＬＹ：リンパ球、ＭＯ：単球。

【図２０Ａ】２回目の形質導入に対する抗ＨＤＡｄ５／３５＋＋抗体の影響を示す。（図２０Ａ）ＣＤ４６ｔｇマウスに対して動員処理を行い、ＨＤＡｄ－ｍｇｍｔ／ＧＦＰ＋ＨＤＡｄ－ＳＢを注射した。示されるように血清試料を採取した。（図２０Ｂ、図２０Ｃ）動員／形質導入から４日目及び４週目にＰＢＭＣをフローサイトメトリーによって分析したものを示す。（図２０Ｄ）４週目に２回目の動員／形質導入を行った後、ＧＦＰ分析を行ったものを示す。（図２０Ｅ）ＯＤ$_{450}$に基づく抗ＨＤＡｄ５／３５＋＋抗体の力価を示す。ＯＤ$_{450}$＝０．２力価は、中和が生じていると見なされる。（図２０Ｆ）異なるコホート（図２０Ｂ～Ｄを参照のこと）において測定したＧＦＰ陽性ＰＢＭＣのパーセントを示す。対照は非処理ＣＤ４６ｔｇマウスである。（図２０Ｅ）及び（図２０Ｆ）における各記号は、個々の動物を表す。統計解析は、ノンパラメトリッククラスカル・ウォリス検定を用いて実施した。

【図２０Ｂ】２回目の形質導入に対する抗ＨＤＡｄ５／３５＋＋抗体の影響を示す。（図２０Ａ）ＣＤ４６ｔｇマウスに対して動員処理を行い、ＨＤＡｄ－ｍｇｍｔ／ＧＦＰ＋ＨＤＡｄ－ＳＢを注射した。示されるように血清試料を採取した。（図２０Ｂ、図２０Ｃ）動員／形質導入から４日目及び４週目にＰＢＭＣをフローサイトメトリーによって分析したものを示す。（図２０Ｄ）４週目に２回目の動員／形質導入を行った後、ＧＦＰ分析を行ったものを示す。（図２０Ｅ）ＯＤ$_{450}$に基づく抗ＨＤＡｄ５／３５＋＋抗体の力価を示す。ＯＤ$_{450}$＝０．２力価は、中和が生じていると見なされる。（図２０Ｆ）異なるコホート（図２０Ｂ～Ｄを参照のこと）において測定したＧＦＰ陽性ＰＢＭＣのパーセントを示す。対照は非処理ＣＤ４６ｔｇマウスである。（図２０Ｅ）及び（図２０Ｆ）における各記号は、個々の動物を表す。統計解析は、ノンパラメトリッククラスカル・ウォリス検定を用いて実施した。

【図２０Ｃ】２回目の形質導入に対する抗ＨＤＡｄ５／３５＋＋抗体の影響を示す。（図２０Ａ）ＣＤ４６ｔｇマウスに対して動員処理を行い、ＨＤＡｄ－ｍｇｍｔ／ＧＦＰ＋ＨＤＡｄ－ＳＢを注射した。示されるように血清試料を採取した。（図２０Ｂ、図２０Ｃ）動員／形質導入から４日目及び４週目にＰＢＭＣをフローサイトメトリーによって分析したものを示す。（図２０Ｄ）４週目に２回目の動員／形質導入を行った後、ＧＦＰ分析を行ったものを示す。（図２０Ｅ）ＯＤ$_{450}$に基づく抗ＨＤＡｄ５／３５＋＋抗体の力価を示す。ＯＤ$_{450}$＝０．２力価は、中和が生じていると見なされる。（図２０Ｆ）異なるコホート（図２０Ｂ～Ｄを参照のこと）において測定したＧＦＰ陽性ＰＢＭＣのパーセントを示す。対照は非処理ＣＤ４６ｔｇマウスである。（図２０Ｅ）及び（図２０Ｆ）における各記号は、個々の動物を表す。統計解析は、ノンパラメトリッククラスカル・ウォリス検定を用いて実施した。

【図２０Ｄ】２回目の形質導入に対する抗ＨＤＡｄ５／３５＋＋抗体の影響を示す。（図２０Ａ）ＣＤ４６ｔｇマウスに対して動員処理を行い、ＨＤＡｄ－ｍｇｍｔ／ＧＦＰ＋ＨＤＡｄ－ＳＢを注射した。示されるように血清試料を採取した。（図２０Ｂ、図２０Ｃ）動員／形質導入から４日目及び４週目にＰＢＭＣをフローサイトメトリーによって分析したものを示す。（図２０Ｄ）４週目に２回目の動員／形質導入を行った後、ＧＦＰ分析を行ったものを示す。（図２０Ｅ）ＯＤ$_{450}$に基づく抗ＨＤＡｄ５／３５＋＋抗体の力価を示す。ＯＤ$_{450}$＝０．２力価は、中和が生じていると見なされる。（図２０Ｆ）異なるコホート（図２０Ｂ～Ｄを参照のこと）において測定したＧＦＰ陽性ＰＢＭＣのパーセントを示す。対照は非処理ＣＤ４６ｔｇマウスである。（図２０Ｅ）及び（図２０Ｆ）における各記号は、個々の動物を表す。統計解析は、ノンパラメトリッククラスカル・ウォ

リス検定を用いて実施した。
【図２０Ｅ】２回目の形質導入に対する抗ＨＤＡｄ５／３５＋＋抗体の影響を示す。（図２０Ａ）ＣＤ４６ｔｇマウスに対して動員処理を行い、ＨＤＡｄ－ｍｇｍｔ／ＧＦＰ＋ＨＤＡｄ－ＳＢを注射した。示されるように血清試料を採取した。（図２０Ｂ、図２０Ｃ）動員／形質導入から４日目及び４週目にＰＢＭＣをフローサイトメトリーによって分析したものを示す。（図２０Ｄ）４週目に２回目の動員／形質導入を行った後、ＧＦＰ分析を行ったものを示す。（図２０Ｅ）ＯＤ$_{450}$に基づく抗ＨＤＡｄ５／３５＋＋抗体の力価を示す。ＯＤ$_{450}$＝０．２力価は、中和が生じていると見なされる。（図２０Ｆ）異なるコホート（図２０Ｂ～Ｄを参照のこと）において測定したＧＦＰ陽性ＰＢＭＣのパーセントを示す。対照は非処理ＣＤ４６ｔｇマウスである。（図２０Ｅ）及び（図２０Ｆ）における各記号は、個々の動物を表す。統計解析は、ノンパラメトリッククラスカル・ウォリス検定を用いて実施した。
【図２０Ｆ】２回目の形質導入に対する抗ＨＤＡｄ５／３５＋＋抗体の影響を示す。（図２０Ａ）ＣＤ４６ｔｇマウスに対して動員処理を行い、ＨＤＡｄ－ｍｇｍｔ／ＧＦＰ＋ＨＤＡｄ－ＳＢを注射した。示されるように血清試料を採取した。（図２０Ｂ、図２０Ｃ）動員／形質導入から４日目及び４週目にＰＢＭＣをフローサイトメトリーによって分析したものを示す。（図２０Ｄ）４週目に２回目の動員／形質導入を行った後、ＧＦＰ分析を行ったものを示す。（図２０Ｅ）ＯＤ$_{450}$に基づく抗ＨＤＡｄ５／３５＋＋抗体の力価を示す。ＯＤ$_{450}$＝０．２力価は、中和が生じていると見なされる。（図２０Ｆ）異なるコホート（図２０Ｂ～Ｄを参照のこと）において測定したＧＦＰ陽性ＰＢＭＣのパーセントを示す。対照は非処理ＣＤ４６ｔｇマウスである。（図２０Ｅ）及び（図２０Ｆ）における各記号は、個々の動物を表す。統計解析は、ノンパラメトリッククラスカル・ウォリス検定を用いて実施した。
【図２１Ａ】ＨＤＡｄ注射から１８週目（１０週間のインビボでの選択を実施）のベクターＤＮＡの生体内分布を示す。プライマー設計を示す。薄灰色のプライマーは、導入遺伝子カセットに特異的であり、組み込まれたベクターＤＮＡ及びエピソームベクターＤＮＡの両方を検出するものである。濃灰色のプライマーは、プラスミドｐＨＣＡ由来のベクタースタッファーＤＮＡを検出するものである。ＳＢ１００ｘ介在性組み込みが生じると、濃灰色のプライマーに対応する標的領域が消失することになる。したがって、濃灰色のプライマーはエピソームベクターコピーの測定に使用される。
【図２１Ｂ】ＨＤＡｄ注射から１８週目（１０週間のインビボでの選択を実施）のベクターＤＮＡの生体内分布を示す。組み込まれた導入遺伝子のコピー数の標準曲線を示す。
【図２１Ｃ】ＨＤＡｄ注射から１８週目（１０週間のインビボでの選択を実施）のベクターＤＮＡの生体内分布を示す。ＨＣＡ（エピソームベクター）のコピー数の標準曲線を示す。
【図２１Ｄ】ＨＤＡｄ注射から１８週目（１０週間のインビボでの選択を実施）のベクターＤＮＡの生体内分布を示す。細胞当たりの組み込まれた導入遺伝子のコピー数を示す。総ベクターコピー数（薄灰色のプライマー）からエピソームベクターコピー数（濃灰色のプライマー）を差し引いた。ベクター特異的シグナルはＧＡＰＤＨで正規化した。各記号は個々の動物を表す。
【図２２Ａ】Ｏ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵ処理の変異原性をインビトロアッセイで評価したものを示す。凍結保存から一晩復元させた後、３０００ｖｐ／細胞のＭＯＩでＨＤＡｄ－ｍｇｍｔ／ＧＦＰまたはＨＤＡｄ対照を用いてＣＤ３４$^{+}$細胞の形質導入を行い、このＭＯＩでの形質導入によって２日後に細胞の５０％においてＧＦＰが発現した。次に、細胞を１０ｍＭのＯ$^{6}$ＢＧで処理した後、２５ｍＭのＢＣＮＵ（またはＤＭＳＯ溶媒）で２時間処理した。洗浄後、ＣＦＵアッセイのために細胞をメチルセルロースに播種した（３０００個細胞／３５ｍｍディッシュ）。コロニー及びプールした細胞を１４日後にカウントし、ゲノムＤＮＡを全エクソームシークエンシングに供した。
【図２２Ｂ】Ｏ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵ処理の変異原性をインビトロアッセイで評価したものを示す。プレート当たりプール細胞数を示す。各記号は、個々の３５ｍｍディッシュ中の細

胞数を表す。統計解析は、ノンパラメトリッククラスカル・ウォリス検定を用いて実施した。

【図２２Ｃ】Ｏ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵ処理の変異原性をインビトロアッセイで評価したものを示す。ＨＤＡｄ－ｍｇｍｔ／ＧＦＰ＋Ｏ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵ群から得られた代表的なコロニーを示す。これは、エピソームウイルスゲノムの消失に起因してコロニー周辺ではＧＦＰが減退しているが、細胞の大部分ではＧＦＰが発現していることを実証するものである。スケールバーは１ｍｍである。

【図２３】ベクター構造を示す。ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲ：このベクターは、ＤＮａｓｅ高感受性部位（ＨＳ）１～４のコア領域からなる４．３ｋｂの小型ＬＣＲと、０．６６ｋｂのβ－グロビンプロモーターとを含む。トランスポゾンの長さは１１．８ｋｂである。ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲ。γ－グロビン遺伝子は、２１．５ｋｂのβ－グロビンＬＣＲ（ｃｈｒ１１：５２９２３１９～５２７０７８９）、１．６ｋｂのβ－グロビンプロモーター（例えば、ｃｈｒ１１：５２２８６３１～５２２７０２３またはｃｈｒ１１：５２２８６３１～５２２７０１８）、及び３’ＨＳ１領域（ｃｈｒ１１：５２０６８６７～５２０３８３９）（これもまた、β－グロビン遺伝子座に由来するもの）の制御下にある。赤血球細胞中でＲＮＡを安定化するために、γ－グロビン遺伝子の３’末端にγ－グロビン遺伝子ＵＴＲを連結した。ベクターは、形質導入ＨＳＰＣ及びＨＳＰＣ子孫をインビボで選択することを可能にするｍｇｍｔＰ１４０Ｋの発現カセットも含む。γ－グロビン発現カセット及びｍｇｍｔ発現カセットは、ニワトリグロビンＨＳ４インスレーター（ｃＨＳ４）によって分離されている。３２．４ｋｂのＬＣＲ－γ－グロビン／ｍｇｍｔトランスポゾンは、逆方向反復配列（ＩＲ）（ＳＢ１００ｘによって認識される）及びｆｔｒ部位（Ｆｌｐｅリコンビナーゼによるトランスポゾンの環状化を可能にする）が隣接している。ＨＤＡｄ－ＳＢ：組み込みに必要な第２のベクターであり、この第２のベクターは、活性増強型Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ　ＳＢ１００ｘトランスポゼースの発現カセット及びＦｌｐｅリコンビナーゼの発現カセットを含む。

【図２４Ａ】ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲを用いてエクスビボでＨＳＰＣ形質導入試験を行った後に、３２．４ｋｂのトランスポゾンがＳＢ１００ｘ介在性に組み込まれることを示す。実験レジメン：ＣＤ４６トランスジェニックマウスから得られた骨髄Ｌｉｎ－細胞の形質導入を、ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲ及びＨＤＡｄ－ＳＢを用いて総ＭＯＩを５００ｖｐ／細胞として行った。１日培養後、形質導入細胞を１×１０６個／マウスで致死性照射Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに移植した。４週目にＯ６ＢＧ／ＢＣＮＵ処理を開始し、２週間ごとに計４回繰り返した。各サイクルに伴って、５ｍｇ／ｋｇ→７．５ｍｇ／ｋｇ→１０ｍｇ／ｋｇ（２回）となるようにＢＣＮＵ濃度を増加させた。２０週目にマウスを　　殺した。

【図２４Ｂ】ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲを用いてエクスビボでＨＳＰＣ形質導入試験を行った後に、３２．４ｋｂのトランスポゾンがＳＢ１００ｘ介在性に組み込まれることを示す。ヒトγ－グロビン陽性末梢赤血球（ＲＢＣ）のパーセントをフローサイトメトリーによって測定したものを示す。各記号は個々の動物である。

【図２４Ｃ】ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲを用いてエクスビボでＨＳＰＣ形質導入試験を行った後に、３２．４ｋｂのトランスポゾンがＳＢ１００ｘ介在性に組み込まれることを示す。移植後２０週目の赤血球（Ｔｅｒ１１９$^{+}$）骨髄細胞（下パネル）におけるヒトγ－グロビンの発現を示す代表的なフローサイトメトリーデータを示す。上パネルは、モックで形質導入した細胞を移植したマウスを示す。

【図２４Ｄ】ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲを用いてエクスビボでＨＳＰＣ形質導入試験を行った後に、３２．４ｋｂのトランスポゾンがＳＢ１００ｘ介在性に組み込まれることを示す。ｉＰＣＲ分析の模式図：５マイクログラムのゲノムＤＮＡをＳａｃＩで消化し、再ライゲーションし、示されるプライマーを用いるネステッドインバースＰＣＲに供した（材料及び方法を参照のこと）。

【図２４Ｅ】ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲを用いてエクスビボでＨＳＰＣ形質導入試験を行った後に、３２．４ｋｂのトランスポゾンがＳＢ１００ｘ介在性に組み込まれることを示す。組み込み連結部を含むクローニングしたプラスミドのアガロースゲル電気泳動を示す。示

されるバンドを切り出し、シークエンスした。ゲルの下には染色体上での組み込み部位の局在が示される。
【図２４Ｆ】ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲを用いてエクスビボでＨＳＰＣ形質導入試験を行った後に、３２．４ｋｂのトランスポゾンがＳＢ１００ｘ介在性に組み込まれることを示す。連結部配列の例：５’末端ベクター配列、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　ｂｅａｕｔｙＩＲ／ＤＲ配列、組み込み連結部（ｃｈｒ１５、６８０５２０６）配列番号１；５’末端ベクター配列、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　ｂｅａｕｔｙＩＲ／ＤＲ配列、組み込み連結部（ｃｈｒＸ、１６８９７３２２）配列番号２；３’末端ベクター配列、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　ｂｅａｕｔｙＩＲ／ＤＲ配列、組み込み連結部（ｃｈｒ４、１０２０７６６７）配列番号３。ベクター体配列及びＩＲ／ＤＲ配列は、それぞれプレーンテキスト及び下線付きで示される。染色体配列は太字テキストで示される。ＩＲと染色体ＤＮＡとの連結部に位置するＴＡジヌクレオチド（ＳＢ１００ｘによって使用される）は角括弧付きで示される。
【図２５Ａ】３２．４ｋｂのトランスポゾンを含むＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲを用いるインビボでのＨＳＰＣの形質導入、及び１１．８ｋｂのトランスポゾンを含むＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲを用いるインビボでのＨＳＰＣの形質導入を示す。処理レジメン：ｈＣＤ４６ｔｇマウスに対して動員処理を行い、ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲ＋ＨＤＡｄ－ＳＢまたはＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲ＋ＨＤＡｄ－ＳＢのいずれかをＩＶ注射した（両方のウイルスの１：１混合物を２回注射した（各４×１０１０ｖｐ））。５週間後、Ｏ６ＢＧ／ＢＣＮＵ処理を開始した。各サイクルに伴って、５ｍｇ／ｋｇ→７．５ｍｇ／ｋｇ→１０ｍｇ／ｋｇとなるようにＢＣＮＵ濃度を増加させた。Ｏ６ＢＧ濃度は、４回すべての処理において３０ｍｇ／ｋｇとした。分析のために動物を　　殺した２０週目までマウスを経過観察した。骨髄Ｌｉｎ－細胞を二次レシピエントへの移植に使用した。次に、二次レシピエントを１６週間経過観察した。
【図２５Ｂ】３２．４ｋｂのトランスポゾンを含むＤＡｄ－長鎖ＬＣＲを用いるインビボでのＨＳＰＣの形質導入、及び１１．８ｋｂのトランスポゾンを含むＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲを用いるインビボでのＨＳＰＣの形質導入を示す。末梢赤血球（ＲＢＣ）におけるヒトγ－グロビン陽性細胞のパーセントをフローサイトメトリーによって測定したものを示す。各記号は個々の動物である。モックで形質導入したマウスでは、γ－グロビン陽性細胞は０．１％未満であった。
【図２５Ｃ】３２．４ｋｂのトランスポゾンを含むＤＡｄ－長鎖ＬＣＲを用いるインビボでのＨＳＰＣの形質導入、及び１１．８ｋｂのトランスポゾンを含むＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲを用いるインビボでのＨＳＰＣの形質導入を示す。インビボでのＨＳＰＣの形質導入後２０週目のＲＢＣ中のγ－グロビンタンパク質鎖レベルをＨＰＬＣによって測定したものを示す。マウスα－グロビンタンパク質鎖に対するヒトγ－グロビンタンパク質鎖のパーセントが示される。
【図２５Ｄ】３２．４ｋｂのトランスポゾンを含むＤＡｄ－長鎖ＬＣＲを用いるインビボでのＨＳＰＣの形質導入、及び１１．８ｋｂのトランスポゾンを含むＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲを用いるインビボでのＨＳＰＣの形質導入を示す。インビボでのＨＳＰＣの形質導入後２０週目の全血中のγ－グロビンのｍＲＮＡレベルをｑＲＴ－ＰＣＲによって測定したものを示す。マウスα－グロビンｍＲＮＡに対するヒトγ－グロビンｍＲＮＡのパーセントが示される。
【図２５Ｅ】３２．４ｋｂのトランスポゾンを含むＤＡｄ－長鎖ＬＣＲを用いるインビボでのＨＳＰＣの形質導入、及び１１．８ｋｂのトランスポゾンを含むＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲを用いるインビボでのＨＳＰＣの形質導入を示す。インビボでのＨＳＰＣの形質導入後２０週目に収集した骨髄単核細胞の細胞当たりのベクターコピー数を示す。２つの群の間の差は有意なものではない。統計解析は、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。
【図２６Ａ】インビボでのＨＳＰＣの形質導入後２０週目の血液学的パラメーターを示す。（図２６Ａ）白血球（ＷＢＣ）、好中球（ＮＥ）、白血球（ＬＹ）、単球（ＭＯ）、好酸球（ＥＯ）、及び好塩基球（ＢＡ）を示す。（図２６Ｂ）赤血球生成パラメーターを示す。ＲＢＣ：赤血球、Ｈｂ：ヘモグロビン、ＭＣＶ：平均赤血球容積、ＭＣＨ：平均赤血

球ヘモグロビン量、ＭＣＨＣ：平均赤血球ヘモグロビン濃度、ＲＤＷ：赤血球分布幅。３つの群の間の差は有意なものではなかった。（図２６Ｃ）骨髄細胞組成を示す。（図２６Ｄ）骨髄Ｌｉｎ－細胞のコロニー形成能を示す。図２６Ａ～Ｄでは、群間差は有意なものではなかった。

【図２６Ｂ】インビボでのＨＳＰＣの形質導入後２０週目の血液学的パラメーターを示す。（図２６Ａ）白血球（ＷＢＣ）、好中球（ＮＥ）、白血球（ＬＹ）、単球（ＭＯ）、好酸球（ＥＯ）、及び好塩基球（ＢＡ）を示す。（図２６Ｂ）赤血球生成パラメーターを示す。ＲＢＣ：赤血球、Ｈｂ：ヘモグロビン、ＭＣＶ：平均赤血球容積、ＭＣＨ：平均赤血球ヘモグロビン量、ＭＣＨＣ：平均赤血球ヘモグロビン濃度、ＲＤＷ：赤血球分布幅。３つの群の間の差は有意なものではなかった。（図２６Ｃ）骨髄細胞組成を示す。（図２６Ｄ）骨髄Ｌｉｎ－細胞のコロニー形成能を示す。図２６Ａ～Ｄでは、群間差は有意なものではなかった。

【図２６Ｃ】インビボでのＨＳＰＣの形質導入後２０週目の血液学的パラメーターを示す。（図２６Ａ）白血球（ＷＢＣ）、好中球（ＮＥ）、白血球（ＬＹ）、単球（ＭＯ）、好酸球（ＥＯ）、及び好塩基球（ＢＡ）を示す。（図２６Ｂ）赤血球生成パラメーターを示す。ＲＢＣ：赤血球、Ｈｂ：ヘモグロビン、ＭＣＶ：平均赤血球容積、ＭＣＨ：平均赤血球ヘモグロビン量、ＭＣＨＣ：平均赤血球ヘモグロビン濃度、ＲＤＷ：赤血球分布幅。３つの群の間の差は有意なものではなかった。（図２６Ｃ）骨髄細胞組成を示す。（図２６Ｄ）骨髄Ｌｉｎ－細胞のコロニー形成能を示す。図２６Ａ～Ｄでは、群間差は有意なものではなかった。

【図２６Ｄ】インビボでのＨＳＰＣの形質導入後２０週目の血液学的パラメーターを示す。（図２６Ａ）白血球（ＷＢＣ）、好中球（ＮＥ）、白血球（ＬＹ）、単球（ＭＯ）、好酸球（ＥＯ）、及び好塩基球（ＢＡ）を示す。（図２６Ｂ）赤血球生成パラメーターを示す。ＲＢＣ：赤血球、Ｈｂ：ヘモグロビン、ＭＣＶ：平均赤血球容積、ＭＣＨ：平均赤血球ヘモグロビン量、ＭＣＨＣ：平均赤血球ヘモグロビン濃度、ＲＤＷ：赤血球分布幅。３つの群の間の差は有意なものではなかった。（図２６Ｃ）骨髄細胞組成を示す。（図２６Ｄ）骨髄Ｌｉｎ－細胞のコロニー形成能を示す。図２６Ａ～Ｄでは、群間差は有意なものではなかった。

【図２７】挿入部位分析の模式図を示す。Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ逆方向反復配列（ＩＲ）と関連付けてＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲベクター中のＮｈｅＩ部位及びＫｐｎＩ部位の局在が示される。これらの酵素の切断位置はＳＢ　ＩＲ／ＤＲと近いがＳＢ　ＩＲ／ＤＲの外側であり、これらの酵素を使用することで、組み込まれていないベクターのバックグラウンドが低減される。骨髄Ｌｉｎ－細胞から得られたゲノムＤＮＡをＮｈｅＩ及びＫｐｎＩで消化し、熱不活化後、ＮｌａＩＩＩでさらに消化した。ＮｌａＩＩＩは４塩基認識酵素であり、短いＤＮＡ断片を創出することになる。次に、消化ＤＮＡを、配列が既知であり、消化ＮｌａＩＩＩ断片と適合する末端を有する二本鎖オリゴとライゲーションした。熱熱不活化及び精製後、リンカーとのライゲーション産物を線形増幅に使用し、この線形増幅によってＳＢ左アームから始まる一本鎖（ｓｓ）ＤＮＡ集団を創出した。プライマーはビオチン化されているため、ストレプトアビジンビーズでｓｓＤＮＡを収集することが可能である。徹底的な洗浄後、ビーズからｓｓＤＮＡを溶出させ、２回のネステッドＰＣＲによるさらなる増幅に供した。ＰＣＲ増幅産物をゲルで精製し、クローニングし、シークエンスし、マウスゲノム配列にマッピングして組み込み部位の印付けを行った。

【図２８Ａ】ＬＡＭ－ＰＣＲ／ＮＧＳによるＨＳＰＣ中のベクター組み込み部位の分析を示す。ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲ＋ＨＤＡｄ－ＳＢを用いたインビボでの形質導入後２０週目に収集した骨髄細胞からゲノムＤＮＡを単離した。染色体上での組み込み部位の分布を示す。組み込み部位は垂直線によって印付けされている。

【図２８Ｂ】ＬＡＭ－ＰＣＲ／ＮＧＳによるＨＳＰＣ中のベクター組み込み部位の分析を示す。ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲ＋ＨＤＡｄ－ＳＢを用いたインビボでの形質導入後２０週目に収集した骨髄細胞からゲノムＤＮＡを単離した。連結部配列の例：Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　ｂｅａｕｔｙ　ＩＲ／ＤＲ配列、組み込み連結部（ｃｈｒ７、７９７９６０９４）配列番

号４；Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　ｂｅａｕｔｙ　ＩＲ／ＤＲ配列、組み込み連結部（反復配列領域）配列番号５。ＩＲ／ＤＲ配列は下線付きかつ太字テキストで示される。染色体配列はプレーンテキストで示される。ＩＲと染色体ＤＮＡとの連結部に位置するＴＡジヌクレオチド（ＳＢ１００ｘによって使用される）は太字で示される。

【図２８Ｃ】ＬＡＭ－ＰＣＲ／ＮＧＳによるＨＳＰＣ中のベクター組み込み部位の分析を示す。ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲ＋ＨＤＡｄ－ＳＢを用いたインビボでの形質導入後２０週目に収集した骨髄細胞からゲノムＤＮＡを単離した。組み込み部位をマウスゲノムにマッピングし、遺伝子と関連付けてその位置を分析した。転写開始部位（ＴＳＳ）の上流１ｋｂで組み込み事象が生じるパーセント（０．０％）、エクソンの５’ＵＴＲで組み込み事象が生じるパーセント（０．０％）、タンパク質コード配列で組み込み事象が生じるパーセント（０．０％）、イントロンで組み込み事象が生じるパーセント（１７．０％）、３’ＵＴＲで組み込み事象が生じるパーセント（０．０％）、３’ＵＴＲの下流１ｋｂで組み込み事象が生じるパーセント（０．０％）、及び遺伝子間で組み込み事象が生じるパーセント（８３．０％）が示される。

【図２８Ｄ】ＬＡＭ－ＰＣＲ／ＮＧＳによるＨＳＰＣ中のベクター組み込み部位の分析を示す。ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲ＋ＨＤＡｄ－ＳＢを用いたインビボでの形質導入後２０週目に収集した骨髄細胞からゲノムＤＮＡを単離した。マウスゲノム枠での組み込みパターンを示す。連続ゲノム枠と重なる組み込みの数及び無作為化したマウスゲノム枠と重なる組み込みの数、ならびにサイズを比較した。これは、組み込みパターンが連続枠と無作為枠とで同様であることを示す。いずれの所与の枠においても最大組み込み数は３を超えることはなく、枠当たりの組み込み数が１の発生率の方が高かった。

【図２９Ａ】二次レシピエントの分析を示す。インビボ形質導入ＣＤ４６ｔｇマウスから２０週目に収集した骨髄Ｌｉｎ－細胞を致死性照射Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに移植した。二次レシピエントを１６週間経過観察した。移植から４週目、８週目、１２週目、及び１６週目のＣＤ４６陽性ＰＢＭＣのパーセントに基づく生着率を示す。２つの群の間の差は有意なものではなかった。

【図２９Ｂ】二次レシピエントの分析を示す。インビボ形質導入ＣＤ４６ｔｇマウスから２０週目に収集した骨髄Ｌｉｎ－細胞を致死性照射Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに移植した。二次レシピエントを１６週間経過観察した。γ－グロビン発現末梢血ＲＢＣのパーセントをフローサイトメトリーによって測定したものを示す。２つの群の間の差は有意なものではない。

【図２９Ｃ】二次レシピエントの分析を示す。インビボ形質導入ＣＤ４６ｔｇマウスから２０週目に収集した骨髄Ｌｉｎ－細胞を致死性照射Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに移植した。二次レシピエントを１６週間経過観察した。インビボでのＨＳＰＣの形質導入後２０週目に収集した骨髄ＭＮＣにおける細胞当たりのベクターコピー数を示す。２つの群の間の差は有意なものではない。

【図２９Ｄ】二次レシピエントの分析を示す。インビボ形質導入ＣＤ４６ｔｇマウスから２０週目に収集した骨髄Ｌｉｎ－細胞を致死性照射Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに移植した。二次レシピエントを１６週間経過観察した。二次レシピエントのＲＢＣ中のヒトγ－グロビン鎖をＨＰＬＣによって分析したものを示す。成体型マウスα－グロビンに対するヒトγ－グロビンのパーセントが示される。＊＊＊ｐ＜０．０００１。

【図２９Ｅ】二次レシピエントの分析を示す。インビボ形質導入ＣＤ４６ｔｇマウスから２０週目に収集した骨髄Ｌｉｎ－細胞を致死性照射Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに移植した。二次レシピエントを１６週間経過観察した。全血液細胞中のγ－グロビンｍＲＮＡのレベルをマウスα－グロビンｍＲＮＡのものと比較したものを示す。

【図２９Ｆ】二次レシピエントの分析を示す。インビボ形質導入ＣＤ４６ｔｇマウスから２０週目に収集した骨髄Ｌｉｎ－細胞を致死性照射Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに移植した。二次レシピエントを１６週間経過観察した。全骨髄ＭＮＣにおけるγ－グロビン発現赤血球（Ｔｅｒ１１９＋細胞）のパーセントを示す。統計解析は、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。

【図２９Ｇ】二次レシピエントの分析を示す。インビボ形質導入ＣＤ４６ｔｇマウスから２０週目に収集した骨髄Ｌｉｎ－細胞を致死性照射Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに移植した。二次レシピエントを１６週間経過観察した。形質導入後１６週目の骨髄ＭＮＣ中のγ－グロビンｍＲＮＡのレベルを示す。マウスα－グロビンｍＲＮＡ及びβ－メジャーグロビンｍＲＮＡに対するヒトγ－グロビンｍ－ＲＮＡのパーセントが示される。

【図２９Ｈ】二次レシピエントの分析を示す。インビボ形質導入ＣＤ４６ｔｇマウスから２０週目に収集した骨髄Ｌｉｎ－細胞を致死性照射Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに移植した。二次レシピエントを１６週間経過観察した。赤血球特異性を示す。赤血球（Ｔｅｒ１１９$^{+}$）細胞及び非赤血球（Ｔｅｒ１１９$^{-}$）細胞におけるγ－グロビン＋細胞のパーセントが示される。

【図２９Ｉ】二次レシピエントの分析を示す。インビボ形質導入ＣＤ４６ｔｇマウスから２０週目に収集した骨髄Ｌｉｎ－細胞を致死性照射Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに移植した。二次レシピエントを１６週間経過観察した。インビボでのＨＳＰＣの形質導入後２０週目に収集した骨髄ＭＮＣにおける細胞当たりのベクターコピー数（ＶＣＮ）を示す。２つの群の間の差は有意なものではない。

【図３０】移植後１６週目の二次レシピエントにおける血液学的パラメーターを示す。（Ａ）白血球を示す。（Ｂ）赤血球生成パラメーターを示す。ＲＢＣ：赤血球、Ｈｂ：ヘモグロビン、ＭＣＶ：平均赤血球容積、ＭＣＨ：平均赤血球ヘモグロビン量、ＭＣＨＣ：平均赤血球ヘモグロビン濃度、ＲＤＷ：赤血球分布幅。（Ｃ）骨髄細胞組成を示す。（Ｄ）骨髄Ｌｉｎ－細胞のコロニー形成能を示す。Ａ～Ｄでは、群間差は有意なものではなかった。統計解析は、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。

【図３１Ａ】ヒトＣＤ３４＋細胞を用いるインビトロ試験を示す。（図３１Ａ）実験の模式図：ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲ＋ＨＤ－ＳＢまたはＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲ＋ＨＤＡｄ－ＳＢを用いてＣＤ３４＋細胞の形質導入を行い、このＣＤ３４＋細胞を赤血球分化（ＥＤ）に供した。ＥＤから５日目にＯ６ＢＧ－ＢＣＮＵを用いるインビトロでの選択を開始した。１８日目にフローサイトメトリー（図３１Ｂ）及びＨＰＬＣ（図３１Ｃ）によって細胞を分析した。（図３１Ｄ）１８日目のベクターコピー数を示す。統計解析は、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０００１。

【図３１Ｂ】ヒトＣＤ３４＋細胞を用いるインビトロ試験を示す。（図３１Ａ）実験の模式図：ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲ＋ＨＤ－ＳＢまたはＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲ＋ＨＤＡｄ－ＳＢを用いてＣＤ３４＋細胞の形質導入を行い、このＣＤ３４＋細胞を赤血球分化（ＥＤ）に供した。ＥＤから５日目にＯ６ＢＧ－ＢＣＮＵを用いるインビトロでの選択を開始した。１８日目にフローサイトメトリー（図３１Ｂ）及びＨＰＬＣ（図３１Ｃ）によって細胞を分析した。（図３１Ｄ）１８日目のベクターコピー数を示す。統計解析は、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０００１。

【図３１Ｃ】ヒトＣＤ３４＋細胞を用いるインビトロ試験を示す。（図３１Ａ）実験の模式図：ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲ＋ＨＤ－ＳＢまたはＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲ＋ＨＤＡｄ－ＳＢを用いてＣＤ３４＋細胞の形質導入を行い、このＣＤ３４＋細胞を赤血球分化（ＥＤ）に供した。ＥＤから５日目にＯ６ＢＧ－ＢＣＮＵを用いるインビトロでの選択を開始した。１８日目にフローサイトメトリー（図３１Ｂ）及びＨＰＬＣ（図３１Ｃ）によって細胞を分析した。（図３１Ｄ）１８日目のベクターコピー数を示す。統計解析は、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０００１。

【図３１Ｄ】ヒトＣＤ３４＋細胞を用いるインビトロ試験を示す。（図３１Ａ）実験の模式図：ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲ＋ＨＤ－ＳＢまたはＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲ＋ＨＤＡｄ－ＳＢを用いてＣＤ３４＋細胞の形質導入を行い、このＣＤ３４＋細胞を赤血球分化（ＥＤ）に供した。ＥＤから５日目にＯ６ＢＧ－ＢＣＮＵを用いるインビトロでの選択を開始した。１８日目にフローサイトメトリー（図３１Ｂ）及びＨＰＬＣ（図３１Ｃ）によって細胞を分析した。（図３１Ｄ）１８日目のベクターコピー数を示す。統計解析は、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０００１。

【図３２Ａ】ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲ及びＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲを用いてＨｂｂ$^{th3}$／Ｃ

Ｄ４６マウスのインビボでのＨＳＣ遺伝子治療を行った後のヒトγ－グロビンの発現を示す。（図３２Ａ）処理レジメンを示す。図２５Ａ～２５Ｅとは対照的に、図３２Ａ～３２Ｄは、サラセミアＨｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６マウス内での結果を示す。（図３２Ｂ）末梢赤血球（ＲＢＣ）におけるヒトγ－グロビン陽性細胞のパーセントをフローサイトメトリーによって測定したものを示す。各記号は個々の動物である。（図３２Ｃ）インビボでのＨＳＰＣの形質導入後１８週目のＲＢＣ中のγ－グロビンタンパク質鎖のレベルをＨＰＬＣによって測定したものを示す。マウスα－グロビンタンパク質鎖に対するヒトγ－グロビンタンパク質鎖のパーセントが示される。（図３２Ｄ）非処理Ｈｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６マウス（左パネル）及び処理後２１週目のマウスの代表的なクロマトグラムを示す。マウスα－鎖及びβ－鎖に加えてヒトγ－グロビンが付加されたことが示される。

【図３２Ｂ】ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲ及びＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲを用いてＨｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６マウスのインビボでのＨＳＣ遺伝子治療を行った後のヒトγ－グロビンの発現を示す。（図３２Ａ）処理レジメンを示す。図２５Ａ～２５Ｅとは対照的に、図３２Ａ～３２Ｄは、サラセミアＨｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６マウス内での結果を示す。（図３２Ｂ）末梢赤血球（ＲＢＣ）におけるヒトγ－グロビン陽性細胞のパーセントをフローサイトメトリーによって測定したものを示す。各記号は個々の動物である。（図３２Ｃ）インビボでのＨＳＰＣの形質導入後１８週目のＲＢＣ中のγ－グロビンタンパク質鎖のレベルをＨＰＬＣによって測定したものを示す。マウスα－グロビンタンパク質鎖に対するヒトγ－グロビンタンパク質鎖のパーセントが示される。（図３２Ｄ）非処理Ｈｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６マウス（左パネル）及び処理後２１週目のマウスの代表的なクロマトグラムを示す。マウスα－鎖及びβ－鎖に加えてヒトγ－グロビンが付加されたことが示される。

【図３２Ｃ】ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲ及びＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲを用いてＨｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６マウスのインビボでのＨＳＣ遺伝子治療を行った後のヒトγ－グロビンの発現を示す。（図３２Ａ）処理レジメンを示す。図２５Ａ～２５Ｅとは対照的に、図３２Ａ～３２Ｄは、サラセミアＨｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６マウス内での結果を示す。（図３２Ｂ）末梢赤血球（ＲＢＣ）におけるヒトγ－グロビン陽性細胞のパーセントをフローサイトメトリーによって測定したものを示す。各記号は個々の動物である。（図３２Ｃ）インビボでのＨＳＰＣの形質導入後１８週目のＲＢＣ中のγ－グロビンタンパク質鎖のレベルをＨＰＬＣによって測定したものを示す。マウスα－グロビンタンパク質鎖に対するヒトγ－グロビンタンパク質鎖のパーセントが示される。（図３２Ｄ）非処理Ｈｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６マウス（左パネル）及び処理後２１週目のマウスの代表的なクロマトグラムを示す。マウスα－鎖及びβ－鎖に加えてヒトγ－グロビンが付加されたことが示される。

【図３２Ｄ】ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲ及びＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲを用いてＨｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６マウスのインビボでのＨＳＣ遺伝子治療を行った後のヒトγ－グロビンの発現を示す。（図３２Ａ）処理レジメンを示す。図２５Ａ～２５Ｅとは対照的に、図３２Ａ～３２Ｄは、サラセミアＨｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６マウス内での結果を示す。（図３２Ｂ）末梢赤血球（ＲＢＣ）におけるヒトγ－グロビン陽性細胞のパーセントをフローサイトメトリーによって測定したものを示す。各記号は個々の動物である。（図３２Ｃ）インビボでのＨＳＰＣの形質導入後１８週目のＲＢＣ中のγ－グロビンタンパク質鎖のレベルをＨＰＬＣによって測定したものを示す。マウスα－グロビンタンパク質鎖に対するヒトγ－グロビンタンパク質鎖のパーセントが示される。（図３２Ｄ）非処理Ｈｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６マウス（左パネル）及び処理後２１週目のマウスの代表的なクロマトグラムを示す。マウスα－鎖及びβ－鎖に加えてヒトγ－グロビンが付加されたことが示される。

【図３２Ｅ】ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲ及びＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲを用いてＨｂｂｔｈ３／ＣＤ４６＋／＋マウスのインビボでのＨＳＰＣ遺伝子治療を行った後のヒトγ－グロビンの発現を示す。（図３２Ｅ）処理レジメン：図２５に示される試験とは対照的に、この試験は、サラセミアＨｂｂｔｈ３／ＣＤ４６マウスを用いて実施した。（図３２Ｆ）末梢赤血球（ＲＢＣ）におけるヒトγ－グロビン陽性細胞のパーセントをフローサイトメトリーによって測定したものを示す。各記号は個々の動物である。（図３２Ｇ）インビボでのＨＳＰＣの形質導入後１０～１６週目のＲＢＣ中のγ－グロビンタンパク質鎖のレベルをＨＰ

ＬＣによって測定したものを示す。マウスα－グロビンタンパク質鎖に対するヒトγ－グロビンタンパク質鎖のパーセントが示される。（図３２Ｈ）非処理Ｈｂｂｔｈ３／ＣＤ４６＋／＋マウス（左パネル）及び処理後１６週目のマウスの代表的なクロマトグラムを示す。マウスα－鎖及びβ－鎖に加えてヒトγ－グロビンが付加されたことが示される。２つの独立した試験がＨｂｂｔｈ３／ＣＤ４６＋／＋マウスを用いて実施されたことは注目すべきことである。一次試験：ＨＤ－長鎖ＬＣＲについてはＮ＝６、ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲについてはＮ＝２、経過観察２１週間。二次試験：ＨＤ－長鎖ＬＣＲについてはＮ＝４、ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲについてはＮ＝５、経過観察１６週間。図３２Ｆは、２１週目までの統合データを示す。統計解析は、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０００１。

【図３２Ｆ】ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲ及びＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲを用いてＨｂｂｔｈ３／ＣＤ４６＋／＋マウスのインビボでのＨＳＰＣ遺伝子治療を行った後のヒトγ－グロビンの発現を示す。（図３２Ｅ）処理レジメン：図２５に示される試験とは対照的に、この試験は、サラセミアＨｂｂｔｈ３／ＣＤ４６マウスを用いて実施した。（図３２Ｆ）末梢赤血球（ＲＢＣ）におけるヒトγ－グロビン陽性細胞のパーセントをフローサイトメトリーによって測定したものを示す。各記号は個々の動物である。（図３２Ｇ）インビボでのＨＳＰＣの形質導入後１０～１６週目のＲＢＣ中のγ－グロビンタンパク質鎖のレベルをＨＰＬＣによって測定したものを示す。マウスα－グロビンタンパク質鎖に対するヒトγ－グロビンタンパク質鎖のパーセントが示される。（図３２Ｈ）非処理Ｈｂｂｔｈ３／ＣＤ４６＋／＋マウス（左パネル）及び処理後１６週目のマウスの代表的なクロマトグラムを示す。マウスα－鎖及びβ－鎖に加えてヒトγ－グロビンが付加されたことが示される。２つの独立した試験がＨｂｂｔｈ３／ＣＤ４６＋／＋マウスを用いて実施されたことは注目すべきことである。一次試験：ＨＤ－長鎖ＬＣＲについてはＮ＝６、ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲについてはＮ＝２、経過観察２１週間。二次試験：ＨＤ－長鎖ＬＣＲについてはＮ＝４、ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲについてはＮ＝５、経過観察１６週間。図３２Ｆは、２１週目までの統合データを示す。統計解析は、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０００１。

【図３２Ｇ】ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲ及びＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲを用いてＨｂｂｔｈ３／ＣＤ４６＋／＋マウスのインビボでのＨＳＰＣ遺伝子治療を行った後のヒトγ－グロビンの発現を示す。（図３２Ｅ）処理レジメン：図２５に示される試験とは対照的に、この試験は、サラセミアＨｂｂｔｈ３／ＣＤ４６マウスを用いて実施した。（図３２Ｆ）末梢赤血球（ＲＢＣ）におけるヒトγ－グロビン陽性細胞のパーセントをフローサイトメトリーによって測定したものを示す。各記号は個々の動物である。（図３２Ｇ）インビボでのＨＳＰＣの形質導入後１０～１６週目のＲＢＣ中のγ－グロビンタンパク質鎖のレベルをＨＰＬＣによって測定したものを示す。マウスα－グロビンタンパク質鎖に対するヒトγ－グロビンタンパク質鎖のパーセントが示される。（図３２Ｈ）非処理Ｈｂｂｔｈ３／ＣＤ４６＋／＋マウス（左パネル）及び処理後１６週目のマウスの代表的なクロマトグラムを示す。マウスα－鎖及びβ－鎖に加えてヒトγ－グロビンが付加されたことが示される。２つの独立した試験がＨｂｂｔｈ３／ＣＤ４６＋／＋マウスを用いて実施されたことは注目すべきことである。一次試験：ＨＤ－長鎖ＬＣＲについてはＮ＝６、ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲについてはＮ＝２、経過観察２１週間。二次試験：ＨＤ－長鎖ＬＣＲについてはＮ＝４、ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲについてはＮ＝５、経過観察１６週間。図３２Ｆは、２１週目までの統合データを示す。統計解析は、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０００１。

【図３２Ｈ】ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲ及びＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲを用いてＨｂｂｔｈ３／ＣＤ４６＋／＋マウスのインビボでのＨＳＰＣ遺伝子治療を行った後のヒトγ－グロビンの発現を示す。（図３２Ｅ）処理レジメン：図２５に示される試験とは対照的に、この試験は、サラセミアＨｂｂｔｈ３／ＣＤ４６マウスを用いて実施した。（図３２Ｆ）末梢赤血球（ＲＢＣ）におけるヒトγ－グロビン陽性細胞のパーセントをフローサイトメトリーによって測定したものを示す。各記号は個々の動物である。（図３２Ｇ）インビボでのＨＳ

ＰＣの形質導入後１０～１６週目のＲＢＣ中のγ－グロビンタンパク質鎖のレベルをＨＰＬＣによって測定したものを示す。マウスα－グロビンタンパク質鎖に対するヒトγ－グロビンタンパク質鎖のパーセントが示される。（図３２Ｈ）非処理Ｈｂｂｔｈ３／ＣＤ４６＋／＋マウス（左パネル）及び処理後１６週目のマウスの代表的なクロマトグラムを示す。マウスα－鎖及びβ－鎖に加えてヒトγ－グロビンが付加されたことが示される。２つの独立した試験がＨｂｂｔｈ３／ＣＤ４６＋／＋マウスを用いて実施されたことは注目すべきことである。一次試験：ＨＤ－長鎖ＬＣＲについてはＮ＝６、ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲについてはＮ＝２、経過観察２１週間。二次試験：ＨＤ－長鎖ＬＣＲについてはＮ＝４、ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲについてはＮ＝５、経過観察１６週間。図３２Ｆは、２１週目までの統合データを示す。統計解析は、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０００１。

【図３３】　殺時の骨髄の分析を示す。Ｈｂｂｔｈ３／ＣＤ４６＋／＋マウスのインビボでのＨＳＰＣの形質導入後１６週目に骨髄を収集した。（Ａ）骨髄ＭＮＣにおける細胞当たりのベクターコピー数を示す。２つの群の間の差は有意なものではない。（Ｂ）赤血球（Ｔｅｒ１１９＋）細胞中のγ－グロビンの平均蛍光強度（ＭＦＩ）を示す。統計解析は、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。

【図３４】Ｃ５７ＢＬ６（正常マウス）ならびにＴｏｗｎｅｓ　ＳＣＡマウス（処理前及び長鎖ＬＣＲ処理後１０週目）の赤血球形態の正常化を示す顕微鏡写真を示す。

【図３５】Ｔｏｗｎｅｓマウス（処理前）及びＴｏｗｎｅｓマウス（長鎖ＬＣＲ処理後１０週目）の赤血球生成（網状赤血球数）の正常化を示す顕微鏡写真を示す。

【図３６Ａ】表現型修正を示す。（図３６Ａ、図３６Ｂ）血液細胞形態を示し、左パネルではギムザ染色で染色した血液塗抹標本が示され、右パネルではメイ・グリュンワルド染色で染色した血液塗抹標本が示される。網状赤血球中の核及び細胞質の残留物が紫色に染色されている。（図３６Ａ）処理前と処理後１４週目との比較を示す。（図３６Ｂ）ＣＤ４６ｔｇ、ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲでの処理前のＨｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６マウス、ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲでの処理後１８週目のＨｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６マウス、及びＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲでの処理後２１週目のＨｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６マウスについてギムザ染色及び網状赤血球を比較したものを示す。（図３６Ｃ）骨髄のサイトスピン調製物を示す。前赤芽球が優位な赤血球生成が処理マウスでは正常化していることが見てとれる。スケールバーは２０μｍである。

【図３６Ｂ】表現型修正を示す。（図３６Ａ、図３６Ｂ）血液細胞形態を示し、左パネルではギムザ染色で染色した血液塗抹標本が示され、右パネルではメイ・グリュンワルド染色で染色した血液塗抹標本が示される。網状赤血球中の核及び細胞質の残留物が紫色に染色されている。（図３６Ａ）処理前と処理後１４週目との比較を示す。（図３６Ｂ）ＣＤ４６ｔｇ、ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲでの処理前のＨｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６マウス、ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲでの処理後１８週目のＨｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６マウス、及びＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲでの処理後２１週目のＨｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６マウスについてギムザ染色及び網状赤血球を比較したものを示す。（図３６Ｃ）骨髄のサイトスピン調製物を示す。前赤芽球が優位な赤血球生成が処理マウスでは正常化していることが見てとれる。スケールバーは２０μｍである。

【図３６Ｃ】表現型修正を示す。（図３６Ａ、図３６Ｂ）血液細胞形態を示し、左パネルではギムザ染色で染色した血液塗抹標本が示され、右パネルではメイ・グリュンワルド染色で染色した血液塗抹標本が示される。網状赤血球中の核及び細胞質の残留物が紫色に染色されている。（図３６Ａ）処理前と処理後１４週目との比較を示す。（図３６Ｂ）ＣＤ４６ｔｇ、ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲでの処理前のＨｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６マウス、ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲでの処理後１８週目のＨｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６マウス、及びＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲでの処理後２１週目のＨｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６マウスについてギムザ染色及び網状赤血球を比較したものを示す。（図３６Ｃ）骨髄のサイトスピン調製物を示す。前赤芽球が優位な赤血球生成が処理マウスでは正常化していることが見てとれる。スケールバーは２０μｍである。

【図３７Ａ】表現型修正（１６週目）を示す。（図３７Ａ）左パネル：ギムザ／メイ・グリュンワルド染色（５分）で染色した血液塗抹標本。右パネル：ブリリアントクレシルブルーで網状赤血球を染色した血液塗抹標本。網状赤血球中の核及び細胞質の残留物が紫色に染まって見える。（図３７Ｂ）ギムザ／メイ・グリュンワルド染色（１５分）で染色した骨髄のサイトスピン調製物を示す。（図３７Ａ及び図３７Ｂ）上パネル：骨髄細胞が正常に分布している－赤血球系譜は、すべての赤血球分化段階によって構成されている。中央パネル：白血球系譜に対して赤血球系譜が優位である－赤血球系譜は、主に、前赤芽球及び好塩基性赤芽球からなる。下パネル：骨髄細胞が正常に分布している－赤血球系譜は、主に、成熟中の多染性赤芽球及び正染性赤芽球によって構成される。スケールバーは、２５μｍである。

【図３７Ｂ】表現型修正（１６週目）を示す。（図３７Ａ）左パネル：ギムザ／メイ・グリュンワルド染色（５分）で染色した血液塗抹標本。右パネル：ブリリアントクレシルブルーで網状赤血球を染色した血液塗抹標本。網状赤血球中の核及び細胞質の残留物が紫色に染まって見える。（図３７Ｂ）ギムザ／メイ・グリュンワルド染色（１５分）で染色した骨髄のサイトスピン調製物を示す。（図３７Ａ及び図３７Ｂ）上パネル：骨髄細胞が正常に分布している－赤血球系譜は、すべての赤血球分化段階によって構成されている。中央パネル：白血球系譜に対して赤血球系譜が優位である－赤血球系譜は、主に、前赤芽球及び好塩基性赤芽球からなる。下パネル：骨髄細胞が正常に分布している－赤血球系譜は、主に、成熟中の多染性赤芽球及び正染性赤芽球によって構成される。スケールバーは、２５μｍである。

【図３８】長鎖ＬＣＲベクター、短鎖ＬＣＲベクター、及び対照ＣＤ４６ｔｇについて１週目（上パネル）及び１０週目（下パネル）の時点での赤血球パラメーターの正常化をグラフで示したものを示す。

【図３９Ａ】Ｈｂｂｔｈ３／ＣＤ４６＋／＋マウスのインビボでのＨＳＰＣ遺伝子治療の前及び後（１６週目）の血液学的パラメーターを示す。（図３９Ａ）網状赤血球数を示す。（図３９Ｂ）血液学的パラメーターを示す。統計解析は、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０００１。

【図３９Ｂ－１】Ｈｂｂｔｈ３／ＣＤ４６＋／＋マウスのインビボでのＨＳＰＣ遺伝子治療の前及び後（１６週目）の血液学的パラメーターを示す。（図３９Ａ）網状赤血球数を示す。（図３９Ｂ）血液学的パラメーターを示す。統計解析は、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０００１。

【図３９Ｂ－２】Ｈｂｂｔｈ３／ＣＤ４６＋／＋マウスのインビボでのＨＳＰＣ遺伝子治療の前及び後（１６週目）の血液学的パラメーターを示す。（図３９Ａ）網状赤血球数を示す。（図３９Ｂ）血液学的パラメーターを示す。統計解析は、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０００１。

【図３９Ｂ－３】Ｈｂｂｔｈ３／ＣＤ４６＋／＋マウスのインビボでのＨＳＰＣ遺伝子治療の前及び後（１６週目）の血液学的パラメーターを示す。（図３９Ａ）網状赤血球数を示す。（図３９Ｂ）血液学的パラメーターを示す。統計解析は、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０００１。

【図４０Ａ】脾臓及び肝臓における髄外造血の表現型修正を示す。　殺時（１６週目）の脾臓サイズを示す。左パネル：代表的な脾臓画像。右パネル：まとめ。各記号は個々の動物を表す。統計解析は、一元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。＊＊ｐ＜０．０００１。２つのベクターの間の差は有意なものではない。

【図４０Ｂ】脾臓及び肝臓における髄外造血の表現型修正を示す。肝臓切片及び脾臓切片をヘマトキシリン／エオシン染色することによって髄外造血を示したものを示す。Ｈｂｂｔｈ３／ＣＤ４６＋／＋マウスの肝臓中の赤芽球クラスター及び脾臓中の巨核球クラスターが黒矢印によって示される。スケールバーは２０μｍである。示される画像は代表的なものである。

【図４１】脾臓及び肝臓（１６週目）におけるヘモジデリン沈着の表現型修正を示す。鉄沈着は、脾臓切片及び肝臓切片中の細胞質ヘモジデリンが青色色素で染まったものとして

パール染色によって示される。スケールバーは２０μｍである。切片は代表的なものが示される。（露出時間：２．２４ｍ秒、ゲイン：４．１×、彩度：１．５０、ガンマ：０．６０）。

【図４２Ａ】　殺時（２１週目）の骨髄の分析を示す。Ｈｂｂ$^{h3}$／ＣＤ４６ｔｇマウスにおけるインビボでのＨＳＣ形質導入後２１週目に骨髄を収集した。（図４２Ａ）骨髄ＭＮＣにおける細胞当たりのベクターコピー数を示す。（図４２Ｂ、図４２Ｃ）γ－グロビン発現の赤血球特異性を示す。（図４２Ｂ）γ－グロビン発現赤血球（Ｔｅｒ１１９$^{+}$）細胞及び非赤血球（Ｔｅｒ１１９$^{-}$）細胞のパーセントを示す。＊ｐ＜０．０５。統計解析は、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。

【図４２Ｂ】　殺時（２１週目）の骨髄の分析を示す。Ｈｂｂ$^{h3}$／ＣＤ４６ｔｇマウスにおけるインビボでのＨＳＣ形質導入後２１週目に骨髄を収集した。（図４２Ａ）骨髄ＭＮＣにおける細胞当たりのベクターコピー数を示す。（図４２Ｂ、図４２Ｃ）γ－グロビン発現の赤血球特異性を示す。（図４２Ｂ）γ－グロビン発現赤血球（Ｔｅｒ１１９$^{+}$）細胞及び非赤血球（Ｔｅｒ１１９$^{-}$）細胞のパーセントを示す。＊ｐ＜０．０５。統計解析は、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。

【図４２Ｃ】　殺時（２１週目）の骨髄の分析を示す。Ｈｂｂ$^{h3}$／ＣＤ４６ｔｇマウスにおけるインビボでのＨＳＣ形質導入後２１週目に骨髄を収集した。（図４２Ａ）骨髄ＭＮＣにおける細胞当たりのベクターコピー数を示す。（図４２Ｂ、図４２Ｃ）γ－グロビン発現の赤血球特異性を示す。（図４２Ｂ）γ－グロビン発現赤血球（Ｔｅｒ１１９$^{+}$）細胞及び非赤血球（Ｔｅｒ１１９$^{-}$）細胞のパーセントを示す。＊ｐ＜０．０５。統計解析は、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。

【図４３】ＣＤ４６ｔｇマウス及びＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／Ｈｂｂ$^{th-3}$マウス（アデノウイルスドナーベクターの投与前）から得られた肝臓切片及び脾臓切片をヘマトキシリン／エオシン染色することによって示した髄外造血を示す。鉄沈着は、脾臓中の細胞質ヘモジデリンが青色色素で染まったものとしてパール染色によって示される。

【図４４Ａ】インビボでのＨＳＰＣの形質導入／選択によるＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスの表現型修正を示す。健康な（ＣＤ４６ｔｇ）マウス、動員及びインビボでの形質導入を行う前のＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウス、ならびにインビボでの形質導入／選択を行ったＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウス（ＨＤＡｄ注入後２９週目に分析した）のＲＢＣ分析（ｎ＝５）を示す。＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０００２、＊＊＊Ｐ≦０．００００３。統計解析は、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。

【図４４Ｂ】インビボでのＨＳＰＣの形質導入／選択によるＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスの表現型修正を示す。網状赤血球を検出するために末梢血塗抹標本をブリリアントクレシルブルーで超生体染色したものを示す。矢印は、特徴的な残存ＲＮＡ及びマイクロオルガネラを含む網状赤血球を示す。代表的な塗抹標本において陽性染色された網状赤血球のパーセントは、ＣＤ４６については７％、処理前のＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３については３１％、処理後のＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３については１２％であった。スケールバー：２０μｍ。

【図４４Ｃ】インビボでのＨＳＰＣの形質導入／選択によるＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスの表現型修正を示す。上：血液塗抹標本。スケールバー：２０μｍ。中央：骨髄のサイトスピン調製物。矢印は、成熟段階が異なる赤芽球を示すと共に、前赤芽球が優位な赤血球生成が処理マウスでは正常化する変化が生じていることを示す。スケールバー：２５μｍ。下：パール染色による組織中のヘモジデリン沈着。脾臓組織切片中の細胞質ヘモジデリンが青色色素で染まったものとして鉄沈着が示される。Ｃ及び図５Ｄにおける対照マウス（ＣＤ４６ｔｇ及び形質導入前のＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３）の血液塗抹標本画像は同じ試料から得られたものである。

【図４４Ｄ】インビボでのＨＳＰＣの形質導入／選択によるＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスの表現型修正を示す。１匹の代表的なＣＤ４６ｔｇマウス及び１匹の非処理ＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスならびに５匹の処理ＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスの巨視的な脾臓画像を示す。

【図４４Ｅ】インビボでのＨＳＰＣの形質導入／選択によるＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスの表現型修正を示す。総体重に対する脾臓重量の比（ｍｇ／ｇ）として　殺時の脾臓サイズを決定した。各記号は個々の動物を表す。データは、平均値Å｝ＳＥＭとして示される。＊Ｐ≦０．０５。統計解析は、一元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。
【図４５】ＣＤ４６マウス及びインビボでの形質導入後１６週目の処理Ｈｂｂｔｈ３／ＣＤ４６マウスの骨髄細胞組成を示す。群間差は有意なものではなかった。統計解析は、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。
【図４６】ヒトγ－グロビンのゲート方針を示す。ＣＤ４６／Ｈｂｂｔｈ３マウスから得られたＲＢＣを固定化及び透過処理し、赤血球マーカーＴｅｒ－１１９及び細胞内γ－グロビンの染色に供した。
【図４７Ａ－１】ＣＤ３４＋細胞のトランスクリプトームに対するＳＢ１００ｘ介在性組み込みの影響を示す。実験の模式図を示す。ＥＦ１αプロモーターの制御下にＧＦＰ／ｍｇｍｔカセットを含むＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを単独使用またはＨＤＡｄ－ＳＢと併用してＣＤ３４＋細胞に感染させた。形質導入細胞を赤血球分化培地中で１６日間増殖させた。２回のＯ６ＢＧ／ＢＣＮＵ選択（５０μＭのＯ６ＢＧ＋３５μＭのＢＣＮＵ）を行うことで、トランスポゾンが組み込まれたＧＦＰ陽性細胞を濃縮した。１６日目にＦＡＣＳによってＧＦＰ陽性細胞を選別した（試料＃６）。ｍｇｍｔ／ＧＦＰベクター単独で形質導入してから選択に供したＣＤ３４＋細胞を比較として使用した（試料＃５）。この対照細胞はＳＢ１００ｘを発現しないため、エピソームｍｇｍｔ／ＧＦＰベクター失ったことでＧＦＰ陰性であった。両方の試料から得られた全ＲＮＡをＲＮＡ－Ｓｅｑ（Ｏｍｅｇａ　Ｂｉｏｓｅｒｖｉｃｅｓによって実施した）に供した。
【図４７Ａ－２】ＣＤ３４＋細胞のトランスクリプトームに対するＳＢ１００ｘ介在性組み込みの影響を示す。実験の模式図を示す。ＥＦ１αプロモーターの制御下にＧＦＰ／ｍｇｍｔカセットを含むＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを単独使用またはＨＤＡｄ－ＳＢと併用してＣＤ３４＋細胞に感染させた。形質導入細胞を赤血球分化培地中で１６日間増殖させた。２回のＯ６ＢＧ／ＢＣＮＵ選択（５０μＭのＯ６ＢＧ＋３５μＭのＢＣＮＵ）を行うことで、トランスポゾンが組み込まれたＧＦＰ陽性細胞を濃縮した。１６日目にＦＡＣＳによってＧＦＰ陽性細胞を選別した（試料＃６）。ｍｇｍｔ／ＧＦＰベクター単独で形質導入してから選択に供したＣＤ３４＋細胞を比較として使用した（試料＃５）。この対照細胞はＳＢ１００ｘを発現しないため、エピソームｍｇｍｔ／ＧＦＰベクター失ったことでＧＦＰ陰性であった。両方の試料から得られた全ＲＮＡをＲＮＡ－Ｓｅｑ（Ｏｍｅｇａ　Ｂｉｏｓｅｒｖｉｃｅｓによって実施した）に供した。
【図４７Ｂ】ＣＤ３４＋細胞のトランスクリプトームに対するＳＢ１００ｘ介在性組み込みの影響を示す。ｍＲＮＡ発現に変化（ｌｏｇ２倍率変化）が生じた遺伝子を、そのｐ値に基づいて順位付けしたものを示す。
【図４８】インビボでの形質導入後１６週目の骨髄ＭＮＣにおけるｍｇｍｔ　ｍＲＮＡの発現レベルを示す。全骨髄ＭＮＣ中のヒトｍｇｍｔ$^{Ｐ１４０Ｋ}$レベル及びマウスｍＲＰＬ１０レベルをｑＲＴ－ＰＣＲによって測定した（ｍＲＰＬ１０は、マウスのハウスキーピング遺伝子である）。相対レベルをさらにＶＣＮで除算した（図３３を参照のこと）。統計解析は、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。
【図４９】ｈＣＤ４６ｔｇマウスにおけるインビボでのＨＳＣ形質導入を「長鎖」ＬＣＲベクターと「短鎖」ＬＣＲベクターとで比較したものを示す。ベクターによるインビボでのＨｂｂ$^{ｔｈ３}$／ＣＤ４６マウスの形質導入を行った。群１は、ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲ－γ－グロビン／ｍｇｍｔ＋ＨＤＡｄ－ＳＢ／Ｆｌｐｅを用いて７匹のマウスにインビボでの形質導入を行ったものを示す。群２は、ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲγ－グロビン／ｍｇｍｔ＋ＨＤＡｄ－ＳＢ／Ｆｌｐｅを用いて３匹のマウスにインビボでの形質導入を行ったものを示す。Ｏ$^{６}$ＢＧ、ＢＣＮＵよる選択に必要な選択サイクル数は３回のみであった。
【図５０－１】Ｔｈｂｂマウス試験（６週目）を示す。グラフの結果は、長鎖ＬＣＲベクターで形質導入したマウスと短鎖ＬＣＲベクターで形質導入したマウスとの比較で差は存在せず、これらのマウスにおいてヒトγ－グロビン発現はほぼ存在しないことを示す。

【図５０－２】Ｔｈｂｂマウス試験（６週目）を示す。グラフの結果は、長鎖ＬＣＲベクターで形質導入したマウスと短鎖ＬＣＲベクターで形質導入したマウスとの比較で差は存在せず、これらのマウスにおいてヒトγ－グロビン発現はほぼ存在しないことを示す。
【図５１－１】Ｔｈｂｂマウス試験（８週目）を示す。グラフの結果は、長鎖ＬＣＲベクターで形質導入したマウスと短鎖ＬＣＲベクターで形質導入したマウスとの比較で差が存在することを示すが、マウスにおいて短鎖ＬＣＲウイルスが死滅したかどうかは不明である。
【図５１－２】Ｔｈｂｂマウス試験（８週目）を示す。グラフの結果は、長鎖ＬＣＲベクターで形質導入したマウスと短鎖ＬＣＲベクターで形質導入したマウスとの比較で差が存在することを示すが、マウスにおいて短鎖ＬＣＲウイルスが死滅したかどうかは不明である。
【図５２】マウスにおけるヒトγ－グロビン発現ＲＢＣのパーセントを示すグラフを示す。このグラフは、インビボでの選択サイクルをわずか３回行うだけで、その後に１００％のマーキングが生じることを示す。
【図５３】マウスＨＢＡに対するヒトγ－グロビンの相対値（１０週目）を示すＨＰＬＣのグラフを示す。このグラフは、短鎖ＬＣＲと比較して長鎖ＬＣＲで有意に高いγ－グロビンレベルが得られることを示す。
【図５４】長鎖ＬＣＲベクターを含むマウス＃５７から１０週目に得られた血液のＨＰＬＣ分析例のグラフを示す。
【図５５Ａ】ＨＤＲ介在性組み込みのためのＡＡＶＳ１特異的ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ベクター及びドナーベクターの特徴付けを示す。ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲベクターの構造：Ｕ６プロモーターから$Ｐｏｌ\mathrm{III}$によってＡＡＶＳ１特異的ｓｇＲＮＡが転写され、ｓｐＣａｓ９遺伝子は、ＥＦ１αプロモーターの制御下にある。Ｃａｓ９発現は、ｍｉＲ－１８３－５ｐ及びｍｉＲ－２１８－５ｐによって制御され、これらは、ＨＤＡｄ産生１１６細胞ではＣａｓ９発現を抑制するが、ＣＤ３４＋細胞ではＣａｓ９発現に負の影響を与えない（Ｓａｙａｄａｍｉｎｏｖａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｃｌｉｎ　Ｄｅｖ，１，１４０５７，２０１５）。対応するマイクロＲＮＡ標的部位（ｍｉＲ－Ｔ）は、β－グロビン遺伝子の３’非翻訳領域（３’ＵＴＲ）に埋め込んだ。
【図５５Ｂ】ＨＤＲ介在性組み込みのためのＡＡＶＳ１特異的ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ベクター及びドナーベクターの特徴付けを示す。２０００ｖｐ／細胞のＭＯＩでＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲによる形質導入を行ってから３日後にヒトＣＤ３４＋細胞における標的部位の切断頻度をＴ７Ｅ１アッセイによって測定したものを示す。４７４ｂｐ及び２９４ｂｐのものは特異的な切断による産物である。ゲルの下には切断効率が示される。
【図５５Ｃ】ＨＤＲ介在性組み込みのためのＡＡＶＳ１特異的ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ベクター及びドナーベクターの特徴付けを示す。ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ形質導入ＣＤ３４＋細胞において最も高い頻度で見られる上位１３個のインデル（上から下の順に配列番号６～１８）を示す。薄灰色で強調された配列は、ガイドＲＮＡの標的を示し、ＴＡＭ配列は中間灰色で強調して印付けされている。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９切断部位は垂直矢印によって印付けされている。緑色のものはＮＨＥＪによって生じた挿入である。
【図５５Ｄ】ＨＤＲ介在性組み込みのためのＡＡＶＳ１特異的ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ベクター及びドナーベクターの特徴付けを示す。ＡＡＶＳ１部位への組み込みのためのドナーベクター（ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナー）の構造を示す。ｍｇｍｔＰ１４０Ｋ遺伝子は、自己切断ピコルナウイルス２Ａペプチドを介してＧＦＰ遺伝子と連結されている。これらの遺伝子は、ＥＦ１αプロモーターの制御下にある。ＰＡ：ポリアデニル化シグナル。導入遺伝子カセットは、ＡＡＶＳ１遺伝子座との相同性を有する０．８ｋｂの領域と隣接しており、これらの領域は、以前に公開された試験のものと類似のものである（Ｌｏｍｂａｒｄｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　８，８６１－８６９，２０１１）。これらの相同領域の上流及び下流には、ドナーカセットを遊離させるためのＡＡＶＳ１特異的ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９の認識部位が存在する。
【図５５Ｅ】ＨＤＲ介在性組み込みのためのＡＡＶＳ１特異的ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ベ

クター及びドナーベクターの特徴付けを示す。ドナーカセットの遊離を示す。ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナー（１０００ｖｐ／細胞または２０００ｖｐ／細胞のＭＯＩで使用）を単独使用またはＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ（ＭＯＩ　１０００ｖｐ／細胞）と併用してＣＤ３４＋細胞に感染させた。３日後にゲノムＤＮＡを、ＧＦＰ特異的プローブを用いるサザンブロットに供した。（直鎖）全長ＨＤＡｄ－ドナー－ＧＦＰゲノムの泳動位置は３６ｋｂである。遊離カセットの泳動位置は４．７ｋｂである。ゲルの下には切断頻度が示される。

【図５６Ａ】ＨＵＤＥＰ－２細胞において標的指向化組み込みとＳＢ１００ｘ介在性組み込みとを比較したものを示す。実験スキームを示す。示されるＨＤＡｄベクターを、各ウイルスのＭＯＩを１０００ｖｐ／細胞として用いてＨＵＤＥＰ－２細胞の形質導入を行った。２１日間増殖させた後、ＧＦＰ陽性細胞を選別して９６ウェルプレートに播種した。さらに２週間増殖させることによって単一細胞由来のクローンを得た。形質導入から２日目及び２１日目には細胞集団において、形質導入から３５日目には細胞クローンにおいて、ＧＦＰ発現を測定した。

【図５６Ｂ】ＨＵＤＥＰ－２細胞において標的指向化組み込みとＳＢ１００ｘ介在性組み込みとを比較したものを示す。ドナーベクター単独で処理した細胞、または標的指向化組み込み機構もしくはＳＢ１００×組み込み機構を有するベクターと共にドナーベクターで処理した細胞、におけるＧＦＰを２日目及び２１日目にフローサイトメトリーで分析したものを示す。

【図５６Ｃ】ＨＵＤＥＰ－２細胞において標的指向化組み込みとＳＢ１００ｘ介在性組み込みとを比較したものを示す。全ＧＦＰ$^{+}$細胞におけるＧＦＰの平均蛍光強度を、標的指向化組み込みを行ったものとＳＢ１００×による組み込みを行ったものとで比較したものを示す（２１日目）。示されるデータ（平均値±ＳＤ）は、３つの独立した実験を表す。

【図５６Ｄ】ＨＵＤＥＰ－２細胞において標的指向化組み込みとＳＢ１００ｘ介在性組み込みとを比較したものを示す。単一クローンにおけるＧＦＰの平均蛍光強度を示す。各記号は１つの細胞クローンを表す。示されるデータ（平均値±ＳＤ）は、２つの独立した実験を代表するものである。

【図５６Ｅ】ＨＵＤＥＰ－２細胞において標的指向化組み込みとＳＢ１００ｘ介在性組み込みとを比較したものを示す。標的指向化組み込みまたはＳＢ１００×介在性組み込みを行った代表的な細胞クローンにおけるＧＦＰ発現を示すフローサイトメトリーを示す。

【図５６Ｆ】ＨＵＤＥＰ－２細胞において標的指向化組み込みとＳＢ１００ｘ介在性組み込みとを比較したものを示す。細胞クローン中のベクターコピー数を、ＧＦＰプライマーを使用するｑＰＣＲによって測定したものを示す。

【図５７Ａ】標的指向化組み込みベクターで形質導入を行ったＨＵＤＥＰ－２クローンの組み込みを分析したものを示す。（図５７Ａ）インバースＰＣＲによって組み込み部位を分析したものを示す。上の図は、利用したＮｃｏＩ部位の位置、及びプライマー（片矢印。濃灰色：５’連結部に対するＥＦ１αプライマー、薄灰色：３’連結部に対するｐＡプライマー）を示す。標的指向化組み込みの各側には予想増幅産物サイズが示される。下のゲル写真はｉＰＣＲの結果を示す。各レーンは１つの細胞クローンを表す。Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓから入手した１ｋｂラダーを使用した。Ｅｆ１αプライマーを採用したため、内在性Ｅｆ１αのバンドが余分に検出された。クローン＃２０については増幅産物サイズが予想と異なるが、クローニング及びシークエンシングを行ったところ、標的組み込みが生じたクローンであることが明らかとなった。（図５７Ｂ）イン・アウトＰＣＲ分析を示す。上の図はプライマーの位置を示す。さまざまな組み込みパターンに対する予想産物サイズが記載されている。下のゲル写真は、ほとんどのクローンにおいて一方のアレルへの標的指向化組み込みが生じたことを実証している。（図５７Ａ）から得られた結果と関連して、クローン＃１７、クローン＃２０、及びクローン＃３６から得られた予想外の増幅産物サイズは、鎖状体組み込みに起因するものである可能性がある。

【図５７Ｂ】標的指向化組み込みベクターで形質導入を行ったＨＵＤＥＰ－２クローンの組み込みを分析したものを示す。（図５７Ａ）インバースＰＣＲによって組み込み部位を分析したものを示す。上の図は、利用したＮｃｏＩ部位の位置、及びプライマー（片矢印

。濃灰色：５’連結部に対するＥＦ１αプライマー、薄灰色：３’連結部に対するｐＡプライマー）を示す。標的指向化組み込みの各側には予想増幅産物サイズが示される。下のゲル写真はｉＰＣＲの結果を示す。各レーンは１つの細胞クローンを表す。Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓから入手した１ｋｂラダーを使用した。Ｅｆ１αプライマーを採用したため、内在性Ｅｆ１αのバンドが余分に検出された。クローン＃２０については増幅産物サイズが予想と異なるが、クローニング及びシークエンシングを行ったところ、標的組み込みが生じたクローンであることが明らかとなった。（図５７Ｂ）イン・アウトＰＣＲ分析を示す。上の図はプライマーの位置を示す。さまざまな組み込みパターンに対する予想産物サイズが記載されている。下のゲル写真は、ほとんどのクローンにおいて一方のアレルへの標的指向化組み込みが生じたことを実証している。（図５７Ａ）から得られた結果と関連して、クローン＃１７、クローン＃２０、及びクローン＃３６から得られた予想外の増幅産物サイズは鎖状体組み込みに起因するものである可能性がある。

【図５８Ａ】ＡＡＶＳ１／ＣＤ４６ｔｇマウスにおけるＡＡＶＳ１標的部位の切断を示す。インビトロの分析を示す。ＡＡＶＳ１／ＣＤ４６ｔｇマウスから得られた骨髄系譜陰性細胞における標的部位の切断頻度を、示されるＭＯＩでＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲによるインビトロでの形質導入を行ってから３日後に測定した。

【図５８Ｂ】ＡＡＶＳ１／ＣＤ４６ｔｇマウスにおけるＡＡＶＳ１標的部位の切断を示す。移植後１４週目に全骨髄単核細胞から得られたＤＮＡをディープシークエンシングすることによって得た全ＡＡＶＳ１インデルのパーセントを示す。各記号は個々の動物である。

【図５８Ｃ】ＡＡＶＳ１／ＣＤ４６ｔｇマウスにおけるＡＡＶＳ１標的部位の切断を示す。マウスにおいて最も高い頻度で見られる上位２９個のインデル（上から下の順に配列番号１９～２３、配列番号２１、配列番号２１、配列番号２６～３０、配列番号２７、配列番号３２、配列番号２８、配列番号３４～４７）を示す。示されるデータは代表的なものである。黄色の配列はガイドＲＮＡの標的を示し、ＴＡＭ配列は青色で印付けされている。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９切断部位は垂直矢印によって印付けされている。

【図５９Ａ】ＨＤＡｄ－ＡＡＶＳ１及びＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーを用いてＡＡＶＳ１／ＣＤ４６Ｌｉｎ－細胞のエクスビボでの形質導入を行った後、このＡＡＶＳ１／ＣＤ４６Ｌｉｎ－細胞を致死性照射レシピエントに移植したものを示す。実験の模式図：ＡＡＶＳ１／ＣＤ４６ｔｇマウスから骨髄を収集し、ＭＡＣＳによって系譜陰性細胞（Ｌｉｎ－）を単離した。ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ及びＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーを各単独使用または併用（総ＭＯＩ５００ｖｐ／細胞）してＬｉｎ－細胞の形質導入を行った。１日培養後、$1\times10^{6}$個の形質導入細胞／マウスを致死性照射Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに移植した。４週目に$O^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵ処理を開始し、２週間ごとに計３回繰り返した。各サイクルに伴って、５ｍｇ／ｋｇ→７．５ｍｇ／ｋｇ→１０ｍｇ／ｋｇとなるようにＢＣＮＵ濃度を増加させた。１４週目にマウスを　　殺し、致死性照射二次Ｃ５７Ｂｌ／６レシピエントへの移植に骨髄Ｌｉｎ－細胞を使用した。その後、この二次Ｃ５７Ｂｌ／６レシピエントを１６週間経過観察した。

【図５９Ｂ】ＨＤＡｄ－ＡＡＶＳ１及びＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーを用いてＡＡＶＳ１／ＣＤ４６Ｌｉｎ－細胞のエクスビボでの形質導入を行った後、このＡＡＶＳ１／ＣＤ４６Ｌｉｎ－細胞を致死性照射レシピエントに移植したものを示す。末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）におけるＧＦＰ陽性細胞のパーセントをフローサイトメトリーによって測定したものを示す。ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲのみで形質導入したＬｉｎ－細胞を移植した群、ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーのみで形質導入したＬｉｎ－細胞を移植した群、及びＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーで形質導入したＬｉｎ－細胞を移植した群が示される。各記号は個々の動物を表す。

【図５９Ｃ】ＨＤＡｄ－ＡＡＶＳ１及びＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーを用いてＡＡＶＳ１／ＣＤ４６Ｌｉｎ－細胞のエクスビボでの形質導入を行った後、このＡＡＶＳ１／ＣＤ４６Ｌｉｎ－細胞を致死性照射レシピエントに移植したものを示す。Ｌｉｎ－細胞を移植した代表的なマウスから得られたＰＢＭＣにおけるＧＦＰ＋細胞のパーセントを示す。４週目

（選択前）及び１２週目（選択後）から得られたデータが示される。
【図５９Ｄ】ＨＤＡｄ－ＡＡＶＳ１及びＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーを用いてＡＡＶＳ１／ＣＤ４６Ｌｉｎ－細胞のエクスビボでの形質導入を行った後、このＡＡＶＳ１／ＣＤ４６Ｌｉｎ－細胞を致死性照射レシピエントに移植したものを示す。系譜陽性細胞（ＣＤ３＋（Ｔ細胞）、ＣＤ１９＋（Ｂ細胞）、Ｇｒ－１＋（骨髄系細胞））及びＨＳＣ（ＬＳＫ細胞）におけるＧＦＰ＋細胞のパーセントを示す。
【図６０Ａ】エクスビボで形質導入したＬｉｎ－細胞の生着を分析したものを示す。フローサイトメトリーによって測定したＰＢＭＣ上のヒトＣＤ４６の発現に基づく移植細胞の生着を示す。各記号は個々の動物である。形質導入されたドナー細胞はＣＤ４６を発現するものであったが、レシピエントＣ５７Ｂｌ／６マウスはＣＤ４６を発現しないものであったということは注目すべきことである。
【図６０Ｂ】エクスビボで形質導入したＬｉｎ－細胞の生着を分析したものを示す。１４週目のＰＢＭＣ（血液）、脾臓、及び骨髄におけるＣＤ４６陽性細胞のパーセントを示す。
【図６０Ｃ】エクスビボで形質導入したＬｉｎ－細胞の生着を分析したものを示す。１４週目のＰＢＭＣ、脾臓、及び骨髄におけるＧＦＰ陽性細胞のパーセントを示す。
【図６０Ｄ】エクスビボで形質導入したＬｉｎ－細胞の生着を分析したものを示す。異なる形質導入状況におけるＬＳＫ細胞及び系譜陽性細胞のパーセントを示す。３つの群の間の差は有意なものではない。
【図６０Ｅ】エクスビボで形質導入したＬｉｎ－細胞の生着を分析したものを示す。ＧＦＰ＋コロニーの分析を示す。１４週目にマウスから得られた全骨髄Ｌｉｎ－細胞を播種し、１２日後にコロニーにおけるＧＦＰ発現を分析した。各記号は個々のマウスの平均ＧＦＰ＋コロニー数である（左パネル）。すべてのコロニーから得られた細胞をプールし、フローサイトメトリーによって分析した（右パネル）。
【図６１Ａ】二次レシピエントにおけるＧＦＰマーキングの分析を示す。ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーまたはＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーで形質導入を行ったＬｉｎ－細胞を移植したレスポンダーマウスに由来する骨髄細胞を移植後１４週目に収集し、系譜陽性細胞の除去処理に供してから致死性照射Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに移植した。４匹のレシピエントマウスにおけるＰＢＭＣのＧＦＰフローサイトメトリーを示す。右パネルは典型的な分析を示す。縦軸はｈＣＤ４６の染色を示し、横軸はＧＦＰの染色を示す。
【図６１Ｂ】二次レシピエントにおけるＧＦＰマーキングの分析を示す。ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーまたはＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーで形質導入を行ったＬｉｎ－細胞を移植したレスポンダーマウスに由来する骨髄細胞を移植後１４週目に収集し、系譜陽性細胞の除去処理に供してから致死性照射Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに移植した。１６週目のＰＢＭＣ、脾臓、及び骨髄におけるＧＦＰ陽性細胞のパーセントを示す。
【図６１Ｃ】二次レシピエントにおけるＧＦＰマーキングの分析を示す。ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーまたはＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーで形質導入を行ったＬｉｎ－細胞を移植したレスポンダーマウスに由来する骨髄細胞を移植後１４週目に収集し、系譜陽性細胞の除去処理に供してから致死性照射Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに移植した。移植後１６週目のレシピエントにおける系譜陽性細胞及び系譜陰性細胞のＧＦＰフロー分析を示す。
【図６１Ｄ】二次レシピエントにおけるＧＦＰマーキングの分析を示す。ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーまたはＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーで形質導入を行ったＬｉｎ－細胞を移植したレスポンダーマウスに由来する骨髄細胞を移植後１４週目に収集し、系譜陽性細胞の除去処理に供してから致死性照射Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに移植した。ＧＦＰ＋コロニーの分析を示す。１６週目にマウスから得られた全骨髄Ｌｉｎ－細胞を播種し、１２日後にコロニーにおけるＧＦＰ発現を分析した。各記号は個々のマウスの平均ＧＦＰ＋コロニー数である（左パネル）。すべてのコロニーから得られた細胞をプールし、フローサイトメトリーによって分析した（右パネル）。

【図６１Ｅ】二次レシピエントにおけるＧＦＰマーキングの分析を示す。ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーまたはＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーで形質導入を行ったＬｉｎ－細胞を移植したレスポンダーマウスに由来する骨髄細胞を移植後１４週目に収集し、系譜陽性細胞の除去処理に供してから致死性照射Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに移植した。フローサイトメトリーによって測定したＰＢＭＣ上のヒトＣＤ４６の発現に基づく移植細胞の生着を示す。

【図６１Ｆ】二次レシピエントにおけるＧＦＰマーキングの分析を示す。ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーまたはＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーで形質導入を行ったＬｉｎ－細胞を移植したレスポンダーマウスに由来する骨髄細胞を移植後１４週目に収集し、系譜陽性細胞の除去処理に供してから致死性照射Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに移植した。異なる形質導入状況における系譜陽性細胞及び系譜陰性細胞のパーセントを示す。２つの群の間の差は有意なものではない。

【図６２Ａ】ＨＤＡｄ－ＡＡＶＳ１－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーを用いるインビボでのＡＡＶＳ１／ＣＤ４６ｔｇマウスの形質導入を示す。処理レジメンを示す。ＡＡＶＳ１／ｈＣＤ４６ｔｇマウスに対して動員処理をし、ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーをＩＶ注射した（両方のウイルスの１：１混合物を２回注射した（各４×１０１０ｖｐ））。４週間後、Ｏ６ＢＧ／ＢＣＮＵ処理を開始した。各サイクルに伴って、２．５ｍｇ／ｋｇ→７．５ｍｇ／ｋｇ→１０ｍｇ／ｋｇとなるようにＢＣＮＵ濃度を増加させた。Ｏ６ＢＧ濃度は、３回すべての処理において３０ｍｇ／ｋｇとした。マウスを１２週目まで経過観察し、１２週目の時点で、分析及び二次レシピエントへのＬｉｎ－細胞移植のために動物を　　殺した。その後、二次レシピエントを１６週間経過観察した。

【図６２Ｂ】ＨＤＡｄ－ＡＡＶＳ１－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーを用いるインビボでのＡＡＶＳ１／ＣＤ４６ｔｇマウスの形質導入を示す。末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）におけるＧＦＰ陽性細胞のパーセントをフローサイトメトリーによって測定したものを示す。

【図６２Ｃ】ＨＤＡｄ－ＡＡＶＳ１－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーを用いるインビボでのＡＡＶＳ１／ＣＤ４６ｔｇマウスの形質導入を示す。１４週目のＰＢＭＣ、脾臓、及び骨髄におけるＧＦＰ陽性細胞のパーセントを示す。

【図６２Ｄ】ＨＤＡｄ－ＡＡＶＳ１－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーを用いるインビボでのＡＡＶＳ１／ＣＤ４６ｔｇマウスの形質導入を示す。系譜陽性細胞（ＣＤ３＋（Ｔ細胞）、ＣＤ１９＋（Ｂ細胞）、Ｇｒ－１＋（骨髄系細胞））及びＨＳＣ（ＬＳＫ細胞）におけるＧＦＰ＋細胞のパーセントを示す。

【図６２Ｅ】ＨＤＡｄ－ＡＡＶＳ１－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーを用いるインビボでのＡＡＶＳ１／ＣＤ４６ｔｇマウスの形質導入を示す。ＧＦＰ＋コロニーの分析を示す。１４週目にマウスから得られた全骨髄Ｌｉｎ－細胞を播種し、１２日後にコロニーにおけるＧＦＰ発現を分析した。各記号は個々のマウスの平均ＧＦＰ＋コロニー数である（左パネル）。すべてのコロニーから得られた細胞をプールし、フローサイトメトリーによって分析した（右パネル）。

【図６２Ｆ】ＨＤＡｄ－ＡＡＶＳ１－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーを用いるインビボでのＡＡＶＳ１／ＣＤ４６ｔｇマウスの形質導入を示す。１４週目の系譜陽性細胞及び系譜陰性細胞のパーセントを示す。

【図６３Ａ】図５９Ａ～５９Ｄから得られた二次レシピエントの分析を示す。１４週目にインビボ形質導入ＡＡＶＳ１／ｈＣＤ４６ｔｇマウスから得られた骨髄Ｌｉｎ－細胞を致死性照射Ｃ５７Ｂｌ／６レシピエントに移植した。６匹のレシピエントマウスにおけるＰＢＭＣのＧＦＰフローサイトメトリーを示す。

【図６３Ｂ】図５９Ａ～５９Ｄから得られた二次レシピエントの分析を示す。１４週目にインビボ形質導入ＡＡＶＳ１／ｈＣＤ４６ｔｇマウスから得られた骨髄Ｌｉｎ－細胞を致死性照射Ｃ５７Ｂｌ／６レシピエントに移植した。血液、脾臓、及び骨髄における単核細胞のＧＦＰ発現を示す。

【図６３Ｃ】図５９Ａ～５９Ｄから得られた二次レシピエントの分析を示す。１４週目にインビボ形質導入ＡＡＶＳ１／ｈＣＤ４６ｔｇマウスから得られた骨髄Ｌｉｎ－細胞を致死性照射Ｃ５７Ｂｌ／６レシピエントに移植した。移植から１６週間後のレシピエントにおける系譜陽性細胞及び系譜陰性細胞のＧＦＰフロー分析を示す。

【図６３Ｄ】図５９Ａ～５９Ｄから得られた二次レシピエントの分析を示す。１４週目にインビボ形質導入ＡＡＶＳ１／ｈＣＤ４６ｔｇマウスから得られた骨髄Ｌｉｎ－細胞を致死性照射Ｃ５７Ｂｌ／６レシピエントに移植した。フローサイトメトリーによって測定したＰＢＭＣ上のヒトＣＤ４６の発現に基づく移植細胞の生着を示す。

【図６３Ｅ】図５９Ａ～５９Ｄから得られた二次レシピエントの分析を示す。１４週目にインビボ形質導入ＡＡＶＳ１／ｈＣＤ４６ｔｇマウスから得られた骨髄Ｌｉｎ－細胞を致死性照射Ｃ５７Ｂｌ／６レシピエントに移植した。１６週目の系譜陽性細胞及び系譜陰性細胞のパーセントを示す。

【図６４Ａ】ＨＤＡｄ－ＡＡＶＳ１ベクター及びＨＤＡｄ－ドナー－γ－グロビンベクターを用いてエクスビボでＡＡＶＳ１／ＣＤ４６Ｌｉｎ－細胞の形質導入を行った後、このＡＡＶＳ１／ＣＤ４６Ｌｉｎ－細胞を致死性照射レシピエントに移植したものを示す。ドナーの構造を示す。全体構造は、ＨＤＡｄｓ－ＧＦＰ－ドナーベクター（図５５Ｄを参照のこと）のものと同じである。新たなＨＤＡｄ－グロビン－ドナーベクターでは、相同性領域は長鎖化している（１．８ｋｂと０．８ｋｂとの比較）。γ－グロビン発現カセットは、４つのＤＮＡｓｅ高感受性（ＨＳ）領域を含む４．３ｋｂバージョンのγ－グロビンＬＣＲと、γ－グロビンプロモーターとを含む（Ｌｉｓｏｗｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．１１０，４１７５－４１７８，１９９６）。３’ＵＴＲ（赤血球中でｍＲＮＡを安定化するためのもの）を含む全長γ－グロビンｃＤＮＡを使用した。ｍｇｍｔＰ１４０Ｋ遺伝子は、遍在性に活性なＥＦ１αプロモーターの制御下にある。転写の終結には双方向性ＳＶ４０ポリアデニル化シグナルを使用した。ＬＣＲ／β－プロモーターとＥＦ１αプロモーターとの間の干渉を避けるために、カセット間に１．２ｋｂのニワトリＨＳ４クロマチンインスレーター（Ｅｍｅｒｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ，９７，９１５０－９１５５，２０００）を挿入した。

【図６４Ｂ】ＨＤＡｄ－ＡＡＶＳ１ベクター及びＨＤＡｄ－ドナー－γ－グロビンベクターを用いてエクスビボでＡＡＶＳ１／ＣＤ４６Ｌｉｎ－細胞の形質導入を行った後、このＡＡＶＳ１／ＣＤ４６Ｌｉｎ－細胞を致死性照射レシピエントに移植したものを示す。処理レジメンは図５７Ａに示されるものと同じである。

【図６４Ｃ】ＨＤＡｄ－ＡＡＶＳ１ベクター及びＨＤＡｄ－ドナー－γ－グロビンベクターを用いてエクスビボでＡＡＶＳ１／ＣＤ４６Ｌｉｎ－細胞の形質導入を行った後、このＡＡＶＳ１／ＣＤ４６Ｌｉｎ－細胞を致死性照射レシピエントに移植したものを示す。末梢赤血球（ＲＢＣ）におけるヒトγ－グロビン陽性細胞のパーセントをフローサイトメトリーによって測定したものを示す。

【図６４Ｄ】ＨＤＡｄ－ＡＡＶＳ１ベクター及びＨＤＡｄ－ドナー－γ－グロビンベクターを用いてエクスビボでＡＡＶＳ１／ＣＤ４６Ｌｉｎ－細胞の形質導入を行った後、このＡＡＶＳ１／ＣＤ４６Ｌｉｎ－細胞を致死性照射レシピエントに移植したものを示す。インビボでの形質導入から１６週目の血液及び骨髄における赤血球（Ｔｅｒ１１９＋）細胞及び非赤血球（Ｔｅｒ１１９－）細胞におけるヒトγ－グロビン陽性細胞のパーセントを示す。＊ｐ＜０．０５。

【図６４Ｅ】ＨＤＡｄ－ＡＡＶＳ１ベクター及びＨＤＡｄ－ドナー－γ－グロビンベクターを用いてエクスビボでＡＡＶＳ１／ＣＤ４６Ｌｉｎ－細胞の形質導入を行った後、このＡＡＶＳ１／ＣＤ４６Ｌｉｎ－細胞を致死性照射レシピエントに移植したものを示す。インビボでの形質導入から１６週目の血液及び骨髄における赤血球（Ｔｅｒ１１９＋）細胞及び非赤血球（Ｔｅｒ１１９－）細胞におけるヒトγ－グロビン陽性細胞の平均蛍光強度を示す。＊ｐ＜０．０５。

【図６４Ｆ】ＨＤＡｄ－ＡＡＶＳ１ベクター及びＨＤＡｄ－ドナー－γ－グロビンベクターを用いてエクスビボでＡＡＶＳ１／ＣＤ４６Ｌｉｎ－細胞の形質導入を行った後、この

ＡＡＶＳ１／ＣＤ４６Ｌｉｎ－細胞を致死性照射レシピエントに移植したものを示す。ＲＢＣ中のマウスβ－メジャー鎖に対するγ－グロビン鎖のパーセントを１６週目にＨＰＬＣによって測定したものを示す。

【図６４Ｇ】ＨＤＡｄ－ＡＡＶＳ１ベクター及びＨＤＡｄ－ドナー－γ－グロビンベクターを用いてエクスビボでＡＡＶＳ１／ＣＤ４６Ｌｉｎ－細胞の形質導入を行った後、このＡＡＶＳ１／ＣＤ４６Ｌｉｎ－細胞を致死性照射レシピエントに移植したものを示す。ＲＢＣ中のマウスβ－メジャーＲＮＡに対するγ－グロビンｍＲＮＡのパーセントを１６週目にｑＲＴ－ＰＣＲによって測定したものを示す。

【図６４Ｈ】ＨＤＡｄ－ＡＡＶＳ１ベクター及びＨＤＡｄ－ドナー－γ－グロビンベクターを用いてエクスビボでＡＡＶＳ１／ＣＤ４６Ｌｉｎ－細胞の形質導入を行った後、このＡＡＶＳ１／ＣＤ４６Ｌｉｎ－細胞を致死性照射レシピエントに移植したものを示す。Ｌｉｎ－細胞から生じたコロニー中の細胞当たりのベクターコピー数を示す。各記号は１つのコロニーを表す。動物間の差は有意なものではない。

【図６５】ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲベクター及びＨＤＡｄ－グロビン－ドナーベクターで形質導入したＡＡＶＳ１／ＣＤ４６Ｌｉｎ－細胞の生着を示す。（Ａ）フローサイトメトリーによって測定したＰＢＭＣ上のヒトＣＤ４６の発現に基づく移植細胞の生着を示す。（Ｂ）１６週目の系譜陽性ＰＢＭＣ（血液）、脾臓、及び骨髄細胞、ならびに骨髄ＬＳＫ細胞におけるＣＤ４６陽性細胞のパーセントを示す。

【図６６Ａ】図６４Ａ～６４Ｈから得られた二次レシピエントの分析を示す。ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－グロビン－ドナーで形質導入したＬｉｎ－細胞を移植したマウスに由来する骨髄細胞を移植後１６週目に収集し、系譜陽性細胞の除去処理に供してから致死性照射Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに移植した。５匹のレシピエントマウスにおけるＲＢＣのγ－グロビンフローサイトメトリーを示す。

【図６６Ｂ】図６４Ａ～６４Ｈから得られた二次レシピエントの分析を示す。ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－グロビン－ドナーで形質導入したＬｉｎ－細胞を移植したマウスに由来する骨髄細胞を移植後１６週目に収集し、系譜陽性細胞の除去処理に供してから致死性照射Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに移植した。系譜陽性ＰＢＭＣにおけるＣＤ４６陽性細胞のパーセントを示す。

【図６６Ｃ】図６４Ａ～６４Ｈから得られた二次レシピエントの分析を示す。ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－グロビン－ドナーで形質導入したＬｉｎ－細胞を移植したマウスに由来する骨髄細胞を移植後１６週目に収集し、系譜陽性細胞の除去処理に供してから致死性照射Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに移植した。二次レシピエントへの移植後１６週目の骨髄組成を示す。

【図６７Ａ】ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－グロビン－ドナーを用いるインビボでのＡＡＶＳ１／ＣＤ４６ｔｇマウスの形質導入を示す。処理レジメンを示す。

【図６７Ｂ】ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－グロビン－ドナーを用いるインビボでのＡＡＶＳ１／ＣＤ４６ｔｇマウスの形質導入を示す。γ－グロビン陽性ＲＢＣのパーセントを示す。

【図６７Ｃ】ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－グロビン－ドナーを用いるインビボでのＡＡＶＳ１／ＣＤ４６ｔｇマウスの形質導入を示す。非形質導入対照マウスまたは形質導入後１６週目のマウスから得られた末梢ＲＢＣにおけるγ－グロビン発現のパーセントを示す代表的なドットプロットを示す。

【図６７Ｄ】ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－グロビン－ドナーを用いるインビボでのＡＡＶＳ１／ＣＤ４６ｔｇマウスの形質導入を示す。血液及び骨髄における赤血球（Ｔｅｒ１１９＋）細胞及び非赤血球（Ｔｅｒ１１９－）細胞中のγ－グロビンの平均蛍光強度を示す。＊ｐ＜０．０５。

【図６７Ｅ】ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－グロビン－ドナーを用いるインビボでのＡＡＶＳ１／ＣＤ４６ｔｇマウスの形質導入を示す。ＲＢＣ中のマウスβ－メジャー鎖に対するγ－グロビン鎖のパーセントを１６週目にＨＰＬＣによって測定したものを示す。＊ｐ＜０．０５。

【図６７Ｆ】ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－グロビン－ドナーを用いるインビボでのＡＡＶＳ１／ＣＤ４６ｔｇマウスの形質導入を示す。ＲＢＣ中のマウスβ－メジャーＲＮＡに対するγ－グロビンｍＲＮＡのパーセントを１６週目にｑＲＴ－ＰＣＲによって測定したものを示す。＊ｐ＜０．０５。
【図６７Ｇ】ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－グロビン－ドナーを用いるインビボでのＡＡＶＳ１／ＣＤ４６ｔｇマウスの形質導入を示す。４匹のレスポンダーマウスから得られたＬｉｎ－細胞から生じたコロニー中の細胞当たりのベクターコピー数を示す。各記号は１つのコロニーを表す。動物間の差は有意なものではない。
【図６７Ｈ】ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－グロビン－ドナーを用いるインビボでのＡＡＶＳ１／ＣＤ４６ｔｇマウスの形質導入を示す。インビボでの形質導入後１６週目の血液、脾臓、及び骨髄、ならびに骨髄中ＬＳＫ細胞における系譜陽性細胞の組成を示す。
【図６８Ａ】図６７Ａ～６７Ｈから得られた二次レシピエントの分析を示す。フローサイトメトリーによって測定したＰＢＭＣ上のヒトＣＤ４６の発現に基づく移植細胞の生着を示す。
【図６８Ｂ】図６７Ａ～６７Ｈから得られた二次レシピエントの分析を示す。ＲＢＣにおけるγ－グロビンの発現を示す。
【図６８Ｃ】図６７Ａ～６７Ｈから得られた二次レシピエントの分析を示す。二次レシピエントのＲＢＣ中のマウスβ－メジャー鎖に対するγ－グロビン鎖のパーセントを１６週目にＨＰＬＣによって測定したものを示す。
【図６８Ｄ】図６７Ａ～６７Ｈから得られた二次レシピエントの分析を示す。インビボでの形質導入後１６週目の血液、脾臓、及び骨髄における系譜陽性細胞の組成を示す。
【図６９Ａ】ＡＡＶＳ１／ＣＤ４６トランスジェニックマウスにおけるＡＡＶＳ１遺伝子座の局在及び構造を示す。１４番染色体上のミスマッチを示すＴＬＡデータを示す。ＡＡＶＳ１特異的プライマー対を使用した。右パネルは、１４番染色体の拡大セクションを示し、１８ｋｂのギャップが確認できる。このギャップは、追加されたヒトＡＡＶＳ１遺伝子座に対応する。
【図６９Ｂ】ＡＡＶＳ１／ＣＤ４６トランスジェニックマウスにおけるＡＡＶＳ１遺伝子座の局在及び構造を示す。
【図７０】ゲノム局在を示すＡＡＶＳ１遺伝子座の詳細構造を示す。影付きのＡＡＶＳ１領域はサンガーシークエンシングによって確認した。空白領域は制限酵素分析、及びＪａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙから入手したＡＡＶＳ１　ｔｇマウス遺伝的背景情報から推定した。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９切断部位はハサミによって示される。反復配列＃２～＃５は完全な８．２ｋｂのヒトＡＡＶＳ１　ＥｃｏＲＩ断片であるが、反復配列＃１及び反復配列＃５はこのＥｃｏＲＩ断片の一部のみを含む。注目すべきことに、反復配列＃５は５’ホモロジーアームを完全に欠いている。得られる結果は、ＡＡＶＳ１ｔｇマウスに存在する複数コピーＡＡＶＳ１遺伝子座のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９切断に依存する。切断位置に関する法則は下記の通りである：ａ）反復配列＃１～＃４中の１つの切断：優先的に生じる。ｂ）反復配列＃５中の１つの切断：左ホモロジーアームが不完全なことに起因して優先度は低下する。ｃ）２つ逆配向反復配列（例えば、＃１及び＃４）中の２つの切断：右ホモロジーアームが存在しないことに起因してＨＤＲ介在性の標的指向化組み込みは生じない。ｄ）同じ方向を向いている２つの反復配列（例えば、＃１及び＃２）中の２つの切断：優先的に生じる。ｅ）２つ超の切断（各側のマウスｇＤＮＡ配列の近くに位置するもののみが考えられる）：したがって、法則ｃ）または法則ｄ）が適用される。ｆ）反復配列＃１及び反復配列＃５中が切断され、中央領域が欠失する。さらに、ＨＤＲ介在性の標的指向化組み込みが反復配列＃２～＃４で生じ、ＣＲＩＳＰＲによって隣接反復配列（例えば、＃１及び＃５）が連続して切断されると、既に組み込まれた導入遺伝子が消失し得る。
【図７１Ａ】ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーを用いてエクスビボまたはインビボでＨＳＣの形質導入を行ってから１６週目に単離したゲノムＤＮＡのサザン

ブロットを行うことによってその組み込み部位を分析したものを示す。ＡＡＶＳ１特異的プローブでのハイブリダイゼーションを示す。上パネルは予想ＥｃｏＲＩ断片サイズ及びプローブの局在を示す。下パネルはエクスビボ及びインビボの形質導入状況から得られた個々のマウスの分析を示す。より大きなバンドは、標的とならなかったＡＡＶＳ１遺伝子座反復配列を表す。

【図７１Ｂ】ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーを用いてエクスビボまたはインビボでＨＳＣの形質導入を行ってから１６週目に単離したゲノムＤＮＡのサザンブロットを行うことによってその組み込み部位を分析したものを示す。ＢｌｐＩで消化したＤＮＡに対するＧＦＰ特異的プローブでのハイブリダイゼーションを示す。バンドパターンについては、他の箇所で論じられる。

【図７２Ａ】ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーを用いてエクスビボまたはインビボでＨＳＣの形質導入を行ってから１６週目に単離したゲノムＤＮＡのインバースＰＣＲ（ｉＰＣＲ）を行うことによってその組み込み部位を分析したものを示す。図は、ＮｃｏＩ部位の位置及びプライマー（片矢印：５’連結部に対するＥＦ１ａプライマー、薄灰色：３’連結部に対するｐＡプライマー）を示す。反復配列＃５への標的指向化組み込みの各側での予想増幅産物サイズが示される。

【図７２Ｂ】ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーを用いてエクスビボまたはインビボでＨＳＣの形質導入を行ってから１６週目に単離したゲノムＤＮＡのインバースＰＣＲ（ｉＰＣＲ）を行うことによってその組み込み部位を分析したものを示す。全骨髄細胞から得られたゲノムＤＮＡを使用したｉＰＣＲの結果を示す。各レーンは１匹のマウスを表す。＃００９、＃０２３、＃９４３、＃９４４、及び＃９４６はエクスビボでＨＳＣの形質導入を行った後のマウスである。＃１４７、＃３０４、及び＃４６７はインビボで形質導入した動物である。

【図７２Ｃ】ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーを用いてエクスビボまたはインビボでＨＳＣの形質導入を行ってから１６週目に単離したゲノムＤＮＡのインバースＰＣＲ（ｉＰＣＲ）を行うことによってその組み込み部位を分析したものを示す。ＧＦＰ陽性コロニーのｉＰＣＲ分析を示す。１４週目にマウスから得られた骨髄Ｌｉｎ－細胞を播種し、２０日後にＧＦＰ＋コロニーからゲノムＤＮＡを単離し、ｉＰＣＲに使用した。マウス＃９４３及びマウス＃９４６を分析した。各レーンは１つのコロニーを表す。薄灰色の矢印：標的指向化組み込み、濃灰色の矢印：オフターゲット組み込み、中間灰色の矢印：全ＨＤＡｄウイルスゲノムの組み込み。

【図７３】ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－グロビン－ドナーを用いてエクスビボまたはインビボでＨＳＣの形質導入を行ってから１６週目に単離したゲノムＤＮＡのインバースＰＣＲ（ｉＰＣＲ）を行うことによってその組み込み部位を分析したものを示す。（Ａ）図は、ＮｃｏＩ部位の位置及びプライマー（片矢印。黒色：５’連結部に対するＥＦ１ａプライマー、灰色：３’連結部に対するｐＡプライマー）を示す。反復配列＃５への標的指向化組み込みの各側での予想増幅産物サイズが示される。（Ｂ）全骨髄細胞から得られたゲノムＤＮＡを使用したｉＰＣＲの結果を示す。各レーンは１匹のマウスを表す。＃３２１、＃３２２、＃８５６、＃８５７、＃８５８、及び＃９４５は、エクスビボで形質導入したマウスである。＃５０４、＃８１６、＃８６９、及び＃８９８は、インビボで形質導入した動物である。白色の矢頭は標的指向化組み込みを示す。灰色の点線矢頭：オフターゲット組み込み、白色の完全矢印：全ＨＤＡｄウイルスゲノムの組み込み。

【図７４Ａ】インビボでのＨＳＰＣの形質導入を行うためのＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを示す。ＨＤＡｄ－ＧＦＰ／ｍｇｍｔでは、トランスポゾンは、ＨＤＡｄ－ＳＢベクターから供給される高活性Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙトランスポゼース（ＳＢ１００Ｘ）を介する組み込みのための逆方向トランスポゾン反復配列（ＩＲ）及びｆｒｔ部位と隣接する。導入遺伝子カセットは、β－グロビン３’ＵＴＲと連結されたＰＧＫ－プロモーター促進性ＧＦＰ遺伝子、ならびにＥＦ１α－プロモーター促進性ｍｇｍｔＰ１４０Ｋカセットを含む。両カセットはニワトリグロビンＨＳ４インスレーターによって分離されている。ヒト組換えＧ－ＣＳＦを皮下注射（５μｇ／マウス／日、４日）した後、最後の

Ｇ－ＣＳＦ注射から１８時間後にＡＭＤ３１００（５ｍｇ／ｋｇ）を皮下注射することによってｎｅｕ／ＣＤ４６トランスジェニックマウスにおいてＨＳＰＣを動員した。ＡＭＤ３１００の注射から１時間後にＨＤＡｄ－ＧＦＰ／ｍｇｍｔ＋ＨＤＡｄ－ＳＢ（総ウイルス粒子数８×１０１０）を静脈内注射した。ＨＤＡｄの注射後に炎症促進性サイトカインが放出されることを阻止するため、ウイルス注射の１６時間前及び２時間前にデキサメタゾン（１０ｍｇ／ｋｇ）を動物に腹腔内投与した。６週間後、Ｏ６ＢＧ／ＢＣＮＵ（腹腔内）を３回（３０ｍｇ／ｋｇのＯ６ＢＧ＋５ｍｇ／ｋｇ、７．５ｍｇ／ｋｇ、及び１０ｍｇ／ｋｇのＢＣＮＵ）を適用して末梢血循環への形質導入ＨＳＰＣの遊離を活性化した。インビボでの形質導入から１７週間後、１×１０$^{6}$個のＭＭＣ細胞を乳腺脂肪体に移植した。５週間後、腫瘍及び他の組織を収集し、ＧＦＰ発現について分析した。

【図７４Ｂ】左パネル：インビボでの形質導入後の異なる時点でのＰＢＭＣにおけるＧＦＰ発現のパーセント。各記号は個々の動物を表す。右パネル：骨髄、脾臓、血液、及びコラゲナーゼ／ディスパーゼで消化した腫瘍に存在する汎白血球マーカーＣＤ４５染色細胞におけるＧＦＰ＋細胞のパーセント。

【図７４Ｃ】ＧＦＰに対する抗体及びラミニン（細胞外マトリックスタンパク質）に対する抗体で染色した腫瘍切片を示す。スケールバーは、５０μｍである。

【図７４Ｄ】血中のＧＦＰ＋ＰＢＭＣ及び腫瘍中のＧＦＰ＋細胞の免疫表現型決定を示す。

【図７５】ＭＭＣ細胞におけるラットＮｅｕの発現を示す。Ｎｅｕ特異的モノクローナル抗体７．１６．４、その後に抗マウスＩｇ－ＦＩＴＣを用いて細胞を染色した。培養したＭＭＣ細胞の代表的な共焦点顕微鏡画像が示される。Ｎｅｗ特異的シグナルは色相が白色化して見える。スケールバーは２０μｍである。

【図７６－１】免疫表現型決定のためのゲート方針を示す。

【図７６－２】免疫表現型決定のためのゲート方針を示す。

【図７７】骨髄及び脾臓（ＭＭＣモデル）中のＧＦＰ＋細胞の免疫表現型決定を示す。詳細については図７４Ｄを参照のこと。

【図７８Ａ】インビボでのＨＳＰＣの形質導入後の腫瘍浸潤性白血球におけるＧＦＰ発現を示す（ＴＣ－１モデル）。実験の模式図を示す。ヒト組換えＧ－ＣＳＦを皮下注射（５ｍｇ／マウス／日、４日）した後、最後のＧ－ＣＳＦ注射から１８時間後にＡＭＤ３１００（５ｍｇ／ｋｇ）を皮下注射することによってＣＤ４６ｔｇトランスジェニックマウスにおいてＨＳＰＣを動員した。ＡＭＤ３１００の注射から１時間後にＨＤＡｄ－ＧＦＰ／ｍｇｍｔ＋ＨＤＡｄ－ＳＢ（総ウイルス粒子数８×１０１０）を静脈内注射した。ＨＤＡｄの注射後に炎症促進性サイトカインが放出されることを阻止するため、ウイルス注射の１６時間前及び２時間前にデキサメタゾン（１０ｍｇ／ｋｇ）を動物に腹腔内投与した。６週間後、Ｏ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵ（腹腔内）を３回（３０ｍｇ／ｋｇのＯ６ＢＧ＋５ｍｇ／ｋｇ、７．５ｍｇ／ｋｇ、及び１０ｍｇ／ｋｇのＢＣＮＵ）を適用して末梢血循環への形質導入ＨＳＰＣの遊離を活性化した。インビボでの形質導入から１７週間後、５×１０$^{4}$個のＴＣ－１細胞を乳腺脂肪体に移植した。５週間後、腫瘍及び他の組織を収集し、ＧＦＰ発現について分析した。

【図７８Ｂ】インビボでのＨＳＰＣの形質導入後の腫瘍浸潤性白血球におけるＧＦＰ発現を示す（ＴＣ－１モデル）。インビボでの形質導入後の異なる時点でのＰＢＭＣにおけるＧＦＰ発現のパーセントを示す。各記号は個々の動物を表す。

【図７８Ｃ】インビボでのＨＳＰＣの形質導入後の腫瘍浸潤性白血球におけるＧＦＰ発現を示す（ＴＣ－１モデル）。骨髄、脾臓、血液、及びコラゲナーゼ／ディスパーゼで消化した腫瘍に存在する汎白血球マーカーＣＤ４５染色細胞におけるＧＦＰ$^{+}$細胞のパーセントを示す。

【図７８Ｄ】インビボでのＨＳＰＣの形質導入後の腫瘍浸潤性白血球におけるＧＦＰ発現を示す（ＴＣ－１モデル）。全（悪性＋腫瘍浸潤性）細胞におけるＧＦＰ＋細胞、及びＧＦＰ$^{+}$陽性白血球の代表的なフローサイトメトリーデータを示す。

【図７８Ｅ】インビボでのＨＳＰＣの形質導入後の腫瘍浸潤性白血球におけるＧＦＰ発現

を示す（ＴＣ－１モデル）。代表的な腫瘍切片を示す。左パネル：ＧＦＰ蛍光。右パネル：ＧＦＰに対する抗体での染色（白色）及び細胞外マトリックスタンパク質ラミニンに対する抗体での染色（灰色）。スケールバーは５０ｍｍである。

【図７８Ｆ】インビボでのＨＳＰＣの形質導入後の腫瘍浸潤性白血球におけるＧＦＰ発現を示す（ＴＣ－１モデル）。腫瘍及び血中ＰＢＭＣにおけるＧＦＰ＋細胞の免疫表現型決定を示す。ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓから入手したリンパ球フローサイトメトリーパネル８ｃ（ＣＤ４５、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ２５、ＣＤ１９）及び骨髄系パネル９ｃ（ＣＤ４５、ＣＤ１１ｃ、Ｆ４／８０、ＭＨＣＩＩ、ＳｉｇｌｅｃＦ－ＰｅｃＣＰ、Ｌｙ６Ｃ、ＣＤ１１ｂ、Ｌｙ６Ｇ）を使用した。

【図７９Ａ】腫瘍浸潤性白血球以外の細胞においては抑制を生じさせるためのｍｉＲＮＡの選択を示す。導入遺伝子発現の組織特異性をｍｉＲＮＡに基づいて制御することを示す。ｍｉＲＮＡは、標的配列と塩基対を形成することによってガイド分子として機能するものであり、こうした標的配列は、ｍｉＲＮＡ標的部位（ｍｉＲ－Ｔ）と称され、典型的には、天然のｍＲＮＡの３’非翻訳領域（３’ＵＴＲ）に存在する。この相互作用によってエフェクター複合体が動員されることで、ｍＲＮＡの切断または翻訳抑制が媒介される。所与の細胞型において高レベルで発現するｍｉＲＮＡに対するｍｉＲ－Ｔを導入遺伝子のｍＲＮＡが含む場合、この細胞型では導入遺伝子発現が阻止されることになる。対照的に、この特定のｍｉＲＮＡを発現しない細胞型では、この導入遺伝子は発現することになる（Ｂｒｏｗｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｍｅｄ．２００６；１２：５８５－５９１）。

【図７９Ｂ】腫瘍浸潤性白血球以外の細胞においては抑制を生じさせるためのｍｉＲＮＡの選択を示す。５匹のマウス（ｎｅｕ／ＣＤ４６ｔｇ－ＭＭＣモデル、腫瘍接種後１７日目）からプールしたＲＮＡに対してマイクロＲＮＡ－Ｓｅｑを実施した。脾臓、骨髄、及び血液の低分子ＲＮＡシークエンシングによって同定した正規化マイクロＲＮＡリード数（マッピングされたマイクロＲＮＡ　１００万リード当たりのリード数＋１）を１３個のＧＦＰ$^{+}$腫瘍試料のものと比較したものが示される。腫瘍に存在しないマイクロＲＮＡ（ｍｉＲ－４２３を含む）は、擬似数１が加えられて散布図の左に並ぶ。ブロット中にはｍｉＲ－４２３－５ｐが示される。

【図７９Ｃ】腫瘍浸潤性白血球以外の細胞においては抑制を生じさせるためのｍｉＲＮＡの選択を示す。５匹のマウス（ＣＤ４６ｔｇ／ＴＣ－１モデル、１７日目）からプールしたＲＮＡに対してマイクロＲＮＡ－Ｓｅｑを実施した。腫瘍中レベル（１とした）と比較した場合の相対発現レベル上位１０のｍｉＲＮＡが示される。

【図８０Ａ】ＨＳＰＣに対するｍｉＲ－４２３－５ｐ標的部位の過剰発現の影響を示す。ベクター構造を示す。ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ｍｉＲ－４２３は、ＧＦＰ遺伝子に連結された３’ＵＴＲ中にｍｉＲ－４２３－５ｐ標的部位を４つ含む。

【図８０Ｂ】ＨＳＰＣに対するｍｉＲ－４２３－５ｐ標的部位の過剰発現の影響を示す。ＨＤＡｄ－ＧＦＰまたはＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ｍｉＲ４２３のいずれかを、それぞれ５００ｖｐ／細胞または３０００ｖｐ／細胞のＭＯＩでマウスＨＳＰＣ（Ｍ）（ＣＤ４６トランスジェニックマウスの骨髄から得られたＬｉｎ－細胞）及びヒトＨＳＰＣ（Ｈｕ）（ＣＤ３４$^{+}$細胞）に感染させた。３日後、細胞溶解物のＣＤＫＮ１Ａをウエスタンブロットによって分析した。ブロットを抗β－アクチン抗体で再探索してロード差異を調整した。右パネルは、ｂ－アクチンシグナルで正規化したＣＤＫＮ１Ａシグナルを定量化したものを示す。対応するマウスＨＤＡｄ－ＧＦＰ／ｍｇｍｔ試料及びヒトＨＤＡｄ－ＧＦＰ／ｍｇｍｔ試料から得られたシグナルを１００％とした。

【図８０Ｃ】ＨＳＰＣに対するｍｉＲ－４２３－５ｐ標的部位の過剰発現の影響を示す。前駆細胞のコロニー形成に対する影響を示す。ＨＤＡｄ感染から１日後、コロニーアッセイのためにマウスＬｉｎ$^{-}$細胞（２．５×１０$^{3}$個細胞／３５ｍｍディッシュ）またはヒトＣＤ３４$^{+}$細胞（３×１０$^{3}$個細胞／ディッシュ）を播種した。１２日後にコロニーの数を数えた。Ｎ＝３。＊ｐ＜０．０５。統計的有意性は、両側スチューデントｔ検定（Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ　Ｅｘｃｅｌ）によって計算した（以前の研究（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｃｌｉｎ　Ｄｅｖ．２０１８；９：３９０－４０１

、Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｃｌｉｎ　Ｄｅｖ．９：１４２－１５２，２０１８）と一致して、ＭＯＩを比較的高くしてＨＳＰＣの感染を行うとＨＳＰＣのコロニー形成能力がわずかに低下した）。

【図８１】ノーザンブロットによるｍｉＲ－４２３－５ｐ発現の検証を示す。骨髄系譜陰性細胞、脾臓、全血液細胞、及びＭＭＣ－／ＴＣ－１－腫瘍浸潤性白血球から得られた全ＲＮＡ（２μｇ）を１５％の変性ポリアクリルアミドゲルにおいて分離し、ブロットを、ｍｕＲＮＡ－４２３－５ｐに特異的なプローブでのハイブリダイゼーションに供した後、Ｕ６　ＲＮＡ（ロード対照）に対するプローブでのハイブリダイゼーションに供した。Ｍｉｒ－４２３は、長さ７０ｂｐの前駆体を有し、その成熟ｍｉＲＮＡの長さは２３ｂｐである。ｍｉＲ－４２３－５ｐ特異的シグナルは、血液、骨髄、及び脾臓については確認できるが、両方の腫瘍モデルの腫瘍浸潤性細胞には存在しない。

【図８２Ａ】ヒトにおけるｍｉＲＮＡ４２３－５ｐの発現を示す。Ｌｕｄｗｉｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２０１６；４４：３８６５－３８７７にて公開されたｍｉＲ－４２３－５ｐのレベルを示す。ｙ軸ラベルは、左から右の順に、脂肪細胞、動脈、結腸、硬膜、腎臓、肝臓、肺、筋肉、心筋、皮膚、脾臓、胃、精巣、甲状腺、小腸十二指腸、小腸空腸、膵臓、副腎、腎皮質、腎髄質、食道、前立腺、骨髄、静脈、リンパ節、胸膜、脳下垂体腺、脊髄、脳視床、脳白質、脳尾状核、脳灰白質、大脳皮質側頭葉、大脳皮質前頭葉、大脳皮質後頭葉、及び小脳を含む。

【図８２Ｂ】ヒトにおけるｍｉＲＮＡ４２３－５ｐの発現を示す。２人の卵巣癌患者（プールしたもの）から得られたｍｉＲＮＡ－Ｓｅｑデータのプロットを示す。高異型度漿液性卵巣の生検検体からＣＤ４５＋細胞を単離した。腫瘍浸潤性白血球及び比較ＰＢＭＣからＲＮＡを単離し、ＬＣＳｃｉｅｎｃｅｓ、ＬＬＣによるｍｉＲＮＡ－Ｓｅｑに供した。ｍｉＲＮＡ－４２３－５ｐが示される。

【図８３Ａ】ｎｅｕ／ＭＭＣモデルにおけるインビボでのＨＳＰＣ　αＰＤ－Ｌ１－γ１免疫チェックポイント阻害剤治療を示す。ＭＭＣ腫瘍細胞におけるＰＤＬ１発現（白色）を示す。スケールバーは２０μｍである。

【図８３Ｂ】ｎｅｕ／ＭＭＣモデルにおけるインビボでのＨＳＰＣ　αＰＤ－Ｌ１－γ１免疫チェックポイント阻害剤治療を示す。治療ベクターの全体構造は、図７４Ａに示されるものと同じである。このベクターは、５’末端に位置するＨＡタグ及び分泌シグナル（ＬＳ）と、３’末端に位置するヒトＩｇＧ１のヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３ドメイン、及びｍｙｃタグと、に連結されたｓｃＦｖ抗マウスＰＤ－Ｌ１の発現カセットを含む。ｍｉＲ４２３－５ｐによる制御によって腫瘍浸潤性細胞にαＰＤ－Ｌ１－γ１発現を限定するためにｍｉＲ４２３－５ｐ標的部位を３’ＵＴＲに挿入した。ベクターは、$mgtm^{P140K}$の発現カセットも含む。

【図８３Ｃ】ｎｅｕ／ＭＭＣモデルにおけるインビボでのＨＳＰＣ　αＰＤ－Ｌ１－γ１免疫チェックポイント阻害剤治療を示す。ＨＤＡｄ－ＧＦＰ／ｍｇｍｔをインビボで形質導入したＨＳＰＣを有するマウス、及びＨＤＡｄ－αＰＤ－Ｌ１－γ１をインビボで形質導入したＨＳＰＣを有するマウスにＭＭＣ細胞を接種（０日目）した後の腫瘍体積を示す。ＨＤＡｄ－αＰＤ－Ｌ１－γ１群のマウスには、１回目の腫瘍細胞注射から８０日目に$１\times１０^{5}$個のＭＭＣ細胞を皮下注射によって再負荷した。各曲線は個々の動物である。

【図８３Ｄ】ｎｅｕ／ＭＭＣモデルにおけるインビボでのＨＳＰＣ　αＰＤ－Ｌ１－γ１免疫チェックポイント阻害剤治療を示す。フローサイトメトリーによるＴ細胞応答の分析を示す。ナイーブｎｅｕトランスジェニックマウス及びＨＤＡｄ－αＰＤ－Ｌ１－γ１処理マウス（１００日目）から得られた脾細胞を、ＣＤ４及びＣＤ８、ならびに細胞内ＩＦＮγまたはＮｅｕ四量体の染色についてフローサイトメトリーによって分析した。Ｎ＝３。＊ｐ＜０．０５。

【図８３Ｅ】ｎｅｕ／ＭＭＣモデルにおけるインビボでのＨＳＰＣ　αＰＤ－Ｌ１－γ１免疫チェックポイント阻害剤治療を示す。Ｎｅｕ＋細胞及びＮｅｕ細胞で刺激した場合のＩＦＮγ応答を示す。ナイーブｎｅｕトランスジェニックマウス及びＨＤＡｄ－αＰＤＬ１－γ１処理マウス（１００日目）から得られた脾細胞を、停止ＭＭＣ細胞（Ｎｅｕ＋）

もしくはｎｅｕトランスジェニックマウスから得られた脾細胞（Ｎｅｕ－）に曝露するか、またはＰＭＡ／イオノマイシンで処理した（「ｎｏＡｇ」）。培養上清中のＩＦＮγ濃度が示される。Ｎ＝３。＊ｐ＜０．００５。

【図８４Ａ】αＰＤ－Ｌ１－γ１発現のキネティクスを示す。抗ＨＡタグ抗体を用いるαＰＤ－Ｌ１－γ１ウエスタンブロットを示す。３匹の動物を１７日目に　殺し、ウエスタンブロットによってαＰＤ－Ｌ１－γ１発現について組織を分析した。αＰＤ－Ｌ１－γ１タンパク質は完全には還元されず、その結果、２つのｓｃＦｖ鎖を有する完全なαＰＤ－Ｌ１－γ１（１３０ｋＤａ）の残留物が生じた（αＰＤ－Ｌ１－γ１の構造については右パネルを参照のこと）。β－アクチンを染色したものをロード対照として使用した。代表的な試料が示される。ウエスタンブロットシグナルを定量化したものも示される。Ｎ＝５マウス。

【図８４Ｂ】αＰＤ－Ｌ１－γ１発現のキネティクスを示す。腫瘍浸潤性白血球、ＰＢＭＣ、骨髄細胞、及び脾細胞におけるαＰＤ－Ｌ１－γ１　ｍＲＮＡの発現を示す。マウスＰＰＩＡ　ｍＲＮＡを内部対照として使用した。結果は２（－ΔΔＣｔ）法に従って計算し、対応腫瘍試料のｃＤＮＡレベルを１００％として、相対発現パーセントとして示される。

【図８４Ｃ】αＰＤ－Ｌ１－γ１発現のキネティクスを示す。血清中に分泌されたαＰＤ－Ｌ１－γ１のレベルをＥＬＩＳＡによって測定したものを示す。このＥＬＩＳＡでは、捕捉用に組換えマウスＰＤ－Ｌ１、検出用に抗ＨＡ抗体－ＨＲＰ結合体を使用した。各記号は個々の動物を表す。＊ｐ＜０．０５。統計的有意性は、両側スチューデントｔ検定（Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ　Ｅｘｃｅｌ）によって計算した。

【図８５Ａ】ＩＤ８－ｐ５３$^{-/-}$ｂｒｃａ２$^{-/-}$卵巣癌モデルにおける免疫予防試験を示す。ＩＤ８－ｐ５３$^{-/-}$ｂｒｃａ２$^{-/-}$腫瘍の分析を示す。ＩＤ８－ｐ５３$^{-/-}$ｂｒｃａ２$^{-/-}$細胞（総細胞数２×１０$^{6}$）をＣＤ４６トランスジェニックマウスに腹腔内注射した。６～８週間後に腹水症／悪液質が生じた。次に、腫瘍を取り出し、フローサイトメトリーを行うためにディスパーゼ／コラゲナーゼで消化した。ノーザンブロット分析を行うために腫瘍関連マクロファージ（ＴＡＭ）、好中球（ＴＡＮ）、及びＴ細胞（ＴＩＬ）を対象として細胞画分を選別した（図７６を参照のこと）。

【図８５Ｂ】ＩＤ８－ｐ５３$^{-/-}$ｂｒｃａ２$^{-/-}$卵巣癌モデルにおける免疫予防試験を示す。腫瘍関連白血球の免疫表現型決定を示す。

【図８５Ｃ】ＩＤ８－ｐ５３$^{-/-}$ｂｒｃａ２$^{-/-}$卵巣癌モデルにおける免疫予防試験を示す。ｍｉＲ－４２３－５ｐに対するノーザンブロットを示す。レーン当たり総量１μｇのＲＮＡをロードした。上パネルは、$^{32}$Ｐ標識ｍｉＲ－４２３－５ｐプローブで探索した後のシグナルを示す。このブロットをプローブ除去処理に供し、Ｕ６　ＲＮＡ特異的プローブで再探索した（下パネル）。右レーンには、Ａｍｂｉｏｎから入手した$^{32}$Ｐ標識Ｄｅｃａｄｅマーカーを泳動させた。

【図８５Ｄ】ＩＤ８－ｐ５３$^{-/-}$ｂｒｃａ２$^{-/-}$卵巣癌モデルにおける免疫予防試験を示す。実験スキームを示す。ＣＤ４６トランスジェニックマウスに対して動員処理を行い、ＨＤＡｄ－αＰＤＬ１γ１ｍｉＲ４２３＋ＨＤＡｄ－ＳＢ、ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ｍｉＲ４２３＋ＨＤＡｄ－ＳＢ、またはモックを注射した。Ｏ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵを用いてインビボでの選択を４回行った。最後のＯ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵ処理から２週間後にＩＤ８－ｐ５３$^{-/-}$ｂｒｃａ２$^{-/-}$細胞を腹腔内注射した。腫瘍細胞の注射から２週間後、６週間後、及び１１週間後に血清中のαＰＤＬ１γ１レベルを分析した。腹水症または病的状態／悪液質の発症をエンドポイントとした。

【図８５Ｅ】ＩＤ８－ｐ５３$^{-/-}$ｂｒｃａ２$^{-/-}$卵巣癌モデルにおける免疫予防試験を示す。カプラン・マイヤー生存プロットを示す。Ｎ＝７。

【図８５Ｆ】ＩＤ８－ｐ５３$^{-/-}$ｂｒｃａ２$^{-/-}$卵巣癌モデルにおける免疫予防試験を示す。ＥＬＩＳＡによって血清中αＰＤＬ１γ１レベルを測定したものを示す。各記号は個々の動物である。＊ｐ＜０．０５。統計的有意性は、両側スチューデントｔ検定（Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ　Ｅｘｃｅｌ）によって計算した。

【図８６Ａ】ＩＤ８－ｐ５３$^{-/-}$ｂｒｃａ２$^{-/-}$卵巣癌モデルにおける免疫療法試験を示す。がん再発を阻止するための臨床状況を示す。インビボでのＨＳＣの形質導入は、腫瘍の大部分を手術で除去した後に開始されることになり、手術が選択肢とならない場合は化学療法と一緒に開始されることになる。$O^6$ＢＧ／ＢＣＮＵによるインビボでの選択は化学療法と併用され得る。インビボでのＨＳＰＣの形質導入／選択の結果として、武装ＨＳＰＣは、がんが再発するまでは休止状態となり、がんが再発するとそれが引き金となってＨＳＰＣが分化し、エフェクター遺伝子発現が活性化する。

【図８６Ｂ】ＩＤ８－ｐ５３$^{-/-}$ｂｒｃａ２$^{-/-}$卵巣癌モデルにおける免疫療法試験を示す。実験スキームを示す。１×１０$^6$個のＩＤ８－ｐ５３$^{-/-}$ｂｒｃａ２$^{-/-}$腫瘍細胞をＣＤ４６トランスジェニックマウスに腹腔内注射した。腫瘍が確立した時点でインビボでのＨＳＰＣの形質導入及び選択を実施した。血清中αＰＤＬ１γ１レベルに基づいてｍｉＲ－４２３ベースの発現系の活性化を監視した。

【図８６Ｃ】ＩＤ８－ｐ５３$^{-/-}$ｂｒｃａ２$^{-/-}$卵巣癌モデルにおける免疫療法試験を示す。カプラン・マイヤー生存プロットを示す。対照状況では、ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ｍｉＲ４２３を注射した。Ｎ＝９。

【図８６Ｄ】ＩＤ８－ｐ５３$^{-/-}$ｂｒｃａ２$^{-/-}$卵巣癌モデルにおける免疫療法試験を示す。ＥＬＩＳＡによって血清中αＰＤＬ１γ１レベルを測定したものを示す。各記号は個々の動物である。＊ｐ＜０．０５。統計的有意性は、両側スチューデントｔ検定（Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ　Ｅｘｃｅｌ）によって計算した。

【図８７】αＰＤ－Ｌ１－γ１がピークを迎えた１７日目（腫瘍増殖からの逆転前）に殺した動物における自己免疫反応を示す。（Ａ）処理動物（右パネル）では、処理前の動物（左パネル）と比較して毛の変色が生じていることを示す。（Ｂ）処理動物から得られた臓器の組織学的分析を示す。切片をＨ＆Ｅ染色した。代表的な領域が示される。スケールバーは２０ｍｍである。単核細胞の浸潤に留意されたい。

【図８８Ａ】ＭＭＣ腫瘍を有するｎｅｕトランスジェニックマウスにおける抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体治療の効果、及び造血に対するインビボでのＨＳＣの形質導入の影響を示す。腫瘍の体積が１００ｍｍ$^3$に達した時点で、抗マウスＰＤ１－Ｌ１モノクローナル抗体ｍｕＤＸ４００＊またはアイソタイプ対照抗体をマウスに腹腔内注射した（５ｍｇ／ｋｇで腹腔内注射）（４日ごとに計４回実施）。個々のマウスにおける腫瘍体積が示される。

【図８８Ｂ】ＭＭＣ腫瘍を有するｎｅｕトランスジェニックマウスにおける抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体治療の効果、及び造血に対するインビボでのＨＳＣの形質導入の影響を示す。腫瘍の体積が１００ｍｍ$^3$に達した時点で、抗マウスＰＤ１－Ｌ１モノクローナル抗体ｍｕＤＸ４００＊またはアイソタイプ対照抗体をマウスに腹腔内注射した（５ｍｇ／ｋｇで腹腔内注射）（４日ごとに計４回実施）。カプラン・マイヤー生存プロットを示し、抗ＰＤ－Ｌ１を用いると生存期間が長期化することが示される。腫瘍体積が１０００ｍｍ$^3$となる時点をエンドポイントとした。２つの群の間の差は有意なものではない。

【図８８Ｃ】ＭＭＣ腫瘍を有するｎｅｕトランスジェニックマウスにおける抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体治療の効果、及び造血に対するインビボでのＨＳＣの形質導入の影響を示す。腫瘍の体積が１００ｍｍ$^3$に達した時点で、抗マウスＰＤ１－Ｌ１モノクローナル抗体ｍｕＤＸ４００＊またはアイソタイプ対照抗体をマウスに腹腔内注射した（５ｍｇ／ｋｇで腹腔内注射）（４日ごとに計４回実施）。インビボでのＨＳＣＰＣの形質導入後２週目の時点の図８５Ｄに示されるｈＣＤ４６トランスジェニックマウス血液細胞数を示す。

【図８８Ｄ】ＭＭＣ腫瘍を有するｎｅｕトランスジェニックマウスにおける抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体治療の効果、及び造血に対するインビボでのＨＳＣの形質導入の影響を示す。腫瘍の体積が１００ｍｍ$^3$に達した時点で、抗マウスＰＤ１－Ｌ１モノクローナル抗体ｍｕＤＸ４００＊またはアイソタイプ対照抗体をマウスに腹腔内注射した（５ｍｇ／ｋｇで腹腔内注射）（４日ごとに計４回実施）。血液学的パラメーターを示す。ＲＢＣ：赤血球、Ｈｂ：ヘモグロビン、ＭＣＶ：平均赤血球容積、ＭＣＨ：平均赤血球ヘモグロ

ビン量、ＭＣＨＣ：平均赤血球ヘモグロビン濃度、ＲＤＷ：赤血球分布幅。統計解析は、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。３つの群の間の差は有意なものではなかった。

【図８８Ｅ－１】ＭＭＣ腫瘍を有するｎｅｕトランスジェニックマウスにおける抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体治療の効果、及び造血に対するインビボでのＨＳＣの形質導入の影響を示す。腫瘍の体積が１００ｍｍ$^3$に達した時点で、抗マウスＰＤ１－Ｌ１モノクローナル抗体ｍｕＤＸ４００＊またはアイソタイプ対照抗体をマウスに腹腔内注射した（５ｍｇ／ｋｇで腹腔内注射）（４日ごとに計４回実施）。ＧＦＰ＋細胞画分のｎｉＲＮＡ－Ｓｅｑを示す。

【図８８Ｅ－２】ＭＭＣ腫瘍を有するｎｅｕトランスジェニックマウスにおける抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体治療の効果、及び造血に対するインビボでのＨＳＣの形質導入の影響を示す。腫瘍の体積が１００ｍｍ$^3$に達した時点で、抗マウスＰＤ１－Ｌ１モノクローナル抗体ｍｕＤＸ４００＊またはアイソタイプ対照抗体をマウスに腹腔内注射した（５ｍｇ／ｋｇで腹腔内注射）（４日ごとに計４回実施）。ＧＦＰ＋細胞画分のｎｉＲＮＡ－Ｓｅｑを示す。

【図８８Ｆ－１】ＭＭＣ腫瘍を有するｎｅｕトランスジェニックマウスにおける抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体治療の効果、及び造血に対するインビボでのＨＳＣの形質導入の影響を示す。腫瘍の体積が１００ｍｍ$^3$に達した時点で、抗マウスＰＤ１－Ｌ１モノクローナル抗体ｍｕＤＸ４００＊またはアイソタイプ対照抗体をマウスに腹腔内注射した（５ｍｇ／ｋｇで腹腔内注射）（４日ごとに計４回実施）。ウエスタンブロット、ｑＲＴ－ＰＣＲ、及び血清ＥＬＩＳＡによるαＰＤＬ１発現のキネティクスを示す。

【図８８Ｆ－２】ＭＭＣ腫瘍を有するｎｅｕトランスジェニックマウスにおける抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体治療の効果、及び造血に対するインビボでのＨＳＣの形質導入の影響を示す。腫瘍の体積が１００ｍｍ$^3$に達した時点で、抗マウスＰＤ１－Ｌ１モノクローナル抗体ｍｕＤＸ４００＊またはアイソタイプ対照抗体をマウスに腹腔内注射した（５ｍｇ／ｋｇで腹腔内注射）（４日ごとに計４回実施）。ウエスタンブロット、ｑＲＴ－ＰＣＲ、及び血清ＥＬＩＳＡによるαＰＤＬ１発現のキネティクスを示す。

【図８８Ｇ－１】ＭＭＣ腫瘍を有するｎｅｕトランスジェニックマウスにおける抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体治療の効果、及び造血に対するインビボでのＨＳＣの形質導入の影響を示す。腫瘍の体積が１００ｍｍ$^3$に達した時点で、抗マウスＰＤ１－Ｌ１モノクローナル抗体ｍｕＤＸ４００＊またはアイソタイプ対照抗体をマウスに腹腔内注射した（５ｍｇ／ｋｇで腹腔内注射）（４日ごとに計４回実施）。ｍｉＲＮＡ制御性の遺伝子発現を示す。

【図８８Ｇ－２】ＭＭＣ腫瘍を有するｎｅｕトランスジェニックマウスにおける抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体治療の効果、及び造血に対するインビボでのＨＳＣの形質導入の影響を示す。腫瘍の体積が１００ｍｍ$^3$に達した時点で、抗マウスＰＤ１－Ｌ１モノクローナル抗体ｍｕＤＸ４００＊またはアイソタイプ対照抗体をマウスに腹腔内注射した（５ｍｇ／ｋｇで腹腔内注射）（４日ごとに計４回実施）。ｍｉＲＮＡ制御性の遺伝子発現を示す。

【図８８Ｈ－１】ＭＭＣ腫瘍を有するｎｅｕトランスジェニックマウスにおける抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体治療の効果、及び造血に対するインビボでのＨＳＣの形質導入の影響を示す。腫瘍の体積が１００ｍｍ$^3$に達した時点で、抗マウスＰＤ１－Ｌ１モノクローナル抗体ｍｕＤＸ４００＊またはアイソタイプ対照抗体をマウスに腹腔内注射した（５ｍｇ／ｋｇで腹腔内注射）（４日ごとに計４回実施）。開示の免疫予防及びがん再発阻止をまとめた模式図を示す。

【図８８Ｈ－２】ＭＭＣ腫瘍を有するｎｅｕトランスジェニックマウスにおける抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体治療の効果、及び造血に対するインビボでのＨＳＣの形質導入の影響を示す。腫瘍の体積が１００ｍｍ$^3$に達した時点で、抗マウスＰＤ１－Ｌ１モノクローナル抗体ｍｕＤＸ４００＊またはアイソタイプ対照抗体をマウスに腹腔内注射した（５ｍｇ／ｋｇで腹腔内注射）（４日ごとに計４回実施）。開示の免疫予防及びがん再発阻止をまとめた模式図を示す。

【図８８Ｈ－３】ＭＭＣ腫瘍を有するｎｅｕトランスジェニックマウスにおける抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体治療の効果、及び造血に対するインビボでのＨＳＣの形質導入の影響を示す。腫瘍の体積が１００ｍｍ$^3$に達した時点で、抗マウスＰＤ１－Ｌ１モノクローナル抗体ｍｕＤＸ４００＊またはアイソタイプ対照抗体をマウスに腹腔内注射した（５ｍｇ／ｋｇで腹腔内注射）（４日ごとに計４回実施）。開示の免疫予防及びがん再発阻止をまとめた模式図を示す。
【図８９Ａ】赤血球からのＧＦＰの発現と関連するデータを示す。
【図８９Ｂ】赤血球からのＧＦＰの発現と関連するデータを示す。
【図８９Ｃ】赤血球からのＧＦＰの発現と関連するデータを示す。
【図８９Ｄ】赤血球からのＧＦＰの発現と関連するデータを示す。
【図８９Ｅ】赤血球からのＧＦＰの発現と関連するデータを示す。
【図８９Ｆ】赤血球からのＧＦＰの発現と関連するデータを示す。
【図８９Ｇ】赤血球からのＧＦＰの発現と関連するデータを示す。
【図８９Ｈ】赤血球からのＧＦＰの発現と関連するデータを示す。
【図９０Ａ】赤血球からのヒト第ＶＩＩＩ因子の発現と関連するデータを示す。
【図９０Ｂ】赤血球からのヒト第ＶＩＩＩ因子の発現と関連するデータを示す。
【図９０Ｃ】赤血球からのヒト第ＶＩＩＩ因子の発現と関連するデータを示す。
【図９０Ｄ】赤血球からのヒト第ＶＩＩＩ因子の発現と関連するデータを示す。
【図９０Ｅ】赤血球からのヒト第ＶＩＩＩ因子の発現と関連するデータを示す。
【図９０Ｆ】赤血球からのヒト第ＶＩＩＩ因子の発現と関連するデータを示す。
【図９０Ｇ】赤血球からのヒト第ＶＩＩＩ因子の発現と関連するデータを示す。
【図９０Ｈ－１】赤血球からのヒト第ＶＩＩＩ因子の発現と関連するデータを示す。
【図９０Ｈ－２】赤血球からのヒト第ＶＩＩＩ因子の発現と関連するデータを示す。
【図９０Ｉ】赤血球からのヒト第ＶＩＩＩ因子の発現と関連するデータを示す。
【図９１Ａ】血液学的な異常が観測されないことを示す。
【図９１Ｂ】血液学的な異常が観測されないことを示す。
【図９１Ｃ】血液学的な異常が観測されないことを示す。
【図９１Ｄ】血液学的な異常が観測されないことを示す。
【図９２Ａ】阻害抗体が生じても血友病Ａの表現型が修正されることを示す。
【図９２Ｂ】阻害抗体が生じても血友病Ａの表現型が修正されることを示す。
【図９２Ｃ】阻害抗体が生じても血友病Ａの表現型が修正されることを示す。
【図９２Ｄ】阻害抗体が生じても血友病Ａの表現型が修正されることを示す。
【図９２Ｅ】阻害抗体が生じても血友病Ａの表現型が修正されることを示す。
【図９２Ｆ】阻害抗体が生じても血友病Ａの表現型が修正されることを示す。
【図９２Ｇ】阻害抗体が生じても血友病Ａの表現型が修正されることを示す。
【図９３Ａ】マカク（Ｍ．ｆａｓｃｉｃｕｌａｒｉｓ）へのインビボでの形質導入を示す。実験タイムラインを示す。
【図９３Ｂ】マカク（Ｍ．ｆａｓｃｉｃｕｌａｒｉｓ）へのインビボでの形質導入を示す。末梢血中に動員されたＣＤ３４＋細胞のＧＦＰマーキングを示す。
【図９３Ｃ】マカク（Ｍ．ｆａｓｃｉｃｕｌａｒｉｓ）へのインビボでの形質導入を示す。末梢血中に動員されたＣＤ３４＋細胞のＧＦＰマーキングを示す。
【図９３Ｄ】マカク（Ｍ．ｆａｓｃｉｃｕｌａｒｉｓ）へのインビボでの形質導入を示す。末梢血中に動員されたＣＤ３４＋細胞のＧＦＰマーキングを示す。
【図９３Ｅ】マカク（Ｍ．ｆａｓｃｉｃｕｌａｒｉｓ）へのインビボでの形質導入を示す。骨髄（３日目）を示す。
【図９４Ａ】インビボでのＨＳＣの統合型形質導入選択を示す。ｍｇｍｔ$^{Ｐ１４０Ｋ}$は、遺伝子改変細胞が薬物耐性を有し、選択的に増殖するための機構を与える。ヒトＯ（６）－メチルグアニン－ＤＮＡ－メチルトランスフェラーゼ（ＭＧＭＴ）のＰ１４０Ｋ変異体は、ＭＧＭＴ阻害剤Ｏ（６）－（４－ブロモテニル）グアニン（ＯＢＧ）（ベンジルグアニンとしても知られる）に対する耐性を与える。ＭＧＭＴ$^{ｐ１４０ｋ}$のベクターを示す。

【図９４Ｂ】インビボでのＨＳＣの統合型形質導入選択を示す。ｍｇｍｔ$^{Ｐ１４０Ｋ}$は、遺伝子改変細胞が薬物耐性を有し、選択的に増殖するための機構を与える。ヒトＯ（６）－メチルグアニン－ＤＮＡ－メチルトランスフェラーゼ（ＭＧＭＴ）のＰ１４０Ｋ変異体は、ＭＧＭＴ阻害剤Ｏ（６）－（４－ブロモテニル）グアニン（ＯＢＧ）（ベンジルグアニンとしても知られる）に対する耐性を与える。タイムライン及び注射用量を示す実験設計を示す。

【図９４Ｃ】インビボでのＨＳＣの統合型形質導入選択を示す。ｍｇｍｔ$^{Ｐ１４０Ｋ}$は、遺伝子改変細胞が薬物耐性を有し、選択的に増殖するための機構を与える。ヒトＯ（６）－メチルグアニン－ＤＮＡ－メチルトランスフェラーゼ（ＭＧＭＴ）のＰ１４０Ｋ変異体は、ＭＧＭＴ阻害剤Ｏ（６）－（４－ブロモテニル）グアニン（ＯＢＧ）（ベンジルグアニンとしても知られる）に対する耐性を与える。ＰＢＭＣにおけるＧＦＰ＋細胞のパーセントを示すデータを示す。

【図９４Ｄ】インビボでのＨＳＣの統合型形質導入選択を示す。ｍｇｍｔ$^{Ｐ１４０Ｋ}$は、遺伝子改変細胞が薬物耐性を有し、選択的に増殖するための機構を与える。ヒトＯ（６）－メチルグアニン－ＤＮＡ－メチルトランスフェラーゼ（ＭＧＭＴ）のＰ１４０Ｋ変異体は、ＭＧＭＴ阻害剤Ｏ（６）－（４－ブロモテニル）グアニン（ＯＢＧ）（ベンジルグアニンとしても知られる）に対する耐性を与える。２６週目の骨髄におけるＧＦＰ＋細胞のパーセントを示すデータを示す。

【図９４Ｅ】インビボでのＨＳＣの統合型形質導入選択を示す。ｍｇｍｔ$^{Ｐ１４０Ｋ}$は、遺伝子改変細胞が薬物耐性を有し、選択的に増殖するための機構を与える。ヒトＯ（６）－メチルグアニン－ＤＮＡ－メチルトランスフェラーゼ（ＭＧＭＴ）のＰ１４０Ｋ変異体は、ＭＧＭＴ阻害剤Ｏ（６）－（４－ブロモテニル）グアニン（ＯＢＧ）（ベンジルグアニンとしても知られる）に対する耐性を与える。Ａｄ５／３５－ＧＦＰベクターを示す。

【図９４Ｆ】インビボでのＨＳＣの統合型形質導入選択を示す。ｍｇｍｔ$^{Ｐ１４０Ｋ}$は、遺伝子改変細胞が薬物耐性を有し、選択的に増殖するための機構を与える。ヒトＯ（６）－メチルグアニン－ＤＮＡ－メチルトランスフェラーゼ（ＭＧＭＴ）のＰ１４０Ｋ変異体は、ＭＧＭＴ阻害剤Ｏ（６）－（４－ブロモテニル）グアニン（ＯＢＧ）（ベンジルグアニンとしても知られる）に対する耐性を与える。ブタオザルに４日間の動員処理を行った後、Ａｄ５／３５注射を行うことを示す実験プロトコールを示す。

【図９４Ｇ】インビボでのＨＳＣの統合型形質導入選択を示す。ｍｇｍｔ$^{Ｐ１４０Ｋ}$は、遺伝子改変細胞が薬物耐性を有し、選択的に増殖するための機構を与える。ヒトＯ（６）－メチルグアニン－ＤＮＡ－メチルトランスフェラーゼ（ＭＧＭＴ）のＰ１４０Ｋ変異体は、ＭＧＭＴ阻害剤Ｏ（６）－（４－ブロモテニル）グアニン（ＯＢＧ）（ベンジルグアニンとしても知られる）に対する耐性を与える。動物ＩＤ、ならびにＧ－ＣＳＦ、ＳＣＦ、ＡＭＤ３１００、及びＡｄ５／３５－ＧＦＰの用量を示す。

【図９４Ｈ】インビボでのＨＳＣの統合型形質導入選択を示す。ｍｇｍｔ$^{Ｐ１４０Ｋ}$は、遺伝子改変細胞が薬物耐性を有し、選択的に増殖するための機構を与える。ヒトＯ（６）－メチルグアニン－ＤＮＡ－メチルトランスフェラーゼ（ＭＧＭＴ）のＰ１４０Ｋ変異体は、ＭＧＭＴ阻害剤Ｏ（６）－（４－ブロモテニル）グアニン（ＯＢＧ）（ベンジルグアニンとしても知られる）に対する耐性を与える。ＡＭＤ３１００を使用することで、全ＣＤ３４＋幹細胞レベルがＧ－ＣＳＦ／ＳＣＦ単独と比較して３倍に向上し、ベースラインに対して６５倍となったことを示す。左パネルは末梢血におけるＣＤ３４＋幹細胞のパーセントを示す。右パネルはＣＤ３４＋細胞数を示す。

【図９４Ｉ】インビボでのＨＳＣの統合型形質導入選択を示す。ｍｇｍｔ$^{Ｐ１４０Ｋ}$は、遺伝子改変細胞が薬物耐性を有し、選択的に増殖するための機構を与える。ヒトＯ（６）－メチルグアニン－ＤＮＡ－メチルトランスフェラーゼ（ＭＧＭＴ）のＰ１４０Ｋ変異体は、ＭＧＭＴ阻害剤Ｏ（６）－（４－ブロモテニル）グアニン（ＯＢＧ）（ベンジルグアニンとしても知られる）に対する耐性を与える。Ａｄ５／３５の注射後に動員された細胞が、系譜が偏ることなく健康なコロニーを形成することを示す。左パネルは、Ａｄ５／

３５の注射から０～６時間後のコロニーの頻度及び数を示す数値データを示す。右パネルは、ＣＤ３４＋細胞の形態を視覚的に検証したものを示す。
【図９４Ｊ】インビボでのＨＳＣの統合型形質導入選択を示す。ｍｇｍｔ$^{Ｐ１４０Ｋ}$は、遺伝子改変細胞が薬物耐性を有し、選択的に増殖するための機構を与える。ヒトＯ（６）－メチルグアニン－ＤＮＡ－メチルトランスフェラーゼ（ＭＧＭＴ）のＰ１４０Ｋ変異体は、ＭＧＭＴ阻害剤Ｏ（６）－（４－ブロモテニル）グアニン（Ｏ６ＢＧ）（ベンジルグアニンとしても知られる）に対する耐性を与える。上パネルは、注射から０～６時間後のＡｄ５／３５－ＧＦＰ細胞のフローサイトメトリーデータを示す。下パネルは、注射から０時間後、２時間後、及び６時間後のＡｄ５／３５－ＧＦＰ含有コロニーの数の数値データを示す。
【図９４Ｋ】インビボでのＨＳＣの統合型形質導入選択を示す。ｍｇｍｔ$^{Ｐ１４０Ｋ}$は、遺伝子改変細胞が薬物耐性を有し、選択的に増殖するための機構を与える。ヒトＯ（６）－メチルグアニン－ＤＮＡ－メチルトランスフェラーゼ（ＭＧＭＴ）のＰ１４０Ｋ変異体は、ＭＧＭＴ阻害剤Ｏ（６）－（４－ブロモテニル）グアニン（Ｏ６ＢＧ）（ベンジルグアニンとしても知られる）に対する耐性を与える。Ａｄ５／３５の注射後にＧＦＰを発現する末梢ＣＤ３４＋が３％を超えることを示す。上パネルは、Ａｄ５／３５注射から０～８日後に単核細胞（ＭＮＣ）層から抽出したＣ３４＋細胞を示す。下パネルは、注射から２時間後及び６時間後の平均ＧＦＰ$^{+}$発現量を示す。
【図９４Ｌ】インビボでのＨＳＣの統合型形質導入選択を示す。ｍｇｍｔ$^{Ｐ１４０Ｋ}$は、遺伝子改変細胞が薬物耐性を有し、選択的に増殖するための機構を与える。ヒトＯ（６）－メチルグアニン－ＤＮＡ－メチルトランスフェラーゼ（ＭＧＭＴ）のＰ１４０Ｋ変異体は、ＭＧＭＴ阻害剤Ｏ（６）－（４－ブロモテニル）グアニン（Ｏ６ＢＧ）（ベンジルグアニンとしても知られる）に対する耐性を与える。動員及びＡｄ５／３５注射の後に循環細胞の形質導入が成功することを複数の方法によって確認したものを示す。左パネルは、ベクターＤＮＡのＴａｑｍａｎ検出を示す。右パネルは、ＧＦＰ発現のフローサイトメトリーデータを示す。
【図９４Ｍ】インビボでのＨＳＣの統合型形質導入選択を示す。ｍｇｍｔ$^{Ｐ１４０Ｋ}$は、遺伝子改変細胞が薬物耐性を有し、選択的に増殖するための機構を与える。ヒトＯ（６）－メチルグアニン－ＤＮＡ－メチルトランスフェラーゼ（ＭＧＭＴ）のＰ１４０Ｋ変異体は、ＭＧＭＴ阻害剤Ｏ（６）－（４－ブロモテニル）グアニン（Ｏ６ＢＧ）（ベンジルグアニンとしても知られる）に対する耐性を与える。改変細胞が骨髄に戻ることを示す。左パネルは、Ａｄ５／３５の注射から３日目、７日目、及び７３日目のＣＤ３４＋細胞及びＧＦＰ＋細胞の変化を示すフローサイトメトリーデータを示す。右パネルは、ベースライン時点、Ａｄ５／３５の注射から３日後、７日後、及び７３日後のＧＦＰ＋ＣＤ３４＋細胞のパーセントを示す。
【図９５】本明細書に記載の代表的なＡｄ３５ヘルパーウイルス及びベクターの特徴を示す。五角星は下記のテキストを示す：ＳＢ１００ｘ及び標的指向化（付加及び再活性化）の統合、ＣＲＩＳＰＲまたはＢＥのための複数のｓｇＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ（ｍｉＲ１８７／２１８）制御性のＣａｓ９発現、及びＣａｓ９の自己不活化。
【図９６】ＨＤＡｄ－ＴＩ－統合ベクターの模式図を示す。ＣＲＩＳＰＲ系は、２つの異なる部位（ＨＢＧプロモーター及び赤血球ｂｃｌ１１ａエンハンサー）を標的とし、これによってガンマ再活性化が増加する。
【図９７Ａ】ＨＤＡｄ－ＳＢ及びＨＤＡｄ－統合を同時感染させると、Ｆｌｐｅが発現し、ＩＲと隣接するトランスポゾンを遊離させ、その後にこの遊離トランスポゾンがＳＢ１００ｘトランスポゼースによってゲノムに組み込まれることになる。同時に、ＨＢＧ１ ＣＲＩＳＰＲ及びｂｃｌ１１ａ－Ｅ ＣＲＩＳＰＲが発現し、ＤＮＡインデルを生じさせ、これらのＤＮＡインデルによってγ－グロビンが再活性化されることになる。トランスポゾンがＦｌｐ介在性に遊離すると、ＣＲＩＳＰＲカセットは分解されることになり、それによって毒性が回避される。ＣＲＩＳＰＲ系は、２つの異なる部位（ＨＢＧプロモーター及び赤血球ｂｃｌ１１ａエンハンサー）を標的とし、これによってγ再活性化が増加す

る。
【図９７Ｂ】標的指向化方針を示す。
【図９７Ｃ】赤血球特異的ＢＣＬ１１Ａエンハンサーを示す。
【図９７Ｄ】ＨＢＧプロモーターのＢＣＬ１１Ａ結合部位（配列番号４８）を示す。ＨＤＡｄ－ＳＢ及びＨｄＡｄ－統合－ＳＢの模式図は、図１０２で見ることができる。
【図９８Ａ】二重ＣＲＩＳＰＲベクター及びγ－グロビン再活性化を示す。ＨＤＡｄ－Ｂｃｌ１１ａｅ－ＣＲＩＳＰＲ、ＨＤａｄ－ＨＢＧ－ＣＲＩＳＰＲ、ＨＤＡｄ－二重－ＣＲＩＳＰＲ、及びＨＤＡｄ－スクランブル型のベクター設計を示す。
【図９８Ｂ】二重ＣＲＩＳＰＲベクター及びγ－グロビン再活性化を示す。二重ｇＲＮＡベクターとしてのＨＤ－Ａｄ５／３５＋＋ＣＲＩＳＰＲベクターを示す。
【図９８Ｃ】二重ＣＲＩＳＰＲベクター及びγ－グロビン再活性化を示す。ＨＤ－Ａｄ５／３５＋＋ＣＲＩＳＰＲでのヒト赤血球前駆細胞株（ＨＵＤＥＰ－２）の形質導入がＨＵＤＥＰ－２の分化前後の画像と共に示される。ＨＵＤＥＰ－２細胞画像の下にはタイムラインが示される。
【図９８Ｄ】二重ＣＲＩＳＰＲベクター及びγ－グロビン再活性化を示す。非処理（ＵＮＴＲ）、ＢＣＬ１１Ａベクター、またはＨＢＧベクターと比較してＨＤ－ＡＤ５／３５＋＋「二重」ｇＲＮＡベクターが細胞生存率に負の影響を与えないことを示す。
【図９８Ｅ】二重ＣＲＩＳＰＲベクター及びγ－グロビン再活性化を示す。ＵＮＴＲ、ＢＣＬ１１Ａベクター、またはＨＢＧベクターと比較してＨＤ－ＡＤ５／３５＋＋「二重」ｇＲＮＡベクターが増殖に負の影響を与えないことを示す。
【図９８Ｆ】二重ＣＲＩＳＰＲベクター及びγ－グロビン再活性化を示す。一重ｇＲＮＡベクターで観測された標的遺伝子座（Ｂｃｌ１１ａエンハンサー）の編集レベルと比較して同様の編集レベルを二重ベクターが達成することを示す。
【図９８Ｇ】二重ＣＲＩＳＰＲベクター及びγ－グロビン再活性化を示す。一重ｇＲＮＡベクターで観測された標的遺伝子座（ＨＢＧプロモーター）の編集レベルと比較して同様の編集レベルを二重ベクターが達成することを示す。
【図９８Ｈ】二重ＣＲＩＳＰＲベクター及びγ－グロビン再活性化を示す。一重ｇＲＮＡベクターで観察された編集レベルと同様の標的遺伝子座編集レベルをＨＤ－ＡＤ５／３５＋＋「二重」ｇＲＮＡベクターが達成することを示す。
【図９８Ｉ】二重ＣＲＩＳＰＲベクター及びγ－グロビン再活性化を示す。ＨＤ－Ａｄ５／３５「二重」ｇＲＮＡベクターで形質導入したＨＵＤＥＰ－２細胞では、一重ｇＲＮＡベクターと比較して、フローサイトメトリーによって観察されたＨｂＦ＋細胞のパーセントが有意に高かったことを示す。フローサイトメトリーデータの下にはフローサイトメトリーデータをまとめた棒グラフが示される。
【図９８Ｊ】二重ＣＲＩＳＰＲベクター及びγ－グロビン再活性化を示す。二重標的化が行われた試料では、全ガンマグロビン発現量（ＨＰＬＣによって測定したもの）が有意に高かった。
【図９８Ｋ】二重ＣＲＩＳＰＲベクター及びγ－グロビン再活性化を示す。シングルノックアウトクローンと比較してダブルノックアウトクローンで観察された胎児型グロビンの発現量が有意に高いことを示し、このことは、２つの変異が相乗効果を有する可能性があり、これによってガンマ発現／細胞が高まることを暗示している。
【図９８Ｌ】二重ＣＲＩＳＰＲベクター及びγ－グロビン再活性化を示す。末梢血に動員されたＣＤ３４＋細胞がＨＤＡｄ５／３５＋＋ＣＲＩＳＰＲベクターで形質導入されたことを示す模式図を示す。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９による細胞毒性を最小化するために、抗Ｃａｓ９ペプチドを発現するＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターによる細胞の形質導入を続けて行った。亜致死性照射ＮＳＧマウスに細胞を移植し、分析した。
【図９８Ｍ】二重ＣＲＩＳＰＲベクター及びγ－グロビン再活性化を示す。移植後１０週目の時点で、ＨＤ－Ａｄ５／３５「二重」ｇＲＮＡベクターで形質導入した細胞が、一重ｇＲＮＡベクターで形質導入した細胞と同様の生着を示したことを示す。すべての群において系譜組成は同様であった。

【図９８Ｎ】二重ＣＲＩＳＰＲベクター及びγ－グロビン再活性化を示す。二重ｇＲＮＡベクターによって形質導入及び編集したＣＤ３４＋細胞がＮＳＧマウスにおいて効率的に生着したことを示す。さらに、生着した二重標的化細胞は、相対的に編集レベルが低かったにもかかわらず、赤血球分化後に、一重標的化細胞と比較して高い対照対比レベルでガンマグロビンを発現した。
【図９９Ａ】正常ＣＤ３４＋細胞及びサラセミアＣＤ３４＋細胞を二重編集してエクスビボで形質導入したものを示す。（図９９Ａ）実験設計を示す。正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおける（図９９Ｂ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｃ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０３４であることを示す。（図９９Ｄ）正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおけるＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。正常ＣＤ３４＋細胞の赤血球分化（ＥＤ）後の（図９９Ｅ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｆ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０１であることを示す。正常ＣＤ３４＋細胞への形質導入（ｔｘｄ）から４８時間後の（図９９Ｇ）ＨＢＧ部位に対するＴＥ７１及び（図９９Ｈ）ＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｉ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び赤血球分化を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｊ～９９Ｕ）サラセミアＣＤ３４＋細胞を示す。（図９９Ｊ）０日目の細胞、非形質導入細胞、及びＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞の免疫表現型を示す。（図９９Ｋ）非形質導入細胞とＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞とを１１日間にわたって比較した増殖曲線を示す。１５日目のコロニーにおける（図９９Ｌ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｍ）ＭＦＩを示す。＊＊は、ｐ＝０．００４６であることを示す。（図９９Ｎ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｏ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重Ａで形質導入した細胞及びＣＲＩＳＰＲ－二重Ｂで形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｐ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び（図９９Ｑ）ＭＦＩを示す。＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示し、＊＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示す。（図９９Ｒ）Ｐ０４及びＰ１８でのＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｓ、９９Ｔ）赤血球分化の（図９９Ｓ）ｐ０４及び（図９９Ｔ）Ｐ１８でのＨＢＧ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｕ）形質導入から４８時間後のＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。
【図９９Ｂ】正常ＣＤ３４＋細胞及びサラセミアＣＤ３４＋細胞を二重編集してエクスビボで形質導入したものを示す。（図９９Ａ）実験設計を示す。正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおける（図９９Ｂ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｃ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０３４であることを示す。（図９９Ｄ）正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおけるＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。正常ＣＤ３４＋細胞の赤血球分化（ＥＤ）後の（図９９Ｅ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｆ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０１であることを示す。正常ＣＤ３４＋細胞への形質導入（ｔｘｄ）から４８時間後の（図９９Ｇ）ＨＢＧ部位に対するＴＥ７１及び（図９９Ｈ）ＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｉ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び赤血球分化を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｊ～９９Ｕ）サラセミアＣＤ３４＋細胞を示す。（図９９Ｊ）０日目の細胞、非形質導入細胞、及びＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞の免疫表現型を示す。（図９９Ｋ）非形質導入細胞とＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞とを１１日間にわたって比較した増殖曲線を示す。１５日目のコロニーにおける（図９９Ｌ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｍ）ＭＦＩを示す。＊＊は、ｐ＝０．００４６であることを示す。（図９９Ｎ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｏ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重Ａで形質導入した細胞及びＣＲＩＳＰＲ－二重Ｂで形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｐ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び（図９９Ｑ）ＭＦＩを示す。＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示し、＊＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示す。（図９９Ｒ）Ｐ０４及びＰ１８でのＨＢＦ発現を説明するフロ

ーサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｓ、９９Ｔ）赤血球分化の（図９９Ｓ）ｐ０４及び（図９９Ｔ）Ｐ１８でのＨＢＧ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｕ）形質導入から４８時間後のＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。

【図９９Ｃ】正常ＣＤ３４＋細胞及びサラセミアＣＤ３４＋細胞を二重編集してエクスビボで形質導入したものを示す。（図９９Ａ）実験設計を示す。正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおける（図９９Ｂ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｃ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０３４であることを示す。（図９９Ｄ）正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおけるＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。正常ＣＤ３４＋細胞の赤血球分化（ＥＤ）後の（図９９Ｅ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｆ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０１であることを示す。正常ＣＤ３４＋細胞への形質導入（ｔｘｄ）から４８時間後の（図９９Ｇ）ＨＢＧ部位に対するＴＥ７１及び（図９９Ｈ）ＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｉ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び赤血球分化を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｊ～９９Ｕ）サラセミアＣＤ３４＋細胞を示す。（図９９Ｊ）０日目の細胞、非形質導入細胞、及びＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞の免疫表現型を示す。（図９９Ｋ）非形質導入細胞とＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞とを１１日間にわたって比較した増殖曲線を示す。１５日目のコロニーにおける（図９９Ｌ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｍ）ＭＦＩを示す。＊＊は、ｐ＝０．００４６であることを示す。（図９９Ｎ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｏ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重Ａで形質導入した細胞及びＣＲＩＳＰＲ－二重Ｂで形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｐ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び（図９９Ｑ）ＭＦＩを示す。＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示し、＊＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示す。（図９９Ｒ）Ｐ０４及びＰ１８でのＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｓ、９９Ｔ）赤血球分化の（図９９Ｓ）ｐ０４及び（図９９Ｔ）Ｐ１８でのＨＢＧ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｕ）形質導入から４８時間後のＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。

【図９９Ｄ】正常ＣＤ３４＋細胞及びサラセミアＣＤ３４＋細胞を二重編集してエクスビボで形質導入したものを示す。（図９９Ａ）実験設計を示す。正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおける（図９９Ｂ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｃ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０３４であることを示す。（図９９Ｄ）正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおけるＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。正常ＣＤ３４＋細胞の赤血球分化（ＥＤ）後の（図９９Ｅ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｆ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０１であることを示す。正常ＣＤ３４＋細胞への形質導入（ｔｘｄ）から４８時間後の（図９９Ｇ）ＨＢＧ部位に対するＴＥ７１及び（図９９Ｈ）ＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｉ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び赤血球分化を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｊ～９９Ｕ）サラセミアＣＤ３４＋細胞を示す。（図９９Ｊ）０日目の細胞、非形質導入細胞、及びＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞の免疫表現型を示す。（図９９Ｋ）非形質導入細胞とＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞とを１１日間にわたって比較した増殖曲線を示す。１５日目のコロニーにおける（図９９Ｌ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｍ）ＭＦＩを示す。＊＊は、ｐ＝０．００４６であることを示す。（図９９Ｎ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｏ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重Ａで形質導入した細胞及びＣＲＩＳＰＲ－二重Ｂで形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｐ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び（図９９Ｑ）ＭＦＩを示す。＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示し、＊＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示す。（図９９Ｒ）Ｐ０４及びＰ１８でのＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｓ、９９Ｔ）赤血球分化の（図９９Ｓ）ｐ０４及び（図９９Ｔ）Ｐ１８でのＨＢＧ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｕ）形質導入

から４８時間後のＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。
【図９９Ｅ】正常ＣＤ３４＋細胞及びサラセミアＣＤ３４＋細胞を二重編集してエクスビボで形質導入したものを示す。（図９９Ａ）実験設計を示す。正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおける（図９９Ｂ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｃ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０３４であることを示す。（図９９Ｄ）正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおけるＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。正常ＣＤ３４＋細胞の赤血球分化（ＥＤ）後の（図９９Ｅ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｆ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０１であることを示す。正常ＣＤ３４＋細胞への形質導入（ｔｘｄ）から４８時間後の（図９９Ｇ）ＨＢＧ部位に対するＴＥ７１及び（図９９Ｈ）ＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｉ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び赤血球分化を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｊ～９９Ｕ）サラセミアＣＤ３４＋細胞を示す。（図９９Ｊ）０日目の細胞、非形質導入細胞、及びＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞の免疫表現型を示す。（図９９Ｋ）非形質導入細胞とＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞とを１１日間にわたって比較した増殖曲線を示す。１５日目のコロニーにおける（図９９Ｌ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｍ）ＭＦＩを示す。＊＊は、ｐ＝０．００４６であることを示す。（図９９Ｎ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｏ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重Ａで形質導入した細胞及びＣＲＩＳＰＲ－二重Ｂで形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｐ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び（図９９Ｑ）ＭＦＩを示す。＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示し、＊＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示す。（図９９Ｒ）Ｐ０４及びＰ１８でのＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｓ、９９Ｔ）赤血球分化の（図９９Ｓ）ｐ０４及び（図９９Ｔ）Ｐ１８でのＨＢＧ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｕ）形質導入から４８時間後のＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。
【図９９Ｆ】正常ＣＤ３４＋細胞及びサラセミアＣＤ３４＋細胞を二重編集してエクスビボで形質導入したものを示す。（図９９Ａ）実験設計を示す。正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおける（図９９Ｂ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｃ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０３４であることを示す。（図９９Ｄ）正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおけるＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。正常ＣＤ３４＋細胞の赤血球分化（ＥＤ）後の（図９９Ｅ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｆ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０１であることを示す。正常ＣＤ３４＋細胞への形質導入（ｔｘｄ）から４８時間後の（図９９Ｇ）ＨＢＧ部位に対するＴＥ７１及び（図９９Ｈ）ＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｉ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び赤血球分化を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｊ～９９Ｕ）サラセミアＣＤ３４＋細胞を示す。（図９９Ｊ）０日目の細胞、非形質導入細胞、及びＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞の免疫表現型を示す。（図９９Ｋ）非形質導入細胞とＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞とを１１日間にわたって比較した増殖曲線を示す。１５日目のコロニーにおける（図９９Ｌ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｍ）ＭＦＩを示す。＊＊は、ｐ＝０．００４６であることを示す。（図９９Ｎ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｏ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重Ａで形質導入した細胞及びＣＲＩＳＰＲ－二重Ｂで形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｐ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び（図９９Ｑ）ＭＦＩを示す。＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示し、＊＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示す。（図９９Ｒ）Ｐ０４及びＰ１８でのＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｓ、９９Ｔ）赤血球分化の（図９９Ｓ）ｐ０４及び（図９９Ｔ）Ｐ１８でのＨＢＧ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｕ）形質導入から４８時間後のＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。
【図９９Ｇ】正常ＣＤ３４＋細胞及びサラセミアＣＤ３４＋細胞を二重編集してエクスビ

ボで形質導入したものを示す。（図９９Ａ）実験設計を示す。正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおける（図９９Ｂ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｃ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０３４であることを示す。（図９９Ｄ）正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおけるＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。正常ＣＤ３４＋細胞の赤血球分化（ＥＤ）後の（図９９Ｅ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｆ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０１であることを示す。正常ＣＤ３４＋細胞への形質導入（ｔｘｄ）から４８時間後の（図９９Ｇ）ＨＢＧ部位に対するＴＥ７１及び（図９９Ｈ）ＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｉ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び赤血球分化を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｊ～９９Ｕ）サラセミアＣＤ３４＋細胞を示す。（図９９Ｊ）０日目の細胞、非形質導入細胞、及びＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞の免疫表現型を示す。（図９９Ｋ）非形質導入細胞とＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞とを１１日間にわたって比較した増殖曲線を示す。１５日目のコロニーにおける（図９９Ｌ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｍ）ＭＦＩを示す。＊＊は、ｐ＝０．００４６であることを示す。（図９９Ｎ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｏ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重Ａで形質導入した細胞及びＣＲＩＳＰＲ－二重Ｂで形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｐ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び（図９９Ｑ）ＭＦＩを示す。＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示し、＊＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示す。（図９９Ｒ）Ｐ０４及びＰ１８でのＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｓ、９９Ｔ）赤血球分化の（図９９Ｓ）ｐ０４及び（図９９Ｔ）Ｐ１８でのＨＢＧ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｕ）形質導入から４８時間後のＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。

【図９９Ｈ】正常ＣＤ３４＋細胞及びサラセミアＣＤ３４＋細胞を二重編集してエクスビボで形質導入したものを示す。（図９９Ａ）実験設計を示す。正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおける（図９９Ｂ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｃ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０３４であることを示す。（図９９Ｄ）正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおけるＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。正常ＣＤ３４＋細胞の赤血球分化（ＥＤ）後の（図９９Ｅ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｆ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０１であることを示す。正常ＣＤ３４＋細胞への形質導入（ｔｘｄ）から４８時間後の（図９９Ｇ）ＨＢＧ部位に対するＴＥ７１及び（図９９Ｈ）ＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｉ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び赤血球分化を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｊ～９９Ｕ）サラセミアＣＤ３４＋細胞を示す。（図９９Ｊ）０日目の細胞、非形質導入細胞、及びＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞の免疫表現型を示す。（図９９Ｋ）非形質導入細胞とＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞とを１１日間にわたって比較した増殖曲線を示す。１５日目のコロニーにおける（図９９Ｌ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｍ）ＭＦＩを示す。＊＊は、ｐ＝０．００４６であることを示す。（図９９Ｎ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｏ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重Ａで形質導入した細胞及びＣＲＩＳＰＲ－二重Ｂで形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｐ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び（図９９Ｑ）ＭＦＩを示す。＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示し、＊＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示す。（図９９Ｒ）Ｐ０４及びＰ１８でのＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｓ、９９Ｔ）赤血球分化の（図９９Ｓ）ｐ０４及び（図９９Ｔ）Ｐ１８でのＨＢＧ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｕ）形質導入から４８時間後のＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。

【図９９Ｉ】正常ＣＤ３４＋細胞及びサラセミアＣＤ３４＋細胞を二重編集してエクスビボで形質導入したものを示す。（図９９Ａ）実験設計を示す。正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおける（図９９Ｂ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｃ）ＭＦＩを示す。＊は、

ｐ＝０．０３４であることを示す。（図９９Ｄ）正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおけるＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。正常ＣＤ３４＋細胞の赤血球分化（ＥＤ）後の（図９９Ｅ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｆ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０１であることを示す。正常ＣＤ３４＋細胞への形質導入（ｔｘｄ）から４８時間後の（図９９Ｇ）ＨＢＧ部位に対するＴＥ７１及び（図９９Ｈ）ＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｉ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び赤血球分化を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｊ～９９Ｕ）サラセミアＣＤ３４＋細胞を示す。（図９９Ｊ）０日目の細胞、非形質導入細胞、及びＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞の免疫表現型を示す。（図９９Ｋ）非形質導入細胞とＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞とを１１日間にわたって比較した増殖曲線を示す。１５日目のコロニーにおける（図９９Ｌ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｍ）ＭＦＩを示す。＊＊は、ｐ＝０．００４６であることを示す。（図９９Ｎ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｏ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重Ａで形質導入した細胞及びＣＲＩＳＰＲ－二重Ｂで形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｐ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び（図９９Ｑ）ＭＦＩを示す。＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示し、＊＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示す。（図９９Ｒ）Ｐ０４及びＰ１８でのＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｓ、９９Ｔ）赤血球分化の（図９９Ｓ）ｐ０４及び（図９９Ｔ）Ｐ１８でのＨＢＧ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｕ）形質導入から４８時間後のＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。

【図９９Ｊ】正常ＣＤ３４＋細胞及びサラセミアＣＤ３４＋細胞を二重編集してエクスビボで形質導入したものを示す。（図９９Ａ）実験設計を示す。正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおける（図９９Ｂ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｃ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０３４であることを示す。（図９９Ｄ）正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおけるＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。正常ＣＤ３４＋細胞の赤血球分化（ＥＤ）後の（図９９Ｅ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｆ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０１であることを示す。正常ＣＤ３４＋細胞への形質導入（ｔｘｄ）から４８時間後の（図９９Ｇ）ＨＢＧ部位に対するＴＥ７１及び（図９９Ｈ）ＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｉ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び赤血球分化を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｊ～９９Ｕ）サラセミアＣＤ３４＋細胞を示す。（図９９Ｊ）０日目の細胞、非形質導入細胞、及びＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞の免疫表現型を示す。（図９９Ｋ）非形質導入細胞とＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞とを１１日間にわたって比較した増殖曲線を示す。１５日目のコロニーにおける（図９９Ｌ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｍ）ＭＦＩを示す。＊＊は、ｐ＝０．００４６であることを示す。（図９９Ｎ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｏ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重Ａで形質導入した細胞及びＣＲＩＳＰＲ－二重Ｂで形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｐ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び（図９９Ｑ）ＭＦＩを示す。＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示し、＊＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示す。（図９９Ｒ）Ｐ０４及びＰ１８でのＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｓ、９９Ｔ）赤血球分化の（図９９Ｓ）ｐ０４及び（図９９Ｔ）Ｐ１８でのＨＢＧ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｕ）形質導入から４８時間後のＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。

【図９９Ｋ】正常ＣＤ３４＋細胞及びサラセミアＣＤ３４＋細胞を二重編集してエクスビボで形質導入したものを示す。（図９９Ａ）実験設計を示す。正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおける（図９９Ｂ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｃ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０３４であることを示す。（図９９Ｄ）正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおけるＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。正常ＣＤ３４＋細

胞の赤血球分化（ＥＤ）後の（図９９Ｅ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｆ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０１であることを示す。正常ＣＤ３４＋細胞への形質導入（ｔｘｄ）から４８時間後の（図９９Ｇ）ＨＢＧ部位に対するＴＥ７１及び（図９９Ｈ）ＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｉ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び赤血球分化を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｊ～９９Ｕ）サラセミアＣＤ３４＋細胞を示す。（図９９Ｊ）０日目の細胞、非形質導入細胞、及びＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞の免疫表現型を示す。（図９９Ｋ）非形質導入細胞とＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞とを１１日間にわたって比較した増殖曲線を示す。１５日目のコロニーにおける（図９９Ｌ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｍ）ＭＦＩを示す。＊＊は、ｐ＝０．００４６であることを示す。（図９９Ｎ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｏ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重Ａで形質導入した細胞及びＣＲＩＳＰＲ－二重Ｂで形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｐ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び（図９９Ｑ）ＭＦＩを示す。＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示し、＊＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示す。（図９９Ｒ）Ｐ０４及びＰ１８でのＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｓ、９９Ｔ）赤血球分化の（図９９Ｓ）ｐ０４及び（図９９Ｔ）Ｐ１８でのＨＢＧ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｕ）形質導入から４８時間後のＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。

【図９９Ｌ】正常ＣＤ３４＋細胞及びサラセミアＣＤ３４＋細胞を二重編集してエクスビボで形質導入したものを示す。（図９９Ａ）実験設計を示す。正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおける（図９９Ｂ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｃ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０３４であることを示す。（図９９Ｄ）正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおけるＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。正常ＣＤ３４＋細胞の赤血球分化（ＥＤ）後の（図９９Ｅ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｆ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０１であることを示す。正常ＣＤ３４＋細胞への形質導入（ｔｘｄ）から４８時間後の（図９９Ｇ）ＨＢＧ部位に対するＴＥ７１及び（図９９Ｈ）ＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｉ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び赤血球分化を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｊ～９９Ｕ）サラセミアＣＤ３４＋細胞を示す。（図９９Ｊ）０日目の細胞、非形質導入細胞、及びＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞の免疫表現型を示す。（図９９Ｋ）非形質導入細胞とＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞とを１１日間にわたって比較した増殖曲線を示す。１５日目のコロニーにおける（図９９Ｌ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｍ）ＭＦＩを示す。＊＊は、ｐ＝０．００４６であることを示す。（図９９Ｎ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｏ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重Ａで形質導入した細胞及びＣＲＩＳＰＲ－二重Ｂで形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｐ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び（図９９Ｑ）ＭＦＩを示す。＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示し、＊＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示す。（図９９Ｒ）Ｐ０４及びＰ１８でのＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｓ、９９Ｔ）赤血球分化の（図９９Ｓ）ｐ０４及び（図９９Ｔ）Ｐ１８でのＨＢＧ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｕ）形質導入から４８時間後のＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。

【図９９Ｍ】正常ＣＤ３４＋細胞及びサラセミアＣＤ３４＋細胞を二重編集してエクスビボで形質導入したものを示す。（図９９Ａ）実験設計を示す。正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおける（図９９Ｂ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｃ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０３４であることを示す。（図９９Ｄ）正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおけるＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。正常ＣＤ３４＋細胞の赤血球分化（ＥＤ）後の（図９９Ｅ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｆ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０１であることを示す。正常ＣＤ３４＋細胞への形質導入（ｔｘｄ）から４

８時間後の（図９９Ｇ）ＨＢＧ部位に対するＴＥ７１及び（図９９Ｈ）ＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｉ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び赤血球分化を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｊ～９９Ｕ）サラセミアＣＤ３４＋細胞を示す。（図９９Ｊ）０日目の細胞、非形質導入細胞、及びＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞の免疫表現型を示す。（図９９Ｋ）非形質導入細胞とＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞とを１１日間にわたって比較した増殖曲線を示す。１５日目のコロニーにおける（図９９Ｌ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｍ）ＭＦＩを示す。＊＊は、ｐ＝０．００４６であることを示す。（図９９Ｎ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｏ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重Ａで形質導入した細胞及びＣＲＩＳＰＲ－二重Ｂで形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｐ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び（図９９Ｑ）ＭＦＩを示す。＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示し、＊＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示す。（図９９Ｒ）Ｐ０４及びＰ１８でのＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｓ、９９Ｔ）赤血球分化の（図９９Ｓ）ｐ０４及び（図９９Ｔ）Ｐ１８でのＨＢＧ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｕ）形質導入から４８時間後のＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。

【図９９Ｎ】正常ＣＤ３４＋細胞及びサラセミアＣＤ３４＋細胞を二重編集してエクスビボで形質導入したものを示す。（図９９Ａ）実験設計を示す。正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおける（図９９Ｂ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｃ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０３４であることを示す。（図９９Ｄ）正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおけるＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。正常ＣＤ３４＋細胞の赤血球分化（ＥＤ）後の（図９９Ｅ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｆ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０１であることを示す。正常ＣＤ３４＋細胞への形質導入（ｔｘｄ）から４８時間後の（図９９Ｇ）ＨＢＧ部位に対するＴＥ７１及び（図９９Ｈ）ＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｉ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び赤血球分化を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｊ～９９Ｕ）サラセミアＣＤ３４＋細胞を示す。（図９９Ｊ）０日目の細胞、非形質導入細胞、及びＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞の免疫表現型を示す。（図９９Ｋ）非形質導入細胞とＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞とを１１日間にわたって比較した増殖曲線を示す。１５日目のコロニーにおける（図９９Ｌ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｍ）ＭＦＩを示す。＊＊は、ｐ＝０．００４６であることを示す。（図９９Ｎ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｏ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重Ａで形質導入した細胞及びＣＲＩＳＰＲ－二重Ｂで形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｐ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び（図９９Ｑ）ＭＦＩを示す。＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示し、＊＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示す。（図９９Ｒ）Ｐ０４及びＰ１８でのＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｓ、９９Ｔ）赤血球分化の（図９９Ｓ）ｐ０４及び（図９９Ｔ）Ｐ１８でのＨＢＧ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｕ）形質導入から４８時間後のＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。

【図９９Ｏ】正常ＣＤ３４＋細胞及びサラセミアＣＤ３４＋細胞を二重編集してエクスビボで形質導入したものを示す。（図９９Ａ）実験設計を示す。正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおける（図９９Ｂ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｃ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０３４であることを示す。（図９９Ｄ）正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおけるＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。正常ＣＤ３４＋細胞の赤血球分化（ＥＤ）後の（図９９Ｅ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｆ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０１であることを示す。正常ＣＤ３４＋細胞への形質導入（ｔｘｄ）から４８時間後の（図９９Ｇ）ＨＢＧ部位に対するＴＥ７１及び（図９９Ｈ）ＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｉ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び赤血球分化を説明

するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｊ～９９Ｕ）サラセミアＣＤ３４＋細胞を示す。（図９９Ｊ）０日目の細胞、非形質導入細胞、及びＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞の免疫表現型を示す。（図９９Ｋ）非形質導入細胞とＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞とを１１日間にわたって比較した増殖曲線を示す。１５日目のコロニーにおける（図９９Ｌ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｍ）ＭＦＩを示す。＊＊は、ｐ＝０．００４６であることを示す。（図９９Ｎ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｏ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重Ａで形質導入した細胞及びＣＲＩＳＰＲ－二重Ｂで形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｐ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び（図９９Ｑ）ＭＦＩを示す。＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示し、＊＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示す。（図９９Ｒ）Ｐ０４及びＰ１８でのＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｓ、９９Ｔ）赤血球分化の（図９９Ｓ）ｐ０４及び（図９９Ｔ）Ｐ１８でのＨＢＧ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｕ）形質導入から４８時間後のＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。

【図９９Ｐ】正常ＣＤ３４＋細胞及びサラセミアＣＤ３４＋細胞を二重編集してエクスビボで形質導入したものを示す。（図９９Ａ）実験設計を示す。正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおける（図９９Ｂ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｃ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０３４であることを示す。（図９９Ｄ）正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおけるＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。正常ＣＤ３４＋細胞の赤血球分化（ＥＤ）後の（図９９Ｅ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｆ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０１であることを示す。正常ＣＤ３４＋細胞への形質導入（ｔｘｄ）から４８時間後の（図９９Ｇ）ＨＢＧ部位に対するＴＥ７１及び（図９９Ｈ）ＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｉ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び赤血球分化を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｊ～９９Ｕ）サラセミアＣＤ３４＋細胞を示す。（図９９Ｊ）０日目の細胞、非形質導入細胞、及びＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞の免疫表現型を示す。（図９９Ｋ）非形質導入細胞とＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞とを１１日間にわたって比較した増殖曲線を示す。１５日目のコロニーにおける（図９９Ｌ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｍ）ＭＦＩを示す。＊＊は、ｐ＝０．００４６であることを示す。（図９９Ｎ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｏ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重Ａで形質導入した細胞及びＣＲＩＳＰＲ－二重Ｂで形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｐ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び（図９９Ｑ）ＭＦＩを示す。＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示し、＊＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示す。（図９９Ｒ）Ｐ０４及びＰ１８でのＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｓ、９９Ｔ）赤血球分化の（図９９Ｓ）ｐ０４及び（図９９Ｔ）Ｐ１８でのＨＢＧ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｕ）形質導入から４８時間後のＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。

【図９９Ｑ】正常ＣＤ３４＋細胞及びサラセミアＣＤ３４＋細胞を二重編集してエクスビボで形質導入したものを示す。（図９９Ａ）実験設計を示す。正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおける（図９９Ｂ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｃ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０３４であることを示す。（図９９Ｄ）正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおけるＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。正常ＣＤ３４＋細胞の赤血球分化（ＥＤ）後の（図９９Ｅ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｆ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０１であることを示す。正常ＣＤ３４＋細胞への形質導入（ｔｘｄ）から４８時間後の（図９９Ｇ）ＨＢＧ部位に対するＴＥ７１及び（図９９Ｈ）ＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｉ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び赤血球分化を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｊ～９９Ｕ）サラセミアＣＤ３４＋細胞を示す。（図９９Ｊ）０日目の細胞、非形質導入細胞、及びＣＲＩＳＰＲ－二重で形質

導入した細胞の免疫表現型を示す。（図９９Ｋ）非形質導入細胞とＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞とを１１日間にわたって比較した増殖曲線を示す。１５日目のコロニーにおける（図９９Ｌ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｍ）ＭＦＩを示す。＊＊は、ｐ＝０．００４６であることを示す。（図９９Ｎ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｏ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重Ａで形質導入した細胞及びＣＲＩＳＰＲ－二重Ｂで形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｐ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び（図９９Ｑ）ＭＦＩを示す。＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示し、＊＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示す。（図９９Ｒ）Ｐ０４及びＰ１８でのＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｓ、９９Ｔ）赤血球分化の（図９９Ｓ）ｐ０４及び（図９９Ｔ）Ｐ１８でのＨＢＧ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｕ）形質導入から４８時間後のＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。

【図９９Ｒ】正常ＣＤ３４＋細胞及びサラセミアＣＤ３４＋細胞を二重編集してエクスビボで形質導入したものを示す。（図９９Ａ）実験設計を示す。正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおける（図９９Ｂ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｃ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０３４であることを示す。（図９９Ｄ）正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおけるＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。正常ＣＤ３４＋細胞の赤血球分化（ＥＤ）後の（図９９Ｅ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｆ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０１であることを示す。正常ＣＤ３４＋細胞への形質導入（ｔｘｄ）から４８時間後の（図９９Ｇ）ＨＢＧ部位に対するＴＥ７１及び（図９９Ｈ）ＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｉ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び赤血球分化を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｊ～９９Ｕ）サラセミアＣＤ３４＋細胞を示す。（図９９Ｊ）０日目の細胞、非形質導入細胞、及びＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞の免疫表現型を示す。（図９９Ｋ）非形質導入細胞とＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞とを１１日間にわたって比較した増殖曲線を示す。１５日目のコロニーにおける（図９９Ｌ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｍ）ＭＦＩを示す。＊＊は、ｐ＝０．００４６であることを示す。（図９９Ｎ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｏ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重Ａで形質導入した細胞及びＣＲＩＳＰＲ－二重Ｂで形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｐ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び（図９９Ｑ）ＭＦＩを示す。＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示し、＊＊＊＊は、ｐ＝０．００００３であることを示す。（図９９Ｒ）Ｐ０４及びＰ１８でのＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｓ、９９Ｔ）赤血球分化の（図９９Ｓ）ｐ０４及び（図９９Ｔ）Ｐ１８でのＨＢＧ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｕ）形質導入から４８時間後のＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。

【図９９Ｓ】正常ＣＤ３４＋細胞及びサラセミアＣＤ３４＋細胞を二重編集してエクスビボで形質導入したものを示す。（図９９Ａ）実験設計を示す。正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおける（図９９Ｂ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｃ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０３４であることを示す。（図９９Ｄ）正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおけるＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。正常ＣＤ３４＋細胞の赤血球分化（ＥＤ）後の（図９９Ｅ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｆ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０１であることを示す。正常ＣＤ３４＋細胞への形質導入（ｔｘｄ）から４８時間後の（図９９Ｇ）ＨＢＧ部位に対するＴＥ７１及び（図９９Ｈ）ＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｉ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び赤血球分化を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｊ～９９Ｕ）サラセミアＣＤ３４＋細胞を示す。（図９９Ｊ）０日目の細胞、非形質導入細胞、及びＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞の免疫表現型を示す。（図９９Ｋ）非形質導入細胞とＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞とを１１日間にわたって比較した増殖曲線を示す。１５日目のコロニー

における（図９９Ｌ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｍ）ＭＦＩを示す。＊＊は、ｐ＝０．００４６であることを示す。（図９９Ｎ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｏ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重Ａで形質導入した細胞及びＣＲＩＳＰＲ－二重Ｂで形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｐ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び（図９９Ｑ）ＭＦＩを示す。＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示し、＊＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示す。（図９９Ｒ）Ｐ０４及びＰ１８でのＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｓ、９９Ｔ）赤血球分化の（図９９Ｓ）ｐ０４及び（図９９Ｔ）Ｐ１８でのＨＢＧ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｕ）形質導入から４８時間後のＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。

【図９９Ｔ】正常ＣＤ３４＋細胞及びサラセミアＣＤ３４＋細胞を二重編集してエクスビボで形質導入したものを示す。（図９９Ａ）実験設計を示す。正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおける（図９９Ｂ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｃ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０３４であることを示す。（図９９Ｄ）正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおけるＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。正常ＣＤ３４＋細胞の赤血球分化（ＥＤ）後の（図９９Ｅ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｆ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０１であることを示す。正常ＣＤ３４＋細胞への形質導入（ｔｘｄ）から４８時間後の（図９９Ｇ）ＨＢＧ部位に対するＴＥ７１及び（図９９Ｈ）ＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｉ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び赤血球分化を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｊ～９９Ｕ）サラセミアＣＤ３４＋細胞を示す。（図９９Ｊ）０日目の細胞、非形質導入細胞、及びＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞の免疫表現型を示す。（図９９Ｋ）非形質導入細胞とＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞とを１１日間にわたって比較した増殖曲線を示す。１５日目のコロニーにおける（図９９Ｌ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｍ）ＭＦＩを示す。＊＊は、ｐ＝０．００４６であることを示す。（図９９Ｎ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｏ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重Ａで形質導入した細胞及びＣＲＩＳＰＲ－二重Ｂで形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｐ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び（図９９Ｑ）ＭＦＩを示す。＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示し、＊＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示す。（図９９Ｒ）Ｐ０４及びＰ１８でのＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｓ、９９Ｔ）赤血球分化の（図９９Ｓ）ｐ０４及び（図９９Ｔ）Ｐ１８でのＨＢＧ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｕ）形質導入から４８時間後のＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。

【図９９Ｕ】正常ＣＤ３４＋細胞及びサラセミアＣＤ３４＋細胞を二重編集してエクスビボで形質導入したものを示す。（図９９Ａ）実験設計を示す。正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおける（図９９Ｂ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｃ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０３４であることを示す。（図９９Ｄ）正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおけるＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。正常ＣＤ３４＋細胞の赤血球分化（ＥＤ）後の（図９９Ｅ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｆ）ＭＦＩを示す。＊は、ｐ＝０．０１であることを示す。正常ＣＤ３４＋細胞への形質導入（ｔｘｄ）から４８時間後の（図９９Ｇ）ＨＢＧ部位に対するＴＥ７１及び（図９９Ｈ）ＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｉ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び赤血球分化を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｊ～９９Ｕ）サラセミアＣＤ３４＋細胞を示す。（図９９Ｊ）０日目の細胞、非形質導入細胞、及びＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞の免疫表現型を示す。（図９９Ｋ）非形質導入細胞とＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞とを１１日間にわたって比較した増殖曲線を示す。１５日目のコロニーにおける（図９９Ｌ）ＨＢＦ発現及び（図９９Ｍ）ＭＦＩを示す。＊＊は、ｐ＝０．００４６であることを示す。（図９９Ｎ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ

発現をＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｏ）赤血球及び骨髄系コンパートメントにおけるＨＢＦ発現をＣＲＩＳＰＲ－二重Ａで形質導入した細胞及びＣＲＩＳＰＲ－二重Ｂで形質導入した細胞と非形質導入細胞とで比較したものを示す。（図９９Ｐ）ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び（図９９Ｑ）ＭＦＩを示す。＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示し、＊＊＊＊は、ｐ＝０．０００３であることを示す。（図９９Ｒ）Ｐ０４及びＰ１８でのＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータを示す。（図９９Ｓ、９９Ｔ）赤血球分化の（図９９Ｓ）ｐ０４及び（図９９Ｔ）Ｐ１８でのＨＢＧ部位に対するＴＥ７１を示す。（図９９Ｕ）形質導入から４８時間後のＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。

【図１００】γ－グロビン遺伝子付加と内在性γ－グロビンの再活性化との統合を説明するまとめ図を示す。

【図１０１】本明細書で使用されるＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを示す。γ－グロビン遺伝子の付加は、発現カセットと隣接するＩＲ部位及びｆｒｔ部位を有するトランスポゾンベクター（ＨＤＡｄ－統合及びＨＤＡｄ－ＳＢ－付加を参照のこと）と、ＳＢ１００ｘ及びＦｌｐｅリコンビナーゼをトランスで供給する第２のベクター（ＨＤＡｄ－ＳＢ）と、からなるＳＢ１００ｘトランスポゼース系を介して達成される。無作為組み込みのためのトランスポゾンカセットは、ヒトγ－グロビンを赤血球特異的に発現させるための小型β－グロビンＬＣＲ／プロモーターからなる。３’ＵＴＲは、赤血球細胞におけるｍＲＮＡの安定化に役立つ。γ－グロビン発現単位と、遍在性に活性なＰＧＫプロモーターからｍｇｍｔ$^{Ｐ１４０Ｋ}$を発現させるためのカセットとは、ニワトリグロビンＨＳ４インスレーターによって分離されている。ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲベクター及びＨＤＡｄ－統合ベクター中のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９カセットは、ＨＢＧ１／２プロモーター中のＢＣＬ１１Ａ結合部位に特異的なＵ６プロモーター促進性ｓｇＲＮＡと、ＥＦ１αプロモーターの制御下にあるＳｐＣａｓ９と、を含む。ＨＤＡｄ産生細胞におけるＣａｓ９の発現は、ｍｉＲＮＡ制御系によって抑制される（Ｓａｙｄａｍｉｎｏｖａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ．２０１５，１：１４０５７，２０１５）。ＨＤＡｄ－統合では、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９カセットはトランスポゾンの外側に配置されており、その結果、Ｆｌｐｅ／ＳＢ１００ｘ介在性の組み込みが生じるとＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９カセットは消失することになる。（図１０２を参照のこと）。

【図１０２】Ｃａｓ９発現制御の模式図を示す。ＨＤＡｄ－統合では、Ｆｌｐｅリコンビナーゼがｆｒｔ部位と相互作用するとトランスポゾンが環状化し、ＣＲＩＳＰＲカセットを含むベクターの直鎖断片が残る。こうしたベクター部分は環状化トランスポゾンがＳＢ１００ｘによって宿主ゲノムに組み込まれる間に急速に消失することが、ＳＢ１００ｘ／Ｆｌｐｅ系を用いた以前の研究によって実証された（Ｙａｎｔ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，２０：９９９－１００５，２００２）。

【図１０３Ａ】ＨＵＤＥＰ－２細胞を用いてＣａｓ９及びγ－グロビンの発現を分析したインビトロ試験を示す。ウエスタンブロットによってＣａｓ９の発現を分析したものを示す。ＨＤＡｄ－統合を単独使用またはＨＤＡｄ－ＳＢ（すなわち、Ｆｌｐｅ及びＳＢ１００ｘをトランスで供給するベクター）と併用してＨＵＤＥＰ－２細胞の形質導入を行った。形質導入の４日後からインビトロでの赤血球分化を開始し、８日間継続した（赤血球分化によってγ－グロビン発現が可能になる）。右パネル：Ｃａｓ９抗体及びβ－アクチン抗体をプローブとして使用した代表的なウエスタンブロット。左パネル：Ｃａｓ９シグナルのまとめ。棒は、ＨＤＡｄ－ＳＢの同時感染の有無でＣａｓ９を比較したものであり、すなわち、Ｆｌｐｅ／ＳＢ１００ｘ機構によってＣａｓ９が減少している。

【図１０３Ｂ】ＨＵＤＥＰ－２細胞を用いてＣａｓ９及びγ－グロビンの発現を分析したインビトロ試験を示す。ウエスタンブロットによってＣａｓ９の発現を分析したものを示す。ＨＤＡｄ－統合を単独使用またはＨＤＡｄ－ＳＢ（すなわち、Ｆｌｐｅ及びＳＢ１００ｘをトランスで供給するベクター）と併用してＨＵＤＥＰ－２細胞の形質導入を行った。形質導入の４日後からインビトロでの赤血球分化を開始し、８日間継続した（赤血球分化によってγ－グロビン発現が可能になる）。右パネル：Ｃａｓ９抗体及びβ－アクチン

抗体をプローブとして使用した代表的なウエスタンブロット。左パネル：Ｃａｓ９シグナルのまとめ。棒は、ＨＤＡｄ－ＳＢの同時感染の有無でＣａｓ９を比較したものであり、すなわち、Ｆｌｐｅ／ＳＢ１００ｘ機構によってＣａｓ９が減少している。

【図１０３Ｃ】ＨＵＤＥＰ－２細胞を用いてＣａｓ９及びγ－グロビンの発現を分析したインビトロ試験を示す。フローサイトメトリーによってγ－グロビンの発現を分析したものを示す。ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ（「切断」）、ＨＤＡｄ－ＳＢ－付加（「付加」）＋ＨＤＡｄ－ＳＢ、またはＨＤＡｄ－統合（「統合」）＋ＨＤＡｄ－ＳＢでＨＵＤＥＰ－２細胞の形質導入を行い、このＨＵＤＥＰ－２細胞を、示される時点で分析した。

【図１０３Ｄ】ＨＵＤＥＰ－２細胞を用いてＣａｓ９及びγ－グロビンの発現を分析したインビトロ試験を示す。ｑＲＴ－ＰＣＲによるγ－グロビンのｍＲＮＡレベルを示す。ｄ．ｐ．ｔ．：形質導入後日数。Ｄｉｆｆ：分化。＊ｐ＜０．０５。

【図１０４Ａ】ＣＤ４６／β－ＹＡＣマウスのインビボでの形質導入後のγ－グロビン発現試験を示す。実験の模式図を示す。ヒト組換えＧ－ＣＳＦの皮下（ｓ．ｃ．）注射を４日間行ってからＡＭＤ３１００の皮下注射を１回行うことによってＨＳＰＣを動員した。ＡＭＤ３１００の注射から３０分後及び６０分後に、下記のＨＤＡｄベクターの１：１混合物を動物に静脈内注射した（注射回数計２回、各４×$10^{10}$ｖｐ）：ＨＤＡｄ－統合＋ＨＤＡｄ－ＳＢ、ＨＤＡｄ－ＳＢ－付加＋ＨＤＡｄ－ＳＢ、及びＨＤＡｄ－切断。次の４週間は免疫抑制（ＩＳ）剤でマウスを処理してヒトγ－グロビン及びＭＧＭＴに対する免疫応答を回避した。４週目に、$O^{6}$－ＢＧ／ＢＣＮＵ処理を開始し、２週間ごとに計３回繰り返した。各サイクルに伴って、５ｍｇ／ｋｇ→７．５ｍｇ／ｋｇ→１０ｍｇ／ｋｇとなるようにＢＣＮＵ濃度を増加させた。１８週目に組織試料分析のために動物を　　殺し、その骨髄Ｌｉｎ⁻細胞を収集して致死性照射Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに二次移植した後、これらのマウスをさらに１６週間経過観察した。

【図１０４Ｂ】ＣＤ４６／β－ＹＡＣマウスのインビボでの形質導入後のγ－グロビン発現試験を示す。「統合」群及び「切断」群の末梢赤血球におけるγ－グロビンの発現をフローサイトメトリーによって検出したものを示す。

【図１０４Ｃ】ＣＤ４６／β－ＹＡＣマウスのインビボでの形質導入後のγ－グロビン発現試験を示す。ＨＰＬＣによってγ－グロビンタンパク質のレベルを測定したものを示す。右パネル：ＲＢＣ溶解物（１８週目）のクロマトグラム（ヒトβ－グロビン、再活性化ヒトＡγ、及び付加されたγ－グロビン鎖が印付けされている）。左パネル：ＨＰＬＣデータのまとめ。「切断」ベクター、「付加」ベクター、及び「統合」ベクターで処理したＣＤ４６／β－ＹＡＣマウスのヒトβ－グロビンに対する全γ－グロビンのパーセントが示される。＊：ｐ＜０．０５、ｎ．ｓ．。

【図１０４Ｄ】ＣＤ４６／β－ＹＡＣマウスのインビボでの形質導入後のγ－グロビン発現試験を示す。マウスβ－メジャーｍＲＮＡの発現に対するγ－グロビンｍＲＮＡの発現（ｑＲＴ－ＰＣＲによって測定したもの）を示す。

【図１０４Ｅ】ＣＤ４６／β－ＹＡＣマウスのインビボでの形質導入後のγ－グロビン発現試験を示す。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９による標的部位の切断パーセントを示す。「切断」及び「統合」を用いてインビボで形質導入したマウスから１８週目に収集したＰＢＭＣ及び骨髄ＭＮＣから得られたゲノムＤＮＡをＴ７ＥＩアッセイに供した。図１０５から得られたデータのまとめが示される。＊ｐ＜０．０５。

【図１０４Ｆ】ＣＤ４６／β－ＹＡＣマウスのインビボでの形質導入後のγ－グロビン発現試験を示す。「付加ベクター」及び「統合」ベクターで形質導入を行ってから１８週目に骨髄ＨＳＰＣにおける組み込みベクターコピー数を測定したものを示す。群間差は有意なものではない。

【図１０４Ｇ】ＣＤ４６／β－ＹＡＣマウスのインビボでの形質導入後のγ－グロビン発現試験を示す。「統合」ベクターで処理したマウスから得られた個々のＣＦＵにおけるＶＣＮのスペクトルを示す。前駆細胞アッセイのために骨髄Ｌｉｎ⁻細胞を播種し、ｑＰＣＲによって個々のコロニーにおけるＶＣＮを測定した。４匹の異なるマウスから得られたデータが示される。

【図１０４Ｈ】ＣＤ４６／β－ＹＡＣマウスのインビボでの形質導入後のγ－グロビン発現試験を示す。ＨＰＬＣによるヒトγ／ヒトβグロビンタンパク質を示す。
【図１０４Ｉ】ＣＤ４６／β－ＹＡＣマウスのインビボでの形質導入後のγ－グロビン発現試験を示す。マウスβ－メジャーｍＲＮＡの発現に対するヒトγ－グロビンｍＲＮＡの発現のパーセントを示す。
【図１０５Ａ】ＲＢＣ溶解物のクロマトグラムを示し、ヒトβ－グロビン及びγ－グロビンのピークが印付けされている。上パネルは、処理前のβ－ＹＡＣマウスを示す。中央パネルは、ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ（「切断」）による形質導入後１８週目を示す。左パネルは、Ｇγ及びＡγの両方の再活性化を示す。下パネルは、ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ（「切断」）による形質導入後１８週目を示す。
【図１０５Ｂ】ＲＢＣ溶解物のクロマトグラムを示し、ヒトβ－グロビン及びγ－グロビンのピークが印付けされている。最後の下パネルでは、ピークがラベル付けして示される。各クロマトグラムは個々の動物のものである。ヒトβ－グロビンはγ－グロビンの増加に伴って減少する（グロビンの逆スイッチ）ことに留意されたい。
【図１０６】「切断」ベクター及び「統合」ベクターでの形質導入後１６週目の血液、脾臓、及び骨髄から得られたＭＮＣから得られたＴ７ＥＩアッセイデータを示す。特異的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９切断断片（２５５ｂｐ及び１１０ｂｐ）は矢印によって印付けされている。各レーンの下には、バンドシグナルの定量化に基づく切断パーセントが示される。
【図１０７Ａ】ＣＤ４６／β－ＹＡＣ形質導入マウスから得られたＬｉｎ－細胞の二次レシピエントを分析したものを示す。示される時点でのヒトγ－グロビン発現末梢血ＲＢＣのパーセントを示す。移植後４週目からすべてのマウスにおいて免疫抑制を開始した。
【図１０７Ｂ】ＣＤ４６／β－ＹＡＣ形質導入マウスから得られたＬｉｎ－細胞の二次レシピエントを分析したものを示す。移植後１６週目のヒトβ－グロビンに対するγ－グロビンタンパク質のレベルを示す。
【図１０７Ｃ】ＣＤ４６／β－ＹＡＣ形質導入マウスから得られたＬｉｎ－細胞の二次レシピエントを分析したものを示す。マウス$\beta_{メジャー}$－グロビン及びヒトβ－グロビンに対するγ－グロビンタンパク質のレベルを示す。
【図１０７Ｄ】ＣＤ４６／β－ＹＡＣ形質導入マウスから得られたＬｉｎ－細胞の二次レシピエントを分析したものを示す。マウス$\beta_{メジャー}$－グロビン及びヒトβ－グロビンに対するγ－グロビンタンパク質のレベルを示す。
【図１０７Ｅ】ＣＤ４６／β－ＹＡＣ形質導入マウスから得られたＬｉｎ－細胞の二次レシピエントを分析したものを示す。「統合」ベクターでの形質導入後１６週目の血液、脾臓、及び骨髄のＭＮＣにおける系譜陽性細胞組成を非形質導入対照マウスと比較したものを示す。
【図１０７Ｆ】ＣＤ４６／β－ＹＡＣ形質導入マウスから得られたＬｉｎ－細胞の二次レシピエントを分析したものを示す。ＨＤＡｄ－統合群から得られた全白血球における細胞当たりのベクターコピー数を、γ－グロビンプライマーを使用するｑＰＣＲによって測定したものを示す。
【図１０８Ａ】ＳＣＤのモデルとしての三重トランスジェニックＣＤ４６／Ｔｏｗｎｅｓマウスの生成及び特徴付けを示す。ＣＤ４６／Ｔｏｗｎｅｓマウスの交配繁殖を示す。Ｔｏｗｎｅｓマウス（ｈα／ｈα：：$\beta^{S}$／$\beta^{S}$）をＣＤ４６トランスジェニックマウスと３回交配繁殖させた。ＣＤ４６、ＨｂＳ、及びＨＢＡについてホモ接合型の動物をインビボでの形質導入試験に使用した。
【図１０８Ｂ】ＳＣＤのモデルとしての三重トランスジェニックＣＤ４６／Ｔｏｗｎｅｓマウスの生成及び特徴付けを示す。変形赤血球、多染性細胞（黒矢印）、鎌状細胞、及び断片化細胞（星付きの黒矢印）を含めて、ヒト疾患の典型的な特徴を有するＣＤ４６／Ｔｏｗｎｅｓマウスの末梢血塗抹標本を示す。スケールバーは１５μｍである。
【図１０８Ｃ】ＳＣＤのモデルとしての三重トランスジェニックＣＤ４６／Ｔｏｗｎｅｓマウスの生成及び特徴付けを示す。ＣＤ４６／Ｔｏｗｎｅｓマウスから得られた末梢血を

血液学的に分析して「健康な」親ＣＤ４６トランスジェニックマウスと比較したものを示す。Ｒｅｔ：網状赤血球、ＲＢＣ：赤血球、Ｈｂ：ヘモグロビン、ＨＣＴ：ヘマトクリット、ＷＢＣ：白血球。差はすべて有意である（ｐ＜０．０５）。

【図１０８Ｄ】ＳＣＤのモデルとしての三重トランスジェニックＣＤ４６／Ｔｏｗｎｅｓマウスの生成及び特徴付けを示す。ＣＤ４６／Ｔｏｗｎｅｓマウスにおける脾腫を示す。ＣＤ４６ｔｇマウス及びＣＤ４６／Ｔｏｗｎｅｓマウスにおける体重に対する脾臓の比が示される。Ｎ＝３。

【図１０９Ａ】ＣＤ４６／ＴｏｗｎｅｓマウスのＨＳＰＣの形質導入をインビボで行った後のγ－グロビンの発現を示す。マウスの動員処理を行い、マウスにＨＤＡｄ－統合＋ＨＤＡｄ－ＳＢを注射し、図１０４向けに記載されるように$O^6$ＢＧ／ＢＣＮＵでマウスを処理した。末梢ＲＢＣにおけるγ－グロビンマーキングをフローサイトメトリーによって測定したものを示す。白四角は、非処理ＣＤ４６／ＴｏｗｎｅｓマウスのＲＢＣにおけるマーキングを示す。垂直矢印はインビボでの選択サイクルを示す。

【図１０９Ｂ】ＣＤ４６／ＴｏｗｎｅｓマウスのＨＳＰＣの形質導入をインビボで行った後のγ－グロビンの発現を示す。マウスの動員処理を行い、マウスにＨＤＡｄ－統合＋ＨＤＡｄ－ＳＢを注射し、図１０４向けに記載されるように$O^6$ＢＧ／ＢＣＮＵでマウスを処理した。ＲＢＣ中のγ－グロビンレベルを１３週目にＨＰＬＣによって測定したものを示す。左パネル：個々のマウスにおけるヒトα－グロビン鎖及び$\beta^s$－グロビン鎖に対する全γ－グロビンのレベルのまとめ。白四角は非処理ＣＤ４６／ＴｏｗｎｅｓマウスのＲＢＣ中レベルを示す。右パネル：処理前のＣＤ４６／Ｔｏｗｎｅｓマウスの代表的なクロマトグラム（上パネル）、及びＨＤＡｄ－統合＋ＨＤＡｄ－ＳＢでのインビボでのＨＳＰＣの形質導入後１３週目のＣＤ４６／Ｔｏｗｎｅｓマウスの代表的なクロマトグラム。ヒトβ－グロビン、$\beta^s$－グロビン、再活性化Ａγ、及び付加されたγ－グロビンのピークが示される。

【図１０９Ｃ】ＣＤ４６／ＴｏｗｎｅｓマウスのＨＳＰＣの形質導入をインビボで行った後のγ－グロビンの発現を示す。マウスの動員処理を行い、マウスにＨＤＡｄ－統合＋ＨＤＡｄ－ＳＢを注射し、図１０４向けに記載されるように$O^6$ＢＧ／ＢＣＮＵでマウスを処理した。ＨＰＬＣに基づく再活性化Ａγのパーセントを示す。

【図１０９Ｄ】ＣＤ４６／ＴｏｗｎｅｓマウスのＨＳＰＣの形質導入をインビボで行った後のγ－グロビンの発現を示す。マウスの動員処理を行い、マウスにＨＤＡｄ－統合＋ＨＤＡｄ－ＳＢを注射し、図１０４向けに記載されるように$O^6$ＢＧ／ＢＣＮＵでマウスを処理した。個々のマウスにおけるヒトα－グロビン及び$\beta^s$－グロビンのｍＲＮＡに対する全γ－グロビンｍＲＮＡのパーセントを示す。

【図１０９Ｅ】ＣＤ４６／ＴｏｗｎｅｓマウスのＨＳＰＣの形質導入をインビボで行った後のγ－グロビンの発現を示す。マウスの動員処理を行い、マウスにＨＤＡｄ－統合＋ＨＤＡｄ－ＳＢを注射し、図１０４向けに記載されるように$O^6$ＢＧ／ＢＣＮＵでマウスを処理した。ＨＤＡｄ－統合での形質導入後１６３週目の骨髄ＨＳＰＣにおける組み込みベクターコピー数を測定したものを示す。

【図１０９Ｆ】ＣＤ４６／ＴｏｗｎｅｓマウスのＨＳＰＣの形質導入をインビボで行った後のγ－グロビンの発現を示す。マウスの動員処理を行い、マウスにＨＤＡｄ－統合＋ＨＤＡｄ－ＳＢを注射し、図１０４向けに記載されるように$O^6$ＢＧ／ＢＣＮＵでマウスを処理した。ＨＤＡｄ－統合の注射後１３週目のＣＤ４６／Ｔｏｗｎｅｓマウスの全骨髄核細胞、Ｌｉｎ$^-$細胞、ＰＢＭＣ、及び脾細におけるＨＢＧ１／２標的部位の切断を示す。特異的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９切断断片（２５５ｂｐ及び１１０ｂｐ）は矢印によって印付けされている。各レーンの下には、バンドシグナルの定量化に基づく切断パーセントが示される。

【図１１０】形質導入ＣＤ４６／Ｔｏｗｎｅｓマウスから得られたＬｉｎ$^-$細胞を移植した二次レシピエントの分析を示す。（Ａ）ヒトγ－グロビン発現末梢血ＲＢＣのパーセントを示す。（Ｂ）移植後１６週目のヒトα－グロビン及び$\beta^S$グロビンに対するγ－グロビンタンパク質のレベルを示す。

【図１１１Ａ】血中の表現型修正を示す。ブリリアントクレシルブルーによって網状赤血球を染色した血液塗抹標本を示す。この色素は、核コンパートメント及び細胞質コンパートメントの残留物を染色するものである（定量化したものについては図１０９Ｃ（最初のバー群）で見ることができる）スケールバーは２０μｍである。
【図１１１Ｂ】血中の表現型修正を示す。ＨＤＡｄ－統合による遺伝子治療後に赤血球形態が正球性であることを示す血液塗抹標本を示す。
【図１１１Ｃ】血中の表現型修正を示す。末梢血の血液学的分析を示す。「ＣＤ４６」と「統合ベクターによる処理後１３週目のＣＤ４６／Ｔｏｗｎｅｓ」との間の差は有意なものではない。
【図１１２Ａ】脾臓及び肝臓における表現型修正を示す。組織学的分析を示す。上パネル：脾臓における鉄沈着。パールプルシアンブルー染色によって脾臓切片におけるヘモジデリンを検出した。スケールバーは２０μｍである。中央パネル及び下パネル：脾臓切片及び肝臓切片における髄外造血のヘマトキシリン／エオシン染色。ＣＤ４６／Ｔｏｗｎｅｓマウスの肝臓中の赤芽球クラスター及び脾臓中の巨核球クラスターが白矢印によって示される。スケールバーは２０μｍである。示される画像は代表的なものである。
【図１１２Ｂ】脾臓及び肝臓における表現型修正を示す。処理ＣＤ４６／Ｔｏｗｎｅｓマウスの脾臓サイズ（測定可能な代償性造血特徴）は父性ＣＤ４６マウスと同等である。
【図１１２Ｃ】脾臓及び肝臓における表現型修正を示す。図１１２Ａの肝臓切片画像の４倍拡大図を示す。処理前のＣＤ４６／Ｔｏｗｎｅｓマウスでは鎌状ＲＢＣが肝類洞に捕捉されており（左パネル）、処理後は肝類洞に鎌状赤血球は存在しない（右パネル）。
【図１１３】Ａｄ５／３５ヘルパーウイルスゲノムの左末端を示す。濃灰色の影付き配列は天然のＡｄ５配列に対応し、すなわち、影なしの配列または薄灰色で強調された配列は人工的に導入したものである。薄灰色で強調された配列は、（縦列反復）ｌｏｘＰ配列の２つのコピーである。「ｃｒｅリコンビナーゼ」タンパク質が存在する場合、２つのｌｏｘＰ配列の間のヌクレオチド配列が欠失する（１つのｌｏｘＰコピーが残る）。ｌｏｘＰ部位の間のＡｄ５配列は（産生細胞の核中で）アデノウイルスＤＮＡをカプシドにパッケージングする上で必要不可欠なものであるため、これが欠失するとヘルパーアデノウイルスゲノムＤＮＡのパッケージングが不可能となる。結果的に、欠失プロセスの効率は、ヘルパーゲノムＤＮＡのパッケージング（望ましくないヘルパーウイルス「混入」）レベルに直接的に影響を及ぼす。上記の観点から、同じスキームをＡｄ５以外のアデノウイルス血清型にあてはめるには、下記のことを達成することが望ましい：１．パッケージングに必要不可欠な配列を同定し、そうした配列をｌｏｘＰ配列挿入と隣接させ、ｃｒｅリコンビナーゼの存在下では欠失し得るようにすること。配列に類似性がほどんど存在しない場合、こうした配列を同定することは容易ではない。２．ヘルパーウイルスの（ｃｒｅリコンビナーゼの非存在下での）増殖及びパッケージングにｌｏｘＰ配列の挿入が与える影響が最小となるであろう場所を天然のＤＮＡ配列の中で決定すること。３．ヘルパー依存型アデノウイルスの産生（すなわち、ｃｒｅリコンビナーゼ発現細胞株（１１６細胞株など）での産生）の間にパッケージング配列が効率的に欠失し、ヘルパーウイルスがパッケージングされることを最小限に保つことを可能にするｌｏｘＰ配列間間隔を決定すること。
【図１１４】Ａｄ５パッケージングシグナル（配列番号４９）とＡｄ３５パッケージングシグナル（配列番号５０）とのアライメントを示す。パッケージングシグナルの同定においてはＡｄ５の左末端配列とＡｄ３５の左末端配列とのアライメントをとることが有用である。パッケージングに重要なＡｄ５配列中モチーフ（ＡＩ～ＡＶ）は箱で示される（Ｓｃｈｍｉｄ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｖｉｒｏｌ．，７１（５）：３３７５－４，１９９７の図１Ｂを参照のこと）。ｌｏｘＰ挿入部位の位置は黒矢印によって示される。これらの挿入はＡＩ～ＡＩＶと隣接しており、ＡＶを破壊していることが見て取れる。さらなるパッケージングシグナルＡＶＩ及びＡＶＩＩ（Ｓｃｈｍｉｄ ｅｔ ａｌ．に示されるもの）は、Ａｄ５ヘルパーウイルスのＥ１欠失の一部としてこのベクター中から欠失していることに留意されたい。
【図１１５】ｐＡｄ３５ＧＬＮ－５Ｅ４の模式図を示す。これは、組換え操作手法を使用

してベクター化されたＡｄ３５ゲノム（ＡＴＣＣから入手したＨｏｌｄｅｎ株）（ＰＭＩＤ：２８５３８１８６）から得られた第１世代の（Ｅ１／Ｅ３欠失）Ａｄ３５ベクターである。次に、このベクタープラスミドを、ｌｏｘＰ部位の挿入に使用した。

【図１１６】プラスミドパッケージングシグナルに関する情報を示す。パッケージング部位（ＰＳ）１　ＬｏｘＰ挿入部位は、ヌクレオチド１７８及びヌクレオチド３４４の後に位置する。これによってＡＩ～ＡＩＶが除去されることになる。ＡＶＩ及びＡＶＩＩ（３４４の後に位置する）を含む残りのパッケージングシグナルは欠失している（Ｅ１欠失（３４５～３１１３）の一部として欠失している）。ＰＳ２　ＬｏｘＰ挿入部位はヌクレオチド１７８及びヌクレオチド４８１の後に位置する。さらに、ヌクレオチド１７９～３６５は欠失しているため、ＡＩ～ＡＶは存在しない。残りのパッケージングモチーフ（ＡＶＩ及びＡＶＩＩ）は、ＨＤＡｄ産生の間にｃｒｅリコンビナーゼによって除去可能である。Ｅ１の欠失で４８２～３１１３は欠失している。ＰＳ３　ＬｏｘＰ挿入部位はヌクレオチド１５４及びヌクレオチド４８１の後に位置する。これら３つの操作されたベクターはレスキュー可能なものである。ｌｏｘＰ部位が再配置されたウイルスゲノムのパーセントは、ＰＳ１、ＰＳ２、及びＰＳ３について、それぞれ５０％、２０％、及び６０％であった。再配置は、ｌｏｘＰ部位がウイルスの複製及び遺伝子発現に決定的に影響を及ぼす場合に生じる。ｌｏｘＰ部位が再配置されたベクターは、パッケージングされる可能性があり、ＨＤＡｄ調製物に混入することになる。配列番号２８６、配列番号５１、及び配列番号５２はベクターの例であり、これらの例は、それぞれＰＳ１、ＰＳ２、及びＰＳ３として図示されている。

【図１１７】次世代ＨＤＡｄ３５プラットホームを、現在のＨＤＡｄ５／３５プラットホームと比較したものを示す。両方のベクターがＣＭＶ－ＧＦＰカセットを含む。このＡｄ３５ベクターは、免疫原性であるＡｄ５カプシドタンパク質を含まない。これらが示すインビトロでのＣＤ３４＋細胞の形質導入効率は同等である。ブリッジング試験は、インビトロでのＣＤ３４＋細胞の形質導入効率が同等であることを示している。Ｇ－ＣＳＦで動員処理したドナーから得られたヒトＨＳＣ（末梢ＣＤ３４＋細胞）の形質導入を、ＨＤＡｄ３５（Ａｄ３５ヘルパーＰ－２で産生させた）またはＡｄ３５由来のファイバーを有するＡｄ５カプシドを含むキメラベクターを用いて５００ｖｐ／細胞、１０００ｖｐ／細胞、２０００ｖｐ／細胞のＭＯＩで行った。３つの独立した実験においてウイルスの添加から４８時間後にＧＦＰ陽性細胞のパーセントを測定した。注目すべきことに、４８時間の時点で、ＨＤＡｄ３５での感染がヘルパーウイルス混入に起因する細胞変性効果を引き起こした。

【図１１８】サル試験に焦点を当てるためにＰＳ２ヘルパーベクターを作製し直した。以下の操作を行った：Ｅ１領域の欠失、変異パッケージングシグナルとＬｏｘｐとの隣接配置、変異パッケージング配列の使用、Ｅ３領域（２７４３５→３０５４０）の欠失、Ａｄ５　Ｅ４ｏｒｆ６での置換、ｃｏｐＧＦＰカセットと隣接するスタッファーＤＮＡの挿入、及びノブへの変異導入によるＡｄ３５Ｋ＋＋の作製。

【図１１９】提供される変異パッケージングシグナル配列を示す。残基１～１３７はＡｄ３５　ＩＴＲである。太字のテキストはＳｗａＩ部位であり、Ｌｏｘｐ部位はイタリック体で示され、変異パッケージングシグナルは下線付きで示される。

【図１２０Ａ】さまざまなヘルパーベクター及びパッケージングシグナルバリアントの模式図を示す。いくつかの実施形態では、Ｅ３領域（２７３８８→３０４０２）は欠失され、Ｅ３欠失部内にＣＭＶ－ｅＧＦＰカセットが位置し、Ａｄ３５Ｋ＋＋が存在し、ｃｏｐＧＦＰの代わりにｅＧＦＰが使用される。（図１２０Ａ）に示されるパッケージングシグナルバリアントを含む４つのヘルパーベクターはすべて、レスキュー可能なものである。増幅効率が向上し得るようにｌｏｘＰ部位を再配置した。図１２０Ｂには追加のパッケージングシグナルバリアントの例が示される。

【図１２０Ｂ】さまざまなヘルパーベクター及びパッケージングシグナルバリアントの模式図を示す。いくつかの実施形態では、Ｅ３領域（２７３８８→３０４０２）は欠失され、Ｅ３欠失部内にＣＭＶ－ｅＧＦＰカセットが位置し、Ａｄ３５Ｋ＋＋が存在し、ｃｏｐ

ＧＦＰの代わりにｅＧＦＰが使用される。（図１２０Ａ）に示されるパッケージングシグナルバリアントを含む４つのヘルパーベクターはすべて、レスキュー可能なものである。増幅効率が向上し得るようにｌｏｘＰ部位を再配置した。図１２０Ｂには追加のパッケージングシグナルバリアントの例が示される。
【図１２１】ＨＤＡｄ－統合ベクターを図示したものである。
【図１２２】実験プロトコールを示す。
【図１２３】＋５８赤血球ｂｃｌ１１ａエンハンサー領域内のＧＡＴＡＡモチーフを編集するためのベクターを示す。上パネルにはベクター構造が示される。これらのベクターは両方共、ＧＡＴＡＡモチーフを標的とするものである。下パネルは、ＨＤＡｄ－Ｃ－ＢＥベクターによって媒介される塩基変更を示す（配列番号６５～６８）。
【図１２４Ａ】ヒトＣＤ３４＋細胞でのベクターの分析を示す。２０００ｖｐ／細胞のＭＯＩで細胞の感染処理を行い、１日後にこの細胞を１８日間の赤血球分化に供したものを示す。
【図１２４Ｂ】ヒトＣＤ３４＋細胞でのベクターの分析を示す。異なる時点でＴ７Ｅ１Ａアッセイによって一定分量の細胞の標的部位切断を分析したものを示す。左のバー：ＨＤＡｄ－ｗｔＣＲＩＳＰＲ、右のバー：ＨＤＡｄ－Ｃ－ＢＥ。
【図１２４Ｃ】ヒトＣＤ３４＋細胞でのベクターの分析を示す。赤血球分化の終了時点のγ－グロビン＋細胞のパーセントを示す。
【図１２５】ＨＤＡｄ－ｗｔＣＲＩＳＰＲで形質導入したＣＤ３４＋細胞及びＨＤＡｄ－Ｃ－ＢＥで形質導入したＣＤ３４＋細胞の生着を示す。形質導入のＭＯＩは、２０００ｖｐ／細胞とした。末梢血単核細胞におけるヒトＣＤ４５＋細胞のパーセントに基づいて生着を測定した。
【図１２６－１】塩基エディターＨＤＡｄベクターを示す。ｓｇＲＮＡは、赤血球ｂｃｌ１１ａエンハンサー（上パネル）またはＨＢＧ１／２中のＢＣＬ１１ａタンパク質結合部位を標的とする。中央パネルは、赤血球前駆細胞株ＨＵＤＥＰ－２の赤血球分化の日の塩基変換％を示す。右パネルは、γ－グロビン再活性化のレベルを示す。（配列番号６７、配列番号６５、及び配列番号７１）。
【図１２６－２】塩基エディターＨＤＡｄベクターを示す。ｓｇＲＮＡは、赤血球ｂｃｌ１１ａエンハンサー（上パネル）またはＨＢＧ１／２中のＢＣＬ１１ａタンパク質結合部位を標的とする。中央パネルは、赤血球前駆細胞株ＨＵＤＥＰ－２の赤血球分化の日の塩基変換％を示す。右パネルは、γ－グロビン再活性化のレベルを示す。（配列番号６７、配列番号６５、及び配列番号７１）。
【図１２６－３】塩基エディターＨＤＡｄベクターを示す。ｓｇＲＮＡは、赤血球ｂｃｌ１１ａエンハンサー（上パネル）またはＨＢＧ１／２中のＢＣＬ１１ａタンパク質結合部位を標的とする。中央パネルは、赤血球前駆細胞株ＨＵＤＥＰ－２の赤血球分化の日の塩基変換％を示す。右パネルは、γ－グロビン再活性化のレベルを示す。（配列番号６７、配列番号６５、及び配列番号７１）。
【図１２６－４】塩基エディターＨＤＡｄベクターを示す。ｓｇＲＮＡは、赤血球ｂｃｌ１１ａエンハンサー（上パネル）またはＨＢＧ１／２中のＢＣＬ１１ａタンパク質結合部位を標的とする。中央パネルは、赤血球前駆細胞株ＨＵＤＥＰ－２の赤血球分化の日の塩基変換％を示す。右パネルは、γ－グロビン再活性化のレベルを示す。（配列番号６７、配列番号６５、及び配列番号７１）。
【図１２７】（Ａ）典型的な鎌状赤血球を含む血液塗抹標本を示す。（Ｂ）赤血球パラメーターを示す。
【図１２８Ａ】インビボでの選択を行わないインビボでのＴｏｗｎｅｓ／ＣＤ４６マウスの形質導入を示す。
【図１２８Ｂ】ＲＢＣ中のγ－グロビンの再活性化を示す。
【図１２８Ｃ】処理前及び処理８週目の血液塗抹標本の網状赤血球を染色したものを示す。
【図１２９Ａ】動員処理したマカクにおけるインビボでのＨＳＣの形質導入を示す。Ｇ－

ＣＳＦ、ＳＣＦ、及びＡＭＤ３１００での動員処理後、２匹の雄性マカクにＨＤＡｄ－ＧＦＰ（１×１０$^{12}$ｖｐ／ｋｇ）を静脈内注射した。ＨＤＡｄの注射前にデキサメタゾンで動物を前処理して潜在的なサイトカイン放出を遮断した。示される時点で精製した末梢血ＣＤ３４＋細胞を培養し、フローサイトメトリーによってそのＧＦＰ発現を分析したものを示す。培養４日間にわたるＧＦＰ発現細胞の平均パーセントが示される。

【図１２９Ｂ】動員処理したマカクにおけるインビボでのＨＳＣの形質導入を示す。Ｇ－ＣＳＦ、ＳＣＦ、及びＡＭＤ３１００での動員処理後、２匹の雄性マカクにＨＤＡｄ－ＧＦＰ（１×１０$^{12}$ｖｐ／ｋｇ）を静脈内注射した。ＨＤＡｄの注射前にデキサメタゾンで動物を前処理して潜在的なサイトカイン放出を遮断した。ＨＤＡｄ－ＧＦＰ注射の前（０時間）及び後（６時間）に精製したＧＦＰ発現ＣＤ３４＋細胞の代表的なフロープロットを示す。

【図１２９Ｃ】動員処理したマカクにおけるインビボでのＨＳＣの形質導入を示す。Ｇ－ＣＳＦ、ＳＣＦ、及びＡＭＤ３１００での動員処理後、２匹の雄性マカクにＨＤＡｄ－ＧＦＰ（１×１０$^{12}$ｖｐ／ｋｇ）を静脈内注射した。ＨＤＡｄの注射前にデキサメタゾンで動物を前処理して潜在的なサイトカイン放出を遮断した。末梢血または全ＰＢＭＣから精製したＣＤ３４＋細胞を用いて開始したコロニー形成アッセイを示す。１４日間培養後、個々のコロニーをピッキングし、ＰＣＲによってＧＦＰ　ＤＮＡの存在について分析した。

【図１２９Ｄ】動員処理したマカクにおけるインビボでのＨＳＣの形質導入を示す。Ｇ－ＣＳＦ、ＳＣＦ、及びＡＭＤ３１００での動員処理後、２匹の雄性マカクにＨＤＡｄ－ＧＦＰ（１×１０$^{12}$ｖｐ／ｋｇ）を静脈内注射した。ＨＤＡｄの注射前にデキサメタゾンで動物を前処理して潜在的なサイトカイン放出を遮断した。骨髄ＣＤ３４＋細胞におけるＧＦＰの発現を分析したものを示す。代表的なブロットが示される。この試験では、ＨＤＡｄ－ＧＦＰのみを注射したため、測定されたＧＦＰ発現は短期的なものにすぎなかった。

【図１３０】ガイド配列のスクリーニングを示す。表１４に記載の塩基エディターをＨＵＤＥＰ－２細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションから４日後（４ｄｐｔ）及びインビトロでの赤血球分化から６日後（Ｄｉｆｆ６ｄ）にγ－グロビンの発現を測定した。ＨＢＧ１／２プロモーター中のＴＧＡＣＣＡモチーフを標的とするＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ベクターを陽性対照（ｐｏｓ　ｃｔｒｌ）として使用した。ＣＣＲ５コード領域を標的とするＣＢＥを陰性対照（ｓｇＮｅｇ）として含めた。示されるデータ（平均値±ＳＤ）は、２つの独立した実験を代表するものである。

【図１３１】異なるバージョンのシチジン塩基エディターを比較したものを示す。（Ａ）ＷＴＣａｓ９ベクターまたはＢＥベクター＋ｐＳＰ－ＢＥ４－ｓｇＢＣＬ１１Ａｅ１（３＋１μｇ）を２９３細胞（ＨＥＫ２９３）にトランスフェクションし、トランスフェクションから４日後にＴ７Ｅ１アッセイによってｂｃｌ１１ａエンハンサー標的部位の切断を分析した。（Ｂ）エリスロ白血病細胞株（Ｋ５６２）（ＷＴＣａｓ９ベクターまたはＢＥベクター＋ｐＳＰ－ＢＥ４－ｓｇＢＣＬ１１Ａｅ１（２＋０．６６μｇ））において同じ試験を実施した。

【図１３２Ａ】ＨＤＡｄ５／３５＋＋＿ＢＥベクターの設計及びレスキューを示す。シチジン塩基エディター（ＣＢＥ）ベクターの設計を示す。レスキュー可能であったが、収率の低いものであった。

【図１３２Ｂ】ＨＤＡｄ５／３５＋＋＿ＢＥベクターの設計及びレスキューを示す。第１バージョンのアデニン塩基エディター（ＡＢＥ）ベクターの設計を示す。レスキュー不可能なものであった。

【図１３２Ｃ】ＨＤＡｄ５／３５＋＋＿ＢＥベクターの設計及びレスキューを示す。反復性を低減するためのＡＢＥのコドン最適化を示す。ＴａｄＡ（ｔＲＮＡアデノシンデアミナーゼ酵素）のコドン最適化を示す配列比較（配列番号２６０及び配列番号２６１）が含まれる。

【図１３３Ａ】ＨＤＡｄ５／３５＋＋＿ＢＥベクターの構築及び検証を示す。（図１３３

Ａ）ＨＤＡｄ＿ＡＢＥベクターの図を示す。２つのｆｒｔ－ＩＲと隣接する４．２ｋｂのＭＧＭＴ／ＧＦＰカセットによって、ＨＤＡｄ＿ＳＢベクターとの同時送達時に統合発現が可能になる。８．０ｋｂの塩基エディター要素は、一過性発現となるように、トランスポゾンの外側に位置するように設計した。２つのＴａｄＡＮ反復配列は配列反復性が低減されるようにコドン最適化に供した（＊は触媒的反復配列を示す）。マイクロＲＮＡ応答エレメント（ｍｉＲ）を３’ヒトβ－グロビンＵＴＲ中に埋め込むことで、１１６細胞におけるＡＢＥの発現を特異的に下方制御することによって産生細胞に対する毒性を最小化した。ＰＧＫ：ヒトＰＧＫプロモーター。ｂＧＨｐＡ：ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列。ＳＶ４０ｐＡ：サルウイルス４０ポリアデニル化シグナル。ＩＴＲ：逆方向末端反復配列。Ψ：パッケージングシグナル。（図１３３Ｂ）生成ウイルスベクターの情報を示す。記載の収量は、１つの３Ｌスピナーフラスコから得られた収量である。（図１３３Ｃ）ＨＵＤＥＰ－２細胞におけるウイルスベクターの検証を示す。示されるＭＯＩ（ｖｐ／細胞）でさまざまなベクターを用いて細胞の形質導入を行った。トランスフェクションから４日後（４ｄｐｔ）及びインビトロでの赤血球分化から６日後（Ｄｉｆｆ６ｄ）にγ－グロビンの発現を測定した。ＣＣＲ５コード領域を標的とするＣＢＥベクターを陰性対照（ｓｇＮｅｇ）として含めた。示されるデータ（平均値±ＳＤ）は、２つの独立した実験を代表するものである。（図１３３Ｄ）ＨＤＡｄ＿ｓｇＨＢＧ＃２による標的塩基の変換を示す。標的塩基を含むＨＢＧ１ゲノムセグメントまたはＨＢＧ２ゲノムセグメントを増幅し、サンガーシークエンシングに供した。データの解析はＥｄｉｔＲ１．０．９によって行った。矢印は標的塩基を示す。クロマトグラムの下には変換％が示される。（図１３３Ｅ）α－グロビンまたはβ－グロビンに対するγ－グロビンの発現％を分化後６日目にＨＰＬＣによって測定したものを示す。ＭＯＩ＝１０００。示されるデータ（平均値±ＳＤ）は、２つの独立した実験を代表するものである。（図１３３Ｆ～１３３Ｈ）ＨＤＡｄ＿ｓｇＨＢＧ＃２で形質導入したＨＵＤＥＰ－２細胞から得られた代表的なクローン（＃３）を示す。一方のアレルにおいてＨＢＧ１プロモーター中での１１６Ａ→Ｇの塩基変換が検出され（図１３３Ｆ）、その結果、フローサイトメトリーによるγ－グロビン＋細胞の％は１００％であった（図１３３Ｇ）。（図１３３Ｈ）γ－グロビンタンパク質のレベルをＨＰＬＣによって測定したものを示す。

【図１３３Ｂ】ＨＤＡｄ５／３５＋＋＿ＢＥベクターの構築及び検証を示す。（図１３３Ａ）ＨＤＡｄ＿ＡＢＥベクターの図を示す。２つのｆｒｔ－ＩＲと隣接する４．２ｋｂのＭＧＭＴ／ＧＦＰカセットによって、ＨＤＡｄ＿ＳＢベクターとの同時送達時に統合発現が可能になる。８．０ｋｂの塩基エディター要素は、一過性発現となるように、トランスポゾンの外側に位置するように設計した。２つのＴａｄＡＮ反復配列は配列反復性が低減されるようにコドン最適化に供した（＊は触媒的反復配列を示す）。マイクロＲＮＡ応答エレメント（ｍｉＲ）を３’ヒトβ－グロビンＵＴＲ中に埋め込むことで、１１６細胞におけるＡＢＥの発現を特異的に下方制御することによって産生細胞に対する毒性を最小化した。ＰＧＫ：ヒトＰＧＫプロモーター。ｂＧＨｐＡ：ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列。ＳＶ４０ｐＡ：サルウイルス４０ポリアデニル化シグナル。ＩＴＲ：逆方向末端反復配列。Ψ：パッケージングシグナル。（図１３３Ｂ）生成ウイルスベクターの情報を示す。記載の収量は、１つの３Ｌスピナーフラスコから得られた収量である。（図１３３Ｃ）ＨＵＤＥＰ－２細胞におけるウイルスベクターの検証を示す。示されるＭＯＩ（ｖｐ／細胞）でさまざまなベクターを用いて細胞の形質導入を行った。トランスフェクションから４日後（４ｄｐｔ）及びインビトロでの赤血球分化から６日後（Ｄｉｆｆ６ｄ）にγ－グロビンの発現を測定した。ＣＣＲ５コード領域を標的とするＣＢＥベクターを陰性対照（ｓｇＮｅｇ）として含めた。示されるデータ（平均値±ＳＤ）は、２つの独立した実験を代表するものである。（図１３３Ｄ）ＨＤＡｄ＿ｓｇＨＢＧ＃２による標的塩基の変換を示す。標的塩基を含むＨＢＧ１ゲノムセグメントまたはＨＢＧ２ゲノムセグメントを増幅し、サンガーシークエンシングに供した。データの解析はＥｄｉｔＲ１．０．９によって行った。矢印は標的塩基を示す。クロマトグラムの下には変換％が示される。（図１３３Ｅ）α－グロビンまたはβ－グロビンに対するγ－グロビンの発現％を分化後６日目に

ＨＰＬＣによって測定したものを示す。ＭＯＩ＝１０００。示されるデータ（平均値±ＳＤ）は、２つの独立した実験を代表するものである。（図１３３Ｆ～１３３Ｈ）ＨＤＡｄ＿ｓｇＨＢＧ＃２で形質導入したＨＵＤＥＰ－２細胞から得られた代表的なクローン（＃３）を示す。一方のアレルにおいてＨＢＧ１プロモーター中での１１６Ａ→Ｇの塩基変換が検出され（図１３３Ｆ）、その結果、フローサイトメトリーによるγ－グロビン＋細胞の％は１００％であった（図１３３Ｇ）。（図１３３Ｈ）γ－グロビンタンパク質のレベルをＨＰＬＣによって測定したものを示す。

【図１３３Ｃ】ＨＤＡｄ５／３５＋＋＿ＢＥベクターの構築及び検証を示す。（図１３３Ａ）ＨＤＡｄ＿ＡＢＥベクターの図を示す。２つのｆｒｔ－ＩＲと隣接する４．２ｋｂのＭＧＭＴ／ＧＦＰカセットによって、ＨＤＡｄ＿ＳＢベクターとの同時送達時に統合発現が可能になる。８．０ｋｂの塩基エディター要素は、一過性発現となるように、トランスポゾンの外側に位置するように設計した。２つのＴａｄＡＮ反復配列は配列反復性が低減されるようにコドン最適化に供した（＊は触媒的反復配列を示す）。マイクロＲＮＡ応答エレメント（ｍｉＲ）を３’ヒトβ－グロビンＵＴＲ中に埋め込むことで、１１６細胞におけるＡＢＥの発現を特異的に下方制御することによって産生細胞に対する毒性を最小化した。ＰＧＫ：ヒトＰＧＫプロモーター。ｂＧＨｐＡ：ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列。ＳＶ４０ｐＡ：サルウイルス４０ポリアデニル化シグナル。ＩＴＲ：逆方向末端反復配列。Ψ：パッケージングシグナル。（図１３３Ｂ）生成ウイルスベクターの情報を示す。記載の収量は、１つの３Ｌスピナーフラスコから得られた収量である。（図１３３Ｃ）ＨＵＤＥＰ－２細胞におけるウイルスベクターの検証を示す。示されるＭＯＩ（ｖｐ／細胞）でさまざまなベクターを用いて細胞の形質導入を行った。トランスフェクションから４日後（４ｄｐｔ）及びインビトロでの赤血球分化から６日後（Ｄｉｆｆ６ｄ）にγ－グロビンの発現を測定した。ＣＣＲ５コード領域を標的とするＣＢＥベクターを陰性対照（ｓｇＮｅｇ）として含めた。示されるデータ（平均値±ＳＤ）は、２つの独立した実験を代表するものである。（図１３３Ｄ）ＨＤＡｄ＿ｓｇＨＢＧ＃２による標的塩基の変換を示す。標的塩基を含むＨＢＧ１ゲノムセグメントまたはＨＢＧ２ゲノムセグメントを増幅し、サンガーシークエンシングに供した。データの解析はＥｄｉｔＲ１．０．９によって行った。矢印は標的塩基を示す。クロマトグラムの下には変換％が示される。（図１３３Ｅ）α－グロビンまたはβ－グロビンに対するγ－グロビンの発現％を分化後６日目にＨＰＬＣによって測定したものを示す。ＭＯＩ＝１０００。示されるデータ（平均値±ＳＤ）は、２つの独立した実験を代表するものである。（図１３３Ｆ～１３３Ｈ）ＨＤＡｄ＿ｓｇＨＢＧ＃２で形質導入したＨＵＤＥＰ－２細胞から得られた代表的なクローン（＃３）を示す。一方のアレルにおいてＨＢＧ１プロモーター中での１１６Ａ→Ｇの塩基変換が検出され（図１３３Ｆ）、その結果、フローサイトメトリーによるγ－グロビン＋細胞の％は１００％であった（図１３３Ｇ）。（図１３３Ｈ）γ－グロビンタンパク質のレベルをＨＰＬＣによって測定したものを示す。

【図１３３Ｄ】ＨＤＡｄ５／３５＋＋＿ＢＥベクターの構築及び検証を示す。（図１３３Ａ）ＨＤＡｄ＿ＡＢＥベクターの図を示す。２つのｆｒｔ－ＩＲと隣接する４．２ｋｂのＭＧＭＴ／ＧＦＰカセットによって、ＨＤＡｄ＿ＳＢベクターとの同時送達時に統合発現が可能になる。８．０ｋｂの塩基エディター要素は、一過性発現となるように、トランスポゾンの外側に位置するように設計した。２つのＴａｄＡＮ反復配列は配列反復性が低減されるようにコドン最適化に供した（＊は触媒的反復配列を示す）。マイクロＲＮＡ応答エレメント（ｍｉＲ）を３’ヒトβ－グロビンＵＴＲ中に埋め込むことで、１１６細胞におけるＡＢＥの発現を特異的に下方制御することによって産生細胞に対する毒性を最小化した。ＰＧＫ：ヒトＰＧＫプロモーター。ｂＧＨｐＡ：ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列。ＳＶ４０ｐＡ：サルウイルス４０ポリアデニル化シグナル。ＩＴＲ：逆方向末端反復配列。Ψ：パッケージングシグナル。（図１３３Ｂ）生成ウイルスベクターの情報を示す。記載の収量は、１つの３Ｌスピナーフラスコから得られた収量である。（図１３３Ｃ）ＨＵＤＥＰ－２細胞におけるウイルスベクターの検証を示す。示されるＭＯＩ（ｖｐ／細胞）でさまざまなベクターを用いて細胞の形質導入を行った。トランスフェクションか

ら４日後（４ｄｐｔ）及びインビトロでの赤血球分化から６日後（Ｄｉｆｆ６ｄ）にγ－グロビンの発現を測定した。ＣＣＲ５コード領域を標的とするＣＢＥベクターを陰性対照（ｓｇＮｅｇ）として含めた。示されるデータ（平均値±ＳＤ）は、２つの独立した実験を代表するものである。（図１３３Ｄ）ＨＤＡｄ＿ｓｇＨＢＧ＃２による標的塩基の変換を示す。標的塩基を含むＨＢＧ１ゲノムセグメントまたはＨＢＧ２ゲノムセグメントを増幅し、サンガーシークエンシングに供した。データの解析はＥｄｉｔＲ１．０．９によって行った。矢印は標的塩基を示す。クロマトグラムの下には変換％が示される。（図１３３Ｅ）α－グロビンまたはβ－グロビンに対するγ－グロビンの発現％を分化後６日目にＨＰＬＣによって測定したものを示す。ＭＯＩ＝１０００。示されるデータ（平均値±ＳＤ）は、２つの独立した実験を代表するものである。（図１３３Ｆ～１３３Ｈ）ＨＤＡｄ＿ｓｇＨＢＧ＃２で形質導入したＨＵＤＥＰ－２細胞から得られた代表的なクローン（＃３）を示す。一方のアレルにおいてＨＢＧ１プロモーター中での１１６Ａ→Ｇの塩基変換が検出され（図１３３Ｆ）、その結果、フローサイトメトリーによるγ－グロビン＋細胞の％は１００％であった（図１３３Ｇ）。（図１３３Ｈ）γ－グロビンタンパク質のレベルをＨＰＬＣによって測定したものを示す。

【図１３３Ｅ】ＨＤＡｄ５／３５＋＋＿ＢＥベクターの構築及び検証を示す。（図１３３Ａ）ＨＤＡｄ＿ＡＢＥベクターの図を示す。２つのｆｒｔ－ＩＲと隣接する４．２ｋｂのＭＧＭＴ／ＧＦＰカセットによって、ＨＤＡｄ＿ＳＢベクターとの同時送達時に統合発現が可能になる。８．０ｋｂの塩基エディター要素は、一過性発現となるように、トランスポゾンの外側に位置するように設計した。２つのＴａｄＡＮ反復配列は配列反復性が低減されるようにコドン最適化に供した（＊は触媒的反復配列を示す）。マイクロＲＮＡ応答エレメント（ｍｉＲ）を３’ヒトβ－グロビンＵＴＲ中に埋め込むことで、１１６細胞におけるＡＢＥの発現を特異的に下方制御することによって産生細胞に対する毒性を最小化した。ＰＧＫ：ヒトＰＧＫプロモーター。ｂＧＨｐＡ：ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列。ＳＶ４０ｐＡ：サルウイルス４０ポリアデニル化シグナル。ＩＴＲ：逆方向末端反復配列。Ψ：パッケージングシグナル。（図１３３Ｂ）生成ウイルスベクターの情報を示す。記載の収量は、１つの３Ｌスピナーフラスコから得られた収量である。（図１３３Ｃ）ＨＵＤＥＰ－２細胞におけるウイルスベクターの検証を示す。示されるＭＯＩ（ｖｐ／細胞）でさまざまなベクターを用いて細胞の形質導入を行った。トランスフェクションから４日後（４ｄｐｔ）及びインビトロでの赤血球分化から６日後（Ｄｉｆｆ６ｄ）にγ－グロビンの発現を測定した。ＣＣＲ５コード領域を標的とするＣＢＥベクターを陰性対照（ｓｇＮｅｇ）として含めた。示されるデータ（平均値±ＳＤ）は、２つの独立した実験を代表するものである。（図１３３Ｄ）ＨＤＡｄ＿ｓｇＨＢＧ＃２による標的塩基の変換を示す。標的塩基を含むＨＢＧ１ゲノムセグメントまたはＨＢＧ２ゲノムセグメントを増幅し、サンガーシークエンシングに供した。データの解析はＥｄｉｔＲ１．０．９によって行った。矢印は標的塩基を示す。クロマトグラムの下には変換％が示される。（図１３３Ｅ）α－グロビンまたはβ－グロビンに対するγ－グロビンの発現％を分化後６日目にＨＰＬＣによって測定したものを示す。ＭＯＩ＝１０００。示されるデータ（平均値±ＳＤ）は、２つの独立した実験を代表するものである。（図１３３Ｆ～１３３Ｈ）ＨＤＡｄ＿ｓｇＨＢＧ＃２で形質導入したＨＵＤＥＰ－２細胞から得られた代表的なクローン（＃３）を示す。一方のアレルにおいてＨＢＧ１プロモーター中での１１６Ａ→Ｇの塩基変換が検出され（図１３３Ｆ）、その結果、フローサイトメトリーによるγ－グロビン＋細胞の％は１００％であった（図１３３Ｇ）。（図１３３Ｈ）γ－グロビンタンパク質のレベルをＨＰＬＣによって測定したものを示す。

【図１３３Ｆ】ＨＤＡｄ５／３５＋＋＿ＢＥベクターの構築及び検証を示す。（図１３３Ａ）ＨＤＡｄ＿ＡＢＥベクターの図を示す。２つのｆｒｔ－ＩＲと隣接する４．２ｋｂのＭＧＭＴ／ＧＦＰカセットによって、ＨＤＡｄ＿ＳＢベクターとの同時送達時に統合発現が可能になる。８．０ｋｂの塩基エディター要素は、一過性発現となるように、トランスポゾンの外側に位置するように設計した。２つのＴａｄＡＮ反復配列は配列反復性が低減されるようにコドン最適化に供した（＊は触媒的反復配列を示す）。マイクロＲＮＡ応答

エレメント（ｍｉＲ）を３’ヒトβ－グロビンＵＴＲ中に埋め込むことで、１１６細胞におけるＡＢＥの発現を特異的に下方制御することによって産生細胞に対する毒性を最小化した。ＰＧＫ：ヒトＰＧＫプロモーター。ｂＧＨｐＡ：ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列。ＳＶ４０ｐＡ：サルウイルス４０ポリアデニル化シグナル。ＩＴＲ：逆方向末端反復配列。Ψ：パッケージングシグナル。（図１３３Ｂ）生成ウイルスベクターの情報を示す。記載の収量は、１つの３Ｌスピナーフラスコから得られた収量である。（図１３３Ｃ）ＨＵＤＥＰ－２細胞におけるウイルスベクターの検証を示す。示されるＭＯＩ（ｖｐ／細胞）でさまざまなベクターを用いて細胞の形質導入を行った。トランスフェクションから４日後（４ｄｐｔ）及びインビトロでの赤血球分化から６日後（Ｄｉｆｆ６ｄ）にγ－グロビンの発現を測定した。ＣＣＲ５コード領域を標的とするＣＢＥベクターを陰性対照（ｓｇＮｅｇ）として含めた。示されるデータ（平均値±ＳＤ）は、２つの独立した実験を代表するものである。（図１３３Ｄ）ＨＤＡｄ＿ｓｇＨＢＧ＃２による標的塩基の変換を示す。標的塩基を含むＨＢＧ１ゲノムセグメントまたはＨＢＧ２ゲノムセグメントを増幅し、サンガーシークエンシングに供した。データの解析はＥｄｉｔＲ１．０．９によって行った。矢印は標的塩基を示す。クロマトグラムの下には変換％が示される。（図１３３Ｅ）α－グロビンまたはβ－グロビンに対するγ－グロビンの発現％を分化後６日目にＨＰＬＣによって測定したものを示す。ＭＯＩ＝１０００。示されるデータ（平均値±ＳＤ）は、２つの独立した実験を代表するものである。（図１３３Ｆ～１３３Ｈ）ＨＤＡｄ＿ｓｇＨＢＧ＃２で形質導入したＨＵＤＥＰ－２細胞から得られた代表的なクローン（＃３）を示す。一方のアレルにおいてＨＢＧ１プロモーター中での１１６Ａ→Ｇの塩基変換が検出され（図１３３Ｆ）、その結果、フローサイトメトリーによるγ－グロビン＋細胞の％は１００％であった（図１３３Ｇ）。（図１３３Ｈ）γ－グロビンタンパク質のレベルをＨＰＬＣによって測定したものを示す。

【図１３３Ｇ】ＨＤＡｄ５／３５＋＋＿ＢＥベクターの構築及び検証を示す。（図１３３Ａ）ＨＤＡｄ＿ＡＢＥベクターの図を示す。２つのｆｒｔ－ＩＲと隣接する４．２ｋｂのＭＧＭＴ／ＧＦＰカセットによって、ＨＤＡｄ＿ＳＢベクターとの同時送達時に統合発現が可能になる。８．０ｋｂの塩基エディター要素は、一過性発現となるように、トランスポゾンの外側に位置するように設計した。２つのＴａｄＡＮ反復配列は配列反復性が低減されるようにコドン最適化に供した（＊は触媒的反復配列を示す）。マイクロＲＮＡ応答エレメント（ｍｉＲ）を３’ヒトβ－グロビンＵＴＲ中に埋め込むことで、１１６細胞におけるＡＢＥの発現を特異的に下方制御することによって産生細胞に対する毒性を最小化した。ＰＧＫ：ヒトＰＧＫプロモーター。ｂＧＨｐＡ：ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列。ＳＶ４０ｐＡ：サルウイルス４０ポリアデニル化シグナル。ＩＴＲ：逆方向末端反復配列。Ψ：パッケージングシグナル。（図１３３Ｂ）生成ウイルスベクターの情報を示す。記載の収量は、１つの３Ｌスピナーフラスコから得られた収量である。（図１３３Ｃ）ＨＵＤＥＰ－２細胞におけるウイルスベクターの検証を示す。示されるＭＯＩ（ｖｐ／細胞）でさまざまなベクターを用いて細胞の形質導入を行った。トランスフェクションから４日後（４ｄｐｔ）及びインビトロでの赤血球分化から６日後（Ｄｉｆｆ６ｄ）にγ－グロビンの発現を測定した。ＣＣＲ５コード領域を標的とするＣＢＥベクターを陰性対照（ｓｇＮｅｇ）として含めた。示されるデータ（平均値±ＳＤ）は、２つの独立した実験を代表するものである。（図１３３Ｄ）ＨＤＡｄ＿ｓｇＨＢＧ＃２による標的塩基の変換を示す。標的塩基を含むＨＢＧ１ゲノムセグメントまたはＨＢＧ２ゲノムセグメントを増幅し、サンガーシークエンシングに供した。データの解析はＥｄｉｔＲ１．０．９によって行った。矢印は標的塩基を示す。クロマトグラムの下には変換％が示される。（図１３３Ｅ）α－グロビンまたはβ－グロビンに対するγ－グロビンの発現％を分化後６日目にＨＰＬＣによって測定したものを示す。ＭＯＩ＝１０００。示されるデータ（平均値±ＳＤ）は、２つの独立した実験を代表するものである。（図１３３Ｆ～１３３Ｈ）ＨＤＡｄ＿ｓｇＨＢＧ＃２で形質導入したＨＵＤＥＰ－２細胞から得られた代表的なクローン（＃３）を示す。一方のアレルにおいてＨＢＧ１プロモーター中での１１６Ａ→Ｇの塩基変換が検出され（図１３３Ｆ）、その結果、フローサイトメトリーによるγ－グロビン＋細胞

の％は１００％であった（図１３３Ｇ）。（図１３３Ｈ）γ－グロビンタンパク質のレベルをＨＰＬＣによって測定したものを示す。
【図１３３Ｈ】ＨＤＡｄ５／３５＋＋＿ＢＥベクターの構築及び検証を示す。（図１３３Ａ）ＨＤＡｄ＿ＡＢＥベクターの図を示す。２つのｆｒｔ－ＩＲと隣接する４．２ｋｂのＭＧＭＴ／ＧＦＰカセットによって、ＨＤＡｄ＿ＳＢベクターとの同時送達時に統合発現が可能になる。８．０ｋｂの塩基エディター要素は、一過性発現となるように、トランスポゾンの外側に位置するように設計した。２つのＴａｄＡＮ反復配列は配列反復性が低減されるようにコドン最適化に供した（＊は触媒的反復配列を示す）。マイクロＲＮＡ応答エレメント（ｍｉＲ）を３’ヒトβ－グロビンＵＴＲ中に埋め込むことで、１１６細胞におけるＡＢＥの発現を特異的に下方制御することによって産生細胞に対する毒性を最小化した。ＰＧＫ：ヒトＰＧＫプロモーター。ｂＧＨｐＡ：ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列。ＳＶ４０ｐＡ：サルウイルス４０ポリアデニル化シグナル。ＩＴＲ：逆方向末端反復配列。Ψ：パッケージングシグナル。（図１３３Ｂ）生成ウイルスベクターの情報を示す。記載の収量は、１つの３Ｌスピナーフラスコから得られた収量である。（図１３３Ｃ）ＨＵＤＥＰ－２細胞におけるウイルスベクターの検証を示す。示されるＭＯＩ（ｖｐ／細胞）でさまざまなベクターを用いて細胞の形質導入を行った。トランスフェクションから４日後（４ｄｐｔ）及びインビトロでの赤血球分化から６日後（Ｄｉｆｆ６ｄ）にγ－グロビンの発現を測定した。ＣＣＲ５コード領域を標的とするＣＢＥベクターを陰性対照（ｓｇＮｅｇ）として含めた。示されるデータ（平均値±ＳＤ）は、２つの独立した実験を代表するものである。（図１３３Ｄ）ＨＤＡｄ＿ｓｇＨＢＧ＃２による標的塩基の変換を示す。標的塩基を含むＨＢＧ１ゲノムセグメントまたはＨＢＧ２ゲノムセグメントを増幅し、サンガーシークエンシングに供した。データの解析はＥｄｉｔＲ１．０．９によって行った。矢印は標的塩基を示す。クロマトグラムの下には変換％が示される。（図１３３Ｅ）α－グロビンまたはβ－グロビンに対するγ－グロビンの発現％を分化後６日目にＨＰＬＣによって測定したものを示す。ＭＯＩ＝１０００。示されるデータ（平均値±ＳＤ）は、２つの独立した実験を代表するものである。（図１３３Ｆ～１３３Ｈ）ＨＤＡｄ＿ｓｇＨＢＧ＃２で形質導入したＨＵＤＥＰ－２細胞から得られた代表的なクローン（＃３）を示す。一方のアレルにおいてＨＢＧ１プロモーター中での１１６Ａ→Ｇの塩基変換が検出され（図１３３Ｆ）、その結果、フローサイトメトリーによるγ－グロビン＋細胞の％は１００％であった（図１３３Ｇ）。（図１３３Ｈ）γ－グロビンタンパク質のレベルをＨＰＬＣによって測定したものを示す。
【図１３４Ａ－１】図１３３を裏付けるデータを示す。図１３３Ｄに対する補足を示す。示されるウイルスで処理したＨＵＤＥＰ－２細胞では標的塩基の変換が生じている。
【図１３４Ａ－２】図１３３を裏付けるデータを示す。図１３３Ｄに対する補足を示す。示されるウイルスで処理したＨＵＤＥＰ－２細胞では標的塩基の変換が生じている。
【図１３４Ｂ－１】図１３３を裏付けるデータを示す。代表的な単一細胞ＨＵＤＥＰ－２クローンを示す。図１３３Ｆに対する補足を示す。矢印を伴うＢは、両方のアレルが編集を受けたことを示し、矢印を伴うＭは、一方のアレルが編集を受けたことを示す。
【図１３４Ｂ－２】図１３３を裏付けるデータを示す。代表的な単一細胞ＨＵＤＥＰ－２クローンを示す。図１３３Ｆに対する補足を示す。矢印を伴うＢは、両方のアレルが編集を受けたことを示し、矢印を伴うＭは、一方のアレルが編集を受けたことを示す。
【図１３４Ｃ】図１３３を裏付けるデータを示す。上部に示される対応単一細胞ＨＵＤＥＰ－２クローンにおけるγ－グロビンの発現を示す。図１３３Ｇに対する補足を示す。
【図１３５Ａ】インビボでの形質導入及び選択を行った後のβＹＡＣマウスにおけるγ－グロビンの再活性化を示す。実験手順を示す。Ｇ－ＣＳＦ／ＡＭＤ３１００によってβ－ＹＡＣ／ＣＤ４６マウス（ｎ＝９）を動員処理し、ＨＤＡｄ＿ｓｇＨＢＧ＃２＋ＨＤＡｄ＿ＳＢを用いるインビボでの形質導入に供した。$O^6$ＢＧ／ＢＣＮＵによる４回の選択を、それぞれ形質導入から４週目、６週目、８週目、及び１０週目に実施した。１６週目にマウスを安楽死させた。系譜⁻細胞を単離し、致死性照射Ｃ５７ＢＬ／６マウスにＩＶ注射した。この二次移植マウスをさらに１６週間経過観察した。

【図１３５Ｂ】インビボでの形質導入及び選択を行った後のβＹＡＣマウスにおけるγ－グロビンの再活性化を示す。形質導入後のさまざまな時点でのＰＢＭＣにおけるＧＦＰマーキングを示す。各ドットは１匹の動物を表す。
【図１３５Ｃ】インビボでの形質導入及び選択を行った後のβＹＡＣマウスにおけるγ－グロビンの再活性化を示す。ＰＢＭＣにおけるＧＦＰの発現を示す代表的なドットプロットを示す。
【図１３５Ｄ】インビボでの形質導入及び選択を行った後のβＹＡＣマウスにおけるγ－グロビンの再活性化を示す。血液細胞におけるγ－グロビンの発現をフローサイトメトリーによって測定したものを示す。
【図１３５Ｅ】インビボでの形質導入及び選択を行った後のβＹＡＣマウスにおけるγ－グロビンの再活性化を示す。血液細胞におけるγ－グロビンの発現を示す代表的なドットプロットを示す。
【図１３５Ｆ】インビボでの形質導入及び選択を行った後のβＹＡＣマウスにおけるγ－グロビンの再活性化を示す。終点時点の一次マウスの血液及び骨髄におけるＴｅｒ－１１９$^{+}$細胞及びＴｅｒ－１１９$^{-}$細胞におけるγ－グロビンの発現をフローサイトメトリーによって測定したものを示す。
【図１３５Ｇ】インビボでの形質導入及び選択を行った後のβＹＡＣマウスにおけるγ－グロビンの再活性化を示す。赤血球溶解物中のγ－グロビンタンパク質のレベルをＨＰＬＣによって測定したものを示す。データは、マウスα－グロビンもしくはβ－グロビンまたはヒトβ－グロビンに対するパーセントを示す。
【図１３５Ｈ】インビボでの形質導入及び選択を行った後のβＹＡＣマウスにおけるγ－グロビンの再活性化を示す。ｍＲＮＡレベルでのγ－グロビンの発現をＲＴ－ＰＣＲによって測定したものを示す。データは、マウスＨＢＡ　ｍＲＮＡもしくはＨＢＢ　ｍＲＮＡまたはヒトＨＢＢ　ｍＲＮＡに対する倍率変化を示す。
【図１３５Ｉ】インビボでの形質導入及び選択を行った後のβＹＡＣマウスにおけるγ－グロビンの再活性化を示す。全骨髄細胞中のベクターコピー数（細胞当たりのコピー数）を示す。ＭＧＭＴに対するプライマーを使用した。
【図１３６】図１３５Ｈに示される代表的なデータのＨＰＬＣプロットを示す。
【図１３７Ａ】標的塩基の変換を示す。ｓｇＨＢＧ＃２のガイド配列を示す。番号付けは、５’末端を始まりとして行った。ＴＧＡＣＣＡモチーフ（ＢＣＬ１１Ａ結合部位として報告されたもの）はオレンジ色の背景で強調されている。モチーフ中の２つのアデニン（Ａ５及びＡ８）は２つの矢印によって示した。
【図１３７Ｂ】標的塩基の変換を示す。標的塩基の変換のパーセントを示す。ＨＢＧ１プロモーター領域中及びＨＢＧ２プロモーター領域中のＡ５及びＡ８の両方を示した。各ドットは１匹の動物を表す（ｎ＝９）。
【図１３７Ｃ】標的塩基の変換を示す。マウス＃１１０８のＨＢＧ１領域及びＨＢＧ２領域における標的塩基の変換を示す代表的なクロマトグラムを示す。
【図１３７Ｄ】標的塩基の変換を示す。平均塩基変換率とγ－グロビン発現との間の相関を示す。各動物における平均塩基変換パーセントは、ＨＢＧ１プロモーター領域中及びＨＢＧ２プロモーター領域中のＡ５でのレベル及びＡ８でのレベルの平均とした。各ドットは１匹の動物を表す（ｎ＝９）。
【図１３７Ｅ】標的塩基の変換を示す。Ａ５での塩基変換とＡ８での塩基変換とを比較したものを示す。各ドットは１匹の動物を表す（ｎ＝９）。
【図１３７Ｆ】標的塩基の変換を示す。標的アデニンヌクレオチドでの変換パーセントを示すチャートを示す。
【図１３７Ｇ】標的塩基の変換を示す。特定のマウスにおける標的指向性の塩基変換を示すクロマトグラムを示す（配列番号２５０）。
【図１３８Ａ】安全性プロファイルを示す。形質導入後１６週目に血液試料を使用してＨＥＭＡＶＥＴ（登録商標）によって血液学的分析を行ったものを示す。データは平均値±ＳＤとして示され、ＨＤＡｄ＿ｓｇＨＢＧ＃２で形質導入した９匹のマウス及び３匹の非

形質導入対照マウスを表す。
【図１３８Ｂ】安全性プロファイルを示す。１６週目の血液試料における網状赤血球のパーセントを示す。ブリリアントクレシルブルーによって試料を染色した。データは平均値±ＳＤとして示され、ＨＤＡｄ＿ｓｇＨＢＧ＃２で形質導入した４匹のマウス及び３匹の非形質導入対照マウスを表す。
【図１３８Ｃ】安全性プロファイルを示す。一次マウスの終点時点の骨髄ＭＮＣにおける細胞組成を示す。非形質導入マウスを対照として使用した。各ドットは１匹の動物を表す。
【図１３８Ｄ】安全性プロファイルを示す。ブリリアントクレシルブルーによる代表的な網状赤血球染色を示す。
【図１３９Ａ】二次移植を示す。フローサイトメトリーを使用してＰＢＭＣにおけるヒトＣＤ４６の発現によって生着を測定したものを示す。
【図１３９Ｂ】二次移植を示す。ＰＢＭＣにおけるＧＦＰの発現を示す。
【図１３９Ｃ】二次移植を示す。末梢血液細胞におけるγ－グロビンの発現をフローサイトメトリーによって検出したものを示す。
【図１４０Ａ】遺伝子間の欠失を検出したものを示す。４．９ｋの欠失が遺伝子間に検出されたことについて以前に報告した（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，１３１（２６）：２９１５，２０１８）。全骨髄ＭＮＣから単離したゲノムＤＮＡをテンプレートとして使用した。ＨＢＧ１プロモーター中及びＨＢＧ２プロモーター中の２つのＣＲＩＳＰＲ切断部位にまたがる９．９ｋｂのゲノム領域をＰＣＲによって増幅した。増幅産物中に５．０ｋｂのバンドが追加で存在することが４．９ｋの欠失の発生を示すものである。４．９ｋｂの欠失比率が規定されたテンプレートを使用してＰＣＲによって作成した標準曲線式に従って欠失パーセントを計算した。ＨＢＧ１／２プロモーターを標的とするＣＲＩＳＰＲベクターを用いてインビボで形質導入したマウスから得られた試料を比較に使用した。各レーンは１匹の動物を表す。
【図１４０Ｂ】遺伝子間の欠失を検出したものを示す。図１４０Ａに示される欠失パーセントのまとめを示す。各ドットは１匹の動物を表す。
【図１４１】細胞毒性をＢＥとＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９とで比較したものを示す。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を使用する現在のゲノム編集技術に伴う主な懸念は、そうしたゲノム編集技術によって二本鎖ＤＮＡ切断（ＤＳＢ）が導入され、このＤＳＢが、望ましくない長鎖断片欠失及びｐ５３依存性ＤＮＡ損傷応答を生じさせることによって宿主細胞に有害な影響を及ぼし得ることである。塩基エディターは、標的ゲノム遺伝子座に正確にヌクレオチド変異を導入することが可能であり、塩基エディターからは、ＤＳＢが回避されるという利点が得られる。ＨＳＣの決定的な機能的特徴（すなわち、亜致死性照射ＮＳＧマウスにおける生着）が、ＢＥによる影響は受けないが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９発現ベクターでのヒトＣＤ３４＋細胞の形質導入後には劇的に減少することをこの試験は示す。
【図１４２】ＢＥ４－ｓｇＢＣＬ１１ＡＥ１によって媒介される編集の予想を示す。ＢＣＬ１１Ａ遺伝子座の編集を示す模式図が示される。ＧＡＴＡＡモチーフ（配列番号６５）及び塩基編集後の破壊されたＧＡＴＡＡモチーフ（配列番号６７）が示される。
【図１４３】最適な標的位置を示す。核酸配列の模式図中で例示の標的位置が強調表示されている。この図の一部は、プロトスペーサー内の位置４～８に標的Ｃが位置する場合のＣ→Ｔ編集を示す。
【図１４４】塩基エディターをコードするベクターの模式図である。
【図１４５】ウイルスｇＤＮＡの図を示す。ウイルスｇＤＮＡ（ＨＢＧ２－ｍｉＲ、アデニンエディター）の模式図が示され、この模式図は、単一の連続コンストラクトを表すものであるが、２つのセクションに分かれている（この分割は、単に表示を簡単にするためのものである）。
【図１４６】ＴａｄＡ配列を示す。２つの「ＴａｄＡ＋３２ａａ」のＤＮＡ配列（配列番号３６７及び配列番号２６８）を含めて、ＴａｄＡ及びＴａｄＡ＊（配列番号２６５及び配列番号２６６）の配列の模式図が示される。

【図１４７】塩基編集を示す。野生型（配列番号２６９）及び編集された配列（配列番号２６９）の模式図が示される。
【図１４８】塩基編集を示す。ＨＤＡｄ５／３５＋＋＿ＢＥ４－ｓｇＢＣＬ１１Ａｅ１－ＦＩ－ｍｇｍｔＧＦＰ（０４１３１８－１）ウイルスによる塩基編集に関する模式図及び２枚のゲルが示される。
【図１４９】γ－グロビン＋細胞のパーセントを示す。示されるＭＯＩでのγ－グロビン＋細胞のパーセントを示すグラフが示される。
【図１５０】塩基編集によるＨｂＦの再活性化を示す。ベクター及び関連情報のリストが示される。
【図１５１】ベクター及び関連情報のリスト、ならびに塩基エディターのさまざまなＭＯＩでのＨｂＦ＋細胞のパーセントを示すグラフを示す。
【図１５２】γ－グロビン発現（ＨＵＤＥＰ－２）（２回目の試験）を示す。ＨＵＤＥＰ－２細胞での２回目の試験から得られたＨｂＦの％を示すグラフが示される。
【図１５３】γ－グロビンの発現（ＨＵＤＥＰ－２）（単一細胞由来クローン）を示す。さまざまな単一細胞由来クローンにおけるＨｂＦ＋の％を示すグラフが示される。
【図１５４Ａ】個々の単一細胞由来クローンを表すデータを示す。図１５４Ａ～１５４Ｓはそれぞれ、単一細胞クローンを代表するデータを含む（配列番号２７１、配列番号２５０、配列番号２５２）。
【図１５４Ｂ】個々の単一細胞由来クローンを表すデータを示す。図１５４Ａ～１５４Ｓはそれぞれ、単一細胞クローンを代表するデータを含む（配列番号２７１、配列番号２５０、配列番号２５２）。
【図１５４Ｃ】個々の単一細胞由来クローンを表すデータを示す。図１５４Ａ～１５４Ｓはそれぞれ、単一細胞クローンを代表するデータを含む（配列番号２７１、配列番号２５０、配列番号２５２）。
【図１５４Ｄ】個々の単一細胞由来クローンを表すデータを示す。図１５４Ａ～１５４Ｓはそれぞれ、単一細胞クローンを代表するデータを含む（配列番号２７１、配列番号２５０、配列番号２５２）。
【図１５４Ｅ】個々の単一細胞由来クローンを表すデータを示す。図１５４Ａ～１５４Ｓはそれぞれ、単一細胞クローンを代表するデータを含む（配列番号２７１、配列番号２５０、配列番号２５２）。
【図１５４Ｆ】個々の単一細胞由来クローンを表すデータを示す。図１５４Ａ～１５４Ｓはそれぞれ、単一細胞クローンを代表するデータを含む（配列番号２７１、配列番号２５０、配列番号２５２）。
【図１５４Ｇ】個々の単一細胞由来クローンを表すデータを示す。図１５４Ａ～１５４Ｓはそれぞれ、単一細胞クローンを代表するデータを含む（配列番号２７１、配列番号２５０、配列番号２５２）。
【図１５４Ｈ】個々の単一細胞由来クローンを表すデータを示す。図１５４Ａ～１５４Ｓはそれぞれ、単一細胞クローンを代表するデータを含む（配列番号２７１、配列番号２５０、配列番号２５２）。
【図１５４Ｉ】個々の単一細胞由来クローンを表すデータを示す。図１５４Ａ～１５４Ｓはそれぞれ、単一細胞クローンを代表するデータを含む（配列番号２７１、配列番号２５０、配列番号２５２）。
【図１５４Ｊ】個々の単一細胞由来クローンを表すデータを示す。図１５４Ａ～１５４Ｓはそれぞれ、単一細胞クローンを代表するデータを含む（配列番号２７１、配列番号２５０、配列番号２５２）。
【図１５４Ｋ】個々の単一細胞由来クローンを表すデータを示す。図１５４Ａ～１５４Ｓはそれぞれ、単一細胞クローンを代表するデータを含む（配列番号２７１、配列番号２５０、配列番号２５２）。
【図１５４Ｌ】個々の単一細胞由来クローンを表すデータを示す。図１５４Ａ～１５４Ｓはそれぞれ、単一細胞クローンを代表するデータを含む（配列番号２７１、配列番号２５

０、配列番号２５２）。
【図１５４Ｍ】個々の単一細胞由来クローンを表すデータを示す。図１５４Ａ～１５４Ｓはそれぞれ、単一細胞クローンを代表するデータを含む（配列番号２７１、配列番号２５０、配列番号２５２）。
【図１５４Ｎ】個々の単一細胞由来クローンを表すデータを示す。図１５４Ａ～１５４Ｓはそれぞれ、単一細胞クローンを代表するデータを含む（配列番号２７１、配列番号２５０、配列番号２５２）。
【図１５４Ｏ】個々の単一細胞由来クローンを表すデータを示す。図１５４Ａ～１５４Ｓはそれぞれ、単一細胞クローンを代表するデータを含む（配列番号２７１、配列番号２５０、配列番号２５２）。
【図１５４Ｐ】個々の単一細胞由来クローンを表すデータを示す。図１５４Ａ～１５４Ｓはそれぞれ、単一細胞クローンを代表するデータを含む（配列番号２７１、配列番号２５０、配列番号２５２）。
【図１５４Ｑ】個々の単一細胞由来クローンを表すデータを示す。図１５４Ａ～１５４Ｓはそれぞれ、単一細胞クローンを代表するデータを含む（配列番号２７１、配列番号２５０、配列番号２５２）。
【図１５４Ｒ】個々の単一細胞由来クローンを表すデータを示す。図１５４Ａ～１５４Ｓはそれぞれ、単一細胞クローンを代表するデータを含む（配列番号２７１、配列番号２５０、配列番号２５２）。
【図１５４Ｓ】個々の単一細胞由来クローンを表すデータを示す。図１５４Ａ～１５４Ｓはそれぞれ、単一細胞クローンを代表するデータを含む（配列番号２７１、配列番号２５０、配列番号２５２）。
【図１５５】２９３ＦＴ細胞における試験を示す。２９３ＦＴ細胞において塩基エディターを使用した結果を示す２枚のゲルが示される。
【図１５６Ａ】編集された塩基（２９３ＦＴ細胞）をサンガーシークエンシングによって確認したものを示す。図１５６Ａ～１５６Ｄはそれぞれ、サンガーシークエンシングの結果を示すクロマトグラム（複数可）を含む（配列番号２６９、配列番号２７５～２７８）。
【図１５６Ｂ】編集された塩基（２９３ＦＴ細胞）をサンガーシークエンシングによって確認したものを示す。図１５６Ａ～１５６Ｄはそれぞれ、サンガーシークエンシングの結果を示すクロマトグラム（複数可）を含む（配列番号２６９、配列番号２７５～２７８）。
【図１５６Ｃ】編集された塩基（２９３ＦＴ細胞）をサンガーシークエンシングによって確認したものを示す。図１５６Ａ～１５６Ｄはそれぞれ、サンガーシークエンシングの結果を示すクロマトグラム（複数可）を含む（配列番号２６９、配列番号２７５～２７８）。
【図１５６Ｄ】編集された塩基（２９３ＦＴ細胞）をサンガーシークエンシングによって確認したものを示す。図１５６Ａ～１５６Ｄはそれぞれ、サンガーシークエンシングの結果を示すクロマトグラム（複数可）を含む（配列番号２６９、配列番号２７５～２７８）。
【図１５７】ＨＵＤＥＰ－２細胞における試験を示す。トランスフェクションの４日後のＨＵＤＥＰ－２細胞における塩基エディターの使用結果を示す２枚のゲルが示される。
【図１５８】γ－グロビンの発現（ＨＵＤＥＰ－２）を示す。γ－グロビンの発現を示すグラフが示される。
【図１５９Ａ】編集された塩基（ＨＵＤＥＰ－２細胞）をサンガーシークエンシングによって確認したものを示す。図１５９Ａ～１５９Ｄはそれぞれ、掲載可能な場合は、サンガーシークエンシングの結果を示すクロマトグラム（複数可）を含む（配列番号２６９、配列番号２７５～２７８）。
【図１５９Ｂ】編集された塩基（ＨＵＤＥＰ－２細胞）をサンガーシークエンシングによって確認したものを示す。図１５９Ａ～１５９Ｄはそれぞれ、掲載可能な場合は、サンガ

ーシークエンシングの結果を示すクロマトグラム（複数可）を含む（配列番号２６９、配列番号２７５～２７８）。
【図１５９Ｃ】編集された塩基（ＨＵＤＥＰ－２細胞）をサンガーシークエンシングによって確認したものを示す。図１５９Ａ～１５９Ｄはそれぞれ、掲載可能な場合は、サンガーシークエンシングの結果を示すクロマトグラム（複数可）を含む（配列番号２６９、配列番号２７５～２７８）。
【図１５９Ｄ】編集された塩基（ＨＵＤＥＰ－２細胞）をサンガーシークエンシングによって確認したものを示す。図１５９Ａ～１５９Ｄはそれぞれ、掲載可能な場合は、サンガーシークエンシングの結果を示すクロマトグラム（複数可）を含む（配列番号２６９、配列番号２７５～２７８）。
【図１６０】ＨＤＡｄウイルス産生（最大調製下でのもの）のために選択したコンストラクトを示す。構築したベクターのリスト（ＨＤＡｄウイルス産生（最大調製下でのもの）のために行ったある特定のコンストラクトの選択を示す）が示される。
【図１６１】ｈｕＣＤ４５＋細胞の生着を示すチャートを示す。
【図１６２】ＨＵＤＥＰ－２細胞の一過性のトランスフェクションを示す（Ｔ７ＥＩによる切断）。ＨＵＤＥＰ－２細胞の一過性のトランスフェクションの結果を示すゲルが示される（Ｔ７ＥＩによる切断）。
【図１６３】二重塩基編集ベクターの適用を示す。二重塩基編集ベクター実施形態を示す模式図が示される（配列番号２７９）。
【図１６４】ヒトγ－グロビン／ｍｇｍｔを示すＨＤａｄ５／３５＋＋統合ベクターのベクター模式図を示す。ＳＢ１００ｘトランスポゼースによる遺伝子付加、ならびに赤血球ｂｃｌ１１ａエンハンサー及びＨＢＧプロモーター中のＢＣＬ１１Ａ結合部位を標的とするＣＲＩＳＰＲを使用するアカゲザルγ－グロビンの再活性化が示される。
【図１６５】ＨＤＡｄ－ｓｇＡＡＶＳ１－ｒｍ（Ｃａｓ９なし）ベクター及びＨＤＡｄ－統合２を示すベクター模式図を示す。このベクターは、１．８ｋのホモロジーアーム（ＨＡ）、ＰＢＭＣにおける形質導入を追跡するためのＧＦＰ、ＨＡの外に位置し、ＨＢＧプロモーターを標的とするＣＲＩＳＰＲカセットを特徴とする。
【図１６６】ＬＣＲβ－グロビンプロモーター促進性に外来性γ－グロビンを使用することによってｒｈγ－グロビンを発現させること、及びγ－グロビンプロモーターのリプレッサー結合領域をＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９介在性に破壊することによって内在性γ－グロビンを再活性化すること、を生じさせるＨＤＡｄ－ｒｈ－統合のベクター模式図を示す。
【発明を実施するための形態】
【００９０】
本開示では、とりわけ、造血幹細胞の遺伝子編集をインビボで行うためのＣＤ４６標的指向性組換えアデノウイルスベクター（Ａｄ５／３５ベクター及びＡｄ３５ベクターなど）について記載される。Ａｄ３５ベクターは、ＣＤ４６との結合を増加させるノブタンパク質変異、遺伝子の発現を制御するｍｉＲＮＡ制御系、内在性遺伝子の発現を活性化するためのＣＲＩＳＰＲ要素、陽性選択マーカー、小型形態または長鎖形態のβ－グロビン遺伝子座制御領域（ＬＣＲ）制御配列、トランスポゼース／リコンビナーゼ系、及び／または本明細書に開示のさまざまな他の配列（限定されないが、移植前処理が不要なインビボ遺伝子治療を促進する多くの他の有益な進歩を含む）を含み得る。
【００９１】
遺伝子治療のためのツールは多く開発されるものの、ベクター及び／または治療的に有用なペイロードの設計は、依然として当該技術分野に残る重要な課題である。遺伝子治療ペイロードは、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターによって送達され得る。非ウイルスベクターの例としては、陽イオン性脂質、脂質ナノエマルション、固体脂質ナノ粒子、ペプチド、及びポリマーベースの送達系が挙げられる。ウイルスベクターには、ＡＡＶ、単純ヘルペス、レトロウイルス、レンチウイルス、アルファウイルス、フラビウイルス、ラブドウイルス、麻疹ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、ポックスウイルス、ピコルナウイルス、コクサッキーウイルスベクター、及びアデノウイルスベクターが含まれ

得、これらはそれぞれ、さまざまな異なる特徴を有する。また、アデノウイルスには５０を超える血清型が存在する。核酸配列を発現及び／または改変するための治療用ペイロードも存在し、こうした治療用ペイロードには、限定されないが、タンパク質をコードするペイロード、制御核酸をコードするペイロード、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９系をコードするペイロード、塩基編集系をコードするペイロード、トランスポゾン系をコードするペイロード、及び相同組換え系をコードするペイロードが含まれる。本明細書で提供される遺伝子治療のための方法及び組成物は、限定されないが、アデノウイルスベクター及び／またはさまざまな治療用ペイロードを利用する上でのさまざまな課題に対処するものである。

【００９２】

本明細書の開示は、特定の状況（例えば、アデノウイルスベクターまたはアデノウイルスゲノムの状況（例えば、Ａｄ５、Ａｄ５／３５、またはＡｄ３５の状況））におけるものであり得る一方で、各要素は、任意のそのような状況とは独立してさらに開示されるものであるため、そのような状況とは独立して請求され得る。開示の例としては、本開示の配列及びペイロードコンストラクトが挙げられ、当業者ならこうした配列及びペイロードコンストラクトを、いずれの特定のベクター、血清型、または他の状況にも限定されない一般的な適用可能性を有し得るものとして理解するであろう。

【００９３】

本開示の態様は、ここで、下記のようにさらに詳細に説明される：（Ｉ）遺伝子治療ベクター、（ＩＩ）標的細胞集団、（ＩＩＩ）用量、製剤、及び投与、（ＩＶ）用途、（Ｖ）実施形態例、（ＶＩ）実験的実施例、ならびに（ＶＩＩ）最終パラグラフ。

【００９４】

Ｉ．遺伝子治療ベクター

アデノウイルス（ａｄｅｎｏｖｉｒｕｓ）ベクター及びアデノウイルス（ａｄｅｎｏｖｉｒｕｓ）ゲノム（または互換的に「アデノウイルス（ａｄｅｎｏｖｉｒａｌ）」ベクター及び「アデノウイルス（ａｄｅｎｏｖｉｒａｌ）」ゲノム）は、（ａ）発現コンストラクトのパッケージングの支援及び（ｂ）コード配列の発現、に十分なアデノウイルス配列を含むコンストラクトを指す。アデノウイルスゲノムは、直鎖の二本鎖ＤＮＡ分子であり得る。当業者なら理解するであろうが、直鎖ゲノム（アデノウイルスゲノムなど）は、環状プラスミド（例えば、ウイルス産生目的のもの）中に存在し得る。

【００９５】

天然のアデノウイルスゲノムの長さ範囲は、血清型によって２６ｋｂ～４５ｋｂである。

【００９６】

アデノウイルスベクターは、逆方向末端反復配列（ＩＴＲ）と両末端で隣接するアデノウイルスＤＮＡを含み、これらのＩＴＲは、プライマーゼ非依存的なＤＮＡ合成を促進し、宿主ゲノムへの組み込みを促進するための自己プライマーとして働く。アデノウイルスゲノムはパッケージング配列も含み、このパッケージング配列は、ウイルス転写産物が適正にパッケージングされることを促進するものであり、ゲノムの左アーム上に位置する。ウイルス転写産物はいくつかのタンパク質をコードし、こうしたタンパク質には、初期転写単位（Ｅ１、Ｅ２、Ｅ３、及びＥ４）ならびに後期転写単位が含まれ、後期転写単位は、Ａｄビリオンの構造要素をコードする（Ｌｅｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅｓ　Ｄｉｓ．，４（２）：４３－６３，２０１７）。

【００９７】

アデノウイルスベクターはアデノウイルスゲノムを含む。組換えアデノウイルスベクターは、組換えアデノウイルスゲノムを含むアデノウイルスベクターである。組換えアデノウイルスベクターには、遺伝子操作された形態のアデノウイルスが含まれる。本出願を通じて、アデノウイルスベクターの開示は、そのアデノウイルスゲノムの開示を含み、アデノウイルスゲノムの開示は、開示のアデノウイルスゲノムを含むアデノウイルスベクターの開示を含むことを当業者なら理解するであろう。

【００９８】

アデノウイルスは、大型の正二十面体形状の非エンベロープウイルスである。ウイルスカプシドは、３つの型のタンパク質（ファイバーベースのタンパク質、ペントンベースのタンパク質、及びヘキソンベースのタンパク質を含む）を含む。ヘキソンはウイルスカプシドの大部分を構成し、２０個の三角面を形成する。ペントンベースは、カプシドの１２個の頂点に位置し、各ペントンベースからはファイバー（ノブファイバーとも称される）が突出している。こうしたタンパク質（ペントン及びファイバー）は、宿主細胞へのカプシドの結合を促進するものであるため、受容体への結合及び内部移行に特に重要なものである（Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅｓ Ｄｉｓ．，４（２）：４３－６３，２０１７）。

【００９９】

Ａｄ３５ファイバーはファイバータンパク質三量体であり、各ファイバータンパク質は、五量体ペントンベースと相互作用するＮ末端尾部ドメインと、宿主細胞受容体への結合部位として機能するＣ末端球状ノブドメイン（ファイバーノブ）と、当該尾部と当該ノブドメインとを連結する中央シャフトドメイン（シャフト）と、を含む。三量体ファイバーの尾部ドメインは、５回軸で五量体ペントンベースに結合する。さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ファイバーノブは、標準野生型Ａｄ３５ファイバータンパク質のアミノ酸１２３～３２０を含む。さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ファイバーノブは、標準野生型Ａｄ３５ファイバータンパク質のアミノ酸１２３～３２０の対応断片との配列同一性％が少なくとも８０％（例えば、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％）である少なくとも６０個のアミノ酸（例えば、少なくとも６０個、少なくとも７０個、少なくとも８０個、少なくとも９０個、少なくとも１００個、少なくとも１１０個、少なくとも１２０個、少なくとも１３０個、少なくとも１４０個、少なくとも１５０個、少なくとも１６０個、少なくとも１７０個、少なくとも１８０個、少なくとも１９０個、または少なくとも１９８個のアミノ酸）を含む。さまざまな実施形態において、ファイバーノブは、参照ファイバーノブ、参照ファイバータンパク質、参照ファイバー、または参照ベクター（標準野生型Ａｄ３５ファイバータンパク質を含む）と比較して、ＣＤ４６との親和性が上昇し、及び／またはファイバータンパク質、ファイバー、もしくはベクターとＣＤ４６との親和性が上昇するように操作され、任意選択で、この上昇は、少なくとも１．１倍（例えば、少なくとも１倍、少なくとも２倍、少なくとも３倍、少なくとも４倍、少なくとも５倍、少なくとも１０倍、少なくとも１５倍、または少なくとも２０倍）の上昇である。中央シャフトドメインは、βターンによって連結された２本の逆平行βストランドをコードする１５～２０個のアミノ酸をそれぞれが含む５．５単位のβリピートからなる。これらのβリピートが連結されることで、高度に強固かつ安定な絡み合った３つのらせん状鎖の伸長構造が形成される。

【０１００】

アデノウイルスは、そのゲノムサイズが中くらいであり、操作がしやすく、力価が高く、標的細胞範囲が広く、感染性が高いことから、遺伝子導入ベクターとしての使用に特に適している。ウイルスゲノムの両端は１００～２００塩基対のＩＴＲを含み、これらのＩＴＲは、ウイルスＤＮＡの複製及びパッケージングに必要なシスエレメントである。ゲノムの初期（Ｅ）領域及び後期（Ｌ）領域は、ウイルスＤＮＡ複製の開始時期によって分けられる異なる転写単位を含む。Ｅ１領域（Ｅ１Ａ及びＥ１Ｂ）は、ウイルスゲノムの転写の制御を担うタンパク質、及び少数の細胞遺伝子をコードする。Ｅ２領域（Ｅ２Ａ及びＥ２Ｂ）が発現すると、ウイルスＤＮＡを複製するためのタンパク質が合成される。こうしたタンパク質は、ＤＮＡの複製、後期遺伝子の発現、及び宿主細胞の遮断に関与する。後期遺伝子の産物（ウイルスカプシドタンパク質の大部分を含む）は、主要後期プロモーター（ＭＬＰ）によって生じる単一の一次転写産物が大幅にプロセシングされた後にのみ発現する。ＭＬＰは、感染後期の間に特に能率的であり、このプロモーターから生じるｍＲＮＡはすべて、５’に三分割リーダー（ＴＰＬ）配列を有しており、このＴＰＬによって、そうしたｍＲＮＡが翻訳に好ましいｍＲＮＡとなる。

【０１０１】

Ｉ（Ａ）．遺伝子治療ベクターの血清型

アデノウイルスには５０を超える血清型も存在する。アデノウイルス５型は、膨大な量の生化学的情報及び遺伝情報が知られているヒトアデノウイルスであり、歴史的に、ベクターとしてアデノウイルスを用いるほとんどの構築に使用されている。Ａｄ５は、遺伝子治療研究において広く使用されている。

【０１０２】

一方で、Ａｄ５カプシドタンパク質に対して指向化された中和血清抗体を大半のヒトが有しており、この中和血清抗体によって、Ａｄ５カプシドを含むアデノウイルスベクター（ＨＤＡｄ５／３５ベクター（すなわち、Ａｄ５カプシドタンパク質及びキメラＡｄ３５ファイバーを含むベクター）など）を用いるインビボでの形質導入が遮断される可能性がある。Ａｄ５カプシドタンパク質に対して指向化された中和血清抗体が存在するからといって、Ａｄ５カプシドを含むアデノウイルスベクターの治療的価値が否定されることはないが、アデノウイルスベクターがＡｄ５カプシドを含まないのであれば、臨床的に著しい免疫原性応答（特に、Ａｄ５カプシドタンパク質に対して指向化された中和血清抗体を有する対象におけるもの）が生じる一般的なリスクが低減されるという利点が追加で得られることになる。

【０１０３】

Ａｄ３５は、既に知られる５７のヒト血清型のうちで最も希少なものの１つであり、その血清陽性率は７％未満であり、Ａｄ３５はＡｄ５との交差反応性を有さない。Ａｄ３５は、Ａｄ５と比較して免疫原性が低く、この免疫原性の低さの理由の一部は、Ａｄ３５ファイバーノブによる Ｔ細胞活性化の減弱化にある。さらに、ヒトＣＤ４６トランスジェニック（ｈＣＤ４６ｔｇ）マウス及び非ヒト霊長類において静脈内（ｉｖ）注射後に生じる組織（肝臓を含む）への形質導入は最小限のもの（ＰＣＲによって検出可能な程度のもの）にすぎない。第１世代のＡｄ３５ベクターは、ワクチン接種目的で臨床的に使用されている。

【０１０４】

Ｉ（Ａ）（ｉ）．Ａｄ３５遺伝子治療ベクター

代表的な天然のＡｄ３５アデノウイルスの全ゲノムは知られており、公的に利用可能である（例えば、Ｇａｏ ｅｔ ａｌ．，２００３ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．１０（２３）：１９４１－９、Ｒｅｄｄｙ ｅｔ ａｌ．２００３ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ３１１（２）：３８４－３９３、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＡＸ０４９９８３を参照のこと）。Ａｄ５ゲノムは３５，９３５ｂｐであり、そのＧ＋Ｃ含量は５５．２％であり、Ａｄ３５ゲノムは３４，７９４ｂｐであり、そのＧ＋Ｃ含量は４８．９％である。Ａｄ３５のゲノムは逆方向末端反復配列（ＩＴＲ）と隣接している。さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ ＩＴＲは１３７ｂｐ（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＡＸ０４９９８３のヌクレオチド１～１３７またはヌクレオチド４～１４０を含む５’Ａｄ３５、及びＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＡＸ０４９９８３のヌクレオチド３４６５８～３４７９４を含む３’ＩＴＲ）を含み、これは、Ａｄ５のもの（１０３ｂｐ）よりも長鎖である。さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ ５’ＩＴＲは、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＡＸ０４９９８３のヌクレオチド１～２００の対応断片との配列同一性％が少なくとも８０％（例えば、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％）である少なくとも８０個のヌクレオチド（例えば、少なくとも８０個、少なくとも９０個、少なくとも１００個、少なくとも１１０個、少なくとも１２０個、少なくとも１３０個、少なくとも１４０個、少なくとも１５０個、少なくとも１６０個、少なくとも１７０個、少なくとも１８０個、少なくとも１９０個、または少なくとも２００個のヌクレオチド、例えば、下限が８０、９０、１００、１１０、１２０、または１３０であり、上限が１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、または２００である数のヌクレオチド、例えば、１３７個のヌクレオチド）を含み、Ａｄ３５ ３’ＩＴＲは、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＡＸ０４９９８３のヌクレオチド３４５９５～３４７９４の対応断片との配列同一性％が少なくとも８０％

（例えば、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％）である少なくとも８０個のヌクレオチド（例えば、少なくとも８０個、少なくとも９０個、少なくとも１００個、少なくとも１１０個、少なくとも１２０個、少なくとも１３０個、少なくとも１４０個、少なくとも１５０個、少なくとも１６０個、少なくとも１７０個、少なくとも１８０個、少なくとも１９０個、または少なくとも２００個のヌクレオチド、例えば、下限が８０、９０、１００、１１０、１２０、または１３０であり、上限が１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、または２００である数のヌクレオチド、例えば、１３７個のヌクレオチド）を含む。さまざまな実施形態において、ＩＴＲは、Ａｄ３５のカプシド形成及び／または複製の一方または両方に十分なものである。さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ベクターのためのアデノ３５　ＩＴＲ配列は、最初の８ｂｐがＣＡＴＣＡＴＣＡではなくＣＴＡＴＣＴＡＴであるという点において異なる（Ｗｕｎｄｅｒｌｉｃｈ，Ｊ．Ｇｅｎ　Ｖｉｒｏ．９５：１５７４－１５８４，２０１４）。

【０１０５】

さまざまな実施形態において、アデノウイルスゲノムのパッケージングは、ＩＴＲと隣接するウイルスゲノムの５’末端に位置するシス作用性パッケージング配列ドメインによって媒介され、パッケージングは左から右への極性様式で生じる。Ａｄ３５のパッケージング配列は、ゲノムの左末端に位置し、５～７つの推定「Ａ」反復配列を含む。さまざまな実施形態において、本開示は、Ａｄ３５パッケージング配列を含む組換えＡｄ３５ドナーベクターまたは組換えＡｄ３５ドナーゲノムを含む。さまざまな実施形態において、本開示は、リコンビナーゼ部位と隣接するパッケージング配列を含む組換えＡｄ３５ヘルパーベクターまたは組換えＡｄ３５ヘルパーゲノムを含む。さまざまな実施形態において、Ａｄ３５パッケージング配列は、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＡＸ０４９９８３のヌクレオチド１３８～４８１、またはＡｄ３５ベクターもしくはＡｄ３５ゲノムのパッケージングに十分もしくは必要なその断片、を含む核酸配列を指す（例えば、当該配列にリコンビナーゼ部位を隣接させ、リコンビナーゼ部位の組換えによって当該配列を切除することで、ベクターまたはゲノムがパッケージング欠損性となる（このパッケージング欠損の割合は、例えば、パッケージング配列を含む参照と比較して少なくとも１０％（例えば、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０$、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％）であり、任意選択で、参照は、組換え部位と隣接するパッケージング配列を含む）。さまざまな実施形態において、Ａｄ３５パッケージング配列は、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＡＸ０４９９８３のヌクレオチド１３７～４８１の対応断片との配列同一性％が少なくとも８０％（例えば、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％）である少なくとも８０個のヌクレオチド（例えば、少なくとも８０個、少なくとも９０個、少なくとも１００個、少なくとも１１０個、少なくとも１２０個、少なくとも１３０個、少なくとも１４０個、少なくとも１５０個、少なくとも１６０個、少なくとも１７０個、少なくとも１８０個、少なくとも１９０個、少なくとも２００個、少なくとも２２５個、少なくとも２５０個、少なくとも２７５個、または少なくとも３００個のヌクレオチド、例えば、下限が８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、または１５０であり、上限が１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２２５、２５０、２７５、または３００である数のヌクレオチド）を含む。

【０１０６】

さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ヘルパーベクターは、パッケージング配列と隣接するように挿入されたリコンビナーゼ部位を含み得、第１のリコンビナーゼ部位は、ヌクレオチド１３０～４００（例えば、ヌクレオチド１３８～１８０、ヌクレオチド１３８

～２００、ヌクレオチド１３８～２２０、ヌクレオチド１３８～２４０、ヌクレオチド１３８～２６０、ヌクレオチド１３８～２８０、ヌクレオチド１３８～３００、ヌクレオチド１３８～３２０、ヌクレオチド１３８～３４０、ヌクレオチド１３８～３６０、ヌクレオチド１３８～３６６、ヌクレオチド１３８～３８０、またはヌクレオチド１３８～４００）から選択される位置のすぐ隣（例えば、その前または後）に挿入され、第２のリコンビナーゼ部位は、ヌクレオチド３００～５５０（例えば、ヌクレオチド３４４～３６０、ヌクレオチド３４４～３８０、ヌクレオチド３４４～４００、ヌクレオチド３４４～４２０、ヌクレオチド３４４～４４０、ヌクレオチド３４４～４６０、ヌクレオチド３４４～４８０、ヌクレオチド３４４～４８１、ヌクレオチド３４４～５００、ヌクレオチド３４４～５２０、ヌクレオチド３４４～５４０、または３４４～５５０）から選択される位置のすぐ隣（例えば、その後または前）に挿入される。パッケージング配列という用語は、必ずしも所与のベクターまたはゲノム中に存在するパッケージングエレメントのすべてを含むものではないことを当業者なら理解するであろう。例えば、ヘルパーゲノムは、パッケージング配列と隣接するリコンビナーゼ同方向反復配列を含み得るが、隣接パッケージング配列は、ヘルパーゲノム中に存在するパッケージングエレメントのすべてを含むわけではない。したがって、ある特定の実施形態では、ヘルパーゲノムの１つまたは２つのリコンビナーゼ同方向反復配列は、より長いパッケージング配列内に位置し、その結果、例えば、より長いパッケージング配列は、１つまたは２つのリコンビナーゼ同方向反復配列が導入されることによって不連続となる。さまざまな実施形態において、ヘルパーゲノムのリコンビナーゼ同方向反復配列は、パッケージング配列の断片と隣接し、その結果、リコンビナーゼ同方向反復配列の組換えによって隣接パッケージング配列が切除されることで、ヘルパーゲノムのパッケージング及び／またはヘルパーゲノムの被パッケージング能力が低減または除去（より一般的には、破壊）される。例として、リコンビナーゼ同方向反復配列（ＤＲ）は、Ａｄ３５パッケージングシグナルは機能的に破壊するが、５’Ａｄ３５　ＩＴＲは機能的に破壊しないようにＡｄ３５ゲノムの５’末端から５５０ヌクレオチド以内に位置する。さまざまな実施形態において、ＤＲは、Ａｄ３５パッケージングシグナルは機能的に破壊するが、５’Ａｄ３５　ＩＴＲは機能的に破壊しないように、Ａｄ３５ゲノムの５’末端から５５０ヌクレオチド未満（例えば、Ａｄ３５ゲノムの５’末端から５４０ヌクレオチド以内、５３０ヌクレオチド以内、５２０ヌクレオチド以内、５１０ヌクレオチド以内、５００ヌクレオチド以内、４９５ヌクレオチド以内、４９０ヌクレオチド以内、４８０ヌクレオチド以内、４７０ヌクレオチド以内、４５０ヌクレオチド以内、４４０ヌクレオチド以内、４００ヌクレオチド以内、３８０ヌクレオチド以内、３６０ヌクレオチド以内、またはＡｄ３５ゲノムの５’末端から３６０ヌクレオチド以内）に位置する。

【０１０７】

さまざまな実施形態において、本開示は、Ａｄ３５　５’ＩＴＲ、Ａｄ３５パッケージング配列、及びＡｄ３５　３’ＩＴＲを含む組換えＡｄ３５ドナーベクターまたは組換えＡｄ３５ドナーゲノムを含み、ある特定の実施形態では、組換えＡｄ３５ドナーベクターまたは組換えＡｄ３５ドナーゲノムのうちで、Ａｄ３５　５’ＩＴＲ、Ａｄ３５パッケージング配列、及びＡｄ３５　３’ＩＴＲが、標準Ａｄ３５ゲノムに由来し、及び／または標準Ａｄ３５ゲノムとの同一性％が少なくとも８０％である唯一の断片（例えば、この唯一の断片の塩基対数は５０超または１００超である）である。

【０１０８】

Ａｄ３５初期領域は、Ｅ１Ａ、Ｅ１Ｂ、Ｅ２Ａ、Ｅ２Ｂ、Ｅ３、及びＥ４を含む。Ａｄ３５中期領域は、ｐＩＸ及びＩＶａ２を含む。Ａｄ３５の後期転写単位は、１６．９地図単位に位置する主要後期プロモーター（ＭＬＰ）から転写される。Ａｄ３５における後期ｍＲＮＡは、５つのｍＲＮＡファミリー（Ｌ１～Ｌ５）に分類することができ、この分類は、こうしたｍＲＮＡがどのポリ（Ａ）シグナルを使用するかに基づいて行われる。ＭＬＰコンセンサスイニシエーターエレメント、ならびにスプライスドナー部位配列及びスプライスアクセプター部位配列に基づいて、三分割リーダー（ＴＰＬ）のヌクレオチド長は

２０４であると予想されている。ＴＰＬの第１のリーダーはＭＬＰと隣接し、そのヌクレオチド長は４５である。第２のリーダーはＤＮＡポリメラーゼのコード領域内に位置し、そのヌクレオチド長は７２である。第３のリーダーは、Ｅ２Ｂ領域の前駆体末端タンパク質（ｐＴＰ）のコード領域内に位置し、そのヌクレオチド長は８７である。Ａｄ５は２つのウイルス関連（ＶＡ）ＲＮＡ遺伝子を含む一方で、Ａｄ３５のゲノム中に存在するウイルス関連ＲＮＡ遺伝子は１つのみである。このＶＡ　ＲＮＡ遺伝子は、５２／５５Ｋ　Ｌ１タンパク質をコードする遺伝子とｐＴＰをコードする遺伝子との間に位置する。

【０１０９】

特定の実施形態では、Ａｄ３５＋＋ベクターは、変異Ａｄ３５ファイバーノブを有するキメラベクター（例えば、変異Ａｄ３５ファイバーノブを有する組換えＡｄ３５ベクター、または変異Ａｄ３５ファイバーノブを有するＡｄ５／３５ベクター）である。特定の実施形態では、Ａｄ３５＋＋ゲノムは、変異Ａｄ３５ファイバーノブをコードするゲノム（例えば、変異Ａｄ３５ファイバーノブをコードする組換えＡｄ３５ヘルパーゲノム、または変異Ａｄ３５ファイバーノブをコードするＡｄ５／３５ヘルパーゲノム）である。さまざまな実施形態において、Ａｄ３５＋＋変異ファイバーノブは、ＣＤ４６への親和性が（例えば、２５倍に）上昇するように変異導入されたＡｄ３５ファイバーノブであり、その結果、例えば、このＡｄ３５＋＋変異ファイバーノブによって（例えば、感染多重度（ＭＯＩ）を下げても）細胞の形質導入効率が向上する（Ｌｉ　ａｎｄ　Ｌｉｅｂｅｒ，ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔｅｒｓ，５９３（２４）：３６２３－３６４８，２０１９）。

【０１１０】

さまざまな実施形態において、Ａｄ３５＋＋変異ファイバーノブは、Ｉｌｅ１９２Ｖａｌ、Ａｓｐ２０７Ｇｌｙ（またはある特定のＡｄ３５配列ではＧｌｕ２０７Ｇｌｙ）、Ａｓｎ２１７Ａｓｐ、Ｔｈｒ２２６Ａｌａ、Ｔｈｒ２４５Ａｌａ、Ｔｈｒ２５４Ｐｒｏ、Ｉｌｅ２５６Ｌｅｕ、Ｉｌｅ２５６Ｖａｌ、Ａｒｇ２５９Ｃｙｓ、及びＡｒｇ２７９Ｈｉｓから選択される少なくとも１つの変異を含む。さまざまな実施形態において、Ａｄ３５＋＋変異ファイバーノブは、下記の変異のそれぞれを含む：Ｉｌｅ１９２Ｖａｌ、Ａｓｐ２０７Ｇｌｙ（またはある特定のＡｄ３５配列ではＧｌｕ２０７Ｇｌｙ）、Ａｓｎ２１７Ａｓｐ、Ｔｈｒ２２６Ａｌａ、Ｔｈｒ２４５Ａｌａ、Ｔｈｒ２５４Ｐｒｏ、Ｉｌｅ２５６Ｌｅｕ、Ｉｌｅ２５６Ｖａｌ、Ａｒｇ２５９Ｃｙｓ、及びＡｒｇ２７９Ｈｉｓ。さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ファイバーのアミノ酸の番号付けは、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＡＰ＿０００６０１またはそれに対応するアミノ酸配列（例えば、位置２０７がＧｌｕもしくはＡｓｐであるもの）に従って行われる。さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ファイバーは、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＡＰ＿０００６０１のアミノ酸配列を有する。Ａｄ３５＋＋ファイバーノブ変異のさらなる説明については、Ｗａｎｇ　２００８　Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．８２（２１）：１０５６７－１０５７９に見られ、当該文献は、その全体及びファイバーノブに関する部分が参照によって本明細書に組み込まれる。

【０１１１】

Ｉ（Ａ）（ｉｉ）．Ａｄ５／３５遺伝子治療ベクター

本開示のＡｄ５／３５ベクターは、Ａｄ５カプシドポリヌクレオチド、及びＡｄ３５ファイバーノブを含むキメラファイバーポリヌクレオチドを含むアデノウイルスベクターを含み、キメラファイバーポリヌクレオチドは、典型的には、Ａｄ３５ファイバーシャフトも含む（例えば、Ａｄ５ファイバーアミノ酸１～４４がＡｄ３５ファイバーアミノ酸４４～３２３と組み合わされる）。さまざまな実施形態において、ファイバーは、Ａｄ３５＋＋変異ファイバーノブを含む。本開示のさまざまなＡｄ５／３５ベクターにおいて、ファイバーノブドメイン及びシャフトを除くタンパク質はすべて血清型５型に由来するものとし、ファイバーノブドメイン及びシャフトは血清型３５型に由来するものとし、このＡｄ３５ファイバーノブには、ＣＤ４６への親和性が上昇する変異を導入した（ＷＯ２０１０／１２０５４１Ａ２を参照のこと）。さらに、さまざまな実施形態において、Ａｄ５／３５ベクターのＩＴＲ及びパッケージング配列はＡｄ５に由来するものである（ノブ変異の例については表１を参照のこと、ＨＤＡｄ３５ベクター産生の一般的な模式図については

図９５を参照のこと）。

【０１１２】

【表１】

表１：ＣＤ４６への結合を増加させるＡｄ３５ノブ変異

| | Kd (Oleks) | |
|---|---|---|
| A1: Asn217Asp Thr245Pro Ile256Leu* | A1 4.82 nM | Asp207Gly +++ |
| A2: Asp207Gly Thr245Ala* | A2 0.629 nM | Thr245Ala ++ |
| A3: Asp207Gly Thr226Ala* | A3 1.407 nM | Ile256Leu + |
| A8: Ile192Val Ile256Val ? | A8 13.6850 nM | |
| B1: Asp207Gly* | B1 1.774 nM | |
| B2: wtAd35(207Asp) | B2 14.98 nM | |
| B3: Asn217Asp* | B3 16.85 nM | |
| B4: Thr245Ala* | B4 7.64 nM | |
| B5: Ile256Leu* | B5 10.96 nM | |
| B6: Ad3 | B6 結合なし | |
| B7: Ad11 | B7 11.22 nM | |
| M1: Arg279Cys** | M1 結合なし | |
| M3:Arg279His** | M3 結合なし | |
| wtAd35* | 13.7 nM | |
| wtAd35* | 15.36 nM | |
| AA: Asp207Gly Thr245Ala Ile256Leu* | 0.943 nM | |

*Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，８２（２１）：１０５６７－１０５７９，２００８）にて公開されたもの

**Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．８１（２３）：１２７８５－１２７９２，２００７）にて公開されたもの

【０１１３】

Ｉ（Ｂ）．ヘルパー依存型Ａｄ３５ベクター及びヘルパー依存型Ａｄ５／３５ベクター

一般に、天然のアデノウイルスベクターからヘルパー依存型アデノウイルスベクターへの経路は、３世代を含み得る。第１世代アデノウイルスベクターは、遺伝子Ｅ１及び遺伝子Ｅ３を除去するように操作される。これらの遺伝子をなくすと、アデノウイルスベクターはそれ自体では複製できなくなるが、Ｅ１発現哺乳動物細胞株（ＨＥＫ２９３細胞など）では産生され得る。第１世代の改変のみではアデノウイルスベクターのクローニング容量は限られている上、ペイロード発現を有効なものにするには、ベクターに対する宿主免疫応答が問題となり得る。第２世代のアデノウイルスベクターは、Ｅ１／Ｅ３除去に加えて、非構造遺伝子Ｅ２及び非構造遺伝子Ｅ４を除去するように操作され、その結果、容量が増大し、免疫原性が低下する。第３世代のアデノウイルスベクター（ガットレス、大容量アデノウイルスベクター、またはヘルパー依存型アデノウイルスベクター（ＨｄＡｄ）とも称される）は、ウイルスコード配列をすべて除去するようにさらに操作され、ゲノムのＩＴＲ及びゲノムのパッケージング配列またはその機能性断片のみを保持する。こうしたゲノムは、ウイルス産生に必要なタンパク質をコードしないため、ヘルパー依存型であり、すなわち、ヘルパー依存型ゲノムは、ウイルスタンパク質をトランスで提供する核酸配列を含む細胞中にそれが存在する場合にのみ、ベクターへとパッケージングされ得る。こうしたヘルパー依存型ベクターは、容量がさらに大型化しており、免疫原性がさらに低減されていることによっても特徴付けられる。各ウイルスゲノムの配列は少なくとも各血清型で異なるため、ヘルパー依存型ウイルスゲノム、及び／またはヘルパーゲノムの生成に必要な適切な改変を、所与の血清型について、他の血清型に関して利用可能な情報から

予想することは不可能である。

【０１１４】

ウイルスコード配列をすべて失うように操作されたヘルパー依存型アデノウイルスベクター（ＨＤＡｄ）は、多種多様な細胞型への形質導入を効率的に生じさせることができると共に、長期的な導入遺伝子発現を媒介し、それに伴う慢性毒性が無視可能なものであり得る。ウイルスコード配列を欠失させ、ゲノム複製に必要なシス作用性エレメント（ＩＴＲ）及びカプシド形成に必要なシス作用性エレメント（Ψ）のみを残すことによって、Ａｄベクターに対する細胞免疫応答が低減される。ＨＤＡｄベクターは、最大で３７ｋｂという大きなクローニング容量を有することで、大きなペイロードを送達することを可能にする。こうしたペイロードは、大きな治療用遺伝子またはさらには複数の導入遺伝子、ならびに導入遺伝子発現を増強、延長、及び制御するための大きな制御要素を含み得る。他のアデノウイルスベクターと同様に、典型的なＨＤＡｄゲノムは、一般に、エピソームのままであり、宿主ゲノムに組み込まれることはない（Ｒｏｓｅｗｅｌｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｇｅｎｅｔ Ｓｙｎｄｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．Ｓｕｐｐｌ ５：００１，２０１１，ｄｏｉ：１０．４１７２／２１５７－７４１２．ｓ５－００１）。

【０１１５】

いくつかのＨＤＡｄベクター系では、１つのウイルスゲノム（ヘルパーゲノム）が複製に必要なタンパク質をすべてコードするが、このウイルスゲノム（ヘルパーゲノム）はパッケージング配列が条件的に不完全化するものであり、これによって自体がビリオンにパッケージングされる可能性が低減されている。上記のように、これには、パッケージング配列またはその機能的に寄与する断片（例えば、機能的に必要な断片）を同定し、ヘルパーベクターの増殖に負の影響を与えない様式で対象ゲノムを改変することが必要であり得るが、こうしたことを他のアデノウイルス血清型に関する現存知見から確かめることは不可能である。ウイルスＩＴＲ、ペイロード（例えば、治療用ペイロード）、及び機能性パッケージング配列（例えば、通常の野生型パッケージング配列またはその機能性断片）については別のドナーウイルスゲノムが含み（例えば、これらのみを含む）、この機能性パッケージング配列によって、このドナーウイルスゲノムをＨＤＡｄウイルスベクターへと選択的にパッケージングし、産生細胞から単離することが可能になる。ＨＤＡｄドナーベクターは、物理的手段によってヘルパーベクターからさらに精製され得る。一般に、ＨＤＡｄウイルスベクター及びＨＤＡｄウイルスベクター製剤にはヘルパーベクター及び／またはヘルパーゲノムがいくらか混入し得るが、こうした混入は許容され得る。

【０１１６】

いくつかのＨＤＡｄベクター系では、ヘルパーゲノムにおいてＣｒｅ／ｌｏｘＰ系が利用される。ある特定のそのようなＨＤＡｄベクター系では、ＨＤＡｄドナーゲノムは、ゲノム複製に必要なアデノウイルスＩＴＲと、ゲノムをカプシド内に封入するカプシド形成に必要なパッケージング配列であるΨまたはその機能性断片と、を含む５００ｂｐの非コードアデノウイルスＤＮＡを含む。ＨＤＡｄドナーベクターゲノムは、その全長が２７．７ｋｂ～３７ｋｂである場合に最も効率的にパッケージングされ得ることも観察されており、この全長は、例えば、治療用ペイロード及び／または「スタッファー」配列から構成され得る。ＨＤＡｄドナーゲノムは、細胞（Ｃｒｅリコンビナーゼを発現する２９３細胞（ＨＥＫ２９３）など）に送達することができ、この場合、任意選択で、ＨＤＡｄドナーゲノムは、非ウイルスベクター形態（細菌プラスミド形態など）で細胞に送達される（例えば、ＨＤＡｄドナーゲノムが細菌プラスミド（ｐＨＤＡｄ）として構築される場合、ＨＤＡｄドナーゲノムは、制限酵素消化によって遊離される）。同じ細胞を、ヘルパーゲノムでの形質導入に供すことができ、このヘルパーゲノムは、ｌｏｘＰ部位と隣接するパッケージング配列またはその機能的に寄与する断片（例えば、機能的に必要な断片）を有するＥ１欠失型Ａｄベクターを含み得、その結果、Ｃｒｅリコンビナーゼ発現２９３細胞への感染後に、ｌｏｘＰ部位の間でのＣｒｅ介在性の部位特異的組換えによってヘルパーゲノムからパッケージング配列またはその機能的に寄与する断片（例えば、機能的に必要な断片）が切除される。したがって、リコンビナーゼ部位（例えば、ｌｏｘＰ部位）と隣接

するパッケージング配列（Ψ）またはその機能性断片を有するヘルパーゲノムで形質導入されたＣｒｅ発現２９３細胞（ＨＥＫ２９３）にＨＤＡｄドナーゲノムをトランスフェクションすることができ、その結果、対応するリコンビナーゼによって媒介されるΨの切除（例えば、Ｃｒｅ介在性の切除）によってヘルパーウイルスゲノムは被パッケージング能力を有さなくなるが、ＨＤＡｄの増殖に必要なトランス作用性因子を依然としてすべて供給可能である。パッケージング配列またはその機能的に寄与する断片（例えば、機能的に必要な断片）が切除された後、ヘルパーゲノムは被パッケージング能力を有さないが、依然としてＤＮＡ複製を受けることができるため、ＨＤＡｄドナーゲノムの複製及びカプシド形成をトランスで補完することができる。いくつかの実施形態では、２９３細胞（ＨＥＫ２９３）中に存在するヘルパーゲノムとＨＤＡｄドナーゲノムとの間で相同組換えが生じる結果として、複製可能なＡｄ（ＲＣＡ；Ｅ１$^{+}$）が生じることを阻止するために、Ｅ３領域に「スタッファー」配列を挿入することで、いずれのＥ１$^{+}$組換え体も大きすぎてパッケージングを受けることが不可能なものにすることができる。ＦＬＰ（例えば、ＦＬＰｅ）／ｆｒｔ部位特異的組換えを使用することでも同様のＨＤＡｄ産生系が開発されており、この場合、ヘルパーゲノムのパッケージング配列と隣接するｆｒｔ部位の間でＦＬＰ介在性の組換えが生じることで、ＦＬＰを発現する２９３細胞（ＨＥＫ２９３）においてヘルパーゲノムのカプシド形成に対する選択が生じる。ヘルパーベクターに対する選択を行うための代替方針も開発されている。Ｅ１発現産物は、産生細胞株のゲノムから補完的に発現することによって供給され得るため、Ａｄ３５ヘルパーウイルスは、典型的には、Ｅ１中のウイルス遺伝子を除くすべてのウイルス遺伝子を含む。

【０１１７】

ＨＤＡｄ５／３５ドナーベクター、ＨＤＡｄ５／３５ドナーゲノム、ＨＤＡｄ５／３５ヘルパーベクター、及びＨＤＡｄ５／３５ヘルパーゲノムは、本明細書で提供される組成物の例であり、本開示のさまざまな方法において使用される。ＨＤＡｄ５／３５ベクターまたはＨＤＡｄ５／３５ゲノムは、Ａｄ３５ファイバーノブ及びＡｄ５シャフトを有するヘルパー依存型キメラＡｄ５／３５ベクターまたはヘルパー依存型キメラＡｄ５／３５ゲノムである。ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターまたはＨＤＡｄ５／３５＋＋ゲノムは、変異Ａｄ３５ファイバーノブを有するヘルパー依存型キメラＡｄ５／３５ベクターまたはヘルパー依存型キメラＡｄ５／３５ゲノムである。このベクターは、ＣＤ４６への親和性が（例えば、２５倍に）上昇し、感染多重度（ＭＯＩ）を下げても細胞形質導入効率が向上するように変異導入される（Ｌｉ　＆　Ｌｉｅｂｅｒ，ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔｅｒｓ，５９３（２４）：３６２３－３６４８，２０１９）。Ａｄ５／３５ヘルパーベクターは、条件的に発現するパッケージング配列（例えば、ｆｒｔ部位またはｌｏｘＰ部位と隣接するもの）を含み、かつドナーゲノムがパッケージングされ得るＡｄ５／３５ビリオンの産生に必要なトランス作用性因子をすべてコードするヘルパーゲノムを含むベクターである。

【０１１８】

ＨＤＡｄ３５ドナーベクター、ＨＤＡｄ３５ドナーゲノム、ＨＤＡｄ３５ヘルパーベクター、及びＨＤＡｄ３５ヘルパーゲノムもまた、本明細書で提供される組成物の例であり、本開示のさまざまな方法において使用される。ＨＤＡｄ３５ベクターまたはＨＤＡｄ３５ゲノムは、ヘルパー依存型Ａｄ３５ベクターまたはヘルパー依存型Ａｄ３５ゲノムである。ＨＤＡｄ３５＋＋ベクターまたはＨＤＡｄ３５＋＋ゲノムは、ＣＤ４６へのその親和性が増強され、細胞形質導入効率が向上した変異Ａｄ３５ファイバーノブを有するヘルパー依存型Ａｄ３５ベクターまたはヘルパー依存型Ａｄ３５ゲノムである。Ａｄ３５ヘルパーベクターは、条件的に発現するパッケージング配列（例えば、ｆｒｔ部位またはｌｏｘＰ部位と隣接するもの）を含み、かつドナーゲノムがパッケージングされ得るＡｄ３５ビリオンの産生に必要なトランス作用性因子をすべてコードするヘルパーゲノムを含むベクターである。本開示は、ＨＤＡｄ３５ドナーゲノム及びＡｄ３５ヘルパーゲノムを含む細胞を含むＨＤＡｄ３５ドナーベクター産生系をさらに含む。ある特定のそのような細胞では、ＨＤＡｄ３５ドナーゲノムがパッケージングされるＨＤＡｄ３５ドナーベクターの産生において、ヘルパーゲノムがコード及び発現するウイルスタンパク質が利用され得る。

したがって、本開示は、ＨＤＡｄ３５ドナーゲノム及びＡｄ３５ヘルパーゲノムを含む細胞を培養することによってＨＤＡｄ３５ドナーベクターを産生させる方法を含む。いくつかの実施形態では、細胞は、Ａｄ３５ヘルパーベクターのパッケージング配列と隣接するリコンビナーゼ同方向反復配列に対応するリコンビナーゼをコード及び発現する。いくつかの実施形態では、Ａｄ３５ヘルパーゲノムの隣接パッケージング配列は切除されている。

【０１１９】

いくつかの実施形態では、Ａｄ３５ヘルパーゲノムは、Ａｄ３５コード配列をすべてコードする。いくつかの実施形態では、Ａｄ３５ヘルパーゲノムは、Ｅ１領域のコード配列の１つ以上及び／またはＥ３コード配列及び／またはＥ４コード配列を除くＡｄ３５コード配列をすべてコード及び／または発現する。さまざまな実施形態において、Ａｄ３５　Ｅ１遺伝子をコード及び／または発現しないヘルパーゲノムは、Ａｄ３５　Ｅ４遺伝子をコード及び／または発現せず、任意選択で、このＡｄ３５ヘルパーゲノムは、Ａｄ５　Ｅ４ｏｒｆ６コード配列を含むようにさらに操作される。当業者なら理解するであろうが、さまざまな実施形態において、ＨＤＡｄ３５ドナーベクターを産生させるための組成物及び方法の細胞は、Ａｄ５　Ｅ１発現産物を発現する細胞であり得る。当業者なら理解するであろうが、さまざまな実施形態において、ＨＤＡｄ３５ドナーベクターを産生させるための組成物及び方法の細胞は、２９３Ｔ細胞（ＨＥＫ２９３）であり得る。

【０１２０】

ヘルパーは、野生型または同様に増殖可能なベクター（野生型または増殖可能なＡｄ５ベクターまたはＡｄ３５ベクターなど）から操作創出されたものであり得る。当業者なら理解するであろうが、ヘルパーベクターの操作において使用され得る方針の１つは、Ｅ１遺伝子発現の欠失または他の機能的破壊である。Ｅ１領域は、アデノウイルスゲノムの５’部分に位置しており、初期遺伝子及び後期遺伝子の野生型発現に必要なタンパク質をコードする。Ｅ１を欠失させると、Ｅ１によって制御されるある特定のウイルス遺伝子の発現が低減または除去され、Ｅ１欠失型ヘルパーウイルスは複製欠陥である。したがって、Ｅ１欠損ヘルパーウイルスは、Ｅ１を発現する細胞株を使用して増殖させることができる。例えば、Ｅ１欠損Ａｄ３５ヘルパーベクターが、Ａｄ５　Ｅ４ｏｒｆ６をコードするように操作される場合、ヘルパーベクターは、Ａｄ５　Ｅ１を発現する細胞株において増殖させることができ、Ｅ１欠損Ａｄ３５ヘルパーベクターが Ａｄ５　Ｅ４ｏｒｆ６をコードする場合、ヘルパーベクターは、Ａｄ５　Ｅ１を発現する細胞株において増殖させることができる。ＨＤＡｄ３５ベクターを産生させるための細胞型の一例では、ＨＥＫ２９３細胞はＡｄ５　Ｅ１ｂ５５ｋを発現し、Ａｄ５　Ｅ１ｂ５５ｋは、Ａｄ５　Ｅ４タンパク質ＯＲＦ６と複合体を形成することが知られている。表２には、Ａｄ３５ゲノムによってコードされる発現産物のまとめ例が示される（Ｇａｏ，Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．１０：１９４１－１９４９，２００３を参照のこと）。

【０１２１】

【表２－１】

表２．Ａｄ３５ゲノムの予測翻訳領域.

| 領域 | | 開始位置 | 終了位置 |
|---|---|---|---|
| E1 領域及び pIX 領域 | | | |
| E1A 261R | | 569 | 1148 |
| | 連結 | 1233 | 1441 |
| E1A 230R | | 569 | 1055 |
| | 連結 | 1233 | 1441 |
| E1A 58R | | 569 | 640 |
| | 連結 | 1233 | 1337 |
| E1B 214R (小型 T 抗原) | | 1611 | 2153 |
| E1B 494R (大型 T 抗原) | | 1916 | 3400 |
| pIX | | 3484 | 3903 |
| ORF-1 | | 2366 | 2689 |
| E2 領域及び IVa2 領域 (相補鎖) | | | |
| IVa2 | | 5579 | 5590 |
| | 連結 | 3966 | 5300 |
| E2B DNA pol | | 5069 | 8437 |
| E2B pTP | | 8440 | 10 356 |
| E2A DBP | | 22 414 | 23 415 |
| ORF-2 | | 5988 | 6482 |
| ORF-3 | | 7847 | 8257 |
| ORF-4 | | 15 663 | 15 971 |
| ORF-5 | | 15 743 | 16 216 |
| ORF-6 | | 16 457 | 17 041 |
| ORF-7 | | 17 543 | 17 938 |
| ORF-8 | | 17 994 | 18 713 |
| ORF-9 | | 21 858 | 22 436 |
| ORF-10 | | 22 128 | 22 502 |
| ORF-11 | | 23 027 | 23 488 |
| E3 領域 | | | |
| E3 12.2K タンパク質 | | 27 198 | 27 515 |
| E3 15.0 K タンパク質 | | 27 469 | 27 864 |
| E3 18.5K タンパク質 | | 27 849 | 28 349 |
| E3 20.3K タンパク質 | | 28 369 | 28 914 |
| E3 20.6K タンパク質 | | 28 932 | 29 495 |
| E3 15.2K タンパク質 | | 29 817 | 30 221 |
| E3 15.3K タンパク質 | | 30 214 | 30 621 |
| ORF-12 | | 25 693 | 26 019 |
| ORF-13 | | 27 908 | 28 240 |

【表２－２】

| 領域 | | 開始位置 | 終了位置 |
|---|---|---|---|
| E4 領域 (相補鎖) | | | |
| E4 299R | | 32 075 | 32 974 |
| E4 145R | | 33 604 | 34 041 |
| E4 125R | | 34 038 | 34 415 |
| E4 117R | | 33 254 | 33 607 |
| E4 122R | | 32 877 | 33 245 |
| ORF-14 | | 33 100 | 33 609 |
| VA RNA 領域 | | 10 433 | 10 594 |
| L 領域 | | | |
| L1 52,55K | | 10 653 | 11 819 |
| L1 IIIa | | 11 845 | 13 608 |
| L2 III (ペントンベース) | | 13 690 | 15 375 |
| L2 pVII | | 15 383 | 15 961 |
| L2 V | | 16 004 | 17 059 |
| L3 pVI | | 17 399 | 18 139 |
| L3 II (ヘキソン) | | 18 255 | 21 113 |
| L3 23K (プロテアーゼ) | | 21 150 | 21 779 |
| L4 100K | | 23 446 | 25 884 |
| L4 22K | | 25 616 | 26 191 |
| L4 33K | | 25 616 | 25 934 |
| | 連結 | 26 104 | 26 465 |
| L4 pVIII | | 26 515 | 27 198 |
| L5 IV(ファイバー) | | 30 826 | 31 797 |

【０１２２】

本開示は、とりわけ、Ａｄ３５　ＩＴＲ（例えば、５’Ａｄ３５　ＩＴＲ及び３’ＩＴＲ）を含むＨＤＡｄ３５ドナーベクター及びＨＤＡｄ３５ドナーゲノムを含み、例えば、２つのＡｄ３５　ＩＴＲは、ペイロードと隣接する。本開示は、とりわけ、Ａｄ３５パッケージング配列またはその機能性断片を含むＨＤＡｄ３５ドナーベクター及びＨＤＡｄ３５ドナーゲノムを含む。本開示は、とりわけ、Ｅ１またはその断片が欠失したＨＤＡｄ３５ドナーベクター及びＨＤＡｄ３５ドナーゲノムを含む（例えば、Ｅ１欠失は、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＡＸ０４９９８３のヌクレオチド４８１～３１１２または本明細書で提供される別のＡｄ３５ベクター配列の対応位置の欠失を含む）。本開示は、とりわけ、Ｅ３またはその断片が欠失したＨＤＡｄ３５ベクター及びＨＤＡｄ３５ゲノムを含む（例えば、Ｅ３欠失は、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＡＸ０４９９８３のヌクレオチド２７６０９～３０４０２もしくはヌクレオチド２７４３５～３０５４２または本明細書で提供される別のＡｄ３５ベクター配列の対応位置の欠失を含む）。

【０１２３】

本開示は、とりわけ、パッケージング配列またはその機能的に寄与する断片（例えば、機能的に必要な断片）と隣接する２つの組換え部位エレメントを含むＡｄ３５ヘルパーベクター及びＡｄ３５ヘルパーゲノムを含み、各組換え部位エレメントは、組換え部位を含み、２つの組換え部位は、同じリコンビナーゼに対する部位である。上記のように、Ａｄ

３５ヘルパーベクターの構築においては、他のベクターに関する現存知見から予想通りに操作を行うことは不可能である。それどころか、Ａｄ３５の関連配列は、（例えば、Ａｄ５の対応配列と比較して）非常に異なるものである（例えば、Ａｄ３５の５’の６００～６２０個のヌクレオチドとＡｄ５の５’の６００～６２０個のヌクレオチドとを比較されたい）。さらに、パッケージング配列は血清型特異的である。Ａｄ３５パッケージング配列は、少なくともＡＩ、ＡＩＩ、ＡＩＩＩ、ＡＩＶ、及びＡＶというＡｄ５パッケージング単一配列に対応する配列を含む。したがって、Ａｄ３５ヘルパーベクターを生成させるには、予想不可能な決定がいくつか必要であり、こうした決定には、（１）リコンビナーゼ部位エレメントを対象ゲノムに挿入することによって、リコンビナーゼ部位（例えば、ｌｏｘＰ部位）と隣接すべきＡｄ３５パッケージング配列またはその機能的に寄与する断片（例えば、機能的に必要な断片）を同定すること（この同定は、配列類似性が限られる場合、容易なことではない）、（２）ヘルパーベクターの増殖（パッケージング配列またはその機能的に寄与する断片（例えば、機能的に必要な断片）が切除されない条件の下での増殖）に負の影響を与えずにリコンビナーゼ部位エレメントを挿入することを同定すること（この同定は、予想不可能である）、及び／または（３）（例えば、ｃｒｅリコンビナーゼ発現細胞株（１１６細胞株など）において）ＨＤＡｄ３５ドナーベクターの産生の間にヘルパーウイルスのパッケージングを低減しつつパッケージング配列またはその機能的に寄与する断片（例えば、機能的に必要な断片）を効率的に欠失させることを可能にする組換え部位エレメント間間隔を同定すること、が含まれる。

【０１２４】

本開示は、複数のＡｄ３５ヘルパーベクター例及びＡｄ３５ヘルパーゲノム例を含み、これらのＡｄ３５ヘルパーベクター例及びＡｄ３５ヘルパーゲノム例は、（１）Ａｄ３５パッケージング配列の機能的に寄与するまたは機能的に必要な断片と隣接するｌｏｘＰ部位を含み、このｌｏｘＰ部位は、少なくとも、このｌｏｘＰ部位の組換えによって当該隣接配列の切除が生じることでベクターの増殖が（例えば、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％）低減される（例えば、ベクターの増殖低減パーセントは、下限が２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％であり、上限が６０％、７０％、８０％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％であるパーセントである）という点において当該隣接配列と隣接しており、任意選択で、増殖パーセントは、切除を受けるベクター（リコンビナーゼ部位と隣接する配列が切除されるもの）の増殖によって産生されるウイルス粒子の数を、同等条件下で完全なベクター（リコンビナーゼ部位と隣接する配列が切除されないもの）または野生型Ａｄ３５ベクターのものと比較して測定される。

【０１２５】

少なくとも１つのＡｄ３５ヘルパーベクター例では、ヌクレオチド１７８の後にリコンビナーゼ部位エレメント（例えば、ｌｏｘＰエレメント）が挿入され、さらに、ヌクレオチド４３７の後にリコンビナーゼ部位エレメント（例えば、ｌｏｘＰエレメント）が挿入される。これらのｌｏｘＰと隣接する配列が切除されることで、パッケージング配列ＡＩ～ＡＩＶが除去される。ある特定のそのような実施形態では、ヌクレオチド３４５～３１３を欠失させることで、Ｅ１遺伝子ならびにパッケージング単一配列ＡＶＩ及びＡＶＩＩが除去される。したがって、隣接するパッケージング配列またはその断片は位置１７９～３４４に対応する。この説明によるベクターは、増殖することが示されている。

【０１２６】

少なくとも１つのＡｄ３５ヘルパーベクター例では、ヌクレオチド１７８の後にリコンビナーゼ部位エレメント（例えば、ｌｏｘＰエレメント）が挿入され、さらに、ヌクレオチド４８１の後にリコンビナーゼ部位エレメント（例えば、ｌｏｘＰエレメント）が挿入され、ヌクレオチド１７９～３６５は欠失され（これによってパッケージング配列ＡＩ～

ＡＶは除去される）、その結果、残存する配列ＡＶＩ及びＡＶＩＩがこの核酸配列中でリコンビナーゼ部位エレメントと隣接する。ある特定のそのような実施形態では、ヌクレオチド４８２～３１１３を欠失させることでＥ１遺伝子が除去される。したがって、隣接するパッケージング配列またはその断片は位置３６６～４８１に対応する。この説明によるベクターは、増殖することが示されている。

【０１２７】

少なくとも１つのＡｄ３５ヘルパーベクター例では、ヌクレオチド１５４の後にリコンビナーゼ部位エレメント（例えば、ｌｏｘＰエレメント）が挿入され、さらに、ヌクレオチド４８１の後にリコンビナーゼ部位エレメント（例えば、ｌｏｘＰエレメント）が挿入され、ある特定のそのような実施形態では、ヌクレオチド４８２～３１１３を欠失させることでＥ１遺伝子が除去される。したがって、隣接するパッケージング配列またはその断片は位置１５５～４８１に対応する。この説明によるベクターは、増殖することが示されている。

【０１２８】

少なくとも１つのＡｄ３５ヘルパーベクター例では、ヌクレオチド１５８の後にリコンビナーゼ部位エレメント（例えば、ｌｏｘＰエレメント）が挿入され、さらに、ヌクレオチド４８０の後にリコンビナーゼ部位エレメント（例えば、ｌｏｘＰエレメント）が挿入される。この説明によるベクターは、増殖することが示されている。ある特定のそのような実施形態では、Ｅ３領域を含むヌクレオチド２７３８８～３０４０２は欠失される。ある特定の実施形態では、ベクターは、Ａｄ３５$^{++}$ベクターである。

【０１２９】

少なくとも１つのＡｄ３５ヘルパーベクター例では、ヌクレオチド１５８の後にリコンビナーゼ部位エレメント（例えば、ｌｏｘＰエレメント）が挿入され、さらに、ヌクレオチド４４６の後にリコンビナーゼ部位エレメント（例えば、ｌｏｘＰエレメント）が挿入される。この説明によるベクターは、増殖することが示されている。ある特定のそのような実施形態では、Ｅ３領域を含むヌクレオチド２７３８８～３０４０２は欠失される。ある特定の実施形態では、ベクターは、Ａｄ３５$^{++}$ベクターである。

【０１３０】

少なくとも１つのＡｄ３５ヘルパーベクター例では、ヌクレオチド１７９の後にリコンビナーゼ部位エレメント（例えば、ｌｏｘＰエレメント）が挿入され、さらに、ヌクレオチド４８０の後にリコンビナーゼ部位エレメント（例えば、ｌｏｘＰエレメント）が挿入される。この説明によるベクターは、増殖することが示されている。ある特定のそのような実施形態では、Ｅ３領域を含むヌクレオチド２７３８８～３０４０２は欠失される。ある特定の実施形態では、ベクターは、Ａｄ３５$^{++}$ベクターである。

【０１３１】

少なくとも１つのＡｄ３５ヘルパーベクター例では、ヌクレオチド２０６の後にリコンビナーゼ部位エレメント（例えば、ｌｏｘＰエレメント）が挿入され、さらに、ヌクレオチド４８０の後にリコンビナーゼ部位エレメント（例えば、ｌｏｘＰエレメント）が挿入される。この説明によるベクターは、増殖することが示されている。ある特定のそのような実施形態では、Ｅ３領域を含むヌクレオチド２７，３８８～３０，４０２は欠失される。ある特定の実施形態では、ヌクレオチド２７，６０７～３０，４０９またはヌクレオチド２７，６０９～３０，４０２は欠失される。ある特定の実施形態では、ヌクレオチド２７，２４０～２７，６０８は欠失されない。

【０１３２】

少なくとも１つのＡｄ３５ヘルパーベクター例では、ヌクレオチド１３９の後にリコンビナーゼ部位エレメント（例えば、ｌｏｘＰエレメント）が挿入され、さらに、ヌクレオチド４４６の後にリコンビナーゼ部位エレメント（例えば、ｌｏｘＰエレメント）が挿入される。ある特定のそのような実施形態では、ヌクレオチド２７６０９～３０４０２は欠失される。

【０１３３】

少なくとも１つのＡｄ３５ヘルパーベクター例では、ヌクレオチド１５８の後にリコンビナーゼ部位エレメント（例えば、ｌｏｘＰエレメント）が挿入され、さらに、ヌクレオチド４４６の後にリコンビナーゼ部位エレメント（例えば、ｌｏｘＰエレメント）が挿入される。ある特定のそのような実施形態では、ヌクレオチド２７６０９～３０４０２は欠失される。

【０１３４】

少なくとも１つのＡｄ３５ヘルパーベクター例では、ヌクレオチド１７９の後にリコンビナーゼ部位エレメント（例えば、ｌｏｘＰエレメント）が挿入され、さらに、ヌクレオチド４４６の後にリコンビナーゼ部位エレメント（例えば、ｌｏｘＰエレメント）が挿入される。ある特定のそのような実施形態では、ヌクレオチド２７６０９～３０４０２は欠失される。

【０１３５】

少なくとも１つのＡｄ３５ヘルパーベクター例では、ヌクレオチド２０１の後にリコンビナーゼ部位エレメント（例えば、ｌｏｘＰエレメント）が挿入され、さらに、ヌクレオチド４４６の後にリコンビナーゼ部位エレメント（例えば、ｌｏｘＰエレメント）が挿入される。ある特定のそのような実施形態では、ヌクレオチド２７６０９～３０４０２は欠失される。

【０１３６】

少なくとも１つのＡｄ３５ヘルパーベクター例では、ヌクレオチド１５８の後にリコンビナーゼ部位エレメント（例えば、ｌｏｘＰエレメント）が挿入され、さらに、ヌクレオチド４８１の後にリコンビナーゼ部位エレメント（例えば、ｌｏｘＰエレメント）が挿入される。ある特定のそのような実施形態では、ヌクレオチド２７６０９～３０４０２は欠失される。

【０１３７】

少なくとも１つのＡｄ３５ヘルパーベクター例では、ヌクレオチド１７９の後にリコンビナーゼ部位エレメント（例えば、ｌｏｘＰエレメント）が挿入され、さらに、ヌクレオチド３８４の後にリコンビナーゼ部位エレメント（例えば、ｌｏｘＰエレメント）が挿入される。ある特定のそのような実施形態では、ヌクレオチド２７６０９～３０４０２は欠失される。

【０１３８】

少なくとも１つのＡｄ３５ヘルパーベクター例では、ヌクレオチド１７９の後にリコンビナーゼ部位エレメント（例えば、ｌｏｘＰエレメント）が挿入され、さらに、ヌクレオチド４８１の後にリコンビナーゼ部位エレメント（例えば、ｌｏｘＰエレメント）が挿入される。ある特定のそのような実施形態では、ヌクレオチド２７６０９～３０４０２は欠失される。

【０１３９】

少なくとも１つのＡｄ３５ヘルパーベクター例では、ヌクレオチド２０６の後にリコンビナーゼ部位エレメント（例えば、ｌｏｘＰエレメント）が挿入され、さらに、ヌクレオチド４８１の後にリコンビナーゼ部位エレメント（例えば、ｌｏｘＰエレメント）が挿入される。ある特定のそのような実施形態では、ヌクレオチド２７６０９～３０４０２は欠失される。

【０１４０】

操作に関して任意選択でさらに考慮すべきことは、遠心分離（例えば、ＣｓＣｌ超遠心分離）によってＨＤＡｄ３５ドナーベクターからヘルパーベクターを分離することを可能にするサイズを有するようにヘルパーゲノムを操作することであり得る。この結果を達成する手段の１つは、典型的なＡｄ３５ゲノム（野生型では３４，７９４ｂｐの長さを有する）と比較してヘルパーゲノムのサイズを大きくすることである。具体的には、少なくとも野生型の長さの１０４％となるように操作することによってアデノウイルスゲノムを大きくすることができる。本開示のある特定のヘルパーベクターは、Ａｄ３５のＥ１領域及びＥ４領域を含み、Ｅ３領域が欠失しており、ペイロード及び／またはスタッファー配列

を収容することができる。

【０１４１】

Ａｄ３５ヘルパーベクターは、Ａｄ３５ドナーベクターの産生に使用され得る。ＨＤＡｄ３５＋＋ベクターの産生は、ＨＤＡｄベクターゲノムを含むプラスミドと、構造ウイルスタンパク質及び非構造ウイルスタンパク質を提供するパッケージング欠損ヘルパーウイルスと、を同時にトランスフェクションすることを含み得る。ヘルパーウイルスゲノムは、Ａｄ３５ドナーベクターの増殖をレスキューすることが可能であり、Ａｄ３５ドナーベクターは、（例えば、大スケールで）産生され、単離され得る。当該技術分野ではさまざまなプロトコールが知られており、こうしたプロトコールは、例えば、Ｐａｌｍｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００９ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌｕｍｅ ４３３．Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ；Ｔｏｔｏｗａ，ＮＪ：２００９．ｐｐ．３３－５３に記載されている。

【０１４２】

本開示は、ヒトＣＤ３４＋細胞の形質導入において本開示のＨＤＡｄ３５ドナーベクターがＨＤＡｄ５／３５ドナーベクターと同等の能力を発揮することを実証するデータ例を含み、この能力は、接触させた細胞が、ＧＦＰをコードするペイロードコード配列を発現するパーセントによって測定したものである。結果は、複数のＭＯＩ（接触細胞当たりのベクター粒子数範囲５００～２０００）で確認した。実験例は、ＨＤＡｄ３５ドナーベクターを使用して実施したものであり、データ例の生成において使用したこのＨＤＡｄ３５ドナーベクターは、上に開示されるＡｄ３５ヘルパーベクター（ｌｏｘＰ部位がヌクレオチド３６６～４８１と隣接するもの）を使用して産生させたものである（例えば、図１１７を参照のこと）。

【０１４３】

本明細書ではさまざまなドナーベクター例が提供される。本開示は、非限定的な例として、表３～６に示されるＨＤＡｄ３５ドナーゲノムを提供する。

【０１４４】

【表３】

表３：配列番号３０４に示されるＨＤＡｄ３５ドナーベクター例.

| 配列領域 | 配列番号 304 中の位置 |
|---|---|
| Ad35 5’ (ITR、パッケージング配列を含む) | 開始位置:1 終了位置:481 |
| FRT リコンビナーゼ同方向反復配列 | 開始位置:14126 終了位置:14159 (相補) |
| pT4 トランスポゼース逆方向反復配列 | 開始位置:14220 終了位置:14463 |
| EF1α プロモーター | 開始位置:14491 終了位置:15825 |
| $mgmt^{P140K}$ 選択カセット | 開始位置:15843 終了位置:16466 |
| ポリ A 配列 | 開始位置:16484 終了位置:16705 |
| pT4 トランスポゼース逆方向反復配列 | 開始位置:16735 終了位置:17000 |
| FRT リコンビナーゼ同方向反復配列 | 開始位置:17107 終了位置:17140 (相補) |
| Ad35 3’ (ITR を含む) | 開始位置:28823 終了位置:29230 |

【０１４５】

【表４】

表４：配列番号３０５に示されるＨＤＡｄ３５ドナーベクター例

| 配列領域 | 配列番号 305 中の位置 |
|---|---|
| Ad35 5' (ITR、パッケージング配列を含む) | 開始位置:1 終了位置:481 |
| FRT リコンビナーゼ同方向反復配列 | 開始位置:14126 終了位置:14159 (相補) |
| pT4 トランスポゼース逆方向反復配列 | 開始位置:14220 終了位置:14463 |
| EF1α プロモーター | 開始位置:14478 終了位置:15812 |
| $mgmt^{P140K}$ 選択カセット | 開始位置:15830 終了位置:16450 |
| 2A ペプチドコード配列 | 開始位置:16451 終了位置:16522 |
| GFP コード配列 | 開始位置:16523 終了位置:17242 |
| SV40 ポリ A 配列 | 開始位置:17269 終了位置:17390 |
| pT4 トランスポゼース逆方向反復配列 | 開始位置:17501 終了位置:17766 |
| FRT リコンビナーゼ同方向反復配列 | 開始位置:17873 終了位置:17906 (相補) |
| Ad35 3' (ITR を含む) | 開始位置:29589 終了位置:29996 |

【０１４６】

【表５】

表５：配列番号２８８に示されるＨＤＡｄ３５ドナーベクター例.

| 配列領域 | 配列番号 288 中の位置 |
|---|---|
| Ad35 5' (ITR、パッケージング配列を含む) | 開始位置:1 終了位置:481 |
| FRT リコンビナーゼ同方向反復配列 | 開始位置:14126 終了位置:14159 (相補) |
| pT4 トランスポゼース逆方向反復配列 | 開始位置:14220 終了位置:14463 |
| EF1α プロモーター | 開始位置:14478 終了位置:15812 |
| $mgmt^{P140K}$ 選択カセット | 開始位置:15830 終了位置:16450 |
| 2A ペプチドコード配列 | 開始位置:16451 終了位置:16522 |
| mCherry コード配列 | 開始位置:16526 終了位置:17230 |
| SV40 ポリ A 配列 | 開始位置:17259 終了位置:17380 |
| pT4 トランスポゼース逆方向反復配列 | 開始位置:17491 終了位置:17756 |
| FRT リコンビナーゼ同方向反復配列 | 開始位置:17863 終了位置:17896 (相補) |
| Ad35 3' (ITR を含む) | 開始位置:29579 終了位置:29986 |

【０１４７】

【表６】

表６：配列番号２８９に示されるサポートベクター例.

| 配列領域 | 配列番号 289 中の位置 |
|---|---|
| Ad35 5' (ITR、パッケージング配列を含む) | 開始位置:1 終了位置:481 |
| PGK プロモーター | 開始位置:14103 終了位置:14614 |
| SB100x トランスポゼースコード配列 | 開始位置:14763 終了位置:15785 |
| BGH ポリ A 配列 | 開始位置:15811 終了位置:16128 |
| B-グロビンポリ A 配列 | 開始位置:16088 終了位置:16376 (相補) |
| Flpe リコンビナーゼコード配列 | 開始位置:16488 終了位置:17759 (相補) |
| EF1α プロモーター | 開始位置:17780 終了位置:18895 (相補) |
| Ad35 3' (ITR を含む) | 開始位置:29751 終了位置:30158 |

【０１４８】

【表７】

表７：配列番号２８６に示されるＡｄ３５ヘルパーベクター例

| 配列領域 | 配列番号 286 中の位置 |
|---|---|
| Ad35 5’ (ITR を含む)(Ad35 nt 1-178) | 開始位置:2582 終了位置:2759 |
| LoxP リコンビナーゼ部位 | 開始位置:2768 終了位置:2801 |
| Ad35 パッケージング配列 (Ad35 nt 179-344) | 開始位置:2808 終了位置:2973 |
| LoxP リコンビナーゼ部位 | 開始位置:2974 終了位置:3007 |
| Ad35 配列 (Ad35 nt 3112-27435) | 開始位置:3016 終了位置:27338 |
| ラムダ-1 配列 | 開始位置:27393 終了位置:29862 (相補) |
| BGH ポリ A 配列 | 開始位置:30176 終了位置:30390 |
| CopGFP コード配列 | 開始位置:30415 終了位置:31080 (相補) |
| CMV プロモーター | 開始位置:31127 終了位置:31779 (相補) |
| ラムダ-2 配列 | 開始位置:31831 終了位置:33360 |
| Ad35 配列 (Ad35 nt 30544-31879) | 開始位置:33421 終了位置:34756 |
| Ad5 E4orf6 配列 | 開始位置:34752 終了位置:35866 |
| Ad35 3’ (ITR を含む) (Ad35 nt 32972-34794) | 開始位置:35864 終了位置:37686 |

【０１４９】

【表８】

表８：配列番号５１に示されるＡｄ３５ヘルパーベクター例.

| 配列領域 | 配列番号 51 中の位置 |
|---|---|
| Ad35 5’ (ITR を含む) (Ad35 nt 1-178) | 開始位置:2582 終了位置:2759 |
| LoxP リコンビナーゼ部位 | 開始位置:2768 終了位置:2801 |
| Ad35 パッケージング配列 (Ad35 nt 366-481) | 開始位置:2808 終了位置:2923 |
| LoxP リコンビナーゼ部位 | 開始位置:2924 終了位置:2957 |
| Ad35 配列 (Ad35 nt 3112-2743) | 開始位置:2966 終了位置:27288 |
| ラムダ-1 配列 | 開始位置:27343 終了位置:29812 (相補) |
| BGH ポリ A 配列 | 開始位置:30126 終了位置:30340 |
| CopGFP コード配列 | 開始位置:30365 終了位置:31030 (相補) |
| CMV プロモーター | 開始位置:31077 終了位置:31729 (相補) |
| ラムダ-2 配列 | 開始位置:31781 終了位置:33310 |
| Ad35 配列 (Ad35 nt 30544-31879) | 開始位置:33371 終了位置:34706 |
| Ad5 E4orf6 配列 | 開始位置:34702 終了位置:35816 |
| Ad35 3’ (ITR を含む) (Ad35 nt 32972-34794) | 開始位置:35814 終了位置:37636 |

【０１５０】

【表９】

表９：配列番号５２に示されるＡｄ３５ヘルパーベクター例.

| 配列領域 | 配列番号 52 中の位置 |
|---|---|
| Ad35 5’ (ITR を含む) (Ad35 nt 1-154) | 開始位置:2582 終了位置:2735 |
| LoxP リコンビナーゼ部位 | 開始位置:2744 終了位置:2777 |
| Ad35 パッケージング配列 (Ad35 nt 155-481) | 開始位置:2784 終了位置:3110 |
| LoxP リコンビナーゼ部位 | 開始位置:3111 終了位置:3144 |
| Ad35 配列 (Ad35 nt 3112-27435) | 開始位置:3153 終了位置:27475 |
| ラムダ-1 配列 | 開始位置:27530 終了位置:29999 (相補) |
| BGH ポリ A 配列 | 開始位置:30313 終了位置:30527 |
| CopGFP コード配列 | 開始位置:30552 終了位置:31217 (相補) |
| CMV プロモーター | 開始位置:31264 終了位置:31916 (相補) |
| ラムダ-2 配列 | 開始位置:31968 終了位置:33497 |
| Ad35 配列 (Ad35 nt 30544-31879) | 開始位置:33558 終了位置:34893 |
| Ad5 E4orf6 配列 | 開始位置:34889 終了位置:36003 |
| Ad35 3’ (ITR を含む) (Ad35 nt 32972-34794) | 開始位置:36001 終了位置:37823 |

【０１５１】

**Ｉ（Ｃ）．遺伝子治療ベクターペイロード**

本開示のＡｄ３５ドナーベクター及びＡｄ３５ドナーゲノムならびにＡｄ５／３５ドナーベクター及びＡｄ５／３５ドナーゲノムは、１つ以上の発現産物をコードする１つ以上のコード配列、コード配列と機能可能なように連結された１つ以上の制御配列、１つ以上のスタッファー配列、及び同様のもの、のうちのいずれも含み得るさまざまな核酸ペイロードを含み得る。さまざまな実施形態において、ペイロードは、宿主細胞または宿主系において所望の結果（治療効果など）を達成するために操作され、こうした所望の結果は、例えば、治療目的のタンパク質が発現すること、または治療目的の配列改変を生じさせるための遺伝子編集系（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系もしくは塩基編集系）が発現することである。いくつかの実施形態では、ペイロードは遺伝子を含み得る。遺伝子はコード配列を含むだけでなく、制御領域（プロモーター、エンハンサー、終結領域、遺伝子座制御領域（ＬＣＲ）、終結シグナルエレメント及びポリアデニル化シグナルエレメント、スプライシングシグナルエレメント、ならびに同様のものなど）も含み得る。この用語は、イントロン、及びｍＲＮＡ転写産物からスプライシングされる他のＤＮＡ配列をすべて、選択的スプライス部位から生じるバリアントと併せて、さらに含み得る。配列は、特定の生物または細胞型におけるコドン選択を与えるために導入され得る参照配列または配列の縮重コドンも含み得る。

【０１５２】

ペイロードは、単一の遺伝子または複数の遺伝子を含み得る。ペイロードは、単一の制御配列または複数の制御配列を含み得る。ペイロードは、単一のコード配列または複数のコード配列を含み得る。ペイロードは、複数のコード配列を含み得、これらのコード配列の個々の発現産物は、一緒に機能するか（例えば、エンドヌクレアーゼ及びガイドＲＮＡの場合に見られるように一緒に機能する）、または独立して機能する（例えば、直接的もしくは間接的に結合しない２つの別々のタンパク質として独立して機能する）。場合によっては、複数のコード配列は協同的に機能し得、この場合、例えば、宿主細胞または宿主系に内在するコード配列の発現をエンドヌクレアーゼ及びガイドＲＮＡが増加させ、ペイロードは、そうした内在性コード配列によってコードされるタンパク質のものに対応する少なくとも１つの生物学的活性を有するタンパク質をさらにコードし、それを発現する。当業者なら理解するであろうが、本明細書で提供されるペイロードコード発現産物のうちで、標準野生型Ａｄ３５ゲノムによってコードされないものはいずれも、本明細書では異

種発現産物と称され得る。
【０１５３】
Ｉ（Ｃ）（ｉ）．ペイロード発現産物
本開示のアデノウイルスドナーベクターまたはアデノウイルスドナーゲノムのペイロードは、さまざまな発現産物のいずれかをコードする１つ以上のコード配列を含み得る。発現産物の例としてはタンパク質が挙げられ、こうしたタンパク質には、限定されないが、生物学的に活性なタンパク質の発現または活性が参照レベルと比較して低いことによって特徴付けられる疾患または状態を治療するための補充療法タンパク質が含まれる。発現産物の例としては、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系及び塩基エディター系が挙げられる。発現産物の例としては、抗体、ＣＡＲ、及びＴＣＲが挙げられる。発現産物の例としては、低分子ＲＮＡが挙げられる。さまざまな実施形態において、ドナーベクターまたはドナーゲノムを標的細胞に送達して目的の作用または標的作用を与える上でドナーベクターペイロードのすべてまたは一部を宿主細胞ゲノムに組み込むことは不要であり、これは、例えば、そうした目的の作用または標的作用がＣＲＩＳＰＲ系または塩基エディター系によって宿主細胞ゲノムを編集することを含むある特定の場合である。さまざまな実施形態において、ドナーベクターまたはドナーゲノムを標的細胞に送達して目的の作用または標的作用を与える上でドナーベクターペイロードのすべてまたは一部を組み込むことが必要であるか、または好ましく、これは、例えば、形質導入される標的細胞の子孫細胞においてペイロードコード発現産物が発現することが望ましい場合である。さまざまな実施形態において、ペイロードは、宿主細胞ゲノムに（例えば、組換えまたは転位によって）組み込まれるように操作された核酸配列（「組み込みエレメント」）を含み得る。
【０１５４】
１つ以上の治療用タンパク質をコードする遺伝子配列は、関連アミノ酸配列から合成方法または組換え方法によって容易に調製され得る。特定の実施形態では、こうした配列のいずれかをコードする遺伝子配列は、当該配列をコードする当該遺伝子配列を切除し、異なる配列をコードする別の遺伝子配列で置き換えることを容易にするために、当該コード配列の５’末端及び／または３’末端に１つ以上の制限酵素部位も有し得る。特定の実施形態では、配列をコードする遺伝子配列は、哺乳動物細胞での発現についてコドンが最適化されたものであり得る。
【０１５５】
治療用遺伝子及び／または治療用遺伝子産物の具体例としては、γ－グロビン、第ＶＩＩＩ因子、γＣ、ＪＡＫ３、ＩＬ７ＲＡ、ＲＡＧ１、ＲＡＧ２、ＤＣＬＲＥ１Ｃ、ＰＲＫＤＣ、ＬＩＧ４、ＮＨＥＪ１、ＣＤ３Ｄ、ＣＤ３Ｅ、ＣＤ３Ｚ、ＣＤ３Ｇ、ＰＴＰＲＣ、ＺＡＰ７０、ＬＣＫ、ＡＫ２、ＡＤＡ、ＰＮＰ、ＷＨＮ、ＣＨＤ７、ＯＲＡＩ１、ＳＴＩＭ１、ＣＯＲＯ１Ａ、ＣＩＩＴＡ、ＲＦＸＡＮＫ、ＲＦＸ５、ＲＦＸＡＰ、ＲＭＲＰ、ＤＫＣ１、ＴＥＲＴ、ＴＩＮＦ２、ＤＣＬＲＥ１Ｂ、及びＳＬＣ４６Ａ１；ＦＡＮＣファミリー遺伝子（ＦａｎｃＡ、ＦａｎｃＢ、ＦａｎｃＣ、ＦａｎｃＤ１（ＢＲＣＡ２）、ＦａｎｃＤ２、ＦａｎｃＥ、ＦａｎｃＦ、ＦａｎｃＧ、ＦａｎｃＩ、ＦａｎｃＪ（ＢＲＩＰ１）、ＦａｎｃＬ、ＦａｎｃＭ、ＦａｎｃＮ（ＰＡＬＢ２）、ＦａｎｃＯ（ＲＡＤ５１Ｃ）、ＦａｎｃＰ（ＳＬＸ４）、ＦａｎｃＱ（ＥＲＣＣ４）、ＦａｎｃＲ（ＲＡＤ５１）、ＦａｎｃＳ（ＢＲＣＡ１）、ＦａｎｃＴ（ＵＢＥ２Ｔ）、ＦａｎｃＵ（ＸＲＣＣ２）、ＦａｎｃＶ（ＭＡＤ２Ｌ２）、及びＦａｎｃＷ（ＲＦＷＤ３）を含む）；可溶性ＣＤ４０；ＣＴＬＡ；ＦａｓＬ；ＣＤ４に対する抗体、ＣＤ５に対する抗体、ＣＤ７に対する抗体、ＣＤ５２に対する抗体など；ＩＬ１に対する抗体、ＩＬ２に対する抗体、ＩＬ６に対する抗体など；自己反応性Ｔ細胞上に特異的に存在するＴＣＲに対する抗体；ＩＬ４；ＩＬ１０；ＩＬ１２；ＩＬ１３；ＩＬ１Ｒａ、ｓＩＬ１ＲＩ、ｓＩＬ１ＲＩＩ；ｓＴＮＦＲＩ；ｓＴＮＦＲＩＩ；ＴＮＦに対する抗体；Ｐ５３、ＰＴＰＮ２２、及びＤＲＢ１＊１５０１／ＤＱＢ１＊０６０２；グロビンファミリー遺伝子；ＷＡＳ；ｐｈｏｘ；ジストロフィン；ピルビン酸キナーゼ；ＣＬＮ３；ＡＢＣＤ１；アリールスルファターゼＡ；ＳＦＴＰＢ；ＳＦＴＰＣ；ＮＬＸ２．１；ＡＢＣＡ３；ＧＡＴＡ１；リボソームタンパク質遺伝子；Ｔ

ＥＲＴ；ＴＥＲＣ；ＤＫＣ１；ＴＩＮＦ２；ＣＦＴＲ；ＬＲＲＫ２；ＰＡＲＫ２；ＰＡＲＫ７；ＰＩＮＫ１；ＳＮＣＡ；ＰＳＥＮ１；ＰＳＥＮ２；ＡＰＰ；ＳＯＤ１；ＴＤＰ４３；ＦＵＳ；ユビキリン２；Ｃ９ＯＲＦ７２、ならびに本明細書に記載の他の治療用遺伝子が挙げられる。

【０１５６】

治療用遺伝子は、赤血球及び凝固と関連する疾患に対して治療的に有効な応答が生じるように選択され得る。特定の実施形態では、疾患は、サラセミアまたは鎌状赤血球症／形質のような異常ヘモグロビン症である。治療用遺伝子は、例えば、ヘモグロビンの産生を誘導もしくは増加させる遺伝子、β－グロビン、γ－グロビン、もしくはα－グロビンの産生を誘導もしくは増加させる遺伝子、または体内の細胞への酸素の利用性を向上させる遺伝子であり得る。治療用遺伝子は、例えば、ＨＢＢまたはＣＹＢ５Ｒ３であり得る。有効な治療の例は、例えば、患者において、血液細胞数を増加させるもの、血液細胞機能を改善するもの、または細胞の酸素化を増加させるものであり得る。別の特定の実施形態では、疾患は血友病である。治療用遺伝子は、例えば、血液凝固／凝固第ＶＩＩＩ因子もしくは血液凝固／凝固第ＩＸ因子の産生を増加させる遺伝子、正常バージョンの血液凝固第ＶＩＩＩ因子もしくは血液凝固第ＩＸ因子の産生を生じさせる遺伝子、血液凝固／凝固第ＶＩＩＩ因子もしくは血液凝固／凝固第ＩＸ因子に対する抗体の産生を低減する遺伝子、または適切な血液凝固物形成を生じさせる遺伝子であり得る。治療用遺伝子の例としては、Ｆ８及びＦ９が挙げられる。有効な治療の例は、例えば、対象において、血液凝固／凝固第ＶＩＩＩ因子及び血液凝固／凝固第ＩＸ因子の産生を増加もしくは誘導するもの、血液凝固／凝固第ＶＩＩＩ因子及び血液凝固／凝固第ＩＸ因子の機能を改善するもの、または凝固時間を低減するものであり得る。

【０１５７】

本開示のさまざまな実施形態において、ドナーベクターはグロビン遺伝子をコードし、グロビン遺伝子によってコードされるグロビンタンパク質は、γ－グロビン、β－グロビン、及び／またはα－グロビンから選択される。本開示のグロビン遺伝子は、例えば、グロビンタンパク質をコードする核酸配列と機能可能なように連結された１つ以上の制御配列（プロモーターなど）を含み得る。当業者なら理解するであろうが、γ－グロビン、β－グロビン、及び／またはα－グロビンはそれぞれ、胎児型ヘモグロビン及び／または成体型ヘモグロビンの構成要素であり、それ故に、本明細書に開示のさまざまなベクターにおいて有用である。

【０１５８】

さまざまな実施形態において、グロビンタンパク質の発現を増加させることは、（ｉ）特定の配列を有するグロビンタンパク質の細胞中または系中の量、濃度、または発現（例えば、そうしたグロビンタンパク質をコードする核酸の転写もしくは翻訳）を増加させること、（ｉｉ）互いに関連するタンパク質の配列を考慮せずに特定の型のグロビンタンパク質の細胞中または系中の量、濃度、または発現（例えば、そうしたグロビンタンパク質をコードする核酸の転写もしくは翻訳）を増加させること（例えば、γ－グロビン（または代替的にはβ－グロビンもしくはα－グロビン）として当業者によってまたは本明細書に示されるように同定されることになるすべてのタンパク質の総量を増加させること）、及び／または（ｉｉｉ）遺伝子治療の前には宿主細胞によってコードされていなかった異種グロビンタンパク質（例えば、グロビンタンパク質）を細胞中または系中で発現させること、のうちの１つ以上のいずれかを指し得る。

【０１５９】

下記の参考文献には、機能性グロビン遺伝子の特定の配列例が記載されている。参考文献１～４はα型グロビン配列に関し、参考文献４～１２はβ型グロビン配列（βグロビン配列及びγグロビン配列を含む）に関し、これらの配列は、参照によって本明細書に組み込まれる：（１）ＧｅｎＢａｎｋ受入番号Ｚ８４７２１（１９９７年３月１９日）、（２）ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＭ＿０００５１７（２０００年１０月３１日）、（３）Ｈａｒｄｉｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．（１９９１）２２２（２）：２３

３－２４９、（４）Ａ Ｓｙｌｌａｂｕｓ ｏｆ Ｈｕｍａｎ Ｈｅｍｏｇｌｏｂｉｎ Ｖａｒｉａｎｔｓ（１９９６）（Ｔｉｔｕｓ ｅｔ ａｌ．による）（Ｔｈｅ Ｓｉｃｋｌｅ Ｃｅｌｌ Ａｎｅｍｉａ Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ ｉｎ Ａｕｇｕｓｔａ，Ｇａ．によって公開）（ｇｌｏｂｉｎ．ｃｓｅ．ｐｓｕ．ｅｄｕにてオンラインで入手可能である）、（５）ＧｅｎＢａｎｋ受入番号Ｊ００１７９（１９９３年８月２６日）、（６）Ｔａｇｌｅ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｉｃｓ（１９９２）１３（３）：７４１－７６０、（７）Ｇｒｏｖｓｆｅｌｄ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ（１９８７）５１（６）：９７５－９８５、（８）Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ（１９９９）９３（７）：２２０８－２２１６、（９）Ｇｏｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．（２０００）２７５（４６）：３５９１４－３５９１９、（１０）Ｓｌｉｇｈｔｏｍ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ（１９８０）２１（３）：６２７－６３８、（１１）Ｆｒｉｔｓｃｈ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ（１９８０）１９（４）：９５９－９７２、（１２）Ｍａｒｏｔｔａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．（１９７７）２５２（１４）：５０４０－５０５３。グロビンをコードする遺伝子のコード領域及び非コード領域の追加の情報については、例えば、Ｍａｒｏｔｔａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｇ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９，１６５－１７５，１９７６、Ｌａｗｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ ２１（３），６４７－６５１，１９８０、及びＳａｄｅｌａｉｎ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ．；９２：６７２８－６７３２，１９９５を参照のこと。

【０１６０】

ヘモグロビンβサブユニットのアミノ酸配列の例は、例えば、ＮＣＢＩ受入番号Ｐ６８８７１にて提供されている。β－グロビンのアミノ酸配列の例は、例えば、ＮＣＢＩ受入番号ＮＰ＿０００５０９にて提供されている。

【０１６１】

治療用遺伝子及び／または治療用遺伝子産物に加えて、導入遺伝子もまた、治療用分子（チェックポイント阻害剤試薬、１つ以上のがん抗原に特異的なキメラ抗原受容体分子、及び／または１つ以上のがん抗原に特異的なＴ細胞受容体など）をコードし得る。

【０１６２】

別の例として、治療用遺伝子は、リソソーム蓄積症に対して治療的に有効な応答が生じるように選択され得る。特定の実施形態では、リソソーム蓄積症は、ムコ多糖症（ＭＰＳ）Ｉ型、ＭＰＳ ＩＩ型（すなわち、ハンター症候群）、ＭＰＳ ＩＩＩ型（すなわち、サンフィリポ症候群）、ＭＰＳ ＩＶ型（すなわち、モルキオ症候群）、ＭＰＳ Ｖ型、ＭＰＳ ＶＩ型（すなわち、マロトー・ラミー症候群）、ＭＰＳ ＶＩＩ型（すなわち、スライ症候群）、α－マンノシドーシス、β－マンノシドーシス、糖原病Ｉ型（ＧＳＤＩ、フォン・ギールケ病、またはテイ・サックス病としても知られる）、ポンペ病、ゴーシェ病、ファブリー病である。治療用遺伝子は、例えば、酵素をコードもしくは産生誘導するまたはその他の様式でリソソームにおいてムコ多糖の分解を生じさせる遺伝子であり得る。治療用遺伝子の例としては、ＩＤＵＡ（すなわち、イズロニダーゼ）、ＩＤＳ、ＧＮＳ、ＨＧＳＮＡＴ、ＳＧＳＨ、ＮＡＧＬＵ、ＧＵＳＢ、ＧＡＬＮＳ、ＧＬＢ１、ＡＲＳＢ、及びＨＹＡＬ１が挙げられる。リソソーム蓄積症に有効な遺伝子治療の例は、例えば、リソソームにおいてさまざまな物質の分解を担う酵素をコードまたは産生誘導するもの、さまざまな器官（頭部（巨頭症）、肝臓、脾臓、舌、または声帯を含む）の腫脹を低減、除去、阻止、または遅延させるもの、脳内の液体を減らすもの、心臓弁の異常を低減するもの、気道狭窄を阻止または拡張し、感染症及び睡眠時無呼吸のような関連上気道状態を阻止するもの、ニューロン破壊及び／または関連症状を低減、除去、阻止、または遅延させるものであり得る。

【０１６３】

別の例として、治療用遺伝子は、過剰増殖性疾患に対して治療的に有効な応答が生じるように選択され得る。特定の実施形態では、過剰増殖性疾患は、がんである。治療用遺伝子は、例えば、腫瘍サプレッサー遺伝子、アポトーシスを誘導する遺伝子、酵素をコードする遺伝子、抗体をコードする遺伝子、またはホルモンをコードする遺伝子であり得る。

治療用遺伝子及び治療用遺伝子産物の例としては、（本明細書の他の箇所に記載のものに加えて）１０１Ｆ６、１２３Ｆ２（ＲＡＳＳＦ１）、５３ＢＰ２、ａｂｌ、ＡＢＬＩ、ＡＤＰ、ａＦＧＦ、ＡＰＣ、ＡｐｏＡＩ、ＡｐｏＡＩＶ、ＡｐｏＥ、ＡＴＭ、ＢＡＩ－１、ＢＤＮＦ、ベータ＊（ＢＬＵ）、ｂＦＧＦ、ＢＬＣ１、ＢＬＣ６、ＢＲＣＡ１、ＢＲＣＡ２、ＣＢＦＡ１、ＣＢＬ、Ｃ－ＣＡＭ、ＣＮＴＦ、ＣＯＸ－１、ＣＳＦＩＲ、ＣＴＳ－１、シトシンデアミナーゼ、ＤＢＣＣＲ－１、ＤＣＣ、Ｄｐ、ＤＰＣ－４、Ｅ１Ａ、Ｅ２Ｆ、ＥＢＲＢ２、ｅｒｂ、ＥＲＢＡ、ＥＲＢＢ、ＥＴＳ１、ＥＴＳ２、ＥＴＶ６、Ｆａｂ、ＦＣＣ、ＦＧＦ、ＦＧＲ、ＦＨＩＴ、ｆｍｓ、ＦＯＸ、ＦＵＳ１、ＦＹＮ、Ｇ－ＣＳＦ、ＧＤＡＩＦ、遺伝子２１（ＮＰＲＬ２）、遺伝子２６（ＣＡＣＮＡ２Ｄ２）、ＧＭ－ＣＳＦ、ＧＭＦ、ｇｓｐ、ＨＣＲ、ＨＩＣ－１、ＨＲＡＳ、ｈｓｔ、ＩＧＦ、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－９、ＩＬ－１１、ＩＮＧ１、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＲＦ－１、ＪＵＮ、ＫＲＡＳ、ＬＵＣＡ－１（ＨＹＡＬ１）、ＬＵＣＡ－２（ＨＹＡＬ２）、ＬＹＮ、ＭＡＤＨ４、ＭＡＤＲ２、ＭＣＣ、ｍｄａ７、ＭＤＭ２、ＭＥＮ－Ｉ、ＭＥＮ－ＩＩ、ＭＬＬ、ＭＭＡＣ１、ＭＹＢ、ＭＹＣ、ＭＹＣＬ１、ＭＹＣＮ、ｎｅｕ、ＮＦ－１、ＮＦ－２、ＮＧＦ、ＮＯＥＹ１、ＮＯＥＹ２、ＮＲＡＳ、ＮＴ３、ＮＴ５、ＯＶＣＡ１、ｐ１６、ｐ２１、ｐ２７、ｐ５７、ｐ７３、ｐ３００、ＰＧＳ、ＰＩＭ１、ＰＬ６、ＰＭＬ、ＰＴＥＮ、ｒａｆ、Ｒａｐ１Ａ、ｒａｓ、Ｒｂ、ＲＢ１、ＲＥＴ、ｒｋｓ－３、ＳｃＦｖ、ｓｃＦＶｒａｓ、ＳＥＭＡ３、ＳＲＣ、ＴＡＬＩ、ＴＣＬ３、ＴＦＰＩ、トロンボスポンジン、チミジンキナーゼ、ＴＮＦ、ＴＰ５３、ｔｒｋ、Ｔ－ＶＥＣ、ＶＥＧＦ、ＶＨＬ、ＷＴ１、ＷＴ－１、ＹＥＳ、及びｚａｃ１が挙げられる。有効な遺伝子治療の例は、腫瘍を抑制もしくは除去するもの、がん細胞の数を低減するもの、腫瘍サイズを低減するもの、腫瘍増殖を遅延もしくは除去するもの、または腫瘍によって生じる症状を軽減するものであり得る。

【０１６４】

別の例として、治療用遺伝子は、感染性疾患に対して治療的に有効な応答が生じるように選択され得る。特定の実施形態では、感染性疾患は、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）である。治療用遺伝子は、例えば、ＨＩＶ感染に対して免疫細胞を抵抗性にする遺伝子、または免疫再構築を介して免疫細胞がウイルスを効率的に中和することを可能にする遺伝子、免疫細胞が発現するタンパク質をコードする遺伝子の多型、患者においては発現しないものであるが、感染との戦いに有利な遺伝子、感染性の病原体、受容体または共受容体をコードする遺伝子、受容体または共受容体のリガンドをコードする遺伝子、ウイルス複製に必須のウイルス遺伝子及び細胞遺伝子（ある特定の転写因子の作用を遮断するためのリボザイム、アンチセンスＲＮＡ、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、またはデコイＲＮＡをコードする遺伝子を含む）、ドミナントネガティブウイルスタンパク質をコードする遺伝子、細胞内抗体をコードする遺伝子、イントラカインをコードする遺伝子、及び自殺遺伝子をコードする遺伝子であり得る。治療用遺伝子及び治療用遺伝子産物の例としては、α２β１、αｖβ３、αｖβ５、αｖβ６３、ＢＯＢ／ＧＰＲ１５、Ｂｏｎｚｏ／ＳＴＲＬ－３３／ＴＹＭＳＴＲ、ＣＣＲ２、ＣＣＲ３、ＣＣＲ５、ＣＣＲ８、ＣＤ４、ＣＤ４６、ＣＤ５５、ＣＸＣＲ４、アミノペプチダーゼ－Ｎ、ＨＨＶ－７、ＩＣＡＭ、ＩＣＡＭ－１、ＰＲＲ２／ＨｖｅＢ、ＨｖｅＡ、α－ジストログリカン、ＬＤＬＲ／α２ＭＲ／ＬＲＰ、ＰＶＲ、ＰＲＲ１／ＨｖｅＣ、及びラミニン受容体が挙げられる。ＨＩＶ治療のための治療的に有効な量は、例えば、ＨＩＶに対する対象の免疫を向上させるもの、ＡＩＤＳもしくはＨＩＶと関連する症状を軽快させるもの、またはＨＩＶに対する対象の自然免疫応答もしくは適応免疫応答を誘導するものであり得る。ＨＩＶに対する免疫応答は、抗体産生を含み、ＡＩＤＳを阻止し、及び／または対象のＡＩＤＳ感染またはＨＩＶ感染の症状を軽快させるか、あるいはＨＩＶの感染性及び／または病原性を低減または除去するものであり得る。

【０１６５】

さまざまな実施形態において、本開示のベクターまたはゲノム（例えば、Ａｄ３５ヘル

パーベクターまたはＡｄ３５ヘルパーゲノム）は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓの通常活性を阻害する抗ＣＲＩＳＰＲ（Ａｃｒ）タンパク質（例えば、ファージ由来のもの）をコード及び／または発現する。

【０１６６】

Ｉ（Ｃ）（ｉ）（ａ）．結合ドメインペイロード発現産物、抗体ペイロード発現産物、ＣＡＲペイロード発現産物、及びＴＣＲペイロード発現産物

本開示は、さまざまな結合ドメインを含む。抗体は結合ドメインの一例であり、こうした抗体には、全抗体または抗体の結合断片（例えば、Ｆｖ形態、Ｆａｂ形態、Ｆａｂ’形態、Ｆ（ａｂ’）$_2$形態、及び一本鎖（ｓｃ）形態）ならびに細胞マーカーに特異的に結合するその断片（例えば、ｓｃＦｖ）が含まれる。抗体または抗原結合断片は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、合成抗体、非ヒト抗体、組換え抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、ミニボディ、及び直鎖抗体のすべてまたは一部を含み得る。そうしたものの機能性断片には、単一ドメイン抗体（重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）、及びラクダ由来のナノボディの可変ドメイン（ＶＨＨ）など）ならびに同様のものが含まれる。

【０１６７】

場合によっては、ｓｃＦｖは、当該技術分野で知られる方法に従って調製され得る（例えば、Ｂｉｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４２：４２３－４２６，１９８８及びＨｕｓｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５：５８７９－５８８３，１９８８を参照のこと）。ＳｃＦｖ分子は、可動性ポリペプチドリンカーを使用して抗体のＶＬ領域とＶＨ領域とを連結して一緒にすることによって生成され得る。短鎖ポリペプチドリンカー（例えば、アミノ酸数が５～１０のもの）が用いられる場合、鎖内フォールディングが阻止される。２つの可変領域が一緒になって機能性のエピトープ結合部位が形成されるには鎖間フォールディングが必要にもなる。リンカーの配向及びサイズの例については、例えば、Ｈｏｌｌｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．１９９３ Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．９０：６４４４－６４４８、ＵＳ２００５／０１００５４３、ＵＳ２００５／０１７５６０６、ＵＳ２００７／００１４７９４、ＷＯ２００６／０２０２５８、及びＷＯ２００７／０２４７１５を参照のこと。

【０１６８】

ｓｃＦｖは、そのＶＬ領域とＶＨ領域との間にリンカーを含み、このリンカーのアミノ酸残基数は少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２５、少なくとも３０、少なくとも３５、少なくとも４０、少なくとも４５、少なくとも５０、またはそれを超える数であり得る。特定の実施形態では、リンカー配列は、任意の天然起源のアミノ酸を含み得る。一般に、ｓｃＦｖのＶＬとＶＨとの連結に使用されるリンカー配列のアミノ酸長は５～３５である。特定の実施形態では、ＶＬ－ＶＨリンカーが含むアミノ酸数は、５～３５、１０～３０、または１５～２５である。リンカーの長さを変動させることで活性が保持または増強され、活性試験において優れた効力が生じ得る。

【０１６９】

いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖのリンカー配列は、アミノ酸グリシン及びアミノ酸セリンを含む。特定の実施形態では、リンカー配列は、グリシン及びセリンの反復配列セット（（ＧｌｙｘＳｅｒｙ）ｎの１～１０回反復配列（ｘ及びｙは、独立して０～１０の整数であり（但し、ｘ及びｙの両方が０になることはない）、ｎは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０の整数である）など）を含み、連結ＶＨ－ＶＬ領域は、機能性の免疫グロブリン様結合ドメインを形成する（例えば、ｓｃＦｖ、ｓｃＴＣＲ）。具体例としては、（Ｇｌｙ４Ｓｅｒ）ｎ、（Ｇｌｙ３Ｓｅｒ）ｎ（Ｇｌｙ４Ｓｅｒ）ｎ、（Ｇｌｙ３Ｓｅｒ）ｎ（Ｇｌｙ２Ｓｅｒ）ｎ、（Ｇｌｙ３Ｓｅｒ）ｎ（Ｇｌｙ４Ｓｅｒ）１

、（Ｇｌｙ４Ｓｅｒ）１、（Ｇｌｙ３Ｓｅｒ）１、または（Ｇｌｙ２Ｓｅｒ）１が挙げられる。特定の実施形態では、リンカーは、（Ｇｌｙ４Ｓｅｒ）４または（Ｇｌｙ４Ｓｅｒ）３である。上でｓｃＴＣＲへの言及を通じて示されるように、そのようなリンカーは、Ｔ細胞受容体Ｖα／β鎖とＴ細胞受容体Ｃα／β鎖との連結にも使用され得る（例えば、Ｖα－Ｃα、Ｖβ－Ｃβ、Ｖα－Ｖβ）。

【０１７０】

追加の例としては、ｓｃＦｖベースのグラバボディ（ｇｒａｂａｂｏｄｙ）及び可溶性ＶＨドメイン抗体が挙げられる。こうした抗体では、重鎖可変領域のみを使用して結合領域が形成される。例えば、Ｊｅｓｐｅｒｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２２：１１６１，２００４、Ｃｏｒｔｅｚ－Ｒｅｔａｍｏｚｏ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．６４：２８５３，２００４、Ｂａｒａｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄ．１２：５８０，２００６、及びＢａｒｔｈｅｌｅｍｙ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２８３：３６３９，２００８を参照のこと。

【０１７１】

場合によっては、結合ドメインを、それが最終的に使用されることになる種と同じ種に由来するものにすることが有益である。例えば、ヒトでの使用については、抗原結合ドメインがヒト抗体、ヒト化抗体、またはその断片もしくは操作された形態を含むことが有益であり得る。ヒト起源の抗体またはヒト化抗体は、ヒトでの免疫原性が低下しているか、または存在せず、非ヒト抗体と比較して非免疫原性エピトープの数が少ない。抗体及びその操作された断片は、一般に、ヒト対象での抗原性が低レベルとなるか、または存在しないように選択されることになる。

【０１７２】

特定の実施形態では、結合ドメインは、ヒト化抗体またはその操作された断片を含む。特定の実施形態では、非ヒト抗体はヒト化され、そうした抗体のアミノ酸残基の１つ以上が、ヒトにおいて天然に産生される抗体またはその断片との類似性が増すように改変される。こうした非ヒトアミノ酸残基は、「移入」残基と称されることが多く、こうした「移入」残基は、典型的には、「移入」可変ドメインから取得される。本明細書で提供されるように、ヒト化抗体またはヒト化抗体断片は、非ヒト免疫グロブリン分子由来の１つ以上のＣＤＲに加えて、フレームワーク領域を含み、こうしたフレームワークを含むアミノ酸残基は、完全にまたはそのほとんどがヒト生殖系列に由来するものである。一態様では、抗原結合ドメインはヒト化される。ヒト化抗体は、当該技術分野で知られるさまざまな手法を使用して生成させることができ、こうした手法には、ＣＤＲ移植（例えば、欧州特許第ＥＰ２３９，４００号、ＷＯ９１／０９９６７、ならびにＵＳ５，２２５，５３９、ＵＳ５，５３０，１０１、及びＵＳ５，５８５，０８９を参照のこと）、ベニアリングまたはリサーフェイシング（例えば、ＥＰ５９２，１０６及びＥＰ５１９，５９６、Ｐａｄｌａｎ，１９９１，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，２８（４／５）：４８９－４９８、Ｓｔｕｄｎｉｃｋａ ｅｔ ａｌ．，１９９４，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，７（６）：８０５－８１４、ならびにＲｏｇｕｓｋａ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ，９１：９６９－９７３，１９９４を参照のこと）、鎖シャフリング（例えば、ＵＳ．５，５６５，３３２を参照のこと）、ならびに例えば、ＵＳ２００５／００４２６６４、ＵＳ２００５／００４８６１７、ＵＳ６，４０７，２１３、ＵＳ５，７６６，８８６、ＷＯ９３１７１０５、Ｔａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１６９：１１１９－２５，２００２、Ｃａｌｄａｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．，１３（５）：３５３－６０，２０００、Ｍｏｒｅａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ，２０（３）：２６７－７９，２０００、Ｂａｃａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７２（１６）：１０６７８－８４，１９９７、Ｒｏｇｕｓｋａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．，９（１０）：８９５－９０４，１９９６、Ｃｏｕｔｏ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，５５（２３ Ｓｕｐｐ）：５９７３ｓ－５９７７ｓ，１９９５、Ｃｏｕｔｏ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，５５（８）：１７１７－２２，１９９５、Ｓａｎｄｈｕ，Ｇｅｎｅ，１５０（２）：４０９－１０，１９９４、及びＰ

ｅｄｅｒｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２３５（３）：９５９－７３，１９９４に開示の手法が含まれる。多くの場合、フレームワーク領域中のフレームワーク残基をＣＤＲドナー抗体由来の対応残基で置換することで、例えば、細胞マーカー結合が改変（例えば、改善）されることになる。こうしたフレームワーク置換は、当該技術分野でよく知られる方法によって同定され、こうした方法は、例えば、ＣＤＲ残基及びフレームワーク残基の相互作用をモデル化して細胞マーカー結合に重要なフレームワーク残基を同定することによるもの、ならびに配列比較を行って特定の位置に通常は存在しないフレームワーク残基を同定することによるものである（例えば、ＵＳ５，５８５，０８９及びＲｉｅｃｈｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３３２：３２３，１９８８を参照のこと）。

【０１７３】

特定の細胞マーカーに特異的に結合する抗体及び他の結合ドメインは、モノクローナル抗体を得る方法、ファージディスプレイ法、ヒト抗体もしくはヒト化抗体を生成させるための方法、または抗体を産生するように操作されたトランスジェニック動物もしくはトランスジェニック植物を使用する方法、を使用して調製することができ、こうした方法は、当業者に知られている（例えば、ＵＳ６，２９１，１６１及びＵＳ６，２９１，１５８を参照のこと）。部分合成抗体または完全合成抗体ついては、そのファージディスプレイライブラリーが利用可能であり、こうしたファージディスプレイライブラリーにおいて細胞マーカーに結合し得る抗体またはその断片をスクリーニングすることができる。例えば、結合ドメインは、Ｆａｂファージライブラリーにおいて目的細胞マーカーに特異的に結合するＦａｂ断片をスクリーニングすることによって同定され得る（Ｈｏｅｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２３：３４４，２００５を参照のこと）。ヒト抗体のファージディスプレイライブラリーも利用可能である。さらに、簡便な系（例えば、マウス、ＨｕＭＡｂマウス（登録商標）（ＧｅｎＰｈａｒｍ　Ｉｎｔ’ｌ．Ｉｎｃ．，Ｍｏｕｎｔａｉｎ　Ｖｉｅｗ，ＣＡ）、ＴＣマウス（登録商標）（Ｋｉｒｉｎ　Ｐｈａｒｍａ　Ｃｏ．Ｌｔｄ．，Ｔｏｋｙｏ，ＪＰ）、ＫＭ－マウス（登録商標）（Ｍｅｄａｒｅｘ，Ｉｎｃ．，Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ，ＮＪ）、ラマ、ニワトリ、ラット、ハムスター、ウサギなど）において目的細胞マーカーを免疫原として使用する従来のハイブリドーマ開発方針を使用しても結合ドメインを開発することができる。特定の実施形態では、抗体は、特定のがん細胞型が選択的に発現する細胞マーカーに特異的に結合し、非特異的な成分または非関連標的とは交差反応しない。抗体が同定された時点で、そうした抗体のアミノ酸配列及びそうした抗体をコードする遺伝子配列が単離及び／または決定され得る。

【０１７４】

特定の実施形態では、治療用遺伝子は、抗体または抗体の結合断片（ＦａｂまたはｓｃＦｖなど）をコードし得る。発現し得る抗体（ｓｃＦｖを含む）の例としては、ＷＯ２０１４／１６４５５３Ａ１、ＵＳ２０１７／０２８３５０４、ＵＳ７，０８３，７８５、ＵＳ１０，１８９，９０６、ＵＳ１０，１７４，０９５、ＷＯ２００５１０２３８７、ＵＳ２０１１／０２０６７０１Ａ１、ＷＯ２０１４／１７９７５９Ａ１、ＵＳ２０１８／００３７６５１Ａ１、ＵＳ２０１８／０１１８８２２Ａ１、ＷＯ２００８／０４７２４２Ａ２、ＷＯ１９９６／０１６９９０Ａ１、ＷＯ２００／５１０３０８３Ａ２、及びＷＯ１９９９／０６２５２６Ａ２に記載のものが挙げられる。結合ドメインと関連して上述の抗体を使用することもでき、さらには、アテゾリズマブ、ブリナツモマブ、ブレンツキシマブ、セツキシマブ、シルムツズマブ、ファルレツズマブ、ゲムツズマブ、ＯＫＴ３、オレゴボマブ、プロミキシマブ（ｐｒｏｍｉｘｉｍａｂ）、ペムブロリズマブ、及びトラスツズマブを使用することもできる。

【０１７５】

免疫チェックポイント阻害剤も使用され得る。免疫チェックポイント阻害剤は、免疫抑制性チェックポイントタンパク質の機能を阻害する化合物を指す。阻害には、機能低減及び完全遮断が含まれる。好ましい免疫チェックポイント阻害剤は、免疫チェックポイントタンパク質を特異的に認識する抗体である。免疫チェックポイント阻害剤は、多くのもの

が知られており、こうした既知の免疫チェックポイントタンパク質阻害剤の類似性を鑑みて、（近い）将来には代替の免疫チェックポイント阻害剤が開発される可能性がある。免疫チェックポイント阻害剤には、ペプチド、抗体、核酸分子、及び小分子が含まれる。特定の実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、対象におけるＣＤ８＋Ｔ細胞の増殖、遊走、持続性、及び／または細胞傷害活性を増強し、具体的には、対象のＣＤ８＋Ｔ細胞の腫瘍浸潤性を増強する。免疫チェックポイント阻害剤の別の例としては、実施例４に開示のチェックポイント阻害剤が挙げられる。したがって、本開示の免疫チェックポイント阻害剤の例としては、αＰＤ－Ｌ１γ１抗体（代替的にαＰＤ－Ｌ１$\gamma_1$とも称される）が挙げられる。αＰＤ－Ｌ１γ１については、Ｅｎｇｅｌａｎｄ　ｅｔ　ａｌ．ＭｏｌＴｈｅｒ　２２（１１）：１９４９－１９５９，２０１４においてさらに記載されており、当該文献は、その全体、ならびに特に抗ＰＤ－Ｌ１抗体、抗ＰＤ－Ｌ１抗体をコードする核酸、及びその使用に関する部分が参照によって本明細書に組み込まれる。

【０１７６】

ＰＤ－１抗体及びＰＤ－Ｌ１抗体の例については、ＵＳ７，４８８，８０２、ＵＳ７，９４３，７４３、ＵＳ８，００８，４４９、ＵＳ８，１６８，７５７、ＵＳ８，２１７，１４９、ＷＯ０３０４２４０２、ＷＯ２００８１５６７１２、ＷＯ２０１００８９４１１、ＷＯ２０１００３６９５９、ＷＯ２０１１０６６３４２、ＷＯ２０１１１５９８７７、ＷＯ２０１１０８２４００、及びＷＯ２０１１１６１６９９に記載されている。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１遮断薬には、抗ＰＤ－Ｌ１抗体が含まれる。ある特定の他の実施形態では、ＰＤ－１遮断薬には、抗ＰＤ－１抗体及び同様の結合タンパク質が含まれ、こうした抗ＰＤ－１抗体及び同様の結合タンパク質は、ニボルマブ（ＭＤＸ１１０６、ＢＭＳ９３６５５８、ＯＮＯ４５３８）（ＰＤ－１に結合し、ＰＤ－１がそのリガンド（ＰＤ－Ｌ１及びＰＤ－Ｌ２）によって活性化されることを遮断する完全ヒトＩｇＧ４抗体）、ランブロリズマブ（ＭＫ－３４７５またはＳＣＨ９００４７５）（ＰＤ－１に対するヒト化モノクローナルＩｇＧ４抗体）、ＣＴ－０１１（ＰＤ－１に結合するヒト化抗体）、ＡＭＰ－２２４（Ｂ７－ＤＣ融合タンパク質）、抗体Ｆｃ部分、ＰＤ－Ｌ１（Ｂ７－Ｈ１）を遮断するためのＢＭＳ－９３６５５９（ＭＤＸ－１１０５－０１）などである。

【０１７７】

他の免疫チェックポイント阻害剤には、リンパ球活性化遺伝子－３（ＬＡＧ－３）阻害剤（ＩＭＰ３２１（可溶性Ｉｇ融合タンパク質）など）が含まれる（Ｂｒｉｇｎｏｎｅ　ｅｔ　ａｌ．，２００７，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１７９：４２０２－４２１１）。他の免疫チェックポイント阻害剤には、Ｂ７阻害剤（Ｂ７－Ｈ３阻害剤及びＢ７－Ｈ４阻害剤など）が含まれる。具体的には、抗Ｂ７－Ｈ３抗体ＭＧＡ２７１（Ｌｏｏ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．Ｊｕｌｙ　１５（１８）３８３４）である。ＴＩＭ３（Ｔ細胞免疫グロブリンドメイン及びムチンドメイン３）阻害剤も含まれる（Ｆｏｕｒｃａｄｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．２０７：２１７５－８６，２０１０及びＳａｋｕｉｓｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．２０７：２１８７－９４，２０１０）。本明細書で使用される「ＴＩＭ－３」という用語は、当該技術分野でのその一般的な意味を有し、Ｔ細胞免疫グロブリン及びムチンドメイン含有分子３を指す。ＴＩＭ－３の天然のリガンドはガレクチン９（Ｇａ１９）である。したがって、本明細書で使用される「ＴＩＭ－３阻害剤」という用語は、ＴＩＭ－３の機能を阻害し得る化合物、物質、または組成物を指す。例えば、阻害剤は、ＴＩＭ－３の発現もしくは活性を阻害し、ＴＩＭ－３シグナル伝達経路を調節もしくは遮断し、及び／またはガレクチン９へのＴＩＭ－３の結合を遮断し得る。ＴＩＭ－３に特異性を有する抗体は当該技術分野でよく知られており、典型的には、ＷＯ２０１１／１５５６０７、ＷＯ２０１３／００６４９０、及びＷＯ２０１０／１１７０５７に記載のものである。

【０１７８】

追加の特定の免疫チェックポイント阻害には、アテゾリズマブ、ＢＭＳ－９３６５５９、イピリムマブ、ＭＥＤＩ０６８０、ＭＥＤＩ４７３６、ＭＳＢ００１０７１８Ｃ、ペムブロリズマブ、ピディリズマブ、及びトレメリムマブが含まれる。ＷＯ１９９８／４２７

５２、ＷＯ２０００／３７５０４、ＷＯ２００１／０１４４２４、ＷＯ２００４／０３５６０７、ＵＳ２００５／０２０１９４、ＵＳ２００２／００３９５８１、ＵＳ２００２／０８６０１４、ＵＳ５，８１１，０９７、ＵＳ５，８５５，８８７、ＵＳ５，９７７，３１８、ＵＳ６，０５１，２２７、ＵＳ６，９８４，７２０、ＵＳ６，６８２，７３６、ＵＳ６，２０７，１５６、ＵＳ６，６８２，７３６、ＵＳ７，１０９，００３、ＵＳ７，１３２，２８１、ＥＰ１２１２４２２Ｂ１、Ｈｕｒｗｉｔｚ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９５（１７）：１００６７－１００７１（１９９８）、Ｃａｍａｃｈｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，２２（１４５）：Ａｂｓｔｒａｃｔ Ｎｏ．２５０５，２００４（抗体ＣＰ－６７５２０６）、及びＭｏｋｙｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ，５８：５３０１－５３０４，１９９８も併せて参照のこと。

【０１７９】

本開示は、抗体及び他の結合ドメイン（ＣＤ４に結合するもの、ＣＤ５に結合するもの、ＣＤ７に結合するもの、ＣＤ５２に結合するものなど）；抗体；ＩＬ１に対する抗体、ＩＬ２に対する抗体、ＩＬ６に対する抗体；自己反応性Ｔ細胞上に特異的に存在するＴＣＲに対する抗体；ＩＬ４；ＩＬ１０；ＩＬ１２；ＩＬ１３；ＩＬ１Ｒａ；ｓＩＬ１ＲＩ；ｓＩＬ１ＲＩＩ；ＴＮＦに対する抗体；ＡＢＣＡ３；ＡＢＣＤ１；ＡＤＡ；ＡＫ２；ＡＰＰ；アルギナーゼ；アリールスルファターゼＡ；Ａ１ＡＴ；ＣＤ３Ｄ；ＣＤ３Ｅ；ＣＤ３Ｇ；ＣＤ３Ｚ；ＣＦＴＲ；ＣＨＤ７；キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）；ＣＩＩＴＡ；ＣＬＮ３；補体因子、ＣＯＲＯ１Ａ；ＣＴＬＡ；Ｃ１阻害剤；Ｃ９ＯＲＦ７２；ＤＣＬＲＥ１Ｂ；ＤＣＬＲＥ１Ｃ；デコイ受容体；ＤＫＣ１；ＤＲＢ１＊１５０１／ＤＱＢ１＊０６０２；ジストロフィン；酵素；第ＶＩＩＩ因子、ＦＡＮＣファミリー遺伝子（ＦａｎｃＡ、ＦａｎｃＢ、ＦａｎｃＣ、ＦａｎｃＤ１（ＢＲＣＡ２）、ＦａｎｃＤ２、ＦａｎｃＥ、ＦａｎｃＦ、ＦａｎｃＧ、ＦａｎｃＩ、ＦａｎｃＪ（ＢＲＩＰ１）、ＦａｎｃＬ、ＦａｎｃＭ、ＦａｎｃＮ（ＰＡＬＢ２）、ＦａｎｃＯ（ＲＡＤ５１Ｃ）、ＦａｎｃＰ（ＳＬＸ４）、ＦａｎｃＱ（ＥＲＣＣ４）、ＦａｎｃＲ（ＲＡＤ５１）、ＦａｎｃＳ（ＢＲＣＡ１）、ＦａｎｃＴ（ＵＢＥ２Ｔ）、ＦａｎｃＵ（ＸＲＣＣ２）、ＦａｎｃＶ（ＭＡＤ２Ｌ２）、及びＦａｎｃＷ（ＲＦＷＤ３））；ＦａｓＬ；ＦＵＳ；ＧＡＴＡ１；グロビンファミリー遺伝子（すなわち、γ－グロビン）；Ｆ８；グルタミナーゼ；ＨＢＡ１；ＨＢＡ２；ＨＢＢ；ＩＬ７ＲＡ；ＪＡＫ３；ＬＣＫ；ＬＩＧ４；ＬＲＲＫ２；ＮＨＥＪ１；ＮＬＸ２．１；中和抗体；ＯＲＡＩ１；ＰＡＲＫ２；ＰＡＲＫ７；ｐｈｏｘ；ＰＩＮＫ１；ＰＮＰ；ＰＲＫＤＣ；ＰＳＥＮ１；ＰＳＥＮ２；ＰＴＰＮ２２；ＰＴＰＲＣ；Ｐ５３；ピルビン酸キナーゼ；ＲＡＧ１；ＲＡＧ２；ＲＦＸＡＮＫ；ＲＦＸＡＰ；ＲＦＸ５；ＲＭＲＰ；リボソームタンパク質遺伝子；ＳＦＴＰＢ；ＳＦＴＰＣ；ＳＯＤ１；可溶性ＣＤ４０；ＳＴＩＭ１；ｓＴＮＦＲＩ；ｓＴＮＦＲＩＩ；ＳＬＣ４６Ａ１；ＳＮＣＡ；ＴＤＰ４３；ＴＥＲＴ；ＴＥＲＣ；ＴＩＮＦ２；ユビキリン２；ＷＡＳ；ＷＨＮ；ＺＡＰ７０；γＣ；ならびに本明細書に記載の他の治療用遺伝子をさらに含む。

【０１８０】

結合ドメインの代替の供給源には、無作為ペプチドライブラリーをコードする配列、または代替の非抗体骨格のループ領域中のアミノ酸がさまざまなに操作されたものをコードする配列が含まれ、こうした代替の非抗体骨格は、ｓｃＴＣＲ（例えば、Ｌａｋｅ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１１：７４５，１９９９、Ｍａｙｎａｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ３０６：５１，２００５、ＵＳ８，３６１，７９４を参照のこと）、フィブリノゲンドメイン（例えば、Ｗｅｉｓｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３０：１３８８，１９８５を参照のこと）、クニッツドメイン（例えば、ＵＳ６，４２３，４９８を参照のこと）、設計されたアンキリンリピートタンパク質（ＤＡＲＰｉｎ；Ｂｉｎｚ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３３２：４８９，２００３及びＢｉｎｚ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２２：５７５，２００４）、フィブロネクチン結合ドメイン（アドネクチンもしくはモノボディ；Ｒｉｃｈａｒｄｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３２６：１４７５，２００３、Ｐ

ａｒｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．Ｄｅｓ．Ｓｅｌｅｃ．１８：４３５，２００５、及びＨａｃｋｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３８１：１２３８－１２５２，２００８）、シスチンノットミニタンパク質（Ｖｉｔａ ｅｔ ａｌ．，１９９５，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ）９２：６４０４－６４０８、Ｍａｒｔｉｎ ｅｔ ａｌ．，２００２，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２１：７１，２００２、及びＨｕａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ １３：７５５，２００５）、テトラトリコペプチドリピートドメイン（Ｍａｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ １１：４９７，２００３及びＣｏｒｔａｊａｒｅｎａ ｅｔ ａｌ．，ＡＣＳ Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．３：１６１，２００８）、ロイシンリッチリピートドメイン（Ｓｔｕｍｐｐ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３３２：４７１，２００３）、リポカリンドメイン（例えば、ＷＯ２００６／０９５１６４、Ｂｅｓｔｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ）９６：１８９８，１９９９及びＳｃｈｏｎｆｅｌｄ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ）１０６：８１９８，２００９を参照のこと）、Ｖ様ドメイン（例えば、ＵＳ２００７／００６５４３１を参照のこと）、Ｃ型レクチンドメイン（Ｚｅｌｅｎｓｋｙ ａｎｄ Ｇｒｅａｄｙ，ＦＥＢＳ Ｊ．２７２：６１７９，２００５、Ｂｅａｖｉｌ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ）８９：７５３，１９９２、及びＳａｔｏ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ）１００：７７７９，２００３）、ｍＡｂ２もしくは抗原結合ドメインを有するＦｃ領域（Ｆｃａｂ（商標））（Ｆ－Ｓｔａｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ ＵＫ、例えば、ＷＯ２００７／０９８９３４及びＷＯ２００６／０７２６２０を参照のこと）、アルマジロリピートタンパク質（例えば、Ｍａｄｈｕｒａｎｔａｋａｍ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉ．２１：１０１５，２０１２、ＷＯ２００９／０４０３３８を参照のこと）、アフィリン（ａｆｆｉｌｉｎ）（Ｅｂｅｒｓｂａｃｈ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３７２：１７２，２００７）、アフィボディ（ａｆｆｉｂｏｄｙ）、アビマー（ａｖｉｍｅｒ）、ノッチン、フィノマー（ｆｙｎｏｍｅｒ）、アトリマー（ａｔｒｉｍｅｒ）、細胞傷害性Ｔリンパ球関連タンパク質－４（Ｗｅｉｄｌｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎ．Ｐｒｏｔｅｏ．１０：１５５，２０１３）、または同様のもの（Ｎｏｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．８：６０１，１９９５、Ｎｏｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１５：７７２，１９９７、Ｎｏｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｅｕｒｏ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２６８：４２６９，２００１、Ｂｉｎｚ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２３：１２５７，２００５、Ｂｏｅｒｓｍａ ａｎｄ Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２２：８４９，２０１１）などである。

【０１８１】

ペプチドアプタマーは、ペプチドループ（細胞マーカーに特異的である）がその両末端でタンパク質骨格に結合したものを含む。この二重の構造的制約によってペプチドアプタマーの結合親和性は抗体と同等のレベルに上昇する。可変ループのアミノ酸長は、典型的には、８～２０であり、骨格は安定、可溶性、小型、かつ無毒な任意のタンパク質であり得る。ペプチドアプタマーの選択は、さまざまな系（酵母ツーハイブリッド系（例えば、Ｇａｌ４酵母ツーハイブリッド系）またはＬｅｘＡ相互作用捕捉系など）を使用して実施することができる。

【０１８２】

特定の実施形態では、結合ドメインは、細胞マーカーＣＤ３３に結合する。特定の実施形態では、ゲムツズマブ、アクリズマブ（ａｃｌｉｚｕｍａｂ）、またはＨｕＭ１９５のうちの１つに由来する結合ドメインがＣＤ３３に結合する。特定の実施形態では、ＣＤ３３結合ドメインは、配列番号９１の配列を含むＣＤＲＬ１配列、配列番号９２の配列を含むＣＤＲＬ２配列、及び配列番号９３の配列を含むＣＤＲＬ３配列を含む可変軽鎖と、配列番号９４の配列を含むＣＤＲＨ１配列、配列番号９５の配列を含むＣＤＲＨ２配列、及び配列番号９６の配列を含むＣＤＲＨ３配列を含む可変重鎖と、を含むヒト結合ドメイン

またはヒト化結合ドメインである。

【０１８３】

特定の実施形態では、ＣＤ３３結合ドメインは、配列番号９７の配列を含むＣＤＲＬ１配列、配列番号９８の配列を含むＣＤＲＬ２配列、及び配列番号９９の配列を含むＣＤＲＬ３配列を含む可変軽鎖と、配列番号１００の配列を含むＣＤＲＨ１配列、配列番号１０１の配列を含むＣＤＲＨ２配列、及び配列番号１０２の配列を含むＣＤＲＨ３配列を含む可変重鎖と、を含むヒトｓｃＦｖまたはヒト化ｓｃＦｖである。ＣＤ３３に結合する結合ドメインに関するさらなる情報については、米国特許第８７５９４９４号を参照のこと。

【０１８４】

特定の実施形態では、ヒトＣＤ３３に結合する配列は、配列番号１０３の配列を含む可変軽鎖領域と、配列番号１０４の配列を含む可変重鎖領域と、を含む。特定の実施形態では、ヒトＣＤ３３に結合する配列は、配列番号１０３の配列を含む可変軽鎖領域と、配列番号１０６の配列を含む可変重鎖領域と、を含む。

【０１８５】

特定の実施形態では、結合ドメインは、全長ＣＤ３３（ＣＤ３３ＦＬ）に結合する。特定の実施形態では、ＣＤ３３ＦＬに結合する結合ドメインは、５Ｄ１２、８Ｆ５、１Ｈ７、リンツズマブ、またはゲムツズマブの少なくとも１つに由来する。特定の実施形態では、ＣＤ３３ＦＬ結合ドメインは、ヒトのものまたはヒト化されたものであり、このＣＤ３３ＦＬ結合ドメインは、配列番号１０７の配列を含むＣＤＲＬ１配列、配列番号１０８の配列を含むＣＤＲＬ２配列、及び配列番号１０９の配列を含むＣＤＲＬ３配列を含む可変軽鎖と、配列番号１１０の配列を含むＣＤＲＨ１配列、配列番号１１１の配列を含むＣＤＲＨ２配列、及び配列番号１１２の配列を含むＣＤＲＨ３配列を含む可変重鎖と、を含む。ＣＤ３３ＦＬに結合する結合ドメインに関するさらなる情報については、ＰＣＴ／ＵＳ１７／４２２６４を参照のこと。

【０１８６】

特定の実施形態では、ヒトＣＤ３３ＦＬに結合する結合ドメインは、配列番号１１３の配列を含む可変軽鎖領域と、配列番号１１４の配列を含む可変重鎖領域と、を含む。

【０１８７】

特定の実施形態では、結合ドメインは、細胞マーカーＣＤ３３デルタＥ２（ＣＤ３３ΔＥ２）に結合する。特定の実施形態では、ＣＤ３３ΔＥ２に結合する結合ドメインは、１２Ｂ１２、４Ｈ１０、１１Ｄ５、１３Ｅ１１、１１Ｄ１１、または１Ｈ７の少なくとも１つに由来する。特定の実施形態では、ＣＤ３３ΔＥ２結合ドメインは、ヒトのものまたはヒト化されたものであり、このＣＤ３３ΔＥ２結合ドメインは、配列番号１１５の配列を含むＣＤＲＬ１配列、配列番号１１６の配列を含むＣＤＲＬ２配列、及び配列番号１１７の配列を含むＣＤＲＬ３配列を含む可変軽鎖と、配列番号１１８の配列を含むＣＤＲＨ１配列、配列番号１１の配列を含むＣＤＲＨ２配列、及び配列番号１２０の配列を含むＣＤＲＨ３配列を含む可変重鎖と、を含む。ＣＤ３３ΔＥ２に結合する結合ドメインに関するさらなる情報については、ＰＣＴ／ＵＳ１７／４２２６４を参照のこと。

【０１８８】

特定の実施形態では、ヒトＣＤ３３ΔＥ２に結合する配列は、配列番号１２１の配列を含む可変軽鎖領域と、配列番号１２２の配列を含む可変重鎖領域と、を含む。

【０１８９】

特定の実施形態では、結合ドメインは、細胞マーカーＨｅｒ２に結合する。特定の実施形態では、ＨＥＲ２に結合する結合ドメインは、トラスツズマブ（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ）に由来する。特定の実施形態では、結合ドメインは、配列番号１２の配列を含むＣＤＲＬ１配列、配列番号１２４の配列を含むＣＤＲＬ２配列、及び配列番号１２５の配列を含むＣＤＲＬ３配列を含む可変軽鎖と、配列番号１２６の配列を含むＣＤＲＨ１配列、配列番号１２７の配列を含むＣＤＲＨ２配列、及び配列番号１２８の配列を含むＣＤＲＨ３配列を含む可変重鎖と、を含む。

【０１９０】

特定の実施形態では、結合ドメインは、細胞マーカーＰＤ－Ｌ１に結合する。特定の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１に結合する結合ドメインは、ペムブロリズマブまたはＦＡＺ０５３（Ｎｏｖａｒｔｉｓ）の少なくとも１つに由来する。特定の実施形態では、結合ドメインは、配列番号１２９の配列を含むＣＤＲＬ１配列、配列番号１３０の配列を含むＣＤＲＬ２配列、及び配列番号１３１の配列を含むＣＤＲＬ３配列を含む可変軽鎖と、配列番号１３２の配列を含むＣＤＲＨ１配列、配列番号１３３の配列を含むＣＤＲＨ２配列、及び配列番号１３４の配列を含むＣＤＲＨ３配列を含む可変重鎖と、を含む。

【０１９１】

ＰＤ－Ｌ１に対する結合ドメインの例は、アベルマブもしくはアテゾリズマブを含むものであるか、またはアベルマブもしくはアテゾリズマブに由来するものであり得る。特定の実施形態では、アベルマブの可変重鎖は、配列番号１３５の配列を含む。特定の実施形態では、アベルマブの可変軽鎖は、配列番号１３６の配列を含む。

【０１９２】

特定の実施形態では、アベルマブのＣＤＲ領域は、配列番号１３７の配列を含むＣＤＲＨ１、配列番号１３８の配列を含むＣＤＲＨ２、配列番号１３９の配列を含むＣＤＲＨ３、配列番号１４０の配列を含むＣＤＲＬ１、配列番号１４１の配列を含むＣＤＲＬ２、及び配列番号１４２の配列を含むＣＤＲＬ３を含む。特定の実施形態では、アテゾリズマブの可変重鎖は、配列番号１４３の配列を含む。特定の実施形態では、アテゾリズマブの可変軽鎖は、配列番号１４４の配列を含む。

【０１９３】

特定の実施形態では、アテゾリズマブのＣＤＲ領域は、配列番号１４５の配列を含むＣＤＲＨ、配列番号１４６の配列を含むＣＤＲＨ２、配列番号１４７の配列を含むＣＤＲＨ３、配列番号１４８の配列を含むＣＤＲＬ１、配列番号１４９の配列を含むＣＤＲＬ２、及び配列番号１５０の配列を含むＣＤＲＬ３を含む。

【０１９４】

特定の実施形態では、結合ドメインは、細胞マーカーＰＳＭＡに結合する。特定の実施形態では、結合ドメインは、配列番号１５１の配列を含むＣＤＲＬ１配列、配列番号１５２の配列を含むＣＤＲＬ２配列、配列番号１５３の配列を含むＣＤＲＬ３配列を含む可変軽鎖を含む。特定の実施形態では、結合ドメインは、配列番号１５４の配列を含むＣＤＲＨ１配列、配列番号１５５の配列を含むＣＤＲＨ２配列、及び配列番号１５６の配列を含むＣＤＲＨ３配列を含む可変重鎖を含む。

【０１９５】

特定の実施形態では、結合ドメインは、細胞マーカーＭＵＣ１６に結合する。特定の実施形態では、結合ドメインは、ヒトのものまたはヒト化されたものであり、配列番号１５７の配列を含むＣＤＲＬ１配列、ＧＡＳを含むＣＤＲＬ２配列、配列番号１５８の配列を含むＣＤＲＬ３配列を含む可変軽鎖を含む。特定の実施形態では、結合ドメインは、ヒトのものまたはヒト化されたものであり、配列番号１５９の配列を含むＣＤＲＨ１配列、配列番号１６０の配列を含むＣＤＲＨ２配列、及び配列番号１６１の配列を含むＣＤＲＨ３配列を含む可変重鎖を含む。

【０１９６】

特定の実施形態では、結合ドメインは、細胞マーカーＦＯＬＲに結合する。特定の実施形態では、ＦＯＬＲに結合する結合ドメインはファルレツズマブに由来する。特定の実施形態では、結合ドメインは、配列番号１６２の配列を含むＣＤＲＬ１配列、配列番号１６３の配列を含むＣＤＲＬ２配列、及び配列番号１６４の配列を含むＣＤＲＬ３配列を含む可変軽鎖と、配列番号１６５の配列を含むＣＤＲＨ１配列、配列番号１６６の配列を含むＣＤＲＨ２配列、及び配列番号１６７の配列を含むＣＤＲＨ３配列を含む可変重鎖と、を含む。

【０１９７】

メソテリンに対する結合ドメインの例は、アマツキシマブを含むものであるか、またはアマツキシマブに由来するものであり得る。特定の実施形態では、アマツキシマブの可変

重鎖は、配列番号１６８の配列を含む。特定の実施形態では、アマツキシマブの可変軽鎖は、配列番号１６９の配列を含む。

【０１９８】

特定の実施形態では、アマツキシマブのＣＤＲ領域は、配列番号１７０の配列を含むＣＤＲＨ１配列、配列番号１７１の配列を含むＣＤＲＨ２配列、配列番号１７２の配列を含むＣＤＲＨ３配列、配列番号１７３の配列を含むＣＤＲＬ１配列、配列番号１７４の配列を含むＣＤＲＬ２配列、及び配列番号１７５の配列を含むＣＤＲＬ３配列を含む。

【０１９９】

特定の実施形態では、結合ドメインは、Ｖα／β鎖及びＣα／β鎖（例えば、Ｖα－Ｃα、Ｖβ－Ｃβ、Ｖα－Ｖβ）を含むｓｃＴ細胞受容体（ｓｃＴＣＲ）であるか、または目的細胞マーカー（例えば、ペプチド－ＭＨＣ複合体）に特異的なＶα－Ｃα対、Ｖβ－Ｃβ対、Ｖα－Ｖβ対を含むｓｃＴＣＲである。

【０２００】

特定の実施形態では、結合ドメインは、既知または同定済のＴＣＲ　Ｖα、ＴＣＲ　Ｖβ、ＴＣＲ　Ｃα、またはＴＣＲ　Ｃβとのアミノ酸配列同一性％が少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、または１００％である配列を含み、各ＣＤＲは、標的細胞マーカーに特異的に結合するＴＣＲまたはその断片もしくは誘導体からの変化を含まないか、または多くとも１つ、多くとも２つ、もしくは多くとも３つ含む。

【０２０１】

特定の実施形態では、結合ドメインは、既知または同定済のＴＣＲ（例えば、高親和性ＴＣＲ）のＶα、Ｖβ、Ｃα、及び／またはＣβに由来するまたは基づくＶα領域、Ｖβ領域、Ｃα領域、及び／またはＣβ領域を含み、そうした既知または同定済のＴＣＲのＶα、Ｖβ、Ｃα、及び／またはＣβと比較して、１つ以上（例えば、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０個）の挿入、１つ以上（例えば、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０個）の欠失、１つ以上（例えば、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０個）のアミノ酸置換（例えば、保存的アミノ酸置換もしくは非保存的アミノ酸置換）、または上記の変化の組み合わせを含む。挿入、欠失、または置換は、Ｖα領域、Ｖβ領域、Ｃα領域、及び／またはＣβ領域中の任意の場所（これらの領域のアミノ末端もしくはカルボキシ末端または両末端を含む）に存在し得るが、但し、各ＣＤＲが含む変化の数が０、または多くとも１、多くとも２、もしくは多くとも３であり、改変されたＶα領域、Ｖβ領域、Ｃα領域、またはＣβ領域を含む標的結合ドメインが、野生型と同様の親和性及び作用を伴ってその標的に依然として特異的に結合し得ることが条件である。

【０２０２】

特定の実施形態では、結合ドメインは、軽鎖可変領域（ＶＬ）もしくは重鎖可変領域（ＶＨ）または両方の領域のアミノ酸配列との同一性％が少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、または１００％である配列を含むか、あるいは当該配列であり、各ＣＤＲは、目的細胞マーカーに特異的に結合するモノクローナル抗体またはその断片もしくは誘導体からの変化を含まないか、または多くとも１つ、多くとも２つ、もしくは多くとも３つ含む。

【０２０３】

特定の実施形態では、本開示の結合ドメイン中のＶＬ領域は、既知のモノクローナル抗体のＶＬに由来するか、または基づくものであり、そうした既知のモノクローナル抗体のＶＬと比較して、１つ以上（例えば、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０個）の挿入、１つ以上（例えば、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０個）の欠失、１つ以上（例えば、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、

９つ、１０個）のアミノ酸置換（例えば、保存的アミノ酸置換）、または上記の変化の組み合わせを含む。挿入、欠失、または置換は、ＶＬ領域中の任意の場所（この領域のアミノ末端もしくはカルボキシ末端または両末端を含む）に存在し得るが、但し、各ＣＤＲが含む変化の数が０、または多くとも１、多くとも２、もしくは多くとも３であり、改変されたＶＬ領域を含む結合ドメインが、野生型結合ドメインと同様の親和性を伴ってその標的に依然として特異的に結合し得ることが条件である。

【０２０４】

特定の実施形態では、本開示の結合ドメインＶＨ領域は、既知のモノクローナル抗体のＶＨに由来するか、または基づくものであり得、既知のモノクローナル抗体のＶＨと比較して、１つ以上（例えば、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０個）の挿入、１つ以上（例えば、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０個）の欠失、１つ以上（例えば、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０個）のアミノ酸置換（例えば、保存的アミノ酸置換もしくは非保存的アミノ酸置換）、または上記の変化の組み合わせを含み得る。挿入、欠失、または置換は、ＶＨ領域中の任意の場所（この領域のアミノ末端もしくはカルボキシ末端または両末端を含む）に存在し得るが、但し、各ＣＤＲが含む変化の数が０、または多くとも１、多くとも２、もしくは多くとも３であり、改変されたＶＨ領域を含む結合ドメインが、野生型結合ドメインと同様の親和性を伴ってその標的に依然として特異的に結合し得ることが条件である。

【０２０５】

所与のＣＤＲまたはＦＲの正確なアミノ酸配列境界は、多くのよく知られるスキームのいずれかを使用して容易に決定することができ、こうしたスキームには、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．（１９９１）“Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，” ５ｔｈ Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄによって説明されるもの（Ｋａｂａｔ番号付けスキーム）、Ａｌ－Ｌａｚｉｋａｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２７３：９２７－９４８，１９９７によって説明されるもの（Ｃｈｏｔｈｉａ番号付けスキーム）、Ｍａｃｃａｌｌｕｍ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２６２：７３２－７４５，１９９６によって説明されるもの（Ｃｏｎｔａｃｔ番号付けスキーム）、Ｍａｒｔｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，８６：９２６８－９２７２，１９８９によって説明されるもの（ＡｂＭ番号付けスキーム）、Ｌｅｆｒａｎｃ ｅｔ ａｌ．，Ｄｅｖ Ｃｏｍｐ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２７（１）：５５－７７，２００３によって説明されるもの（ＩＭＧＴ番号付けスキーム）及びＨｏｎｅｇｇｅｒ ａｎｄ Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ３０９（３）：６５７－６７０，２００１によって説明されるもの（「Ａｈｏ」番号付けスキーム）が含まれる。所与のＣＤＲまたはＦＲの境界は、同定に使用されるスキームによって異なり得る。例えば、Ｋａｂａｔスキームは構造アライメントに基づく一方で、Ｃｈｏｔｈｉａスキームは構造情報に基づく。Ｋａｂａｔスキーム及びＣｈｏｔｈｉａスキームの両方について、番号付けは、最も一般的な抗体領域配列長に基づき、挿入は挿入文字（例えば、「３０ａ」）によって考慮され、抗体によっては欠失が見られる。これら２つのスキームによって決定されるある特定の挿入及び欠失（「インデル」）の位置は異なるものであり、その結果、番号付けに差異が生じる。Ｃｏｎｔａｃｔスキームは、複雑な結晶構造の解析に基づくものであり、Ｃｈｏｔｈｉａ番号付けスキームと多くの点で類似している。特定の実施形態では、本明細書に開示の抗体ＣＤＲ配列は、Ｋａｂａｔ番号付けによるものである。

【０２０６】

前立腺癌と関連する特定の細胞マーカーには、ＰＳＭＡ、ＷＴ１、前立腺幹細胞抗原（ＰＳＣＡ）、及びＳＶ４０ Ｔが含まれる。乳癌と関連する特定の細胞マーカーには、ＨＥＲ２及びＥＲＢＢ２が含まれる。卵巣癌と関連する特定の細胞マーカーには、Ｌ１－ＣＡＭ、ＭＵＣ１６の細胞外ドメイン（ＭＵＣ－ＣＤ）、葉酸結合タンパク質（葉酸受容体）、ルイスＹ、メソテリン、及びＷＴ－１が含まれる。膵癌と関連する特定の細胞マーカ

ーには、メソテリン、ＣＥＡ、及びＣＤ２４が含まれる。多発性骨髄腫と関連する特定の細胞マーカーには、ＢＣＭＡ、ＧＰＲＣ５Ｄ、ＣＤ３８、及びＣＳ－１が含まれる。白血病及び／またはリンパ腫と関連する特定のマーカーには、ＣＬＬ－１、ＣＤ１２３、ＣＤ３３、及びＰＤ－Ｌ１が含まれる。

【０２０７】

（例えば、感染性病原体抗原に結合することによって）感染性疾患病原体に特異的な結合ドメインも企図される。こうしたものには、例えば、ウイルス抗原または他のウイルスマーカー（例えば、ウイルスに感染した細胞が発現するもの）が含まれる。ウイルスの例としては、アデノウイルス、アレナウイルス、ブニヤウイルス、コロナウイルス、フラビウイルス、ハンタウイルス、ヘパドナウイルス、ヘルペスウイルス、パピローマウイルス、パラミクソウイルス、パルボウイルス、ピコルナウイルス、ポックスウイルス、オルソミクソウイルス、レトロウイルス、レオウイルス、ラブドウイルス、ロタウイルス、海綿状脳症ウイルス、またはトガウイルスが挙げられる。追加の実施形態では、ウイルス抗原マーカーには、ＣＭＶ、風邪のウイルス、エプスタイン・バーウイルス、インフルエンザウイルス、Ａ型肝炎ウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス、及びＣ型肝炎ウイルス、単純ヘルペスウイルス、ＨＩＶ、インフルエンザウイルス、日本脳炎ウイルス、麻疹ウイルス、ポリオウイルス、狂犬病ウイルス、呼吸器多核体ウイルス、風疹ウイルス、天然痘ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、またはウエストナイルウイルスが発現するペプチドが含まれる。

【０２０８】

別の具体例として、サイトメガロウイルス抗原には、エンベロープ糖タンパク質Ｂ及びＣＭＶ　ｐｐ６５が含まれる。エプスタイン・バーウイルス抗原には、ＥＢＶ　ＥＢＮＡＩ、ＥＢＶ　Ｐ１８、及びＥＢＶ　Ｐ２３が含まれる。肝炎抗原には、ＨＢＶのＳタンパク質、Ｍタンパク質、及びＬタンパク質、ＨＢＶのｐｒｅ－Ｓ抗原、ＨＢＣＡＧデルタ、ＨＢＶ　ＨＢＥ、Ｃ型肝炎ウイルスＲＮＡ、ＨＣＶ　ＮＳ３、ならびにＨＣＶ　ＮＳ４が含まれる。単純ヘルペスウイルス抗原には、前初期タンパク質及び糖タンパク質Ｄが含まれる。ＨＩＶ抗原には、ｇａｇ遺伝子の遺伝子産物、ｐｏｌ遺伝子の遺伝子産物、及びｅｎｖ遺伝子の遺伝子産物（ＨＩＶ　ｇｐ３２、ＨＩＶ　ｇｐ４１、ＨＩＶ　ｇｐ１２０、ＨＩＶ　ｇｐ１６０、ＨＩＶ　Ｐ１７／２４、ＨＩＶ　Ｐ２４、ＨＩＶ　Ｐ５５　ＧＡＧ、ＨＩＶ　Ｐ６６　ＰＯＬ、ＨＩＶ　ＴＡＴ、ＨＩＶ　ＧＰ３６、Ｎｅｆタンパク質、及び逆転写酵素など）が含まれる。インフルエンザ抗原には、ヘマグルチニン及びノイラミニダーゼが含まれる。日本脳炎ウイルス抗原には、Ｅタンパク質、Ｍ－Ｅタンパク質、Ｍ－Ｅ－ＮＳ１タンパク質、ＮＳ１タンパク質、ＮＳ１－ＮＳ２Ａタンパク質、及び８０％Ｅタンパク質が含まれる。麻疹抗原には、麻疹ウイルス融合タンパク質が含まれる。狂犬病抗原には、狂犬病糖タンパク質及び狂犬病核タンパク質が含まれる。呼吸器多核体ウイルス抗原には、ＲＳＶ融合タンパク質及びＭ２タンパク質が含まれる。ロタウイルス抗原には、ＶＰ７ｓｃが含まれる。風疹抗原には、Ｅ１タンパク質及びＥ２タンパク質が含まれる。水痘帯状疱疹ウイルス抗原には、ｇｐＩ及びｇｐＩＩが含まれる。

【０２０９】

追加の特定のウイルス抗原配列例としては、Ｎｅｆ（６６～９７）（配列番号１７６）、Ｎｅｆ（１１６～１４５）（配列番号１７７）、Ｇａｇ　ｐ１７（１７～３５）（配列番号１７８）、Ｇａｇ　ｐ１７～ｐ２４（２５３～２８４）（配列番号１７９）、及びＰｏｌ３２５～３５５（ＲＴ１５８～１８８）（配列番号１８０）が挙げられる。ウイルス抗原の追加の例については、Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ　Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，Ｓｅｃｏｎｄ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，ｅｄｓ．Ｆｉｅｌｄｓ，Ｂ．Ｎ．ａｎｄ　Ｋｎｉｐｅ，Ｄ．Ｍ．（Ｒａｖｅｎ　Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，１９９１）を参照のこと。

【０２１０】

望ましくない細胞型（がん細胞など）を標的とし、それを死滅させるように免疫系のＴ細胞を遺伝子操作することにおいては、著しい進歩が見られる。こうしたＴ細胞の多くが、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）コンストラクトを発現するように遺伝子操作されている。ＣＡＲは、遺伝子改変Ｔ細胞ががん細胞を認識し、それを死滅させることを可能にするい

くつかの異なる従属要素を含むタンパク質である。こうした従属要素は、少なくとも細胞外要素及び細胞内要素を含む。

【０２１１】

細胞外要素は、望ましくない細胞の表面上に選択的に存在するマーカーに特異的に結合する結合ドメインを含む。そのようなマーカーに結合ドメインが結合した場合、結合を受けたがん細胞を破壊するように細胞内要素がＴ細胞を導く。結合ドメインは、典型的には、モノクローナル抗体（ｍＡｂ）由来の一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）であるが、抗体様抗原結合部位を含む他の形式に基づくものでもあり得る。

【０２１２】

細胞内要素は、エフェクタードメインを含むことに基づいて活性化シグナルを与える。第１世代のＣＡＲでは、エフェクタードメインとしてＣＤ３ζの細胞質が利用された。第２世代のＣＡＲでは、表面抗原分類２８（ＣＤ２８）または４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）と組み合わせてＣＤ３ζが利用され、第３世代のＣＡＲでは、細胞内エフェクタードメイン内でＣＤ２８及び４０１ＢＢと組み合わせてＣＤ３ζが利用されている。

【０２１３】

ＣＡＲは、一般に、さまざまな目的で使用される１つ以上のリンカー配列も分子内に含む。例えば、ＣＡＲの細胞外要素を細胞内要素と連結するには膜貫通ドメインが使用され得る。可動性リンカー配列はスペーサー領域と称されることが多く、このスペーサー領域は、結合ドメインに対して膜近くに位置し、結合ドメインと細胞膜との間にさらなる距離を創出するために使用され得る。この距離創出は、膜への近さによって結合が立体障害を受けることを低減する上で有益であり得る。この目的で使用される一般的なスペーサー領域はＩｇＧ４リンカーである。標的細胞マーカーに応じて、よりコンパクトなスペーサーまたはより長いスペーサーが使用され得る。他の潜在的なＣＡＲ従属要素については、本明細書の他の箇所により詳細に記載される。ここでは、ＣＡＲの構成要素について、以下のようにさらに詳細に記載される：（ａ）結合ドメイン、（ｂ）細胞内シグナル伝達要素、（ｃ）リンカー、（ｄ）膜貫通ドメイン、（ｅ）連結部アミノ酸、及び（ｆ）制御部（タグカセットを含む）。

【０２１４】

（ａ）結合ドメイン．

結合ドメインは、細胞マーカーに結合して複合体を形成する任意の物質を含み、こうした結合ドメインには、限定されないが、本明細書に開示の結合ドメイン及び抗体がすべて含まれる。結合ドメインの選択は、標的細胞の表面を規定する細胞マーカーの型及び数に依存し得る。結合ドメインの例としては、細胞マーカーリガンド、受容体リガンド、抗体、ペプチド、ペプチドアプタマー、受容体（例えば、Ｔ細胞受容体）、またはその組み合わせ及び操作された断片もしくは形式が挙げられる。

【０２１５】

（ｂ）細胞内シグナル伝達要素．

ＣＡＲの細胞内シグナル伝達要素あるいは細胞質シグナル伝達要素は、ＣＡＲが発現する細胞を活性化することを担う。したがって、「細胞内シグナル伝達要素」または「細胞内要素」という用語は、細胞内ドメインのうちで活性化シグナルの伝達に十分な任意の部分を含むことが意図される。発現するＣＡＲの細胞内要素は、エフェクタードメインを含み得る。エフェクタードメインは、融合タンパク質または受容体のうちで、適切なシグナルの受容時に細胞において生物学的応答または生理学的応答を直接的または間接的に促進し得る細胞内部分である。ある特定の実施形態では、エフェクタードメインは、タンパク質またはタンパク質複合体のうちで、結合した後にシグナルを受容するか、、またはタンパク質もしくはタンパク質複合体が標的分子（エフェクタードメインからのシグナルを生じさせる）に直接的に結合する部分である。エフェクタードメインは、１つ以上のシグナル伝達ドメインまたはシグナル伝達モチーフ（免疫受容体チロシン活性化モチーフ（ＩＴＡＭ）など）を含む場合、細胞応答を直接的に促進し得る。他の実施形態では、エフェクタードメインは、細胞応答を直接的に促進する１つ以上の他のタンパク質（共刺激ドメイ

ンなど）と結び付けられることによって細胞応答を間接的に促進することになる。
【０２１６】
エフェクタードメインは、がん細胞が発現する細胞マーカーに結合すると改変細胞の機能の少なくとも１つを活性化し得る。改変細胞の活性化は、分化、増殖、及び／または活性化、あるいは他のエフェクター機能、のうちの１つ以上を含み得る。特定の実施形態では、エフェクタードメインは、Ｔ細胞受容体と、共受容体または共刺激分子に由来する細胞質配列を含み得る共刺激ドメインと、を含む細胞内シグナル伝達要素を含み得る。
【０２１７】
エフェクタードメインは、１つ、２つ、３つ、またはそれを超える数の受容体シグナル伝達ドメイン、細胞内シグナル伝達要素（例えば、細胞質シグナル伝達配列）、共刺激ドメイン、またはそれらの組み合わせを含み得る。エフェクタードメインの例としては、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）、ＣＡＲＤ１１、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、ＣＤ３ε、ＣＤ３ζ、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ７９Ａ、ＣＤ７９Ｂ、ＤＡＰ１０、ＦｃＲα、ＦｃＲβ（ＦｃεＲ１ｂ）、ＦｃＲγ、Ｆｙｎ、ＨＶＥＭ（ＬＩＧＨＴＲ）、ＩＣＯＳ、ＬＡＧ３、ＬＡＴ、Ｌｃｋ、ＬＲＰ、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＯＴＣＨ１、ｐＴα、ＰＴＣＨ２、ＯＸ４０、ＲＯＲ２、Ｒｙｋ、ＳＬＡＭＦ１、Ｓｌｐ７６、ＴＣＲα、ＴＣＲβ、ＴＲＩＭ、Ｗｎｔ、Ｚａｐ７０、またはそれらの任意の組み合わせ、から選択されるシグナル伝達ドメイン及び刺激ドメインが挙げられる。特定の実施形態では、エフェクタードメインの例としては、ＣＤ８６、ＦｃγＲＩＩａ、ＤＡＰ１２、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＰＤ－１、リンパ球機能関連抗原－１（ＬＦＡ－１）、ＣＤ２、ＣＤ７、ＬＩＧＨＴ、ＮＫＧ２Ｃ、Ｂ７－Ｈ３、ＣＤ８３と特異的に結合するリガンド、ＣＤＳ、ＩＣＡＭ－１、ＧＩＴＲ、ＢＡＦＦＲ、ＳＬＡＭＦ７、ＮＫｐ８０（ＫＬＲＦ１）、ＣＤ１２７、ＣＤ１６０、ＣＤ１９、ＣＤ４、ＣＤ８α、ＣＤ８β、ＩＬ２Ｒβ、ＩＬ２Ｒγ、ＩＬ７Ｒα、ＩＴＧＡ４、ＶＬＡ１、ＣＤ４９ａ、ＩＡ４、ＣＤ４９Ｄ、ＩＴＧＡ６、ＶＬＡ－６、ＣＤ４９ｆ、ＩＴＧＡＤ、ＣＤ１１ｄ、ＩＴＧＡＥ、ＣＤ１０３、ＩＴＧＡＬ、ＣＤ１１ａ、ＩＴＧＡＭ、ＣＤ１１ｂ、ＩＴＧＡＸ、ＣＤ１１ｃ、ＩＴＧＢ１、ＣＤ２９、ＩＴＧＢ２、ＣＤ１８、ＩＴＧＢ７、ＴＮＦＲ２、ＴＲＡＮＣＥ／ＲＡＮＫＬ、ＤＮＡＭ１（ＣＤ２２６）、ＳＬＡＭＦ４（ＣＤ２４４、２Ｂ４）、ＣＤ８４、ＣＤ９６（Ｔａｃｔｉｌｅ）、ＣＥＡＣＡＭ１、ＣＲＴＡＭ、Ｌｙ９（ＣＤ２２９）、ＰＳＧＬ１、ＣＤ１００（ＳＥＭＡ４Ｄ）、ＣＤ６９、ＳＬＡＭＦ６（ＮＴＢ－Ａ、Ｌｙ１０８）、ＳＬＡＭ（ＣＤ１５０、ＩＰＯ－３）、ＢＬＡＭＥ（ＳＬＡＭＦ８）、ＳＥＬＰＬＧ（ＣＤ１６２）、ＬＴＢＲ、ＧＡＤＳ、ＰＡＧ／Ｃｂｐ、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ３０、またはＮＫｐ４６から選択されるシグナル伝達ドメイン及び共刺激ドメインが挙げられる。
【０２１８】
刺激様式で働く細胞内シグナル伝達要素配列はｉＴＡＭを含み得る。一次細胞質シグナル伝達配列を含むｉＴＡＭの例としては、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、ＣＤ３ε、ＣＤ３ζ、ＣＤ５、ＣＤ２２、ＣＤ６６ｄ、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、ならびに一般的なＦｃＲγ（ＦＣＥＲ１Ｇ）、ＦｃγＲｌｌａ、ＦｃＲβ（ＦｃεＲｉｂ）、ＤＡＰ１０、及びＤＡＰ１２に由来するものが挙げられる。特定の実施形態では、ＣＤ３ζのバリアントは、少なくとも１つの、少なくとも２つ、少なくとも３つ、またはすべてのＩＴＡＭ領域を保持する。
【０２１９】
特定の実施形態では、エフェクタードメインは、細胞質シグナル伝達タンパク質と結び付いた細胞質部分を含み、細胞質シグナル伝達タンパク質は、リンパ球受容体もしくはそのシグナル伝達ドメイン、複数のＩＴＡＭを含むタンパク質、共刺激ドメイン、またはそれらの任意の組み合わせである。
【０２２０】
細胞内シグナル伝達要素の追加の例としては、ＣＤ３ζ鎖の細胞質配列、及び／または結合ドメインが結合を受けた後に協奏的に働いてシグナル伝達を開始する共受容体が挙げられる。

【０２２１】
共刺激ドメインは、細胞マーカーとの結合に対するリンパ球応答を効率的に生じさせる上で活性化することが必要となり得るドメインである。分子によっては、細胞内シグナル伝達要素または共刺激ドメインとして互換可能である。共刺激ドメインの例としては、ＣＤ２７、ＣＤ２８、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）、ＯＸ４０、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＰＤ－１、ＩＣＯＳ、リンパ球機能関連抗原－１（ＬＦＡ－１）、ＣＤ２、ＣＤ７、ＬＩＧＨＴ、ＮＫＧ２Ｃ、Ｂ７－Ｈ３、及びリガンド（ＣＤ８３と特異的に結合するもの）が挙げられる。例えば、ＣＤ２７共刺激は、インビトロでのヒトＣＡＲ　Ｔ細胞の増殖、エフェクター機能、及び生存を増進し、インビボでのヒトＴ細胞の存続性及び抗がん活性を増強することが実証されている（Ｓｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．Ｂｌｏｏｄ．２０１２；１１９（３）：６９６－７０６）。そのような共刺激ドメイン分子の別の例としては、ＣＤＳ、ＩＣＡＭ－１、ＧＩＴＲ、ＢＡＦＦＲ、ＨＶＥＭ（ＬＩＧＨＴＲ）、ＳＬＡＭＦ７、ＮＫｐ８０（ＫＬＲＦ１）、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ３０、ＮＫｐ４６、ＣＤ１６０、ＣＤ１９、ＣＤ４、ＣＤ８α、ＣＤ８β、ＩＬ２Ｒβ、ＩＬ２Ｒγ、ＩＬ７Ｒα、ＩＴＧＡ４、ＶＬＡ１、ＣＤ４９ａ、ＩＴＧＡ４、ＩＡ４、ＣＤ４９Ｄ、ＩＴＧＡ６、ＶＬＡ－６、ＣＤ４９ｆ、ＩＴＧＡＤ、ＣＤ１１ｄ、ＩＴＧＡＥ、ＣＤ１０３、ＩＴＧＡＬ、ＣＤ１１ａ、ＩＴＧＡＭ、ＣＤ１１ｂ、ＩＴＧＡＸ、ＣＤ１１ｃ、ＩＴＧＢｌ、ＣＤ２９、ＩＴＧＢ２、ＣＤ１８、ＩＴＧＢ７、ＴＮＦＲ２、ＴＲＡＮＣＥ／ＲＡＮＫＬ、ＤＮＡＭ１（ＣＤ２２６）、ＳＬＡＭＦ４（ＣＤ２４４、２Ｂ４）、ＣＤ８４、ＣＤ９６（Ｔａｃｔｉｌｅ）、ＮＫＧ２Ｄ、ＣＥＡＣＡＭ１、ＣＲＴＡＭ、Ｌｙ９（ＣＤ２２９）、ＰＳＧＬ１、ＣＤ１００（ＳＥＭＡ４Ｄ）、ＣＤ６９、ＳＬＡＭＦ６（ＮＴＢ－Ａ、Ｌｙｌ０８）、ＳＬＡＭ（ＳＬＡＭＦ１、ＣＤ１５０、ＩＰＯ－３）、ＢＬＡＭＥ（ＳＬＡＭＦ８）、ＳＥＬＰＬＧ（ＣＤ１６２）、ＬＴＢＲ、ＬＡＴ、ＧＡＤＳ、ＳＬＰ－７６、ＰＡＧ／Ｃｂｐ、及びＣＤ１９ａが挙げられる。

【０２２２】
特定の実施形態では、細胞内シグナル伝達要素のアミノ酸配列は、ＣＤ３ζのバリアント及び４－１ＢＢ細胞内シグナル伝達要素の一部を含む。

【０２２３】
特定の実施形態では、細胞内シグナル伝達要素は、（ｉ）ＣＤ３ζのシグナル伝達ドメインのすべてもしくは一部、（ｉｉ）４－１ＢＢのシグナル伝達ドメインのすべてもしくは一部、または（ｉｉｉ）ＣＤ３ζ及び４－１ＢＢのシグナル伝達ドメインのすべてもしくは一部を含む。

【０２２４】
細胞内要素は、Ｗｎｔシグナル伝達経路のタンパク質（例えば、ＬＲＰ、Ｒｙｋ、もしくはＲＯＲ２）、ＮＯＴＣＨシグナル伝達経路のタンパク質（例えば、ＮＯＴＣＨ１、ＮＯＴＣＨ２、ＮＯＴＣＨ３、もしくはＮＯＴＣＨ４）、ヘッジホッグシグナル伝達経路のタンパク質（例えば、ＰＴＣＨもしくはＳＭＯ）、受容体型チロシンキナーゼ（ＲＴＫ）（例えば、上皮成長因子（ＥＧＦ）受容体ファミリー、線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）受容体ファミリー、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）受容体ファミリー、インスリン受容体（ＩＲ）ファミリー、血小板由来増殖因子（ＰＤＧＦ）受容体ファミリー、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）受容体ファミリー、トロポミオシン受容体キナーゼ（Ｔｒｋ）受容体ファミリー、エフリン（Ｅｐｈ）受容体ファミリー、ＡＸＬ受容体ファミリー、白血球チロシンキナーゼ（ＬＴＫ）受容体ファミリー、免疫グロブリン様ドメイン及びＥＧＦ様ドメインを有するチロシンキナーゼ１（ＴＩＥ）受容体ファミリー、受容体型チロシンキナーゼ様オーファン（ＲＯＲ）受容体ファミリー、ジスコイジンドメイン（ＤＤＲ）受容体ファミリー、トランスフェクション中の再編成（ＲＥＴ）受容体ファミリー、チロシン－タンパク質キナーゼ様（ＰＴＫ７）受容体ファミリー、受容体型チロシンキナーゼ関連（ＲＹＫ）受容体ファミリー、もしくは筋特異的キナーゼ（ＭｕＳＫ）受容体ファミリー）、Ｇタンパク質共役型受容体（ＧＰＣＲ（ＦｒｉｚｚｌｅｄもしくはＳｍｏｏｔｈｅｎｅｄ））、セリン／スレオニンキナーゼ受容体（ＢＭＰＲもしくはＴＧＦＲ）、またはサイトカイン

受容体（ＩＬ１Ｒ、ＩＬ２Ｒ、ＩＬ７Ｒ、もしくはＩＬ１５Ｒ）、のうちの１つ以上も含み得る。

【０２２５】

（ｃ）リンカー．

本明細書で使用されるリンカーは、ＣＡＲ分子のうちで当該分子の２つの他の従属要素の連結に役立つ任意の部分であり得る。多くのリンカーが追加の目的を果たす一方で、リンカーによっては、他の要素を連結する以外の目的は果たさない。ｓｃＦｖの結合ドメイン（抗体のＶＬ及びＶＨに由来するもの）を連結する状況でのリンカーについては上述されている。リンカーは、スペーサー領域及び連結部アミノ酸も含み得る。

【０２２６】

スペーサー領域は、他の連結要素からの適切な距離及び／または可動性を創出するために使用される型のリンカー領域である。特定の実施形態では、スペーサー領域の長さは、望ましくない細胞の認識及び破壊が最適化するように望ましくない細胞上の個々の細胞マーカーごとにカスタマイズされ得る。スペーサーは、スペーサーが存在しない場合と比較して抗原結合後の細胞の応答性を向上させる長さのものであり得る。特定の実施形態では、スペーサー領域の長さは、細胞マーカーエピトープの位置、エピトープに対する結合ドメインの親和性、及び／または分子を発現する改変細胞が細胞マーカーの認識に応じてインビトロ及び／またはインビボで増殖する能力、に基づいて選択され得る。スペーサー領域は、改変細胞での発現レベルを高めることも可能にし得る。

【０２２７】

スペーサーの例としては、１０～２５０個のアミノ酸、１０～２００個のアミノ酸、１０～１５０個のアミノ酸、１０～１００個のアミノ酸、１０～５０個のアミノ酸、または１０～２５個のアミノ酸を有するものが挙げられる。特定の実施形態では、スペーサー領域のアミノ酸数は、１２、２０、２１、２６、２７、４５、または５０である。

【０２２８】

特定の実施形態では、スペーサー領域は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、またはＩｇＤに由来するヒンジ領域配列のすべてまたは一部を、単独で含む、あるいはＣＨ２領域のすべてもしくは一部、ＣＨ３領域のすべてもしくは一部、またはＣＨ２領域のすべてもしくは一部及びＣＨ３領域のすべてもしくは一部と組み合わせて含む群から選択される。

【０２２９】

スペーサーの例としては、ＩｇＧ４ヒンジ単独、ＣＨ２ドメイン及びＣＨ３ドメインと連結されたＩｇＧ４ヒンジ、またはＣＨ３ドメインと連結されたＩｇＧ４ヒンジが挙げられる。特定の実施形態では、スペーサーは、配列番号１８１のアミノ酸配列を有するＩｇＧ４リンカーを含む。ヒンジ領域は、望ましくない構造的相互作用（意図しないパートナーとの二量体化など）を回避するように改変され得る。

【０２３０】

特定の実施形態では、スペーサー領域は、ＩＩ型Ｃ型レクチンドメイン間（ストーク）領域または表面抗原分類（ＣＤ）分子ストーク領域を含むヒンジ領域を含む。本明細書で使用される「野生型免疫グロブリンヒンジ領域」は、天然起源の上部ヒンジアミノ酸配列及び中間ヒンジアミノ酸配列を指し、こうした天然起源の上部ヒンジアミノ酸配列及び中間ヒンジアミノ酸配列は、抗体の重鎖に見られ、（ＩｇＧ、ＩｇＡ、及びＩｇＤについては）ＣＨ１ドメイン及びＣＨ２ドメインとの間に介在し、それらを連結するか、または（ＩｇＥ及びＩｇＭについては）ＣＨ１ドメインとＣＨ３ドメインとの間に介在し、それらを連結するものである。

【０２３１】

ＩＩ型Ｃ型レクチンまたはＣＤ分子の「ストーク領域」は、ＩＩ型Ｃ型レクチンまたはＣＤ分子の細胞外ドメインのうちで、Ｃ型レクチン様ドメイン（ＣＴＬＤ（例えば、ナチュラルキラー細胞受容体のＣＴＬＤと同様のもの））と疎水性部分（膜貫通ドメイン）との間に位置する部分を指す。例えば、ヒトＣＤ９４（ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＡＡＣ５０

２９１．１）の細胞外ドメインはアミノ酸残基３４～１７９に対応するが、ＣＴＬＤはアミノ酸残基６１～１７６に対応するため、ヒトＣＤ９４分子のストーク領域はアミノ酸残基３４～６０を含み、このアミノ酸残基３４～６０は、疎水性部分（膜貫通ドメイン）とＣＴＬＤとの間に位置する（Ｂｏｙｉｎｇｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ １０：１５，１９９９を参照のこと。他のストーク領域の説明については、Ｂｅａｖｉｌ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：１５３，１９９２及びＦｉｇｄｏｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２：１１，２００２も併せて参照のこと）。こうしたＩＩ型Ｃ型レクチンまたはＣＤ分子は、ストーク領域と膜貫通領域またはＣＴＬＤとの間に連結部アミノ酸（以下に記載のもの）も有し得る。別の例では、アミノ酸数２３３のヒトＮＫＧ２Ａタンパク質（ＧｅｎＢａｎｋ受入番号Ｐ２６７１５．１）は、アミノ酸７１～９３の範囲の疎水性部分（膜貫通ドメイン）及びアミノ酸９４～２３３の範囲の細胞外ドメインを有する。ＣＴＬＤはアミノ酸１１９～２３１を含み、ストーク領域はアミノ酸９９～１１６を含み、このストーク領域は追加の連結部アミノ酸と隣接し得る。ＩＩ型Ｃ型レクチンまたはＣＤ分子ならびにその細胞外リガンド結合ドメイン、ストーク領域、及びＣＴＬＤは当該技術分野で他にも知られている（例えば、ヒトのＣＤ２３、ＣＤ６９、ＣＤ７２、ＮＫＧ２Ａ、及びＮＫＧ２Ｄの配列ならびにその説明については、それぞれＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＰ００１９９３．２、同ＡＡＨ０７０３７．１、同ＮＰ００１７７３．１、同ＡＡＬ６５２３４．１、同ＣＡＡ０４９２５．１を参照のこと）。

【０２３２】

スペーサーの例としては、Ｈｕｄｅｃｅｋ ｅｔ ａｌ．（Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，１９：３１５３，２０１３）またはＷＯ２０１４／０３１６８７に記載のものも挙げられる。特定の実施形態では、スペーサー領域は、配列番号１８２のアミノ酸配列を有するＣＤ２８リンカーであり得る。特定の実施形態では、スペーサー領域は配列番号１８３の配列である。特定の実施形態では、スペーサー領域は配列番号１８４の配列である。

【０２３３】

特定の実施形態では、長鎖スペーサーのアミノ酸数は１１９超であり（例えば、アミノ酸数２２９）、中鎖スペーサーのアミノ酸数は１３～１１９であり、短鎖スペーサーのアミノ酸数は１２以下である。中鎖スペーサー領域の例としては、ＩｇＧ４ヒンジ領域配列及びＣＨ３領域のすべてまたは一部が挙げられる。長鎖スペーサーの例としては、ＩｇＧ４ヒンジ領域配列、ＣＨ２領域、及びＣＨ３領域のすべてまたは一部が挙げられる。本開示の特定の実施形態では、短鎖スペーサー配列が好ましい。

【０２３４】

スペーサー領域に関してさらに説明すると、融合タンパク質の細胞外要素は、細胞外非シグナル伝達スペーサー領域または細胞外非シグナル伝達リンカー領域を任意選択で含み、こうしたスペーサー領域またはリンカー領域は、例えば、結合ドメインを宿主細胞（例えば、Ｔ細胞）表面から離して配置することで細胞間接触、抗原結合、及び活性化を適切なものにすることが可能なものであり得る（Ｐａｔｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ６：４１２－４１９（１９９９））。示されるように、融合結合タンパク質の細胞外スペーサー領域は、一般に、疎水性部分または膜貫通ドメインと細胞外結合ドメインとの間に位置し、スペーサー領域の長さは、選択標的分子、選択結合エピトープ、または抗原結合ドメインのサイズ及び親和性に基づいて抗原認識（例えば、腫瘍認識）が最大化するように変更され得る（例えば、Ｇｕｅｓｔ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２８：２０３－１１，２００５、ＷＯ２０１４／０３１６８７を参照のこと）。ある特定の実施形態では、スペーサー領域は、免疫グロブリンヒンジ領域を含む。免疫グロブリンヒンジ領域は、野生型免疫グロブリンヒンジ領域または改変された野生型免疫グロブリンヒンジ領域であり得る。ある特定の実施形態では、免疫グロブリンヒンジ領域は、ヒト免疫グロブリンヒンジ領域である。免疫グロブリンヒンジ領域は、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、またはＩｇＭのヒンジ領域であり得る。ＩｇＧヒンジ領域は、ＩｇＧ

１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４のヒンジ領域であり得る。改変されたＩｇＧ４ヒンジ領域の例は、ＰＣＴ公開公報第ＷＯ２０１４／０３１６８７号に記載されている。本明細書に記載の融合結合タンパク質において使用されるヒンジ領域の他の例としては、１型膜タンパク質（ＣＤ８α、ＣＤ４、ＣＤ２８、及びＣＤ７など）の細胞外領域中に存在するヒンジ領域（野生型またはそのバリアントであり得る）が挙げられる。

【０２３５】

ある特定の実施形態では、細胞外スペーサー領域は、ＣＨ１ドメイン、ＣＨ２ドメイン、ＣＨ３ドメイン、ＣＨ４ドメイン、またはそれらの任意の組み合わせ、から選択されるＦｃドメインのすべてまたは一部を含む（例えば、ＷＯ２０１４／０３１６８７を参照のこと）。Ｆｃドメインまたはその一部は、野生型であるか、または（例えば、抗体エフェクター機能が減少するように）改変され得る。ある特定の実施形態では、細胞外要素は、結合ドメインと疎水性部分との間に配置された免疫グロブリンヒンジ領域、ＣＨ２ドメイン、ＣＨ３ドメイン、またはそれらの任意の組み合わせを含む。ある特定の実施形態では、細胞外要素は、ＩｇＧ１ヒンジ領域、ＩｇＧ１　ＣＨ２ドメイン、及びＩｇＧ１　ＣＨ３ドメインを含む。別の実施形態では、ＩｇＧ１　ＣＨ２ドメインは、（ｉ）Ｎ２９７Ｑ変異、（ｉｉ）ＡＰＰＶＡでの最初の６つのアミノ酸（ＡＰＥＦＬＧ）の置換、または（ｉ）及び（ｉｉ）の両方、を含む。ある特定の実施形態では、免疫グロブリンヒンジ領域、Ｆｃドメインもしくはその一部、または両方がヒトのものである。

【０２３６】

（ｄ）膜貫通ドメイン．

示されるように、ＣＡＲ分子内の膜貫通ドメインは、細胞膜を介して細胞外要素と細胞内要素とを連結するように働くことが多い。膜貫通ドメインは、改変細胞の膜に発現分子を固定し得る。

【０２３７】

膜貫通ドメインは、天然源及び／または合成源に由来し得る。起源が天然である場合、膜貫通ドメインは、任意の膜結合型タンパク質または膜貫通タンパク質に由来し得る。膜貫通ドメインは、Ｔ細胞受容体のα鎖、β鎖、またはζ鎖、ＣＤ２８、ＣＤ２７、ＣＤ３イプシロン、ＣＤ４５、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ８、ＣＤ９、ＣＤ１６、ＣＤ２２、ＣＤ３３、ＣＤ３７、ＣＤ６４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ１３４、ＣＤ１３７、及びＣＤ１５４、の膜貫通領域（複数可）を少なくとも含み得る。特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、少なくとも膜貫通領域（複数可）を含み得、こうした膜貫通領域（複数可）は、例えば、ＫＩＲＤＳ２、ＯＸ４０、ＣＤ２、ＣＤ２７、ＬＦＡ－１（ＣＤ１１ａ、ＣＤ１８）、ＩＣＯＳ（ＣＤ２７８）、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）、ＧＩＴＲ、ＣＤ４０、ＢＡＦＦＲ、ＨＶＥＭ（ＬＩＧＨＴＲ）、ＳＬＡＭＦ７、ＮＫｐ８０（ＫＬＲＦ１）、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ３０、ＮＫｐ４６、ＣＤ１６０、ＣＤ１９、ＩＬ２Ｒβ、ＩＬ２Ｒγ、ＩＬ７Ｒａ、ＩＴＧＡ１、ＶＬＡ１、ＣＤ４９ａ、ＩＴＧＡ４、ＩＡ４、ＣＤ４９Ｄ、ＩＴＧＡ６、ＶＬＡ－６、ＣＤ４９ｆ、ＩＴＧＡＤ、ＣＤ１１ｄ、ＩＴＧＡＥ、ＣＤ１０３、ＩＴＧＡＬ、ＣＤ１１ａ、ＩＴＧＡＭ、ＣＤ１１ｂ、ＩＴＧＡＸ、ＣＤ１１ｃ、ＩＴＧＢ１、ＣＤ２９、ＩＴＧＢ２、ＣＤ１８、ＩＴＧＢ７、ＴＮＦＲ２、ＤＮＡＭ１（ＣＤ２２６）、ＳＬＡＭＦ４（ＣＤ２４４、２Ｂ４）、ＣＤ８４、ＣＤ９６（Ｔａｃｔｉｌｅ）、ＣＥＡＣＡＭ１、ＣＲＴ　ＡＭ、Ｌｙ９（ＣＤ２２９）、ＰＳＧＬ１、ＣＤ１００（ＳＥＭＡ４Ｄ）、ＳＬＡＭＦ６（ＮＴＢ－Ａ、Ｌｙｌ０８）、ＳＬＡＭ（ＳＬＡＭＦ１、ＣＤ１５０、ＩＰＯ－３）、ＢＬＡＭＥ（ＳＬＡＭＦ８）、ＳＥＬＰＬＧ（ＣＤ１６２）、ＬＴＢＲ、ＰＡＧ／Ｃｂｐ、ＮＫＧ２Ｄ、またはＮＫＧ２Ｃのものである。特定の実施形態では、ヒトＩｇ（免疫グロブリン）ヒンジ（例えば、ＩｇＧ４ヒンジ、ＩｇＤヒンジ）、ＧＳリンカー（例えば、本明細書に記載のＧＳリンカー）、ＫＩＲ２ＤＳ２ヒンジ、またはＣＤ８ａヒンジを含めて、さまざまなヒトヒンジを用いることもできる。

【０２３８】

特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、細胞膜中で熱力学的に安定な三次元構造を有し、一般に、アミノ酸長の範囲が１５～３０である。膜貫通ドメインの構造は、αヘリッ

クス、βバレル、βシート、βヘリックス、またはそれらの任意の組み合わせを含み得る。

【０２３９】

膜貫通ドメインは、膜貫通領域と隣接する１つ以上の追加のアミノ酸を含み得る（例えば、ＣＡＲの細胞外領域内に１つ以上のアミノ酸を含み（こうしたアミノ酸は、例えば、最大で細胞外領域のアミノ酸のうちの１５個）、及び／またはＣＡＲの細胞内領域内に１つ以上の追加のアミノ酸を含む（こうした追加のアミノ酸は、例えば、最大で細胞内要素のアミノ酸のうちの１５個））。一態様では、膜貫通ドメインは、シグナル伝達ドメイン、共刺激ドメイン、またはヒンジドメインの由来元のタンパク質と同じタンパク質に由来する。別の態様では、膜貫通ドメインは、ＣＡＲのいずれの他のドメインの由来元のタンパク質とも、その由来元が同じではない。場合によっては、膜貫通ドメインを、そのようなドメインが同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインに結合しないように選択またはアミノ酸置換改変することで、受容体複合体の他の意図しないメンバーとの相互作用が最小化され得る。一態様では、膜貫通ドメインは、ＣＡＲ発現細胞の細胞表面上の別のＣＡＲとホモ二量体化する能力を有する。異なる態様では、膜貫通ドメインのアミノ酸配列は、同じＣＡＲ発現細胞中に存在する天然の結合パートナーの結合ドメインとの相互作用が最小化するように改変または置換され得る。特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、ＣＤ２８膜貫通ドメインのアミノ酸配列を含む。

【０２４０】

（ｅ）連結部アミノ酸．

連結部アミノ酸は、スペーサーによって得られる距離が不要及び／または望まれない場合にＣＡＲドメインの配列を連結するために使用され得るリンカーであり得る。連結部アミノ酸は、共刺激細胞内シグナル伝達要素の連結に使用され得る短鎖アミノ酸配列である。特定の実施形態では、連結部アミノ酸のアミノ酸数は９以下である。

【０２４１】

連結部アミノ酸は、短鎖オリゴリンカーまたは短鎖タンパク質リンカーであり得、好ましくは、こうしたリンカーを形成するアミノ酸長は２～９（例えば、２、３、４、５、６、７、８、または９）である。特定の実施形態では、適切な連結部アミノ酸リンカーとしてグリシン－セリンダブレットが使用され得る。特定の実施形態では、適切な連結部アミノ酸として単一のアミノ酸（例えば、アラニン、グリシン）が使用され得る。

【０２４２】

（ｆ）制御部（タグカセット、形質導入マーカー、及び自殺スイッチを含む）．

特定の実施形態では、ＣＡＲコンストラクトは、１つ以上のタグカセット、形質導入マーカー、及び／または自殺スイッチを含み得る。いくつかの実施形態では、形質導入マーカー及び／または自殺スイッチは、同じコンストラクト内に存在するが、細胞表面上に個別分子として発現する。タグカセット及び形質導入マーカーは、インビトロ、インビボ、及び／またはエクスビボで遺伝子改変細胞を活性化、増殖促進、検出、濃縮、単離、追跡、枯渇、及び／または除去するために使用され得る。「タグカセット」は、ＣＡＲに付加されるか、ＣＡＲと融合されるか、またはＣＡＲの一部であり、対応結合分子（例えば、リガンド、抗体、または他の結合パートナー）が特異的に結合することが可能な特有の合成ペプチド配列を指し、この結合特性は、タグ付きタンパク質及び／またはタグ付きタンパク質を発現する細胞を活性化、増殖促進、検出、濃縮、単離、追跡、枯渇、及び／または除去するために使用され得る。形質導入マーカーも同じ目的を果たし得るが、天然起源の分子に由来するものであり、ＣＡＲ分子の残部からそうした形質導入マーカーを分離するスキッピングエレメントを使用して発現されることが多い。

【０２４３】

対応結合分子に結合するタグカセットには、例えば、Ｈｉｓタグ、Ｆｌａｇタグ、Ｘｐｒｅｓｓタグ、Ａｖｉタグ、カルモジュリンタグ、ポリグルタミン酸タグ、ＨＡタグ、Ｍｙｃタグ、Ｓｏｆｔａｇ１、Ｓｏｆｔａｇ３、及びＶ５タグが含まれる。特定の実施形態では、ＣＡＲはＭｙｃタグを含む。

【０２４４】
本明細書に開示のタグカセット配列に特異的に結合する複合体結合分子は商業的に利用可能である。例えば、Ｈｉｓタグ抗体は、Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｐｉｅｒｃｅ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ、及びＧｅｎＳｃｒｉｐｔを含む供給業者から商業的に利用可能である。Ｆｌａｇタグ抗体は、Ｐｉｅｒｃｅ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ、及びＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈを含む供給業者から商業的に利用可能である。Ｘｐｒｅｓｓタグ抗体は、Ｐｉｅｒｃｅ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ、Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、及びＧｅｎＳｃｒｉｐｔを含む供給業者から商業的に利用可能である。Ａｖｉタグ抗体は、Ｐｉｅｒｃｅ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ、ＩｓＢｉｏ、及びＧｅｎｅｃｏｐｏｅｉａを含む供給業者から商業的に利用可能である。カルモジュリンタグ抗体は、Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、Ａｂｃａｍ、及びＰｉｅｒｃｅ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓを含む供給業者から商業的に利用可能である。ＨＡタグ抗体は、Ｐｉｅｒｃｅ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ、Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌ、及びＡｂｃａｍを含む供給業者から商業的に利用可能である。Ｍｙｃタグ抗体は、Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、Ａｂｃａｍ、及びＣｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌを含む供給業者から商業的に利用可能である。

【０２４５】
形質導入マーカーは、切断型ＣＤ１９（ｔＣＤ１９；Ｂｕｄｄｅ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ １２２：１６６０，２０１３を参照のこと）、切断型ヒトＥＧＦＲ（ｔＥＧＦＲ；Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ １１８：１２５５，２０１１を参照のこと）、ヒトＣＤ３４の細胞外ドメイン、及び／またはＣＤ３４抗原由来の標的エピトープ（Ｆｅｈｓｅ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ １（５ Ｐｔ １）；４４８－４５６，２０００を参照のこと）と、ＣＤ２０抗原由来の標的エピトープ（Ｐｈｉｌｉｐ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ １２４：１２７７－１２７８，２０１４を参照のこと）と、を組み合わせたＲＱＲ８、のうちの少なくとも１つから選択され得る。

【０２４６】
特定の実施形態では、ｉカスパーゼ９コンストラクト（ｉＣａｓｐ９）をコードするポリヌクレオチドが自殺スイッチとしてＣＡＲヌクレオチドコンストラクトに挿入され得る。

【０２４７】
複数の制御部は、ＣＡＲ中に複数のコピーとして存在し得るか、またはスキッピングエレメントを使用して異なる分子として発現し得る。例えば、ＣＡＲは、１つ、２つ、３つ、４つ、もしくは５つのタグカセットを有し得、及び／または１つ、２つ、３つ、４つ、もしくは５つの形質導入マーカーも発現され得る。例えば、実施形態は、２つのＭｙｃタグカセット、またはＨｉｓタグ及びＨＡタグカセット、またはＨＡタグ及びＳｏｆｔａｇ１タグカセット、またはＭｙｃタグ及びＳＢＰタグカセット、を有するＣＡＲコンストラクトを含み得る。特定の実施形態では、発現後に多量体化することになるＣＡＲは、異なるタグカセットを含む。特定の実施形態では、形質導入マーカーはｔＥＦＧＲを含む。形質導入マーカー及び対応ペアの例は、ＵＳ１３／４６３，２４７に記載されている。

【０２４８】
ＣＡＲ中に少なくとも１つの制御部を含めることの利点の１つは、対象に投与されるＣＡＲ発現細胞を、タグカセットに対応結合分子を使用して枯渇できることである。ある特定の実施形態では、本開示は、タグカセットに特異的な抗体を使用するか、制御部に特異的な対応結合分子を使用するか、または制御部に対する特異性を有する第２のＣＡＲ発現改変細胞を使用することによってＣＡＲ発現改変細胞を枯渇するための方法を提供する。改変細胞の除去は、制御部に特異的な枯渇剤を使用して達成され得る。

【０２４９】
ある特定の実施形態では、キメラ分子を発現する改変細胞は、制御部に特異的に結合する抗体（例えば、抗Ｔａｇ抗体）または制御部に特異的に結合する他の対応結合分子を使用することによってインビボで検出または追跡することができ、制御部に対するこうした

結合パートナーは、蛍光色素、放射性トレーサー、鉄－オキシドナノ粒子、または他の造影剤（Ｘ線、ＣＴスキャン、ＭＲＩスキャン、ＰＥＴスキャン、超音波、フローサイトメトリー、近赤外造影システム、もしくは他の画像診断法によって検出するためのものとして当該技術分野で知られるもの）と結合される（例えば、Ｙｕ，ｅｔ　ａｌ．，Ｔｈｅｒａｎｏｓｔｉｃｓ　２：３，２０１２を参照のこと）。

【０２５０】

したがって、ＣＡＲと共に少なくとも１つの制御部を発現する改変細胞は、例えば、タグカセットが存在しない改変細胞と比較してその同定、単離、選別、増殖誘導、追跡、及び／または除去が容易であり得る。

【０２５１】

本開示の方法及び組成物において有用なＣＡＲ及びＣＡＲ構築の例としては、ＷＯ２０１２／１３８４７５Ａ１、ＵＳ９，６２４，３０６Ｂ２、ＵＳ９２６６９６０Ｂ２、ＵＳ２０１７／０１７４７７、ＥＰ２６９４５４９Ｂ１、ＵＳ２０１７／０２８３５０４、ＵＳ２０１７／０２８１７６６、ＵＳ２０１７０２８３５００、ＵＳ２０１８／００８６８４６、ＵＳ２０１０／０１０５１３６、ＵＳ２０１０／０１０５１３６、ＷＯ２０１２／０７９０００、ＷＯ２００８０４５４３７、ＷＯ２０１６／１３９４８７Ａ１、及びＷＯ２０１４／０３９５２３によって提供されるものが挙げられる。

【０２５２】

ＴＣＲは、天然起源のＴ細胞受容体を指す。ＨＳＣは、選択ＴＣＲを発現するようにインビボで改変され得る。ＣＡＲ／ＴＣＲハイブリッドは、ＴＣＲのエレメント及びＣＡＲのエレメントを有するタンパク質を指す。例えば、ＣＡＲ／ＴＣＲハイブリッドは、天然起源のＴＣＲ結合ドメインを有し、このＴＣＲ結合ドメインは、そうしたＴＣＲ結合ドメインと天然では結び付かないエフェクタードメインが加えられたものであり得る。ＣＡＲ／ＴＣＲハイブリッドは、変異ＴＣＲ結合ドメイン及びＩＴＡＭシグナル伝達ドメインを有し得る。ＣＡＲ／ＴＣＲハイブリッドは、非天然起源のスペーサー領域または膜貫通ドメインが挿入された天然起源のＴＣＲを有し得る。

【０２５３】

特定のＣＡＲ／ＴＣＲハイブリッドには、ＴＲｕＣ（登録商標）（Ｔ細胞受容体融合コンストラクト）ハイブリッド（ＴＣＲ２　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ）が含まれる。例として、ＴＣＲ融合タンパク質の生成については、国際特許公開公報ＷＯ２０１８／０２６９５３及び同ＷＯ２０１８／０６７９９３ならびに出願公開公報ＵＳ２０１７／０１６６６２２に記載されている。

【０２５４】

特定の実施形態では、ＣＡＲ／ＴＣＲハイブリッドには、「Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）融合タンパク質」、すなわち「ＴＦＰ」が含まれる。ＴＦＰは、さまざまなポリペプチドに由来する組換えポリペプチドを含み、こうしたさまざまなポリペプチドには、一般に、ｉ）標的細胞上の表面抗原に結合し、ｉｉ）（典型的には、Ｔ細胞の中または表面上での共局在時に）インタクトなＴＣＲ複合体の他のポリペプチド要素と相互作用する能力を有するＴＣＲが含まれる。

【０２５５】

特定の実施形態では、ＴＦＰは、がん抗原（例えば、ＣＤ１９、ＲＯＲ１）に結合する抗体断片を含み、この抗体断片の配列は、ＴＣＲサブユニットまたはその一部をコードする核酸配列と隣接し、かつ同じリーディングフレーム内に存在する。ＴＦＰは、１つ以上の内在性ＴＣＲサブユニット（あるいは代替的には、１つ以上の外来性ＴＣＲサブユニット、または内在性ＴＣＲサブユニットと外来性ＴＣＲサブユニットとの組み合わせ）と結び付いて機能性のＴＣＲ複合体を形成することができる。

【０２５６】

Ｉ（Ｃ）（ｉ）（ｂ）．遺伝子編集系及び構成要素

さまざまな実施形態において、本開示のペイロードは、遺伝子編集系の少なくとも１つの構成要素またはすべての構成要素をコードする。本開示の遺伝子編集系には、ＣＲＩＳ

ＰＲ系及び塩基編集系が含まれる。大まかには、遺伝子編集系は、ＣＲＩＳＰＲ関連ＲＮＡガイド型エンドヌクレアーゼ及び塩基編集酵素から選択される遺伝子編集酵素と、少なくとも１つのｇＲＮＡと、を含めて、複数の構成要素を含み得る。したがって、本開示の遺伝子編集系は、（ｉ）ＣＲＩＳＰＲ系の場合、ＣＲＩＳＰＲ関連ＲＮＡガイド型エンドヌクレアーゼであるＣＲＩＳＰＲ酵素、及び少なくとも１つのガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）、または（ｉｉ）塩基編集系の場合、塩基編集酵素及び少なくとも１つのｇＲＮＡ、のいずれかを含み得る。

【０２５７】

本開示のベクター中に存在し、ベクターの一部（例えば、組み込みエレメント）の切除時及び／または宿主細胞ゲノムへの組み込み時に非機能性となる遺伝子編集系が自己不活型遺伝子編集系として挙げられることを本開示は含む。さまざまな実施形態において、遺伝子編集系は、組み込みエレメントが切除され、及び／または組み込みエレメントが宿主細胞ゲノムに組み込まれた後に遺伝子編集系の少なくとも１つの構成要素をコードするベクター配列が分解されることによって非機能性となる。

【０２５８】

本開示は、さまざまな実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素または塩基編集酵素がＰＧＫプロモーターと機能可能なように連結された遺伝子編集系をコードする核酸配列を含む。ＰＧＫが、ドナーベクター産生のための産生細胞（ＨＥＫ２９３細胞など）では減弱化するプロモーターであるが（すなわち、ＰＧＫによって促進されるコード配列の発現レベルは、（例えば、産生細胞でのＥｆ１αプロモーター及び／またはＨＳＣでのＰＧＫプロモーターと比較して）比較的低いか、または低減される）、ＨＳＣではＰＧＫが効率的な導入遺伝子発現を促進する（すなわち、ＰＧＫによって促進されるコード配列の発現レベルは、（例えば、ＨＳＣでのＥｆ１αプロモーター及び／または産生細胞（ＨＥＫ２９３細胞など）でのＰＧＫプロモーターと比較して）比較的高いか、または上昇する）という実験的な発見を本開示は含む。

【０２５９】

さまざまな実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素または塩基編集酵素を含む遺伝子編集系をコードする核酸配列は、産生細胞（ＨＥＫ２９３細胞など）でのそうした酵素の発現を低減または抑制するマイクロＲＮＡ標的部位を含む（これによって、例えば、酸性細胞（複数可）における遺伝子編集系の発現（例えば、塩基編集系の発現）による潜在的な有害作用（例えば、ＴａｄＡ及び／またはＴａｄ＊の発現に起因するもの）が回避または低減される）。さまざまな実施形態において、ｍｉＲ配列は、ＨＤＡｄ３５ドナーベクターの産生中に産生細胞において塩基編集酵素またはＣＲＩＳＰＲ酵素が発現することを抑制する配列であり得る。このことについては、例えば、Ｓａｙｄａｍｉｎｏｖａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．Ｍｅｔｈ．Ｃｌｉｎ．Ｄｅｖ．１：１４０５７，２０１５、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．Ｍｅｔｈ．Ｃｌｉｎ．Ｄｅｖ．９：３９０－４０１，２０１８に記載されており、これらの文献は、参照によって本明細書に組み込まれる。

【０２６０】

したがって、誤解を避けるために記載すると、本開示は、遺伝子編集系をコードする核酸配列が、（ｉ）ＣＲＩＳＰＲ酵素または塩基編集酵素をコードする核酸配列（この核酸配列は、本明細書に開示の改変ＴａｄＡ及び／またはＴａｄＡ＊を任意選択で含む）、（ｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ酵素または塩基編集酵素をコードする配列と機能可能なように連結されたＰＧＫプロモーター、及び（ｉｉｉ）産生細胞（ＨＥＫ２９３細胞）でのそうした酵素の発現を低減または抑制するマイクロＲＮＡ標的部位、のいずれかまたはすべてを含み得る実施形態を含む。本開示は、こうした領域（ｉ、ｉｉ、及びｉｉｉ）が個別に、または相乗的に組み合わさって、有効な遺伝子治療に寄与し得ることを含む。

【０２６１】

Ｉ（Ｃ）（ｉ）（ｂ）（１）．ＣＲＩＳＰＲペイロード発現産物

ＣＲＩＳＰＲ（規則的な間隔でクラスター化した短鎖反復回文配列）／Ｃａｓ（ＣＲＩ

ＳＰＲ関連タンパク質）ヌクレアーゼ系は、細菌系に基づく、遺伝子操作に使用される操作されたヌクレアーゼ系である。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓヌクレアーゼ系は、部分的には、多くの細菌及び古細菌の適応免疫応答に基づくものである。ウイルスまたはプラスミドが細菌に侵入した場合、細菌の「免疫」応答によってこうした侵入者のＤＮＡのセグメントがＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）へと変換される。その後、ｃｒＲＮＡが部分的に相補的な領域を介して別の型のＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡと呼ばれる）と結び付いて、ｃｒＲＮＡと相同的な標的ＤＮＡ中領域（「プロトスペーサー」と呼ばれる）にＣａｓヌクレアーゼを導く。ｃｒＲＮＡ転写産物中に含まれる２０ヌクレオチドの相補鎖配列によって特定される部位においてＣａｓヌクレアーゼがＤＮＡを切断すると、そこに二本鎖切断が生じて平滑末端が生じる。場合によっては、Ｃａｓヌクレアーゼは、ＤＮＡを部位特異的に認識及び切断する上でｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡの両方を必要とする。

【０２６２】

ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）は、標的指向性エレメントの一例である。ｇＲＮＡは、その最も単純な形態では、相補性に基づいてゲノム中部位を標的とする配列（例えば、ｃｒＲＮＡ）を与える。一方で、以下に説明されるように、ｇＲＮＡは、追加の構成要素も含み得る。例えば、特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、標的指向性配列（例えば、ｃｒＲＮＡ）、及びこの標的指向性配列を切断エレメントと連結するための要素を含み得る。この連結要素はｔｒａｃｒＲＮＡであり得る。特定の実施形態では、以下に記載のように、ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡを含むｇＲＮＡは、シングルｇＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）と称される単一分子として発現され得る。ｇＲＮＡは、他の機構（ナノ粒子を介するもの、または２つ以上の目的を有する分子を発現もしくは構築することによるものなど）を介しても切断エレメントと連結され得る。（例えば、本開示のアデノウイルスドナーベクターまたはアデノウイルスドナーゲノムの宿主細胞において）核酸配列を選択的に修正または改変するためのｇＲＮＡまたは他の標的指向性エレメントは、（例えば、利用可能な配列情報に基づいて）容易に設計及び実装できることを当業者なら理解するであろう。

【０２６３】

特定の実施形態では、標的指向性エレメント（例えば、ｇＲＮＡ）に１つ以上の改変（例えば、塩基改変、骨格改変）を含めることで、特徴が新規追加または増強された（例えば、安定性が向上した）核酸を得ることができる。改変骨格には、骨格中にリン原子が保持されているもの、及び骨格中にリン原子を有さないものが含まれ得る。適切なリン原子含有改変骨格には、例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチルホスホネート及び他のアルキルホスホネート（３’－アルキレンホスホネート、５’－アルキレンホスホネートなど）、キラルホスホネート、ホスフィネート、ホスホロアミデート（３’－アミノホスホロアミデート及びアミノアルキルホスホロアミデートを含む）、ホスホロジアミデート、チオノホスホロアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、セレノホスフェート、ならびにボラノホスフェート（通常の３’－５’結合を有するもの、２’－５’結合類似体、及び反転極性を有するもの（１つ以上のヌクレオチド間結合が３’－３’結合、５’－５’結合、または２’－２’結合であるもの））が含まれ得る。適切な反転極性含有標的指向性エレメントは、最も３’側のヌクレオチド間結合位置に３’－３’結合を１つ含み得る（すなわち、核酸塩基を有さないまたはその位置にヒドロキシル基を有する反転ヌクレオシド残基を１つ含み得る）。さまざまな塩（例えば、塩化カリウムまたは塩化ナトリウム）形態、混合塩形態、及び遊離酸形態も含まれ得る。

【０２６４】

標的指向性エレメントは、１つ以上のホスホロチオエートヌクレオシド間結合及び／またはヘテロ原子ヌクレオシド間結合、具体的には、－－$CH_2$－$NH$－Ｏ－$CH_2$－、－－$CH_2$－Ｎ（$CH_3$）－Ｏ－$CH_2$－（すなわち、メチレン（メチルイミノ）またはＭＭＩ骨格）、－－$CH_2$－Ｏ－Ｎ（$CH_3$）－$CH_2$－、－－$CH_2$－Ｎ（$CH_3$）－Ｎ（$CH_3$）－$CH_2$－、及び－－Ｏ－－Ｎ（$CH_3$）－$CH_2$－$CH_2$－（天然のホスホ

ジエステルヌクレオチド間結合は、－－Ｏ－－Ｐ（＝Ｏ）（ＯＨ）－Ｏ－ＣＨ$_2$－として表される）を含み得る。

【０２６５】

特定の実施形態では、標的指向性エレメントは、モルホリノ骨格構造を含み得る。例えば、標的指向性エレメントは、リボース環の代わりに６員のモルホリノ環を含み得る。こうした実施形態のいくつかでは、ホスホロジアミデートヌクレオシド間結合または他の非ホスホジエステルヌクレオシド間結合によってホスホジエステル結合が置き換えられる。

【０２６６】

特定の実施形態では、標的指向性エレメントは、１つ以上の置換糖部分を含み得る。適切なポリヌクレオチドは、ＯＨ、Ｆ、Ｏ－アルキル、Ｓ－アルキル、もしくはＮ－アルキル、Ｏ－アルケニル、Ｓ－アルケニル、もしくはＮ－アルケニル、Ｏ－アルキニル、Ｓ－アルキニル、もしくはＮ－アルキニル、またはＯ－アルキル－Ｏ－アルキル（こうしたアルキル、アルケニル、及びアルキニルは、置換または非置換のＣ１～Ｃ１０アルキルまたはＣ２～Ｃ１０アルケニル及びＣ２～Ｃ１０アルキニルであり得る）から選択される糖置換基を含み得る。Ｏ（（ＣＨ$_2$）ｎＯ）ｍＣＨ$_3$、Ｏ（ＣＨ$_2$）ｎＯＣＨ$_3$、Ｏ（ＣＨ$_2$）ｎＮＨ$_2$、Ｏ（ＣＨ$_2$）ｎＣＨ$_3$、Ｏ（ＣＨ$_2$）ｎＯＮＨ$_2$、及びＯ（ＣＨ$_2$）ｎＯＮ（（ＣＨ$_2$）ｎＣＨ$_3$）$_2$（式中、ｎ及びｍは、１～１０である）が特に適している。

【０２６７】

切断エレメントの例としては、ヌクレアーゼが挙げられる。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子座は、５０を超える遺伝子ファミリーを有し、厳密に普遍的な遺伝子は存在せず、このことは、遺伝子座構造の進化が速く、極度に多様であることを示している。ＣａｓヌクレアーゼのＣａｓ１、Ｃａｓ１Ｂ、Ｃａｓ２、Ｃａｓ３、Ｃａｓ４、Ｃａｓ５、Ｃａｓ６、Ｃａｓ７、Ｃａｓ８、Ｃａｓ９（Ｃｓｎ１及びＣｓｘ１２としても知られる）、Ｃａｓ１０、Ｃｐｆ１、Ｃ２ｃ３、Ｃ２ｃ２、及びＣ２ｃ１、Ｃｓｙ１、Ｃｓｙ２、Ｃｓｙ３、Ｃｓｅ１、Ｃｓｅ２、Ｃｓｃ１、Ｃｓｃ２、Ｃｓａ５、Ｃｓｎ２、Ｃｓｍ２、Ｃｓｍ３、Ｃｓｍ４、Ｃｓｍ５、Ｃｓｍ６、Ｃｍｒ１、Ｃｍｒ３、Ｃｍｒ４、Ｃｍｒ５、Ｃｍｒ６、Ｃｐｆ１、Ｃｓｂ１、Ｃｓｂ２、Ｃｓｂ３、Ｃｓｘ１７、Ｃｓｘ１４、Ｃｓｘ１０、Ｃｓｘ１６、ＣｓａＸ、Ｃｓｘ３、Ｃｓｘ１、Ｃｓｘ１５、Ｃｓｆ１、Ｃｓｆ２、Ｃｓｆ３、及びＣｓｆ４が挙げられる。

【０２６８】

ＣａｓヌクレアーゼにはⅠ型、ＩＩ型、及びＩＩＩ型）、亜型が１０個（Ⅰ型タンパク質を５つ、ＩＩ型タンパク質を３つ、ＩＩＩ型タンパク質を２つ含む）存在する（例えば、Ｈｏｃｈｓｔｒａｓｓｅｒ ａｎｄ Ｄｏｕｄｎａ，Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｓｃｉ，２０１５：４０（ｌ）：５８－６６を参照のこと）。ＩＩ型ＣａｓヌクレアーゼにはＣａｓ１、Ｃａｓ２、Ｃｓｎ２、及びＣａｓ９が含まれる。こうしたＣａｓヌクレアーゼは、当該技術分野で知られている。例えば、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓの野生型Ｃａｓ９ポリペプチドのアミノ酸配列は、例えば、ＮＣＢＩ参照配列番号ＮＰ２６９２１５にて示されており、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓの野生型Ｃａｓ９ポリペプチドのアミノ酸配列は、例えば、ＮＣＢＩ参照配列番号ＷＰ＿０１１６８１４７０にて示されている。

【０２６９】

特定の実施形態では、Ｃａｓ９は、ＲＮＡガイド型の二本鎖ＤＮＡ結合ヌクレアーゼタンパク質または二本鎖ＤＮＡ結合ニッカーゼタンパク質を指す。野生型Ｃａｓ９ヌクレアーゼは、異なるＤＮＡ鎖を切断する２つの機能性ドメイン（例えば、ＲｕｖＣ及びＨＮＨ）を有する。Ｃａｓ９は、両方の機能性ドメインが活性である場合にゲノムＤＮＡ（標的ＤＮＡ）中に二本鎖切断を導入し得る。Ｃａｓ９酵素は、いくつかの実施形態では、細菌（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒ、Ｓｕｔｔｅｒｅｌｌａ、Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ、Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ、Ｆｉｌｉｆ ａｃｔｏｒ、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ、Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ、Ｆｌａｖｉｉｖｏｌａ、Ｆｌａｖｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｓｐｈａｅｒｏｃｈａｅｔａ

、Ａｚｏｓｐｉｒｉｌｌｕｍ、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ、Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ、Ｒｏｓｅｂｕｒｉａ、Ｐａｒｖｉｂａｃｕｌｕｍ、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ、Ｎｉｔｒａｔｉｆｒａｃｔｏｒ、及びＣａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒなど）に由来するＣａｓ９タンパク質の触媒ドメインを１つ以上含む。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９は融合タンパク質であり、例えば、２つの触媒ドメインは、異なる細菌種に由来する。

【０２７０】

これまでに示されたように、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は操作されており、その結果、ある特定の場合、ｃｒＲＮＡとｔｒａｃｒＲＮＡとが統合されて１つの分子（シングルｇＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）と呼ばれる）にされ得る。この操作手法では、任意の所望の配列が標的となるようにｓｇＲＮＡによってＣａｓが導かれる（例えば、Ｊｉｎｅｋ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ３３７：８１６－８２１，２０１２、Ｊｉｎｅｋ ｅｔ ａｌ．，ｅＬｉｆｅ ２：ｅ００４７１，２０１３、Ｓｅｇａｌ，ｅＬｉｆｅ ２：ｅ００５６３，２０１３を参照のこと）。したがって、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、細胞のゲノム中の所望の標的に二本鎖切断を創出し、導入された切断をＨＤＲまたはＮＨＥＪによって修復する細胞の内在性機構を利用するように操作され得る。本明細書に記載の特定の実施形態では、規定の組み込み部位でのＨＤＲを促進するためにホモロジーアームが利用される。

【０２７１】

Ｃａｓ９ヌクレアーゼの有用なバリアントには、触媒ドメインの一方が不活性な酵素（ＲｕｖＣ”酵素もしくはＨＮＨ”酵素またはニッカーゼなど）が含まれる。Ｃａｓ９ニッカーゼは、活性な機能性ドメインを１つのみ有し、いくつかの実施形態では、標的ＤＮＡの一方の鎖のみを切断し、それによって一本鎖切断、すなわちニックを創出する。いくつかの実施形態では、少なくともＤ１０Ａ変異を有する変異Ｃａｓ９ヌクレアーゼは、Ｃａｓ９ニッカーゼである。他の実施形態では、少なくともＨ８４０Ａ変異を有する変異Ｃａｓ９ヌクレアーゼは、Ｃａｓ９ニッカーゼである。Ｃａｓ９ニッカーゼ中に存在する変異の他の例としては、Ｎ８５４Ａ及びＮ８６３Ａが挙げられる。相対するＤＮＡ鎖を標的とする少なくとも２つのＤＮＡ標的指向性ＲＮＡが使用される場合、Ｃａｓ９ニッカーゼを使用して二本鎖切断が導入される。ニックが二重に導入された二本鎖切断は、ＨＤＲまたはＮＨＥＪによって修復される。この遺伝子編集方針は、一般に、ＨＤＲに好都合であり、オフターゲットＤＮＡ部位にインデル変異が生じる頻度を低減するものである。Ｃａｓ９ヌクレアーゼまたはＣａｓ９ニッカーゼは、いくつかの実施形態では、標的細胞または標的生物向けにコドン最適化に供される。

【０２７２】

特定の実施形態では、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ Ｃａｓ９（ＳａＣａｓ９）が利用され得る。特定の実施形態では、下記の位置の１つ以上に変異を有するＳａＣａｓ９が利用され得る：Ｅ７８２、Ｎ９６８、及び／またはＲ１０１５。特定の実施形態では、下記の位置の１つ以上に変異を有するＳａＣａｓ９が利用され得る：Ｅ７３５、Ｅ７８２、Ｋ９２９、Ｎ９６８、Ａ１０２１、Ｋ１０４４、及び／またはＲ１０１５。いくつかの実施形態では、バリアントＳａＣａｓ９タンパク質は、下記の変異の１つ以上を含む：Ｒ１０１５Ｑ、Ｒ１０１５Ｈ、Ｅ７８２Ｋ、Ｎ９６８Ｋ、Ｅ７３５Ｋ、Ｋ９２９Ｒ、Ａ１０２１Ｔ、及び／またはＫ１０４４Ｎ。いくつかの実施形態では、バリアントＳａＣａｓ９タンパク質は、Ｄ１０Ａ、Ｄ５５６Ａ、Ｈ５５７Ａ、Ｎ５８０Ａという変異を含み、例えば、Ｄ１０Ａ／Ｈ５５７Ａ及び／またはＤ１０Ａ／Ｄ５５６Ａ／Ｈ５５７Ａ／Ｎ５８０Ａを含む。いくつかの実施形態では、バリアントＳａＣａｓ９タンパク質は、Ｅ７３５、Ｅ７８２、Ｋ９２９、Ｎ９６８、Ｒ１０１５、Ａ１０２１、及び／またはＫ１０４４から選択される１つ以上の位置に変異を含む。いくつかの実施形態では、ＳａＣａｓ９バリアントは、下記の変異セットのうちの１つを含み得る：Ｅ７８２Ｋ／Ｎ９６８Ｋ／Ｒ１０１５Ｈ（ＫＫＨバリアント）、Ｅ７８２Ｋ／Ｋ９２９Ｒ／Ｒ１０１５Ｈ（ＫＲＨバリアント）、または７８２Ｋ／Ｋ９２９Ｒ／Ｎ９６８Ｋ／Ｒ１０１５Ｈ（ＫＲＫＨバリアント）。

【０２７３】

クラスＩＩ、Ｖ型のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓクラス（Ｃｐｆ１が例として挙げられる）が同定されている（Ｚｅｔｓｃｈｅ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）Ｃｅｌｌ　１６３（３）：７５９－７７１）。Ｃｐｆ１ヌクレアーゼでは、とりわけ、短い３塩基対認識配列（ＴＴＮ）（プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）として知られる）によって標的部位選択に柔軟性が加わり得る。Ｃｐｆ１の切断部位は、ＰＡＭ配列から少なくとも１８ｂｐ離れている。さらに、突出末端を有する互い違いのＤＳＢによってドナーテンプレートを配向特異的に挿入することが可能になり、このことは、非分裂細胞において有利である。

【０２７４】

特定の実施形態では、操作されたＣｐｆ１が利用され得る。例えば、ＵＳ２０１８／０３０４２５では、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ　ｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ＮＤ２００６及びＡｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ属の１種ＢＶ３Ｌ６に由来するＣｐｆ１ヌクレアーゼを標的特異性が改変及び改善されるように操作したものについて記載されている。特定のバリアントには、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ　ｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ＮＤ２００６のものが含まれ、このバリアントは、例えば、少なくともアミノ酸１９～１２４６に変異を有するものであり（すなわち、天然のアミノ酸が、異なるアミノ酸（例えば、アラニン、グリシン、またはセリン）で置き換わっている）、こうした変異は、下記の位置の１つ以上に位置する：Ｓ２０２、Ｎ２７４、Ｎ２７８、Ｋ２９０、Ｋ３６７、Ｋ５３２、Ｋ６０９、Ｋ９１５、Ｑ９６２、Ｋ９６３、Ｋ９６６、Ｋ１００２、及び／またはＳ１００３。特定のＣｐｆ１バリアントには、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓの１種ＢＶ３Ｌ６のＣｐｆ１（ＡｓＣｐｆ１）のものが含まれ得、このバリアントは、変異を有するものであり（すなわち、天然のアミノ酸が、異なるアミノ酸（例えば、アラニン、グリシン、またはセリン）で置き換わっている（天然のアミノ酸がセリンである場合は除く））、こうした変異は、下記の位置の１つ以上に位置する：Ｎ１７８、Ｓ１８６、Ｎ２７８、Ｎ２８２、Ｒ３０１、Ｔ３１５、Ｓ３７６、Ｎ５１５、Ｋ５２３、Ｋ５２４、Ｋ６０３、Ｋ９６５、Ｑ１０１３、Ｑ１０１４、及び／またはＫ１０５４。

【０２７５】

他のＣｐｆ１バリアントには、Ｚｅｔｓｃｈｅ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）Ｃｅｌｌ　１６３：７５９－７７１に開示のＣｐｆ１ホモログ及びＣｐｆ１ポリペプチドのオルソログ、ならびに米国２０１６／０２０８２４３に開示のＣｐｆ１ポリペプチドが含まれる。操作されたＣｐｆ１バリアントについては他にも当業者に知られており、こうした操作されたＣｐｆ１バリアントは本開示の範囲に含まれる（例えば、ＷＯ／２０１７／１８４７６８を参照のこと）。

【０２７６】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系及びその構成要素に関する追加の情報は、ＵＳ８６９７３５９、ＵＳ８７７１９４５、ＵＳ８７９５９６５、ＵＳ８８６５４０６、ＵＳ８８７１４４５、ＵＳ８８８９３５６、ＵＳ８８８９４１８、ＵＳ８８９５３０８、ＵＳ８９０６６１６、ＵＳ８９３２８１４、ＵＳ８９４５８３９、ＵＳ８９９３２３３、及びＵＳ８９９９６４１、ならびにその関連出願、ならびにＷＯ２０１４／０１８４２３、ＷＯ２０１４／０９３５９５、ＷＯ２０１４／０９３６２２、ＷＯ２０１４／０９３６３５、ＷＯ２０１４／０９３６５５、ＷＯ２０１４／０９３６６１、ＷＯ２０１４／０９３６９４、ＷＯ２０１４／０９３７０１、ＷＯ２０１４／０９３７０９、ＷＯ２０１４／０９３７１２、ＷＯ２０１４／０９３７１８、ＷＯ２０１４／１４５９９、ＷＯ２０１４／２０４７２３、ＷＯ２０１４／２０４７２４、ＷＯ２０１４／２０４７２５、ＷＯ２０１４／２０４７２６、ＷＯ２０１４／２０４７２７、ＷＯ２０１４／２０４７２８、ＷＯ２０１４／２０４７２９、ＷＯ２０１５／０６５９６４、ＷＯ２０１５／０８９３５１、ＷＯ２０１５／０８９３５４、ＷＯ２０１５／０８９３６４、ＷＯ２０１５／０８９４１９、ＷＯ２０１５／０８９４２７、ＷＯ２０１５／０８９４６２、ＷＯ２０１５／０８９４６５、ＷＯ２０１５／０８９４７３及びＷＯ２０１５／０８９４８６、ＷＯ２０１６／２０５７１１、ＷＯ２０１７／１０６６５７、ＷＯ２０１７／１２７８０７、ならびにその関連出願に記載されている。

【０２７７】
いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ系は、γ－グロビンをコードする核酸配列を改変するように操作され、この改変操作の結果、例えば、γ－グロビンの発現が増加する。主要な胎児型形態のヘモグロビン（ヘモグロビンＦ（ＨｂＦ））は、γ－グロビンポリペプチドサブユニットがα－グロビンポリペプチドサブユニットと対になることによって形成される。ヒト胎児型γ－グロビン遺伝子（ＨＢＧ１及びＨＢＧ２（進化的重複によって生じた２つの高度に相同的な遺伝子））は、通常、出生時前後にサイレンシングされる一方で、成体型β－グロビン遺伝子（ＨＢＢ及びＨＢＤ）の発現は増加する。生涯にわたって胎児型γ－グロビンを持続的に発現させるまたはそれを可能にする変異が存在すれば、β－グロビン欠損の表現型が軽快し得る。したがって、胎児型γ－グロビン遺伝子を再活性化させることが治療的に有益であり得、特に、β－グロビン欠損対象において有益であり得る。γ－グロビンの発現を増加させる変異については、さまざまなものが当該技術分野で知られているか、または本明細書に開示される（例えば、Ｗｉｅｎｅｒｔ，Ｔｒｅｎｄｓ　ｉｎ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　３４（１２）：９２７－９４０，２０１８を参照のこと。当該文献は、その全体及びγ－グロビンの発現を増加させる変異に関する部分が参照によって本明細書に組み込まれる）。ある特定のそのような変異は、ＨＢＧ１プロモーター中またはＨＢＧ２プロモーター中に見られる。

【０２７８】
いくつかの実施形態では、ベクターまたはゲノムはＣＲＩＳＰＲ系を含み、このベクターまたはゲノム中では、ペイロードが組み込みエレメントを含み、ペイロード中にはＣＲＩＳＰＲ系の構成要素も少なくとも１つ存在するが、そうした構成要素は組み込みエレメントの外側に存在する（例えば、トランスポゾン逆方向反復配列と隣接する転位性組み込みエレメントを含むペイロード断片の外側に存在するか、または相同組み込みのためのホモロジーアームを含むペイロード断片の外側に存在する）。ペイロードが転位性組み込みエレメントを含むある特定の実施形態では、転位性組み込みエレメントがトランスポゾン逆方向反復配列と隣接する場合、ＣＲＩＳＰＲ系のＣＲＩＳＰＲ酵素及び／または１つ以上のｇＲＮＡのうちの１つ以上は、転位性組み込みエレメントの外側の位置でペイロード中に存在する（すなわち、転位性組み込みエレメント中には存在しない）（すなわち、トランスポゾン逆方向反復配列と隣接する核酸配列中には存在しない）。ペイロードが転位性組み込みエレメントを含むある特定の実施形態では、転位性組み込みエレメントがホモロジーアームと隣接する場合、ＣＲＩＳＰＲ編集系のＣＲＩＳＰＲ酵素及び／または１つ以上のｇＲＮＡのうちの１つ以上は、組み込みエレメントの外側の位置でペイロード中に存在する（すなわち、組み込みエレメント中には存在しない）（すなわち、ホモロジーアームと隣接する核酸配列中には存在しない）。そのような系では、ＣＲＩＳＰＲ系の発現及び／または活性は、転位性組み込みエレメントが転位するとベクターが破壊され、転位性組み込みエレメントの外側に位置するＣＲＩＳＰＲ系構成要素の１つ以上の発現が減少または終止し得るという点において一過性である。ＣＲＩＳＰＲ系を含むそのようなベクターは、「自己不活型」ＣＲＩＳＰＲ系または「自己不活型」ベクターと称されることがあり得、これは、組み込みエレメントが（例えば、転位または相同組換えによって）組み込まれるとＣＲＩＳＰＲ系の発現及び／または活性が不活化し得ることによるものである。さまざまな実施形態において、自己不活型ＣＲＩＳＰＲ系は、統合ペイロード中に存在する。

【０２７９】
自己不活型ＣＲＩＳＰＲ系ペイロードをアデノウイルスベクター（例えば、ＨＤＡｄアデノウイルスベクター）に含めることで、他のＣＲＩＳＰＲ系ペイロード（例えば、ＣＲＩＳＰＲ系が組み込みエレメント内に完全に含まれるもの、またはＣＲＩＳＰＲ系は宿主細胞ゲノムに組み込まれないが、その発現がベクターの破壊によって不活化されないもの）と比較して、遺伝子治療（例えば、インビボ遺伝子治療）における切断頻度が上昇し、及び／または形質導入及び／または編集された標的細胞の生存が長期化する（例えば、形質導入されたＨＳＰＣの生存が長期化する）ことを本発明者らは観察している。ＣＲＩＳ

ＰＲ系が自己不活化すると、ＣＲＩＳＰＲ酵素及び／またはｇＲＮＡの発現が短縮され、編集された細胞の生存が長期化し、長期的再増殖細胞のパーセントが増加する。一例を挙げると、ＨＢＧ１及び／またはＨＧＢ２を再活性化するための自己不活型ＣＲＩＳＰＲ系を含むと共に、γ－グロビンを発現させるための核酸配列をさらに含む統合ペイロードを含むＨＤＡｄベクターを使用する遺伝子治療では、非自己不活型ＣＲＩＳＰＲ系またはγ－グロビンを発現させるための核酸配列単独のいずれかを含むＨＤＡｄベクターを使用した場合と比較して、形質導入後にＲＢＣ中のγ－グロビン量が顕著に増加した。

【０２８０】

本明細書では、組み込みエレメントを転位させるためのトランスポゼースをコードするサポートベクターまたはサポートゲノムと組み合わせて、自己不活型ＣＲＩＳＰＲ系を含むドナーベクターを（例えば、ヒト対象に）投与する方法がさらに提供される。本開示は、さまざまな場合において、サポートベクターを投与する前にドナーベクターを投与することを含み、ドナーベクターの投与とサポートベクターの投与との間の時間は、ＣＲＩＳＰＲ系の活性の持続時間及び／またはレベルを制御する手段となる。例えば、さまざまな実施形態において、ドナーベクターの投与から一定時間後にサポートベクターを（例えば、対象に）投与することができ、この一定時間は、少なくとも１時間、少なくとも２時間、少なくとも３時間、少なくとも４時間、少なくとも５時間、少なくとも６時間、少なくとも８時間、少なくとも１０時間、少なくとも１２時間、少なくとも１４時間、少なくとも１６時間、少なくとも１８時間、少なくとも２０時間、少なくとも２２時間、少なくとも２４時間、少なくとも３０時間、少なくとも３６時間、少なくとも４２時間、少なくとも４８時間、少なくとも５４時間、少なくとも６０時間、少なくとも６６時間、もしくは少なくとも７２時間、少なくとも９６時間、または少なくとも１２８時間である（例えば、この一定時間は、その下限が１時間、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、８時間、１０時間、１２時間、１４時間、１６時間、１８時間、２０時間、２２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、または７２時間であり、その上限が６時間、８時間、１０時間、１２時間、１４時間、１６時間、１８時間、２０時間、２２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、９６時間、または１２８時間である）。

【０２８１】

いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ系構成要素（例えば、ＣＲＩＳＰＲ酵素）をコードする核酸配列は、ＣＲＩＳＰＲの発現及び／または活性をマイクロＲＮＡで制御するためのマイクロＲＮＡ標的部位を含むように操作される。

【０２８２】

Ｉ（Ｃ）（ｉ）（ｂ）（２）．塩基エディターペイロード発現産物

本開示は、とりわけ、塩基編集物質、及び塩基編集物質をコードする核酸を含み、任意選択で、塩基編集物質、または塩基編集物質をコードする核酸は、ベクターまたはゲノム（アデノウイルスベクターまたはアデノウイルスゲノムなど）中に存在する。塩基編集系は、その構成要素として塩基編集酵素及び／または少なくとも１つのｇＲＮＡを含み得る。ある特定の実施形態では、本開示の塩基編集物質及び／または塩基編集系は、Ａｄ３５アデノウイルスベクターまたはＡｄ５／３５アデノウイルスベクター中に存在する。一方で、本開示の塩基編集物質、及び本開示の塩基編集物質をコードする核酸配列は、任意の状況または形態で（例えば、アデノウイルスベクターではないベクター（例えば、プラスミド）中に）存在し得ることを当業者なら理解するであろう。本明細書に開示の塩基編集系をコードするヌクレオチド配列は、典型的には、多くの容量限定ベクター系に含めるには大きすぎるものであるが、アデノウイルスベクターの容量は大きいため、そのような配列を本開示のアデノウイルスベクターまたはアデノウイルスゲノムに含めることが可能である。実際、本明細書の他の箇所で論じられるように、塩基編集系をコードすると共に、１つ以上の追加のコード配列をさらにコードするペイロードをアデノウイルスベクターに含めることができる。本開示の塩基エディターをコードするペイロードを用いて遺伝子治療を行う上で本明細書に開示のアデノウイルスベクター及びアデノウイルスゲノムで得ら

れる追加の利点は、アデノウイルスゲノム（Ａｄ３５ゲノムなど）が自然には宿主細胞ゲノムに組み込まれないことであり（これによって、塩基編集系の一過性発現が促進される）、このことは、例えば、免疫原性及び／または遺伝毒性を回避する上で望ましくあり得る。

【０２８３】

塩基編集は、ゲノムＤＮＡ中または細胞ＲＮＡ中の塩基または塩基対を異なる塩基または塩基対に変換することによって核酸配列を選択的に改変することを指す（Ｒｅｅｓ　＆　Ｌｉｕ，Ｎａｔｕｒｅ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，１９：７７０－７８８，２０１８）。ＤＮＡ塩基エディターには一般的なクラスが２つ存在する：（ｉ）グアニン－シトシン塩基対をチミン－アデニン塩基対に変換するシトシン塩基エディター（ＣＢＥ）、及び（ｉｉ）アデニン－チミン塩基対をグアニンシトシン塩基対に変換するアデニン塩基エディター（ＡＢＥ）。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ系由来の要素を他の酵素またはその生物学的に活性な断片と組み合わせることで、核酸（例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡ）中に変異（点変異など）が直接的に導入、誘発、または生成され、このことは、例えば、変異導入される核酸に１つ以上の二本鎖切断を導入、誘発、または生成することなく生じる。ある特定のそのような要素組み合わせ物は、塩基エディターとして知られる。

【０２８４】

ＤＮＡ塩基エディターは、核酸塩基デアミナーゼ酵素と融合した触媒的に無能化されたヌクレアーゼ、場合によっては、ＤＮＡグリコシラーゼ阻害剤を含み得る。ＲＮＡ塩基エディターは、ＲＮＡの塩基改変を行う要素を使用して類似の変更を達成するものである。

【０２８５】

ＤＮＡ中のその標的遺伝子座に結合すると、ガイドＲＮＡと標的ＤＮＡ鎖との間に塩基対が形成されることで、一本鎖ＤＮＡの小さなセグメントで置換が生じる。この一本鎖ＤＮＡ逸脱部内のＤＮＡ塩基がデアミナーゼ酵素によって改変され得る。ある特定の実施形態では、真核細胞における効率を改善するために、触媒的に無能化されたヌクレアーゼによって非編集ＤＮＡ鎖中にニックを生じさせ、これによって、細胞が編集鎖をテンプレートとして使用して非編集鎖を修復するように誘導することも行われる。

【０２８６】

ＣＢＥについては、シトシンデアミナーゼをＣａｓニッカーゼ（例えば、Ｃａｓ９ニッカーゼ（ｎＣａｓ９））と連結することによってＣＲＩＳＰＲベースのエディターを得ることができる。一例を挙げると、ｎＣａｓ９は、一本鎖を切断することによって標的ＤＮＡにニックを創出することで、二本鎖切断を必要とする方法と比較して、有害なインデル形成が生じる可能性を低減し得る。ＣＢＥは、ＤＮＡと結合後、標的シトシン（Ｃ）を脱アミノ化してウラシル（Ｕ）塩基に変換する。その後、得られたＵ－Ｇ対が細胞のミスマッチ修復機構によって修復されることで最初のＣ－Ｇ対がＴ－Ａに変換されるか、または得られたＵ－Ｇ対が、ウラシルグリコシラーゼによって媒介される塩基除去修復によって最初のＣ－Ｇへと戻される。さまざまな実施形態において、ウラシルグリコシラーゼ阻害剤（ＵＧＩ）（例えば、ペイロード中に存在するＵＧＩ）を発現させることで、後者の結果の発生が低減され、Ｔ－Ａ塩基対形成の生成が増加する。

【０２８７】

アデノシン塩基エディター（ＡＢＥ）について、アデニン塩基編集対象のＤＮＡに作用し得るアデノシンデアミナーゼの例としては、自体の基質としてＤＮＡを許容する変異ＴａｄＡアデノシンデアミナーゼ（ＴａｄＡ＊）が挙げられる。Ｅ．ｃｏｌｉ　ＴａｄＡは、典型的には、ホモ二量体として働いて転移ＲＮＡ（ｔＲＮＡ）中のアデノシンを脱アミノ化する。ＴａｄＡ＊デアミナーゼは、標的「Ａ」から「Ｉ」（イノシン）への変換を触媒し、「Ｉ」は、細胞ポリメラーゼによって「Ｇ」として扱われる。その後、最初のゲノムＡ－Ｔ塩基対がＧ－Ｃ対へと変換され得る。細胞のイノシン除去修復は、ウラシル除去ほどは活性ではないため、ＡＢＥは、ＣＢＥでのＵＧＩのような追加の阻害剤タンパク質を全く必要としない。いくつかの実施形態では、典型的なＡＢＥは、３つの構成要素を含み得、これらの構成要素には、野生型Ｅ．ｃｏｌｉ　ｔＲＮＡ特異的アデノシンデアミナ

ーゼ（ＴａｄＡ）単量体（塩基編集中に構造的な役割を果たし得る）、ＴａｄＡ＊（デオキシアデノシンの脱アミノ化を触媒する変異ＴａｄＡ単量体）、及びＣａｓニッカーゼ（Ｃａｓ９（Ｄ１０Ａ）など）が含まれる。ある特定の実施形態では、ＴａｄＡとＴａｄＡ＊との間に位置するリンカーが存在し、ある特定の実施形態では、ＴａｄＡ＊とＣａｓニッカーゼとの間に位置するリンカーが存在する。さまざまな実施形態において、一方または両方のリンカーが含むアミノ酸数は少なくとも６であり、例えば、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１５、少なくとも２０、少なくとも２５、少なくとも３０、少なくとも３５、少なくとも４０、少なくとも４５、または少なくとも５０である（例えば、下限が５、６、７、８、９、１０、または１５であり、上限が２０、２５、３０、３５、４０、４５、または５０である）。さまざまな実施形態において、一方または両方のリンカーが含むアミノ酸数は３２である。いくつかの実施形態では、一方または両方のリンカーは、（ＳＧＧＳ）$_2$－ＸＴＥＮ－（ＳＧＧＳ）$_2$という配列を有するか、または当業者に知られるその他の配列を有する。

【０２８８】

塩基エディターは、１つの塩基または塩基対を別のもの直接的に変換し、望ましくない編集副産物（挿入及び欠失（インデル）など）を過剰に生成させることなく非分裂細胞に効率的に点変異を導入することを可能にし得る。例えば、塩基エディターによるインデルの生成率は、１０％未満、９％未満、８％未満、７％未満、６％未満、５．５％未満、５％未満、４．５％未満、４％未満、３．５％未満、３％未満、２．５％未満、２％未満、１．５％未満、１％未満、０．５％未満、または０．１％未満であり得る。

【０２８９】

ＤＮＡ塩基エディターは、二本鎖切断を生成させることなく、そのような点変異を非分裂細胞に挿入し得る。二本鎖切断が生じないため、塩基エディターによって、望ましくない編集副産物（挿入及び欠失（インデル）など）が過剰に生じることはない。例えば、塩基エディターによるインデルの生成率は、二本鎖切断に依存する技術によるものと比較して、１０％未満、９％未満、８％未満、７％未満、６％未満、５．５％未満、５％未満、４．５％未満、４％未満、３．５％未満、３％未満、２．５％未満、２％未満、１．５％未満、１％未満、０．５％未満、または０．１％未満であり得る。

【０２９０】

ほとんどの塩基編集系の構成要素は、（１）標的指向化ＤＮＡ結合タンパク質、（２）核酸塩基デアミナーゼ酵素、及び（３）ＤＮＡグリコシラーゼ阻害剤を含む。

【０２９１】

ＣＲＩＳＰＲ系の任意のヌクレアーゼを無能化し、塩基編集系に含めて使用することができる。Ｃａｓヌクレアーゼの例としては、Ｃａｓ１、Ｃａｓ１Ｂ、Ｃａｓ２、Ｃａｓ３、Ｃａｓ４、Ｃａｓ５、Ｃａｓ６、Ｃａｓ７、Ｃａｓ８、Ｃａｓ９（Ｃｓｎ１及びＣｓｘ１２としても知られる）、Ｃａｓ１０、Ｃｐｆ１、Ｃ２ｃ３、Ｃ２ｃ２、及びＣ２ｃ１、Ｃｓｙ１、Ｃｓｙ２、Ｃｓｙ３、Ｃｓｅ１、Ｃｓｅ２、Ｃｓｃ１、Ｃｓｃ２、Ｃｓａ５、Ｃｓｎ２、Ｃｓｍ２、Ｃｓｍ３、Ｃｓｍ４、Ｃｓｍ５、Ｃｓｍ６、Ｃｍｒ１、Ｃｍｒ３、Ｃｍｒ４、Ｃｍｒ５、Ｃｍｒ６、Ｃｐｆ１、Ｃｓｂ１、Ｃｓｂ２、Ｃｓｂ３、Ｃｓｘ１７、Ｃｓｘ１４、Ｃｓｘ１０、Ｃｓｘ１６、ＣｓａＸ、Ｃｓｘ３、Ｃｓｘ１、Ｃｓｘ１５、Ｃｓｆ１、Ｃｓｆ２、Ｃｓｆ３、Ｃｓｆ４、ならびにその変異体が挙げられる。

【０２９２】

特定の実施形態では、触媒的に無能化されたヌクレアーゼとしてヌクレアーゼ不活性Ｃａｓ９（ｄＣａｓ９）が利用される。しかしながら、ＣＲＩＳＰＲ系の任意のヌクレアーゼ（その多くが上に記載される）を無能化し、塩基編集系に含めて使用することができる。特定の実施形態では、忠実度の高いＣａｓ９ドメインが選択され、こうしたＣａｓ９ドメインでは、当該Ｃａｓ９ドメインとＤＮＡの糖－リン酸骨格との間に生じる静電相互作用が野生型Ｃａｓ９ドメインと比較して少ない。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９ドメイン（例えば、野生型Ｃａｓ９ドメイン）は、Ｃａｓ９ドメインとの糖－リン酸骨

格との間の結び付きを低減する１つ以上の変異を含む。忠実度の高いＣａｓ９ドメインは当業者に知られている。例えば、忠実度の高いＣａｓ９ドメインについては、Ｋｌｅｉｎｓｔｉｖｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　５２９，４９０－４９５，２０１６、及びＳｌａｙｍａｋｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　３５１，８４－８８，２０１５に記載されている。

【０２９３】

他の遺伝子編集系に由来するヌクレアーゼも使用され得る。例えば、塩基編集系では、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）（Ｕｒｎｏｖ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｒｅｖ　Ｇｅｎｅｔ．，１１（９）：６３６－４６，２０１０）及び転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）（Ｊｏｕｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｒｅｖ　Ｍｏｌ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．１４（１）：４９－５５，２０１３）が利用され得る。ＤＮＡ結合ヌクレアーゼに関する追加の情報についてはＵＳ２０１８／０３１２８２５Ａ１を参照のこと。

【０２９４】

特定の実施形態では、核酸塩基デアミナーゼ酵素は、シチジンデアミナーゼドメインまたはアデニンデアミナーゼドメインを含む。

【０２９５】

特定の実施形態では、核酸塩基デアミナーゼ酵素としてシチジンデアミナーゼドメインが利用される。特定の実施形態では、核酸塩基デアミナーゼ酵素としてアデニンデアミナーゼドメインが利用される。さらに、特定の実施形態では、グリコシラーゼ阻害剤としてウラシルグリコシラーゼ阻害剤（ＵＧＩ）が利用される。例えば、特定の実施形態では、ｄＣａｓ９またはＣａｓ９ニッカーゼがシチジンデアミナーゼドメインと融合され得る。シチジンデアミナーゼドメインと融合したｄＣａｓ９またはＣａｓ９ニッカーゼは、１つ以上のＵＧＩドメインと融合され得る。複数のＵＧＩドメインを有する塩基エディターによって生成するインデルは少なくあり得、こうした塩基エディターは、より効率的に標的核酸を脱アミノ化する。

【０２９６】

特定の実施形態では、デアミナーゼドメイン（シチジン及び／またはアデニン）は、触媒的に無能化されたヌクレアーゼのＮ末端に融合される。このようにする理由は、シチジンデアミナーゼドメインをＣａｓ９のＮ末端に融合させると、その塩基編集効率が他の配置と比較して改善し得ることによるものである。こうした実施形態では、グリコシラーゼ阻害剤（例えば、ＵＧＩドメイン）は、触媒的に無能化されたヌクレアーゼのＣ末端に融合され得る。複数のグリコシラーゼ阻害剤が使用される場合、各グリコシラーゼ阻害剤は、触媒的に無能化されたヌクレアーゼのＣ末端に融合され得る。

【０２９７】

特定の実施形態では、シチジンデアミナーゼドメインを利用するＣＢＥは、シトシンの環外アミンを脱アミノしてウラシルを生成させることによってグアニン－シトシン塩基対をチミン－アデニン塩基対に変換する。シトシンデアミナーゼ酵素の例としては、ＡＰＯＢＥＣ１、ＡＰＯＢＥＣ３Ａ、ＡＰＯＢＥＣ３Ｇ、ＣＤＡ１、及びＡＩＤが挙げられる。ＡＰＯＢＥＣ１は、特に一本鎖（ｓｓ）ＤＮＡを基質として許容するが、二本鎖（ｄｓ）ＤＮＡに作用する能力は有さない。

【０２９８】

ほとんどの塩基編集系は、天然のＤＮＡ修復機構を無効にするように働くＤＮＡグリコシラーゼ阻害剤も含み、こうした天然のＤＮＡ修復機構は、ＤＮＡグリコシラーゼ阻害剤を含めなければ所期の塩基編集を修復してしまう可能性のあるものである。特定の実施形態では、ＤＮＡグリコシラーゼ阻害剤には、ウラシルグリコシラーゼ阻害剤（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（Ｇｅｎｅ　９９，３１－３７，１９９１）に記載のウラシルＤＮＡグリコシラーゼ阻害剤タンパク質（ＵＧＩ）など）が含まれる。

【０２９９】

塩基エディターの構成要素は、（例えば、直接的な共有結合によって）直接的に融合さ

れるか、またはリンカーを介して融合され得る。例えば、触媒的に無能化されたヌクレアーゼは、リンカーを介してデアミナーゼ酵素及び／またはグリコシラーゼ阻害剤と融合され得る。複数のグリコシラーゼ阻害剤もリンカーを介して融合され得る。当業者なら理解するであろうが、リンカーは、任意のペプチドまたはその一部の連結に使用され得る。

【０３００】

リンカーの例としては、多量体リンカー（例えば、ポリエチレン、ポリエチレングリコール、ポリアミド、ポリエステル）、アミノ酸リンカー、炭素－窒素結合アミドリンカー、環式または非環式、置換または非置換、かつ分岐または非分岐の脂肪族リンカーまたはヘテロ脂肪族リンカー、単量体、二量体、または多量体のアミノアルカン酸リンカー、アミノアルカン酸（例えば、グリシン、エタン酸、アラニン、β－アラニン、３－アミノプロパン酸、４－アミノブタン酸、５－ペンタン酸）リンカー、単量体、二量体、または多量体のアミノヘキサン酸（Ａｈｘ）リンカー、炭素環式部分（例えば、シクロペンタン、シクロヘキサン）リンカー、アリール部分リンカーまたはヘテロアリール部分リンカー、及びフェニル環リンカーが挙げられる。

【０３０１】

リンカーは、ペプチド由来の求核基（例えば、チオール、アミノ）をリンカーに付加することを容易にするための官能化部分も含み得る。任意の求電子基がリンカーの一部として使用され得る。求電子基の例としては、活性化エステル、活性化アミド、マイケルアクセプター、ハロゲン化アルキル、ハロゲン化アリール、ハロゲン化アシル、及びイソチオシアネートが挙げられる。

【０３０２】

特定の実施形態では、リンカーのアミノ酸長範囲は４～１００である。特定の実施形態では、リンカーのアミノ酸数は、４、９、１４、１６、３２、または１００である。

【０３０３】

標的指向化ＤＮＡ結合タンパク質をシチジンデアミナーゼ酵素及びＤＮＡグリコシラーゼ阻害剤（例えば、ＵＧＩ）と連結することによって形成される塩基編集（ＢＥ）系については、多くのものが報告されている。こうした複合体には、例えば、ＢＥ１（［ＡＰＯＢＥＣ１－１６アミノ酸（ａａ）リンカー－Ｓｐ ｄＣａｓ９（Ｄ１０Ａ、Ｈ８４０Ａ）］Ｋｏｍｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，５３３，４２０－４２４，２０１６）、ＢＥ２（［ＡＰＯＢＥＣ１－１６ａａリンカー－Ｓｐ ｄＣａｓ９（Ｄ１０Ａ、Ｈ８４０Ａ）－４ａａリンカー－ＵＧＩ］Ｋｏｍｅｒ ｅｔ ａｌ．，２０１６（前出））、ＢＥ３（［ＡＰＯＢＥＣ１－１６ａａリンカー－Ｓｐ ｎＣａｓ９（Ｄ１０Ａ）－４ａａリンカー－ＵＧＩ］Ｋｏｍｅｒ ｅｔ ａｌ．（前出））、ＨＦ－ＢＥ３（［ＡＰＯＢＥＣ１－１６ａａリンカー－ＨＦ ｎＣａｓ９（Ｄ１０Ａ）－４ａａリンカー－ＵＧＩ］Ｒｅｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｃｏｍｍｕｎ．８，１５７９０，２０１７）、ＢＥ４、ＢＥ４ｍａｘ（［ＡＰＯＢＥＣ１－３２ａａリンカー－Ｓｐ ｎＣａｓ９（Ｄ１０Ａ）－９ａａリンカー－ＵＧＩ－９ａａリンカー－ＵＧＩ］Ｋｏｂｌａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ １０．１０３８／ｎｂｔ．４１７２，２０１８、Ｋｏｍｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉ．Ａｄｖ．，３，ｅａａｏ４７７４，２０１７）、ＢＥ４－ＧＡＭ（［Ｇａｍ－１６ａａリンカー－ＡＰＯＢＥＣ１－３２ａａリンカー－Ｓｐ ｎＣａｓ９（Ｄ１０Ａ）－９ａａリンカー－ＵＧＩ－９ａａリンカー－ＵＧＩ］Ｋｏｍｅｒ ｅｔ ａｌ．，２０１７（前出））、ＹＥ１－ＢＥ３（［ＡＰＯＢＥＣ１（Ｗ９０Ｙ、Ｒ１２６Ｅ）－１６ａａリンカー－Ｓｐ ｎＣａｓ９（Ｄ１０Ａ）－４ａａリンカー－ＵＧＩ］Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．３５，４７５－４８０，２０１７）、ＥＥ－ＢＥ３（［ＡＰＯＢＥＣ１（Ｒ１２６Ｅ、Ｒ１３２Ｅ）－１６ａａリンカー－Ｓｐ ｎＣａｓ９（Ｄ１０Ａ）－４ａａリンカー－ＵＧＩ］Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．，２０１７（前出））、ＹＥ２－ＢＥ３（［ＡＰＯＢＥＣ１（Ｗ９０Ｙ、Ｒ１３２Ｅ）－１６ａａリンカー－Ｓｐ ｎＣａｓ９（Ｄ１０Ａ）－４ａａリンカー－ＵＧＩ］Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．，２０１７（前出））、ＹＥＥ－ＢＥ３（［ＡＰＯＢＥＣ１（Ｗ９０Ｙ、Ｒ１２６Ｅ、Ｒ１３２Ｅ）－１６ａａリンカー－Ｓｐ ｎＣａｓ９（Ｄ１０Ａ）－４ａａリンカー－ＵＧ

Ｉ］Ｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７（前出））、ＶＱＲ－ＢＥ３（［ＡＰＯＢＥＣ１－１６ａａリンカー－ＳｐＶＱＲ　ｎＣａｓ９（Ｄ１０Ａ）－４ａａリンカー－ＵＧＩ］Ｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７（前出））、ＶＲＥＲ－ＢＥ３（［ＡＰＯＢＥＣ１－１６ａａリンカー－Ｓｐ　ＶＲＥＲ　ｎＣａｓ９（Ｄ１０Ａ）－４ａａリンカー－ＵＧＩ］Ｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．３５，４７５－４８０，２０１７）、Ｓａ－ＢＥ３（［ＡＰＯＢＥＣ１－１６ａａリンカー－Ｓａ　ｎＣａｓ９（Ｄ１０Ａ）－４ａａリンカー－ＵＧＩ］Ｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７（前出））、ＳＡ－ＢＥ４（［ＡＰＯＢＥＣ１－３２ａａリンカー－Ｓａ　ｎＣａｓ９（Ｄ１０Ａ）－９ａａリンカー－ＵＧＩ－９ａａリンカー－ＵＧＩ］Ｋｏｍｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７（前出））、ＳａＢＥ４－Ｇａｍ（［Ｇａｍ－１６ａａリンカー－ＡＰＯＢＥＣ１－３２ａａリンカー－Ｓａ　ｎＣａｓ９（Ｄ１０Ａ）－９ａａリンカー－ＵＧＩ－９ａａリンカー－ＵＧＩ］Ｋｏｍｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７（前出））、ＳａＫＫＨ－ＢＥ３（［ＡＰＯＢＥＣ１－１６ａａリンカー－Ｓａ　ＫＫＨ　ｎＣａｓ９（Ｄ１０Ａ）－４ａａリンカー－ＵＧＩ］Ｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７（前出））、Ｃａｓ１２ａ－ＢＥ（［ＡＰＯＢＥＣ１－１６ａａリンカー－ｄＣａｓ１２ａ－１４ａａリンカー－ＵＧＩ］Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．３６，３２４－３２７，２０１８）、Ｔａｒｇｅｔ－ＡＩＤ（［Ｓｐ　ｎＣａｓ９（Ｄ１０Ａ）－１００ａａリンカー－ＣＤＡ１－９ａａリンカー－ＵＧＩ］Ｎｉｓｈｉｄａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，３５３，１０．１１２６／ｓｃｉｅｎｃｅ．ａａｆ８７２９，２０１６）、Ｔａｒｇｅｔ－ＡＩＤ－ＮＧ（［Ｓｐ　ｎＣａｓ９（Ｄ１０Ａ）－ＮＧ－１００ａａリンカー－ＣＤＡ１－９ａａリンカー－ＵＧＩ］Ｎｉｓｈｉｍａｓｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，３６１（６４０８）：１２５９－１２６２，２０１８）、ｘＢＥ３（［ＡＰＯＢＥＣ１－１６ａａリンカー－ｘＣａｓ９（Ｄ１０Ａ）－４ａａリンカー－ＵＧＩ］Ｈｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，５５６，５７－６３，２０１８）、ｅＡ３Ａ－ＢＥ３（［ＡＰＯＢＥＣ３Ａ（Ｎ３７Ｇ）－１６ａａリンカー－Ｓｐ　ｎＣａｓ９（Ｄ１０Ａ）－４ａａリンカー－ＵＧＩ］Ｇｅｒｋｈｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，１０．１０３８／ｎｂｔ．４１９９，２０１８）、Ａ３Ａ－ＢＥ３（［ｈＡＰＯＢＥＣ３Ａ－１６ａａリンカー－Ｓｐ　ｎＣａｓ９（Ｄ１０Ａ）－４ａａリンカー－ＵＧＩ］Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１０．１０３８／ｎｂｔ．４１９８、２０１８）、及びＢＥ－ＰＬＵＳ（［１０Ｘ　ＧＣＮ４－Ｓｐ　ｎＣａｓ９（Ｄ１０Ａ）／ＳｃＦｖ－ｒＡＰＯＢＥＣ１－ＵＧＩ］Ｊｉａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ．Ｒｅｓ，１０．１０３８／ｓ４１４２２－０１８－００５２－４，２０１８）が含まれる。アデニンデアミナーゼ塩基エディターを含めて、ＢＥ複合体の追加の例については、Ｒｅｅｓ　＆　Ｌｉｕ　Ｎａｔ．Ｒｅｖ　Ｇｅｎｅｔ．１９（１２）：７７０－７８８，２０１８を参照のこと。

【０３０４】

塩基エディターに関する追加の情報については、ＵＳ２０１８／０３１２８２５Ａ１、ＷＯ２０１８／１６５６２９Ａ、Ｕｒｎｏｖ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｒｅｖ　Ｇｅｎｅｔ．１１（９）：６３６－４６，２０１０、Ｊｏｕｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｒｅｖ　Ｍｏｌ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．１４（１）：４９－５５，２０１３、Ｃｈａｒｐｅｎｔｉｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ．；４９５（７４３９）：５０－１，２０１３、Ｓｅｏ　＆　Ｋｉｍ，Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，２４，１４９３－１４９５，２０１８、及びＲｅｅｓ　＆　Ｌｉｕ，Ｎａｔｕｒｅ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，１９，７７０－７８，２０１８を参照のこと。これらの文献はそれぞれ、その全体及び特に塩基エディター関する部分が参照によって本明細書に組み込まれる。本開示のさまざまな実施形態において使用され得るある特定の塩基エディターコンストラクトについては、Ｚａｆｒａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，３６（９）：８８８－８９３，２０１８、及びＫｏｂｌａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　３６（９）：８４３－８４６，２０１８に記載されており、これらの文献はそれぞれ、その全体及び特に塩基エディターコンストラクトに関する部分がその全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【０３０５】
いくつかの実施形態では、塩基エディター系は、γ－グロビンをコードする核酸配列を改変するように操作され、この改変操作の結果、例えば、γ－グロビンの発現が増加する。主要な胎児型形態のヘモグロビン（ヘモグロビンＦ（ＨｂＦ））は、γ－グロビンポリペプチドがα－グロビンポリペプチドと対になることによって形成される。ヒト胎児型γ－グロビン遺伝子（ＨＢＧ１及びＨＢＧ２（進化的重複によって生じた２つの高度に相同的な遺伝子））は、通常、出生時前後にサイレンシングされる一方で、成体型β－グロビン遺伝子（ＨＢＢ及びＨＢＤ）の発現は増加する。生涯にわたって胎児型γ－グロビンを持続的に発現させるまたはそれを可能にする変異が存在すれば、β－グロビン欠損の表現型が軽快し得る。したがって、胎児型γ－グロビン遺伝子を再活性化させることが治療的に有益であり得、特に、β－グロビン欠損対象において有益であり得る。γ－グロビンの発現を増加させる変異については、さまざまなものが当該技術分野で知られているか、または本明細書に開示される（例えば、Ｗｉｅｎｅｒｔ　Ｔｒｅｎｄｓ　ｉｎ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　３４（１２）：９２７－９４０，２０１８を参照のこと。当該文献は、その全体及びγ－グロビンの発現を増加させる変異に関する部分が参照によって本明細書に組み込まれる）。ある特定のそのような変異は、ＨＢＧ１プロモーター中またはＨＢＧ２プロモーター中に見られる。

【０３０６】
いくつかの実施形態では、ベクターまたはゲノムは塩基編集系を含み、このベクターまたはゲノム中では、ペイロードが組み込みエレメントを含み、ペイロード中には塩基編集系の構成要素も少なくとも１つ存在するが、そうした構成要素は組み込みエレメントの外側に存在する（例えば、トランスポゾン逆方向反復配列と隣接する転位性組み込みエレメントを含むペイロード断片の外側に存在するか、または相同組み込みのためのホモロジーアームを含むペイロード断片の外側に存在する）。ペイロードが転位性組み込みエレメントを含むある特定の実施形態では、転位性組み込みエレメントがトランスポゾン逆方向反復配列と隣接する場合、塩基編集系の塩基編集酵素及び／または１つ以上のｇＲＮＡのうちの１つ以上は、転位性組み込みエレメントの外側の位置でペイロード中に存在する（すなわち、転位性組み込みエレメント中には存在しない）（すなわち、トランスポゾン逆方向反復配列と隣接する核酸配列中には存在しない）。ペイロードが転位性組み込みエレメントを含むある特定の実施形態では、転位性組み込みエレメントがホモロジーアームと隣接する場合、塩基編集系の塩基編集酵素及び／または１つ以上のｇＲＮＡのうちの１つ以上は、組み込みエレメントの外側の位置でペイロード中に存在する（すなわち、組み込みエレメント中には存在しない）（すなわち、ホモロジーアームと隣接する核酸配列中には存在しない）。そのような系では、塩基編集系の発現及び／または活性は、転位性組み込みエレメントが転位するとベクターが破壊され、転位性組み込みエレメントの外側に位置する塩基編集系構成要素の１つ以上の発現が減少または終止し得るという点において一過性である。塩基編集系を含むそのようなベクターは、「自己不活型」塩基編集系または「自己不活型」ベクターと称されることがあり得、これは、組み込みエレメントが（例えば、転位または相同組換えによって）組み込まれると塩基編集系の発現及び／または活性が不活化し得ることによるものである。さまざまな実施形態において、自己不活型塩基編集系は、統合ペイロード中に存在する。

【０３０７】
自己不活型塩基編集系ペイロードをアデノウイルスベクター（例えば、ＨＤＡｄアデノウイルスベクター）に含めることで、他の塩基編集系ペイロード（例えば、塩基編集系が組み込みエレメント内に完全に含まれるもの、または塩基編集系は宿主細胞ゲノムに組み込まれないが、その発現がベクターの破壊によって不活化されないもの）と比較して、遺伝子治療（例えば、インビボ遺伝子治療）における切断頻度が上昇し、及び／または形質導入及び／または編集された標的細胞の生存が長期化し得る（例えば、形質導入されたＨＳＰＣの生存が長期化する）ことを本開示は含む。塩基編集系が自己不活化すると、塩基エディター酵素及び／またはｇＲＮＡの発現が短縮され、編集された細胞の生存が長期化

し、長期的再増殖細胞のパーセントが増加する。例えば、ＨＢＧ１及び／またはＨＢＧ２を再活性化するための自己不活型塩基編集系を含むと共に、γ－グロビンを発現させるための核酸配列をさらに含む統合ペイロードを含むＨＤＡｄベクターを使用する遺伝子治療では、非自己不活型塩基編集系またはγ－グロビンを発現させるための核酸配列単独のいずれかを含むＨＤＡｄベクターを使用した場合と比較して、形質導入後にＲＢＣ中のγ－グロビン量が顕著に増加し得る。

【０３０８】

本明細書では、組み込みエレメントを転位させるためのトランスポゼースをコードするサポートベクターまたはサポートゲノムと組み合わせて、自己不活型塩基編集系を含むドナーベクターを（例えば、ヒト対象に）投与する方法がさらに提供される。本開示は、さまざまな場合において、サポートベクターを投与する前にドナーベクターを投与することを含み、ドナーベクターの投与とサポートベクターの投与との間の時間は、塩基編集系の活性の持続時間及び／またはレベルを制御する手段となる。例えば、さまざまな実施形態において、ドナーベクターの投与から一定時間後にサポートベクターを（例えば、対象に）投与することができ、この一定時間は、少なくとも１時間、少なくとも２時間、少なくとも３時間、少なくとも４時間、少なくとも５時間、少なくとも６時間、少なくとも８時間、少なくとも１０時間、少なくとも１２時間、少なくとも１４時間、少なくとも１６時間、少なくとも１８時間、少なくとも２０時間、少なくとも２２時間、少なくとも２４時間、少なくとも３０時間、少なくとも３６時間、少なくとも４２時間、少なくとも４８時間、少なくとも５４時間、少なくとも６０時間、少なくとも６６時間、もしくは少なくとも７２時間、少なくとも９６時間、または少なくとも１２８時間である（例えば、この一定時間は、その下限が１時間、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、８時間、１０時間、１２時間、１４時間、１６時間、１８時間、２０時間、２２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、または７２時間であり、その上限が６時間、８時間、１０時間、１２時間、１４時間、１６時間、１８時間、２０時間、２２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、９６時間、または１２８時間である）。

【０３０９】

いくつかの実施形態では、塩基編集系構成要素（例えば、塩基編集酵素）をコードする核酸配列は、塩基エディターの発現及び／または活性をマイクロＲＮＡで制御するためのマイクロＲＮＡ標的部位を含むように操作される。

【０３１０】

本開示では、さらに、ＡＢＥ系を利用する上での問題が認識及び解決された。塩基エディターＴａｄＡ配列及びＴａｄＡ＊配列の中に反復性及び／または配列類似性が存在すると、コードされる塩基編集系（例えば、インビボ遺伝子治療のためのもの）の発現及び／または活性についてそのようなベクターの有効性を低下させる相同組換えが生じ得るという認識を本開示は含む。本発明者らの知る限りでは、本開示は、この問題（例えば、インビボ遺伝子治療において観察されるもの）を初めて認識したものとなる。この問題に対処するために、ＴａｄＡ及び／またはＴａｄＡ＊を、類似配列間の相同性が低下するように改変した。さまざまな実施形態において、ＴａｄＡをコードする核酸配列及びＴａｄＡ＊をコードする核酸配列の少なくとも５つの対応コドンが、異なるヌクレオチド配列を有するように操作され、任意選択で、この操作は、ＴａｄＡまたはＴａｄＡ＊のヌクレオチド配列中の最初のコドン配列を、関連系（例えば、ヒト）におけるコドン使用頻度に沿って、同じアミノ酸をコードする異なるコドン配列で置き換えることを含む。さまざまな実施形態において、ＴａｄＡ及びＴａｄＡ＊それぞれをコードする核酸配列の間で差異が生じるように少なくとも５つ、少なくとも１０個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、少なくとも３０個、少なくとも３５個、少なくとも４０個、少なくとも４５個、または少なくとも５０個のコドンが操作される。図１３２Ｃには、操作された配列の例が示される。

【０３１１】

さまざまな実施形態において、ＡＢＥは、下記のＴａｄＡ配列及びＴａｄＡ＊配列と比較して少なくとも１つの配列改変を含むＴａｄＡ配列及びＴａｄＡ＊配列を含み、このＴａｄＡ配列及びＴａｄＡ＊配列は、例えば、ＡＢＥをコードする配列において、直接的に融合されるか、またはリンカーによって分離され得る。さまざまな実施形態において、ＴａｄＡ配列は、以下のＴａｄＡ配列との同一性％が少なくとも８０％（例えば、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％）である配列であり、本明細書で提供されるＴａｄＡ改変のいずれかまたはすべてを含み得る。さまざまな実施形態において、ＴａｄＡ＊配列は、以下のＴａｄＡ＊配列との同一性％が少なくとも８０％（例えば、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％）である配列であり、本明細書で提供されるＴａｄＡ＊改変のいずれかまたはすべてを含み得る。さまざまな実施形態において、本開示のＴａｄＡ配列及び／またはＴａｄＡ＊配列は、リンカー（アミノ酸数３２のリンカーなど）を含むことも含まないこともあり得る。さまざまな配列及び実施形態（以下に提供されるＴａｄＡ配列及び／またはＴａｄＡ＊配列を含むものを含む）において、配列は、アミノ酸数３２のリンカーをコードするヌクレオチド数９６の３’配列を含み得る。したがって、さまざまな実施形態において、ＴａｄＡ配列は、以下のＴａｄＡ配列のヌクレオチド１～４９８（９６個の３’ヌクレオチドを除く）との同一性％が少なくとも８０％（例えば、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％）である配列であり、本明細書で提供される対応ＴａｄＡ改変のいずれかまたはすべてを含み得る。したがって、同様に、さまざまな実施形態において、ＴａｄＡ＊配列は、以下のＴａｄＡ＊配列のヌクレオチド１～４９８（９６個の３’ヌクレオチドを除く）との同一性％が少なくとも８０％（例えば、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％）である配列であり、本明細書で提供される対応ＴａｄＡ＊改変のいずれかまたはすべてを含み得る。

【０３１２】

さまざまな実施形態において、ＡＢＥのＴａｄＡ及び／またはＴａｄＡ＊の配列は、ＴａｄＡとＴａｄＡ＊との間（またはそれらのアライメント部分（例えば、ヌクレオチド１～５７９もしくはヌクレオチド１～４９８を含む）の間）の同一性パーセントが８０％未満（例えば、８０％未満、７５％未満、７０％未満、６５％未満、６０％未満、５５％未満、５０％未満、４５％未満、もしくは４０％未満、または６０％～８０％、６５％～８０％、７０％、～８０％、７５％～８０％、６０％～７５％、６５％～７５％、７０％～７５％、６０％～７０％、もしくは６５％～７０％である同一性パーセント）に低下するように操作される。他者によって生産されたｐＣＭＶ－ＡＢＥｍａｘプラスミド（Ａｄｄｇｅｎｅ　＃１１２０９５）では、２つの５９４ｂｐ　ＴａｄＡ＋３２ａａ反復配列の間に１０９ｂｐのミスマッチが存在し、それらの反復配列の間の同一性は８１．６％である。本開示のさまざまな実施形態におけるＴａｄＡ改変部位及び／またはＴａｄＡ＊改変部位には、以下の配列中で下線付きで示されるもの及び下記の表に記載のものが含まれる。さまざまな実施形態において、ＴａｄＡ＊配列は、ＴａｄＡ＊改変表（表１１）に示されるものに対応する改変を１つ以上またはすべて含む。さまざまな実施形態において、ＴａｄＡ配列は、ＴａｄＡ改変表（表１０）に示される改変を１つ以上またはすべて含み、ＴａｄＡ＊配列は、ＴａｄＡ＊改変表（表１１）に示されるものに対応する改変を１つ以上またはすべて含む。ある特定の実施形態では、ＴａｄＡ配列は、ＴａｄＡ改変表（表１０（配列番号２８０に関する））に示されるものに対応する改変を０、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個、２０個、２１個、２２個、２３個、２４個、または２５個（例えば、１～５つ、５～１０個、５～２０個、５～２５個、１０～２０個、１

０～２５個、１５～２０個、１５～２５個、または２０～２５個）含み、ＴａｄＡ＊配列は、ＴａｄＡ＊改変表（表１１（配列番号２８１に関する））に示されるものに対応する改変を０、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、または１６個（例えば、１～５つ、５～１０個、５～１６個、または１０～１６個）含む。

【０３１３】

当業者なら理解するであろうが、同一性が低減されたＴａｄＡ配列及びＴａｄＡ＊配列は遺伝子操作（限定されないが、インビボでの遺伝子操作及びエクスビボでの遺伝子操作を含む）の分野で広く有用である。同一性が低減されるように操作されたＴａｄＡ配列及びＴａｄＡ＊配列は、（例えば、（例えば、インビボ遺伝子治療のための）アデノウイルスベクターまたはアデノウイルスゲノム（Ａｄ３５ドナーベクター、Ａｄ３５＋＋ドナーベクター、ＨＤＡｄ３５ドナーベクター、もしくはＨＤＡｄ３５＋＋ドナーベクターまたはＡｄ３５ドナーゲノム、Ａｄ３５＋＋ドナーゲノム、ＨＤＡｄ３５ドナーゲノム、もしくはＨＤＡｄ３５＋＋ドナーゲノムなど））中のペイロード（例えば、本開示のペイロード）にも含められ得る。

【０３１４】

【表１０】

表１０：ＴａｄＡ改変表

| 位置 | ヌクレオチドの変更 |
|---|---|
| 15 | T > C |
| 57 | G > A |
| 63 | A > C |
| 69 | T > C |
| 87 | G > C |
| 112 | A > C |
| 114 | A > C |
| 126 | G > A |
| 147 | C > A |
| 198 | C > A |
| 216 | C > T |
| 289 | A > C |
| 318 | G > A |
| 333 | C > A |
| 343 | T > A |
| 344 | C > G |
| 369 | C > A |
| 402 | A > C |
| 451 | C > A |
| 507 | A > C |
| 547 | A > T |
| 548 | G > C |
| 568 | A > T |
| 569 | G > C |
| 570 | C > T |

【表１１】

表１１：ＴａｄＡ*改変表

| 位置 | ヌクレオチドの変更 |
|---|---|
| 321 | C > T |
| 330 | C > T |
| 345 | C > T |
| 382 | C > A |
| 384 | C > A |
| 465 | C > T |
| 498 | C > T |
| 499 | T > A |
| 500 | C > G |
| 501 | C > T |
| 504 | A > C |
| 516 | A > G |
| 537 | A > C |
| 592 | T > A |
| 593 | C > G |
| 594 | A > C |

参照配列：

ＴａｄＡ（配列番号２８０）

ＴａｄＡ*（配列番号２８１）

【０３１５】

少なくとも、ＴａｄＡヌクレオチド配列とＴａｄＡ＊ヌクレオチド配列との間の同一性を低下させることが、いずれかの特定の改変は不要であり、むしろＴａｄＡ配列とＴａｄＡ＊配列との間の同一性を全体的に変化させることが必要であると特定された問題に対する解決となる限りにおいては、選択する特定の改変を考慮することを抜きにして、ＴａｄＡ配列及びＴａｄＡ＊配列を含むＡＢＥの中にＴａｄＡ改変表及び／またはＴａｄＡ＊改変表のものに対応する改変がいくつ存在するかが重要であり得ることを当業者ならさらに理解するであろう。したがって、本開示は改変の例を提供するが、いずれかの特定の改変を含めることまたは除外することは、本明細書で提示される解決に対して決定的に重要な意味を有することではない。それ故に、本開示は、ＴａｄＡ改変表及びＴａｄＡ＊改変表に示される改変を１つ以上含み、かつＴａｄＡとＴａｄＡ＊との間（またはそれらのアライメント部分（例えば、ヌクレオチド１～５７９を含む）の間）の同一性パーセントが８０％未満（例えば、８０％未満、７５％未満、７０％未満、６５％未満、６０％未満、５５％未満、５０％未満、４５％未満、または４０％未満）であるＴａｄＡ及びＴａｄＡ＊の同一性低減配列を含む。

【０３１６】

誤解を避けるために記載すると、提供される配列は、以下のＴａｄＡ配列及びＴａｄＡ＊配列の対応ヌクレオチド位置での比較によって、本明細書で提供されるＴａｄＡ配列改変またはＴａｄＡ＊配列改変のいずれかを含むものまたは含まないものとして特定され得る。したがって、本明細書で提供されるＴａｄＡ配列改変またはＴａｄＡ＊配列改変のいずれかの存在有無の決定は、いずれかの提供される配列の起源または歴史に依存するもの

ではなく、単に配列自体から行われ得るものである。

【０３１７】

本開示のＡＢＥ系ならびにそのＴａｄＡ配列及びＴａｄＡ＊配列は、ここに示される状況または本明細書に示される任意の他の状況（例えば、限定されないが、特定のベクター、血清型、もしくは他の状況での使用）に限定されない一般的な有用性に貢献するものとなることを当業者なら理解するであろう。実際、本開示の配列は、塩基編集要素をコードするまたは含み得る任意の実験系においてインビボ、インビトロ、またはエクスビボで使用され得る。こうした配列は、さまざまな分子生物学用途におけるツールとして有用である。

【０３１８】

Ｉ（Ｃ）（ｉ）（ｃ）．低分子ＲＮＡペイロード発現産物

低分子ＲＮＡは、遺伝子発現の制御において役割を果たす短い非コードＲＮＡ分子である。特定の実施形態では、低分子ＲＮＡのヌクレオチド長は２００未満である。特定の実施形態では、低分子ＲＮＡのヌクレオチド長は１００未満である。特定の実施形態では、低分子ＲＮＡのヌクレオチド長は５０未満、４５未満、４０未満、３５未満、３０未満、２５未満、または２０未満である。特定の実施形態では、低分子ＲＮＡのヌクレオチド長は２０未満である。さまざまな実施形態において、低分子ＲＮＡのヌクレオチド長は、その下限が５、１０、１５、２０、２５、または３０であり、その上限が２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、７５、または１００である。低分子ＲＮＡには、限定されないが、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、Ｐｉｗｉ相互作用ＲＮＡ（ｐｉＲＮＡ）、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、核小体低分子ＲＮＡ（ｓｎｏＲＮＡ）、ｔＲＮＡ由来低分子ＲＮＡ（ｔｓＲＮＡ）、低分子ｒＤＮＡ由来ＲＮＡ（ｓｒＲＮＡ）、及び核内低分子ＲＮＡが含まれる。低分子ＲＮＡのクラスは、その発見が続いており、追加されている。

【０３１９】

特定の実施形態では、標的ｍＲＮＡと相同的な干渉ＲＮＡ分子（または干渉ＲＮＡは、標的ｍＲＮＡとハイブリダイゼーションし得る）は、標的ｍＲＮＡ分子の分解または標的ｍＲＮＡの翻訳の減少を引き起こし得るものであり、このプロセスは、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）と称される（Ｃａｒｔｈｅｗ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１３：２４４－２４８，２００１）。ＲＮＡｉは、細胞中で自然に生じて外来ＲＮＡ（例えば、ウイルスＲＮＡ）を除去するものである。場合によっては、天然のＲＮＡｉは、遊離の二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）から切断された断片が他の類似ＲＮＡ配列に対する分解機構を生じさせることで進行する。あるいは、ＲＮＡｉは、例えば、標的遺伝子の発現をサイレンシングするように作られ得る。ＲＮＡｉ分子の例としては、低分子ヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ、短鎖ヘアピンＲＮＡとも称される）及び低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）が挙げられる。

【０３２０】

本開示を限定するものではなく、理論によって拘束されることもないが、天然では及び／またはいくつかの実施形態では、ＲＮＡ干渉は、典型的には、２ステッププロセスである。第１のステップ（開始ステップ）では、入力ｄｓＲＮＡが消化されてヌクレオチド（ｎｔ）数２１～２３のｓｉＲＮＡに変換される。この消化は、高い確実性でダイサー（ｄｓＲＮＡ特異的リボヌクレアーゼのリボヌクレアーゼ（ＲＮａｓｅ）ＩＩＩファミリーのメンバー）の作用によって生じ、この作用によってｄｓＲＮＡ（直接的に導入されたもの、または導入遺伝子もしくはウイルスを介して導入されたもの）がＡＴＰ依存的様式でプロセシング（切断）を受ける。切断事象が連続的に生じることでＲＮＡが分解されて１９～２１塩基対（ｂｐ）の二本鎖（ｓｉＲＮＡ）となり、それぞれの３’末端にはヌクレオチド数２のオーバーハングが生じる（Ｈｕｔｖａｇｎｅｒ　＆　Ｚａｍｏｒｅ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｇｅｎｅｔ．Ｄｅｖ．１２：２２５－２３２，２００２、Ｂｅｒｎｓｔｅｉｎ，Ｎａｔｕｒｅ　４０９：３６３－３６６，２００１）。

【０３２１】

第２のステップ（エフェクターステップ）では、ｓｉＲＮＡ二本鎖がヌクレアーゼ複合

体に結合してＲＮＡ誘導型サイレンシング複合体（ＲＩＳＣ）を形成する。ＲＩＳＣが活性化するには、ｓｉＲＮＡ二本鎖がＡＴＰ依存的に解離することが必要である。その後、活性ＲＩＳＣは、塩基対形成相互作用によって相同的な転写産物を標的とし、典型的には、そうしたｍＲＮＡをｓｉＲＮＡの３’末端から切断してヌクレオチド数１２の断片へと変換する（Ｈｕｔｖａｇｎｅｒ　＆　Ｚａｍｏｒｅ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｇｅｎｅｔ．Ｄｅｖ．１２：２２５－２３２，２００２、Ｈａｍｍｏｎｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｇｅｎ．２：１１０－１１９，２００１、Ｓｈａｒｐ，Ｇｅｎｅｓ．Ｄｅｖ．１５：４８５－４９０，２００１）。各ＲＩＳＣは単一のｓｉＲＮＡ及びＲＮａｓｅを含むことが研究によって示されている（Ｈｕｔｖａｇｎｅｒ　＆　Ｚａｍｏｒｅ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｇｅｎｅｔ．Ｄｅｖ．１２：２２５－２３２，２００２）。

【０３２２】

ＲＮＡｉの効力は著しいため、ＲＮＡｉ経路内には増幅ステップが存在することが示唆されている。増幅は、入力ｄｓＲＮＡがコピーされるか（ｓｉＲＮＡの生成量が増えることになる）または形成されるｓｉＲＮＡが複製されることによって生じ得る。代替的または付加的に、増幅は、ＲＩＳＣの複数回のターンオーバー事象による影響を受け得る（Ｈｕｔｖａｇｎｅｒ　＆　Ｚａｍｏｒｅ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｇｅｎｅｔ．Ｄｅｖ．１２：２２５－２３２，２００２、Ｈａｍｍｏｎｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｇｅｎ．２：１１０－１１９，２００１、Ｓｈａｒｐ，Ｇｅｎｅｓ．Ｄｅｖ．１５：４８５－４９０，２００１）。ＲＮＡｉについては、Ｔｕｓｃｈｌ（Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２：２３９－２４５，２００１）、Ｃｕｌｌｅｎ（Ｎａｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３：５９７－５９９，２００２）、及びＢｒａｎｔｌ（Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔ．１５７５：１５－２５，２００２）にも記載されている。

【０３２３】

いくつかの実施形態では、本開示と関連する使用に適したＲＮＡｉ分子の合成は、下記のように実施され得る。第１に、標的導入遺伝子の開始コドンから下流に向かってｍＲＮＡ配列の解析が行われ得る。各ＡＡ及びその３’側に隣接する１９個のヌクレオチドが潜在的なｓｉＲＮＡ標的部位として記録され得る。特定の実施形態では、ｓｉＲＮＡ標的部位は、オープンリーディングフレームから選択される可能性があり、これは、非翻訳領域（ＵＴＲ）が制御タンパク質結合部位をより多く含むことによるものである。ＵＴＲ結合タンパク質及び／または翻訳開始複合体は、ｓｉＲＮＡエンドヌクレアーゼ複合体の結合を妨害し得る（Ｔｕｓｃｈｌ，Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２：２３９－２４５，２００１）。しかしながら、グリセルアルデヒド　３－リン酸脱水素酵素（ＧＡＰＤＨ）を対象として実証されたように（５’ＵＴＲに指向化されたｓｉＲＮＡは、細胞ＧＡＰＤＨ　ｍＲＮＡを９０％低減し、タンパク質レベルを完全に消失させた）、非翻訳領域に指向化されたｓｉＲＮＡもまた有効であり得ることが理解されよう。第２に、任意の配列アライメントソフトウェア（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃｅｎｔｅｒ　ｆｏｒ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ（ＮＣＢＩ）サーバーから利用可能なＢａｓｉｃ　Ｌｏｃａｌ　Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ　Ｓｅａｒｃｈ　Ｔｏｏｌ（ＢＬＡＳＴ）ソフトウェアなど）を使用して、潜在的な標的部位と適切なゲノムデータベースとの比較が行われ得る。他のコード配列との相同性が著しい推定標的部位は除外され得る。

【０３２４】

適格な標的配列がｓｉＲＮＡ合成のテンプレートとして選択され得る。選択される配列に含まれる配列はＧ／Ｃ含量が低いものであり得、この理由は、こうした配列によって媒介される遺伝子サイレンシングの有効性が、Ｇ／Ｃ含量が５５％を超えるものと比較して高いことが示されていることによるものである。いくつかの標的部位は、評価のために標的遺伝子の長さに沿って選択され得る。選択されるｓｉＲＮＡの評価を良好なものにするために、陰性対照が使用され得る。陰性対照ｓｉＲＮＡは、ｓｉＲＮＡのものと同じヌクレオチド組成を有するが、ゲノムとの著しい相同性は有し得ない。したがって、ｓｉＲＮＡのスクランブルヌクレオチド配列が使用され得るが、そうしたヌクレオチド配列が他の遺伝子との著しい相同性を全く示さないことが条件である。

【０３２５】
センス鎖は、選択部分の配列に基づいて設計され得る。アンチセンス鎖は、通常通り、センス鎖と同じ長さを有し、相補ヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、これらの鎖は完全に相補的であり、アライメントまたはアニーリング時には平滑末端を有する。他の実施形態では、これらの鎖は、ヌクレオチド数が１、２、または３のオーバーハングが生じるようにアライメントされるか、またはアニーリングし、すなわち、センス鎖の３’末端がアンチセンス鎖の５’末端よりもさらに１ヌクレオチド分、２ヌクレオチド分、もしくは３ヌクレオチド分延長され、及び／またはアンチセンス鎖の３’末端がセンス鎖の５’末端よりもさらに１ヌクレオチド分、２ヌクレオチド分、もしくは３ヌクレオチド分延長される。オーバーハングは、標的遺伝子配列（またはその相補配列）に対応するヌクレオチドを含み得る。あるいは、オーバーハングは、デオキシリボヌクレオチド（例えば、デオキシチミン（ｄＴ））またはヌクレオチド類似体または他の適切な非ヌクレオチド物質を含み得る。

【０３２６】
アンチセンス鎖がＲＩＳＣに入ること（ならびにそれによる標的の切断及びサイレンシングの効率の向上または改善）を促進するために、センス鎖の５’末端とアンチセンス鎖の３’末端との間の塩基対強度が変更（例えば、減弱化または低減）され得る。特定の実施形態では、塩基対強度は低下しており、この低下は、第１の鎖またはアンチセンス鎖の５’末端と第２の鎖またはセンス鎖の３’末端との間のＧ：Ｃ塩基対が第１の鎖またはアンチセンス鎖の３’末端と第２の鎖またはセンス鎖の５’末端との間のＧ：Ｃ塩基対と比較して少ないことに起因する。特定の実施形態では、塩基対強度は低下しており、この低下は、第１の鎖またはアンチセンス鎖の５’末端と第２の鎖またはセンス鎖の３’末端との間にミスマッチ塩基対が少なくとも１つ存在することに起因する。好ましくは、こうしたミスマッチ塩基対は、Ｇ：Ａ、Ｃ：Ａ、Ｃ：Ｕ、Ｇ：Ｇ、Ａ：Ａ、Ｃ：Ｃ、及びＵ：Ｕを含む群から選択される。別の実施形態では、塩基対強度は低下しており、この低下は、第１の鎖またはアンチセンス鎖の５’末端と第２の鎖またはセンス鎖の３’末端との間にゆらぎ塩基対（例えば、Ｇ：Ｕ）が少なくとも１つ存在することに起因する。別の実施形態では、塩基対強度は低下しており、この低下は、低頻度ヌクレオチド（例えば、イノシン（Ｉ））を含む塩基対が少なくとも１つ存在することに起因する。特定の実施形態では、塩基対は、Ｉ：Ａ、Ｉ：Ｕ、及びＩ：Ｃを含む群から選択される。さらに別の実施形態では、塩基対強度は低下しており、この低下は、修飾ヌクレオチドを含む塩基対が少なくとも１つ存在することに起因する。特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、例えば、２－アミノ－Ｇ、２－アミノ－Ａ、２，６－ジアミノ－Ｇ、及び２，６－ジアミノ－Ａから選択される。

【０３２７】
ｓｈＲＮＡは、ヘアピンループ構造を有する一本鎖ポリヌクレオチドである。この一本鎖ポリヌクレオチドは、二本鎖領域中の一方の鎖の３’末端と二本鎖領域中のもう一方の５’末端とを連結するループセグメントを有する。二本鎖領域は、標的配列（導入遺伝子をコードするポリヌクレオチドなど）にハイブリダイゼーションすることが可能な第１の配列と、第１の配列に相補的な第２の配列と、から形成され、これによって、第１の配列及び第２の配列が二本鎖領域を形成し、これらの配列の末端が連結配列によって連結されることでヘアピンループ構造が形成される。第１の配列は、導入遺伝子をコードするポリヌクレオチドのいずれかの部分にハイブリダイゼーションすることが可能であり得る。ｓｈＲＮＡの二本鎖ステムドメインは、制限エンドヌクレアーゼ部位を含み得る。

【０３２８】
ｓｈＲＮＡの転写は、ポリメラーゼＩＩＩ（ＰｏｌＩＩＩ）プロモーターにて開始され、４～５チミン転写終結部位の位置２で終結すると考えられている。ｓｈＲＮＡは、発現すると、３’ＵＵ－オーバーハングを有するステムループ構造へと折り畳まれると考えられており、その後、こうしたｓｈＲＮＡの末端はプロセシングを受け、ｓｈＲＮＡがヌクレオチド数２１～２３のｓｉＲＮＡ様分子へと変換される（Ｂｒｕｍｍｅｌｋａｍｐ　ｅ

ｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ．２９６（５５６７）：５５０－５５３，２００２、Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０（５）：５００－５０５，２００２、Ｍｉｙａｇｉｓｈｉ ＆ Ｔａｉｒａ，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０（５）：４９７－５００，２００２、Ｐａｄｄｉｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅｓ ＆ Ｄｅｖ．１６（８）：９４８－９５８，２００２、Ｐａｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０（５）：５０５－５０８，２００２、Ｓｕｉ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．９９（６）：５５１５－５５２０，２００２、Ｙｕ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．９９（９）：６０４７－６０５２，２００２）。

【０３２９】

ｓｈＲＮＡのステムループ構造は、任意選択のヌクレオチドオーバーハング（２ｂｐのオーバーハング（例えば、３’ＵＵオーバーハング）など）を有し得る。バリエーションは存在し得るが、ステムの範囲は、典型的には、１５～４９ｂｐ、１５～３５ｂｐ、１９～３５ｂｐ、２１～３１ｂｐ、または２１～２９ｂｐであり、ループの範囲は、４～３０ｂｐ（例えば、４～２３ｂｐ）であり得る。特定の実施形態では、ｓｈＲＮＡ配列は、４５～６５ｂｐ、５０～６０ｂｐ、または５１ｂｐ、５２ｂｐ、５３ｂｐ、５４ｂｐ、５５ｂｐ、５６ｂｐ、５７ｂｐ、５８ｂｐ、もしくは５９ｂｐを含む。特定の実施形態では、ｓｈＲＮＡ配列は、５２ｂｐまたは５５ｂｐを含む。特定の実施形態では、ｓｉＲＮＡｓは、１５～２５ｂｐを有する。特定の実施形態は、ｓｉＲＮＡは、１６ｂｐ、１７ｂｐ、１８ｂｐ、１９ｂｐ、２０ｂｐ、２１ｂｐ、２２ｂｐ、２３ｂｐ、または２４ｂｐを有する。特定の実施形態では、ｓｉＲＮＡは、１９ｂｐを有する。一方で、ＲＮＡｉを媒介する上で１６ヌクレオチド未満または２４ヌクレオチド超の長さを有するｓｉＲＮＡも機能し得ることを当業者なら理解するであろう。より長いＲＮＡｉ剤は、ある特定の哺乳動物細胞では望ましくない可能性のあるインターフェロンまたはタンパク質キナーゼＲ（ＰＫＲ）応答を誘発することが実証されている。ＲＮＡｉ剤は、ＰＫＲ応答を誘発しないもの（すなわち、長さが十分に短いもの）が好ましい。しかしながら、より長いＲＮＡｉ剤も有用であり得る（例えば、代替手段によってＰＫＲ応答が下方制御または減弱化される状況では有用であり得る）。

【０３３０】

低分子ＲＮＡもまた、遺伝子発現の活性化に使用され得る。

【０３３１】

Ｉ（Ｃ）（ｉ）（ｄ）．統合ペイロード

本開示は、複数の発現産物をコードするペイロードを含むアデノウイルスベクター及びアデノウイルスゲノムを含む。複数の発現産物をコードするペイロードは、統合ペイロードと称され得る。さまざまな実施形態において、統合ペイロードは、第１の発現産物をコードする第１の核酸配列、及び第２の発現産物をコードする第２の核酸配列を含み得る。さまざまな実施形態において、第１の発現産物及び第２の発現産物はそれぞれ、タンパク質（例えば、治療用タンパク質、例えば、置き換え酵素）、結合ドメイン、抗体、ＣＡＲ、ＴＣＲ、ＣＲＩＳＰＲ系、塩基エディター系、低分子ＲＮＡ、及び／または選択可能マーカー（例えば、本明細書に開示のもの）、のいずれかから独立して選択され得る。統合ペイロードの例は、本明細書に開示されている。

【０３３２】

コード配列は、さまざまなプロモーター及び／または本明細書で提供されるもしくはその他の形で当該技術分野で知られる他の制御配列のいずれかと機能可能なように連結されて制御され、及び／または発現し得ることを当業者なら理解するであろう。当業者なら認識するであろうし、本開示にも例示されているが、ベクターにおけるコード配列の制御及び／または発現に利用可能な配列は当該技術分野で知られており、そうした配列には、本明細書で提供されるものが含まれる。さまざまな具体例では、本開示のペイロード中に存在するコード配列は、プロモーター、エンハンサー、終結領域、インスレーター、小型ＬＣＲ、終結シグナル、ポリアデニル化シグナル、スプライシングシグナル、及び同様のも

のから任意選択で選択される１つ以上の制御配列と機能可能なように連結され得る。

【０３３３】

いくつかの実施形態では、統合ペイロードは、ＣＲＩＳＰＲ関連ＲＮＡガイド型エンドヌクレアーゼ及び少なくとも１つのガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）（任意選択で、少なくとも１つのｇＲＮＡは、１つ、２つ、３つ、４つ、または５つのｇＲＮＡを含む）を含むＣＲＩＳＰＲ系の構成要素の１つ以上またはすべてと、ＣＲＩＳＰＲ系の一部ではない任意選択の１つ以上の別のコード配列と、をコードする。例えば、ＣＲＩＳＰＲ系のｇＲＮＡは、ＨＢＧ１プロモーターの核酸配列を標的とするｇＲＮＡ、ＨＢＧ２プロモーターの核酸配列を標的とするｇＲＮＡ、及び／または赤血球エンハンサーｂｃｌ１１ａの核酸配列を標的とするｇＲＮＡ、のうちの１つ以上またはすべてを含み得る。さまざまな実施形態において、（ｉ）ＨＢＧ１プロモーター標的指向化ｇＲＮＡは、ＨＢＧ１プロモーター中のＢＣＬ１１Ａリプレッサータンパク質結合部位を不活化することによって、ＨＢＧ１プロモーターと機能可能なように連結されたγ－グロビンコード配列の発現が増加するように設計され、（ｉｉ）ＨＢＧ２プロモーター標的指向化ｇＲＮＡは、ＨＢＧ２プロモーター中のＢＣＬ１１Ａリプレッサータンパク質結合部位を不活化することによって、ＨＢＧ２プロモーターと機能可能なように連結されたγ－グロビンコード配列の発現が増加するように設計され、及び／または（ｉｉｉ）ｂｃｌ１１ａ標的指向化ｇＲＮＡは、ｂｃｌ１１ａエンハンサーと機能可能なように連結されたγ－グロビンコード配列の発現が増加するように設計される（赤血球ｂｃｌ１１ａエンハンサーが改変及び／または不活化される結果、赤血球細胞におけるＢＣＬ１１Ａリプレッサータンパク質の発現が減少する）。さまざまな実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ系を含む統合ペイロードは、治療用タンパク質をコードする核酸をさらに含み、任意選択で、治療用タンパク質は、γ－グロビン及びβ－グロビンのうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、治療用タンパク質は、β－グロビンプロモーター及び／またはβ－グロビンＬＣＲと機能可能なように連結される。

【０３３４】

いくつかの実施形態では、統合ペイロードは、塩基編集酵素及び少なくとも１つのガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）（任意選択で、少なくとも１つのｇＲＮＡは、１つ、２つ、３つ、４つ、または５つのｇＲＮＡを含む）を含む塩基エディター系の構成要素の１つ以上またはすべてと、塩基エディター系の一部ではない任意選択の１つ以上の別のコード配列と、をコードする。例えば、塩基エディター系のｇＲＮＡは、ＨＢＧ１プロモーターの核酸配列を標的とするｇＲＮＡ、ＨＢＧ２プロモーターの核酸配列を標的とするｇＲＮＡ、及び／または赤血球エンハンサーｂｃｌ１１ａの核酸配列を標的とするｇＲＮＡ、のうちの１つ以上またはすべてを含み得る。さまざまな実施形態において、（ｉ）ＨＢＧ１プロモーター標的指向化ｇＲＮＡは、ＨＢＧ１プロモーター中のＢＣＬ１１Ａリプレッサータンパク質結合部位を不活化することによって、ＨＢＧ１プロモーターと機能可能なように連結されたγ－グロビンコード配列の発現が増加するように設計され、（ｉｉ）ＨＢＧ２プロモーター標的指向化ｇＲＮＡは、ＨＢＧ２プロモーター中のＢＣＬ１１Ａリプレッサータンパク質結合部位を不活化することによって、ＨＢＧ２プロモーターと機能可能なように連結されたγ－グロビンコード配列の発現が増加するように設計され、及び／または（ｉｉｉ）ｂｃｌ１１ａ標的指向化ｇＲＮＡは、ｂｃｌ１１ａエンハンサーと機能可能なように連結されたγ－グロビンコード配列の発現が増加するように設計される（赤血球ｂｃｌ１１ａエンハンサーが改変及び／または不活化される結果、赤血球細胞におけるＢＣＬ１１Ａリプレッサータンパク質の発現が減少する）。さまざまな実施形態において、塩基エディター系を含む統合ペイロードは、治療用タンパク質をコードする核酸をさらに含み、任意選択で、治療用タンパク質は、γ－グロビン及びβ－グロビンのうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、治療用タンパク質は、β－グロビンプロモーター及び／またはβ－グロビンＬＣＲと機能可能なように連結される。

【０３３５】

いくつかの実施形態では、統合ペイロードは、抗体をコードする核酸配列を含む。いく

つかの実施形態では、統合ペイロードは、第１の抗体をコードする第１の核酸配列、及び第２の抗体をコードする第２の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体（例えば、第１の抗体及び／または第２の抗体）はｓｃＦｖである。いくつかの実施形態では、抗体は、免疫グロブリン重鎖及び免疫グロブリン軽鎖を含む抗体である。

【０３３６】

さまざまな実施形態において、統合ペイロードのペイロード核酸配列によってコードされる少なくとも１つの発現産物は、選択可能マーカーである。さまざまな実施形態において、選択可能マーカーは、ＭＧＭＴ$^{Ｐ１４０Ｋ}$である。

【０３３７】

Ａｄ３５ペイロード及びＡｄ３５系の例としては、下記のものが挙げられる。

【０３３８】

（ｉ）さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ペイロードは、ＳＢ１００ｘによる転位のためのトランスポゼース逆方向反復配列と隣接する組み込みエレメントを含み、トランスポゼース逆方向反復配列は、ＦＬＰリコンビナーゼ（ＦＬＰｅなど）による組換えのためのｆｒｔ同方向反復配列と隣接する。さまざまな実施形態において、組み込みエレメントは、（ａ）β－グロビン小型ＬＣＲ、（ｂ）ヒトγ－グロビンコード配列と機能可能なように連結されたβ－グロビンプロモーターを含む遺伝子（γ－グロビンコード配列は、３’ＵＴＲ（例えば、γ－グロビン３’ＵＴＲ）と機能可能なように連結され、β－グロビン小型ＬＣＲもまた、γ－グロビンコード配列と機能可能なように連結される）、（ｃ）ｃＨＳ４インスレーター配列、ならびに（ｄ）ＭＧＭＴ$^{Ｐ１４０Ｋ}$コード配列、２Ａ自己切断型ペプチド、ＧＦＰ蛍光マーカーコード配列、及びポリアデニル化シグナルと機能可能なように連結されたプロモーター（ＰＧＫプロモーターなど）を含む遺伝子、を含み（任意選択で５’から３’の方向で含む）、任意選択で、（ａ）～（ｄ）はいずれも、Ａｄ３５ペイロードの２つの鎖のいずれかに５’から３’の方向でコードされ得る。

【０３３９】

さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ペイロードは、ＣＲＩＳＰＲ系をコードする核酸配列を、組み込みエレメントの外側かつリコンビナーゼ部位の外側にさらに含む。ある特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ系をコードする核酸配列は、（ａ）第１のｇＲＮＡコード配列と機能可能なように連結された第１のＵ６プロモーターを含む第１のｇＲＮＡ遺伝子（第１のｇＲＮＡは、ｂｃｌ１１ａエンハンサーを標的とする）、（ｂ）第２のｇＲＮＡコード配列と機能可能なように連結された第２のＵ６プロモーターを含む第２のｇＲＮＡ遺伝子（第２のｇＲＮＡは、ＨＢＧプロモーターを標的とする）、ならびに（ｃ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９コード配列と機能可能なように連結されたプロモーター（ＥＦ１αプロモーターなど）を含むＣＲＩＳＰＲ酵素遺伝子（ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９コード配列は、３’ＵＴＲ／ｍｉＲ配列及びポリアデニル化シグナルと機能可能なように連結される）、を含む（任意選択で５’から３’の方向で含む）。さまざまな実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ系は、赤血球ｂｃｌ１１ａエンハンサー、及びＨＢＧプロモーターのＢＣＬ１１Ａ結合部位を標的とし、これらを標的とすることはそれぞれ、γ－グロビンの活性化または再活性化の誘発に寄与する。本明細書に開示されるように、ＣＲＩＳＰＲ系は、転位によってドナーベクターが切断されると非組み込みドナーベクター核酸が分解されるという点において自己不活型であり得る。さまざまな実施形態において、ｍｉＲ配列は、ＨＤＡｄ３５ドナーベクターを産生させる間に産生細胞においてＣａｓ９が発現することを抑制する配列であり得る（例えば、Ｓａｙｄａｍｉｎｏｖａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．Ｍｅｔｈ．Ｃｌｉｎ．Ｄｅｖ．１：１４０５７，２０１５、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．Ｍｅｔｈ．Ｃｌｉｎ．Ｄｅｖ．９：３９０－４０１，２０１８を参照のこと）。

【０３４０】

さまざまな実施形態において、本開示のＡｄ３５系は、Ａｄ３５サポートベクターをさらに含み、サポートベクターは、（ａ）ＦＬＰｅリコンビナーゼコード配列と機能可能なように連結されたＥＦ１αプロモーターを含む組換え酵素遺伝子、及び（ｂ）ＳＢ１００

ｘトランスポゼースコード配列と機能可能なように連結されたＰＧＫプロモーターを含むトランスポゼース遺伝子、を含む（任意選択で５’から３’の方向で含む）。

【０３４１】

さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ペイロードは、Ａｄ３５ドナーベクターゲノム中に存在する。さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ドナーベクターゲノム中に存在するＡｄ３５ペイロードはＡｄ３５　ＩＴＲと隣接する。さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ドナーベクターゲノムは、Ａｄ３５ドナーベクター中に存在する。さまざまな実施形態において、ドナーベクターは、Ａｄ３５＋＋ベクターである。

【０３４２】

さまざまな実施形態において、サポートゲノムは、Ａｄ３５　ＩＴＲを含む。さまざまな実施形態において、サポートゲノムは、Ａｄ３５ベクター中に存在する。さまざまな実施形態において、サポートベクターは、Ａｄ３５＋＋ベクターである。

【０３４３】

さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ドナーベクターは、ヘルパー依存型ドナーベクター（ＨＤＡｄ３５）である。ある特定のそのような実施形態では、本開示の系は、ＨＤＡｄ３５ドナーベクターまたはＨＤＡｄ３５ドナーゲノム、及びＡｄ３５ヘルパーベクターまたはＡｄ３５ヘルパーゲノムを含み得、さまざまな実施形態において、Ａｄ３５サポートベクターをさらに含み得る。

【０３４４】

図１６４には、ある特定の実施形態例が示される。

【０３４５】

（ｉｉ）さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ペイロードは、標的細胞ゲノムとの同一性％が少なくとも８０％（例えば、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％＜、または１００％）であるホモロジーアーム（例えば、１．８ｋｂのホモロジーアーム）と隣接する組み込みエレメントを含む。さまざまな実施形態において、組み込みエレメントは、（ａ）ＨＳ１、ＨＳ２、ＨＳ３、及びＨＳ４を含むが、ＨＳ５は含まないβ－グロビン小型ＬＣＲ、（ｂ）γ－グロビンコード配列と機能可能なように連結されたβ－グロビンプロモーターを含む遺伝子（γ－グロビンコード配列は、γ－グロビン３’ＵＴＲと機能可能なように連結され、β－グロビン小型ＬＣＲもまた、γ－グロビンコード配列と機能可能なように連結される）、（ｃ）ｃＨＳ４インスレーター配列、ならびに（ｄ）ＭＧＭＴ$^{Ｐ１４０Ｋ}$コード配列と機能可能なように連結されたＰＧＫプロモーターを含む遺伝子（ＭＧＭＴ$^{Ｐ１４０Ｋ}$コード配列は、ポリアデニル化シグナルと機能可能なように連結される）、を含み（任意選択で５’から３’の方向で含む）、任意選択で、（ａ）～（ｄ）はいずれも、Ａｄ３５ペイロードの２つの鎖のいずれかに５’から３’の方向でコードされ得る。

【０３４６】

さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ペイロードは、ＣＲＩＳＰＲ系をコードする核酸配列を、組み込みエレメントの外側かつリコンビナーゼ部位の外側にさらに含む。ある特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ系をコードする核酸配列は、（ａ）ｓｇＲＮＡコード配列と機能可能なように連結されたＵ６プロモーターを含むｓｇＲＮＡ遺伝子（ｓｇＲＮＡは、ＨＢＧ２プロモーターを標的とする）、ならびに（ｂ）ｓｐＣａｓ９コード配列と機能可能なように連結されたＥＦ１αプロモーターを含むＣＲＩＳＰＲ酵素遺伝子（ｓｐＣａｓ９コード配列は、ｍｉＲ部位、β－グロビン３’ＵＴＲ配列、及びポリアデニル化シグナルと機能可能なように連結される）、を含む（任意選択で５’から３’の方向で含む）。さまざまな実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ系は、ＨＢＧプロモーターのＢＣＬ１１Ａ結合部位を標的とし、γ－グロビンの活性化または再活性化を誘発し得る。本明細書に開示されるように、ＣＲＩＳＰＲ系は、ＡＡＶＳ１　ＣＲＩＳＰＲによってドナーベクターが切断されると非組み込みドナーベクター核酸が分解されるという点において自己不活型であり得る。さまざまな実施形態において、ｍｉＲ配列は、ＨＤＡｄ３５ドナーベクタ

ーを産生させる間に産生細胞においてＣａｓ９が発現することを抑制する配列であり得る（例えば、Ｓａｙｄａｍｉｎｏｖａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．Ｍｅｔｈ．Ｃｌｉｎ．Ｄｅｖ．１：１４０５７，２０１５、Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．Ｍｅｔｈ．Ｃｌｉｎ．Ｄｅｖ．９：３９０－４０１，２０１８を参照のこと）。

【０３４７】

さまざまな実施形態において、本開示のＡｄ３５系はＡｄ３５サポートベクターをさらに含み、サポートベクターは、ｓｇＡＡＶＳ１－ｒｍコード配列と機能可能なように連結されたＵ６プロモーターを含む（任意選択で５’から３’の方向で含む）。

【０３４８】

さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ペイロードは、Ａｄ３５ドナーベクターゲノム中に存在する。さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ドナーベクターゲノム中に存在するＡｄ３５ペイロードはＡｄ３５　ＩＴＲと隣接する。さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ドナーベクターゲノムは、Ａｄ３５ドナーベクター中に存在する。さまざまな実施形態において、ドナーベクターは、Ａｄ３５＋＋ベクターである。

【０３４９】

さまざまな実施形態において、サポートゲノムはＡｄ３５　ＩＴＲを含む。さまざまな実施形態において、サポートゲノムは、Ａｄ３５ベクター中に存在する。さまざまな実施形態において、サポートベクターは、Ａｄ３５＋＋ベクターである。

【０３５０】

さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ドナーベクターは、ヘルパー依存型ドナーベクター（ＨＤＡｄ３５）である。ある特定のそのような実施形態では、本開示の系は、ＨＤＡｄ３５ドナーベクターまたはＨＤＡｄ３５ドナーゲノム、及びＡｄ３５ヘルパーベクターまたはＡｄ３５ヘルパーゲノムを含み得、さまざまな実施形態において、Ａｄ３５サポートベクターをさらに含み得る。

【０３５１】

図１６５には、ある特定の実施形態例が示される。

【０３５２】

（ｉｉｉ）さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ペイロードは、ＳＢ１００ｘによる転位のためのトランスポゼース逆方向反復配列と隣接する組み込みエレメントを含み、トランスポゼース逆方向反復配列は、ＦＬＰリコンビナーゼ（ＦＬＰｅなど）による組換えのためのｆｒｔ同方向反復配列と隣接する。さまざまな実施形態において、組み込みエレメントは、（ａ）β－グロビン小型ＬＣＲ、（ｂ）アカゲザルγ－グロビンコード配列と機能可能なように連結されたβ－グロビンプロモーターを含む遺伝子（γ－グロビンコード配列は、３’ＵＴＲ（例えば、γ－グロビン３’ＵＴＲ）と機能可能なように連結され、β－グロビン小型ＬＣＲもまた、γ－グロビンコード配列と機能可能なように連結される）、（ｃ）ｃＨＳ４インスレーター配列、ならびに（ｄ）ＭＧＭＴ$^{Ｐ１４０Ｋ}$コード配列と機能可能なように連結されたＰＧＫプロモーターを含む遺伝子（ＭＧＭＴ$^{Ｐ１４０Ｋ}$コード配列は、ポリアデニル化シグナルと機能可能なように連結される）、を含み（任意選択で５’から３’の方向で含む）、任意選択で、（ａ）～（ｄ）はいずれも、Ａｄ３５ペイロードの２つの鎖のいずれかに５’から３’の方向でコードされ得る。

【０３５３】

さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ペイロードは、ＣＲＩＳＰＲ系をコードする核酸配列を、組み込みエレメントの外側かつリコンビナーゼ部位の外側にさらに含む。ある特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ系をコードする核酸配列は、（ａ）ｇＲＮＡコード配列と機能可能なように連結されたＵ６プロモーターを含むｇＲＮＡ遺伝子（ｇＲＮＡは、ＨＢＧプロモーターを標的とする）、ならびに（ｂ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９コード配列と機能可能なように連結されたＥＦ１αプロモーターを含むＣＲＩＳＰＲ酵素遺伝子（ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９コード配列は、３’ＵＴＲ／ｍｉＲ配列及びポリアデニル化シグナルと機能可能なように連結される）、を含む（任意選択で５’から３’の方向で含む）。さまざまな実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ系は、ＨＢＧプロモーターのＢＣＬ１１Ａ結合

部位を標的とし、これによってγ－グロビンが活性化または再活性化し得る。本明細書に開示されるように、ＣＲＩＳＰＲ系は、転位によってドナーベクターが切断されると非組み込みドナーベクター核酸が分解されるという点において自己不活型であり得る。さまざまな実施形態において、ｍｉＲ配列は、ＨＤＡｄ３５ドナーベクターを産生させる間に産生細胞においてＣａｓ９が発現することを抑制する配列であり得る（例えば、Ｓａｙｄａｍｉｎｏｖａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．Ｍｅｔｈ．Ｃｌｉｎ．Ｄｅｖ．１：１４０５７，２０１５、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．Ｍｅｔｈ．Ｃｌｉｎ．Ｄｅｖ．９：３９０－４０１，２０１８を参照のこと）。

【０３５４】

さまざまな実施形態において、本開示のＡｄ３５系は、Ａｄ３５サポートベクターをさらに含み、サポートベクターは、（ａ）ＦＬＰｅリコンビナーゼコード配列と機能可能なように連結されたＥＦ１αプロモーターを含む組換え酵素遺伝子、及び（ｂ）ＳＢ１００ｘトランスポゼースコード配列と機能可能なように連結されたＰＧＫプロモーターを含むトランスポゼース遺伝子、を含む（任意選択で５’から３’の方向で含む）。

【０３５５】

さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ペイロードは、Ａｄ３５ドナーベクターゲノム中に存在する。さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ドナーベクターゲノム中に存在するＡｄ３５ペイロードはＡ３ｄ５　ＩＴＲと隣接する。さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ドナーベクターゲノムは、Ａｄ３５ドナーベクター中に存在する。さまざまな実施形態において、ドナーベクターは、Ａｄ３５＋＋ベクターである。

【０３５６】

さまざまな実施形態において、サポートゲノムはＡｄ３５　ＩＴＲを含む。さまざまな実施形態において、サポートゲノムは、Ａｄ３５ベクター中に存在する。さまざまな実施形態において、サポートベクターは、Ａｄ３５＋＋ベクターである。

【０３５７】

さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ドナーベクターは、ヘルパー依存型ドナーベクター（ＨＤＡｄ３５）である。ある特定のそのような実施形態では、本開示の系は、ＨＤＡｄ３５ドナーベクターまたはＨＤＡｄ３５ドナーゲノム、及びＡｄ３５ヘルパーベクターまたはＡｄ３５ヘルパーゲノムを含み得、さまざまな実施形態において、Ａｄ３５サポートベクターをさらに含み得る。

【０３５８】

図１６６中には、ある特定の実施形態例が示される。

【０３５９】

（ｉｖ）さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ペイロードは、ＳＢ１００ｘによる転位のためのトランスポゼース逆方向反復配列と隣接する組み込みエレメントを含み、トランスポゼース逆方向反復配列は、ＦＬＰリコンビナーゼ（ＦＬＰｅなど）による組換えのためのｆｒｔ同方向反復配列と隣接する。さまざまな実施形態において、組み込みエレメントは、（ａ）β－グロビン小型ＬＣＲ、（ｂ）ヒトγ－グロビンコード配列と機能可能なように連結されたβ－グロビンプロモーターを含む遺伝子（γ－グロビンコード配列は、３’ＵＴＲ（例えば、γ－グロビン３’ＵＴＲ）と機能可能なように連結され、β－グロビン小型ＬＣＲもまた、γ－グロビンコード配列と機能可能なように連結される）、（ｃ）ｃＨＳ４インスレーター配列、ならびに（ｄ）ＭＧＭＴＰ１４０Ｋコード配列、２Ａ自己切断型ペプチド、ＧＦＰ蛍光マーカーコード配列、及びポリアデニル化シグナルと機能可能なように連結されたプロモーター（ＰＧＫプロモーターなど）を含む遺伝子、を含み（任意選択で５’から３’の方向で含む）、任意選択で、（ａ）～（ｄ）はいずれも、Ａｄ３５ペイロードの２つの鎖のいずれかに５’から３’の方向でコードされ得る。

【０３６０】

さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ペイロードは、塩基編集系をコードする核酸配列を、組み込みエレメントの外側かつリコンビナーゼ部位の外側にさらに含む。ある特定の実施形態では、塩基編集系をコードする核酸配列は、（ａ）第１のｇＲＮＡコード配列

と機能可能なように連結された第１のＵ６プロモーターを含む第１のｇＲＮＡ遺伝子（第１のｇＲＮＡは、ｂｃｌ１１ａエンハンサーを標的とする）、（ｂ）第２のｇＲＮＡコード配列と機能可能なように連結された第２のＵ６プロモーターを含む第２のｇＲＮＡ遺伝子（第２のｇＲＮＡは、ＨＢＧプロモーターを標的とする）、ならびに（ｃ）塩基編集酵素コード配列と機能可能なように連結されたプロモーター（ＥＦ１αプロモーターなど）を含む塩基編集酵素遺伝子（塩基編集酵素コード配列は、３’ＵＴＲ／ｍｉＲ配列及びポリアデニル化シグナルと機能可能なように連結される）、を含む（任意選択で５’から３’の方向で含む）。さまざまな実施形態において、塩基編集系は、赤血球ｂｃｌ１１ａエンハンサー、及びＨＢＧプロモーターのＢＣＬ１１Ａ結合部位を標的とし、これらを標的とすることはそれぞれ、γ－グロビンの活性化または再活性化の誘発に寄与する。本明細書に開示されるように、塩基編集系は、転位によってドナーベクターが切断されると非組み込みドナーベクター核酸が分解されるという点において自己不活型であり得る。さまざまな実施形態において、ｍｉＲ配列は、ＨＤＡｄ３５ドナーベクターを産生させる間に産生細胞においてＣａｓ９が発現することを抑制する配列であり得る（例えば、Ｓａｙｄａｍｉｎｏｖａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．Ｍｅｔｈ．Ｃｌｉｎ．Ｄｅｖ．１：１４０５７，２０１５、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．Ｍｅｔｈ．Ｃｌｉｎ．Ｄｅｖ．９：３９０－４０１，２０１８を参照のこと）。

【０３６１】

さまざまな実施形態において、本開示のＡｄ３５系は、Ａｄ３５サポートベクターをさらに含み、サポートベクターは、（ａ）ＦＬＰｅリコンビナーゼコード配列と機能可能なように連結されたＥＦ１αプロモーターを含む組換え酵素遺伝子、及び（ｂ）ＳＢ１００ｘトランスポゼースコード配列と機能可能なように連結されたＰＧＫプロモーターを含むトランスポゼース遺伝子、を含む（任意選択で５’から３’の方向で含む）。

【０３６２】

さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ペイロードは、Ａｄ３５ドナーベクターゲノム中に存在する。さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ドナーベクターゲノム中に存在するＡｄ３５ペイロードはＡｄ３５　ＩＴＲと隣接する。さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ドナーベクターゲノムは、Ａｄ３５ドナーベクター中に存在する。さまざまな実施形態において、ドナーベクターは、Ａｄ３５＋＋ベクターである。

【０３６３】

さまざまな実施形態において、サポートゲノムはＡｄ３５　ＩＴＲを含む。さまざまな実施形態において、サポートゲノムは、Ａｄ３５ベクター中に存在する。さまざまな実施形態において、サポートベクターは、Ａｄ３５＋＋ベクターである。

【０３６４】

さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ドナーベクターは、ヘルパー依存型ドナーベクター（ＨＤＡｄ３５）である。ある特定のそのような実施形態では、本開示の系は、ＨＤＡｄ３５ドナーベクターまたはＨＤＡｄ３５ドナーゲノム、及びＡｄ３５ヘルパーベクターまたはＡｄ３５ヘルパーゲノムを含み得、さまざまな実施形態において、Ａｄ３５サポートベクターをさらに含み得る。

【０３６５】

（ｖ）さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ペイロードは、ＳＢ１００ｘによる転位のためのトランスポゼース逆方向反復配列と隣接する組み込みエレメントを含み、トランスポゼース逆方向反復配列は、ＦＬＰリコンビナーゼ（ＦＬＰｅなど）による組換えのためのｆｒｔ同方向反復配列と隣接する。さまざまな実施形態において、組み込みエレメントは、（ａ）β－グロビン小型ＬＣＲ、（ｂ）アカゲザルγ－グロビンコード配列と機能可能なように連結されたβ－グロビンプロモーターを含む遺伝子（γ－グロビンコード配列は、３’ＵＴＲ（例えば、γ－グロビン３’ＵＴＲ）と機能可能なように連結され、β－グロビン小型ＬＣＲもまた、γ－グロビンコード配列と機能可能なように連結される）、（ｃ）ｃＨＳ４インスレーター配列、ならびに（ｄ）ＭＧＭＴ$^{Ｐ１４０Ｋ}$コード配列と機能可能なように連結されたＰＧＫプロモーターを含む遺伝子（ＭＧＭＴ$^{Ｐ１４０Ｋ}$コード

配列は、ポリアデニル化シグナルと機能可能なように連結される）、を含み（任意選択で５’から３’の方向で含む）、任意選択で、（ａ）～（ｄ）はいずれも、Ａｄ３５ペイロードの２つの鎖のいずれかに５’から３’の方向でコードされ得る。

【０３６６】

さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ペイロードは、塩基編集系をコードする核酸配列を、組み込みエレメントの外側かつリコンビナーゼ部位の外側にさらに含む。ある特定の実施形態では、塩基編集系をコードする核酸配列は、（ａ）ｇＲＮＡコード配列と機能可能なように連結されたＵ６プロモーターを含むｇＲＮＡ遺伝子（ｇＲＮＡは、ＨＢＧプロモーターを標的とする）、ならびに（ｂ）塩基編集酵素コード配列と機能可能なように連結されたＥＦ１αプロモーターを含む塩基編集酵素遺伝子（塩基編集酵素コード配列は、３’ＵＴＲ／ｍｉＲ配列及びポリアデニル化シグナルと機能可能なように連結される）、を含む（任意選択で５’から３’の方向で含む）。さまざまな実施形態において、塩基編集系は、ＨＢＧプロモーターのＢＣＬ１１Ａ結合部位を標的とし、これによってγ－グロビンが活性化または再活性化し得る。本明細書に開示されるように、塩基編集系は、転位によってドナーベクターが切断されると非組み込みドナーベクター核酸が分解されるという点において自己不活型であり得る。さまざまな実施形態において、ｍｉＲ配列は、ＨＤＡｄ３５ドナーベクターを産生させる間に産生細胞においてＣａｓ９が発現することを抑制する配列であり得る（例えば、Ｓａｙｄａｍｉｎｏｖａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．Ｍｅｔｈ．Ｃｌｉｎ．Ｄｅｖ．１：１４０５７，２０１５、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．Ｍｅｔｈ．Ｃｌｉｎ．Ｄｅｖ．９：３９０－４０１，２０１８を参照のこと）。

【０３６７】

さまざまな実施形態において、本開示のＡｄ３５系は、Ａｄ３５サポートベクターをさらに含み、サポートベクターは、（ａ）ＦＬＰｅリコンビナーゼコード配列と機能可能なように連結されたＥＦ１αプロモーターを含む組換え酵素遺伝子、及び（ｂ）ＳＢ１００ｘトランスポゼースコード配列と機能可能なように連結されたＰＧＫプロモーターを含むトランスポゼース遺伝子、を含む（任意選択で５’から３’の方向で含む）。

【０３６８】

さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ペイロードは、Ａｄ３５ドナーベクターゲノム中に存在する。さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ドナーベクターゲノム中に存在するＡｄ３５ペイロードはＡｄ３５　ＩＴＲと隣接する。さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ドナーベクターゲノムは、Ａｄ３５ドナーベクター中に存在する。さまざまな実施形態において、ドナーベクターは、Ａｄ３５＋＋ベクターである。

【０３６９】

さまざまな実施形態において、サポートゲノムはＡｄ３５　ＩＴＲを含む。さまざまな実施形態において、サポートゲノムは、Ａｄ３５ベクター中に存在する。さまざまな実施形態において、サポートベクターは、Ａｄ３５＋＋ベクターである。

【０３７０】

さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ドナーベクターは、ヘルパー依存型ドナーベクター（ＨＤＡｄ３５）である。ある特定のそのような実施形態では、本開示の系は、ＨＤＡｄ３５ドナーベクターまたはＨＤＡｄ３５ドナーゲノム、及びＡｄ３５ヘルパーベクターまたはＡｄ３５ヘルパーゲノムを含み得、さまざまな実施形態において、Ａｄ３５サポートベクターをさらに含み得る。

【０３７１】

Ｉ（Ｃ）（ｉｉ）．ペイロード制御配列

Ｉ（Ｃ）（ｉｉ）（ａ）．プロモーター制御配列

プロモーターは、転写開始前にＲＮＡポリメラーゼが結合する非コードゲノムＤＮＡ配列であり得、この非コードゲノムＤＮＡ配列は、通常、関連コード配列の上流（５’）に位置する。この結合によって、転写が特定の転写開始部位から開始されるようにＲＮＡポリメラーゼが配置される。プロモーターのヌクレオチド配列によって、それに結合する酵

素及び他の関連タンパク質因子の性質、ならびにＲＮＡ合成の速度が決まる。ＲＮＡがプロセシングを受けることでメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）が生成され、この生成ｍＲＮＡは、ＲＮＡ配列をコードポリペプチドのアミノ酸配列へと翻訳するためのテンプレートとして働く。５’非翻訳リーダー配列は、ｍＲＮＡのうちでコード領域の上流の位置する領域であり、この領域は、ｍＲＮＡの開始及び翻訳において役割を果たし得る。３’転写終結／ポリアデニル化シグナルは、コード領域の下流に位置する非翻訳領域であり、この領域は、植物細胞においてＲＮＡ合成を終結させ、多数のアデニンヌクレオチドを３’末端に付加するように機能する。

【０３７２】

プロモーターは、非特異的プロモーター、組織特異的プロモーター、細胞特異的プロモーター、及び／または細胞質特異的プロモーターが含まれ得る。プロモーターには、強いプロモーター、弱いプロモーター、構成的発現プロモーター、及び／または誘導性（条件的）プロモーターが含まれ得る。誘導性プロモーターは、ある特定の条件、シグナル、または細胞事象に反応して発現を促進または制御する。例えば、プロモーターは、プロモーターからの転写を引き起こすために特定のリガンド、小分子、転写因子、ホルモン、またはホルモンタンパク質を必要とする誘導性プロモーターであり得る。プロモーターの具体例としては、ＡＦＰ（α－フェトプロテイン）プロモーター、アミラーゼ１Ｃプロモーター、アクアポリン－５（ＡＰ５）プロモーター、α１－アンチトリプシンプロモーター、β－ａｃｔプロモーター、β－グロビンプロモーター、β－Ｋｉｎプロモーター、Ｂ２９プロモーター、ＣＣＫＡＲプロモーター、ＣＤ１４プロモーター、ＣＤ４３プロモーター、ＣＤ４５プロモーター、ＣＤ６８プロモーター、ＣＥＡプロモーター、ｃ－ｅｒｂＢ２プロモーター、ＣＯＸ－２プロモーター、ＣＸＣＲ４プロモーター、デスミンプロモーター、Ｅ２Ｆ－１プロモーター、ヒト伸長因子１αプロモーター（ＥＦ１α）、ＣＭＶ（サイトメガロウイルス）プロモーター、ｍｉｎＣＭＶプロモーター、ＳＶ４０（サルウイルス４０）前初期プロモーター、ＥＧＲ１プロモーター、ｅＩＦ４Ａ１プロモーター、エラスターゼ－１プロモーター、エンドグリンプロモーター、ＦｅｒＨプロモーター、ＦｅｒＬプロモーター、フィブロネクチンプロモーター、Ｆｌｔ－１プロモーター、ＧＡＰＤＨプロモーター、ＧＦＡＰプロモーター、ＧＰＩＩｂプロモーター、ＧＲＰ７８プロモーター、ＧＲＰ９４プロモーター、ＨＥ４プロモーター、ｈＧＲ１／１プロモーター、ｈＮＩＳプロモーター、Ｈｓｐ６８プロモーター、Ｈｓｐ６８最小プロモーター（ｐｒｏＨＳＰ６８）、ＨＳＰ７０プロモーター、ＨＳＶ－１ウイルスＴＫ遺伝子プロモーター、ｈＴＥＲＴプロモーター、ＩＣＡＭ－２プロモーター、カリクレインプロモーター、ＬＰプロモーター、主要後期プロモーター（ＭＬＰ）、Ｍｂプロモーター、Ｒｈｏプロモーター、ＭＴ（メタロチオネイン）プロモーター、ＭＵＣ１プロモーター、ＮｐｈｓＩプロモーター、ＯＧ－２プロモーター、ＰＧＫ（ホスホグリセリン酸キナーゼ）プロモーター、ＰＧＫ－１プロモーター、ポリメラーゼＩＩＩ（ＰｏｌＩＩＩ）プロモーター、ＰＳＡプロモーター、ＲＯＳＡプロモーター、ＳＰ－Ｂプロモーター、サバイビンプロモーター、ＳＹＮ１プロモーター、ＳＹＴ８遺伝子プロモーター、ＴＲＰ１プロモーター、Ｔｙｒプロモーター、ユビキチンＢプロモーター、ＷＡＳＰプロモーター、及びラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）長鎖末端反復配列（ＬＴＲ）プロモーターが挙げられる。

【０３７３】

プロモーターは、ネイティブプロモーターまたは複合プロモーターとして得ることができる。ネイティブプロモーターまたは最小プロモーターは、所与の遺伝子の５’領域に由来するヌクレオチド配列を含むプロモーターを指す。ネイティブプロモーターは、コアプロモーター及びその天然５’ＵＴＲを含む。特定の実施形態では、５’ＵＴＲはイントロンを含む。複合プロモーターは、異なる起源のプロモーターエレメントを組み合わせるか、または遠位エンハンサーを同じもしくは異なる起源の最小プロモーターと組み合わせることによって得られるプロモーターを指す。

【０３７４】

特定の実施形態では、ＳＶ４０プロモーターは、配列番号８０に示される配列を含む。

特定の実施形態では、ｄＥＳＶ４０プロモーター（エンハンサー領域が欠失したＳＶ４０プロモーター）は、配列番号８１に示される配列を含む。特定の実施形態では、ヒトテロメラーゼ触媒サブユニット（ｈＴＥＲＴ）プロモーターは、配列番号８２に示される配列を含む。特定の実施形態では、Ｓｃｈｍｉｄｔ－ＲｕｐｐｉｎＡ株由来のＲＳＶプロモーターは、配列番号８３に示される配列を含む。特定の実施形態では、ｈＮＩＳプロモーターは、配列番号８４に示される配列を含む。特定の実施形態では、ヒト糖質コルチコイド受容体１Ａ（ｈＧＲ１／Ａｐ／ｅ）プロモーターは、配列番号８５に示される配列を含む。

【０３７５】

特定の実施形態では、プロモーターには、野生型プロモーター配列と、当該野生型プロモーターと比較してある特定の位置に任意選択の変化（挿入、点変異、または欠失を含む）を含む配列と、が含まれる。特定の実施形態では、プロモーターは、ヌクレオチド数２０の区間当たりに１つ、２つ、３つ、４つ、または５つの変化を有することによって天然起源のプロモーターと異なる。特定の実施形態では、天然の配列は、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、または１０個の塩基が変更されることになる。ＬＴＲ配列のヌクレオチド数が５０～１００、２００、２５０、または３５０であることを含めて、プロモーターは、他のウイルス配列を含めて、または他のウイルス配列を含めずに、長さが異なり得る。

【０３７６】

プロモーターは、組織または細胞に特異的なものもあれば、組織または細胞に非特異的なものもある。哺乳動物細胞中の各遺伝子は、それ自体のプロモーターを有しており、いくつかのプロモーターは、ある特定の細胞型でのみ活性化され得る。非特異的プロモーターまたは遍在性プロモーターは、そのプロモーター配列と機能可能なように連結された遺伝子またはヌクレオチド配列の転写を、幅広い範囲の細胞、組織、及び細胞周期において開始させることを支援する。特定の実施形態では、プロモーターは、非特異的プロモーターである。特定の実施形態では、非特異的プロモーターには、ＣＭＶプロモーター、ＲＳＶプロモーター、ＳＶ４０プロモーター、哺乳動物伸長因子１α（ＥＦ１α）プロモーター、β－ａｃｔプロモーター、ＥＧＲ１プロモーター、ｅＩＦ４Ａ１プロモーター、ＦｅｒＨプロモーター、ＦｅｒＬプロモーター、ＧＡＰＤＨプロモーター、ＧＲＰ７８プロモーター、ＧＲＰ９４プロモーター、ＨＳＰ７０プロモーター、β－Ｋｉｎプロモーター、ＰＧＫ－１プロモーター、ＲＯＳＡプロモーター、及び／またはユビキチンＢプロモーターが含まれる。

【０３７７】

特異的プロモーターは、そのプロモーター配列と機能可能なように連結されたヌクレオチド配列を細胞特異的に発現させることを支援する。特定の実施形態では、特異的プロモーターは、Ｂ細胞、単球細胞、白血球、マクロファージ、膵腺房細胞、内皮細胞、アストロサイト、及び／またはいずれかの他の細胞型もしくは細胞周期において活性である。特定の実施形態では、プロモーターは、特異的プロモーターである。特定の実施形態では、ＳＹＴ８遺伝子プロモーターは、ヒト膵島における遺伝子発現を制御する（Ｘｕ，ｅｔａｌ．，Ｎａｔ Ｓｔｒｕｃｔ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．，２０１１，１８：３７２－３７８）。特定の実施形態では、カリクレインプロモーターは、導管細胞特異的に唾液腺における遺伝子発現を制御する。特定の実施形態では、アミラーゼ１Ｃプロモーターは、腺房細胞における遺伝子発現を制御する。特定の実施形態では、アクアポリン－５（ＡＰ５）プロモーターは、腺房細胞における遺伝子発現を制御する（Ｚｈｅｎｇ ａｎｄ Ｂａｕｍ，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．，４３４：２０５－２１９，２００８）。特定の実施形態では、Ｂ２９プロモーターは、Ｂ細胞における遺伝子発現を制御する。特定の実施形態では、ＣＤ１４プロモーターは、単球細胞における遺伝子発現を制御する。特定の実施形態では、ＣＤ４３プロモーターは、白血球及び血小板における遺伝子発現を制御する。特定の実施形態では、ＣＤ４５プロモーターは、造血細胞における遺伝子発現を制御する。特定の実施形態では、ＣＤ６８プロモーターは、マクロファージにおける遺伝子発

現を制御する。特定の実施形態では、デスミンプロモーターは、筋細胞における遺伝子発現を制御する。特定の実施形態では、エラスターゼ－１プロモーターは、膵腺房細胞における遺伝子発現を制御する。特定の実施形態では、エンドグリンプロモーターは、内皮細胞における遺伝子発現を制御する。特定の実施形態では、フィブロネクチンプロモーターは、分化中の細胞または治癒中の組織における遺伝子発現を制御する。特定の実施形態では、Ｆｌｔ－１プロモーターは、内皮細胞における遺伝子発現を制御する。特定の実施形態では、ＧＦＡＰプロモーターは、アストロサイトにおける遺伝子発現を制御する。特定の実施形態では、ＧＰＩＩｂプロモーターは、巨核球における遺伝子発現を制御する。特定の実施形態では、ＩＣＡＭ－２プロモーターは、内皮細胞における遺伝子発現を制御する。特定の実施形態では、Ｍｂプロモーターは、筋肉におけう遺伝子発現を制御する。特定の実施形態では、ＮｐｈｓＩプロモーターは、ポドサイトにおける遺伝子発現を制御する。特定の実施形態では、ＯＧ－２プロモーターは、骨芽細胞及び象牙芽細胞における遺伝子発現を制御する。特定の実施形態では、ＳＰ－Ｂプロモーターは、肺細胞における遺伝子発現を制御する。特定の実施形態では、ＳＹＮ１プロモーターは、ニューロンにおける遺伝子発現を制御する。特定の実施形態では、ＷＡＳＰプロモーターは、造血細胞における遺伝子発現を制御する。

【０３７８】

特定の実施形態では、プロモーターは、腫瘍特異的プロモーターである。特定の実施形態では、ＡＦＰプロモーターは、肝細胞癌における遺伝子発現を制御する。特定の実施形態では、ＣＣＫＡＲプロモーターは、膵癌における遺伝子発現を制御する。特定の実施形態では、ＣＥＡプロモーターは、上皮癌における遺伝子発現を制御する。特定の実施形態では、ｃ－ｅｒｂＢ２プロモーターは、乳癌及び膵癌における遺伝子発現を制御する。特定の実施形態では、ＣＯＸ－２プロモーターは、腫瘍における遺伝子発現を制御する。特定の実施形態では、ＣＸＣＲ４プロモーターは、腫瘍における遺伝子発現を制御する。特定の実施形態では、Ｅ２Ｆ－１プロモーターは、腫瘍における遺伝子発現を制御する。特定の実施形態では、ＨＥ４プロモーターは、腫瘍における遺伝子発現を制御する。特定の実施形態では、ＬＰプロモーターは、腫瘍における遺伝子発現を制御する。特定の実施形態では、ＭＵＣ１プロモーターは、がん細胞における遺伝子発現を制御する。特定の実施形態では、ＰＳＡプロモーターは、前立腺及び前立腺癌における遺伝子発現を制御する。特定の実施形態では、サバイビンプロモーターは、腫瘍における遺伝子発現を制御する。特定の実施形態では、ＴＲＰ１プロモーターは、メラノサイト及び黒色腫における遺伝子発現を制御する。特定の実施形態では、Ｔｙｒプロモーターは、メラノサイト及び黒色腫における遺伝子発現を制御する。

【０３７９】

Ｉ（Ｃ）（ｉｉ）（ｂ）．ＬＣＲ制御配列

遺伝子座制御領域は、連結される遺伝子の発現を組織特異的かつ異所クロマチン部位でのコピー数依存的様式で生理学的レベルへと増進するその能力によって機能的には定義される。Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，２００２，１００（９）：３０７７－３０８６。

【０３８０】

β－グロビンＬＣＲは、少なくともいくつかの点において少なくともいくつかのＬＣＲの例となる。例えば、多くの他のＬＣＲと同様に、β－グロビンＬＣＲは、機能可能なように連結された遺伝子または導入遺伝子の発現の増進（例えば、転写の増加、翻訳の増加、及び／または細胞特異性もしくは組織特異性の増加）を生じさせるものであり、ＤＮＡｓｅ高感受性（ＨＳ）領域を含み、こうしたＨＳ領域は、ＬＣＲの発現作用を媒介することが当業者に理解されている。さらに、多くの他のＬＣＲと同様に、β－グロビンＬＣＲは、例えば、β－グロビンＬＣＲ　ＨＳ領域のすべて（ＨＳ１～ＨＳ５）を含むβ－グロビンＬＣＲ配列を含む核酸として利用されるか、またはβ－グロビンＬＣＲ　ＨＳ領域のサブセット（例えば、ＨＳ１～ＨＳ４）を含む核酸として利用され得るという点において、その全体または一部が利用され得る。

【０３８１】

１１番染色体上に位置するＨｏｍｏ ｓａｐｉｅｎｓ β－グロビン領域の核酸配列の例は、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＧ＿０００００７にて提供されている。β－グロビン長鎖ＬＣＲは、場合によっては、遺伝子座における最初の（胚性）グロビン遺伝子の５’側６～２２ｋｂに位置する配列であるか、または当該配列を含み得る。β－グロビン長鎖ＬＣＲは、５つのＤＮＡｓｅＩ高感受性部位（５’ＨＳ１～５）を含み得る。Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，２００２，１００（９）：３０７７－３０８６。ＮＧ＿０００００７では、遺伝子座制御領域内のＤＮＡｓｅＩ高感受性部位ＨＳ１、ＨＳ２、ＨＳ３、及びＨＳ４の境界を表す制限酵素認識部位の位置（例えば、ＨＳ２のＳｎａＢＩ制限酵素認識部位及びＢｓｔＸＩ制限酵素認識部位、ＨＳ３のＨｉｎｄＩＩＩ制限酵素認識部位及びＢａｍＨＩ制限酵素認識部位、ならびにＨＳ４のＢａｍＨＩ制限酵素認識部位及びＢａｎＩＩ制限酵素認識部位）が与えられており、ＮＧ＿０００００７は、その全体及び特に高感受性部位位置に関する部分が参照によって本明細書に組み込まれる。ＨＳ１の配列及び位置は、例えば、Ｐａｓｃｅｒｉ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ ＮＹ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８５０：３７７－３８１，１９９８、Ｐａｓｃｅｒｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．９２：６５３－６６３，１９９８、及びＭｉｌｏｔ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ．８７：１０５－１１４，１９９６によって記載されている。特定の実施形態では、ＨＳ２領域は、遺伝子座制御領域の位置１６，６７１～１７，０５８に広がっている。ＨＳ２のＳｎａＢＩ制限酵素認識部位及びＢｓｔＸＩ制限酵素認識部位は、それぞれ位置１７，０９３及び位置１６，２４０に位置する。ＨＳ３領域は、遺伝子座制御領域の位置１２，４５９～１３，０９７に広がっている。ＨＳ３のＢａｍＨＩ制限酵素認識部位及びＨｉｎｄＩＩＩ制限酵素認識部位は、それぞれ位置１２，０６５及び位置１３，３６０に位置する。ＨＳ４領域は、遺伝子座制御領域の位置９，０４８～９，７１３に広がっている。ＨＳ４のＢａｍＨＩ制限酵素認識部位及びＢａｎＩＩ制限酵素認識部位は、それぞれ位置８，４９６及び位置９，５７６に位置する。

【０３８２】

本明細書に開示の特定の実施形態では、β－グロビンＬＣＲの小型部分が利用される。小型部分が含むＨＳ領域は５つすべてに満たないもの（ＨＳ１、ＨＳ２、ＨＳ３、ＨＳ４、及び／またはＨＳ５など）であり、このＬＣＲがβ－グロビンＬＣＲのセグメントを５つすべて含まないことが条件である。本開示の実施例１で利用した４．３ｋｂのＨＳ１～ＨＳ４ ＬＣＲは、小型ＬＣＲの一例となる。他の小型ＬＣＲには、例えば、ＨＳ１、ＨＳ２、及びＨＳ３；ＨＳ２、ＨＳ３、及びＨＳ４；ＨＳ３、ＨＳ４、及びＨＳ５；ＨＳ１、ＨＳ３、及びＨＳ５；ＨＳ１、ＨＳ２、及びＨＳ５；ならびにＨＳ１、ＨＳ４、及びＨＳ５が含まれ得る。小型ＬＣＲの追加の例については、Ｓａｄｅｌａｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ）９２：６７２８－６７３２，１９９５、及びＬｅｂｏｕｉｃｈ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．１３：３０６５－３０７６，１９９４を参照のこと。特定の実施形態は、β－グロビンプロモーターと組み合わせて小型β－グロビンＬＣＲが利用され得る。特定の実施形態では、この組み合わせから、５．９ｋｂのＬＣＲ－プロモーター統合物が得られる。ＬＣＲに関して、本明細書では「小型」及び「マイクロ」が互換的に使用される。

【０３８３】

本明細書に開示の特定の実施形態では、遺伝子座制御領域（ＬＣＲ）の長鎖部分が利用される。長鎖β－グロビンＬＣＲは、ＨＳ１、ＨＳ２、ＨＳ３、ＨＳ４、及びＨＳ５を含み得る。特定の実施形態では、長鎖ＬＣＲは、β－グロビンＬＣＲのＨＳ１、ＨＳ２、ＨＳ３、ＨＳ４、及びＨＳ５を含む２１．５ｋｂの配列を含む。長鎖β－グロビンＬＣＲをβ－グロビンプロモーターと組み合わせることで、タンパク質を高レベルで発現させることができる。

【０３８４】

特定の実施形態は、ＧＲＣｈ３８に示されるヒト１１番染色体の長鎖β－グロビンＬＣＲ位置５２９２３１９～５２７０７８９（２１，５３１ｂｐ）（配列番号１８５）を含み得る。さまざまな実施形態において、長鎖ＬＣＲの全長は、１８ｋｂ以上、１８．５ｋｂ

以上、１９ｋｂ以上、１９．５ｋｂ以上、２０ｋｂ以上、２０．５ｋｂ以上、２１ｋｂ以上、２１．５ｋｂ以上、または２１．５３１ｋｂ以上であり得る。さまざまな実施形態において、長鎖ＬＣＲの全長は、配列番号１８５の配列の長さの７０％以上、７５％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９１％以上、９２％以上、９３％以上、９４％以上、９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上、または９９％以上であり得る。さまざまな実施形態において、長鎖ＬＣＲは、配列番号１８５のうちの少なくとも１８ｋｂ、少なくとも１８．５ｋｂ、少なくとも１９ｋｂ、少なくとも１９．５ｋｂ、少なくとも２０ｋｂ、少なくとも２０．５ｋｂ、少なくとも２１ｋｂ、または少なくとも２１．５ｋｂを含み得る。本明細書で提供されるさまざまな実施形態のいずれかでは、長鎖ＬＣＲは、配列番号１８５の配列の対応連続部分との同一性％が少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％である核酸であるか、または当該核酸を含み得る。本明細書で提供されるさまざまな実施形態のいずれかでは、長鎖ＬＣＲは、ＨＳ１、ＨＳ２、ＨＳ３、ＨＳ４、及びＨＳ５を含み得る。

【０３８５】

さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ベクター系は、例えば、ＧＲＣｈ３８に示されるヒト１１番染色体の位置５２２８６３１～５２２７０２３（１６０９ｂｐ）または位置５２２８６３１～５２２７０１８（１６１４ｂｐ）（配列番号１８６）をβ－グロビンプロモーターとして含む転位性導入遺伝子インサートを含み得る。さまざまな実施形態において、β－グロビンプロモーターの全長は、例えば、１．０ｋｂ以上、１．１．ｋｂ以上、１．２ｋｂ以上、１．３ｋｂ以上、１．４ｋｂ以上、１．５ｋｂ以上、１．６ｋｂ以上、または１．６０９ｋｂ以上であり得る。さまざまな実施形態において、β－グロビンプロモーターは、配列番号１８６の配列のうちの少なくとも１．０ｋｂ、少なくとも１．１ｋｂ、少なくとも１．２ｋｂ、少なくとも１．３ｋｂ、少なくとも１．４ｋｂ、少なくとも１．５ｋｂ、少なくとも１．６ｋｂ、または少なくとも１．６０９ｋｂを含み得る。さまざまな実施形態において、転位性導入遺伝子インサートは、ヒト１１番染色体の位置５２２８６３１～５２２７０２３（１６０９ｂｐ）を含み得る。さまざまな実施形態において、β－グロビンプロモーターの全長は、例えば、β－グロビンＬＣＲによって発現が制御される遺伝子の上流（例えば、そうした遺伝子の１番目のコードヌクレオチドのすぐ上流）に位置する核酸配列のうちの１００ｂｐ以上、２００ｂｐ以上、３００ｂｐ以上、４００ｂｐ以上、５００ｂｐ以上、１ｋｂ以上、１．５ｋｂ以上、２ｋｂ以上、２．５ｋｂ以上、３ｋｂ以上、４ｋｂ以上、または５ｋｂ以上を含み得、こうした遺伝子には、限定されないが、イプシロン（ＨＢＥ１）グロビン遺伝子、Ｇ－ガンマ（ＨＢＧ２）グロビン遺伝子、Ａ－ガンマ（ＨＢＧ１）グロビン遺伝子、デルタ（ＨＢＤ）グロビン遺伝子、及びベータ（ＨＢＢ）グロビン遺伝子、及び／またはヘモグロビンβ遺伝子座（１１：５，２２５，４６３～５，２２７，０７０、相補鎖）に存在する１つ以上の遺伝子がいずれも含まれる。さまざまな実施形態において、β－グロビンプロモーターの全長は、例えば、１１番染色体ＮＣ＿０００００１１．１０の位置５２２７０２１の上流（例えば、すぐ上流）に位置する核酸配列のうちの１００ｂｐ以上、２００ｂｐ以上、３００ｂｐ以上、４００ｂｐ以上、５００ｂｐ以上、１ｋｂ以上、１．５ｋｂ以上、２ｋｂ以上、２．５ｋｂ以上、３ｋｂ以上、４ｋｂ以上、または５ｋｂ以上を含み得る。さまざまな実施形態において、β－グロビンプロモーターの全長は、配列番号１８６の配列の長さの７０％以上、７５％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９１％以上、９２％以上、９３％以上、９４％以上、９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上、または９９％以上であり得る。本明細書で提供されるさまざまな実施形態のいずれかでは、β－グロビンプロモーターは、配列番号１８６の配列の対応連続部分との同一性％が少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％で

ある配列を有する核酸であるか、または当該核酸を含み得る。

【０３８６】

さまざまな実施形態において、β－グロビンＬＣＲ（長鎖β－グロビンＬＣＲなど）は、機能可能なように連結されたコード配列を赤血球において発現させる。さまざまな実施形態において、機能可能なように連結されたコード配列は、本明細書に示されるまたはその他の形で当該技術分野で知られるβ－グロビンプロモーターとも機能可能なように連結される。

【０３８７】

免疫グロブリン重鎖遺伝子座Ｂ細胞ＬＣＲは、機能可能なように連結されたコード配列の発現の増進（例えば、転写の増加、翻訳の増加、及び／または細胞特異性もしくは組織特異性の増加）を生じさせるＬＣＲの例である。完全な免疫グロブリン重鎖遺伝子座Ｂ細胞ＬＣＲ配列を含み、及び／またはその発現制御断片を含む免疫グロブリン重鎖遺伝子座Ｂ細胞ＬＣＲと機能可能なように連結されると、コード配列の発現が増進し得る。免疫グロブリン重鎖遺伝子座Ｂ細胞ＬＣＲは、ＤＮＡｓｅ高感受性部位（ＨＳ）を含み、こうしたＨＳは、免疫グロブリン重鎖遺伝子座Ｂ細胞ＬＣＲの発現増進作用の少なくともいくつかを媒介することが当業者に理解されている。免疫グロブリン重鎖遺伝子座Ｂ細胞ＬＣＲは、免疫グロブリン重鎖（ＩｇＨ）遺伝子座の３’Ｃα領域中の４つのＤＮａｓｅＩ高感受性部位（ＨＳ１、ＨＳ２、ＨＳ３、及びＨＳ４）を含み、エンハンサー遺伝子座制御領域（ＬＣＲ）として機能する。したがって、免疫グロブリン重鎖遺伝子座Ｂ細胞ＬＣＲは、ＨＳ１～ＨＳ４をすべて含む完全な免疫グロブリン重鎖遺伝子座Ｂ細胞ＬＣＲであり得るか、または高感受性部位ＨＳ１～ＨＳ４のサブセットを含むその発現制御断片であり得る。これらのＨＳ部位は、ＩｇＨ　Ｃ遺伝子の１０～３０ｋｂにマッピングされ、一過性トランスフェクションアッセイにおいてリンパ球系細胞特異的かつ発生的に制御されるエンハンサーエレメントとなり得る。この核酸配列は、バーキットリンパ腫細胞株及び形質細胞腫細胞株においてｃ－ｍｙｃ遺伝子と連結されると同様の発現パターンを導き得ることが観察されている。バーキットリンパ腫及び形質細胞腫では、Ｂ細胞ＬＣＲによるｃ－ｍｙｃの制御が生じており、この制御は、ｃ－ｍｙｃ遺伝子がＩｇＨ配列と並置するようになる特徴的な染色体転座が生じ、それによって異常なｃ－ｍｙｃ転写が生じることによるものである。Ｂ細胞ＬＣＲの追加の説明については、例えば、Ｍａｄｉｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．１８（１１）：６２８１－９２，１９９８、Ｇｉａｎｎｉｎｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５０：１７７２－１７８０，１９９３、Ｍａｄｉｓｅｎ　＆　Ｇｒｏｕｄｉｎｅ，Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖ．８：２２１２－２２２６，１９９４、及びＭｉｃｈａｅｌｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２３：９７５－９８１，１９９５において見つけることができる。

【０３８８】

発現コンストラクトは、ｍＲＮＡ転写産物の安定性を増進させる領域（例えば、インスレーター及び／またはポリＡ尾部）をさらに含み得る。

【０３８９】

Ｉ（Ｃ）（ｉｉ）（ｃ）．マイクロＲＮＡ部位制御配列

さまざまな実施形態において、マイクロＲＮＡ（またはｍｉＲＮＡ）制御系は、マイクロＲＮＡ部位（例えば、マイクロＲＮＡが相互作用し得る核酸配列）の存在によって遺伝子の発現が制御される方法または組成物を指し得る。さまざまな実施形態において、本開示は、発現産物をコードする核酸配列がｍｉＲＮＡ標的部位と機能可能なように連結され、その結果、対応ｍｉＲＮＡの存在、レベル、活性、及び／またはそれとの接触によってそうした発現産物の発現が制御されるペイロードを含むＡｄ３５ドナーベクターを含む。さまざまな実施形態において、ｍｉＲＮＡ部位は、ｍｉＲ４２３－５、ｍｉＲ４２３－５ｐ、ｍｉＲ４２－２、ｍｉＲ１８１ｃ、ｍｉＲ１２５ａ、ｍｉＲ１５ａ、ｍｉＲ１８７、及び／またはｍｉＲ２１８のいずれかから選択されるｍｉＲＮＡに対する標的部位である。誤解を避けるために記載すると、本開示は、ｍｉＲＮＡ部位（例えば、本明細書に開示のもの）と機能可能なように連結される核酸配列が、例えば、本明細書で提供される１つ

以上の発現産物のいずれかをコードする核酸配列であり得ることを企図する。

【０３９０】

特定の実施形態では、標的細胞（ＨＳＰＣ（例えば、腫瘍浸潤性ＨＳＰＣ）など）において遺伝子が排他的に発現するように当該遺伝子の発現がマイクロＲＮＡ制御系によって制御された。いくつかの実施形態では、目的タンパク質または目的核酸（例えば、抗がん剤（ＣＡＲ、ＴＣＲ、抗体、及び／またはチェックポイント阻害剤（例えば、チェックポイント阻害剤であるαＰＤ－Ｌ１抗体（例えば、αＰＤ－Ｌ１γ１抗体））など）をコードする核酸（例えば、治療用遺伝子）は、マイクロＲＮＡ部位、複数の同じマイクロＲＮＡ部位、もしくは複数の異なるマイクロＲＮＡ部位を含むか、それと結び付けられるか、またはそれと機能可能なように連結される。目的遺伝子をコードする配列を有する核酸またはその一部とマイクロＲＮＡ部位とを結び付ける手段及び手法を当業者なら知っているであろうが、本明細書ではある特定の非限定的な例が示される。例えば、目的遺伝子（例えば、αＰＤ－Ｌ１γ１抗体をコードする配列）は、腫瘍浸潤性白血球細胞ではない細胞での発現は抑制するが、腫瘍浸潤性白血球での発現は抑制しない１つ以上のマイクロＲＮＡ部位が存在することによって目的遺伝子の発現が制御されるように核酸中に存在し得る。ある特定の具体例では、目的遺伝子（例えば、αＰＤ－Ｌ１γ１抗体をコードする配列）は、腫瘍浸潤性白血球細胞ではない細胞での発現は抑制するが、腫瘍浸潤性白血球での発現は抑制しない１つ以上のｍｉＲ４２３－５ｐマイクロＲＮＡ部位が存在することによって目的遺伝子の発現が制御されるように核酸中に存在し得る。さまざまな実施形態において、マイクロＲＮＡ制御系は、１つ以上のマイクロＲＮＡ部位（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０個、もしくはそれを超える数のマイクロＲＮＡ部位）を含む核酸を含むか、または１つ以上のマイクロＲＮＡ部位（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０個、もしくはそれを超える数のマイクロＲＮＡ部位）によって目的タンパク質もしくは目的核酸の発現が制御される核酸を含み得る。さまざまな実施形態において、マイクロＲＮＡ制御系は、１つ以上のｍｉＲ４２３－５ｐマイクロＲＮＡ部位（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０個、もしくはそれを超える数のｍｉＲ４２３－５ｐマイクロＲＮＡ部位）を含む核酸を含むか、または１つ以上のｍｉＲ４２３－５ｐマイクロＲＮＡ部位（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０個、もしくはそれを超える数のｍｉＲ４２３－５ｐマイクロＲＮＡ部位）によって目的タンパク質もしくは目的核酸の発現が制御される核酸を含み得る。いくつかの特定の実施形態では、マイクロＲＮＡ制御系は、１つ以上のｍｉＲ４２３－５ｐマイクロＲＮＡ部位（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０個、もしくはそれを超える数のｍｉＲ４２３－５ｐマイクロＲＮＡ部位（例えば、ｍｉＲ４２３－５ｐマイクロＲＮＡ部位））を含むαＰＤ－Ｌ１γ１抗体コード核酸を含むか、または１つ以上のｍｉＲ４２３－５ｐマイクロＲＮＡ部位（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０個、もしくはそれを超える数のｍｉＲ４２３－５ｐマイクロＲＮＡ部位（例えば、ｍｉＲ４２３－５ｐマイクロＲＮＡ部位））によってαＰＤ－Ｌ１γ１抗体の発現が制御されるαＰＤ－Ｌ１γ１抗体コード核酸を含み得る。

【０３９１】

さまざまな実施形態において、マイクロＲＮＡ部位は、機能可能なように連結されたコード配列（例えば、ＣＲＩＳＰＲ酵素、塩基編集酵素、またはｇＲＮＡをコードするコード配列）がＨＤＡｄ３５ドナーベクター産生の間に産生細胞において発現することを抑制する配列であり得る（例えば、Ｓａｙｄａｍｉｎｏｖａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．Ｍｅｔｈ．Ｃｌｉｎ．Ｄｅｖ．１：１４０５７，２０１５、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．Ｍｅｔｈ．Ｃｌｉｎ．Ｄｅｖ．９：３９０－４０１，２０１８を参照のこと）。

【０３９２】

Ｉ（Ｃ）（ｉｉｉ）．選択配列

特定の実施形態では、ベクターは、選択カセットを含む選択エレメントを含む。特定の

実施形態では、選択カセットは、プロモーター、選択剤に対する耐性を付加または付与するｃＤＮＡ、及びこの独立した転写エレメントの転写を停止することを可能にするポリＡ配列を含む。

【０３９３】

選択カセットは、（ａ）抗生物質もしくは他の毒素に対する耐性を付与する、（ｂ）栄養要求性の欠損を補完する、または（ｃ）複合培地からは利用不可能な必須栄養素を供給する、１つ以上のタンパク質をコードし得る（例えば、Ｂａｃｉｌｌｉに対するＤ－アラニンラセマーゼコード遺伝子）。形質転換された細胞株の回収には任意の数の選択系が使用され得る。特定の実施形態では、陽性選択カセットは、ネオマイシンに対する耐性遺伝子、ハイグロマイシンに対する耐性遺伝子、アンピシリンに対する耐性遺伝子、ピューロマイシンに対する耐性遺伝子、フレオマイシンに対する耐性遺伝子、ゼオマイシンに対する耐性遺伝子、ブラストサイジンに対する耐性遺伝子、バイオマイシンに対する耐性遺伝子を含む。特定の実施形態では、陽性選択カセットは、メトトレキサートに対する耐性を付与するＤＨＦＲ（ジヒドロ葉酸還元酵素）遺伝子、$O^6$ＢＧ／ＢＣＮＵに対する耐性を担う$MGMT^{P140K}$遺伝子、ＨＡＴ選択培地中に存在する特定の塩基（アミノプテリン、ヒポキサンチン、チミジン）の変換を担うＨＰＲＴ（ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ）遺伝子、及びいくつかの薬剤と関連する他の解毒用遺伝子を含む。特定の実施形態では、選択剤は、ネオマイシン、ハイグロマイシン、ピューロマイシン、フレオマイシン、ゼオマイシン、ブラストサイジン、バイオマイシン、アンピシリン、$O^6$ＢＧ／ＢＣＮＵ、メトトレキサート、テトラサイクリン、アミノプテリン、ヒポキサンチン、チミジンキナーゼ、ＤＨＦＲ、Ｇｌｎ合成酵素、またはＡＤＡを含む。

【０３９４】

特定の実施形態では、陰性選択カセットは、培養培地中に存在する基質を毒性物質へと変換するための遺伝子を含み、この遺伝子を発現する細胞は、当該毒性物質から毒性を受ける。こうした分子には、ジフテリア毒素（ＤＴＡ）の解毒遺伝子（Ｙａｇｉ ｅｔ ａｌ．，Ａｎａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍ．２１４（１）：７７－８６，１９９３、Ｙａｎａｇａｗａ ｅｔ ａｌ．，Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ Ｒｅｓ．８（３）：２１５－２２１，１９９９）、ガンシクロビルまたはＦＩＡＵの存在に感受性のヘルペスウイルス（ＨＳＶ ＴＫ）のキナーゼチミジン遺伝子が含まれる。ＨＰＲＴ遺伝子は、培地に６－チオグアニン（６ＴＧ）を添加することによって陰性選択としても使用され得る。さらには、すべての陽性選択及び陰性選択について、起源の異なるポリＡ転写終結配列（最も古典的なものはＳＶ４０ポリＡ由来のもの、または真核生物遺伝子ポリＡ（ウシ成長ホルモン、ウサギβ－グロビンなど））。

【０３９５】

特定の実施形態では、選択カセットは、Ｏｌｓｚｋｏ ｅｔ ａｌ．（Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ２２：５９１－５９５，２０１５）に記載の$MGMT^{P140K}$を含む。特定のエレメントでは、選択剤は、$O^6$ＢＧ／ＢＣＮＵを含む。

【０３９６】

薬物耐性遺伝子ＭＧＭＴがコードするヒトアルキルグアニントランスフェラーゼ（ｈＡＧＴ）は、アルキル化剤（ニトロソ尿素及びテモゾロミド（ＴＭＺ）など）の細胞毒性作用に対する耐性を付与するＤＮＡ修復タンパク質である。６－ベンジルグアニン（６－ＢＧ）は、ニトロソ尿素毒性を増強するＡＧＴ阻害剤であり、ＴＭＺと同時投与することでこの薬剤の細胞毒性作用が増強される。ＡＧＴのバリアントをコードするいくつかの変異形態のＭＧＭＴは、６－ＢＧによる不活化に高度に耐性であるが、ＤＮＡ損傷を修復するその能力は保持している（Ｍａｚｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｅｘｐ．Ｔｈｅｒ．２９０：１４６７－１４７４，１９９９）。$MGMT^{P140K}$ベースの薬物耐性遺伝子治療は、マウス細胞、イヌ細胞、アカゲザル細胞、及びヒト細胞、具体的には造血細胞に対して化学防御を付与することが示されている（Ｚｉｅｌｓｋｅ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１１２：１５６１－１５７０，２００３、Ｐｏｌｌｏｋ ｅｔ ａｌ．Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．１４：１７０３－１７１４，２００３、Ｇｅ

ｒｕｌｌ ｅｔ ａｌ．Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．１８：４５１－４５６，２００７、Ｎｅｆｆ ｅｔ ａｌ．Ｂｌｏｏｄ １０５：９９７－１００２，２００５、Ｌａｒｏｃｈｅｌｌｅ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１１９：１９５２－１９６３，２００９、Ｓａｗａｉ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．３：７８－８７，２００１）。

【０３９７】

特定の実施形態では、インビボ選択カセットとの組み合わせは、遺伝子が修正された細胞に選択的な優位性が伴わない疾患に対する決定的な要素となる。例えば、ＳＣＩＤ及びいくつかの他の免疫不全ならびにＦＡでは、細胞が修正されると、そうした細胞は優位性を有するようになり、「少数」のＨＳＰＣに治療用遺伝子が形質導入されるだけで、治療効果を得るには十分である。細胞が競争上の優位性を示さない他の疾患（異常ヘモグロビン症（すなわち、鎌状赤血球症及びサラセミア）のような疾患）については、遺伝子が修正された細胞のインビボでの選択（インビボ選択カセット（ＭＧＭＴ$^{Ｐ１４０Ｋ}$など）と組み合わせて行われるものなど）によって少数の形質導入ＨＳＰＣが選択されることになり、これによってそうした遺伝子修正細胞を増加させることが可能になり、治療効果が達成される。この手法は、ＨＳＰＣをエクスビボでの遺伝子改変に供するのではなく、ＨＳＰＣをインビボでＨＩＶ抵抗性にすることによってＨＩＶにも適用され得る。

【０３９８】

Ｉ（Ｃ）（ｉｖ）．スタッファー配列

特定の実施形態では、ベクターは、スタッファー配列を含む。特定の実施形態では、スタッファー配列は、ゲノムのサイズを野生型の長さに近づけるために付加され得る。スタッファーは、長さの延長が意図される機能的に不活性な配列を定義することを意図するものとして当該技術分野で一般的に認識されている用語である。

【０３９９】

スタッファー配列は、ベクターの効率的なパッケージング及び安定性を達成するために使用される。特定の実施形態では、スタッファー配列は、ゲノムサイズを野生型ウイルスのものの７０％～１１０％にするために使用される。

【０４００】

スタッファー配列は、任意のＤＮＡであり、好ましくは、哺乳動物起源のＤＮＡであり得る。本発明の好ましい実施形態では、スタッファー配列は、哺乳動物起源の非コード配列であり、例えば、イントロン断片である。

【０４０１】

スタッファー配列は、ベクターのサイズを所定のサイズに保つために使用される場合、分裂細胞または非分裂細胞においてゲノムを安定に保持することを可能にする任意の非コード配列またはコード配列であり得る。こうした配列は、他のウイルスゲノム（例えば、エプスタイン・バーウイルス）または生物（例えば酵母）に由来し得る。例えば、こうした配列は、セントロメア及び／またはテロメアの機能性部分であり得る。

【０４０２】

Ｉ（Ｃ）（ｖ）．ペイロード組み込み及びサポートベクター

遺伝子治療は、多くの場合、所望の核酸ペイロードを標的細胞のゲノムに組み込むことを必要とする。宿主または標的細胞ゲノムへのペイロードの組み込みにはさまざまな系が設計及び／または使用され得る。さまざまなそのような系は、ある特定のペイロード配列領域ならびにサポートベクター及びサポートゲノム（サポートゲノム）の１つ以上を含み得る。

【０４０３】

宿主細胞ゲノムにペイロードを組み込むアデノウイルスベクターを操作する手段の１つは、組み込みウイルスハイブリッドベクターを得ることである。組み込みウイルスハイブリッドベクターでは、標的細胞の形質導入を効率的に生じさせるベクターの遺伝エレメントと、自体のベクターペイロードを安定的に組み込むベクターの遺伝エレメントと、が統合される。目的の組み込みエレメント（例えば、アデノウイルスベクターと組み合わせて使用するためのもの）には、バクテリオファージインテグラーゼＰＨｉＣ３１のもの、レ

トロトランスポゾンのもの、レトロウイルスのもの（例えば、ＬＴＲが介在するものまたはレトロウイルス組み込みが介在するもの）、ジンクフィンガーヌクレアーゼのもの、ＤＮＡ結合ドメイン－レトロウイルスインテグラーゼ融合タンパク質のもの、ＡＡＶのもの（例えば、ＡＡＶ－ＩＴＲが介在するものまたはＡＡＶ－Ｒｅｐタンパク質が介在するもの）、及びＳｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙ（ＳＢ）トランスポゼースのものが含まれる。

【０４０４】

本明細書に記載のＡｄ３５ベクターは、トランスポゼース及びトランスポゾンを含めて、転位性エレメントを任意選択で含み得る。トランスポゼースには、レトロトランスポゾン由来またはレトロウイルス起源のインテグラーゼ、ならびに転位能力を有する機能性の核酸－タンパク質複合体の構成要素である転位媒介酵素が含まれ得る。転位反応には、トランスポゾン及びトランスポゼースまたはインテグラーゼ酵素が関与する。特定の実施形態では、そのような転位性エレメントを使用することによって組み込みの効率、組み込まれ得るＤＮＡ配列のサイズ、及びゲノムに組み込まれ得るＤＮＡ配列のコピー数が改善され得る。トランスポゾンは、より大きなＤＮＡセグメントの上流及び下流に短い末端反復核酸配列を含む。トランスポゼースは、これらの末端反復配列に結合し、ゲノムの別の部分へのトランスポゾンの移動を触媒する。

【０４０５】

当該技術分野では、ヒトを含めて、脊椎動物のゲノムへの核酸の挿入を促進するトランスポゼースが多く報告されている。そのようなトランスポゼースの例としては、ｓｌｅｅｐｉｎｇ ｂｅａｕｔｙ（「ＳＢ」、例えば、サケ科魚類のゲノム由来のもの）、ｐｉｇｇｙｂａｃ（例えば、鱗翅目の細胞及び／またはＭｙｏｔｉｓ ｌｕｃｉｆｕｇｕｓに由来するもの）、ｍａｒｉｎｅｒ（例えば、ショウジョウバエ由来のもの）、ｆｒｏｇ ｐｒｉｎｃｅ（例えば、Ｒａｎａ ｐｉｐｉｅｎｓ由来のもの）、Ｔｏｌ１、Ｔｏｌ２（例えば、メダカ魚類由来のもの）、ＴｃＢｕｓｔｅｒ（例えば、コクヌストモドキＴｒｉｂｏｌｉｕｍ ｃａｓｔａｎｅｕｍ由来のもの）、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ、Ｈｉｍａｒ１、Ｐａｓｓｐｏｒｔ、Ｍｉｎｏｓ、Ａｃ／Ｄｓ、ＰＩＦ、Ｈａｒｂｉｎｇｅｒ、Ｈａｒｂｉｎｇｅｒ３－ＤＲ、ＨＳｍａｒ１、及びｓｐｉｎＯＮが挙げられる。

【０４０６】

ＰｉｇｇｙＢａｃ（ＰＢ）トランスポゼースは、コンパクトな機能性トランスポゼースタンパク質であり、このタンパク質については、例えば、Ｆｒａｓｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｓｅｃｔ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１９９６，５，１４１－５１、Ｍｉｔｒａ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．，２００８，２７，１０９７－１１０９、Ｄｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ，２００５，１２２，４７３－８３、ならびに米国特許第６，２１８，１８５号、同第６，５５１，８２５号、同第６，９６２，８１０号、同第７，１０５，３４３号、及び同第７，９３２，０８８号に記載されている。高活性ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゼースについては、ＵＳ１０，１３１，８８５に記載されている。

【０４０７】

特定の実施形態では、ＰＢトランスポゼースは、配列番号２９１に示される配列（ＧｅｎＢａｎｋ ＡＢＳ１２１１１．１）を有する。

【０４０８】

特定の実施形態では、Ｆｒｏｇ Ｐｒｉｎｃｅトランスポゼースは、配列番号２９２に示される配列（ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＡＰ４９００９．１）を有する。ＵＳ２００５／０２４１００７も併せて参照のこと。

【０４０９】

特定の実施形態では、ＴｃＢｕｓｔｅｒトランスポゼースは、配列番号２９３に示される配列（ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＢＦ２０５４５．１）を有する。

【０４１０】

特定の実施形態では、Ｔｏｌ２トランスポゼースは、配列番号２９４に示される配列（ＧｅｎＢａｎｋ：ＢＡＡ８７０３９．１）を有する。

【０４１１】

ＤＮＡトランスポゾンに関する追加の情報については、例えば、Ｍｕｎｏｚ－Ｌｏｐｅｚ ＆ Ｇａｒｃｉａ Ｐｅｒｅｚ，Ｃｕｒｒ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ，１１（２）：１１５－１２８，２０１０にて見つけることができる。

【０４１２】

Ｓｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙについては、Ｉｖｉｃｓ ｅｔ ａｌ．Ｃｅｌｌ ９１，５０１－５１０，１９９７、Ｉｚｓｖａｋ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，３０２（１）：９３－１０２，２０００、Ｇｅｕｒｔｓ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，８（１）：１０８－１１７，２００３、Ｍａｔｅｓ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ４１：７５３－７６１，２００９、ならびに米国特許第６，４８９，４５８号、同第７，１４８，２０３号、及び同第７，１６０，６８２号、ＵＳ公開公報第２０１１／１１７０７２号、同第２００４／０７７５７２号、及び同第２００６／２５２１４０号に記載されている。ある特定の実施形態では、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙトランスポゼース酵素は、配列番号７３の配列を有する。特定の実施形態では、高活性Ｓｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙ（ＳＢ１００ｘ）トランスポゼース酵素は、配列番号７４の配列を有する。

【０４１３】

ＳＢトランスポゼースの活性を上昇させるために合成的な変異導入試験が行われている。例えば、Ｙａｎｔ ｅｔ ａｌ．は、ＳＢトランスポゼースのＮ末端に位置する９５個のＡＡを合成的にアラニンに換えることを行った（Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．２４：９２３９－９２４７，２００４）。こうした置換のうちの１０個によって、参照としてのＳＢ１０と比較して活性が２００～４００％に高まった。Ｂａｕｓ ｅｔ ａｌ．（Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ １２：１１４８－１１５６，２００５）ではＳＢ１６について記載されており、このＳＢ１６は、ＳＢ１０と比較して活性が１６倍に上昇していることが報告された。追加の高活性ＳＢバリアントについては、Ｚａｙｅｄ ｅｔ ａｌ．（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ ９（２）：２９２－３０４，２００４）及びＵＳ９，８４０，６９６に記載されている。

【０４１４】

ＳＢトランスポゾンは、転位するには環状化する必要がある（Ｙａｎｔ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，２０：９９９－１００５，２００２）。さらに、１．９～７．２ｋｂのトランスポゾンについては、トランスポゾンの長さと転位頻度との間に直線的な逆比例関係が存在する。換言すれば、トランスポゾンが長いほど、それよりも短いトランスポゾンと比較してＳＢトランスポゼースが媒介する送達の効率が低下する（Ｇｅｕｒｔｓ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．，８（１）：１０８－１７，２００３）。

【０４１５】

ＳＢトランスポゼースは、ＳＢ ＩＴＲ間に位置する核酸トランスポゾンペイロードを転位させる。当該技術分野では、さまざまなＳＢ ＩＴＲが知られている。いくつかの実施形態では、ＳＢ ＩＴＲは、トランスポゼースの認識シグナルとして働く長さ３２ｂｐの不完全な同方向反復配列を含む２３０ｂｐの配列である。ｐＴ、ｐＴ２、ｐＴ３、ｐＴ２Ｂ、及びｐＴ４として知られるＳＢ ＩＴＲを含めて、当該技術分野では操作されたＳＢ ＩＴＲが知られている。いくつかの実施形態では、ｐＴ４ ＩＴＲが使用されて、例えば、本開示のトランスポゾンペイロード（例えば、ＳＢ１００ｘトランスポゼースによる転位のためのもの）と隣接配置される。

【０４１６】

特定の実施形態では、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ ＢｅａｕｔｙのＩＲ（逆方向反復配列）／ＤＲ（同方向反復配列）及び染色体配列をコードする配列は、配列番号４の配列を含む。特定の実施形態では、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ ＢｅａｕｔｙのＩＲ／ＤＲ及び染色体配列をコードする配列は、配列番号５の配列を含む。特定の実施形態では、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ ＢｅａｕｔｙのＩＲ／ＤＲコード配列は、配列番号２９５の配列を含む。特定の実施形態では、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ ＢｅａｕｔｙのＩＲ／ＤＲ及び染色体配列をコードする配列は、配

列番号２９６の配列を含む。特定の実施形態では、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　ＢｅａｕｔｙのＩＲ／ＤＲ及び染色体配列をコードする配列は、配列番号２９７の配列を含む。特定の実施形態では、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　ＢｅａｕｔｙのＩＲ／ＤＲをコードする配列は、配列番号２９８の配列を含む。特定の実施形態では、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　ＢｅａｕｔｙのＩＲ／ＤＲ及び染色体配列をコードする配列は、配列番号２９９の配列を含む。特定の実施形態では、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　ＢｅａｕｔｙのＩＲ／ＤＲをコードする配列は、配列番号３００の配列を含む。

【０４１７】

さまざまな実施形態において、Ａｄ３５ドナーベクターまたはＡｄ３５ドナーゲノムは、β－グロビン発現産物またはγ－グロビン発現産物をコードする少なくとも１つのコード配列を含む組み込みエレメントと隣接するＳＢ１００ｘトランスポゾン逆方向反復配列を含むペイロードを含む。

【０４１８】

さまざまな実施形態において、アデノウイルス転位系は、トランスポゾン逆方向反復配列と隣接する組み込みエレメントを含むＡｄ３５ドナーベクターまたはＡｄ３５ドナーゲノムを含むと共に、アデノウイルスサポートベクターまたはアデノウイルスサポートゲノムをさらに含み得る。さまざまな実施形態において、サポートベクターは、（ｉ）アデノウイルスカプシド、及び（ｉｉ）組み込みエレメントと隣接する逆方向反復配列に対応するトランスポゼースをコードする核酸配列を含むアデノウイルスサポートゲノム、を含む。したがって、さまざまな実施形態において、サポートベクターまたはサポートゲノムの少なくとも１つの機能は、標的細胞に投与されるドナーベクター中に存在する組み込みエレメントを転位させるためのトランスポゼースをコードし、発現させ、及び／または標的細胞へと送達することであり得る。例えば、いくつかの実施形態では、Ａｄ３５ドナーベクターまたはＡｄ３５ドナーゲノムは、β－グロビン発現産物またはγ－グロビン発現産物をコードする少なくとも１つのコード配列を含む組み込みエレメントと隣接するＳＢ１００ｘトランスポゾン逆方向反復配列を含み、サポートベクターまたはサポートゲノムは、ＳＢ１００ｘトランスポゼースをコードするコード配列を含む。ある特定の実施形態では、組み込みエレメントは、リコンビナーゼ同方向反復配列と隣接し、例えば、組み込みエレメントは、トランスポゾン逆方向反復配列と隣接し、トランスポゾン逆方向反復配列は、リコンビナーゼ同方向反復配列と隣接する。ある特定のそのような実施形態では、サポートベクターまたはサポートゲノムの少なくとも１つの機能は、標的細胞に投与されるドナーベクター中に存在するリコンビナーゼ部位での組換えを生じさせるためのリコンビナーゼをコードし、発現させ、及び／または標的細胞へと送達することであり得る。さまざまな実施形態において、サポートベクターまたはサポートゲノムは、標的細胞に投与されるドナーベクター中に存在するリコンビナーゼ部位での組換えを生じさせるためのリコンビナーゼをコードし、発現させ、及び／または標的細胞へと送達すると共に、標的細胞に投与されるドナーベクター中に存在する組み込みエレメントを転位させるためのトランスポゼースもコードし、発現させ、及び／または標的細胞へと送達し得る。

【０４１９】

本明細書に開示の特定の実施形態では、部位特異的リコンビナーゼ系も使用される。こうした実施形態では、トランスポゼース認識逆方向反復配列を含むトランスポゾンは、少なくとも１つの治療用遺伝子に加えて、少なくとも１つのリコンビナーゼ認識部位も含む。したがって、特定の実施形態では、本開示は、治療用遺伝子をゲノムに組み込む方法も提供し、この方法は、（ａ）治療用遺伝子を含むトランスポゾン（この治療用遺伝子は、（ｉ）トランスポゼースによって認識される逆方向反復配列配列及び（ｉｉ）リコンビナーゼ認識部位と隣接する）と、ｂ）プラスミド、エピソーム、または導入遺伝子から治療用遺伝子を切除し、この治療用遺伝子をゲノムに組み込むように働くトランスポゼース及びリコンビナーゼと、を投与することを含む。いくつかの実施形態では、（ｂ）のタンパク質（複数可）は、そうしたタンパク質（複数可）をコードする核酸として投与される。いくつかの実施形態では、トランスポゾンと、（ｂ）のタンパク質（複数可）をコードす

る核酸とは、別々のベクター上に存在する。いくつかの実施形態では、トランスポゾンと、（ｂ）のタンパク質（複数可）をコードする核酸とは、同じベクター上に存在する。同じベクター上に存在する場合、ベクターのうちで（ｂ）のタンパク質（複数可）をコードする部分は、（ａ）のトランスポゾンを保有する部分の外側に位置する。換言すれば、トランスポゼース及び／またはリコンビナーゼをコードする領域は、逆方向反復配列及び／またはリコンビナーゼ認識部位と隣接する領域の外側に位置する。前述の方法では、トランスポゼースタンパク質は、挿入核酸（標的細胞ゲノムへと挿入されるべき核酸など）と隣接する逆方向反復配列を認識する。リコンビナーゼ及びリコンビナーゼ認識部位を使用することで、ゲノムに組み込まれ得るトランスポゾンのサイズがさらに増加し得る。

【０４２０】

リコンビナーゼ系の例としては、Ｆｌｐ／Ｆｒｔ系、Ｃｒｅ／ｌｏｘＰ系、Ｄｒｅ／ｒｏｘ系、Ｖｉｋａ／ｖｏｘ系、及びＰｈｉＣ３１系が挙げられる。

【０４２１】

Ｆｌｐ／ＦｒｔＤＮＡリコンビナーゼ系は、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅから単離された。Ｆｌｐ／Ｆｒｔ系は、Ｆｒｔ認識部位でのＤＮＡ組換えを触媒するリコンビナーゼＦｌｐ（フリッパーゼ）を含む。特定の実施形態では、Ｆｌｐ（フリッパーゼ）は、配列番号７５の配列を含み、ＦＲＴ認識部位は、配列番号７６の配列を含む。

【０４２２】

Ｆｌｐタンパク質のバリアントには、配列番号７７（ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＢＤ５７３５６．１）及び配列番号７８（ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＮＷ６１８８８．１）が含まれる。

【０４２３】

Ｃｒｅ／ｌｏｘＰ系については、例えば、ＥＰ０２２０００９Ｂ１に記載されている。Ｃｒｅは、バクテリオファージＰ１から単離された部位特異的ＤＮＡリコンビナーゼである。特定の実施形態では、Ｃｒｅは、配列番号７９の配列を含む。

【０４２４】

Ｃｒｅタンパク質の認識部位は、３４塩基対のヌクレオチド配列（ｌｏｘＰ部位（配列番号８０））である。Ｃｒｅは、１３塩基対の逆方向反復配列に結合し、鎖の切断及びスペーサー領域内での再ライゲーションを触媒することによって３４ｂｐのｌｏｘＰ　ＤＮＡ配列を組換える。Ｃｒｅによってスペーサー領域に生じるＤＮＡ切断はずれたものであり、これらのＤＮＡ切断は６塩基対分離れていることで、相同性センサーとして働く重複領域が生じて、同じ重複領域を有する組換え部位のみが確実に組換わる。同様に使用され得るｌｏｘ認識部位のバリアントには、ｌｏｘ２２７２（配列番号８１）、ｌｏｘ５１１（配列番号８２）、ｌｏｘ６６（配列番号８３）、ｌｏｘ７１（配列番号８４）、ｌｏｘＭ２（配列番号８５）、及びｌｏｘ５１７１（配列番号８６）が含まれる。

【０４２５】

ＶＣｒｅ／ＶｌｏｘＰリコンビナーゼ系は、ビブリオプラスミドｐ０９０８から単離された。特定の実施形態では、この系のＶＣｒｅリコンビナーゼは、配列番号８７の配列を含み、ＶｌｏｘＰ認識部位は、配列番号８８の配列を含む。

【０４２６】

ｓＣｒｅ／ＳｌｏｘＰ系については、ＷＯ２０１０／１４３６０６に記載されている。Ｄｒｅ／ｒｏｘ系については、ＵＳ７，４２２，８８９及びＵＳ７，９１５，０３７Ｂ２に記載されている。Ｄｒｅ／ｒｏｘ系は、一般に、配列番号８９の配列を有する腸内細菌ファージＤ６から単離されたＤｒｅリコンビナーゼ、及びｒｏｘ認識部位（配列番号９０）を含む。

【０４２７】

Ｖｉｋａ／ｖｏｘ系については、米国特許第１０，２５３，３３２号に記載されている。さらに、ＰｈｉＣ３１リコンビナーゼは、ＡｔｔＢ／ＡｔｔＰ結合部位を認識する。

【０４２８】

トランスポゾン（逆方向反復配列及び／またはリコンビナーゼ認識部位を含む）を含む

ベクター核酸、これに加えて多くの実施形態ではトランスポゼース及び／またはリコンビナーゼをコードするベクター核酸、が細胞に導入される量は、トランスポゾン核酸が望まれるように切除され、標的細胞ゲノムに挿入される上で十分なものである。したがって、導入されるベクター核酸の量は、トランスポゼース活性及び／またはリコンビナーゼ活性が十分なものとなる量、及び標的細胞ゲノムに挿入されることが望まれるトランスポゾンのコピー数が十分なものとなる量を与えることになる。特定の実施形態は、トランスポゾンとトランスポゼース／リコンビナーゼとを１：１、１：２、または１：３の比で含む。

【０４２９】

対象方法を用いると、標的細胞ゲノムへの核酸の安定な組み込みが生じる。安定な組み込みは、一過性の期間よりも長く標的細胞ゲノム中に核酸が残存し、染色体遺伝物質の一部として標的細胞の子孫に受け継がれることが意図される。

【０４３０】

本開示の実施例２では、高活性Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙトランスポゼースを使用することで、３２．４ｋｂのトランスポゾンをＨＳＰＣのゲノムに組み込むことができるといういう驚くべき結果について記載される。こうした実施形態は、ＳＢＸ１００とＦｌｐ／Ｆｒｔ系とを併用することを含む（図２３に示される）。

【０４３１】

これまでに示されたように、特定の実施形態では、相同組換え修復を利用して遺伝的コンストラクトが標的に挿入されることを促進するためにホモロジーアームが利用される。ホモロジーアームは、切断部位におけるゲノム配列との相同性が十分な任意の長さを有することで、当該ホモロジーアームと当該ホモロジーアームが相同性を有するゲノム配列との間でのＨＤＲが支援され得る（例えば、切断部位と隣接するヌクレオチド配列との相同性％は、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、または１００％であり、これらの隣接ヌクレオチド配列は、例えば、切断部位から５０塩基以内の位置（例えば、切断部位から３０塩基以内の位置、切断部位から１５塩基以内の位置、切断部位から１０塩基以内の位置、切断部位から５塩基以内の位置、または切断部位のすぐ隣）に存在する）。ホモロジーアームは、一般に、ゲノム配列（例えば、二本鎖切断（ＤＳＢ）が生じるゲノム領域）と同一である。しかしながら、示されるように、絶対的な同一性が必要なわけではない。

【０４３２】

特定の実施形態では、相同組換え修復テンプレートと標的ゲノム配列との間での配列相同性を有するヌクレオチド（ｎｔ）数が２５、５０、１００、もしくは２００、または２００超（あるいは１０～２００の間の任意の整数値またはそれを超える数）であるホモロジーアームが利用され得る。特定の実施形態では、ホモロジーアームの長さは４０～１０００ｎｔである。特定の実施形態では、ホモロジーアームの塩基対数は、５００～２５００、７００～２０００、または８００～１８００である。特定の実施形態では、ホモロジーアームは、少なくとも８００塩基対または少なくとも８５０塩基対を含む。ホモロジーアームの長さは、対称の場合も非対称の場合もあり得る。

【０４３３】

特定の実施形態では、標的ゲノムの対応断片との配列同一性または配列相同性を有する第１のホモロジーアーム及び／または第２のホモロジーアームが利用され、各ホモロジーアームが含むヌクレオチドの数は、少なくとも２５、少なくとも５０、少なくとも１００、少なくとも２００、少なくとも４００、少なくとも６００、少なくとも８００、少なくとも１，０００、少なくとも１，２００、少なくとも１，４００、少なくとも１，６００、少なくとも１，８００、少なくとも２，０００、少なくとも２，５００、もしくは少なくとも３，０００、またはそれを超える数であり得る。いくつかの実施形態では、第１のホモロジーアーム及び／または第２のホモロジーアームはそれぞれ、標的ゲノムの対応断片との配列同一性または配列相同性を有する多くのヌクレオチドを含み、これらのヌクレオチドの数の下限は、２５、５０、１００、２００、４００、６００、８００、１，０００、１，２００、１，４００、１，６００、または１，８００であり、上限は、１，００

０、１，２００、１，４００、１，６００、１，８００、２，０００、２，５００、または３，０００である。いくつかの実施形態では、第１のホモロジーアーム及び／または第２のホモロジーアームはそれぞれ、標的ゲノムの対応断片との配列同一性または配列相同性を有する多くのヌクレオチドを含み、これらのヌクレオチドの数は、４０～１，０００、５００～２，５００、７００～２，０００、もしくは８００～１８００、または少なくとも８００もしくは少なくとも８５０である。第１のホモロジーアームの長さと第２のホモロジーアームの長さとは、同じであるか、同様であるか、または異なり得る。

【０４３４】

ホモロジーアームに関する追加の情報については、Ｒｉｃｈａｒｄｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．３４（３）：３３９－４４，２０１６を参照のこと。

【０４３５】

特定の実施形態では、遺伝的コンストラクト（例えば、細胞内で治療産物を発現させる遺伝子）は、ゲノムセーフハーバー内に正確に挿入される。ゲノムセーフハーバー部位は、新たに組み込まれたＤＮＡを宿主細胞に有害作用を与えることなく予想可能に発現させることが可能な、ゲノムの遺伝子内領域または遺伝子外領域である。有用なセーフハーバーは、コードされるタンパク質が所望のレベルで産生する上で十分な導入遺伝子発現を可能にするものでなくてはならない。ゲノムセーフハーバー部位は、細胞機能を変化させるものであってもならない。ゲノムセーフハーバー部位を同定するための方法については、Ｓａｄｅｌａｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ １２：５１－５８，２０１２、及びＰａｐａｐｅｔｒｏｕ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２９（１）：７３－８，２０１１に記載されている。特定の実施形態では、ゲノムセーフハーバー部位は、下記の基準のうちの１つ以上（１つ、２つ、３つ、４つ、または５つ）を満たす：（ｉ）いずれの遺伝子の５’末端からの距離が少なくとも５０ｋｂであること、（ｉｉ）いずれのがん関連遺伝子からの距離が少なくとも３００ｋｂであること、（ｉｉｉ）オープン／アクセシブルクロマチン構造内に位置すること（天然のヌクレアーゼまたは操作されたヌクレアーゼでのＤＮＡ切断によって測定される）、（ｉｖ）遺伝子転写単位の外側に位置すること、及び（ｖ）ゲノムの超保存領域（ＵＣＲ）、マイクロＲＮＡ、または長鎖非コードＲＮＡの外側に位置すること。

【０４３６】

特定の実施形態では、ゲノムセーフハーバーの基準を満たすために、クロマチン部位は、既知のがん遺伝子から１５０ｋｂ超離れており、既知の転写開始部位から３０ｋｂ超離れており、かつコードｍＲＮＡと重複してはならない。特定の実施形態では、ゲノムセーフハーバーの基準を満たすために、クロマチン部位は、既知がん遺伝子から２００ｋｂ超離れており、既知の転写開始部位から４０ｋｂ超離れており、かつコードｍＲＮＡと重複してはならない。特定の実施形態では、ゲノムセーフハーバーの基準を満たすために、クロマチン部位は、既知のがん遺伝子から３００ｋｂ超離れており、既知の転写開始部位から５０ｋｂ超離れており、かつコードｍＲＮＡと重複してはならない。特定の実施形態では、ゲノムセーフハーバーは、前述の基準（既知のがん遺伝子から１５０ｋｂ超、２００ｋｂ超、または３００ｋｂ超離れており、既知の転写開始部位から４０ｋｂ超または５０ｋｂ超離れており、かつコードｍＲＮＡと重複しないこと）を満たし、これに加えて、関連動物モデルの動物とヒトゲノムとの間の相同性％が１００％であることで迅速に関連知見を臨床的な橋渡しとすることが可能である。

【０４３７】

特定の実施形態では、ゲノムセーフハーバーは、本明細書に記載の基準を満たすものであり、当該セーフハーバーにおいて、フォワード方向での組み込みとリバース方向での組み込みとの比が１：１であるレンチウイルスによる組み込みを行って、当該遺伝子座が周辺遺伝物質に影響を及ぼさないものであることもさらに実証される。

【０４３８】

特定のゲノムセーフハーバー部位には、ＣＣＲ５、ＨＰＲＴ、ＡＡＶＳ１、Ｒｏｓａ及びアルブミンが含まれる。適切なゲノムセーフハーバー組み込み部位に関する追加の情報

及び選択肢については、例えば、米国特許第７，９５１，９２５号及び同第８，１１０，３７９号、米国公開公報第２００８／０１５９９９６号、同第２０１０／００２１８２６４号、同第２０１２／００１７２９０号、同第２０１１／０２６５１９８号、同第２０１３／０１３７１０４号、同第２０１３／０１２２５９１号、同第２０１３／０１７７９８３号、及び同第２０１３／０１７７９６０号も併せて参照のこと。

【０４３９】

当該技術分野ではさまざまな技術が知られており、そうした技術を使用することで、特定のゲノム遺伝子座（ゲノムセーフハーバーなど）に組み込みエレメントを直接的に組み込むことができる。例えば、ＡＡＶ介在性の遺伝子標的化、ならびに部位特異的エンドヌクレアーゼ（ジンクフィンガーヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）ヌクレアーゼ）、及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系を使用してＤＮＡ二本鎖切断を導入することによって増進される相同組換えはすべて、所定のゲノム遺伝子座（ゲノムセーフハーバーなど）を標的として外来ＤＮＡを挿入することを媒介し得るツールである。免疫抑制レジメンは、例えば、米国仮出願第６３／００９，２１８号に記載されており、当該文献は、その全体及び特に免疫抑制レジメンに関する部分が参照によって本明細書に組み込まれる。

【０４４０】

ある特定の実施形態では、特定のゲノム遺伝子座（ゲノムセーフハーバーなど）に組み込みエレメントを組み込むことは、ＣＲＩＳＰＲ酵素介在性の標的ゲノム切断を使用する相同組換え組み込みを含み得る。ＣＲＩＳＰＲ酵素（例えば、Ｃａｓ９）は、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）によって特定される部位で二本鎖ＤＮＡを切断する。二本鎖切断は、ドナーテンプレート（左ホモロジーアーム及び右ホモロジーアームを含むＡｄ３５ペイロード組み込みエレメントなど）が存在する場合、相同組換え修復（ＨＤＲ）によって修復され得る。さまざまなそのような方法では、組み込みエレメントは、それが切断標的ゲノムへと挿入するための左ホモロジーアーム及び右ホモロジーアーム（例えば、５００～３，０００ｂｐのもの）を含むという点において「修復テンプレート」である。ＣＲＩＳＰＲ介在性の遺伝子挿入は、ＤＮＡテンプレートの自発的な組換えと比較して桁違いに効率的であり得、このことは、ＣＲＩＳＰＲ介在性の遺伝子挿入が有効なゲノム編集ツールであり得ることを示している。核酸配列を特定のゲノム遺伝子座に相同組換えで組み込む方法の例は当該技術分野で知られており、例えば、Ｒｉｃｈａｒｄｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．３４（３）：３３９－４４，２０１６）に記載されている。

【０４４１】

さまざまな実施形態において、標的細胞ゲノムのゲノムセーフハーバーに挿入するための組み込みエレメントを含むアデノウイルスドナーベクターは、長さが最大で１５ｋｂの核酸配列を組み込むことが可能なものである。さまざまな実施形態において、標的細胞ゲノムのゲノムセーフハーバーに組み込むための組み込みエレメントの長さは、例えば、少なくとも１ｋｂ、少なくとも２ｋｂ、少なくとも３ｋｂ、少なくとも４ｋｂ、少なくとも５ｋｂ、少なくとも６ｋｂ、少なくとも７ｋｂ、少なくとも８ｋｂ、少なくとも９ｋｂ、少なくとも１０ｋｂ、少なくとも１１ｋｂ、少なくとも１２ｋｂ、少なくとも１３ｋｂ、少なくとも１４ｋｂ、または少なくとも１５ｋｂであり得、例えば、その下限は、１ｋｂ、２ｋｂ、３ｋｂ、４ｋｂ、または５ｋｂであり、その上限は、１０ｋｂ、１１ｋｂ、１２ｋｂ、１３ｋｂ、１４ｋｂ、または１５ｋｂである。

【０４４２】

ＩＩ．標的細胞集団

さまざまな実施形態において、本開示のＡｄ３５ドナーベクター及びＡｄ３５ドナーゲノムは、さまざまな型のいずれの標的細胞の形質導入も行うことができ、こうした標的細胞の型には、限定されないが、本明細書に開示のＨＳＣ、Ｔ細胞、Ｂ細胞、及び腫瘍細胞が含まれる。

【０４４３】

ＩＩ（Ａ）．ＨＳＣ

特定の実施形態では、ベクターの標的となる細胞型には、造血幹細胞（ＨＳＣ）が含まれる。ＨＳＣは、ＣＤ４６との結合によってインビボでの遺伝子改変の標的とされる。示されるように、本開示内では、ＨＳＣは、ＣＤ４６との結合によってインビボでの遺伝子改変の標的とされる。本明細書に開示の変異をベクターに含めることで、ＣＤ４６との結合の特異性及び／または強度を上昇させることができる。ＨＳＣは、下記のマーカープロファイルによっても同定され得る：ＣＤ３４＋、Ｌｉｎ－ＣＤ３４＋ＣＤ３８－ＣＤ４５ＲＡ－ＣＤ９０＋ＣＤ４９ｆ＋（ＨＳＣ１）、及びＣＤ３４＋ＣＤ３８－ＣＤ４５ＲＡ－ＣＤ９０－ＣＤ４９ｆ＋（ＨＳＣ２）。ヒトＨＳＣ１は、下記のプロファイルによって同定され得る：ＣＤ３４＋／ＣＤ３８－／ＣＤ４５ＲＡ－／ＣＤ９０＋またはＣＤ３４＋／ＣＤ４５ＲＡ－／ＣＤ９０＋。マウスＬＴ－ＨＳＣは、Ｌｉｎ－Ｓｃａ１＋ｃｋｉｔ＋ＣＤ１５０＋ＣＤ４８－Ｆｌｔ３－ＣＤ３４－によって同定され得る（Ｌｉｎ－は、ＣＤ３、Ｃｄ４、ＣＤ８、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１１ｃ、ＮＫ１．１、Ｇｒ１、及びＴＥＲ１１９を含めて、いずれの成熟細胞マーカーの発現も存在しないことを表す）。特定の実施形態では、ＨＳＣは、ＣＤ１６４＋プロファイルによって同定される。特定の実施形態では、ＨＳＣは、ＣＤ３４＋／ＣＤ１６４＋プロファイルによって同定される。ＨＳＣマーカープロファイルに関する追加の情報については、ＷＯ２０１７／２１８９４８を参照のこと。

【０４４４】

ＩＩ（Ｂ）．Ｔ細胞

Ｔ細胞は、その異なるサブセットがいくつか発見されており、各サブセットが、異なる機能を有する。例えば、Ｔ細胞の大半は、いくつかのタンパク質の複合体として存在するＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を有する。実際のＴ細胞受容体は、２つの別々のペプチド鎖から構成され、これらのペプチド鎖は、独立したＴ細胞受容体アルファ（ＴＣＲα）遺伝子及びＴ細胞受容体ベータ（ＴＣＲβ）遺伝子から生じるものであり、α－ＴＣＲ鎖及びβ－ＴＣＲ鎖と呼ばれる。

【０４４５】

γδＴ細胞は、その表面上に異なるＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を有する小さなＴ細胞サブセットである。γδＴ細胞では、ＴＣＲは、１つのγ－鎖及び１つのδ－鎖から構成される。このＴ細胞群は、αβＴ細胞と比較してはるかに稀なもの（全Ｔ細胞の２％）である。

【０４４６】

ＣＤ３は、すべての成熟Ｔ細胞上に発現する。活性化Ｔ細胞は、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）、ＣＤ６９、及びＣＤ２５を発現する。Ｔ細胞上にはＣＤ５及びトランスフェリン受容体も発現する。

【０４４７】

Ｔ細胞は、ヘルパー細胞（ＣＤ４＋Ｔ細胞）及び細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ、ＣＤ８＋Ｔ細胞）（細胞溶解性Ｔ細胞を含む）にさらに分類することができる。ヘルパーＴ細胞は、数ある機能の中でもとりわけ、形質細胞へのＢ細胞の成熟、ならびに細胞傷害性Ｔ細胞及びマクロファージの活性化を含めて、免疫学的プロセスにおいて他の白血球を支援する。こうした細胞は、その表面上にＣＤ４タンパク質を発現することから、ＣＤ４＋Ｔ細胞としても知られる。ヘルパーＴ細胞は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）の表面上に発現するＭＨＣクラスＩＩ分子によってペプチド抗原の提示を受けると活性化する。ヘルパーＴ細胞は、活性化すると急速に分裂し、サイトカインと呼ばれる低分子タンパク質を分泌し、この低分子タンパク質によって、活性な免疫応答が制御または支援される。

【０４４８】

細胞傷害性Ｔ細胞は、ウイルスに感染した細胞、及び腫瘍細胞を破壊すると共に、移植拒絶反応にも関与する。こうした細胞は、その表面上にＣＤ８糖タンパク質を発現することから、ＣＤ８＋Ｔ細胞としても知られる。こうした細胞は、その標的を、ＭＨＣクラスＩ（体のほぼすべての細胞の表面上に存在する）と結び付いた抗原に結合することによって認識する。

【０４４９】

特定の実施形態では、ＣＡＲは、細胞傷害性Ｔ細胞に発現するように遺伝子改変される。

【０４５０】

本明細書で使用される「セントラルメモリー」Ｔ細胞（または「ＴＣＭ」）は、その表面上に、ナイーブ細胞と比較してＣＤ６２ＬまたはＣＣＲ７及びＣＤ４５ＲＯを発現し、かつＣＤ４５ＲＡを発現しないか、またはＣＤ４５ＲＡの発現が減少している抗原刺激経験ＣＴＬを指す。特定の実施形態では、セントラルメモリー細胞は、ＣＤ６２Ｌ、ＣＣＲ７、ＣＤ２５、ＣＤ１２７、ＣＤ４５ＲＯ、及びＣＤ９５の発現が陽性であり、ナイーブ細胞と比較してＣＤ４５ＲＡの発現が減少している。

【０４５１】

本明細書で使用される「エフェクターメモリー」Ｔ細胞（または「ＴＥＭ」）は、その表面上に、セントラルメモリー細胞と比較してＣＤ６２Ｌを発現しないか、またはＣＤ６２Ｌの発現が減少しており、かつナイーブ細胞と比較してＣＤ４５ＲＡを発現しないか、またはＣＤ４５ＲＡの発現が減少している抗原刺激経験Ｔ細胞を指す。特定の実施形態では、エフェクターメモリー細胞は、ナイーブ細胞またはセントラルメモリー細胞と比較してＣＤ６２Ｌ及びＣＣＲ７の発現が陰性であり、ＣＤ２８及びＣＤ４５ＲＡの発現に可変性を有する。エフェクターＴ細胞は、メモリーＴ細胞またはナイーブＴ細胞と比較してグランザイムＢ及びパーフォリンが陽性である。

【０４５２】

本明細書で使用される「ナイーブ」Ｔ細胞は、セントラルメモリー細胞またはエフェクターメモリー細胞と比較してＣＤ６２Ｌ及びＣＤ４５ＲＡを発現するが、ＣＤ４５ＲＯを発現しない抗原刺激非経験Ｔ細胞を指す。特定の実施形態では、ナイーブＣＤ８＋Ｔリンパ球は、ＣＤ６２Ｌ、ＣＣＲ７、ＣＤ２８、ＣＤ１２７、及びＣＤ４５ＲＡを含めて、ナイーブＴ細胞の表現型マーカーが発現することによって特徴付けられる。

【０４５３】

ＩＩ（Ｃ）．Ｂ細胞

Ｂ細胞は、液性応答のメディエーターであり、抗原に特異的な抗体の産生及び放出を担う。Ｂ細胞には、主要なマーカーによって特徴付けられ得る型がいくつか存在する。一般に、未熟Ｂ細胞は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ３４、ＣＤ３８、及びＣＤ４５Ｒを発現し、成熟するにつれて、ＣＤ１９及びＩｇＭが主要な発現マーカーとなる。

【０４５４】

ＩＩ（Ｄ）．腫瘍

特定の実施形態では、ベクターは、腫瘍を標的とし得る。特定の実施形態では、腫瘍細胞上には存在するが、健康な細胞上には存在しない受容体を標的とすることによって腫瘍が標的とされる。αｖインテグリンとの結合によって腫瘍をインビボでの遺伝子改変の標的とすることができる。αｖインテグリンは、血管新生において重要な役割を果たす。αｖβ３インテグリン及びαｖβ５インテグリンは、正常な内皮細胞には存在しないか、またはその発現レベルが低いものであるが、腫瘍の新生血管系では誘導される（Ｂｒｏｏｋｓ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ，７９：１１５７－１１６４，１９９４、Ｈａｍｍｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄ，２：５２９－５３３，１９９６）。アミノペプチダーゼＮ／ＣＤ１３は、ＮＧＲモチーフの血管新生受容体として最近同定されている（Ｂｕｒｇ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ，５９：２８６９－７４，１９９９）。アミノペプチダーゼＮ／ＣＤ１３は、がんの新生血管及他の血管新生組織において強く発現する。

【０４５５】

特定の実施形態では、ベクターは、がん細胞抗原エピトープを標的とすることによって腫瘍を標的とし得る。がん細胞抗原は、がん細胞または腫瘍が発現するものである。

【０４５６】

特定の実施形態では、がん細胞抗原エピトープは、がん細胞が選択的に発現するものである。「選択的に発現する」は、他の細胞型と比較してがん細胞上に高いレベルでがん細

胞抗原が見られることを意味する。いくつかの例では、がん抗原エピトープは、標的がん細胞型のみが発現するものである。他の例では、標的がん細胞型でのがん抗原の発現は、非標的細胞での発現と比較して少なくとも２５％、少なくとも３５％、少なくとも４５％、少なくとも５５％、少なくとも６５％、少なくとも７５％、少なくとも８５％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％多い。

【０４５７】

特定の実施形態では、がん細胞抗原は、がん性組織でも健康な組織でも顕著に発現する。特定の実施形態では、顕著に発現するとは、オンターゲット／がん非特異的毒性に基づいて、開発の間に二重特異性抗体の使用が停止されたことを意味する。特定の実施形態では、顕著に発現するとは、二重特異性抗体を使用するには、オンターゲット／がん非特異的毒性に基づく潜在的な負の副作用に関する注意が必要なことを意味する。一例として、セツキシマブは、重度の発疹と関連する抗ＥＧＦＲ抗体であり、この関連は、皮膚にＥＧＦＲが発現することによるものと考えられている。別の例は、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（トラスツズマブ）であり、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎは、抗ＨＥＲ２（ＥＲＢＢ２）抗体である。Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎは、心臓に標的が発現することによって心毒性と関連する。さらに、ＣＡＲ－Ｔ細胞を用いてＨｅｒ２を標的とすると、肺でのオンターゲット／がん非特異的発現に起因して患者が死に至ることが生じた。

【０４５８】

表１２には、特定のがん型において共発現する可能性が高いがん抗原の例が示される。

【０４５９】

【表１２】

表１２

| 共発現する可能性のあるがん抗原 | がん型 |
|---|---|
| CD19, CD20, CD22, ROR1, CD33, CD56, CLL-1, WT-1, CD123, PD-L1, EFGR | 白血病/リンパ腫 |
| B 細胞成熟抗原 (BCMA), PD-L1, EFGR | 多発性骨髄腫 |
| PSMA, WT1, 前立腺幹細胞抗原 (PSCA), SV40 T, PD-L1, EFGR | 前立腺癌 |
| HER2, ERBB2, ROR1, PD-L1, EFGR, MUC16, 葉酸受容体 (FOLR), CEA | 乳癌 |
| CD133, PD-L1, EFGR | 幹細胞癌 |
| L1-CAM, MUC16, FOLR, ルイス Y, ROR1, メソテリン, WT-1, PD-L1, EFGR, CD56 | 卵巣癌 |
| メソテリン, PD-L1, EFGR | 中皮腫 |
| カルボキシ-アンヒドラーゼ-IX (CAIX)；PD-L1, EFGR | 腎細胞癌 |
| GD2, PD-L1, EFGR | 黒色腫 |
| メソテリン, CEA, CD24, ROR1, PD-L1, EFGR, MUC16 | 膵癌 |
| ROR1, PD-L1, EFGR, メソテリン, MUC16, FOLR, CEA, CD56 | 肺癌 |
| メソテリン, PD-L1, EFGR | 胆管癌 |
| MUC16, PD-L1, EFGR, | 膀胱癌 |
| ROR1, グリピカン-2, CD56, ジシアロガングリオシド, PD-L1, EFGR, | 神経芽腫 |
| CEA, PD-L1, EFGR, | 結腸直腸癌 |
| CD56, PD-L1, EFGR, | メルケル細胞癌 |

【０４６０】

より具体的な例では、がん細胞抗原には、メソテリン、ＭＵＣ１６、ＦＯＬＲ、ＰＤ－

Ｌ１、ＲＯＲ１、グリピカン－２（ＧＰＣ２）、ジシアロガングリオシド（ＧＤ２）、ＨＥＲ２、ＥＧＦＲ、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ＣＥＡ、ＣＤ５６、ＣＬＬ－１、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ１２３、ＣＤ３０、ＣＤ３３（全長）、ＣＤ３３（デルタＥ２バリアント）、ＣＤ３３（Ｃ末端が切除されたもの）、ＢＣＭＡ、ＩＧＦＲ、ＭＵＣ１、ＶＥＧＦＲ、ＰＳＭＡ、ＰＳＣＡ、ＩＬ１３Ｒａ２、ＦＡＰ、ＥｐＣＡＭ、ＣＤ４４、ＣＤ１３３、Ｔｒｏ－２、ＣＤ２００、ＦＬＴ３、ＧＣＣ、及びＷＴ１が含まれる。当業者なら理解するであろうが、標的抗原はシグナルペプチドを欠き得る。

【０４６１】

ＣＤ５６は、神経細胞接着分子１（ＮＣＡＭ１）としても知られており、細胞－細胞接着及び細胞－マトリックス接着に関与するＩ型膜糖タンパクである。ＣＤ５６の細胞外ドメインは、Ｎ末端に５つのＩｇＧ様ドメインを有し、膜近位領域に２つのフィブロネクチンＩＩＩ型ドメインを有する。

【０４６２】

ジシアロガングリオシド（ＧａｌＡｃβ１－４（ＮｅｕＡｃアルファ２－８ＮｅｕＡｃアルファ２－３）Ｇａｌβ１－４Ｇｌｃβ１－１Ｃｅｒ）（ＧＤ２）は、神経芽腫を含めて、さまざまな腫瘍上に発現する。ジシアロガングリオシド抗原ＧＤ２は、シアル酸残基及び脂質残基と隣接するオリゴ糖骨格を含む。例えば、Ｃｈｅｒｅｓｈ（Ｓｕｒｖ．Ｓｙｎｔｈ．Ｐａｔｈｏｌ．Ｒｅｓ．４：９７，１９８７）及びＵＳ５，６５３，９７７を参照のこと。

【０４６３】

ＥＧＦＲバリアントＩＩＩ（ＥＧＦＲｖＩＩＩ）は、ＥＧＦＲの腫瘍特異的変異体であり、野生型ＥＧＦＲ遺伝子の増幅と関連することが多いゲノム再編成の産物である。ＥＧＦＲｖＩＩＩは、エクソン２～７のインフレーム欠失によって形成され、このインフレーム欠失によって、２６７個のアミノ酸が欠失し、連結部ではグリシンへの置換が生じる。この切断型受容体は、リガンドと結合する能力は失っているが、構成的なキナーゼ活性を獲得している。興味深いことに、ＥＧＦＲｖＩＩＩは、同じ腫瘍細胞において全長野生型ＥＧＦＲと共発現することが多い。さらに、ＥＧＦＲｖＩＩＩ発現細胞では、増殖、浸潤、血管新生、及びアポトーシス抵抗性が増加している。

【０４６４】

ＥＧＦＲｖＩＩＩは、多形神経膠芽腫（ＧＢＭ）に見られることが最も多い。ＧＢＭの２５～３５％がこの切断型受容体を保有すると推定される。さらに、ＧＢＭの発現は、侵襲性が高まった表現型であること、及び予後が不良であることを反映するものであることが多い。ＧＢＭに加えて、他の固形腫瘍（非小細胞肺癌、頭頸部癌、乳癌、卵巣癌及び前立腺癌など）にも、ＥＧＦＲｖＩＩＩが発現することが報告されている。対照的に、健康な組織ではＥＧＦＲｖＩＩＩは発現しない。

【０４６５】

特定の実施形態では、標的がん抗原エピトープは、標的がん細胞もしくは標的腫瘍が高発現するものであるか、または標的がん細胞もしくは標的腫瘍が低発現するものであり得る。特定の実施形態では、高発現及び低発現は、フローサイトメトリーまたは蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）を使用して決定され得る。フローサイトメトリーの分野の当業者なら理解するであろうが、「ｈｉ」、「ｌｏ」、「＋」、及び「－」は、陰性集団または他の集団に対するシグナルの強度を指す。特定の実施形態では、陽性発現（＋）は、フローサイトメトリーを使用して細胞上のマーカーが検出可能であることを意味する。特定の実施形態では、陰性発現（－）は、フローサイトメトリーを使用してマーカーが検出不可能であることを意味する。特定の実施形態では、「ｈｉ」は、（例えば、ＦＡＣＳを使用して）蛍光によって測定すると、目的マーカーの陽性発現が、同じく発現が陽性の他の細胞と比較して輝度が高いことを意味する。こうした実施形態では、輝度は検出閾値に基づくものであることを当業者なら認識するであろう。一般に、当業者なら、陰性対照管を最初に分析し、ＦＳＣ及びＳＳＣによって目的集団周辺のゲート（ビットマップ）を設定し、陰性対照では９７％の細胞が蛍光マーカーに染まっていないように見えるように、所望の

発光波長での蛍光が得られるように光電子増倍管電圧及びゲインを調節するであろう。こうしたパラメーターが確立された時点で、染色細胞が分析され、非染色蛍光細胞集団に対する相対値として蛍光が記録される。特定の実施形態、及び典型的なＦＡＣＳプロットの代表的なものでは、ｈｉは、最も右寄りに位置するか（ｘ軸）または一番上の線の最も近くに位置する（右上または左上に位置する）ことを暗示し、ｌｏは、左下象限内に位置するか、または右象限と左象限との中間に位置する（しかしながら、陰性集団と比較するとシフトはしている）ことを暗示する。特定の実施形態では、「ｈｉ」は、＋細胞と比較して、検出可能な蛍光の増加が２０倍超、３０倍超、４０倍超、５０倍超、６０倍超、７０倍超、８０倍超、９０倍超、１００倍超、またはそれを超える倍率であることを指す。逆に、「ｌｏ」は、「ｈｉ」として定義されるものの相反集団を指し得る。

【０４６６】

ＩＩ（Ｅ）．他の標的

ＨＳＣ、Ｔ細胞、Ｂ細胞、及び腫瘍（またはがん細胞）に加えて、ベクターは、他の細菌抗原及び真菌抗原を標的とし得る。

【０４６７】

細菌を標的とするための抗原は、例えば、炭疽、グラム陰性桿菌、クラミジア、ジフテリア、Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ　ｐｙｌｏｒｉ、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ、百日咳毒素、肺炎球菌、リケッチア、ブドウ球菌、連鎖球菌、及び破傷風に由来し得る。

【０４６８】

細菌抗原マーカーの具体例として、炭疽抗原には、炭疽防御抗原が含まれ、グラム陰性桿菌抗原には、リポ多糖が含まれ、ジフテリア抗原には、ジフテリア毒素が含まれ、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ抗原には、ミコール酸、熱ショックタンパク質６５（ＨＳＰ６５）、３０ｋＤａ主要分泌タンパク質、及び抗原８５Ａが含まれ、百日咳毒素抗原には、ヘマグルチニン、パータクチン、ＦＩＭ２、ＦＩＭ３、及びアデニル酸シクラーゼが含まれ、肺炎球菌抗原には、ニューモリシン及び肺炎球菌莢膜多糖が含まれ、リケッチア抗原には、ｒｏｍｐＡが含まれ、連鎖球菌抗原には、Ｍタンパク質が含まれ、破傷風抗原には、破傷風毒素が含まれる。

【０４６９】

真菌を標的とするための抗原は、例えば、カンジダ、コクシジオイデス、クリプトコッカス、ヒストプラズマ、リーシュマニア、変形体、原生動物、寄生生物、住血吸虫、白癬、トキソプラズマ、及びＴｒｙｐａｎｏｓｏｍａ　ｃｒｕｚｉに由来し得る。

【０４７０】

真菌抗原の具体例として、コクシジオイデス抗原には、球状体抗原が含まれ、クリプトコッカス抗原には、莢膜多糖が含まれ、ヒストプラズマ抗原には、熱ショックタンパク質６０（ＨＳＰ６０）が含まれ、リーシュマニア抗原には、ｇｐ６３及びリポホスホグリカンが含まれ、ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ抗原には、メロゾイト表面抗原、スポロゾイト表面抗原、スポロゾイト周囲抗原、生殖母細胞／配偶子表面抗原、原生動物抗原、及び他の寄生生物抗原（血液期抗原ｐｆ１５５／ＲＥＳＡを含む）が含まれ、住血吸虫抗原には、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ及びパラミオシンが含まれ、白癬真菌抗原には、トリコフィトンが含まれ、トキソプラズマ抗原には、ＳＡＧ－１及びｐ３０が含まれ、Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ　ｃｒｕｚｉ抗原には、７５～７７ｋＤａ抗原及び５６ｋＤａ抗原が含まれる。

【０４７１】

ＩＩＩ．用量、製剤、及び投与

ベクターは、細胞または動物（例えば、ヒト）に投与する上で医薬的に許容可能となるように製剤化され得る。ベクターは、インビトロ、エクスビボ、またはインビボで投与され得る。本明細書に記載のＡｄ３５ウイルスベクターは、対象への投与向けに製剤化され得る。製剤は、治療用遺伝子（「活性成分」）と結び付いたＡｄ３５ウイルスベクターと、１つ以上の医薬的に許容可能な担体と、を含む。

【０４７２】
本明細書に開示のように、ベクターは、当該技術分野で知られる任意の形態であり得る。そのような形態には、例えば、液体剤形、半固体剤形、及び固体剤形（溶液（例えば、注射用溶液及び注入用溶液）、分散液または懸濁液、錠剤、丸剤、粉末、リポソーム、ならびに坐剤など）が含まれる。
【０４７３】
いずれかの具体的な形態の選択または使用は、部分的には、所期の投与様式及び治療用途に依存し得る。例えば、全身送達または局所送達が意図される組成物を含む組成物は、注射用溶液または注入用溶液の形態であり得る。したがって、ベクターは、非経口様式による投与（例えば、静脈内注射、皮下注射、腹腔内注射、または筋肉内注射）向けに製剤化され得る。本明細書で使用される非経口投与は、腸内投与及び局所投与以外の投与様式（通常は注射によるもの）を指し、非経口投与には、限定されないが、静脈内、鼻腔内、眼内、肺、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、関節包内、眼窩内、心臓内、皮内、肺内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、髄腔内、硬膜外、脳内、頭蓋内、頸動脈内、及び大槽内への注射及び注入が含まれる。非経口投与経路は、例えば、注射、経鼻投与、経肺動脈投与、または経皮投与による投与であり得る。投与は、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射による全身性または局所性のものであり得る。
【０４７４】
さまざまな実施形態において、本発明のベクターは、溶液、マイクロエマルション、分散液、リポソーム、または高濃度での安定保管に適した他の秩序構造として製剤化され得る。滅菌注射用溶液は、本明細書に記載の組成物を必要量で（必要に応じて、上に列挙した成分の１つまたは組み合わせと共に）適切な溶媒に含めた後にろ過滅菌することによって調製され得る。一般に、分散液は、基礎分散媒体及び上に列挙したものから選択される他の必要成分を含む滅菌媒体に本明細書に記載の組成物を含めることによって調製される。滅菌注射用溶液を調製するための滅菌粉末の場合、調製方法には、本明細書に記載の組成物＋任意の所望の追加成分（以下を参照のこと）をその事前滅菌ろ過溶液から粉末にする真空乾燥及びフリーズドライが含まれる。溶液の適切な流動性は、例えば、コーティング剤（レシチンなど）を使用すること、分散液の場合は必要粒度を維持すること、及び界面活性剤を使用すること、によって維持され得る。注射用組成物の吸収の持続化は、吸収を遅延させる試薬（例えば、モノステアリン酸塩及びゼラチン）を組成物に含めることによって達成され得る。
【０４７５】
ベクターは、水または別の医薬的に許容可能な液体における滅菌溶液または滅菌懸濁液を含む注射用製剤の形態で非経口的に投与され得る。例えば、ベクターは、医薬的に許容可能な媒介物または媒体（滅菌水及び生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定化剤、香味付け用添加物、希釈剤、媒介物、保存剤、結合剤など）と治療用分子とを適切に組み合わせた後、一般的に認められた薬務に必要な単位剤形において混合することによって製剤化され得る。ベクターは、指定の範囲に入る適切な用量となる量で医薬調製物に含められる。油性液体の例としては、限定されないが、ゴマ油及び大豆油が挙げられ、油性液体は、可溶化剤としての安息香酸ベンジルまたはベンジルアルコールと混合され得る。含められ得る他の物品は緩衝剤であり、こうした緩衝剤は、リン酸緩衝剤または酢酸ナトリウム緩衝剤、無痛化剤（プロカイン塩酸塩など）、安定化剤（ベンジルアルコールまたはフェノールなど）、及び抗酸化剤などである。製剤化された注射用物は、適切なアンプル中に包装され得る。
【０４７６】
さまざまな実施形態において、皮下投与は、デバイスによって達成することができ、こうしたデバイスは、シリンジ、充填済みシリンジ、自己注射器（例えば、使い捨てまたは再利用が可能なもの）、ペン型注射器、パッチ注射器、ウェアラブル注射器、皮下注入セットを備えた携帯型シリンジ注入ポンプ、または他の皮下注射用デバイスなどである。
【０４７７】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のベクターは、局所投与によって対象に治療的に送達され得る。本明細書で使用される「局所投与」または「局所送達」は、ベクターがその所期の標的組織または標的部位へと血管系を介して輸送されることに依存しない送達を指し得る。例えば、ベクターは、組成物もしくは薬剤を注射もしくは埋め込むことによって送達されるか、または組成物もしくは薬剤を含むデバイスを注射もしくは埋め込むことによって送達され得る。ある特定の実施形態では、組成物もしくは薬剤またはその１つ以上の構成成分は、標的組織または標的部位の近傍への局所投与後に、投与部位ではない所期の標的組織または標的部位へと拡散し得る。

【０４７８】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される組成物は単位剤形中に存在し、この単位剤形は自己投与に適したものであり得る。そのような単位剤形は、容器に含めて提供することができ、この容器は、典型的には、例えば、バイアル、カートリッジ、充填済みシリンジ、または使い捨てペンである。ｄｏｓｅｒ（ＵＳ６，３０２，８５５に記載のｄｏｓｅｒデバイスなど）も（例えば、本明細書に記載の注射系と共に）使用され得る。

【０４７９】

注射に適した医薬形態のベクター製剤は、滅菌水溶液または滅菌分散液を含み得る。製剤は、滅菌されたものであり得、シリンジの内外で適切に流動することが可能な流体でなくてはならない。製剤は、製造及び保存の条件の下でも安定であり得る。担体は、溶媒または分散媒体であり得、こうした溶媒または分散媒体は、例えば、水及び生理食塩水または緩衝水溶液を含む。製剤中では、好ましくは、等張剤（例えば、糖または塩化ナトリウム）が使用され得る。

【０４８０】

さらに、当業者なら追加の送達方法も企図し得るであろう。こうした送達方法は、電気穿孔法によるもの、ソノフォレーシス法によるもの、骨内注入法によるもの、または遺伝子銃を使用することによるものであり得る。ベクターは、マイクロチップ、ナノチップ、またはナノ粒子にも埋め込まれ得る。

【０４８１】

本明細書に記載のベクターの適切な用量は、さまざまな要因に依存し得、こうした要因には、例えば、治療すべき対象の年齢、性別、及び体重、治療すべき状態または疾患、ならびに使用される特定のベクターが含まれる。対象に投与される用量に影響する他の要因には、例えば、状態または疾患の型または重症度が含まれる。他の要因には、例えば、対象が同時に罹患しているまたは以前に罹患していた他の医学的障害、対象の総体的な健康、対象の遺伝的素因、食事、投与時間、排泄速度、薬物併用、及び対象に施される他の追加の治療が含まれ得る。ベクターの適切な投与手段は、治療すべき状態または疾患及び対象の年齢及び状態に基づいて選択され得る。投与用量及び投与方法は、患者の体重、年齢、状態、及び同様のものによって異なり得、当業者によって必要に応じて適切に選択され得る。任意の特定の対象に対する具体的な用量及び治療レジメンは、医師の判断に基づいて調節され得る。

【０４８２】

ベクター溶液は、本明細書に記載の組成物を治療的に有効な量で含み得る。そのような有効量は、投与される組成物の作用、または複数の薬剤が使用される場合は組成物と１つ以上の追加の活性薬剤との複合作用に部分的には基づいて当業者によって容易に決定され得る。治療的に有効な量は、組成物の毒性作用または有害作用のいずれにも、治療的に有益な作用が勝る量であり得る。

【０４８３】

さまざまな場合において、ベクターは、医薬的に許容可能な担体または添加物を含むように製剤化され得る。医薬的に許容可能な担体の例としては、限定されないが、いずれか及びすべての溶媒、分散媒体、コーティング剤、抗細菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤、ならびに生理学的に適合性の同様のものが挙げられる。本発明の組成物は、医薬的に許容可能な塩（例えば、酸付加塩または塩基付加塩）を含み得る。

【０４８４】
一般的に使用される医薬的に許容可能な担体の例としては、いずれか及びすべての吸収遅延剤、抗酸化剤、結合剤、緩衝剤、嵩増剤もしくは増量剤、キレート剤、コーティング剤、崩壊剤、分散媒体、ゲル、等張剤、滑沢剤、保存剤、塩、溶媒もしくは共溶媒、安定化剤、界面活性剤、及び／または送達媒体が挙げられる。
【０４８５】
さまざまな実施形態において、本明細書に記載のベクターを含む組成物（例えば、注射用滅菌製剤）は、媒体として注射用蒸留水を使用する通常の薬務に従って製剤化され得る。例えば、生理食塩水、またはグルコース及び他の添加物質（Ｄ－ソルビトール、Ｄ－マンノース、Ｄ－マンニトール、及び塩化ナトリウムなど）を含む等張溶液を注射用水溶液として使用することができ、任意選択で、適切な可溶化剤（例えば、アルコール（エタノール及び多価アルコール（プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールなど）など）ならびに非イオン性界面活性剤（ポリソルベート８０（商標）、ＨＣＯ－５０、及び同様のものなど））と組み合わせて使用することができる。
【０４８６】
抗酸化剤の例としては、アスコルビン酸、メチオニン、及びビタミンＥが挙げられる。
【０４８７】
緩衝剤の例としては、クエン酸塩緩衝剤、コハク酸緩衝剤、酒石酸緩衝剤、フマル酸緩衝剤、グルコン酸緩衝剤、シュウ酸緩衝剤、乳酸緩衝剤、酢酸緩衝剤、リン酸緩衝剤、ヒスチジン緩衝剤、及び／またはトリメチルアミン塩が挙げられる。
【０４８８】
キレート剤の例は、ＥＤＴＡである。
【０４８９】
等張剤の例としては、三価糖アルコールまたは高級糖アルコールを含む多価糖アルコール（グリセリン、エリスリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール、またはマンニトールなど）が挙げられる。
【０４９０】
保存剤の例としては、フェノール、ベンジルアルコール、メタ－クレゾール、メチルパラベン、プロピルパラベン、オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム、ハロゲン化ベンザルコニウム、塩化ヘキサメトニウム、アルキルパラベン（メチルパラベンまたはプロピルパラベンなど）、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、及び３－ペンタノールが挙げられる。
【０４９１】
安定化剤は、活性成分を可溶化する、または変性阻止もしくは容器壁への付着阻止を支援する嵩増剤から添加剤までの範囲の機能を果たし得る広いカテゴリーの添加物を指す。典型的な安定化剤には、多価糖アルコール、アミノ酸（アルギニン、リジン、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アラニン、オルニチン、Ｌ－ロイシン、２－フェニルアラニン、グルタミン酸、及びスレオニンなど）、有機糖または糖アルコール（ラクトース、トレハロース、スタキオース、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、リビトール、ミオイノシトール、ガラクチトール、グリセロール、及びシクリトール（イノシトールなど）など）、ＰＥＧ、アミノ酸ポリマー、含硫還元剤（尿素、グルタチオン、チオクト酸、チオグリコール酸ナトリウム、チオグリセロール、α－モノチオグリセロール、及びチオ硫酸ナトリウムなど）、低分子量ポリペプチド（すなわち、１０残基未満）、タンパク質（ヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンなど）、親水性ポリマー（ポリビニルピロリドンなど）、単糖（キシロース、マンノース、フルクトース、及びグルコースなど）、二糖（ラクトース、マルトース、及びスクロースなど）、三糖（ラフィノースなど）、ならびに多糖（デキストランなど）が含まれ得る。安定化剤は、典型的には、治療重量に基づいて０．１～１０，０００重量部の範囲で存在する。
【０４９２】

本明細書に開示の製剤は、例えば、注射による投与向けに製剤化され得る。注射については、製剤を水溶液として製剤化することができ、こうした水溶液は、緩衝液（ハンクス液、リンゲル液、または生理食塩水を含む）におけるものまたは培養培地（イスコフ改変ダルベッコ培地（ＩＭＤＭ）など）におけるものなどである。水溶液は、調合剤（懸濁剤、安定化剤、及び／または分散剤など）を含み得る。あるいは、製剤は、適切な媒体（例えば、滅菌パイロジェンフリー水）で使用前に構成するための凍結乾燥形態及び／または粉末形態のものであり得る。

【０４９３】

本明細書に開示の製剤はいずれも、任意の他の医薬的に許容可能な担体（投与利益を上回る顕著な有害反応、アレルギー反応、または他の不利な反応が生じないものを含む）を有利に含み得る。医薬的に許容可能な担体及び製剤の例は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１８ｔｈ Ｅｄ．Ｍａｃｋ Ｐｒｉｎｔｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，１９９０に開示されている。さらに、製剤は、無菌性、発熱性、全般的な安全性、ならびにＵＳ ＦＤＡ Ｏｆｆｉｃｅ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｓｔａｎｄａｒｄｓ及び／または他の関連外国規制機関によって求められる純度基準を満たすように調製され得る。

【０４９４】

特定の実施形態では、製剤は、活性成分を含み、この活性成分の含量は、製剤の少なくとも０．１％ｗ／ｖもしくは少なくとも０．１％ｗ／ｗ、製剤の少なくとも１％ｗ／ｖもしくは少なくとも１％ｗ／ｗ、製剤の少なくとも１０％ｗ／ｖもしくは少なくとも１０％ｗ／ｗ、製剤の少なくとも２０％ｗ／ｖもしくは少なくとも２０％ｗ／ｗ、製剤の少なくとも３０％ｗ／ｖもしくは少なくとも３０％ｗ／ｗ、製剤の少なくとも４０％ｗ／ｖもしくは少なくとも４０％ｗ／ｗ、製剤の少なくとも５０％ｗ／ｖもしくは少なくとも５０％ｗ／ｗ、製剤の少なくとも６０％ｗ／ｖもしくは少なくとも６０％ｗ／ｗ、製剤の少なくとも７０％ｗ／ｖもしくは少なくとも７０％ｗ／ｗ、製剤の少なくとも８０％ｗ／ｖもしくは少なくとも８０％ｗ／ｗ、製剤の少なくとも９０％ｗ／ｖもしくは少なくとも９０％ｗ／ｗ、製剤の少なくとも９５％ｗ／ｖもしくは少なくとも９５％ｗ／ｗ、または製剤の少なくとも９９％ｗ／ｖもしくは少なくとも９９％ｗ／ｗである。

【０４９５】

特定の対象に投与されるＡｄ３５ウイルスベクターの実際の用量及び量（特定の実施形態では、特定の対象に投与されるＡｄ３５ウイルスベクター及び動員因子の用量及び量）ならびに確実な動員手順及びスケジュールは、パラメーター（物理学的要因及び生理学的要因など）を考慮して医師、獣医師、または研究者によって決定され得るものであり、こうしたパラメーターには、例えば、標的、体重、状態の型、状態の重症度、後に生じる関連事象（既知の場合）、以前に行われた治療介入または同時に行われる治療介入、対象の特発性疾患、ならびに投与経路が含まれる。さらに、最適な用量範囲を特定しやすくするためにインビトロアッセイ及びインビボアッセイが任意選択で用いられ得る。

【０４９６】

治療用遺伝子と結び付いたＡｄ３５ベクターの治療的に有効な量には、例えば、$1\times10^{7}$～$50\times10^{8}$感染単位（ＩＵ）または$5\times10^{7}$～$20\times10^{8}$ＩＵの範囲の用量が含まれ得る。他の例では、用量は、$5\times10^{7}$ＩＵ、$6\times10^{7}$ＩＵ、$7\times10^{7}$ＩＵ、$8\times10^{7}$ＩＵ、$9\times10^{7}$ＩＵ、$1\times10^{8}$ＩＵ、$2\times10^{8}$ＩＵ、$3\times10^{8}$ＩＵ、$4\times10^{8}$ＩＵ、$5\times10^{8}$ＩＵ、$6\times10^{8}$ＩＵ、$7\times10^{8}$ＩＵ、$8\times10^{8}$ＩＵ、$9\times10^{8}$ＩＵ、$10\times10^{8}$ＩＵ、またはそれを超える数のＩＵを含み得る。特定の実施形態では、治療用遺伝子と結び付いたＡｄ３５ベクターの治療的に有効な量は、$4\times10^{8}$ＩＵを含む。特定の実施形態では、治療用遺伝子と結び付いたＡｄ３５ベクターの治療的に有効な量は、皮下または静脈内に投与され得る。特定の実施形態では、治療用遺伝子と結び付いたＡｄ３５ベクターの治療的に有効な量は、１つ以上の動員因子の投与後に投与され得る。

【０４９７】

本開示のさまざまな実施形態では、インビボ遺伝子治療は、少なくとも１つの免疫抑制レジメンと組み合わせて少なくとも１つのウイルス遺伝子治療ベクターを対象に投与することを含む。複数のベクター種を含むインビボ遺伝子治療（サポートを受けるウイルス遺伝子治療ベクターである第１のベクターと、サポートベクターである第２のベクターとを組み合わせて行うものなど）では、第１のベクター及び第２のベクターは、単一の製剤もしくは剤形において投与されるか、または２つの別々の製剤もしくは剤形において投与され得る。さまざまな実施形態において、第１のベクター及び第２のベクターは、同じ時刻または異なる時刻（例えば、同じ１時間の間または重複しない１時間の間）に投与され得る。さまざまな実施形態において、第１のベクター及び第２のベクターは、（例えば、同じ日または異なる日に）同じ時刻または異なる時刻に投与され得る。さまざまな実施形態において、第１のベクター及び第２のベクターは、同じ用量または異なる用量で投与することができ、例えば、この用量は、ウイルス粒子の総数または対象のキログラム当たりのウイルス粒子数として測定される。さまざまな実施形態において、第１のベクター及び第２のベクターは、予め定義された比で投与され得る。さまざまな実施形態において、この比は、２：１～１：２の範囲内のもの（例えば、１：１）である。

【０４９８】

さまざまな実施形態において、ベクターは、１日に単一の総用量で対象に投与される。さまざまな実施形態において、ベクターは、総用量を一緒に構成する２つ、３つ、４つ、またはそれを超える数の単位用量で投与される。さまざまな実施形態において、１日、２日、３日、４日、またはそれを超える連続日数の各日に、１日につき１単位用量のベクターが対象に投与される。さまざまな実施形態において、１日、２日、３日、４日、またはそれを超える連続日数の各日に、１日につき２単位用量のベクターが対象に投与される。したがって、さまざまな実施形態において、１日用量は、１日を通じて対象に投与されるベクターの用量を指し得る。さまざまな実施形態において、日という用語は、２４時間（最初のカレンダー日付の午前０時から次のカレンダー日付の午前０時までの２４時間など）を指す。

【０４９９】

さまざまな実施形態において、ベクター（ウイルス遺伝子治療ベクターまたはサポートベクターなど）の単位用量、１日用量、もしくは総用量、またはウイルス遺伝子治療ベクター及びサポートベクターの総統合用量は、キログラム当たりのウイルス粒子数（ｖｐ／ｋｇ）で、少なくとも１Ｅ８、少なくとも５Ｅ８、少なくとも１Ｅ９、少なくとも５Ｅ９、少なくとも１Ｅ１０、少なくとも５Ｅ１０、少なくとも１Ｅ１１、少なくとも５Ｅ１１、少なくとも１Ｅ１２、少なくとも５Ｅ１２、少なくとも１Ｅ１３、少なくとも５Ｅ１３、少なくとも１Ｅ１４、または少なくとも１Ｅ１５であり得る。さまざまな実施形態において、ベクター（ウイルス遺伝子治療ベクターまたはサポートベクターなど）の単位用量、１日用量、もしくは総用量、またはウイルス遺伝子治療ベクター及びサポートベクターの総統合用量は、１Ｅ８、５Ｅ８、１Ｅ９、５Ｅ９、１Ｅ１０、５Ｅ１０、１Ｅ１１、５Ｅ１１、１Ｅ１２、５Ｅ１２、１Ｅ１３、５Ｅ１３、１Ｅ１４、または１Ｅ１５から選択される下限（ｖｐ／ｋｇ）及び１Ｅ８、５Ｅ８、１Ｅ９、５Ｅ９、１Ｅ１０、５Ｅ１０、１Ｅ１１、５Ｅ１１、１Ｅ１２、５Ｅ１２、１Ｅ１３、５Ｅ１３、１Ｅ１４、または１Ｅ１５から選択される上限（ｖｐ／ｋｇ）を有する範囲に入るものであり得る。

【０５００】

さまざまな実施形態において、ウイルス遺伝子治療ベクターは、少なくとも１Ｅ１０ｖｐ／ｋｇ、少なくとも５Ｅ１０ｖｐ／ｋｇ、少なくとも１Ｅ１１ｖｐ／ｋｇ、少なくとも５Ｅ１１ｖｐ／ｋｇ、少なくとも１Ｅ１２ｖｐ／ｋｇ、少なくとも５Ｅ１２ｖｐ／ｋｇ、少なくとも１Ｅ１３ｖｐ／ｋｇ、少なくとも５Ｅ１３ｖｐ／ｋｇ、少なくとも１Ｅ１４ｖｐ／ｋｇ、または少なくとも１Ｅ１５ｖｐ／ｋｇの単位用量、１日用量、または総用量で投与され、サポートベクターは、少なくとも１Ｅ８ｖｐ／ｋｇ、少なくとも５Ｅ８ｖｐ／ｋｇ、少なくとも１Ｅ９ｖｐ／ｋｇ、少なくとも５Ｅ９ｖｐ／ｋｇ、少なくとも１Ｅ１０ｖｐ／ｋｇ、少なくとも５Ｅ１０ｖｐ／ｋｇ、少なくとも１Ｅ１１ｖｐ／ｋｇ、及び少な

くとも５Ｅ１１ｖｐ／ｋｇの単位用量、１日用量、または総用量で投与され、任意選択で、ウイルス遺伝子治療ベクターの単位用量、１日用量、もしくは総用量は、１Ｅ１０、５Ｅ１０、１Ｅ１１、５Ｅ１１、１Ｅ１２、及び５Ｅ１２から選択される下限（ｖｐ／ｋｇ）ならびに１Ｅ１１、５Ｅ１１、１Ｅ１２、５Ｅ１２、１Ｅ１３、５Ｅ１３、１Ｅ１４、及び１Ｅ１５から選択される上限（ｖｐ／ｋｇ）を有する範囲に入り、及び／またはサポートベクターの単位用量、１日用量、もしくは総用量は、１Ｅ８、５Ｅ８、１Ｅ９、５Ｅ９、１Ｅ１０、及び５Ｅ１０から選択される下限（ｖｐ／ｋｇ）ならびに１Ｅ９、５Ｅ９、１Ｅ１０、５Ｅ１０、１Ｅ１１、及び５Ｅ１１から選択される上限（ｖｐ／ｋｇ）を有する範囲に入る。

【０５０１】

さまざまな実施形態において、サポートベクターは、少なくとも１Ｅ１０ｖｐ／ｋｇ、少なくとも５Ｅ１０ｖｐ／ｋｇ、少なくとも１Ｅ１１ｖｐ／ｋｇ、少なくとも５Ｅ１１ｖｐ／ｋｇ、少なくとも１Ｅ１２ｖｐ／ｋｇ、少なくとも５Ｅ１２ｖｐ／ｋｇ、少なくとも１Ｅ１３ｖｐ／ｋｇ、少なくとも５Ｅ１３ｖｐ／ｋｇ、少なくとも１Ｅ１４ｖｐ／ｋｇ、または少なくとも１Ｅ１５ｖｐ／ｋｇの単位用量、１日用量、または総用量で投与され、サポートを受けるウイルス遺伝子治療ベクターは、少なくとも１Ｅ８ｖｐ／ｋｇ、少なくとも５Ｅ８ｖｐ／ｋｇ、少なくとも１Ｅ９ｖｐ／ｋｇ、少なくとも５Ｅ９ｖｐ／ｋｇ、少なくとも１Ｅ１０ｖｐ／ｋｇ、少なくとも５Ｅ１０ｖｐ／ｋｇ、少なくとも１Ｅ１１ｖｐ／ｋｇ、及び少なくとも５Ｅ１１ｖｐ／ｋｇの単位用量、１日用量、または総用量で投与され、任意選択で、サポートベクターの単位用量、１日用量、もしくは総用量は、１Ｅ１０、５Ｅ１０、１Ｅ１１、５Ｅ１１、１Ｅ１２、及び５Ｅ１２から選択される下限（ｖｐ／ｋｇ）ならびに１Ｅ１１、５Ｅ１１、１Ｅ１２、５Ｅ１２、１Ｅ１３、５Ｅ１３、１Ｅ１４、及び１Ｅ１５から選択される上限（ｖｐ／ｋｇ）を有する範囲に入り、及び／またはサポートを受けるウイルス遺伝子治療ベクターの単位用量、１日用量、もしくは総用量は、１Ｅ８、５Ｅ８、１Ｅ９、５Ｅ９、１Ｅ１０、及び５Ｅ１０から選択される下限（ｖｐ／ｋｇ）ならびに１Ｅ９、５Ｅ９、１Ｅ１０、５Ｅ１０、１Ｅ１１、及び５Ｅ１１から選択される上限（ｖｐ／ｋｇ）を有する範囲に入る。さまざまな実施形態において、サポートを受けるウイルス遺伝子治療ベクター及びサポートベクターは、予め定義された比で投与される。さまざまな実施形態において、この比は、２：１～１：２の範囲内のもの（例えば、１：１）である。

【０５０２】

ＩＶ．用途

本明細書で提供される方法及び組成物は、少なくとも部分的にはインビボ遺伝子治療における使用について開示される。しかしながら、誤解を避けるために記載すると、本開示は、細胞及び／または組織をエクスビボでの操作するための本明細書で提供される組成物及び方法の使用、ならびに研究目的のための細胞及び／または組織の操作を含むインビトロでの使用、を明確に含む。遺伝子治療は、外来性ＤＮＡを宿主細胞（標的細胞など）及び／または核酸（標的核酸（標的ゲノム（例えば、標的細胞のゲノム）など）など）に導入する方法における本開示のベクター、ゲノム、または系の使用を含む。本開示は、インビボ治療、インビトロ治療、及びエクスビボ治療に関する組成物及び方法の説明及び例示を含み、本明細書で提供されるさまざまな方法及び組成物は、一般に、対象（例えば、宿主または標的細胞）への核酸ペイロードの導入に適用可能であることを当業者なら理解するであろう。そのような組成物及び方法は、（例えば、遺伝子治療において）一般的な有用性を有するものであるため、一般的な遺伝子治療におけるツールとしても、全般的な及び特に本明細書で提供されるものを含むさまざまな特定条件の両方におけるツールとしても有用である。

【０５０３】

ＩＶ（Ａ）．インビボ遺伝子治療

インビボ遺伝子治療を使用する治療は、ウイルスベクターを直接的に患者に送達することを含むものであり、この治療の探索が行われている。インビボ遺伝子治療は、いずれの

遺伝毒性移植前処理も不要であるか（もしくは遺伝毒性移植前処理が必要になるとしても軽微なものに留まり得る）、またはいずれのエクスビボ細胞処理も不要であり得ることから、魅力的な手法であり、それ故に、発展途上国の施設を含めて多くの施設で世界的に適用可能なのものであり得、これは、この治療が、ワクチンを送達するために既に世界的に行われているものと同様に注射を介して実施し得るものであるためである。さまざまな実施形態において、本開示のアデノウイルスベクターを用いるインビボ遺伝子治療の方法は、（ｉ）標的細胞を動員するステップ、（ｉｉ）免疫を抑制するステップ、（ｉｉｉ）本明細書で提供されるベクター、ゲノム、系、もしくは製剤を投与するステップ、及び／または（ｉｖ）形質導入された細胞、及び／またはアデノウイルスベクターもしくはアデノウイルスゲノムのペイロードの組み込みエレメントが組み込まれた細胞を選択するステップ、のうちの１つ以上を含み得る。

【０５０４】

本明細書に開示のアデノウイルスベクター製剤は、対象（ヒト、獣医学的動物（イヌ、ネコ、爬虫類、鳥類など）、家畜（ウマ、ウシ、ヤギ、ブタ、ニワトリなど）、及び研究用動物（サル、ラット、マウス、魚類など））の処置に使用され得る。対象の処置は、本開示の１つ以上のベクター、ゲノム、または系を治療的に有効な量で送達することを含む。治療的に有効な量には、有効量、予防的治療、及び／または治療的処置を与えるものが含まれる。

【０５０５】

ＩＶ（Ａ）ｉ．ＨＳＣの動員

本明細書に記載のベクターは、動員因子と一緒に効率的に働くように投与され得る。ある特定の実施形態では、本明細書に記載のアデノウイルスベクター製剤は、ＨＳＰＣの動員と協奏的に投与され得る。特定の実施形態では、アデノウイルスドナーベクターの投与は、１つ以上の動員因子の投与と同時に行われる。特定の実施形態では、アデノウイルスドナーベクターの投与は、１つ以上の動員因子の投与の後に行われる。特定の実施形態では、アデノウイルスドナーベクターの投与は、第１の１つ以上の動員因子の投与の後に、第２の１つ以上の動員因子の投与と同時に行われる。ＨＳＰＣを動員するための薬剤には、例えば、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、ＡＭＤ３１００、ＳＣＦ、Ｓ－ＣＳＦ、ＣＸＣＲ４アンタゴニスト、ＣＸＣＲ２アゴニスト、及びＧｒｏ－ベータ（ＧＲＯ－β）が含まれる。さまざまな実施形態において、ＣＸＣＲ４アンタゴニストはＡＭＤ３１００であり、及び／またはＣＸＣＲ２アゴニストはＧＲＯ－βである。

【０５０６】

Ｇ－ＣＳＦは、ＨＳＰＣの動員において機能するサイトカインであり、この機能には、顆粒球の増殖を促進すること、及び接着分子をプロテアーゼ依存的にも非依存的にも減弱化させること、及びＳＤＦ－１／ＣＸＣＲ４軸を破壊することが含まれ得る。特定の実施形態では、当業者に知られる任意の商業的に利用可能な形態のＧ－ＣＳＦを、本明細書に開示の方法及び製剤において使用することができ、こうしたＧ－ＣＳＦは、例えば、フィルグラスチム（Ｎｅｕｐｏｇｅｎ（登録商標），Ａｍｇｅｎ　Ｉｎｃ．，Ｔｈｏｕｓａｎｄ　Ｏａｋｓ，ＣＡ）及びＰＥＧ化フィルグラスチム（ペグフィルグラスチム、ＮＥＵＬＡＳＴＡ（登録商標），Ａｍｇｅｎ　Ｉｎｃ．，Ｔｈｏｕｓａｎｄ　Ｏａｋｓ，ＣＡ）である。

【０５０７】

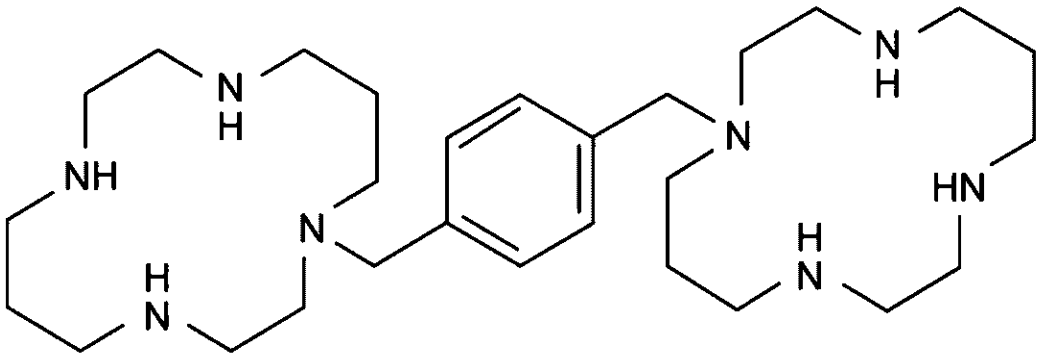
ＧＭ－ＣＳＦは、サイトカインとして機能するコロニー刺激因子２（ＣＳＦ２）としても知られる単量体糖タンパク質であり、天然ではマクロファージ、Ｔ細胞、マスト細胞、ナチュラルキラー細胞、内皮細胞、及び線維芽細胞によって分泌される。特定の実施形態では、当業者に知られる任意の商業的に利用可能な形態のＧＭ－ＣＳＦを、本明細書に開示の方法及び製剤において使用することができ、こうしたＧＭ－ＣＳＦは、例えば、サルグラモスチム（Ｌｅｕｋｉｎｅ，Ｂａｙｅｒ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ，Ｓｅａｔｔｌｅ，ＷＡ）及びモルグラモスチム（Ｓｃｈｅｒｉｎｇ－Ｐ

ｌｏｕｇｈ，Ｋｅｎｉｌｗｏｒｔｈ，ＮＪ）である。

【０５０８】

ＡＭＤ３１００（ＭＯＺＯＢＩＬ（商標）、ＰＬＥＲＩＸＡＦＯＲ（商標）；Ｓａｎｏｆｉ－Ａｖｅｎｔｉｓ、Ｐａｒｉｓ、Ｆｒａｎｃｅ）（ビシクラムクラスの合成有機分子）はケモカイン受容体アンタゴニストであり、ＣＸＣＲ４へのＳＤＦ－１の結合を可逆的に阻害し、ＨＳＰＣの動員を促進する。ＡＭＤ３１００は、骨髄腫患者及びリンパ腫患者においてＨＳＰＣを動員するためにＧ－ＣＳＦと併用することが認められている。ＡＭＤ３１００は下記の構造を有する。

【化１】



【０５０９】

ＳＣＦ（ＫＩＴリガンド（ＫＬ）または造血幹細胞因子としても知られる）は、ｃ－ｋｉｔ受容体（ＣＤ１１７）に結合するサイトカインである。ＳＣＦは、膜貫通タンパク質としても可溶性タンパク質としても存在し得る。このサイトカインは、造血、精子形成、及びメラニン形成において重要な役割を果たす。特定の実施形態では、当業者に知られる任意の商業的に利用可能な形態のＳＣＦを、本明細書に開示の方法及び製剤において使用することができ、こうしたＳＣＦは、例えば、組換えヒトＳＣＦ（アンセスチム、ＳＴＥＭＧＥＮ（登録商標）、Ａｍｇｅｎ　Ｉｎｃ．，Ｔｈｏｕｓａｎｄ　Ｏａｋｓ，ＣＡ）である。

【０５１０】

集中的な骨髄抑制処理において使用される化学療法においても、化学療法誘導性の形成不全の後に好中球産生が代償性に生じる結果として末梢血にＨＳＰＣが動員される。特定の実施形態では、ＨＳＰＣの動員に使用され得る化学療法剤には、シクロホスファミド、エトポシド、イホスファミド、シスプラチン、及びシタラビンが含まれる。

【０５１１】

細胞動員に使用され得る追加の薬剤には、ＣＸＣＬ１２／ＣＸＣＲ４モジュレーター（例えば、ＣＸＣＲ４アンタゴニスト：ＰＯＬ６３２６（Ｐｏｌｙｐｈｏｒ，Ａｌｌｓｃｈｗｉｌ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）、ＣＸＣＲ４を可逆的に阻害する合成環状ペプチド（ＢＫＴ－１４０）（４Ｆ－ベンゾイル－ＴＮ１４００３；Ｂｉｏｋｉｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｒｅｈｏｖｉｔ，Ｉｓｒａｅｌ）、ＴＧ－００５４（Ｔａｉｇｅｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｔａｉｐｅｉ，Ｔａｉｗａｎ）、ＳＤＦ－１に結合してＣＸＣＲ４へのその結合を阻害するＣＸＣＬ１２中和剤ＮＯＸ－Ａ１２（ＮＯＸＸＯＮ　Ｐｈａｒｍａ，Ｂｅｒｌｉｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）、スフィンゴシン－１－リン酸（Ｓ１Ｐ）アゴニスト（例えば、ＳＥＷ２８７１、Ｊｕａｒｅｚ　ｅｔ　ａｌ．Ｂｌｏｏｄ　１１９：７０７－７１６，２０１２）、血管細胞接着分子－１（ＶＣＡＭ）または最晩期抗原４（ＶＬＡ－４）阻害剤（例えば、ナタリズマブ（ＶＬＡ－４のα４サブユニットに対する組換えヒト化モノクローナル抗体）（Ｚｏｈｒｅｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｂｌｏｏｄ　１１１：３８９３－３８９５，２００８）、ＢＩＯ５１９２（ＶＬＡ－４の小分子阻害剤）（Ｒａｍｉｒｅｚ　ｅｔ　ａｌ．Ｂｌｏｏｄ　１１４：１３４０－１３４３，２００９））、副甲状腺ホルモン（Ｂｒｕｎｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．Ｅｘｐ　Ｈｅｍａｔｏｌ．３６：１１５７－

１１６６，２００８）、プロテアソーム阻害剤（例えば、ボルテゾミブ、Ｇｈｏｂａｄｉｅｔ ａｌ．ＡＳＨ Ａｎｎｕａｌ Ｍｅｅｔｉｎｇ Ａｂｓｔｒａｃｔｓ．ｐ．５８３，２０１２）、Ｇｒｏβ（ＣＸＣＲ２受容体に結合することによって好中球の走化性及び活性化を刺激するＣＸＣケモカインファミリーのメンバー）（例えば、ＳＢ－２５１３５３、Ｋｉｎｇ ｅｔ ａｌ．Ｂｌｏｏｄ ９７：１５３４－１５４２，２００１）；低酸素誘導因子（ＨＩＦ）の安定化（例えば、ＦＧ－４４９７、Ｆｏｒｒｉｓｔａｌ ｅｔ ａｌ．ＡＳＨ Ａｎｎｕａｌ Ｍｅｅｔｉｎｇ Ａｂｓｔｒａｃｔｓ．ｐ．２１６，２０１２）、フィラテグラスト（α４β１及びα４β７のインテグリン阻害剤（α４β１／７））（Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．Ｂｌｏｏｄ １２８：２４５７－２４６１，２０１６）、ベドリズマブ（α４β７インテグリンに対するヒト化モノクローナル抗体）（Ｒｏｓａｒｉｏ ｅｔ ａｌ．Ｃｌｉｎ Ｄｒｕｇ Ｉｎｖｅｓｔｉｇ ３６：９１３－９２３，２０１６）、ならびにインテグリンα９β１／α４β１を標的とするＢＯＰ（Ｎ－（ベンゼンスルホニル）－Ｌ－プロリル－Ｌ－Ｏ－（１－ピロリジニルカルボニル）チロシン）（Ｃａｏ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｃｏｍｍｕｎ ７：１１００７，２０１６）が含まれる。ＨＳＰＣの動員に使用され得る追加の薬剤については、例えば、Ｒｉｃｈｔｅｒ Ｒ ｅｔ ａｌ．Ｔｒａｎｓｆｕｓ Ｍｅｄ Ｈｅｍｏｔｈｅｒ ４４：１５１－１６４，２０１７，Ｂｅｎｄａｌｌ ＆ Ｂｒａｄｓｔｏｃｋ，Ｃｙｔｏｋｉｎｅ ＆ Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒ Ｒｅｖｉｅｗｓ ２５：３５５－３６７，２０１４、ＷＯ２００３０４３６５１、ＷＯ２００５０１７１６０、ＷＯ２０１１０６９３３６、ＵＳ５，６３７，３２３、ＵＳ７，２８８，５２１、ＵＳ９，７８２，４２９、ＵＳ２００２／０１４２４６２、及びＵＳ２０１０／０２２６８に記載されている。

【０５１２】

特定の実施形態では、Ｇ－ＣＳＦの治療的に有効な量は、０．１μｇ／ｋｇ～１００μｇ／ｋｇを含む。特定の実施形態では、Ｇ－ＣＳＦの治療的に有効な量は、０．５μｇ／ｋｇ～５０μｇ／ｋｇを含む。特定の実施形態では、Ｇ－ＣＳＦの治療的に有効な量は、０．５μｇ／ｋｇ、１μｇ／ｋｇ、２μｇ／ｋｇ、３μｇ／ｋｇ、４μｇ／ｋｇ、５μｇ／ｋｇ、６μｇ／ｋｇ、７μｇ／ｋｇ、８μｇ／ｋｇ、９μｇ／ｋｇ、１０μｇ／ｋｇ、１１μｇ／ｋｇ、１２μｇ／ｋｇ、１３μｇ／ｋｇ、１４μｇ／ｋｇ、１５μｇ／ｋｇ、１６μｇ／ｋｇ、１７μｇ／ｋｇ、１８μｇ／ｋｇ、１９μｇ／ｋｇ、２０μｇ／ｋｇ、またはそれを超える量を含む。特定の実施形態では、Ｇ－ＣＳＦの治療的に有効な量は、５μｇ／ｋｇを含む。特定の実施形態では、Ｇ－ＣＳＦは、皮下または静脈内に投与され得る。特定の実施形態では、Ｇ－ＣＳＦは、１日間、連続２日間、連続３日間、連続４日間、連続５日間、またはそれを超える連続日数の間投与され得る。特定の実施形態では、Ｇ－ＣＳＦは、連続４日間投与され得る。特定の実施形態では、Ｇ－ＣＳＦは、連続５日間投与され得る。特定の実施形態では、Ｇ－ＣＳＦは、単一の薬剤として、１０μｇ／ｋｇの用量で１日１回皮下投与して使用することができ、この投与は、Ａｄ３５を送達する３日前、４日前、５日前、６日前、７日前、または８日前に開始される。特定の実施形態では、Ｇ－ＣＳＦは、単一の薬剤として投与された後、別の動員因子と共に同時投与され得る。特定の実施形態では、Ｇ－ＣＳＦは、単一の薬剤として投与された後、ＡＭＤ３１００と共に同時投与され得る。特定の実施形態では、処理プロトコールは、１日目、２日目、３日目、及び４日目にＧ－ＣＳＦを投与することができ、５日目に、Ａｄ３５を投与する６～８時間前にＧ－ＣＳＦ及びＡＭＤ３１００を投与する５日間の処理を含む。

【０５１３】

治療的に有効なＧＭ－ＣＳＦ投与量は、例えば、０．１～５０μｇ／ｋｇまたは０．５～３０μｇ／ｋｇの範囲の用量を含み得る。特定の実施形態では、ＧＭ－ＣＳＦが投与され得る用量は、０．５μｇ／ｋｇ、１μｇ／ｋｇ、２μｇ／ｋｇ、３μｇ／ｋｇ、４μｇ／ｋｇ、５μｇ／ｋｇ、６μｇ／ｋｇ、７μｇ／ｋｇ、８μｇ／ｋｇ、９μｇ／ｋｇ、１０μｇ／ｋｇ、１１μｇ／ｋｇ、１２μｇ／ｋｇ、１３μｇ／ｋｇ、１４μｇ／ｋｇ、１５μｇ／ｋｇ、１６μｇ／ｋｇ、１７μｇ／ｋｇ、１８μｇ／ｋｇ、１９μｇ／ｋｇ、２０μｇ／ｋｇ、またはそれを超える量を含む。特定の実施形態では、ＧＭ－ＣＳＦは、１

日間、連続２日間、連続３日間、連続４日間、連続５日間、またはそれを超える連続日数間皮下投与され得る。特定の実施形態では、ＧＭ－ＣＳＦは、皮下または静脈内に投与され得る。特定の実施形態では、ＧＭ－ＣＳＦは、１０μｇ／ｋｇの用量で１日１回皮下投与することができ、この投与は、Ａｄ３５を送達する３日前、４日前、５日前、６日前、７日前、または８日前に開始される。特定の実施形態では、ＧＭ－ＣＳＦは、単一の薬剤として投与された後、別の動員因子と共に同時投与され得る。特定の実施形態では、ＧＭ－ＣＳＦは、単一の薬剤として投与された後、ＡＭＤ３１００と共に同時投与され得る。特定の実施形態では、処理プロトコールは、１日目、２日目、３日目、及び４日目にＧＭ－ＣＳＦを投与することができ、５日目に、Ａｄ３５を投与する６～８時間前にＧＭ－ＣＳＦ及びＡＭＤ３１００を投与する５日間の処理を含む。サルグラモスチムの投薬レジメンは、２００μｇ／ｍ$^2$、２１０μｇ／ｍ$^2$、２２０μｇ／ｍ$^2$、２３０μｇ／ｍ$^2$、２４０μｇ／ｍ$^2$、２５０μｇ／ｍ$^2$、２６０μｇ／ｍ$^2$、２７０μｇ／ｍ$^2$、２８０μｇ／ｍ$^2$、２９０μｇ／ｍ$^2$、３００μｇ／ｍ$^2$、またはそれを超える用量を含み得る。特定の実施形態では、サルグラモスチムは、１日間、連続２日間、連続３日間、連続４日間、連続５日間、またはそれを超える連続日数の間投与され得る。特定の実施形態では、サルグラモスチムは、皮下または静脈内に投与され得る。特定の実施形態では、サルグラモスチムの投薬レジメンは、２５０μｇ／ｍ$^2$／日（静脈内投与または皮下投与）を含み得、標的細胞量が末梢血中で達成されるまで継続され得るか、または５日間継続され得る。特定の実施形態では、サルグラモスチムは、単一の薬剤として投与された後、別の動員因子と共に同時投与され得る。特定の実施形態では、サルグラモスチムは、単一の薬剤として投与された後、ＡＭＤ３１００と共に同時投与され得る。特定の実施形態では、処理プロトコールは、１日目、２日目、３日目、及び４日目にサルグラモスチムを投与することができ、５日目に、Ａｄ３５を投与する６～８時間前にサルグラモスチム及びＡＭＤ３１００を投与する５日間の処理を含む。

【０５１４】

特定の実施形態では、ＡＭＤ３１００の治療的に有効な量は、０．１ｍｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇを含む。特定の実施形態では、ＡＭＤ３１００の治療的に有効な量は、０．５ｍｇ／ｋｇ～５０ｍｇ／ｋｇを含む。特定の実施形態では、ＡＭＤ３１００の治療的に有効な量は、０．５ｍｇ／ｋｇ、１ｍｇ／ｋｇ、２ｍｇ／ｋｇ、３ｍｇ／ｋｇ、４ｍｇ／ｋｇ、５ｍｇ／ｋｇ、６ｍｇ／ｋｇ、７ｍｇ／ｋｇ、８ｍｇ／ｋｇ、９ｍｇ／ｋｇ、１０ｍｇ／ｋｇ、１１ｍｇ／ｋｇ、１２ｍｇ／ｋｇ、１３ｍｇ／ｋｇ、１４ｍｇ／ｋｇ、１５ｍｇ／ｋｇ、１６ｍｇ／ｋｇ、１７ｍｇ／ｋｇ、１８ｍｇ／ｋｇ、１９ｍｇ／ｋｇ、２０ｍｇ／ｋｇ、またはそれを超える量を含む。特定の実施形態では、ＡＭＤ３１００の治療的に有効な量は、４ｍｇ／ｋｇを含む。特定の実施形態では、ＡＭＤ３１００の治療的に有効な量は、５ｍｇ／ｋｇを含む。特定の実施形態では、ＡＭＤ３１００の治療的に有効な量は、１０μｇ／ｋｇ～５００μｇ／ｋｇまたは５０μｇ／ｋｇ～４００μｇ／ｋｇを含む。特定の実施形態では、ＡＭＤ３１００の治療的に有効な量は、１００μｇ／ｋｇ、１５０μｇ／ｋｇ、２００μｇ／ｋｇ、２５０μｇ／ｋｇ、３００μｇ／ｋｇ、３５０μｇ／ｋｇ、またはそれを超える量を含む。特定の実施形態では、ＡＭＤ３１００は、皮下または静脈内に投与され得る。特定の実施形態では、ＡＭＤ３１００は、Ａｄ３５を送達する６～１１時間前に１６０～２４０μｇ／ｋｇで皮下投与され得る。特定の実施形態では、治療的に有効な量のＡＭＤ３１００は、別の動員因子の投与と同時に投与され得る。特定の実施形態では、治療的に有効な量のＡＭＤ３１００は、別の動員因子の投与後に投与され得る。特定の実施形態では、治療的に有効な量のＡＭＤ３１００は、Ｇ－ＣＳＦの投与後に投与され得る。特定の実施形態では、処理プロトコールは、１日目、２日目、３日目、及び４日目にＧ－ＣＳＦを投与し、５日目に、Ａｄ３５が注射される６～８時間前にＧ－ＣＳＦ及びＡＭＤ３１００を投与する５日間の処理を含む。

【０５１５】

治療的に有効なＳＣＦ投与量は、例えば、０．１～１００μｇ／ｋｇ／日または０．５～５０μｇ／ｋｇ／日の範囲の用量を含み得る。特定の実施形態では、ＳＣＦが投与され

得る用量は、０．５μｇ／ｋｇ／日、１μｇ／ｋｇ／日、２μｇ／ｋｇ／日、３μｇ／ｋｇ／日、４μｇ／ｋｇ／日、５μｇ／ｋｇ／日、６μｇ／ｋｇ／日、７μｇ／ｋｇ／日、８μｇ／ｋｇ／日、９μｇ／ｋｇ／日、１０μｇ／ｋｇ／日、１１μｇ／ｋｇ／日、１２μｇ／ｋｇ／日、１３μｇ／ｋｇ／日、１４μｇ／ｋｇ／日、１５μｇ／ｋｇ／日、１６μｇ／ｋｇ／日、１７μｇ／ｋｇ／日、１８μｇ／ｋｇ／日、１９μｇ／ｋｇ／日、２０μｇ／ｋｇ／日、２１μｇ／ｋｇ／日、２２μｇ／ｋｇ／日、２３μｇ／ｋｇ／日、２４μｇ／ｋｇ／日、２５μｇ／ｋｇ／日、２６μｇ／ｋｇ／日、２７μｇ／ｋｇ／日、２８μｇ／ｋｇ／日、２９μｇ／ｋｇ／日、３０μｇ／ｋｇ／日、またはそれを超える用量を含む。特定の実施形態では、ＳＣＦは、１日間、連続２日間、連続３日間、連続４日間、連続５日間、またはそれを超える連続日数の間投与され得る。特定の実施形態では、ＳＣＦは、皮下または静脈内に投与され得る。特定の実施形態では、ＳＣＦは、２０μｇ／ｋｇ／日で皮下注射され得る。特定の実施形態では、ＳＣＦは、単一の薬剤として投与された後、別の動員因子と共に同時投与され得る。特定の実施形態では、ＳＣＦは、単一の薬剤として投与された後、ＡＭＤ３１００と共に同時投与され得る。特定の実施形態では、処理プロトコールは、１日目、２日目、３日目、及び４日目にＳＣＦを投与することができ、５日目に、Ａｄ３５を投与する６～８時間前にＳＣＦ及びＡＭＤ３１００を投与する５日間の処理を含む。

【０５１６】

特定の実施形態では、増殖因子であるＧＭ－ＣＳＦ及びＧ－ＣＳＦを投与して骨髄ニッチ中のＨＳＰＣを末梢循環血液に動員して、血中に循環するＨＳＰＣ画分を増加させることができる。特定の実施形態では、動員は、Ｇ－ＣＳＦ／フィルグラスチム（Ａｍｇｅｎ）及び／またはＡＭＤ３１００（Ｓｉｇｍａ）を投与して達成され得る。特定の実施形態では、動員は、ＧＭ－ＣＳＦ／サルグラモスチム（Ａｍｇｅｎ）及び／またはＡＭＤ３１００（Ｓｉｇｍａ）を投与して達成され得る。特定の実施形態では、動員は、ＳＣＦ／アンセスチム（Ａｍｇｅｎ）及び／またはＡＭＤ３１００（Ｓｉｇｍａ）を投与して達成され得る。特定の実施形態では、Ｇ－ＣＳＦ／フィルグラスチムが投与された後にＡＭＤ３１００が投与される。特定の実施形態では、Ｇ－ＣＳＦ／フィルグラスチムの投与は、ＡＭＤ３１００の投与と同時に行われる。特定の実施形態では、Ｇ－ＣＳＦ／フィルグラスチムが投与された後にＡＭＤ３１００が投与され、その後にＧ－ＣＳＦ／フィルグラスチムとＡＭＤ３１００とが同時に投与される。ＵＳ２０１４０１９３３７６では、ＣＸＣＲ４アンタゴニストをＳ１Ｐ受容体１（Ｓ１ＰＲ１）モジュレーター剤と共に利用する動員プロトコールについて記載されている。ＵＳ２０１１００４４９９７では、ＣＸＣＲ４アンタゴニストを血管内皮増殖因子受容体（ＶＥＧＦＲ）アゴニストと共に利用する動員プロトコールについて記載されている。

【０５１７】

Ａｄ３５ウイルスベクターは、ＨＳＰＣの動員と協奏的に投与され得るベクターの一例である。特定の実施形態では、Ａｄ３５ウイルスベクターの投与は、１つ以上の動員因子の投与と同時に行われる。特定の実施形態では、Ａｄ３５ウイルスベクターの投与は、１つ以上の動員因子の投与の後に行われる。特定の実施形態では、Ａｄ３５ウイルスベクターの投与は、第１の１つ以上の動員因子の投与の後に、第２の１つ以上の動員因子の投与と同時に行われる。

【０５１８】

特定の実施形態では、ＨＳＰＣを濃縮するためにＨＳＣ濃縮剤（ＣＤ１９免疫毒素または５－ＦＵなど）が投与され得る。ＣＤ１９免疫毒素を使用することでＣＤ１９系譜細胞（骨髄細胞の３０％を占める）をすべて除去することができ、除去によって骨髄からの遊離が促される。ＨＳＰＣを強制的に増殖させることによって（この増殖がＣＤ１９免疫毒素によるものであるか、５－ＦＵによるものであるかは無関係である）、この刺激によってＨＳＰＣが分化し、骨髄から遊離することが刺激され、末梢血液細胞における導入遺伝子マーキングが増加する。

【０５１９】

治療的に有効な量は、任意の適切な投与経路（注射によるもの、注入によるもの、灌流によるもの、より具体的には、骨髄、静脈内、皮内、動脈内、節内、リンパ管内、腹腔内注射、注入、または灌流のうちの１つ以上による投与によるものなど）によって投与され得る。

【０５２０】

ＩＶ（Ａ）ｉｉ．免疫抑制レジメン

Ａｄ３５ウイルスベクターは、１つ以上の免疫抑制剤もしくは免疫抑制レジメンの実施と同時に投与するか、または１つ以上の免疫抑制剤もしくは免疫抑制レジメンを実施した後に投与することができ、この免疫抑制レジメンは、１つ以上のステロイド、ＩＬ－１受容体アンタゴニスト、及び／またはＩＬ－６受容体アンタゴニストを投与することを含み得る。こうしたプロトコールは、処理の潜在的な副作用を軽減し得る。

【０５２１】

ＩＬ－１受容体アンタゴニストは知られており、こうしたＩＬ－１受容体アンタゴニストには、ＡＤＣ－１００１（Ａｌｌｉｇａｔｏｒ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、ＦＸ－２０１（Ｆｌｅｘｉｏｎ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ）、Ｂｉｏａｓｉｓ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから入手可能な融合タンパク質ＧＱ－３０３（Ｇｅｎｅｑｕｉｎｅ Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ ＧｍｂＨ）、ＨＬ－２３５１（Ｈａｎｄｏｋ，Ｉｎｃ．）、ＭＢＩＬ－１ＲＡ（ＰｒｏｔｅｏＴｈｅｒａ，Ｉｎｃ．）、アナキンラ（Ｐｉｖｏｒ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）、ヒト免疫グロビンＧまたはグロブリンＳ（ＧＣＰｈａｒｍａ）が含まれる。ＩＬ－６受容体アンタゴニストもまた、当該技術分野で知られており、こうしたＩＬ－６受容体アンタゴニストには、トシリズマブ、ＢＣＤ－０８９（Ｂｉｏｃａｄ）、ＨＳ－６２８（Ｚｈｅｊｉａｎｇ Ｈｉｓｕｎ Ｐｈａｒｍ）、及びＡＰＸ－００７（Ａｐｅｘｉｇｅｎ）が含まれる。

【０５２２】

さまざまな実施形態において、免疫抑制レジメンが対象に施され、この対象には、少なくとも１つのウイルス遺伝子治療ベクターの投与も行われ、この免疫抑制レジメンは、少なくとも１つの免疫抑制剤を対象に投与することを含み、この投与の実施日は、（ｉ）ウイルス遺伝子治療ベクターの第１の用量が対象に投与される前の１日以上、（ｉｉ）ウイルス遺伝子治療ベクターの第１の用量の投与と同じ日、（ｉｉｉ）ウイルス遺伝子治療ベクターの第２の用量もしくは他の後続用量の１つ以上が投与される日と同じ日、及び／または（ｉｖ）ウイルス遺伝子治療ベクターの第１の用量の対象への投与と、ウイルス遺伝子治療ベクターの第２の用量もしくは他の後続用量の１つ以上のいずれかもしくはそうした用量のすべての投与と、の間に介在する日の１日以上のいずれかもしくはそうした介在日のすべて、である。

【０５２３】

免疫抑制レジメンについては、例えば、米国仮出願第６３／００９，２１８号にさらに記載されており、当該文献は、その全体及び特に免疫抑制レジメンに関する部分が参照によって本明細書に組み込まれる。

【０５２４】

ＩＶ（Ａ）ｉｉｉ．選択

特定の実施形態では、使用方法は、修正された細胞が、非修正細胞に勝る選択的な優位性を有する条件の処理を含む。Ａｄ３５ウイルスベクターは、ＨＳＰＣの動員と協奏的に投与され得るベクターの一例であり、この投与後に、インビボ選択カセット（複数可）と対応する選択剤が投与される。特定の実施形態では、本明細書に記載のＡｄ３５ベクターならびにＢＣＮＵまたはベンジルグアニン及びテモゾロミド（Ａｄ３５がＭＧＭＴ$^{Ｐ１４０Ｋ}$カセットを含む場合）及び／またはＣＤ３３標的指向性分子（Ａｄ３５ベクターが抗ＣＤ３３カセットを含む場合）の投与と動員（例えば、本明細書に記載の動員プロトコール）とが組み合わせて行われる。

【０５２５】

特定の実施形態では、インビボＡｄ３５介在性遺伝子送達（動員ありまたは動員なし）

とインビボ選択マーカーとを組み合わせることができる。特定の実施形態では、インビボ選択マーカーは、Ｏｌｓｚｋｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ　２２：５９１－５９５，２０１５に記載のＭＧＭＴ$^{Ｐ１４０Ｋ}$を含み得る。

【０５２６】

薬物耐性遺伝子ＭＧＭＴがコードするヒトアルキルグアニントランスフェラーゼ（ｈＡＧＴ）は、アルキル化剤（ニトロソ尿素及びテモゾロミド（ＴＭＺ）など）の細胞毒性作用に対する耐性を付与するＤＮＡ修復タンパク質である。６－ベンジルグアニン（６－ＢＧ）は、ニトロソ尿素毒性を増強するＡＧＴ阻害剤であり、ＴＭＺと同時投与することでこの薬剤の細胞毒性作用が増強される。ＡＧＴのバリアントをコードするいくつかの変異形態のＭＧＭＴは、６－ＢＧによる不活化に高度に耐性であるが、ＤＮＡ損傷を修復するその能力は保持している（Ｍａｚｅ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｅｘｐ．Ｔｈｅｒ．２９０：１４６７－１４７４，１９９９）。ＭＧＭＴ$^{Ｐ１４０Ｋ}$ベースの薬物耐性遺伝子治療は、マウス細胞、イヌ細胞、アカゲザル細胞、及びヒト細胞、特に造血細胞に対して化学防御を付与することが示されている（Ｚｉｅｌｓｋｅ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１１２：１５６１－１５７０，２００３、Ｐｏｌｌｏｋ　ｅｔ　ａｌ．Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．１４：１７０３－１７１４，２００３、Ｇｅｒｕｌｌ　ｅｔ　ａｌ．Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．１８：４５１－４５６，２００７、Ｎｅｆｆ　ｅｔ　ａｌ．Ｂｌｏｏｄ　１０５：９９７－１００２，２００５、Ｌａｒｏｃｈｅｌｌｅ　ｅｔ　ａｌ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１１９：１９５２－１９６３，２００９、Ｓａｗａｉ　ｅｔ　ａｌ．Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．３：７８－８７，２００１）。

【０５２７】

特定の実施形態では、インビボ選択マーカーとの組み合わせは、遺伝子が修正された細胞に選択的な優位性が伴わない疾患に対する決定的な要素となる。例えば、ＳＣＩＤ及びいくつかの他の免疫不全ならびにＦＡでは、細胞が修正されると、そうした細胞は優位性を有するようになり、「少数」のＨＳＰＣに治療用遺伝子が形質導入されるだけで、治療効果を得るには十分である。細胞が競争上の優位性を示さない他の疾患（異常ヘモグロビン症（すなわち、鎌状赤血球症及びサラセミア）のような疾患）については、遺伝子が修正された細胞のインビボでの選択（インビボ選択マーカー（ＭＧＭＴ$^{Ｐ１４０Ｋ}$など）と組み合わせて行われるものなど）によって少数の形質導入ＨＳＰＣが選択されることになり、これによってそうした遺伝子修正細胞を増加させることが可能になり、治療効果が達成される。この手法は、ＨＳＰＣをエクスビボでの遺伝子改変に供するのではなく、ＨＳＰＣをインビボでＨＩＶ抵抗性にすることによってＨＩＶにも適用され得る。

【０５２８】

追加の手法も使用され得る。例えば、本開示は、細胞を遺伝子改変して治療用遺伝子を産生するようにし、同時に、遺伝子改変治療細胞において選択的にＣＤ３３の発現を低減する系及び方法を利用するものであり得る。この様式では、患者が受け得る現在または後続の抗ＣＤ３３治療によって遺伝子改変治療細胞が害を受けることはない。一方で、患者における既存のＣＤ３３発現細胞及び／または遺伝子改変を有さない投与細胞は保護されないことになり、その結果、非修正細胞に対して遺伝子修正細胞が陽性選択される。

【０５２９】

特定の実施形態では、この手法は、単一の細胞内送達媒体において治療用遺伝子とＣＤ３３遮断分子とを連結することによって達成される。特定の実施形態では、単一の細胞内送達媒体は、Ａｄ３５ウイルスベクターである。

【０５３０】

特定の実施形態では、ＣＤ３３遮断分子は、共通のＡｄ３５ウイルスベクター内に含めることによって治療用遺伝子と統合されたｓｈＲＮＡ　ＣＤ３３遮断分子またはｓｉＲＮＡ　ＣＤ３３遮断分子である。特定の実施形態では、ＣＤ３３遮断分子は、配列番号１８７の配列を含むｓｈＲＮＡ配列であるか、または配列番号１８８の配列を含むｓｈＲＮＡ配列である。

【０５３１】

ＣＤ３３を標的とする処理には、抗ＣＤ３３抗体、抗ＣＤ３３免疫毒素、抗ＣＤ３３抗体薬物複合体、抗ＣＤ３３抗体放射性同位体複合体、抗ＣＤ３３二重特異性抗体、抗ＣＤ３３ＢｉＴＥ（登録商標）抗体、抗ＣＤ３３三重特異性抗体、及び／または抗ＣＤ３３ＣＡＲが含まれる。

【０５３２】

ＩＶ（Ｂ）．インビトロ遺伝子治療及びエクスビボ遺伝子治療

インビトロ遺伝子治療は、外来性ＤＮＡを宿主細胞（標的細胞など）及び／または核酸（標的核酸（標的ゲノムなど）など）に導入する方法において本開示のベクター、ゲノム、または系を使用することを含み、宿主細胞または核酸は、多細胞生物中には存在しない（例えば、研究室に存在する）。いくつかの実施形態では、標的細胞または核酸は、多細胞生物（哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ヒト、または非ヒト霊長類）など）に由来する。多細胞生物に由来する細胞をインビトロで操作することは、エクスビボ操作と称され得るものであり、エクスビボ治療において使用され得る。さまざまな実施形態において、本開示の方法及び組成物を（例えば、本明細書に開示のように）利用することで、第１の多細胞生物に由来する標的細胞または核酸が改変され、操作された標的細胞または核酸は、次に、（例えば、養子細胞療法の方法において）第２の多細胞生物（哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ヒト、または非ヒト霊長類）など）に投与される。場合によっては、第１の生物と第２の生物とは、同じ単一対象生物である。インビトロで操作された物質をその由来元である対象に戻すことは、自己治療であり得る。場合によっては、第１の生物と第２の生物とは、異なる生物（例えば、同じ種の２生物、例えば、同じ種の２匹のマウス、２匹のラット、２人のヒト、または２頭の非ヒト霊長類）である。第１の対象に由来する操作された物質を第２の異なる対象に移入することは、同種異系治療であり得る。

【０５３３】

エクスビボ細胞療法は、患者または正常ドナーに由来する幹細胞、前駆細胞、または分化細胞を単離すること、単離した細胞をエクスビボで増殖させること（遺伝子操作ありまたは遺伝子操作なし）、ならびに細胞を対象に投与して注入細胞及び／またはその子孫の一過性移植片または安定移植片を確立すること、を含み得る。そのようなエクスビボ手法を使用することで、例えば、遺伝性疾患、感染性疾患、もしくは新生物疾患が治療されるか、組織が再生されるか、または罹患部位に治療剤が送達され得る。さまざまなエクスビボ治療では、対象が遺伝子導入ベクターに直接的に曝露されることはなく、形質導入の標的細胞は、いずれかの遺伝子操作の前または後に、効率及び安全性を改善するために選択、増殖、及び／または分化に供され得る。

【０５３４】

エクスビボ治療には、造血幹細胞（ＨＳＣ）移植（ＨＣＴ）が含まれる。自己ＨＳＣ遺伝子治療は、血液及び免疫系の単一遺伝子疾患のいくつか、ならびに貯蔵障害に対する治療選択肢となるものであり、選択される疾患状態の第一治療選択肢となり得る。別の確立された細胞遺伝子治療用途は養子免疫療法であり、養子免疫療法では、エクスビボで増殖させたＴ細胞を利用して遺伝子操作を伴ってまたは遺伝子操作を伴わずにその抗原特異性を再指向化するか、またはその安全性プロファイルを向上させることで、悪性腫瘍、感染症、及び自己免疫疾患に対して使用するための免疫エフェクター細胞及び制御性細胞の力が利用される。表皮幹細胞及び角膜上皮幹細胞、神経幹細胞／前駆細胞（ＮＳＰＣ）、心臓幹細胞、ならびに多能性間質細胞（ＭＳＣ）を含めて、さまざまな他の型の体性幹細胞もまた、場合によっては遺伝子操作を伴うことで、治療用途への有望性を示している。

【０５３５】

エクスビボ治療の用途には、機能障害性細胞系譜を再構成することが含まれる。細胞系譜の欠陥または不在によって特徴付けられる遺伝性疾患については、そうした系譜を機能性前駆細胞（正常ドナーに由来するもの、またはエクスビボでの遺伝子導入を行って欠陥を修正した自己細胞に由来するもの）によって再生させることができる。一例としては、ＳＣＩＤが挙げられ、ＳＣＩＤでは、いくつかの遺伝子のいずれか１つの欠陥によって成熟リンパ球系細胞の発生が遮断される。非操作正常ドナーＨＳＣを移植することで、宿主

においてさまざまな系譜のドナー由来機能性造血細胞を産生させることが可能になり得、この移植は、ＳＣＩＤ、ならびに血液及び免疫系に影響を与える多くの他の疾患に対する治療選択肢となる。自己ＨＳＣ遺伝子治療は、移植した造血幹細胞／前駆細胞（ＨＳＰＣ）における欠陥遺伝子を機能性コピーで置き換えることを含み得、ＨＣＴと同様に、機能性の子孫を着実に供給し得るものであり、移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）のリスクの低減、移植片拒絶のリスクの低減、及び移植後の免疫抑制の必要性の低減を含めて、いくつかの利点を有し得る。

【０５３６】

エクスビボ治療の用途には、治療用遺伝子用量を増強することが含まれる。いくつかの用途では、ＨＳＣ遺伝子治療は、同種異系ＨＣＴの治療効果を増強し得る。治療用遺伝子用量は、移植細胞において超正常レベルに達するように操作され得る。

【０５３７】

エクスビボ治療の用途には、新規の機能を導入すること、及び遺伝子治療を標的指向化することが含まれる。エクスビボ遺伝子治療は、ＨＳＣまたはその子孫に新規の機能を与え得るものであり、こうした新規の機能の付与は、高用量の抗腫瘍化学療法レジメンの実施を可能にするために薬物耐性を確立すること、または既に確立されたウイルス（ＨＩＶまたは他の病原体など）感染に対する抵抗性を確立することなどであり、これらのことは、ＲＮＡベースの薬剤（例えば、リボザイム、ＲＮＡデコイ、アンチセンスＲＮＡ、ＲＮＡアプタマー、及び低分子干渉ＲＮＡ）ならびにタンパク質ベースの薬剤（例えば、ドミナントネガティブ変異ウイルスタンパク質、融合阻害剤、及び病原体のゲノムを標的とする操作されたヌクレアーゼ）を発現させることによって行われる。

【０５３８】

エクスビボ治療の用途には、免疫応答を増進させることが含まれる。新生物疾患では、同種異系適応免疫細胞型（Ｔ細胞など）は、がん細胞を認識及び死滅させ得る。不幸なことに、同種反応性リンパ球によって健康な組織が認識されると、有害なＧｖＨＤも生じ得る。ドナーリンパ球に自殺遺伝子を導入することで、その抗腫瘍潜在力を利用しつつ、同時にその毒性を制御することが可能になる。自己状況では、がん化細胞または感染細胞に対して指向化された特異性を有するリンパ球を患者の組織から単離し、エクスビボで選択的に増殖させることができる。あるいは、そうしたリンパ球を、それががん化細胞または感染細胞に遭遇した場合に細胞の応答を引き起こす合成抗原受容体またはキメラ抗原受容体の遺伝子を導入することによって、生成させることができる。こうした手法は、腫瘍または感染に対する基礎的な宿主応答を増強するか、またはそうした宿主応答をデノボで誘導し得る。

【０５３９】

ＩＶ（Ｃ）．遺伝子治療によって治療可能な状態

本開示のアデノウイルスベクターは、宿主細胞及び／または標的細胞の改変にインビボ、インビトロ、またはエクスビボで使用できることが少なくとも理由の一部であり、さらには、多種多様な発現産物をコードするペイロードをアデノウイルスベクターに含めることができるという理由も相まって、本明細書で提供されるさまざまな技術は幅広い適用性を有すると共に、多種多様な状態の治療に使用し得るものであることが本明細書から明らかであろう。本開示のアデノウイルスベクター、ゲノム、または系を投与することによって治療可能な状態の例としては、限定されないが、異常ヘモグロビン症、免疫不全、点変異状態、がん、タンパク質欠乏症、感染性疾患、及び炎症状態が挙げられる。

【０５４０】

ある特定の実施形態では、本明細書に開示のベクター、ゲノム、系、及び製剤は、対象（ヒト、獣医学的動物（イヌ、ネコ、爬虫類、鳥類など）、家畜（ウマ、ウシ、ヤギ、ブタ、ニワトリなど）、及び研究用動物（サル、ラット、マウス、魚類など））の処置に使用され得る。対象を処置することは、治療的に有効な量を送達することを含む。治療的に有効な量には、有効量、予防的治療、及び／または治療的処置を与えるものが含まれる。

【０５４１】

特定の実施形態では、本明細書に開示の方法及び製剤は、血液障害の治療に使用され得る。特定の実施形態では、血友病、β－サラセミアメジャー、ダイアモンド・ブラックファン貧血（ＤＢＡ）、発作性夜間ヘモグロビン尿症（ＰＮＨ）、赤芽球癆（ＰＲＣＡ）、不応性貧血、重症再生不良性貧血、及び／または血液がん（白血病、リンパ腫、及び骨髄腫など）を治療するために対象に製剤が投与される。

【０５４２】

異常ヘモグロビン症は、不相応な結果を伴う世界的な健康負担となっている。ヘモグロビンタンパク質またはグロビン遺伝子発現が欠損すると、異常ヘモグロビン症と呼ばれる疾患が生じ得る。異常ヘモグロビン症は、世界的に最もよく見られる遺伝性障害の１つである。

【０５４３】

毎年、世界で１１０万人の新生児が異常ヘモグロビン症のリスクにさらされており、熱帯性マラリアが流行する地理的地域では、ヘモグロビン（Ｈｂ）遺伝分散によって付与される天然のマラリア感染抵抗性のために異常ヘモグロビン症の罹患率は新生児１、０００人中２５人にも上る。先進地域では、患者は、長期間の輸血に起因する鉄過剰のリスクにさらされる。開発途上地域では、生存率は顕著に低くなる。例えば、アフリカでは、小児死亡率は、すべての小児が１６％であるのに対して、異常ヘモグロビン症患者では４０％である。

【０５４４】

グロビン遺伝子に変異が存在すると、鎌状赤血球症（ＳＣＤ）、ならびにヘモグロビンＣ症、ヘモグロビンＤ症、及びヘモグロビンＥ症に見られるような異常な形態のヘモグロビンが生じるか、またはαポリペプチドもしくはβポリペプチドの産生が減少し、それによって細胞中のグロビン鎖のバランスが崩れ得る。こうした後者の状態は、どちらのグロビン鎖が損なわれるかによってα－サラセミアまたはβ－サラセミアと呼ばれる。ｂ－グロビン（ＨＢＢ）遺伝子に鎌状赤血球変異（グルタミン酸からバリンへの変換（歴史的にはＥ６Ｖであるが、同時にＥ７Ｖとしても知られる））を有する顕著なヘモグロビンバリアント（最もよく見られるもの（保因者の４０％））の保有率は世界人口の５％に上る。ヘモグロビン障害の有病率及び重症度が高いことは、罹患している人の生命のみならず、生涯にわたる患者ケアに費用がかかることから医療制度にも影響を及ぼす実質的な負荷となっている。

【０５４５】

ヘモグロビンには、胎児型（ＨｂＦ）（２つのアルファ（α）鎖及び２つのガンマ（γ）鎖を含む）ならびに成体型（ＨｂＡ）（２つのα鎖及び２つのベータ（β）鎖を含む）という２つの形態が存在する。生後すぐにＨｂＦからＨｂＡへのスイッチが自然に生じ、このスイッチは、主要制御因子ｂｃｌ１１ａを含む因子によるγグロビン遺伝子の転写抑制によって制御される。非常に重要なことに、β－異常ヘモグロビン症（鎌状赤血球症及びβ－サラセミアなど）の重症度は、ＨｂＦの産生を増加させることによって軽快することがさまざまな臨床所見から示されている。

【０５４６】

特定の実施形態では、治療的に有効な処置は、ＨｂＦの発現を誘導もしくは増加させ、ヘモグロビンの産生を誘導もしくは増加させ、及び／またはβ－グロビンの産生を誘導もしくは増加させる。特定の実施形態では、治療的に有効な治療は、血液細胞機能を改善し、及び／または細胞の酸素化を増加させる。

【０５４７】

さまざまな実施形態において、本開示は、β－グロビン長鎖ＬＣＲと、β－グロビンプロモーターと、血液障害を治療するためのタンパク質または薬剤をコードするコード核酸配列と、を含む本開示のアデノウイルスドナーベクターを使用する血液障害の治療を含む。さまざまな実施形態において、血液障害はサラセミアであり、タンパク質は、β－グロビンタンパク質もしくはγ－グロビンタンパク質、またはそれ以外でβ－グロビンもしくはγ－グロビンを部分的もしくは完全に機能的に補充するタンパク質である。さまざまな

実施形態において、血液障害は血友病であり、タンパク質は、ＥＴ３であるか、またはそれ以外で第ＶＩＩＩ因子を部分的もしくは完全に機能的に補充するタンパク質である。さまざまな実施形態において、血液障害は、点変異疾患（鎌状赤血球貧血など）であり、薬剤は、遺伝子編集タンパク質である。

【０５４８】

ＥＴ３は、配列番号３０１のアミノ酸配列を有し得る。さまざまな実施形態において、第ＶＩＩＩ因子補充タンパク質は、配列番号３０１との同一性％が少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％であるアミノ酸配列を有し得る。

【０５４９】

β－グロビンは、配列番号３０２のアミノ酸配列を有し得る。さまざまな実施形態において、β－グロビン補充タンパク質は、配列番号３０２との同一性％が少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％であるアミノ酸配列を有し得る。

【０５５０】

γ－グロビンは、配列番号３０３のアミノ酸配列を有し得る。さまざまな実施形態において、γ－グロビン補充タンパク質は、配列番号３０３との同一性％が少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％であるアミノ酸配列を有し得る。

【０５５１】

世界保健機関によって認知されている原発性免疫不全症の数は８０を超える。こうした疾患は、免疫系に内因性の欠陥（症例によっては、感染に対するいずれかの抗体または十分な抗体を体が産生できない）が存在することによって特徴付けられる。他の症例では、感染と戦う細胞防御が適切に機能しない。典型的には、原発性免疫不全は、遺伝性障害である。

【０５５２】

続発性免疫不全または後天性免疫不全は、遺伝的異常が継承された結果ではなく、個体において免疫系外の因子によって免疫系が損なわれると生じる。例としては、外傷、ウイルス、化学療法、毒素、及び汚染が挙げられる。後天性免疫不全症候群（ＡＩＤＳ）は、ウイルス（ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ））によって生じる続発性免疫不全障害の一例であり、この続発性免疫不全障害では、Ｔリンパ球が枯渇することで、体が感染と戦うことができなくなる。

【０５５３】

Ｘ連鎖重症複合免疫不全（ＳＣＩＤ－Ｘ１）は、共通ガンマ鎖遺伝子（γＣ）に変異が存在することによって細胞性免疫及び液性免疫の両方が枯渇するものであり、この変異の結果、Ｔリンパ球及びナチュラルキラー（ＮＫ）リンパ球が存在せず、非機能性Ｂリンパ球が存在する。ＳＣＩＤ－Ｘ１は、（例えば、骨髄移植（ＢＭＴ）または遺伝子治療によって）免疫系が再構成されなければ生後２年で死に至るものである。

【０５５４】

ほとんどの個体がＢＭＴまたは非自己遺伝子治療のための適合ドナーに巡り合えないため、親のハプロタイプ一致成熟Ｔ細胞除去骨髄が使用されることが多い。しかしながら、合併症には、移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）、適切な抗体の産生不全（これによって長期的な免疫グロブリン補充が必要になる）、造血幹細胞及び前駆細胞（ＨＳＰＣ）の生着失敗に起因する遅発性のＴ細胞喪失、慢性の疣贅、ならびにリンパ球調節異常が含まれる。

【０５５５】
ファンコニ貧血（ＦＡ）は、骨髄不全を引き起こす遺伝性血液障害である。ＦＡは、ＤＮＡ修復機構の欠損によって部分的には特徴付けられる。ＦＡ患者の少なくとも２０％が、がん（急性骨髄性白血病、ならびに皮膚系癌、肝臓系癌、胃腸管系癌、及び婦人科系癌など）を発症する。皮膚腫瘍及び胃腸腫瘍は、通常、扁平上皮癌である。がんを発症する患者の平均年齢は、白血病では１５歳、肝腫瘍では１６歳、他の腫瘍では２３歳である。
【０５５６】
治療用遺伝子は、状態（特定の実施形態では、遺伝性の状態）に対して治療的に有効な応答が生じるように選択され得る。特定の実施形態では、こうした状態は、グレーブス病、関節リウマチ、悪性貧血、多発性硬化症（ＭＳ）、炎症性腸疾患、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、アデノシンデアミナーゼ欠損症（ＡＤＡ－ＳＣＩＤ）もしくは重症複合免疫不全症（ＳＣＩＤ）、ウィスコット・アルドリッチ症候群（ＷＡＳ）、慢性肉芽腫性疾患（ＣＧＤ）、ファンコニ貧血（ＦＡ）、バッテン病、副腎白質ジストロフィー（ＡＬＤ）もしくは異染性白質ジストロフィー（ＭＬＤ）、筋ジストロフィー、肺胞タンパク症（ＰＡＰ）、ピルビン酸キナーゼ欠損症、シュワッハマン・ダイアモンド・ブラックファン貧血、先天性角化異常症、嚢胞性線維症、パーキンソン病、アルツハイマー病、または筋萎縮性側索硬化症（ルー・ゲーリック病）であり得る。特定の実施形態では、状態によって、治療用遺伝子は、機能が妨げられているタンパク質をコードする遺伝子及び／または機能が妨げられている遺伝子であり得る。
【０５５７】
特定の実施形態では、本明細書に開示の方法及び製剤は、がんの治療に使用され得る。特定の実施形態では、製剤は、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、慢性骨髄単球性白血病、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、ホジキンリンパ腫、若年性骨髄単球性白血病、多発性骨髄腫、骨髄異形成、及び／または非ホジキンリンパ腫を治療するために対象に投与される。
【０５５８】
治療され得るがんの追加の例としては、星細胞腫、非定型奇形腫様／ラブドイド腫瘍、脳及び中枢神経系（ＣＮＳ）の癌、乳癌、癌肉腫、軟骨肉腫、脊索腫、脈絡叢癌、脈絡叢乳頭腫、軟部組織の明細胞肉腫、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、上衣腫、類上皮肉腫、性腺外胚細胞腫瘍、外部ラブドイド腫瘍、ユーイング肉腫、消化管間質腫瘍、神経膠芽腫、ＨＢＶ誘導性肝細胞癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌、悪性ラブドイド腫瘍、髄芽腫、黒色腫、髄膜腫、中皮腫、多発性骨髄腫、神経膠腫、特定不能（ＮＯＳ）肉腫、乏突起星細胞腫、乏突起神経膠腫、骨肉腫、卵巣癌、卵巣明細胞腺癌、卵巣類内膜腺癌、卵巣漿液性腺癌、膵癌、膵臓導管腺癌、膵内分泌腫瘍、松果体芽細胞腫、前立腺癌、腎細胞癌、腎髄質癌、横紋筋肉腫、肉腫、シュワン腫、皮膚扁平上皮癌、及び幹細胞癌が挙げられる。さまざまな特定の実施形態において、がんは、卵巣癌である。さまざまな特定の実施形態において、がんは、乳癌である。
【０５５９】
特定の実施形態では、本明細書に開示の方法及び製剤は、点変異状態の治療に使用され得る。特定の実施形態では、製剤は、鎌状赤血球症、嚢胞性線維症、テイ・サックス病、及び／またはフェニルケトン尿症を治療するために対象に投与される。さまざまな実施形態において、本開示のトランスポゾンペイロードは、核酸病変を修正編集するためのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓをコードする。さまざまな実施形態において、本開示のトランスポゾンペイロードは、核酸病変を修正編集するための塩基エディターをコードする。
【０５６０】
特定の実施形態では、本明細書に開示の方法及び製剤は、特定の酵素欠損症の治療に使用され得る。特定の実施形態では、製剤は、ハーラー症候群、選択的ＩｇＡ欠損症、高ＩｇＭ、ＩｇＧサブクラス欠損症、ニーマン・ピック病、テイ・サックス病、ゴーシェ病、ファブリー病、クラッベ病、グルコース血症（ｇｌｕｃｏｓｅｍｉａ）、メープルシロッ

プ尿症、フェニルケトン尿症、糖原病、フリードライヒ運動失調症、ツェルウェーガー症候群、副腎白質ジストロフィー、補体障害、及び／またはムコ多糖症を治療するために対象に投与される。

【０５６１】

治療的に有効な量は、免疫細胞及び他の血液細胞及び／またはミクログリア細胞に機能を付与し得るか、あるいは代替的には、治療される状態に応じて、リンパ球の活性化を抑制し、リンパ球のアポトーシスを誘導し、さまざまなリンパ球サブセットを除去し、Ｔ細胞の活性化を抑制し、自己反応性Ｔ細胞を除去もしくは抑制し、Ｔｈ－２リンパ球活性もしくはＴｈ－１リンパ球活性を抑制し、ＩＬ－１もしくはＴＮＦをアンタゴナイズし、炎症を低減し、誘発剤に対する選択的寛容性を誘導し、免疫介在性の状態を低減もしくは除去し、及び／または免疫介在性の状態の症状を低減もしくは除去し得る。治療的に有効な量は、機能性ＤＮＡ修復機構を与え、サーファクタントタンパク質を発現させ、テロメアを維持し、リソソーム機能を与え、脂質もしくは他のタンパク質（アミロイドなど）の分解を生じさせ、リボソーム機能を可能にし、及び／または治療的に有効な量が与えられなければ発生しないと想定される成熟血液細胞系譜（マクロファージ、他の白血球型など）の発生も可能にし得る。

【０５６２】

特定の実施形態では、本開示の方法は、それを必要とする対象におけるＴ細胞介在性の免疫応答を回復させ得る。Ｔ細胞介在性の免疫応答の回復は、胸腺産生を回復させること及び／または正常なＴリンパ球発生を回復させることを含み得る。

【０５６３】

特定の実施形態では、胸腺産生を回復させることは、対照集団から得られる参照レベルのものと同等のレベルにまで末梢血中のＣＤ４５ＲＡ発現ＣＤ３＋Ｔ細胞の頻度を回復させることを含み得る。特定の実施形態では、胸腺産生を回復させることは、対照集団から得られる参照レベルのものと同等のレベルにまで、１０６個の成熟中Ｔ細胞当たりのＴ細胞受容体切除サークル（ＴＲＥＣ）数を回復させることを含み得る。１０６個の成熟中Ｔ細胞当たりのＴＲＥＣ数は、Ｋｅｎｎｅｄｙ ｅｔ ａｌ．，Ｖｅｔ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｐａｔｈｏｌ １４２：３６－４８，２０１１に記載のように決定され得る。

【０５６４】

特定の実施形態では、正常なＴリンパ球発生を回復させることは、ＣＤ４＋細胞：ＣＤ８＋細胞の比を２に回復させることを含む。特定の実施形態では、正常なＴリンパ球発生を回復させることは、循環Ｔリンパ球におけるαβＴＣＲの存在を検出することを含む。循環Ｔリンパ球におけるαβＴＣＲの存在は、例えば、ＴＣＲのα鎖及び／またはβ鎖に結合する抗体を使用してフローサイトメトリーによって検出され得る。特定の実施形態では、正常なＴリンパ球発生を回復させることは、対照集団から得られる参照レベルのものと同等の多様なＴＣＲレパートリーの存在を検出することを含む。ＴＣＲ多様性は、ＴＣＲＶβスペクトラタイプ分析によって評価することができ、この分析では、ＴＣＲβ遺伝子の可変領域の遺伝的再編成が分析される。頑健な正常スペクトラタイププロファイルは、１７のＴＣＲＶβセグメントファミリーにまたがるサイズを有する断片のガウス分布によって特徴付けられ得る。特定の実施形態では、正常なＴリンパ球発生を回復させることは、Ｔ細胞特異的シグナル伝達経路を回復させることを含む。Ｔ細胞特異的シグナル伝達経路を回復させることは、Ｔ細胞マイトジェンフィトヘマグルチニン（ＰＨＡ）への曝露後のリンパ球増殖によって評価され得る。特定の実施形態では、正常なＴリンパ球発生を回復させることは、対照集団から得られる参照レベルと同等のレベルにまで白血球数、好中球数、単球数、リンパ球数、及び／または血小板細胞数を回復させることを含む。

【０５６５】

特定の実施形態では、本開示の方法は、それを必要とする対象におけるリンパ球再構成のキネティクス及び／またはクローン多様性を改善し得る。特定の実施形態では、リンパ球再構成のキネティクスを改善させることは、対照集団から得られる参照レベルの範囲内に循環Ｔリンパ球数を増加させることを含み得る。特定の実施形態では、リンパ球再構成

のキネティクスを改善させることは、対照集団から得られる参照レベルの範囲内にＣＤ３＋リンパ球の絶対数を増加させることを含み得る。範囲は、所与のパラメーターについて正常な（非免疫不全）対象において観測される値の範囲、または当該対象が示す値の範囲であり得る。特定の実施形態では、リンパ球再構成のキネティクスを改善させることは、それを必要とする対象に対して本明細書に記載の治療が施されない場合と比較して正常なリンパ球数への到達に要する時間を低減することを含み得る。特定の実施形態では、リンパ球再構成のキネティクスを改善させることは、それを必要とする対象に対して本明細書に記載の治療が施されない場合と比較して遺伝子修正リンパ球の頻度を増加させることを含み得る。特定の実施形態では、リンパ球再構成のキネティクスを改善させることは、それを必要とする対象に対して本明細書に記載の遺伝子治療が施されない場合と比較して対象における遺伝子修正リンパ球のクローンレパートリーの多様性を増加させることを含み得る。遺伝子修正リンパ球のクローンレパートリーの多様性を増加させることは、レトロウイルス組み込み部位（ＲＩＳ）分析によって測定した場合の特有のＲＩＳクローンの数を増加させることを含み得る。

【０５６６】

特定の実施形態では、本開示の方法は、それを必要とする対象における骨髄機能を回復させ得る。特定の実施形態では、骨髄機能を回復させることは、それを必要とする対象に対して本明細書に記載の治療が施されない場合と比較して、遺伝子修正細胞を用いて骨髄再増殖を改善させることを含み得る。遺伝子修正細胞を用いて骨髄再増殖を改善させることは、遺伝子が修正された細胞のパーセントを増加させることを含み得る。特定の実施形態では、細胞は、白血球及び骨髄由来細胞から選択される。特定の実施形態では、遺伝子が修正された細胞のパーセントは、定量的リアルタイムＰＣＲ及びフローサイトメトリーから選択されるアッセイを使用して測定され得る。

【０５６７】

特定の実施形態では、本開示の方法は、それを必要とする対象における免疫化に対する一次抗体応答及び二次抗体応答を正常化し得る。免疫化に対する一次抗体応答及び二次抗体応答を正常化することは、抗原に対するクラススイッチ及びメモリー応答において機能するＢ細胞サイトカインシグナル伝達プログラム及び／またはＴ細胞サイトカインシグナル伝達プログラムを回復させることを含み得る。免疫化に対する一次抗体応答及び二次抗体応答を正常化することは、バクテリオファージ免疫化アッセイによって測定され得る。特定の実施形態では、Ｂ細胞サイトカインシグナル伝達プログラム及び／またはＴ細胞サイトカインシグナル伝達プログラムの回復は、Ｔ細胞依存性ネオアンチゲンであるバクテリオファージΨＸ１７４での免疫化後にアッセイされ得る。特定の実施形態では、免疫化に対する一次抗体応答及び二次抗体応答を正常化することは、それを必要とする対象におけるＩｇＡ、ＩｇＭ、及び／またはＩｇＧのレベルを対照集団から得られる参照レベルと同等のレベルに上昇させることを含み得る。特定の実施形態では、免疫化に対する一次抗体応答及び二次抗体応答を正常化することは、それを必要とする対象におけるＩｇＡ、ＩｇＭ、及び／またはＩｇＧのレベルを、本明細書に記載の遺伝子治療が施されていないそれを必要とする対象のものよりも高いレベルに上昇させることを含み得る。ＩｇＡ、ＩｇＭ、及び／またはＩｇＧのレベルは、例えば、免疫グロブリン検査によって測定され得る。特定の実施形態では、免疫グロブリン検査は、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ、カッパ軽鎖、ラムダ軽鎖、及び／または重鎖と結合する抗体を使用することを含む。特定の実施形態では、免疫グロブリン検査は、血清タンパク質電気泳動、免疫電気泳動、放射状免疫拡散、比濁分析、及び比濁法を行うことを含む。商業的に利用可能免疫グロブリン検査キットには、ＭＩＮＩＮＥＰＨ（商標）（Ｂｉｎｄｉｎｇ ｓｉｔｅ，Ｂｉｒｍｉｎｇｈａｍ，ＵＫ）、ならびにＤａｋｏ（Ｄｅｎｍａｒｋ）及びＤａｄｅ Ｂｅｈｒｉｎｇ（Ｍａｒｂｕｒｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）から入手可能な免疫グロブリン検査系が含まれる。特定の実施形態では、免疫グロブリンレベルの測定に使用され得る試料には、血液試料、血漿試料、脳脊髄液試料、及び尿試料が含まれる。

【０５６８】

特定の実施形態では、本開示の方法は、ＳＣＩＤ－Ｘ１の治療に使用され得る。特定の実施形態では、本開示の方法は、ＳＣＩＤ（例えば、ＪＡＫ３キナーゼ欠損症ＳＣＩＤ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ（ＰＮＰ）欠損症ＳＣＩＤ、アデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡ）欠損症ＳＣＩＤ、ＭＨＣクラスＩＩ欠損症、またはリコンビナーゼ活性化遺伝子（ＲＡＧ）欠損症ＳＣＩＤ）の治療に使用され得る。特定の実施形態では、治療効果は、リンパ球再構成、クローン多様性及び胸腺細胞増殖の改善、感染の減少、及び／または患者予後の改善を介して観察され得る。治療効果は、体重増加及び成長、胃腸機能の改善（例えば、下痢の減少）、上気道症状の減少、口腔の真菌感染（鵞口瘡）の減少、肺炎の発生及び重症度の減少、髄膜炎及び血流感染の減少、ならびに耳感染の減少、のうちの１つ以上を介しても観察され得る。特定の実施形態では、本開示の方法を用いてＳＣＩＤＸ－１を治療することは、γＣ依存性シグナル伝達経路の機能性を回復させることを含む。γＣ依存性シグナル伝達経路の機能性は、エフェクター分子であるＳＴＡＴ３及び／またはＳＴＡＴ５を、それぞれＩＬ－２１及び／またはＩＬ－２を用いてインビトロで刺激した後に、そのチロシンリン酸化を測定することによってアッセイされ得る。ＳＴＡＴ３及び／またはＳＴＡＴ５のチロシンリン酸化は、細胞内抗体染色によって測定され得る。

【０５６９】

特定の実施形態では、本開示の方法は、ＦＡの治療に使用され得る。特定の実施形態では、治療効果は、リンパ球再構成、クローン多様性及び胸腺細胞増殖の改善、感染の減少、及び／または患者予後の改善を介して観察され得る。治療効果は、体重増加及び成長、胃腸機能の改善（例えば、下痢の減少）、上気道症状の減少、口腔の真菌感染（鵞口瘡）の減少、肺炎の発生及び重症度の減少、髄膜炎及び血流感染の減少、ならびに耳感染の減少、のうちの１つ以上を介しても観察され得る。特定の実施形態では、本開示の方法を用いてＦＡを治療することは、マイトマイシンＣ（ＭＭＣ）に対する骨髄由来細胞の耐性を向上させることを含む。特定の実施形態では、ＭＭＣに対する骨髄由来細胞の耐性は、メチルセルロース及びＭＭＣにおける細胞生存アッセイによって測定され得る。

【０５７０】

特定の実施形態では、本開示の方法は、低ガンマグロブリン血症の治療に使用され得る。低ガンマグロブリン血症は、Ｂ－リンパ球の欠乏によって生じるものであり、血中の抗体レベルが低いことによって特徴付けられる。低ガンマグロブリン血症は、白血病関連免疫機能不全の結果としても治療関連免疫抑制の結果としても、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）患者、多発性骨髄腫（ＭＭ）患者、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）患者、及び他の関連悪性腫瘍を有する患者において生じ得る。そのような血液学的悪性腫瘍に続発して低ガンマグロブリン血症を獲得した患者、及びＨＳＰＣ移植後の患者は、細菌感染を受けやすい。液性免疫の不全は、こうした患者において感染関連の病的状態及び死亡率のリスク（特に、被包性微生物によるもの）を増大させることの大半を担う。例えば、*Streptococcus pneumoniae*、*Haemophilus influenzae*、及び*Staphylococcus aureus*ならびに*Legionella*属の種及び*Nocardia*属の種は、ＣＬＬ患者において肺炎を生じさせることが多い細菌性病原体である。日和見感染（*Pneumocystis carinii*、真菌、ウイルス、及びマイコバクテリアなど）も観察されている。こうした患者における感染の数及び重症度は、免疫グロブリンを投与することによって顕著に低減され得る（Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓ ｅｔ ａｌ．Ｂｌｏｏｄ ７３：３６６－３６８，１９８９、Ｃｈａｐｅｌ ｅｔ ａｌ．Ｌａｎｃｅｔ ３４３：１０５９－１０６３，１９９４）。

【０５７１】

特定の実施形態では、製剤は、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、副腎白質ジストロフィー、原発性骨髄線維症、無巨核球性／先天性血小板減少症、毛細血管拡張性運動失調症、β－サラセミアメジャー、慢性肉芽腫性疾患、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、慢性骨髄単球性白血病、分類不能型免疫不全症（ＣＶＩＤ）、補体障害、先天性無ガンマグロブリン血症、ダイアモンド・ブラックファン症候群、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、家族性赤血球貪食性リン

パ組織球症、濾胞性リンパ腫、ホジキンリンパ腫、ハーラー症候群、高ＩｇＭ、ＩｇＧサブクラス欠損症、若年性骨髄単球性白血病、異染性白質ジストロフィー、ムコ多糖症、多発性骨髄腫、骨髄異形成、非ホジキンリンパ腫、発作性夜間ヘモグロビン尿症（ＰＮＨ）、抗体産生不全を伴う原発性免疫不全症、赤芽球癆、不応性貧血、シュワッハマン・ダイアモンド・ブラックファン貧血（ＤＢＡ）、選択的ＩｇＡ欠損症、重症再生不良性貧血、鎌状赤血球症、特異抗体産生不全症、ウィスコット・アルドリッチ症候群、及び／またはＸ連鎖無ガンマグロブリン血症（ＸＬＡ）を治療するために対象に投与される。

【０５７２】

治療され得るがんの追加の例としては、星細胞腫、非定型奇形腫様／ラブドイド腫瘍、脳及び中枢神経系（ＣＮＳ）の癌、乳癌、癌肉腫、軟骨肉腫、脊索腫、脈絡叢癌、脈絡叢乳頭腫、軟部組織の明細胞肉腫、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、上衣腫、類上皮肉腫、性腺外胚細胞腫瘍、外部ラブドイド腫瘍、ユーイング肉腫、消化管間質腫瘍、神経膠芽腫、ＨＢＶ誘導性肝細胞癌、頭頸部癌、腎癌、肺癌、悪性ラブドイド腫瘍、髄芽腫、黒色腫、髄膜腫、中皮腫、多発性骨髄腫、神経膠腫、特定不能の（ＮＯＳ）肉腫、乏突起星細胞腫、乏突起神経膠腫、骨肉腫、卵巣癌、卵巣明細胞腺癌、卵巣類内膜腺癌、卵巣漿液性腺癌、膵癌、膵臓導管腺癌、膵内分泌腫瘍、松果体芽細胞腫、前立腺癌、腎細胞癌、腎髄質癌、横紋筋肉腫、肉腫、シュワン腫、皮膚扁平上皮癌、及び幹細胞癌が挙げられる。さまざまな特定の実施形態において、がんは、卵巣癌である。さまざまな特定の実施形態において、がんは、乳癌である。

【０５７３】

がんとの関連では、治療的に有効な量は、腫瘍細胞の数を低減し、転移の数を低減し、腫瘍体積を低減し、平均余命を延長し、がん細胞のアポトーシスを誘導し、がん細胞死を誘導し、がん細胞の化学療法感受性もしくは放射線感受性を誘導し、がん細胞付近での血管新生を阻害し、がん細胞増殖を抑制し、腫瘍増殖を抑制し、転移を阻止し、対象の寿命を延長し、がん関連疼痛を低減し、転移の数を低減し、及び／または治療後のがんの再発症もしくは再発を低減し得る。

【０５７４】

特定の実施形態は、続発性免疫不全または後天性免疫不全（外傷、ウイルス、化学療法、毒素、及び汚染によって生じる免疫不全など）を治療することを含む。これまでに示されたように、後天性免疫不全症候群（ＡＩＤＳ）は、ウイルス（ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ））によって生じる続発性免疫不全障害の一例であり、この続発性免疫不全障害では、Ｔリンパ球が枯渇することで、体が感染と戦うことができなくなる。したがって、別の例として、遺伝子は、感染性疾患に対して治療的に有効な応答が生じるように選択され得る。特定の実施形態では、感染性疾患は、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）である。治療用遺伝子は、例えば、ＨＩＶ感染に対して免疫細胞を抵抗性にする遺伝子、または免疫再構築を介して免疫細胞がウイルスを効率的に中和することを可能にする遺伝子、免疫細胞が発現するタンパク質をコードする遺伝子の多型、患者においては発現しないものであるが、感染との戦いに有利な遺伝子、感染性病原体の受容体または共受容体をコードする遺伝子、受容体または共受容体のリガンドをコードする遺伝子、ウイルス複製に必須のウイルス遺伝子及び細胞遺伝子（ある特定の転写因子の作用を遮断するためのリボザイム、アンチセンスＲＮＡ、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、またはデコイＲＮＡをコードする遺伝子を含む）、ドミナントネガティブウイルスタンパク質をコードする遺伝子、細胞内抗体をコードする遺伝子、イントラカインをコードする遺伝子、及び自殺遺伝子をコードする遺伝子であり得る。治療用遺伝子及び治療用遺伝子産物の例としては、α２β１、αｖβ３、αｖβ５、αｖβ６３、ＢＯＢ／ＧＰＲ１５、Ｂｏｎｚｏ／ＳＴＲＬ－３３／ＴＹＭＳＴＲ、ＣＣＲ２、ＣＣＲ３、ＣＣＲ５、ＣＣＲ８、ＣＤ４、ＣＤ４６、ＣＤ５５、ＣＸＣＲ４、アミノペプチダーゼ－Ｎ、ＨＨＶ－７、ＩＣＡＭ、ＩＣＡＭ－１、ＰＲＲ２／ＨｖｅＢ、ＨｖｅＡ、α－ジストログリカン、ＬＤＬＲ／α２ＭＲ／ＬＲＰ、ＰＶＲ、ＰＲＲ１／ＨｖｅＣ、及びラミニン受容体が挙げられる。ＨＩＶ治療のための治療的に有効な量は、例えば、ＨＩＶに対する対象の免疫を向上させるもの、ＡＩＤＳもしくはＨ

ＩＶと関連する症状を軽快させるもの、またはＨＩＶに対する対象の自然免疫応答もしくは適応免疫応答を誘導するものであり得る。ＨＩＶに対する免疫応答は、抗体産生を含み、ＡＩＤＳを阻止し、及び／または対象のＡＩＤＳ感染またはＨＩＶ感染の症状を軽快させるか、あるいはＨＩＶの感染性及び／または病原性を低減または除去するものであり得る。

【０５７５】

特定の実施形態では、製剤は、リスクの高い生殖系列細胞変異の保因者におけるがん再発の阻止もしくは遅延またはがん発症の阻止もしくは遅延のために対象に投与される。特定の実施形態では、対象が受容するテモゾロミド（ＴＭＺ）及びベンジルグアニンまたはＢＣＮＵの治療用量が高まるように製剤が対象に投与される。強力な骨髄抑制性のオフターゲット効果が生じることに起因して、ＴＭＺ及びベンジルグアニンを有効用量で腫瘍に送達することには課題が残っている。患者は、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、食道癌、頭頸部癌、高悪性度神経膠腫、骨髄異形成症候群、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、治療抵抗性ＡＭＬ、小細胞肺癌、退形成性星細胞腫、脳腫瘍、乳癌（例えば、転移性）、結腸直腸癌（例えば、転移性）、びまん性内在脳幹グリオーマ、ユーイング肉腫、多形神経膠芽腫（ＧＢＭ）、悪性神経膠腫、黒色腫、転移性悪性黒色腫、再発性悪性黒色腫、鼻咽頭癌、転移性乳癌、及び小児がん、と関連する治療のためにＴＭＺ及びベンジルグアニンを現在投与されている可能性がある。

【０５７６】

ＭＧＭＴ発現腫瘍を患者が有するのであれば、ＭＧＭＴ$^{Ｐ１４０Ｋ}$インビボ選択カセットと統合された活性成分（ＣＡＲ、ＴＣＲ、またはチェックポイント阻害剤など）を有するＡｄ３５ウイルスベクターを投与することがそうした患者にとって有益となる。この手法の適用性は、エクスビボ手法によって示されている。特定の実施形態では、腫瘍の負荷及び体積を低減するためにＴＭＺ及びベンジルグアニンまたはＢＣＮＵが治療量で投与される。

【０５７７】

特定の実施形態では、治療的に有効な量は、免疫細胞及び他の血液細胞に機能を付与し、免疫介在性の状態を低減もしくは除去し、及び／または免疫介在性の状態の症状を低減もしくは除去し得る。

【０５７８】

本明細書に記載のベクター、動員因子、製剤、及び使用方法では、タンパク質配列及び／または核酸配列のバリアントも使用され得る。バリアントには、本明細書に記載または開示のタンパク質配列及び核酸配列との配列同一性％が少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％である配列が含まれ、こうしたバリアントが示す生物学的機能は、実質的に同様または改善されたものである。

【０５７９】

本明細書に記載のインビボ遺伝子治療及び／またはＨＳＰＣの動員と関連するパラメーターに関して得られる値は、対照集団から得られる参照レベルと比較することができ、この比較は、本明細書に記載インビボ遺伝子治療が、そうした遺伝子治療が施されたそれを必要とする対象に有効であるかどうかを示し得る。インビボ遺伝子治療及び／またはＨＳＰＣの動員と関連するパラメーターには、例えば、白血球、好中球、単球、リンパ球、及び／または血小板の総数、正常なリンパ球数への到達に要する時間、ＣＤ３＋ＣＤ４５ＲＡ＋Ｔ細胞のパーセント、$１０^{６}$個の細胞当たりのＴＲＥＣ数、ＣＤ４＋細胞のパーセント、ＣＤ８＋細胞のパーセント、ＣＤ４／ＣＤ８比、ＣＤ３＋Ｔ細胞におけるＴＣＲαβ＋細胞のパーセント、ＴＣＲの多様性、遺伝子修正リンパ球の頻度、遺伝子修正リンパ球のクローンレパートリーの多様性、特有ＲＩＳクローンの数、バクテリオファージ注射に対する一次抗体応答及び二次抗体応答、バクテリオファージの不活化率、遺伝子が修正された細胞のパーセント、免疫グロブリン（ＩｇＡ、ＩｇＭ、及び／またはＩｇＧ）のレベル、マイトマイシンＣに対する骨髄由来細胞の抵抗性、メチルセルロース及びマイトマイ

シンＣにおける生存細胞のパーセント、γＣ依存性シグナル伝達経路の機能性、ならびに細胞のＩＬ－２１／マイトジェン刺激に伴うＳＴＡＴ３のリン酸化パーセントが含まれ得る。参照レベルは、対照集団由来の１つ以上の関連データセットから得られ得る。本明細書で使用される「データセット」は、所望の条件の下で試料（または試料集団）を評価して得られる数値のセットである。データセットの値は、例えば、試料から実験的に測定値を取得し、こうした測定値からデータセットを構築することによって得ることができる。当業者なら理解するであろうが、参照レベルは、例えば、個々のデータ点を収集して得られる有意義な集合的参照レベルに到達する上で有用な当該技術分野で知られる任意の数式または統計式に基づくものであり得、例えば、平均値、中央値、平均値の中央値などである。あるいは、参照レベル、または参照レベルを創出するためのデータセットは、サービス提供者（研究所など）、またはデータセットが蓄積されているデータベースもしくはサーバーから得ることができる。

【０５８０】

データセット由来の参照レベルは、対照集団から得られた以前の測定値に由来するものであり得る。「対照集団」は、同様の特定の特徴を有する対象または試料を任意に群化したものである。この群化は、例えば、臨床的パラメーター、臨床的評価、治療レジメン、病状、状態重症度などによるものであり得る。特定の実施形態では、この群化は、年齢範囲（例えば、０～２歳）及び非免疫不全状態に基づく。特定の実施形態では、正常な対照集団には、被検対象と年齢が一致し、免疫不全を有さない個体が含まれる。特定の実施形態では、年齢が一致する範囲には、例えば、０～６ヶ月齢、０～１歳、０～２歳、０～３歳、１０～１５歳が含まれ、こうした範囲は、状況の下で臨床的に関連するものである。

【０５８１】

特定の実施形態では、本明細書に記載のインビボ遺伝子治療及び／またはＨＳＰＣの動員と関連する特定のパラメーターの値に対する関連参照レベルは、対照集団におけるインビボ遺伝子治療及び／またはＨＳＰＣの動員と関連する特定の対応パラメーターの値に基づいて得られることで、本明細書に開示のインビボ遺伝子治療が、そうした遺伝子治療が施されたそれを必要とする対象に治療的に有効であるかどうかが決定される。

【０５８２】

特定の実施形態では、対照集団には、健康な非免疫不全集団が含まれ得る。特定の実施形態では、対照集団には、（ｉ）治療用遺伝子と結び付いたＡｄ３５ウイルスベクターを含む製剤と、（ｉｉ）動員因子とが、治療的に有効な量で投与されていない非免疫不全集団が含まれ得る。特定の実施形態では、対照集団には、治療用遺伝子と結び付いたＡｄ３５ウイルスベクターを含み、動員因子を含まない製剤が治療的に有効な量で投与された免疫不全集団が含まれ得る。一例として、関連参照レベルは、対照対象におけるインビボ遺伝子治療及び／またはＨＳＰＣの動員と関連する特定のパラメーターの値であり得る。

【０５８３】

特定の実施形態では、参照レベルと比較して試料値が統計的に有意に異なるか否かに基づいて結論が導かれる。偶然のみに基づいて生じるとが予想されるレベル内に差が入るのであれば、測定値は、統計的に有意に異ならない。対照的に、統計的に有意な差または増加は、偶然によってのみ生じると予想されるものよりも大きなのものである。統計的有意性またはその欠如は、当該技術分野でよく知られるさまざまな方法のいずれかによって決定され得る。一般に使用される統計的有意性尺度の一例はｐ値である。ｐ値は、単なる偶然の結果である特定のデータ点に等しいものとして所与の結果が得られる確率を表す。ｐ値が０．０５以下である結果は有意（偶然ではない）と見なされることが多い。特定の実施形態では、試料値と参照レベルとの差が統計的に有意でない場合、試料値は、正常な対照集団から得られる参照レベルと「同等」である。

【０５８４】

特定の実施形態では、本明細書に記載のインビボ遺伝子治療及び／またはＨＳＰＣの動員と関連するパラメーターに関して得られる値、及び／または他のデータセット構成要素は、選択パラメーターでの分析プロセスに供され得る。分析プロセスのパラメーターは、

本明細書に開示のものであるか、または本明細書に記載のガイドラインを使用して得られるものであり得る。結果の生成に使用される分析プロセスは、試料の分類に有用な結果を得ることが可能な任意の型のプロセスであり得、こうしたプロセスは、例えば、参照レベル、線形アルゴリズム、二次アルゴリズム、決定木アルゴリズム、または投票アルゴリズムを用いる取得値の比較である。分析プロセスでは、試料が所与のクラスに属する確率を決定するための閾値が設定され得る。確率は、好ましくは、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、またはそれを超える％である。

【０５８５】

本明細書記載のＡｄ３５ベクターは、下記の実施形態例及び実施例に記載のＡｄ５／Ａｄ３５＋＋ベクターの代わりに利用され得る。

【０５８６】

以下の実施形態例及び実施例（複数可）は、本開示の特定の実施形態を示すために含められている。本明細書に開示の特定の実施形態には多くの変更を加えることができ、こうした変更によって、本開示の趣旨及び範囲を逸脱することなく、同様または類似の結果を依然として得ることができることを、当業者なら本開示の観点から認識するであろう。

【０５８７】

Ｖ．実施形態例

実施形態例の第１のセットは、下記のものを含み得る。

実施形態１

アデノウイルス血清型３５型（Ａｄ３５）ファイバーシャフトをコードする核酸配列、Ａｄ３５ファイバーノブをコードする核酸配列、及びＡｄ３５パッケージング配列の少なくとも一部と隣接するリコンビナーゼ同方向反復配列（ＤＲ）、を含む組換えＡｄ３５ヘルパーゲノムと、５’Ａｄ３５逆方向末端反復配列（ＩＴＲ）、３’Ａｄ３５　ＩＴＲ、Ａｄ３５パッケージング配列、及び少なくとも１つの異種発現産物をコードする核酸配列、を含む組換えヘルパー依存型Ａｄ３５ドナーゲノムと、を含む組換えＡｄ３５ベクター産生系。

【０５８８】

実施形態２

アデノウイルス血清型３５型（Ａｄ３５）ファイバーシャフトと、Ａｄ３５ファイバーノブと、Ａｄ３５パッケージング配列の少なくとも一部と隣接するリコンビナーゼ同方向反復配列（ＤＲ）を含むＡｄ３５ゲノムと、を含む組換えＡｄ３５ヘルパーベクター。

【０５８９】

実施形態３

アデノウイルス血清型３５型（Ａｄ３５）ファイバーシャフトをコードする核酸配列と、Ａｄ３５ファイバーノブをコードする核酸配列と、Ａｄ３５パッケージング配列の少なくとも一部と隣接するリコンビナーゼ同方向反復配列（ＤＲ）と、を含む組換えＡｄ３５ヘルパーゲノム。

【０５９０】

実施形態４

５’アデノウイルス血清型３５型（Ａｄ３５）逆方向末端反復配列（ＩＴＲ）、３’Ａｄ３５　ＩＴＲ、Ａｄ３５パッケージング配列、少なくとも１つの異種発現産物をコードする核酸配列、を含む核酸配列であって、前記ゲノムが、Ａｄ３５ウイルス構造タンパク質をコードする核酸配列を含まない前記核酸配列と、Ａｄ３５ファイバーシャフト及び／またはＡｄ３５ファイバーノブと、を含む組換えヘルパー依存型Ａｄ３５ドナーベクター。

【０５９１】

実施形態５

５’アデノウイルス血清型３５型（Ａｄ３５）逆方向末端反復配列（ＩＴＲ）と、３’Ａｄ３５　ＩＴＲと、Ａｄ３５パッケージング配列と、少なくとも１つの異種発現産物をコードする核酸配列と、を含む組換えヘルパー依存型Ａｄ３５ドナーゲノムであって、前記

Ａｄ３５ドナーゲノムが、野生型Ａｄ３５ゲノムによってコードされる発現産物をコードする核酸配列を含まない、前記組換えヘルパー依存型Ａｄ３５ドナーゲノム。

【０５９２】

実施形態６

組換えヘルパー依存型アデノウイルス血清型３５型（Ａｄ３５）ドナーベクターを産生させる方法であって、前記方法が、細胞の培養物から前記組換えヘルパー依存型Ａｄ３５ドナーベクターを単離することを含み、前記細胞が、Ａｄ３５ファイバーシャフトをコードする核酸配列、Ａｄ３５ファイバーノブをコードする核酸配列、及びＡｄ３５パッケージング配列の少なくとも一部と隣接するリコンビナーゼ同方向反復配列（ＤＲ）、を含む組換えＡｄ３５ヘルパーゲノムと、５’Ａｄ３５逆方向末端反復配列（ＩＴＲ）、３’Ａｄ３５　ＩＴＲ、Ａｄ３５パッケージング配列、及び少なくとも１つの異種発現産物をコードする核酸配列、を含む組換えヘルパー依存型Ａｄ３５ドナーゲノムと、を含む、前記方法。

【０５９３】

実施形態７

アデノウイルス血清型３５型（Ａｄ３５）ファイバーシャフトをコードする核酸配列、Ａｄ３５ファイバーノブをコードする核酸配列、及びＡｄ３５パッケージングシグナルは機能的に破壊するが、５’Ａｄ３５逆方向末端反復配列（ＩＴＲ）は機能的に破壊しない、前記Ａｄ３５ゲノムの５’末端から５５０ヌクレオチド以内に位置するリコンビナーゼ同方向反復配列（ＤＲ）、を含む前記組換えＡｄ３５ヘルパーゲノムと、５’Ａｄ３５　ＩＴＲ、３’Ａｄ３５　ＩＴＲ、Ａｄ３５パッケージング配列、及び少なくとも１つの異種発現産物をコードする核酸配列、を含む組換えＡｄ３５ドナーゲノムと、を含む組換えＡｄ３５産生系。

【０５９４】

実施形態８

アデノウイルス血清型３５型（Ａｄ３５）ファイバーシャフトと、Ａｄ３５ファイバーノブと、Ａｄ３５パッケージングシグナルは機能的に破壊するが、５’Ａｄ３５逆方向末端反復配列（ＩＴＲ）は機能的に破壊しない、前記Ａｄ３５ゲノムの５’末端から５５０ヌクレオチド以内に位置するリコンビナーゼ同方向反復配列（ＤＲ）を含む前記Ａｄ３５ゲノムと、を含む組換えＡｄ３５ヘルパーベクター。

【０５９５】

実施形態９

アデノウイルス血清型３５型（Ａｄ３５）ファイバーシャフトをコードする核酸配列と、Ａｄ３５ファイバーノブをコードする核酸配列と、Ａｄ３５パッケージングシグナルは機能的に破壊するが、５’Ａｄ３５逆方向末端反復配列（ＩＴＲ）は機能的に破壊しない、前記Ａｄ３５ゲノムの５’末端から５５０ヌクレオチド以内に位置するリコンビナーゼ同方向反復配列（ＤＲ）と、を含む前記組換えＡｄ３５ヘルパーゲノム。

【０５９６】

実施形態１０

組換えヘルパー依存型アデノウイルス血清型３５型（Ａｄ３５）ドナーベクターを産生させる方法であって、前記方法が、細胞の培養物から前記組換えヘルパー依存型Ａｄ３５ドナーベクターを単離することを含み、前記細胞が、Ａｄ３５ファイバーシャフトをコードする核酸配列、Ａｄ３５ファイバーノブをコードする核酸配列、及びＡｄ３５パッケージングシグナルは機能的に破壊するが、５’Ａｄ３５逆方向末端反復配列（ＩＴＲ）は機能的に破壊しない、前記Ａｄ３５ゲノムの５’末端から５５０ヌクレオチド以内に位置するリコンビナーゼ同方向反復配列（ＤＲ）、を含む前記組換えＡｄ３５ヘルパーゲノムと、５’Ａｄ３５　ＩＴＲ、３’Ａｄ３５　ＩＴＲ、Ａｄ３５パッケージング配列、及び少なくとも１つの異種発現産物をコードする核酸配列、を含む組換えＡｄ３５ドナーゲノムと、を含む、前記方法。

【０５９７】

実施形態１１
前記Ａｄ３５ファイバーノブが野生型Ａｄ３５ファイバーノブを含むか、または前記Ａｄ３５ファイバーノブが、操作されたＡｄ３５ファイバーノブを含み、前記操作されたファイバーノブが、前記ファイバーノブとＣＤ４６との親和性を上昇させる変異を含む、実施形態１～４または実施形態６～１０のいずれか１つに記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、ドナーベクター、または方法。
【０５９８】
実施形態１２
前記変異が、Ｉｌｅ１９２Ｖａｌ、Ａｓｐ２０７Ｇｌｙ（もしくはＧｌｕ２０７Ｇｌｙ）、Ａｓｎ２１７Ａｓｐ、Ｔｈｒ２２６Ａｌａ、Ｔｈｒ２４５Ａｌａ、Ｔｈｒ２５４Ｐｒｏ、Ｉｌｅ２５６Ｌｅｕ、Ｉｌｅ２５６Ｖａｌ、Ａｒｇ２５９Ｃｙｓ、及びＡｒｇ２７９Ｈｉｓから選択される変異を含むか、またはＩｌｅ１９２Ｖａｌ、Ａｓｐ２０７Ｇｌｙ（もしくはＧｌｕ２０７Ｇｌｙ）、Ａｓｎ２１７Ａｓｐ、Ｔｈｒ２２６Ａｌａ、Ｔｈｒ２４５Ａｌａ、Ｔｈｒ２５４Ｐｒｏ、Ｉｌｅ２５６Ｌｅｕ、Ｉｌｅ２５６Ｖａｌ、Ａｒｇ２５９Ｃｙｓ、及びＡｒｇ２７９Ｈｉｓである変異のそれぞれを含む、実施形態１１に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、ドナーベクター、または方法。
【０５９９】
実施形態１３
前記異種発現産物が、制御配列と機能可能なように連結された治療用発現産物を含み、任意選択で、前記治療用発現産物が、（ａ）β－グロビンタンパク質またはγ－グロビンタンパク質、（ｂ）抗体またはその免疫グロブリン鎖であって、任意選択で、前記抗体が抗ＣＤ３３抗体を含む、前記抗体またはその免疫グロブリン鎖、（ｃ）第１の抗体またはその免疫グロブリン鎖及び第２の抗体またはその免疫グロブリン鎖であって、任意選択で、前記抗体が抗ＣＤ３３抗体を含む、前記第１の抗体またはその免疫グロブリン鎖及び前記第２の抗体またはその免疫グロブリン鎖、（ｄ）ＣＲＩＳＰＲ関連ＲＮＡガイド型エンドヌクレアーゼ及び／またはガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）であって、任意選択で、前記ＣＲＩＳＰＲ関連ＲＮＡガイド型エンドヌクレアーゼがＣａｓ９またはｃｐｆ１を含む、前記ＣＲＩＳＰＲ関連ＲＮＡガイド型エンドヌクレアーゼ及び／または前記ｇＲＮＡ、（ｅ）塩基エディター及び／またはｇＲＮＡであって、任意選択で、前記塩基エディターがシトシン塩基エディター（ＣＢＥ）またはアデニン塩基エディター（ＡＢＥ）を含み、任意選択で、前記塩基エディターが、無能化Ｃａｓ９及び無能化ｃｐｆ１から選択される触媒的に無能化されたヌクレアーゼを含む、前記塩基エディター及び／または前記ｇＲＮＡ、（ｆ）凝固因子、またはウイルス感染を遮断もしくは低減するタンパク質であって、任意選択で、前記治療用発現産物が第ＶＩＩ因子補充タンパク質または第ＶＩＩＩ因子補充タンパク質を含む、前記凝固因子、または前記ウイルス感染を遮断もしくは低減するタンパク質、（ｇ）チェックポイント阻害剤、（ｈ）キメラ抗原受容体または操作されたＴ細胞受容体、あるいは（ｉ）γＣ、ＪＡＫ３、ＩＬ７ＲＡ、ＲＡＧ１、ＲＡＧ２、ＤＣＬＲＥ１Ｃ、ＰＲＫＤＣ、ＬＩＧ４、ＮＨＥＪ１、ＣＤ３Ｄ、ＣＤ３Ｅ、ＣＤ３Ｚ、ＣＤ３Ｇ、ＰＴＰＲＣ、ＺＡＰ７０、ＬＣＫ、ＡＫ２、ＡＤＡ、ＰＮＰ、ＷＨＮ、ＣＨＤ７、ＯＲＡＩ１、ＳＴＩＭ１、ＣＯＲＯ１Ａ、ＣＩＩＴＡ、ＲＦＸＡＮＫ、ＲＦＸ５、ＲＦＸＡＰ、ＲＭＲＰ、ＤＫＣ１、ＴＥＲＴ、ＴＩＮＦ２、ＤＣＬＲＥ１Ｂ、ＳＬＣ４６Ａ１、ＦａｎｃＡ、ＦａｎｃＢ、ＦａｎｃＣ、ＦａｎｃＤ１、ＦａｎｃＤ２、ＦａｎｃＥ、ＦａｎｃＦ、ＦａｎｃＧ、ＦａｎｃＩ、ＦａｎｃＪ、ＦａｎｃＬ、ＦａｎｃＭ、ＦａｎｃＮ、ＦａｎｃＯ、ＦａｎｃＰ、ＦａｎｃＱ、ＦａｎｃＲ、ＦａｎｃＳ、ＦａｎｃＴ、ＦａｎｃＵ、ＦａｎｃＶ、ＦａｎｃＷ、可溶性ＣＤ４０、ＣＴＬＡ、ＦａｓＬ、ＰＤ－Ｌ１に対する抗体、ＣＤ４に対する抗体、ＣＤ５に対する抗体、ＣＤ７に対する抗体、ＣＤ５２に対する抗体、ＩＬ－１に対する抗体、ＩＬ－２に対する抗体、ＩＬ－４に対する抗体、ＩＬ－６に対する抗体、ＩＬ－１０に対する抗体、ＴＮＦに対する抗体、自己反応性Ｔ細胞上に特異的に存在するＴＣＲに対する抗体、グロビンファミリー遺伝子、ＷＡＳ、ｐｈｏｘ、ジスト

ロフィン、ピルビン酸キナーゼ、ＣＬＮ３、ＡＢＣＤ１、アリールスルファターゼＡ、ＳＦＴＰＢ、ＳＦＴＰＣ、ＮＬＸ２．１、ＡＢＣＡ３、ＧＡＴＡ１、リボソームタンパク質遺伝子、ＴＥＲＴ、ＴＥＲＣ、ＤＫＣ１、ＴＩＮＦ２、ＣＦＴＲ、ＬＲＲＫ２、ＰＡＲＫ２、ＰＡＲＫ７、ＰＩＮＫ１、ＳＮＣＡ、ＰＳＥＮ１、ＰＳＥＮ２、ＡＰＰ、ＳＯＤ１、ＴＤＰ４３、ＦＵＳ、ユビキリン２、及び／またはＣ９ＯＲＦ７２からなる群から選択されるタンパク質であって、任意選択で、前記タンパク質がＦａｎｃＡタンパク質を含む、前記タンパク質、を含む、実施形態１、実施形態４～７、または実施形態１０～１２のいずれか１つに記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ドナーゲノム、ドナーベクター、または方法。

【０６００】

実施形態１４

前記ｇＲＮＡが、ＨＢＧ１、ＨＢＧ２、及び／または赤血球エンハンサーｂｃｌ１１ａの標的核酸配列に結合し、任意選択で、前記ｇＲＮＡが、γ－グロビンの発現が増加するように操作されるか、または前記ｇＲＮＡが、ＣＤ３３の一部をコードする標的核酸配列に結合し、任意選択で、前記ＣＤ３３がヒトＣＤ３３を含む、実施形態１３（ｄ）または実施形態１３（ｅ）に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ドナーゲノム、ドナーベクター、または方法。

【０６０１】

実施形態１５

前記治療用発現産物が、β－グロビンタンパク質またはγ－グロビンタンパク質、ならびにＣＲＩＳＰＲ関連ＲＮＡガイド型エンドヌクレアーゼと、ＨＢＧ１の標的核酸配列に結合するｇＲＮＡ、ＨＢＧ２の標的核酸配列に結合するｇＲＮＡ、及び／またはＢｃｌ１１ａの標的核酸配列に結合するｇＲＮＡ、のうちの１つ、２つ、または３つと、を含むＣＲＩＳＰＲ系、を含み、任意選択で、前記ｇＲＮＡが、γ－グロビンの発現が増加するように操作される、実施形態１３に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ドナーゲノム、ドナーベクター、または方法。

【０６０２】

実施形態１６

前記制御配列（複数可）がプロモーターを含み、任意選択で、前記プロモーターがβ－グロビンプロモーターを含み、任意選択で、前記β－グロビンプロモーターが、約１．６ｋｂの長さを有し、及び／または１１番染色体の位置５２２８６３１～５２２７０２３の核酸を含む、実施形態１３に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ドナーゲノム、ドナーベクター、または方法。

【０６０３】

実施形態１７

前記制御配列（複数可）が遺伝子座制御領域（ＬＣＲ）を含み、任意選択で、前記ＬＣＲがβ－グロビンＬＣＲを含む、実施形態１３に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ドナーゲノム、ドナーベクター、または方法。

【０６０４】

実施形態１８

前記β－グロビンＬＣＲが、高感受性部位（ＨＳ）１、ＨＳ２、ＨＳ３、及びＨＳ４を含むもしくはＨＳ１、ＨＳ２、ＨＳ３、及びＨＳ４からなるβ－グロビンＬＣＲ　ＤＮＡｓｅＩ　ＨＳを含み、任意選択で、前記β－グロビンＬＣＲは、約４．３ｋｂの長さを有し、

前記β－グロビンＬＣＲが、ＨＳ１、ＨＳ２、ＨＳ３、ＨＳ４、及びＨＳ５を含むβ－グロビンＬＣＲ　ＤＮＡｓｅＩ　ＨＳを含み、任意選択で、前記β－グロビンＬＣＲは、約２１．５ｋｂの長さを有し、または

前記β－グロビンＬＣＲが、１１番染色体の位置５２９２３１９～５２７０７８９の配列を含む、実施形態１３に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ドナーゲノム、ドナーベクター、または方法。

【０６０５】
実施形態１９
前記制御配列（複数可）が３’ＨＳ１を含み、任意選択で、前記３’ＨＳ１が、１１番染色体の位置５２０６８６７～５２０３８３９の配列を含む、実施形態１３または実施形態１４に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ドナーゲノム、ドナーベクター、または方法。
【０６０６】
実施形態２０
前記制御配列（複数可）がｍｉＲＮＡ結合部位を含み、任意選択で、前記ｍｉＲＮＡ結合部位が、目的種が天然に発現するｍｉＲＮＡに対する結合部位を含み、前記ｍｉＲＮＡが、血中と腫瘍微小環境中または標的組織中とでは異なる占有率プロファイルを示し、任意選択で、前記占有率プロファイルが、前記腫瘍微小環境中または前記標的組織中と比較して血中で高く、前記ｍｉＲＮＡ結合部位が、ｍｉＲ４２３－５結合部位、ｍｉＲ４２３－５ｐ結合部位、ｍｉＲ４２－２結合部位、ｍｉＲ１８１ｃ結合部位、ｍｉＲ１２５ａ結合部位、もしくはｍｉＲ１５ａ結合部位を含み、及び／または前記ｍｉＲＮＡ結合部位が、ｍｉＲ１８７結合部位もしくはｍｉＲ２１８結合部位を含む、実施形態１３～１９のいずれか１つに記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ドナーゲノム、ドナーベクター、または方法。
【０６０７】
実施形態２１
前記異種発現産物をコードする前記核酸がペイロードの一部であり、前記ペイロードが組み込みエレメントをさらに含み、任意選択で、前記組み込みエレメントが発現産物を含む、実施形態１、実施形態４～７、または実施形態１０～２１のいずれか１つに記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ドナーゲノム、ドナーベクター、または方法。
【０６０８】
実施形態２２
前記組み込みエレメントが、相同組換えによって標的ゲノムに組み込まれるように操作され、前記組み込みエレメントが、前記標的ゲノムの連続的に連結された配列に対応するホモロジーアームと隣接し、任意選択で、前記ホモロジーアームが、０．８～１．８ｋｂであり、及び／または前記ホモロジーアームが、前記標的ゲノムのうちで染色体セーフハーバー遺伝子座と隣接する核酸配列と相同的であり、任意選択で、前記セーフハーバー遺伝子座が、ＡＡＶＳ１、ＣＣＲ５、ＨＰＲＴ、またはＲｏｓａから選択される、実施形態２１に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ドナーゲノム、ドナーベクター、または方法。
【０６０９】
実施形態２３
前記組み込みエレメントが、転位によって標的ゲノムに組み込まれるように操作され、前記組み込みエレメントが、トランスポゾン逆方向反復配列（ＩＲ）と隣接し、任意選択で、前記トランスポゾンＩＲが、リコンビナーゼＤＲと隣接する、実施形態２１に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ドナーゲノム、ドナーベクター、または方法。
【０６１０】
実施形態２４
前記トランスポゾンＩＲが、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙ（ＳＢ）ＩＲであり、任意選択で、前記ＳＢ ＩＲがｐＴ４ ＩＲであるか、または前記トランスポゾンＩＲが、ｐｉｇｇｙｂａｃｋ ＩＲ、Ｍａｒｉｎｅｒ ＩＲ、ｆｒｏｇ ｐｒｉｎｃｅ ＩＲ、Ｔｏｌ２ ＩＲ、ＴｃＢｕｓｔｅｒ ＩＲ、もしくはｓｐｉｎＯＮ ＩＲである、実施形態２３に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ドナーゲノム、ドナーベクター、または方法。
【０６１１】
実施形態２５

前記トランスポゾンＩＲと隣接する前記組み込みエレメントの転位を媒介するトランスポゼースをコードする核酸を含み、任意選択で、前記トランスポゼースをコードする前記核酸が、サポートベクターまたはサポートベクターゲノムに含まれる、実施形態２１～２４のいずれか１つに記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ドナーゲノム、ドナーベクター、または方法。

【０６１２】

実施形態２６

前記トランスポゼースが、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　ｂｅａｕｔｙトランスポゼース、ｐｉｇｇｙｂａｃｋトランスポゼース、Ｍａｒｉｎｅｒトランスポゼース、ｆｒｏｇ　ｐｒｉｎｃｅトランスポゼース、Ｔｏｌ２トランスポゼース、ＴｃＢｕｓｔｅｒトランスポゼース、またはｓｐｉｎＯＮトランスポゼースであり、任意選択で、前記トランスポゼースが、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ　１００ｘ（ＳＢ１００ｘ）トランスポゼースを含む、実施形態２５に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ドナーゲノム、ドナーベクター、または方法。

【０６１３】

実施形態２７

前記トランスポゼースをコードする前記核酸が、ＰＧＫプロモーターと機能可能なように連結される、実施形態２５または実施形態２６に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ドナーゲノム、ドナーベクター、または方法。

【０６１４】

実施形態２８

前記Ａｄ３５パッケージング配列の少なくとも一部と隣接し、及び／または前記Ａｄ３５ゲノムの５’末端から５５０ヌクレオチド以内に位置し、前記Ａｄ３５パッケージングシグナルは機能的に破壊するが、前記５’Ａｄ３５　ＩＴＲは機能的に破壊しない前記リコンビナーゼＤＲが、ＦＲＴ部位、ｌｏｘＰ部位、ｒｏｘ部位、ｖｏｘ部位、ＡｔｔＢ部位、またはＡｔｔＰ部位である、実施形態１～３または実施形態６～２７のいずれか１つに記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、または方法。

【０６１５】

実施形態２９

前記Ａｄ３５パッケージング配列の前記少なくとも一部を切除するためのリコンビナーゼをコードする核酸が、前記ヘルパーゲノムを含む細胞の核酸配列によってコードされる、実施形態２８に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、または方法。

【０６１６】

実施形態３０

前記トランスポゾンＩＲと隣接する前記リコンビナーゼＤＲが、ＦＲＴ部位、ｌｏｘＰ部位、ｒｏｘ部位、ｖｏｘ部位、ＡｔｔＢ部位、またはＡｔｔＰ部位である、実施形態２３～２９のいずれか１つに記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、または方法。

【０６１７】

実施形態３１

前記組み込みエレメントを含む核酸を切除するためのリコンビナーゼをコードする核酸が、サポートベクターまたはサポートベクターゲノムに含まれる、実施形態２１～２８のいずれか１つに記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、または方法。

【０６１８】

実施形態３２

前記リコンビナーゼが、Ｆｌｐリコンビナーゼ、Ｃｒｅリコンビナーゼ、Ｄｒｅリコンビナーゼ、Ｖｉｋａリコンビナーゼ、またはＰｈｉＣ３１リコンビナーゼを含む、実施形

態２９または実施形態３１に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、または方法。

【０６１９】

実施形態３３

前記リコンビナーゼをコードする前記核酸が、ＥＦ１αプロモーターと機能可能なように連結される、実施形態３２に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、または方法。

【０６２０】

実施形態３４

前記ペイロードが、前記異種発現産物を含む組み込みエレメントを含み、前記異種発現産物が、β－グロビンプロモーター及びβ－グロビン長鎖ＬＣＲと機能可能なように連結されたβ－グロビンタンパク質を含み、

前記組み込みエレメントが、ＳＢ　ＩＲと隣接し、前記ＳＢ　ＩＲが、リコンビナーゼＤＲと隣接し、任意選択で、前記リコンビナーゼＤＲが、ＦＲＴ部位である、実施形態２１～３３のいずれか１つに記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、または方法。

【０６２１】

実施形態３５

前記ペイロードが、組み込みエレメントと、発現産物をコードし、前記組み込みエレメントに含まれず、かつ前記組み込みエレメントが標的ゲノムに組み込まれることによって非機能性となる位置に存在する、条件的に発現する核酸配列と、を含む、実施形態２１～３４のいずれか１つに記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、または方法。

【０６２２】

実施形態３６

前記条件的に発現する核酸配列によってコードされる前記発現産物が、ＣＲＩＳＰＲ系構成要素または塩基エディター系構成要素を含み、任意選択で、前記構成要素が、ＣＲＩＳＰＲ関連ＲＮＡガイド型エンドヌクレアーゼ、塩基エディター酵素、またはｇＲＮＡを含む、実施形態３５に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、または方法。

【０６２３】

実施形態３７

前記ペイロードが選択カセットを含み、任意選択で、前記選択カセットが前記組み込みエレメントに含まれる、実施形態２１～３６のいずれか１つに記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、または方法。

【０６２４】

実施形態３８

前記選択カセットが、ｍｇｍｔ$^{Ｐ１４０Ｋ}$をコードする核酸配列を含むか、または前記選択カセットが、抗ＣＤ３３　ｓｈＲＮＡをコードする核酸配列を含む、実施形態３７に記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、または方法。

【０６２５】

実施形態３９

リコンビナーゼＤＲと隣接する、前記Ａｄ３５パッケージング配列の前記少なくとも一部が、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＡＸ０４９９８３のＡｄ３５配列のヌクレオチド１３８～４８１に対応する、実施形態１～３または実施形態６～３８のいずれか１つに記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、または方法。

【０６２６】

実施形態４０

リコンビナーゼＤＲと隣接する、前記Ａｄ３５パッケージング配列の前記少なくとも一

部が、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＡＸ０４９９８３のＡｄ３５配列のヌクレオチド１７９～３４４、ヌクレオチド３６６～４８１、ヌクレオチド１５５～４８１、ヌクレオチド１５９～４８０、ヌクレオチド１５９～４４６、ヌクレオチド１８０～４８０、ヌクレオチド２０７～４８０、ヌクレオチド１４０～４４６、ヌクレオチド１５９～４４６、ヌクレオチド１８０～４４６、ヌクレオチド２０２～４４６、ヌクレオチド１５９～４８１、ヌクレオチド１８０～３８４、ヌクレオチド１８０～４８１、またはヌクレオチド２０７～４８１に対応する、実施形態１～３または実施形態６～３８のいずれか１つに記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、または方法。

【０６２７】

実施形態４１

前記リコンビナーゼＤＲが、ＬｏｘＰ部位である、実施形態１～３または実施形態６～４０のいずれか１つに記載の組換えＡｄ３５ベクター産生系、ヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、または方法。

【０６２８】

実施形態４２

前記Ａｄ３５ヘルパーゲノムが、２９３Ｔ細胞における増幅のためのＡｄ５　Ｅ４ｏｒｆ６を含む、実施形態２、実施形態３、実施形態８、または実施形態９のいずれか１つに記載のヘルパーベクターまたはヘルパーゲノム。

【０６２９】

実施形態４３

前記ヘルパーゲノムが、配列番号５１～６５のいずれか１つに示される配列を含むか、または生成させる、実施形態２、実施形態３、実施形態８、または実施形態９のいずれか１つに記載のヘルパーベクターまたはヘルパーゲノム。

【０６３０】

実施形態４４

実施形態２～５、実施形態８、または実施形態９のいずれか１つに記載のヘルパーベクター、ヘルパーゲノム、ドナーベクター、またはドナーゲノムを含む細胞であって、任意選択で、前記細胞が、ＨＥＫ２９３細胞である、前記細胞。

【０６３１】

実施形態４５

実施形態１、実施形態４、実施形態６、実施形態７、実施形態１０、実施形態１３～２７、または実施形態４４のいずれか１つに記載のドナーゲノムを含む細胞であって、任意選択で、前記細胞が赤血球であり、任意選択で、前記細胞が造血幹細胞、Ｔ細胞、Ｂ細胞、または骨髄系細胞であり、任意選択で、前記細胞が前記発現産物を分泌する、前記細胞。

【０６３２】

実施形態４６

前記細胞が、ＨＥＫ２９３細胞である、実施形態６または実施形態１０～４１のいずれか１つに記載の方法。

【０６３３】

実施形態４７

細胞を改変する方法であって、前記方法が、実施形態５または実施形態１１～２７のいずれか１つに記載のＡｄ３５ドナーベクターと前記細胞とを接触させることを含む、前記方法。

【０６３４】

実施形態４８

対象の細胞を改変する方法であって、前記方法が、実施形態５または実施形態１１～２７のいずれか１つに記載のＡｄ３５ドナーベクターを前記対象に投与することを含み、任意選択で、前記方法が、前記対象から前記細胞を単離することを含まない、前記方法。

【０６３５】

実施形態４９

疾患または状態の治療を必要とする対象において当該治療を行う方法であって、前記方法が、実施形態５または実施形態１１～２７のいずれか１つに記載のＡｄ３５ドナーベクターを前記対象に投与することを含み、任意選択で、前記投与が、静脈内に対して行われる、前記方法。

【０６３６】

実施形態５０

前記方法が、前記対象に動員剤を投与することを含み、任意選択で、前記動員剤が、顆粒球コロニー刺激因子、ＧＭ－ＣＳＦ、Ｓ－ＣＳＦ、ＣＸＣＲ４アンタゴニスト、及びＣＸＣＲ２アゴニストの１つ以上を含み、任意選択で、前記ＣＸＣＲ４アンタゴニストがＡＭＤ３１００を含み、及び／または前記ＣＸＣＲ２アゴニストがＧＲＯ－βを含む、実施形態４９に記載の方法。

【０６３７】

実施形態５１

前記Ａｄ３５ドナーベクターが選択カセットを含み、任意選択で、前記方法が、前記対象に選択剤を投与することをさらに含み、任意選択で、前記選択カセットがｍｇｍｔ$^{Ｐ１４０Ｋ}$をコードし、前記選択剤が$Ｏ^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵを含む、実施形態４９または実施形態５０に記載の方法。

【０６３８】

実施形態５２

前記方法が、前記対象に免疫抑制剤を投与することをさらに含み、任意選択で、前記免疫抑制レジメンが、ステロイド、ＩＬ－６受容体アンタゴニスト、及び／またはＩＬ－１Ｒ受容体アンタゴニストを含み、任意選択で、前記ステロイドが、糖質コルチコイドまたはデキサメタゾンを含む、実施形態４９～５１のいずれか１つに記載の方法。

【０６３９】

実施形態５３

前記Ａｄ３５ドナーベクターが組み込みエレメントを含み、前記方法によって、ＣＤ４６を発現する細胞の少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、もしくは少なくとも９５％、造血幹細胞の少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、もしくは少なくとも９５％、及び／または赤血球Ｔｅｒ１１９$^{＋}$細胞の少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、もしくは少なくとも９５％においてその前記組み込みエレメントのコピーの組み込み及び／または発現が生じる、実施形態４９～５２のいずれか１つに記載の方法。

【０６４０】

実施形態５４

前記方法によって、前記組み込みエレメントのコピーを少なくとも１つ含む標的細胞ゲノムへと前記組み込みエレメントのコピーが平均で少なくとも２つまたは少なくとも２．５個組み込まれる、実施形態４９～５３のいずれか１つに記載の方法。

【０６４１】

実施形態５５

前記方法によって、前記ペイロードまたはその組み込みエレメントによってコードされる発現産物の発現が、参照のレベルの少なくとも約２０％または参照のレベルの少なくとも約２５％であるレベルで生じ、任意選択で、前記参照が、前記対象または参照集団における内在性参照タンパク質の発現である、実施形態４９～５４のいずれか１つに記載の方法。

【０６４２】

実施形態５６

前記疾患または前記状態が、異常ヘモグロビン症、血小板障害、貧血、免疫不全、凝固因子欠乏症、ファンコニ貧血、α１－アンチトリプシン欠乏症、鎌状赤血球貧血、サラセミア、中間型サラセミア、血友病Ａ、血友病Ｂ、フォン・ヴィレブランド病、第Ｖ因子欠乏症、第ＶＩＩ因子欠乏症、第Ｘ因子欠乏症、第ＸＩ因子欠乏症、第ＸＩＩ因子欠乏症、第ＸＩＩＩ因子欠乏症、ベルナール・スーリエ症候群、灰色血小板症候群、またはムコ多糖症を含む、実施形態４９～５５のいずれか１つに記載の方法。

【０６４３】

実施形態５７

前記対象が、がんを患っている対象であり、前記方法によって、がんが治療、阻止、もしくは遅延されるか、またはがん再発が遅延され、任意選択で、前記対象が、がんの発症と関連する１つ以上の生殖細胞系列変異の保因者であり、任意選択で、前記がんが、退形成性星細胞腫、乳癌、卵巣癌、結腸直腸癌、びまん性内在脳幹グリオーマ、ユーイング肉腫、多形神経膠芽腫、悪性神経膠腫、黒色腫、転移性悪性黒色腫、鼻咽頭癌、または小児がんを含み、任意選択で、前記対象に対して、$O^6$ＢＧ、ＴＭＺ（テモゾロミド）、及び／またはＢＣＮＵ（カルムスチン）が投与されているか、または投与される、実施形態４９～５６のいずれか１つに記載の方法。

【０６４４】

実施形態５８

前記疾患または前記状態が中間型サラセミアを含み、任意選択で、内在性γ－グロビンの発現を増加または再活性化させる発現産物（複数可）であって、任意選択で、内在性γ－グロビンの発現を増加または再活性化させる前記発現産物（複数可）は、ＣＲＩＳＰＲ関連ＲＮＡガイド型エンドヌクレアーゼまたは塩基エディターと、ＨＢＧ１の核酸配列に結合し、前記標的核酸配列に機能可能なように連結されたコード配列からの発現を増加させるように操作されたｇＲＮＡ、ＨＢＧ２の核酸配列に結合し、前記標的核酸配列と機能可能なように連結されたコード配列からの発現を増加させるように操作されたｇＲＮＡ、及びＢＣＬ１１Ａ発現を低減するように操作された、赤血球エンハンサーｂｃｌ１１ａの核酸配列に結合するｇＲＮＡ、のうちの１つ以上と、を含む前記発現産物（複数可）；γ－グロビン；ならびにβ－グロビン；から選択される１つ以上の発現産物をコードする核酸を前記ベクターまたは前記ゲノムが含み、任意選択で、前記方法によって、中間型サラセミアの症状が低減され、及び／または中間型サラセミアが治療され、及び／またはＨｂＦが増加する、実施形態４９～５７のいずれか１つに記載の方法。

【０６４５】

実施形態例の第２のセットは、下記のものを含み得る。

実施形態１

造血幹細胞をインビボで遺伝子編集するためのＣＤ４６標的指向性組換え血清型３５型アデノウイルス（Ａｄ３５）ベクター。

【０６４６】

実施形態２

前記ベクターのファイバーノブタンパク質が、ＣＤ４６との結合を増加させる変異を含む、実施形態１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６４７】

実施形態３

前記ファイバーノブタンパク質変異が、Ａｓｎ２１７Ａｓｐ、Ｔｈｒ２５４Ｐｒｏ、Ｉｌｅ２５６Ｌｅｕ、Ａｓｐ２０７Ｇｌｙ（またはＧｌｕ２０７Ｇｌｙ）、Ｔｈｒ２４５Ａｌａ、Ｔｈｒ２２６Ａｌａ、Ｉｌｅ１９２Ｖａｌ、Ｉｌｅ２５６Ｖａｌ、Ａｒｇ２５９Ｃｙｓ、及びＡｒｇ２７９Ｈｉｓの１つ以上から選択される、実施形態２に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６４８】

実施形態４

前記ファイバーノブタンパク質変異が、Ａｓｎ２１７Ａｓｐ、Ｔｈｒ２５４Ｐｒｏ、Ｉ

ｌｅ２５６Ｌｅｕ、Ａｓｐ２０７Ｇｌｙ（またはＧｌｕ２０７Ｇｌｙ）、Ｔｈｒ２４５Ａｌａ、Ｔｈｒ２２６Ａｌａ、Ｉｌｅ１９２Ｖａｌ、Ｉｌｅ２５６Ｖａｌ、Ａｒｇ２５９Ｃｙｓ、及びＡｒｇ２７９Ｈｉｓを含む、実施形態２に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６４９】

実施形態５

前記ファイバーノブタンパク質変異が、Ａｓｎ２１７Ａｓｐ、Ｔｈｒ２５４Ｐｒｏ、Ｉｌｅ２５６Ｌｅｕ、Ａｓｐ２０７Ｇｌｙ（またはＧｌｕ２０７Ｇｌｙ）、Ｔｈｒ２４５Ａｌａ、Ｔｈｒ２２６Ａｌａ、Ｉｌｅ１９２Ｖａｌ、Ｉｌｅ２５６Ｖａｌ、Ａｒｇ２５９Ｃｙｓ、及びＡｒｇ２７９Ｈｉｓからなる、実施形態２に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６５０】

実施形態６

コードされる遺伝子の発現をインビボで制御するｍｉＲＮＡ制御系を含む、実施形態１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６５１】

実施形態７

前記ｍｉＲＮＡ制御系が、血中と腫瘍微小環境中または標的組織中とでは占有率プロファイルが異なるｍｉＲＮＡ標的部位からなる、実施形態６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６５２】

実施形態８

前記占有率プロファイルが、前記腫瘍微小環境中または前記標的組織中と比較して血中で高い、実施形態７に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６５３】

実施形態９

前記ｍｉＲＮＡ標的部位が、ｍｉＲ４２３－５、ｍｉＲ４２３－５ｐ、ｍｉＲ４２－２、ｍｉＲ１８１ｃ、ｍｉＲ１２５ａ、及び／またはｍｉＲ１５ａを含む、実施形態６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６５４】

実施形態１０

前記ｍｉＲＮＡ標的部位が、Ｃａｓ９の発現を制御する、実施形態６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６５５】

実施形態１１

前記ｍｉＲＮＡ標的部位が、ｍｉＲ１８７及び／またはｍｉＲ２１８を含む、実施形態６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６５６】

実施形態１２

ＤＮＡ切断を媒介し、及び／または内在性遺伝子の発現を活性化させるためのＣＲＩＳＰＲ要素をコードするヌクレオチドを含む、実施形態１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６５７】

実施形態１３

前記ＣＲＩＳＰＲ要素が、ヌクレアーゼ及びガイドＲＮＡを含む、実施形態１２に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６５８】

実施形態１４

前記ヌクレアーゼが、Ｃａｓ９またはｃｐｆ１を含む、実施形態１３に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６５９】

実施形態１５

前記ＣＲＩＳＰＲ要素が、触媒的に無能化されたヌクレアーゼを含む、実施形態１２に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６６０】

実施形態１６

前記触媒的に無能化されたヌクレアーゼが、無能化Ｃａｓ９または無能化ｃｐｆ１を含む、実施形態１５に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６６１】

実施形態１７

前記触媒的に無能化されたヌクレアーゼが、ガイドＲＮＡ及びシチジンデアミナーゼもしくはアデニンデアミナーゼまたはシチジントランスアミナーゼもしくはアデニントランスアミナーゼと融合される、実施形態１５に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６６２】

実施形態１８

前記ガイドＲＮＡが、ＨＢＧ１プロモーター、ＨＢＧ２プロモーター、及び／またはｂｃｌ１１ａエンハンサーに結合する、実施形態１３に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６６３】

実施形態１９

陽性選択マーカーを含む、実施形態１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６６４】

実施形態２０

前記陽性選択マーカーが、抗ＣＤ３３　ｓｈＲＮＡカセット及び／またはＭＧＭＴ$^{Ｐ１４０Ｋ}$カセットを含む、実施形態１９に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６６５】

実施形態２１

ホモロジーアームを含む、実施形態１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６６６】

実施形態２２

前記ホモロジーアームが、０．８～１．８ｋｂである、実施形態２１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６６７】

実施形態２３

前記ホモロジーアームが、染色体セーフハーバー遺伝子座に特異的である、実施形態２１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６６８】

実施形態２４

前記染色体前記セーフハーバー遺伝子座が、ＡＡＶＳ１、ＣＣＲ５、ＨＰＲＴ、またはＲｏｓａから選択される、実施形態２３に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６６９】

実施形態２５

トランスポゼースによって認識される逆方向反復配列を含む、実施形態１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６７０】

実施形態２６

トランスポゼースをコードするヌクレオチド配列を含む、実施形態１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６７１】

実施形態２７

前記トランスポゼースが、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　ｂｅａｕｔｙ、ｐｉｇｇｙｂａｃｋ、Ｍａｒｉｎｅｒ、ｆｒｏｇ　ｐｒｉｎｃｅ、Ｔｏｌ２、ＴｃＢｕｓｔｅｒ、及びｓｐｉｎＯＮを含む、実施形態２６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６７２】
実施形態２８
前記トランスポゼースが、高活性Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　ｂｅａｕｔｙトランスポゼースまたは高活性ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゼースを含む、実施形態２６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０６７３】
実施形態２９
前記高活性Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　ｂｅａｕｔｙトランスポゼースが、ＳＢ１００Ｘを含む、実施形態２８に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０６７４】
実施形態３０
前記トランスポゼースをコードする前記ヌクレオチド配列が、ＰＧＫプロモーターの転写制御下にある、実施形態２６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０６７５】
実施形態３１
リコンビナーゼ認識配列を含む、実施形態１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０６７６】
実施形態３２
前記リコンビナーゼ認識配列が、Ｆｒｔ、ｌｏｘ、ｒｏｘ、ｖｏｘ、ＡｔｔＢ、またはＡｔｔＰを含む、実施形態３１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０６７７】
実施形態３３
リコンビナーゼをコードするヌクレオチド配列を含む、実施形態１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０６７８】
実施形態３４
前記リコンビナーゼが、Ｆｌｐ、Ｃｒｅ、Ｄｒｅ、Ｖｉｋａ、またはＰｈｉＣ３１を含む、実施形態３３に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０６７９】
実施形態３５
前記リコンビナーゼをコードする前記ヌクレオチド配列が、ＥＦ１αプロモーターの転写制御下にある、実施形態３３に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０６８０】
実施形態３６
治療用カセットを含む、実施形態１～３５のいずれか１つに記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０６８１】
実施形態３７
前記治療用カセットが、治療用遺伝子を含むか、または治療用遺伝子産物をコードし、前記治療用遺伝子産物が、γＣ、ＪＡＫ３、ＩＬ７ＲＡ、ＲＡＧ１、ＲＡＧ２、ＤＣＬＲＥ１Ｃ、ＰＲＫＤＣ、ＬＩＧ４、ＮＨＥＪ１、ＣＤ３Ｄ、ＣＤ３Ｅ、ＣＤ３Ｚ、ＣＤ３Ｇ、ＰＴＰＲＣ、ＺＡＰ７０、ＬＣＫ、ＡＫ２、ＡＤＡ、ＰＮＰ、ＷＨＮ、ＣＨＤ７、ＯＲＡＩ１、ＳＴＩＭ１、ＣＯＲＯ１Ａ、ＣＩＩＴＡ、ＲＦＸＡＮＫ、ＲＦＸ５、ＲＦＸＡＰ、ＲＭＲＰ、ＤＫＣ１、ＴＥＲＴ、ＴＩＮＦ２、ＤＣＬＲＥ１Ｂ、ＳＬＣ４６Ａ１、ＦａｎｃＡ、ＦａｎｃＢ、ＦａｎｃＣ、ＦａｎｃＤ１（ＢＲＣＡ２）、ＦａｎｃＤ２、ＦａｎｃＥ、ＦａｎｃＦ、ＦａｎｃＧ、ＦａｎｃＩ、ＦａｎｃＪ（ＢＲＩＰ１）、ＦａｎｃＬ、ＦａｎｃＭ、ＦａｎｃＮ（ＰＡＬＢ２）、ＦａｎｃＯ（ＲＡＤ５１Ｃ）、ＦａｎｃＰ（ＳＬＸ４）、ＦａｎｃＱ（ＥＲＣＣ４）、ＦａｎｃＲ（ＲＡＤ５１）、ＦａｎｃＳ（ＢＲＣＡ１）、ＦａｎｃＴ（ＵＢＥ２Ｔ）、ＦａｎｃＵ（ＸＲＣＣ２）、ＦａｎｃＶ（ＭＡＤ２Ｌ２）、ＦａｎｃＷ（ＲＦＷＤ３）、可溶性ＣＤ４０、ＣＴＬＡ、ＦａｓＬ、ＰＤ－Ｌ１

に対する抗体、ＣＤ４に対する抗体、ＣＤ５に対する抗体、ＣＤ７に対する抗体、ＣＤ５２に対する抗体、ＩＬ－１に対する抗体、ＩＬ－２に対する抗体、ＩＬ－４に対する抗体、ＩＬ－６に対する抗体、ＩＬ－１０に対する抗体、ＴＮＦに対する抗体、自己反応性Ｔ細胞上に特異的に存在するＴＣＲに対する抗体、グロビンファミリー遺伝子、ＷＡＳ、ｐｈｏｘ、ジストロフィン、ピルビン酸キナーゼ、ＣＬＮ３、ＡＢＣＤ１、アリールスルファターゼＡ、ＳＦＴＰＢ、ＳＦＴＰＣ、ＮＬＸ２．１、ＡＢＣＡ３、ＧＡＴＡ１、リボソームタンパク質遺伝子、ＴＥＲＴ、ＴＥＲＣ、ＤＫＣ１、ＴＩＮＦ２、ＣＦＴＲ、ＬＲＲＫ２、ＰＡＲＫ２、ＰＡＲＫ７、ＰＩＮＫ１、ＳＮＣＡ、ＰＳＥＮ１、ＰＳＥＮ２、ＡＰＰ、ＳＯＤ１、ＴＤＰ４３、ＦＵＳ、ユビキリン２、及び／またはＣ９ＯＲＦ７２から選択される、実施形態３６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６８２】

実施形態３８

前記治療用カセットが、共通ガンマ（γ）鎖、ＦａｎｃＡ、γ－グロビン、及び／またはＦＶＩＩＩを含むまたはコードする治療用遺伝子を含む、実施形態３６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６８３】

実施形態３９

前記治療用カセットが、キメラ抗原受容体、操作されたＴ細胞受容体、及び／または治療用抗体をコードする治療用遺伝子を含む、実施形態３６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６８４】

実施形態４０

前記治療用遺伝子が、β－グロビンプロモーターの転写制御下にある、実施形態３８に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６８５】

実施形態４１

前記治療用遺伝子が、ＤＮＡｓｅＩ高感受性部位（ＨＳ）１、ＨＳ２、ＨＳ３、及びＨＳ４からなるＨＳを含むβ－グロビン遺伝子座制御領域（ＬＣＲ）の転写制御下にある、実施形態３８に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６８６】

実施形態４２

前記β－グロビンＬＣＲが、約４．３ｋｂである、実施形態４１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６８７】

実施形態４３

前記治療用遺伝子が、さらに、β－グロビンプロモーターの転写制御下にある、実施形態４１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６８８】

実施形態４４

前記β－グロビンプロモーターが、約１．６ｋｂである、実施形態４３に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６８９】

実施形態４５

前記β－グロビンプロモーターが、１１番染色体の位置５２２８６３１～５２２７０２３の配列を有する、実施形態４４に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６９０】

実施形態４６

前記治療用遺伝子が、ＨＳ１、ＨＳ２、ＨＳ３、ＨＳ４、及びＨＳ５を含むβ－グロビン長鎖ＬＣＲの転写制御下にある、実施形態３８に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０６９１】

実施形態４７
前記β－グロビン長鎖ＬＣＲが、約２１．５ｋｂである、実施形態４６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０６９２】
実施形態４８
前記β－グロビン長鎖ＬＣＲが、１１番染色体の位置５２９２３１９～５２７０７８９の配列を有する、実施形態４７に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０６９３】
実施形態４９
前記治療用遺伝子が、さらに、β－グロビンプロモーターの転写制御下にある、実施形態４６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０６９４】
実施形態５０
前記β－グロビンプロモーターが、約１．６ｋｂである、実施形態４９に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０６９５】
実施形態５１
前記β－グロビンプロモーターが、１１番染色体の位置５２２８６３１～５２２７０２３の配列を有する、実施形態５０に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０６９６】
実施形態５２
３’ＨＳ１をさらに含む、実施形態４６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０６９７】
実施形態５３
前記３’ＨＳ１が、１１番染色体の位置５２０６８６７～５２０３８３９の配列を有する、実施形態５２に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０６９８】
実施形態５４
少なくとも３０ｋｂのトランスポゾンを含む、実施形態１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０６９９】
実施形態５５
３２．４ｋｂのトランスポゾンを含む、実施形態１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７００】
実施形態５６
ヘルパーウイルスを使用して生成される、実施形態１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７０１】
実施形態５７
前記ヘルパーウイルスが、２９３Ｔ細胞における増幅のためのＡｄ５　Ｅ４ｏｒｆ６を含む、実施形態５６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７０２】
実施形態５８
前記ヘルパーウイルスが、Ａｄ３５シグナル伝達配列及びパッケージング配列を含む、実施形態５６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７０３】
実施形態５９
前記ヘルパーウイルスが、ウイルス製造の間にＣＲＩＳＰＲ要素が発現することを阻止するための抗ＣＲＩＳＰＲ（ａｃｒ）発現カセットを含む、実施形態５６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０７０４】
実施形態６０
前記ヘルパーベクターが、配列番号５１～６４の配列を含むか、または生成させる、実施形態５６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７０５】
実施形態６１
治療用タンパク質を発現するように遺伝子改変された赤血球。
【０７０６】
実施形態６２
前記治療用タンパク質が、凝固因子、またはウイルス感染を遮断もしくは低減するタンパク質を含む、実施形態６１に記載の赤血球。
【０７０７】
実施形態６３
前記赤血球が、前記治療用タンパク質を分泌する、実施形態６１に記載の赤血球。
【０７０８】
実施形態６４
赤血球ｂｃｌ１１ａエンハンサー及びＨＢＧプロモーター領域を同時に標的とすることによってＨｂＦの再活性化を増加させるための、実施形態１～６３のいずれかに記載の組換えＡｄ３５ベクターまたは赤血球の使用。
【０７０９】
実施形態６５
γ－グロビン遺伝子の付加及び内在性γ－グロビン遺伝子の再活性化を統合するための、実施形態１～６３のいずれかに記載の組換えＡｄ３５ベクターまたは赤血球の使用。
【０７１０】
実施形態６６
インビボでのＣＲＩＳＰＲゲノム操作のための、実施形態１～６３のいずれかに記載の組換えＡｄ３５ベクターまたは赤血球の使用。
【０７１１】
実施形態６７
治療用遺伝子を提供するための、実施形態１～６３のいずれかに記載の組換えＡｄ３５ベクターまたは赤血球の使用。
【０７１２】
実施形態６８
（ｉ）異常ヘモグロビン症、（ｉｉ）ファンコニ貧血、（ｉｉｉ）血友病Ａ、血友病Ｂ、もしくはフォン・ヴィレブランド病から任意選択で選択される凝固因子欠乏症、（ｉｖ）血小板障害、（ｖ）貧血、（ｖｉ）α－１アンチトリプシン欠乏症、または（ｖ）免疫不全、を治療するための、実施形態１～６３のいずれかに記載の組換えＡｄ３５ベクターまたは赤血球の使用。
【０７１３】
実施形態６９
サラセミアを治療するための、実施形態１～６３のいずれかに記載の組換えＡｄ３５ベクターまたは赤血球の使用。
【０７１４】
実施形態７０
がんの治療、がん再発の阻止もしくは遅延、または高リスクの生殖細胞系列変異の保因者におけるがん発症の阻止もしくは遅延のための、実施形態１～６３のいずれかに記載の組換えＡｄ３５ベクターまたは赤血球の使用であって、任意選択で、前記がんが、乳癌または卵巣癌である、前記使用。
【０７１５】
実施形態７１

ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を自己不活化させるための、実施形態１～６３のいずれかに記載の組換えＡｄ３５ベクターまたは赤血球の使用。

【０７１６】

実施形態７２

自己遊離カセットを含むドナーベクターとしてＨＤＡｄを使用する標的指向化組み込みのための、実施形態１～３のいずれかに記載の組換えＡｄ３５ベクターまたは赤血球の使用。

【０７１７】

実施形態７３

動員を含む、実施形態６４～７２のいずれかに記載の使用。

【０７１８】

実施形態７４

前記動員が、Ｇｒｏ－ベータ、ＧＭ－ＣＳＦ、Ｓ－ＣＳＦ、及び／またはＡＭＤ３１００を投与することを含む、実施形態４９に記載の使用。

【０７１９】

実施形態７５

前記Ａｄ３５ベクター及び／または前記赤血球が投与されている対象に対してステロイド、ＩＬ－６受容体アンタゴニスト、及び／またはＩＬ－１Ｒ受容体アンタゴニストを投与することを含む、実施形態６４～７２のいずれかに記載の使用。

【０７２０】

実施形態７６

前記ステロイドが、糖質コルチコイドを含む、実施形態７５に記載の使用。

【０７２１】

実施形態７７

前記ステロイドが、デキサメタゾンを含む、実施形態７５に記載の使用。

【０７２２】

実施形態７８

前記Ａｄ３５ベクター及び／または前記赤血球が投与されている対象に対してＯ６ＢＧ及びＴＭＺ（テモゾロミド）またはＢＣＮＵ（カルムスチン）を投与することを含む、実施形態６４～７２のいずれかに記載の使用。

【０７２３】

実施形態７９

前記対象が、退形成性星細胞腫、乳癌、結腸直腸癌、びまん性内在脳幹グリオーマ、ユーイング肉腫、多形神経膠芽腫（ＧＢＭ）、悪性神経膠腫、黒色腫、転移性悪性黒色腫、鼻咽頭癌、または小児がんの治療としてＯ６ＢＧ及びＴＭＺまたはＢＣＮＵを投与されている、実施形態７８に記載の使用。

【０７２４】

実施形態例の第３のセットは、下記のものを含み得る。

実施形態１

造血幹細胞をインビボで遺伝子編集するためのＣＤ４６標的指向性組換え血清型３５型アデノウイルス（Ａｄ３５）ベクター。

【０７２５】

実施形態２

前記ベクターのファイバーノブタンパク質が、ＣＤ４６との結合を増加させる変異を含む、実施形態１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０７２６】

実施形態３

前記ファイバーノブタンパク質変異が、Ａｓｎ２１７Ａｓｐ、Ｔｈｒ２５４Ｐｒｏ、Ｉｌｅ２５６Ｌｅｕ、Ａｓｐ２０７Ｇｌｙ（またはＧｌｕ２０７Ｇｌｙ）、Ｔｈｒ２４５Ａｌａ、Ｔｈｒ２２６Ａｌａ、Ｉｌｅ１９２Ｖａｌ、Ｉｌｅ２５６Ｖａｌ、Ａｒｇ２５９Ｃ

ｙｓ、及びＡｒｇ２７９Ｈｉｓの１つ以上から選択される、実施形態２に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７２７】
実施形態４
前記ファイバーノブタンパク質変異が、Ａｓｎ２１７Ａｓｐ、Ｔｈｒ２５４Ｐｒｏ、Ｉｌｅ２５６Ｌｅｕ、Ａｓｐ２０７Ｇｌｙ（またはＧｌｕ２０７Ｇｌｙ）、Ｔｈｒ２４５Ａｌａ、Ｔｈｒ２２６Ａｌａ、Ｉｌｅ１９２Ｖａｌ、Ｉｌｅ２５６Ｖａｌ、Ａｒｇ２５９Ｃｙｓ、及びＡｒｇ２７９Ｈｉｓを含む、実施形態２に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７２８】
実施形態５
前記ファイバーノブタンパク質変異が、Ａｓｎ２１７Ａｓｐ、Ｔｈｒ２５４Ｐｒｏ、Ｉｌｅ２５６Ｌｅｕ、Ａｓｐ２０７Ｇｌｙ（またはＧｌｕ２０７Ｇｌｙ）、Ｔｈｒ２４５Ａｌａ、Ｔｈｒ２２６Ａｌａ、Ｉｌｅ１９２Ｖａｌ、Ｉｌｅ２５６Ｖａｌ、Ａｒｇ２５９Ｃｙｓ、及びＡｒｇ２７９Ｈｉｓからなる、実施形態２に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７２９】
実施形態６
コードされる遺伝子の発現をインビボで制御するｍｉＲＮＡ制御系を含む、実施形態１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７３０】
実施形態７
前記ｍｉＲＮＡ制御系が、血中と腫瘍微小環境中または標的組織中とでは占有率プロファイルが異なるｍｉＲＮＡ標的部位からなる、実施形態６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７３１】
実施形態８
前記占有率プロファイルが、前記腫瘍微小環境中または前記標的組織中と比較して血中で高い、実施形態７に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７３２】
実施形態９
前記ｍｉＲＮＡ標的部位が、ｍｉＲ４２３－５、ｍｉＲ４２３－５ｐ、ｍｉＲ４２－２、ｍｉＲ１８１ｃ、ｍｉＲ１２５ａ、及び／またはｍｉＲ１５ａを含む、実施形態６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７３３】
実施形態１０
前記ｍｉＲＮＡ標的部位が、Ｃａｓ９の発現を制御する、実施形態６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７３４】
実施形態１１
前記ｍｉＲＮＡ標的部位が、ｍｉＲ１８７及び／またはｍｉＲ２１８を含む、実施形態６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７３５】
実施形態１２
ＤＮＡ切断を媒介し、及び／または内在性遺伝子の発現を活性化させるためのＣＲＩＳＰＲ要素をコードするヌクレオチドを含む、実施形態１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７３６】
実施形態１３
前記ＣＲＩＳＰＲ要素が、ヌクレアーゼ及びガイドＲＮＡを含む、実施形態１２に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７３７】

実施形態１４
前記ヌクレアーゼが、Ｃａｓ９またはｃｐｆ１を含む、実施形態１３に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７３８】
実施形態１５
前記ＣＲＩＳＰＲ要素が、触媒的に無能化されたヌクレアーゼを含む、実施形態１２に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７３９】
実施形態１６
前記触媒的に無能化されたヌクレアーゼが、無能化Ｃａｓ９または無能化ｃｐｆ１を含む、実施形態１５に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７４０】
実施形態１７
前記触媒的に無能化されたヌクレアーゼが、ガイドＲＮＡ及びシチジンデアミナーゼもしくはアデニンデアミナーゼまたはシチジントランスアミナーゼもしくはアデニントランスアミナーゼと融合される、実施形態１５に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７４１】
実施形態１８
前記ガイドＲＮＡが、ＨＢＧ１、ＨＢＧ２、及び／またはＢｃ１１ａに結合する、実施形態１３に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７４２】
実施形態１９
陽性選択マーカーを含む、実施形態１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７４３】
実施形態２０
前記陽性選択マーカーが、抗ＣＤ３３　ｓｈＲＮＡカセット及び／またはＭＧＭＴ$^{Ｐ１４０Ｋ}$カセットを含む、実施形態１９に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７４４】
実施形態２１
ホモロジーアームを含む、実施形態１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７４５】
実施形態２２
前記ホモロジーアームが、０．８～１．８ｋｂである、実施形態２１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７４６】
実施形態２３
前記ホモロジーアームが、染色体セーフハーバー遺伝子座に特異的である、実施形態２１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７４７】
実施形態２４
前記染色体セーフハーバー遺伝子座が、ＡＡＶＳ１、ＣＣＲ５、ＨＰＲＴ、またはＲｏｓａから選択される、実施形態２３に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７４８】
実施形態２５
トランスポゼースによって認識される逆方向反復配列を含む、実施形態１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７４９】
実施形態２６
トランスポゼースをコードするヌクレオチド配列を含む、実施形態１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０７５０】
実施形態２７
前記トランスポゼースが、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ ｂｅａｕｔｙ、ｐｉｇｇｙｂａｃｋ、Ｍａｒｉｎｅｒ、ｆｒｏｇ ｐｒｉｎｃｅ、Ｔｏｌ２、ＴｃＢｕｓｔｅｒ、及びｓｐｉｎＯＮを含む、実施形態２６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７５１】
実施形態２８
前記トランスポゼースが、高活性Ｓｌｅｅｐｉｎｇ ｂｅａｕｔｙトランスポゼースまたは高活性ｐｉｇｇｙｂａｃトランスポゼースを含む、実施形態２６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７５２】
実施形態２９
前記高活性Ｓｌｅｅｐｉｎｇ ｂｅａｕｔｙトランスポゼースが、ＳＢ１００Ｘを含む、実施形態２８に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７５３】
実施形態３０
前記トランスポゼースをコードする前記ヌクレオチド配列が、ＰＧＫプロモーターの転写制御下にある、実施形態２６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７５４】
実施形態３１
リコンビナーゼ認識配列を含む、実施形態１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７５５】
実施形態３２
前記リコンビナーゼ認識配列が、Ｆｒｔ、ｌｏｘ、ｒｏｘ、ｖｏｘ、ＡｔｔＢ、またはＡｔｔＰを含む、実施形態３１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７５６】
実施形態３３
リコンビナーゼをコードするヌクレオチド配列を含む、実施形態１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７５７】
実施形態３４
前記リコンビナーゼが、Ｆｌｐ、Ｃｒｅ、Ｄｒｅ、Ｖｉｋａ、またはＰｈｉＣ３１を含む、実施形態３３に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７５８】
実施形態３５
前記リコンビナーゼをコードする前記ヌクレオチド配列が、ＥＦ１αプロモーターの転写制御下にある、実施形態３３に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７５９】
実施形態３６
治療用カセットを含む、実施形態１～３５のいずれか１つに記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７６０】
実施形態３７
前記治療用カセットが、治療用遺伝子を含むか、または治療用遺伝子産物をコードし、前記治療用遺伝子産物が、γＣ、ＪＡＫ３、ＩＬ７ＲＡ、ＲＡＧ１、ＲＡＧ２、ＤＣＬＲＥ１Ｃ、ＰＲＫＤＣ、ＬＩＧ４、ＮＨＥＪ１、ＣＤ３Ｄ、ＣＤ３Ｅ、ＣＤ３Ｚ、ＣＤ３Ｇ、ＰＴＰＲＣ、ＺＡＰ７０、ＬＣＫ、ＡＫ２、ＡＤＡ、ＰＮＰ、ＷＨＮ、ＣＨＤ７、ＯＲＡＩ１、ＳＴＩＭ１、ＣＯＲＯ１Ａ、ＣＩＩＴＡ、ＲＦＸＡＮＫ、ＲＦＸ５、ＲＦＸＡＰ、ＲＭＲＰ、ＤＫＣ１、ＴＥＲＴ、ＴＩＮＦ２、ＤＣＬＲＥ１Ｂ、ＳＬＣ４６Ａ１、ＦａｎｃＡ、ＦａｎｃＢ、ＦａｎｃＣ、ＦａｎｃＤ１（ＢＲＣＡ２）、ＦａｎｃＤ２、Ｆａｎ

ｃＥ、ＦａｎｃＦ、ＦａｎｃＧ、ＦａｎｃＩ、ＦａｎｃＪ（ＢＲＩＰ１）、ＦａｎｃＬ、ＦａｎｃＭ、ＦａｎｃＮ（ＰＡＬＢ２）、ＦａｎｃＯ（ＲＡＤ５１Ｃ）、ＦａｎｃＰ（ＳＬＸ４）、ＦａｎｃＱ（ＥＲＣＣ４）、ＦａｎｃＲ（ＲＡＤ５１）、ＦａｎｃＳ（ＢＲＣＡ１）、ＦａｎｃＴ（ＵＢＥ２Ｔ）、ＦａｎｃＵ（ＸＲＣＣ２）、ＦａｎｃＶ（ＭＡＤ２Ｌ２）、ＦａｎｃＷ（ＲＦＷＤ３）、可溶性ＣＤ４０、ＣＴＬＡ、ＦａｓＬ、ＰＤ－Ｌ１に対する抗体、ＣＤ４に対する抗体、ＣＤ５に対する抗体、ＣＤ７に対する抗体、ＣＤ５２に対する抗体、ＩＬ－１に対する抗体、ＩＬ－２に対する抗体、ＩＬ－４に対する抗体、ＩＬ－６に対する抗体、ＩＬ－１０に対する抗体、ＴＮＦに対する抗体、自己反応性Ｔ細胞上に特異的に存在するＴＣＲに対する抗体、グロビンファミリー遺伝子、ＷＡＳ、ｐｈｏｘ、ジストロフィン、ピルビン酸キナーゼ、ＣＬＮ３、ＡＢＣＤ１、アリールスルファターゼＡ、ＳＦＴＰＢ、ＳＦＴＰＣ、ＮＬＸ２．１、ＡＢＣＡ３、ＧＡＴＡ１、リボソームタンパク質遺伝子、ＴＥＲＴ、ＴＥＲＣ、ＤＫＣ１、ＴＩＮＦ２、ＣＦＴＲ、ＬＲＲＫ２、ＰＡＲＫ２、ＰＡＲＫ７、ＰＩＮＫ１、ＳＮＣＡ、ＰＳＥＮ１、ＰＳＥＮ２、ＡＰＰ、ＳＯＤ１、ＴＤＰ４３、ＦＵＳ、ユビキリン２、及び／またはＣ９ＯＲＦ７２から選択される、実施形態３６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０７６１】

実施形態３８

前記治療用カセットが、共通ガンマ（γ）鎖、ＦａｎｃＡ、γ－グロビン、及び／またはＦＶＩＩＩを含むまたはコードする治療用遺伝子を含む、実施形態３６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０７６２】

実施形態３９

前記治療用カセットが、キメラ抗原受容体、操作されたＴ細胞受容体、及び／または治療用抗体をコードする治療用遺伝子を含む、実施形態３６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０７６３】

実施形態４０

前記治療用遺伝子が、β－グロビンプロモーターの転写制御下にある、実施形態３８に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０７６４】

実施形態４１

前記治療用遺伝子が、ＤＮＡｓｅＩ高感受性部位（ＨＳ）１、ＨＳ２、ＨＳ３、及びＨＳ４からなるＨＳを含むβ－グロビン遺伝子座制御領域（ＬＣＲ）の転写制御下にある、実施形態３８に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０７６５】

実施形態４２

前記β－グロビンＬＣＲが、約４．３ｋｂである、実施形態４１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０７６６】

実施形態４３

前記治療用遺伝子が、さらに、β－グロビンプロモーターの転写制御下にある、実施形態４１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０７６７】

実施形態４４

前記β－グロビンプロモーターが、約１．６ｋｂである、実施形態４３に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０７６８】

実施形態４５

前記β－グロビンプロモーターが、１１番染色体の位置５２２８６３１～５２２７０２３の配列を有する、実施形態４４に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０７６９】
実施形態４６
前記治療用遺伝子が、ＨＳ１、ＨＳ２、ＨＳ３、ＨＳ４、及びＨＳ５を含むβ－グロビン長鎖ＬＣＲの転写制御下にある、実施形態３８に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７７０】
実施形態４７
前記β－グロビン長鎖ＬＣＲが、約２１．５ｋｂである、実施形態４６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７７１】
実施形態４８
前記β－グロビン長鎖ＬＣＲが、１１番染色体の位置５２９２３１９～５２７０７８９の配列を有する、実施形態４７に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７７２】
実施形態４９
前記治療用遺伝子が、さらに、β－グロビンプロモーターの転写制御下にある、実施形態４６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７７３】
実施形態５０
前記β－グロビンプロモーターが、約１．６ｋｂである、実施形態４９に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７７４】
実施形態５１
前記β－グロビンプロモーターが、１１番染色体の位置５２２８６３１～５２２７０２３の配列を有する、実施形態５０に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７７５】
実施形態５２
３’ＨＳ１をさらに含む、実施形態４６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７７６】
実施形態５３
前記３’ＨＳ１が、１１番染色体の位置５２０６８６７～５２０３８３９の配列を有する、実施形態５２に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７７７】
実施形態５４
少なくとも３０ｋｂのトランスポゾンを含む、実施形態１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７７８】
実施形態５５
３２．４ｋｂのトランスポゾンを含む、実施形態１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７７９】
実施形態５６
ヘルパーウイルスを使用して生成される、実施形態１に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７８０】
実施形態５７
前記ヘルパーウイルスが、２９３Ｔ細胞における増幅のためのＡｄ５　Ｅ４ｏｒｆ６を含む、実施形態５６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７８１】
実施形態５８
前記ヘルパーウイルスが、Ａｄ３５シグナル伝達配列及びパッケージングシグナルを含む、実施形態５６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。

【０７８２】
実施形態５９
前記ヘルパーウイルスが、ウイルス製造の間にＣＲＩＳＰＲ要素が発現することを阻止するための抗ＣＲＩＳＰＲ（ａｃｒ）発現カセットを含む、実施形態５６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７８３】
実施形態６０
前記ヘルパーベクターが、配列番号５１～６５のいずれか１つに示される配列を含むか、または生成させる、実施形態５６に記載の組換えＡｄ３５ベクター。
【０７８４】
実施形態６１
治療用タンパク質を発現するように遺伝子改変された赤血球。
【０７８５】
実施形態６２
前記治療用タンパク質が、凝固因子、またはウイルス感染を遮断もしくは低減するタンパク質を含む、実施形態６１に記載の赤血球。
【０７８６】
実施形態６３
前記赤血球が、前記治療用タンパク質を分泌する、実施形態６１に記載の赤血球。
【０７８７】
実施形態６４
前記赤血球ｂｃｌ１１ａエンハンサー及び前記ＨＢＧプロモーター領域を同時に標的とすることによってＨｂＦの再活性化を増加させるための、実施形態１～６３のいずれかに記載の組換えＡｄ３５ベクターまたは赤血球の使用。
【０７８８】
実施形態６５
γ－グロビン遺伝子の付加及び内在性γ－グロビン遺伝子の再活性化を統合するための、実施形態１～６３のいずれかに記載の組換えＡｄ３５ベクターまたは赤血球の使用。
【０７８９】
実施形態６６
インビボでのＣＲＩＳＰＲゲノム操作のための、実施形態１～６３のいずれかに記載の組換えＡｄ３５ベクターまたは赤血球の使用。
【０７９０】
実施形態６７
治療用遺伝子を提供するための、実施形態１～６３のいずれかに記載の組換えＡｄ３５ベクターまたは赤血球の使用。
【０７９１】
実施形態６８
（ｉ）異常ヘモグロビン症、（ｉｉ）ファンコニ貧血、（ｉｉｉ）血友病Ａ、血友病Ｂ、もしくはフォン・ヴィレブランド病から任意選択で選択される凝固因子欠乏症、（ｉｖ）血小板障害、（ｖ）貧血、（ｖｉ）α－１アンチトリプシン欠乏症、または（ｖ）免疫不全、を治療するための、実施形態１～６３のいずれかに記載の組換えＡｄ３５ベクターまたは赤血球の使用。
【０７９２】
実施形態６９
サラセミアを治療するための、実施形態１～６３のいずれかに記載の組換えＡｄ３５ベクターまたは赤血球の使用。
【０７９３】
実施形態７０
がんの治療、がん再発の阻止もしくは遅延、または高リスクの生殖細胞系列変異の保因

者におけるがん発症の阻止もしくは遅延のための、実施形態１～６３のいずれかに記載の組換えＡｄ３５ベクターまたは赤血球の使用であって、任意選択で、前記がんが、乳癌または卵巣癌である、前記使用。

【０７９４】

実施形態７１

ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を自己不活化させるための、実施形態１～６３のいずれかに記載の組換えＡｄ３５ベクターまたは赤血球の使用。

【０７９５】

実施形態７２

自己遊離カセットを含むドナーベクターとしてＨＤＡｄを使用する標的指向化組み込みのための、実施形態１～３のいずれかに記載の組換えＡｄ３５ベクターまたは赤血球の使用。

【０７９６】

実施形態７３

動員を含む、実施形態６４～７２のいずれかに記載の使用。

【０７９７】

実施形態７４

前記動員が、Ｇｒｏ－ベータ、ＧＭ－ＣＳＦ、Ｓ－ＣＳＦ、及び／またはＡＭＤ３１００を投与することを含む、実施形態４９に記載の使用。

【０７９８】

実施形態７５

前記Ａｄ３５ベクター及び／または前記赤血球が投与されている対象に対してステロイド、ＩＬ－６受容体アンタゴニスト、及び／またはＩＬ－１Ｒ受容体アンタゴニストを投与することを含む、実施形態６４～７２のいずれかに記載の使用。

【０７９９】

実施形態７６

前記ステロイドが、糖質コルチコイドを含む、実施形態７５に記載の使用。

【０８００】

実施形態７７

前記ステロイドが、デキサメタゾンを含む、実施形態７５に記載の使用。

【０８０１】

実施形態７８

前記Ａｄ３５ベクター及び／または前記赤血球が投与されている対象に対して$O^6$ＢＧ及びＴＭＺ（テモゾロミド）またはＢＣＮＵ（カルムスチン）を投与することを含む、実施形態６４～７２のいずれかに記載の使用。

【０８０２】

実施形態７９

前記対象が、退形成性星細胞腫、乳癌、結腸直腸癌、びまん性内在脳幹グリオーマ、ユーイング肉腫、多形神経膠芽腫（ＧＢＭ）、悪性神経膠腫、黒色腫、転移性悪性黒色腫、鼻咽頭癌、または小児がんの治療として$O^6$ＢＧ及びＴＭＺまたはＢＣＮＵを投与されている、実施形態７８に記載の使用。

【実施例】

【０８０３】

ＶＩ．実験的実施例

実施例１．インビボでの造血幹細胞遺伝子治療は、マウスの中間型サラセミアを軽快させる。

【０８０４】

この実施例では、「健康な」ヒトＣＤ４６トランスジェニック（ＣＤ４６ｔｇ）マウスにおいて、ヒトγ－グロビン遺伝子を発現する組み込みＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを用いるインビボＨＳＰＣ遺伝子治療手法について例示される。概念実証として、この手法

は、中間型サラセミアのマウスモデル（ＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウス）において例示される。これは、サラセミアに対する従来のレンチウイルスベクターエクスビボ遺伝子治療の代替となるものである。この実施例に含まれる情報の少なくともいくつかは、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，（Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ．１２９（２）：５９８－６１５，２０１９；ｅ－ｐｕｂ Ｎｏｖｅｍｂｅｒ １３，２０１８）に公開されたものである。

【０８０５】

サラセミアは、世界的に最もよく見られるヒトの遺伝性疾患の１つであり（Ｗｅａｔｈｅｒａｌｌ，Ａｎｎ Ｎ Ｙ Ａｃａｄ Ｓｃｉ．１２０２：１７－２３，２０１０）、β－グロビン鎖合成の完全欠損（β０／β０）または欠損（β＋／β＋）に起因して生じる。β－サラセミアメジャーを患って生まれる小児の人数は毎年６０，０００人に上る。サラセミアメジャーを患う小児は、治療を行わなければ１０代の早いうちに死に至る。ヘモグロビン四量体の形成に十分なβ－グロビン鎖合成が行われない場合、過剰なα－グロビン鎖が沈降し、骨髄における後期赤芽球の早期死滅を引き起こすまたは循環赤血球の半減期を短期化させる封入体が形成されることで、β－サラセミアの主要な血液学的特徴、赤血球生成の非効率化、及び赤血球の死滅が引き起こされる。結果として生じる貧血によって造血コンパートメントの拡大が刺激されて赤血球過形成及び髄外造血が生じる。

【０８０６】

β－サラセミアメジャーの主な治療様式は、生涯にわたる赤血球（ＲＢＣ）輸血及び過剰な鉄を除去するためのキレート療法を含む対症療法からなるか、または同種異系造血幹／前駆細胞（ＨＳＰＣ）の移植を伴う根治的治療からなる。適合度の高いドナーが見つからない患者または同種異系ＨＳＰＣ移植を受ける上でリスクを伴う患者については、レンチウイルスベクターでの野生型β－グロビン遺伝子治療または胎児型γ－グロビン遺伝子治療が、同種異系移植の免疫学的リスクを回避する治療となる可能性を有する。マイクロＬＣＲカセットが組み込まれたＳＩＮレンチウイルスグロビンベクターを用いるＨＳＰＣ遺伝子治療では、動物モデル及びインビトロの患者細胞においてβ－サラセミア表現型及び鎌状赤血球症（ＳＣＤ）表現型が解消された（Ｐｓｔａｈａ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．１７（５）：３６４－３７８，２０１７）。このことに基づいて、欧州、アジア、及び米国においてサラセミア及びＳＣＤに対する臨床治験が現在数多く行われている（Ｐｓｔａｈａ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．１７（５）：３６４－３７８，２０１７，Ｃａｖａｚａｎｎａ－Ｃａｌｖｏ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ．４６７（７３１３）：３１８－３２２，２０１０、Ｆｅｒａｒｒｉ ｅｔ ａｌ．，Ｈｅｍａｔｏｌｏｇｙ／Ｏｎｃｏｌｏｇｙ Ｃｌｉｎｉｃｓ ｏｆ Ｎｏｒｔｈ Ａｍｅｒｉｃａ：Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ．３１（５），Ｔｈｏｍｐｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ．３７８（１６）：１４７９－１４９３，２０１８）。こうした治験からこれまでに得られたデータは、β＋遺伝子型を有する患者の大部分については輸血が長期的に不要となることを実証するものであるが、β０／β０サラセミアの治療については依然として課題が残っている。

【０８０７】

臨床結果は有望なものであるものの、現在のサラセミア遺伝子治療プロトコールは複雑であり、白血球アフェレーシスによるドナー／患者からのＨＳＰＣの収集を行い、インビトロでの培養を行い、β－グロビン発現カセットまたはγ－グロビン発現カセットを保有するレンチウイルスベクターでの形質導入を行い、完全骨髄破壊的前処理を施した患者に再移植を行うことを伴うものである。技術的に複雑であること以外にも、この手法には他に不都合な点があり、こうした不都合な点には、（ａ）複数のサイトカイン（造血幹細胞（ＨＳＣ）の多能性及びその生着潜在力に影響を与え得る）の存在下での培養が必要になる点、（ｂ）骨髄破壊的前処理レジメンが必要になる点（慢性の非悪性疾患及び既存の臓器障害を有する患者（異常ヘモグロビン症患者など）において骨髄破壊的前処理を行うことは、憂慮すべき造血性及び非造血性の早発毒性及び遅発毒性と関連する臨床的リスク因子となることによるものある）、ならびに（ｃ）この手法は費用がかさむものであるとい

う点、が含まれる。サラセミアが流行しているのは資源が乏しい国々であるいう事実に鑑みれば、より簡便かつ安価な治療手法が求められている。

【０８０８】

白血球アフェレーシス、骨髄破壊的前処理、及びＨＳＰＣ移植を行なうことなくインビボでＨＳＰＣ遺伝子を送達するための、侵襲性が最小かつ様式移行が容易に可能な手法が開発されている（Ｒｉｃｈｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．２０１６；１２８（１８）：２２０６－２２１７、Ｒｉｃｈｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｈｅｍａｔｏｌ Ｏｎｃｏｌ Ｃｌｉｎ Ｎｏｒｔｈ Ａｍ．３１（５）：７７１－７８５，２０１７、Ｒｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．１２８（１８）：２１９４－２１９，２０１６）。この手法では、Ｇ－ＣＳＦ／ＡＭＤ３１００を注射して骨髄から末梢血流へとＨＳＰＣを動員し、組み込みヘルパー依存型アデノウイルス（ＨＤＡｄ５／３５＋＋）ベクター系が静脈内注射される。ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターは、ヒトＣＤ４６（未分化ＨＳＣ上に発現する受容体）を標的とする（Ｒｉｃｈｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．１２８（１８）：２２０６－２２１７，２０１６）。ＨＤＡｄ５／３５＋＋では、ファイバーノブドメイン及びシャフトを除くすべてのタンパク質が血清型５型に由来し、ファイバーノブドメイン及びシャフトは血清型３５型に由来し（このＡｄ３５ファイバーノブにはＣＤ４６に対する親和性を上昇させる変異が導入されている（ＷＯ２０１０／０１２０５４１を参照のこと））、ＩＴＲ及びパッケージングシグナルはＡｄ５に由来する。ＨｄＡｄ３５＋＋では、タンパク質はすべて、血清型３５型に由来し、ファイバーノブにはＣＤ４６に対する親和性を上昇させる変異が導入されており、ＩＴＲ及びパッケージングシグナルはＡｄ３５に由来する。

【０８０９】

導入遺伝子の組み込みは、高活性Ｓｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙトランスポゼース（ＳＢ１００Ｘ）によって無作為なパターンで達成される（Ｍａｔｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｇｅｎｅｔ．４１（６）：７５３－７６１，２００９）。末梢において形質導入されたＨＳＰＣが骨髄に戻ることが、ＧＦＰをレポーター遺伝子として使用してマウスモデルで実証されており、骨髄においてこの形質導入ＨＳＰＣは存続し、インビボで形質導入されたマウス及び二次レシピエントにおいて当該レポーターを長期的に安定して発現する（Ｒｉｃｈｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．２０１６；１２８（１８）：２２０６－２２１７）。

【０８１０】

サラセミアを表現型的に修正するためには導入遺伝子によるマーキングが高いレベルで必要になることを考慮して、ＭＧＭＴ$^{Ｐ１４０Ｋ}$発現カセットをＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターに挿入することによってインビボＨＳＰＣ形質導入手法を最適化することが行われた。これによって、遺伝子が修正された前駆細胞を、低用量のメチル化剤（例えば、Ｏ$^{6}$－ベンジルグアニン（Ｏ$^{6}$ＢＧ）＋ビス－クロロエチルニトロソ尿素（ＢＣＮＵ）またはテモゾロミド）を用いてインビボで選択することが可能になる（Ｂｅａｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ．１２０（７）：２３４５－２３５４，２０１０、Ｌａｒｏｃｈｅｌｌｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ．１１９（７）：１９５２－１９６３，２００９、Ｔｒｏｂｒｉｄｇｅ ｅｔ ａｌ．，ＰＬｏＳ Ｏｎｅ．７（９）：ｅ４５１７３，２０１２）。この統合されたインビボ形質導入／選択手法は安全であり、結果的に、末梢血液細胞の最大８０％がＧＦＰを安定的に発現し、二次レシピエントにおいてもレベルが維持されることが以前に示されており、このことは、この形質導入が自己更新し、多系譜にまたがり、かつ長期的なＨＳＣの再増殖を伴う安定したものであることを示している（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ．８：５２－６４，２０１８）。

【０８１１】

本明細書では、このインビボＨＳＰＣ遺伝子治療手法を、「健康な」ヒトＣＤ４６トランスジェニック（ＣＤ４６ｔｇ）マウス、さらには概念実証として中間型サラセミアのマウスモデル（ＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウス）において、ヒトγ－グロビン遺伝

子発現組み込みＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを使用して試験した。

【０８１２】

材料及び方法．試薬．

下記の試薬を使用した：Ｇ－ＣＳＦ（Ｎｅｕｐｏｇｅｎ，Ａｍｇｅｎ）、ＡＭＤ３１００（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、プレリキサホル（Ｍｏｚｏｂｉｌ，Ｇｅｎｚｙｍｅ Ｃｏｒｐ．）、Ｏ$^{6}$－ＢＧ及びＢＣＮＵ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、ミコフェノール酸モフェチル（ＣｅｌｌＣｅｐｔ Ｉｎｔｒａｖｅｎｏｕｓ，Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、ラパマイシン（Ｒａｐａｍｕｎｅ／シロリムス、Ｐｆｉｚｅｒ）、ならびにメチルプレドニゾロン（Ｐｆｉｚｅｒ）。

【０８１３】

ＨＤＡｄベクター．

トランスポゾンベクターＨＤＡｄ－γ－グロビン／ｍｇｍｔ、及びＳＢ１００Ｘ発現ヒト胎児腎臓２９３細胞由来１１６細胞の生成（Ｐａｌｍｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ．Ｖｏｌｕｍｅ １：Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｉｎ ｖｉｖｏ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｏｆ Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ Ｖｅｃｔｏｒｓ（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ）：３３－５３，２００９）については以前に記載されている（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ．９：１４２－１５２，２０１８）。ヘルパーウイルスの混入レベルは０．０５％未満であることが明らかとなった。力価は、６×１０$^{12}$～１２×１０$^{12}$ｖｐ／ｍｌであった。この試験で使用したＨＤＡｄベクターはすべて、Ａｄ５ファイバーテール、Ａｄ３５ファイバーシャフト、及び親和性増強型Ａｄ３５＋＋ファイバーノブから構成されるキメラファイバーを含む（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｖｉｒｏｌ．８２（２１）：１０５６７－１０５７９，２００８）。ＨＤＡｄ調製物はすべて、１０$^{10}$ｖｐ中の野生型ウイルスのコピー数が１未満のものであった（このコピー数は、他に記載のプライマーを使用してｑＰＣＲによって測定した；Ｈａｅｕｓｓｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＰＬｏＳ Ｏｎｅ．６（８）：ｅ２３１６０，２０１１）。

【０８１４】

ヒトγ－グロビン発現を検出する細胞内フローサイトメトリー．

ＦＩＸ＆ＰＥＲＭ細胞透過処理キット（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用し、製造者のプロトコールに従った。簡潔に記載すると、１×１０$^{6}$個の細胞を１００μｌのＦＡＣＳ緩衝液（１％のＦＣＳが添加されたＰＢＳ）中に再浮遊させ、１００μｌの試薬Ａ（固定化媒体）を添加し、室温で２～３分間インキュベートした後、予冷した無水メタノールを１ｍｌ添加し、混合し、暗所、氷上で１０分間インキュベートした。次に、ＦＡＣＳ緩衝液で試料を洗浄し、１００μｌの試薬Ｂ（透過処理媒体）及び１μｇのγ－グロビン抗体（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，カタログｓｃ－２１７５６ＰＥ）中に再浮遊させ、室温で３０分間インキュベートした。洗浄後、ＦＡＣＳ緩衝液中に細胞を再浮遊させ、分析した。赤血球及びγ－グロビンの両方を染色する場合については、細胞を最初にＡＰＣ抗マウスＴｅｒ１１９抗体（Ｔｅｒ１１９－ＡＰＣ、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ，カタログ１１６２１２）で染色した後、洗浄し、上記のように固定化媒体で固定化した。

【０８１５】

グロビンＨＰＬＣ．

個々のグロビン鎖レベルの定量化は、ＳＰＤ－１０ＡＶダイオードアレイ検出器及びＬＣ－１０ＡＴバイナリポンプ（Ｓｈｉｍａｄｚｕ）を備えたＳｈｉｍａｄｚｕ Ｐｒｏｍｉｎｅｎｃｅ機器で実施した。ＶｙｄａｃＣ４逆相カラム（Ｈｉｃｈｒｏｍ）を使用して、トリフルオロ酢酸含量０．１％の水／アセトニトリルの３８％→６０％グラジエント混合物を流速１ｍｌ／分で適用した。

【０８１６】

リアルタイム逆転写ＰＣＲ．

製造者のフェノール－クロロホルム抽出方法に従ってＴＲＩｚｏｌ（商標）試薬（Ｔｈ

ｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号１５５９６０２６）を使用して５０～１００μｌの血液から全ＲＮＡを抽出した。ＱｕａｎｔｉＴｅｃｔ逆転写キット（Ｑｉａｇｅｎ、カタログ番号２０５３１１）及びＰｏｗｅｒ ＳＹＢＲ Ｇｒｅｅｎ ＰＣＲ Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号４３６７６５９）を使用した。リアルタイム定量的ＰＣＲは、ＳｔｅｐＯｎｅＰｌｕｓ Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ ＰＣＲ Ｓｙｓｔｅｍ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）で実施した。この作業では下記のプライマー対を使用した：マウスＲＰＬ１０フォワード（配列番号１８９）及びリバース（配列番号１９０）、ヒトγ－グロビンフォワード（配列番号１９１）及びリバース（配列番号１９２）、マウスβ－メジャーグロビンフォワード（配列番号１９３）及びリバース（配列番号１９４）。

【０８１７】

磁気細胞選別．

系譜決定細胞の除去については、製造者の説明に従ってマウスＬｉｎｅａｇｅ Ｃｅｌｌ Ｄｅｐｌｅｔｉｏｎ Ｋｉｔ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ、カタログ番号１３０－０９０－８５８）を使用した。一次ＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスの骨髄からのＴｅｒ１１９＋細胞の選択、または二次Ｃ５７Ｂｌ／６レシピエントの造血組織からのＣＤ４６＋細胞の選択については、ヒト抗ＣＤ４６－ＰＥ一次抗体（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ、カタログ１３０－１０４－５０８）での染色後に、それぞれマウス抗Ｔｅｒ１１９マイクロビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ、カタログ１３０－０４９－９０１）または抗ＰＥマイクロビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ、カタログ１３０－０４８－８０１）を使用した。

【０８１８】

動物試験．

ヒトＣＤ４６ゲノム遺伝子座についてホモ接合型であり、かつヒトのものと同様のレベル及びパターンでＣＤ４６を発現するＣ５７ＢＬ／６ベースのトランスジェニックマウス（ＣＤ４６ｔｇ）については、早くに記載されている（Ｋｅｍｐｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｅｘｐ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００１；１２４（２）：１８０－１８９）。ＣＤ４６ｔｇマウスについては、Ｒｏｂｅｒｔｏ Ｃａｔｔａｎｅｏ，Ｍａｙｏ Ｃｌｉｎｉｃ（Ｒｏｃｈｅｓｔｅｒ，Ｍｉｎｎｅｓｏｔａ，ＵＳＡ）による供与を受けた。ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターによる感染に感受性のサラセミアマウスモデルについては、雌性ＣＤ４６ｔｇマウスを雄性Ｈｂｂｔｈ－３マウス（Ｔｈｅ Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）と交配繁殖させ、Ｆ１をＣＤ４６ｔｇマウスと戻し交配させてＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスを生成させることによって得た。インビボでの形質導入／選択試験には、６～１０週齢の雌性ＣＤ４６ｔｇ及び雌性ＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３を使用した。６～１０週齢の雌性Ｃ５７ＢＬ／６マウスを二次レシピエントとして使用した。

【０８１９】

ＣＤ４６ｔｇマウスの動員及びインビボ形質導入．

ヒト組換えＧ－ＣＳＦを皮下注射（５μｇ／マウス／日、４日間）した後、５日目にＡＭＤ３１００（５ｍｇ／ｋｇ）を皮下注射することによってマウスにおいてＨＳＰＣを動員した。さらに、ウイルス注射の１６時間前及び２時間前に動物の腹腔内にデキサメタゾン（１０ｍｇ／ｋｇ）を投与した。ＡＭＤ３１００の注射から３０分後及び６０分後に、後眼窩静脈叢を介してＨＤＡｄ－γ－グロビン／ｍｇｍｔ＋ＨＤＡｄ－ＳＢを動物に静脈内注射した（$4\times10^{10}$ ｖｐ用量／注射（注射回数合計２回、３０分の間隔を空けた））。４週間後、$O^6$－ＢＧ（１５ｍｇ／ｋｇ、腹腔内）をマウスに２回注射（３０分の間隔を空けた）した。２回目の$O^6$－ＢＧ注射から１時間後、ＢＣＮＵ（５ｍｇ／ｋｇ、腹腔内）をマウスに注射した。２回目のサイクル及び３回目のサイクルではＢＣＮＵ用量を、それぞれ７．５ｍｇ／ｋｇ及び１０ｍｇ／ｋｇに増やした。

【０８２０】

ＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスの動員及びインビボ形質導入．

こうした試験では、２５０μｇ／ｋｇのＧ－ＣＳＦの腹腔内投与（１～６日間）及び５

ｍｇ／ｋｇのプレリキサホル（かつてはＡＭＤ３１００；Ｍｏｚｏｂｉｌ，Ｇｅｎｚｙｍｅ　Ｃｏｒｐ．）の腹腔内投与（５～７日目）を行う７日間の動員手法を、サラセミアマウスモデルにおいて以前に報告されたように適用した（Ｐｓａｔｈａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈｕｍ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ　Ｍｅｔｈｏｄｓ．２５（６）：３１７－３２７，２０１４）。インビボ形質導入は、上記のように実施した。処理後、複合的な免疫抑制を施した。１７週目に、インビボでの４回の選択サイクルにマウスを供し、この４回の選択サイクルでは、用量間の間隔を２週間としてＯ$^{6}$ＢＧ（３０ｍｇ／ｋｇ、腹腔内）及び漸増用量のＢＣＮＵ（５ｍｇ／ｋｇ、７．５ｍｇ／ｋｇ、１０ｍｇ／ｋｇ、１０ｍｇ／ｋｇ）を用いた。最後のＯ$^{6}$－ＢＧ／ＢＣＮＵ用量から２週間後に免疫抑制を再開した。

【０８２１】

免疫抑制．

ミコフェノール酸モフェチル（２０ｍｇ／ｋｇ／日）、ラパマイシン（０．２ｍｇ／ｋｇ／日）、及びメチルプレドニゾロン（２０ｍｇ／ｋｇ／日）の腹腔内注射（１日１回）を行った。

【０８２２】

二次骨髄移植．

Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙから入手した６～８週齢の雌性Ｃ５７ＢＬ／６マウスをレシピエントとした。移植日に、レシピエントマウスに１０Ｇｙの照射を行った。インビボ形質導入ＣＤ４６ｔｇマウスから骨髄細胞を無菌的に単離し、磁気細胞選別（ＭＡＣＳ）を使用して、系譜決定細胞が除去された細胞を単離した。照射から４時間後、１×１０$^{6}$個細胞／マウスで細胞を静脈内注射した。ＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウス試験では、１００ｍｇ／ｋｇのブスルファン（Ｂｕｓｉｌｖｅｘ，Ｐｉｅｒｒｅ　Ｆａｂｒｅ）の腹腔内投与（３つの１日用量に分割して実施）または致死性ＴＢＩ（１，０００ｃＧｙ）で移植前処理した準骨髄破壊的前処理二次Ｃ５７Ｂｌ／６レシピエントに対して、インビボ形質導入ＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスから得られた２×１０$^{6}$個の全骨髄細胞を移植した。２０週目に二次レシピエントを　殺し、血液、骨髄、及び脾臓からＣＤ４６＋細胞をＭＡＣＳによって単離するか、またはマウスを、上記のように動員処理及びインビボ形質導入に供した。すべての二次レシピエントにおいて４週目に免疫抑制を開始した。

【０８２３】

組織分析．

厚さ２．５μｍの脾臓組織切片及び肝臓組織切片を４％のホルムアルデヒド中で少なくとも２４時間固定化し、脱水し、パラフィン中に包埋した。髄外造血の組織学的評価にはＨ＆Ｅ染色を使用した。組織切片中のヘモジデリンの検出は、パールプルシアンブルー染色によって実施した。簡潔に記載すると、フェロシアン化カリウムと蒸留水希釈塩酸との等体積混合物（２％）で組織切片を処理した後、ニュートラルレッドで対比染色した。脾臓サイズは、体重（ｇ）に対する脾臓重量（ｍｇ）の比率として評価した。

【０８２４】

血液分析及び骨髄サイトスピン．

血液試料をＥＤＴＡ被覆管に収集し、ＨｅｍａＶｅｔ　９５０ＦＳ（Ｄｒｅｗ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）装置またはＰｒｏＣｙｔｅＤｘ（ＩＤＥＸＸ）装置で分析を実施した。末梢血塗抹標本を調製し、メイ・グリュンワルド／ギムザ（Ｍｅｒｃｋ）染色にそれぞれ５分間及び１５分間供した。サイトスピンデバイスを使用して骨髄細胞の浮遊液を遠心分離してスライドに乗せ、メイ・グリュンワルド／ギムザ染色に供した。

【０８２５】

統計．

データは、平均値±ＳＥＭとして示される。複数群の比較については、一元配置ＡＮＯＶＡ及び二元配置ＡＮＯＶＡを、多重比較のためのボンフェローニ事後検定と併用した。１つの群化変数についての群間差は、対応のない両側スチューデントｔ検定によって決定した。ノンパラメトリック解析については、クラスカル・ウォリス検定を使用した。統計

解析は、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍバージョン６．０１（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ　Ｉｎｃ．）を使用して実施した。Ｐ値が０．０５未満である場合に有意と見なした；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０００２、＊＊＊Ｐ≦０．００００３。

【０８２６】

動物試験の承認．

実験はすべて、管理を行うＩｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ　Ｒｅｖｉｅｗ　Ｂｏａｒｄ及びＩＡＣＵＣからの承認をもって実施した。

【０８２７】

結果．

インビボＨＳＰＣ形質導入の後にＣＤ４６ｔｇマウスでのインビボ選択を行うと、末梢ＲＢＣの大部分においてγ－グロビンが安定的に発現するようになる。治療用ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターは、赤血球において効率的な発現を生じさせる５ｋｂの「マイクロ」β－グロビンＬＣＲ／β－プロモーターの制御下にあるヒトγ－グロビン遺伝子、ならびにＭＧＭＴ$^{Ｐ１４０Ｋ}$発現カセットを含む（図２Ａ、ＨＤＡｄ－γ－グロビン／ｍｇｍｔ）。ＣＤ４６ｔｇマウスは、ヒトのものと同様のパターン及びレベルでＨＤＡｄ５／３５＋＋受容体ＣＤ４６を発現するヒトＣＤ４６遺伝子座についてホモ接合型であり、それ故に、インビボＨＳＰＣ形質導入試験のモデルとなる（Ｒｉｃｈｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．１２８（１８）：２２０６－２２１７，２０１６、Ｋｅｍｐｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ　Ｅｘｐ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．１２４（２）：１８０－１８９，２００１）。「健康な」ＣＤ４６ｔｇマウスでのこうした試験の目的は、マウス細胞でのヒトγ－グロビンのレベル、キネティクス、及び分布、ならびに手法の安全性を分析することとした。動物をＧ－ＣＳＦ／ＡＭＤ３１００での動員処理に供した後、ＨＤＡｄ－γ－グロビン／ｍｇｍｔ及びＳＢ１００Ｘ発現ＨＤＡｄ－ＳＢベクターを動物に静脈内注射した。ベクター注射の４週間後に３回のＯ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵ処理サイクルを開始し、ベクターの注射後１８週目までマウスの経過観察を行った（図２Ｂ）。最初に、ＲＢＣにおけるヒトγ－グロビンの発現を分析した（図２Ｃ）。インビボ選択の開始前（形質導入後４週目）のレベルは、バックグラウンドをわずかに超えるものにすぎなかった。γ－グロビン＋細胞のパーセントは、２回目の選択の後に増加を開始し、３回目の選択の後は８０％を超えるレベルに到達した。末梢血及び骨髄における赤血球Ｔｅｒ１１９＋細胞でのγ－グロビン発現細胞のパーセントは、非赤血球Ｔｅｒ１１９－細胞との比較で７～１０倍高かった（図２Ｄ）。成体型マウスα－グロビン鎖及びβ－グロビン鎖との比較におけるγ－グロビンタンパク質のレベルの測定にはＨＰＬＣを使用した（図２Ｅ及び図３；ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１７２／ＪＣＩ１２２８３６ＤＳ１にて入手可能な補足資料）。１８週目に、こうしたレベルは、成体型マウスα－グロビン及びβ－メジャーグロビンの１０％～１５％、マウスβ－マイナーグロビンの２５％に達した。このことは、定量的逆転写ＰＣＲ（ＲＴ－ｑＰＣＲ）によってｍＲＮＡレベルで確認し、ヒトγ－グロビンｍＲＮＡは、マウスβ－メジャーｍＲＮＡの１３％であった（図２Ｆ）。長期再増殖未分化ＨＳＣが形質導入されたことをさらに実証するために、系譜決定細胞が除去された（Ｌｉｎ－）骨髄細胞をインビボ形質導入／選択マウスから得て、照射Ｃ５７ＢＬ／６マウスに移植した。末梢血、骨髄、及び脾臓において分析した生着レベルは９５％を超えており、２０週間の観察期間にわたって安定していた（図４Ａ、図４Ｂ）ヒトγ－グロビンレベル（マウスα－グロビンと比較したもの）は、（「一次」）インビボ形質導入マウス（形質導入後１８週目での分析）と二次レシピエント（移植後１４週目及び２０週目での分析）とで同様であった（図４Ｃ）。

【０８２８】

このインビボＨＳＰＣ形質導入／選択手法によって、ＳＢ１００Ｘ介在性の無作為な導入遺伝子組み込みパターンが変化することはなく、造血が変化することもない。ハイブリッドトランスポゾン／ＳＢ１００Ｘ　ＨＤＡｄ５／３５＋＋系を用いてインビボでの形質導入を行うと、ＨＳＰＣにおいて導入遺伝子が無作為に組み込まれることが以前に示されている（Ｒｉｃｈｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．１２８（１８）：２２０６－２２

１７，２０１６）。インビボ選択におけるＯ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵの効果を評価するために、二次レシピエントにおいて骨髄Ｌｉｎ－細胞における導入遺伝子の組み込みを試験終了時点（すなわち、２０週目）に分析した。線形増幅介在性ＰＣＲ（ＬＡＭ－ＰＣＲ）を行い、その後にディープシークエンシングを行うことで、マウスゲノムにおける組み込み部位の分布パターンが無作為であることが示された（図５Ａ）。５匹のマウスからプールしたデータによって、エクソンへの組み込みが２．２３％、イントロンへの組み込みが３１．５８％、遺伝子間領域への組み込みが６５．１７％、非翻訳領域への組み込みが１．０４％であることが示された（図５Ｂ）。組み込みの無作為レベルは９９％であり、全マウスゲノムのいずれの所与の枠においても選択的な組み込みは生じていなかった（図５Ｃ）。このことは、インビボでの選択及び二次レシピエントでの細胞のさらなる増殖が、優位な組み込み部位が出現する結果を導かなかったことを示している（図５Ｄ）。形質導入細胞及び非形質導入細胞の両方を含む集団中の骨髄細胞につき平均で２つのγ－グロビンｃＤＮＡコピーを、ｑＰＣＲを使用して測定した。次に、組み込まれている導入遺伝子コピー数を単一細胞レベルで定量化した。これを行うために、１８週目にマウスから得た骨髄Ｌｉｎ－細胞をメチルセルロースに播種し、個々の前駆細胞コロニーを単離し、ゲノムＤＮＡに対してｑＰＣＲを実施した。導入遺伝子陽性コロニー（ｎ＝１１３）では、コロニーの８６．７％が、組み込みコピーを２つまたは３つ有していた（図５Ｅ及び図６）。コロニーの６．２％では４つのコピーが見られ、コロニーの１．７８％では８つのコピーが見られた。コロニーの０．８８％は、１３個、１０個、７つ、６つ、または５つの組み込みベクターコピーを有していた。

【０８２９】

試験終了時点（１８週目）で血液細胞数に変化は見られなかった（図７Ａ）。ＲＢＣパラメーターの分析で異常は示されなかった（図７Ａ～７Ｃ）。骨髄におけるＬｉｎ＋画分の組成は、処理前のマウスと処理後（１８週目）のマウスとで同様であった（図７Ｄ）。Ｌｉｎ－Ｓｃａ１＋ｃＫｉｔ＋（ＬＳＫ）ＨＳＰＣのレベル（図７Ｄ、最後のレーン）及び前駆細胞コロニー形成細胞のレベル（図７Ｅ）もまた、両方の群で同等であった。

【０８３０】

ヒトＣＤ４６を発現し、かつヒト中間型サラセミアと類似するＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスモデルの生成．

ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターによる感染にはヒトＣＤ４６が必要である。インビボＨＳＰＣ形質導入試験のためのサラセミアマウスモデルを開発するために、マウスＨｂｂ－β１遺伝子及びＨｂｂ－β２遺伝子の欠失についてヘテロ接合型であるＨｂｂｔｈ－３マウス（Ｙａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．９２（２５）：１１６０８－１１６１２，１９９５）（ホモ接合型状態は子宮内でまたは出生後早期に致命的なものとなる）とＣＤ４６ｔｇ（ＣＤ４６＋／＋）マウスとを交配繁殖させた。Ｈｂｂｔｈ－３マウスは、サラセミアの生存可能な形態となっており、ヒト中間型サラセミアと類似している。Ｆ１雑種マウスをＣＤ４６＋／＋マウスと戻し交配させてＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスを生成させた（図８）。こうしたマウスは、サラセミア表現型を示した。親ＣＤ４６ｔｇマウスと比較して、ＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスでは、ＲＢＣ数が顕著に減少し（７．１±０．１Ｍ／μｌと８．６３±０．２９Ｍ／μｌとの対比）、ヘモグロビン量が低下し（９．７±０．１８ｇ／ｄｌと１３．９±０．６３ｇ／ｄｌとの対比）、ヘマトクリット値が低下し（３０．７％±０．４６％と４１．７％±１．４８％との対比）、平均赤血球ヘモグロビン量が低下し（１３．９±０．１４ｇ／ｄｌと１６．１±０．２３ｇ／ｄｌとの対比）、平均赤血球容積が低下し（４３．０３±０．２２ｆｌと４８．３５±０．９ｆｌとの対比）、ＲＢＣ分布幅が大きくなり（４２．９％±０．２９％と２５．３％±０．７９％との対比）、明らかな網状赤血球増加を示した（４２．４％±１．４３％と１１．８％±３．７％との対比）（図９Ａ）。血液塗抹標本における赤血球形態は、血色素減少、サイズ及び形状の大幅な多様化（変形赤血球）、ならびに細胞断片化によって特徴付けられ、こうした赤血球形態は、Ｈｂｂｔｈ－３マウス血液塗抹標本の形態と同様であり、ＣＤ４６ｔｇマウスの赤血球の外観が正球

性であることとは著しく対照的であった（図９Ｂ）。同様に、ＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスから得られた肝臓及び脾臓を組織学的に分析したところ、赤血球前駆細胞または巨核球のクラスターを含む髄外造血フォーカスが存在することが明らかとなり（図９Ｃ、左下パネル及び下中央パネル）、パール染色では、顕著な実質内鉄沈着が示され（図９Ｃ、右下パネル）、こうしたことは、親ＣＤ４６ｔｇマウスから得られた組織切片では髄外造血及び鉄蓄積が存在しないか、または限られたものであることと対照的であった（図９Ｃ、上パネル）。ＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスのこうした特徴はヒト疾患を再現しており、後続の実験に対するそのようなモデルの妥当性を裏付けるものである。注目すべきことに、ＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３モデルのサラセミア表現型は、赤血球系譜以外の系譜に定量的な差が存在することによっても特徴付けられ、このことは、総ＷＢＣ数が上昇していることによって示された（図１０）。

【０８３１】

ＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスにおいて、ＨＤＡｄ－γ－グロビン／ｍｇｍｔ＋ＨＤＡｄ－ＳＢを用いるインビボでのＨＳＰＣの形質導入後にインビボ選択を行うと、γ－グロビンが安定して長期的に高発現する。このインビボ形質導入手法によってＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３サラセミアマウスモデルの特徴的な疾患パラメーターが軽快し得るかどうかを決定した。Ｈｂｂｔｈ－３マウスにおいて以前に検証された改変型のＧ－ＣＳＦ／ＡＭＤ３１００動員スキーム（Ｐｓａｔｈａ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ．２０１４；２５（６）：３１７－３２７）によって、最後のプレリキサホル（ＡＭＤ３１００）注射から１時間後（すなわち、ＨＤＡｄ－γ－グロビン／ｍｇｍｔ及びＨＤＡｄ－ＳＢを静脈内注射した時点）に末梢血中に多数のＬＳＫ細胞が見られた（図１１）。ヒトγ－グロビンタンパク質及びＭＧＭＴタンパク質に対する応答を回避するためにマウスの免疫抑制を行った（図１２）。エクスビボでのレンチウイルスベクター遺伝子治療後に、遺伝的に修正された赤芽球が生存優位性を有し、Ｈｂｂｔｈ－３マウスにおいてインビボで選択されるという報告（Ｍｉｃｃｉｏ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ １０５（３０）：１０５４７－１０５５２，２００８）を考慮し、$O^6$ＢＧ／ＢＣＮＵ処理なしで試験を実施することを最初に計画した。γ－グロビン＋ＲＢＣの平均パーセントは、ＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスのインビボでの形質導入後８週目には３１．１９％±２．７％に達したが、１６週目までには１３．１４％±０．４％に低下した。この時点でマウスを２つの群に分けた。半数のマウスは、血液及び骨髄の分析に使用すると共に（群１：インビボ選択なし）、二次レシピエントのドナーとして使用し、もう一方の群は、$O^6$ＢＧ／ＢＣＮＵによるインビボでの選択を行って試験を継続した（群２：インビボ選択あり）（図１２を参照のこと）。１６週目に、群１では、末梢ＲＢＣの１３％にγ－グロビンの発現が見られた（図１３Ａ、図１３Ｂ）。このレベルのγ－グロビンマーキングでも、末梢血中の網状赤血球のパーセントは有意に低下した（図１３Ｃ、最後のレーン）。しかしながら、このレベルのγ－グロビンマーキングは、ＲＢＣ形態及び髄外造血を含めて、他のＲＢＣパラメーターを改善するには十分なものではなかった（図１３Ｃ、図１３Ｄ）。この一次γ－グロビンマーキングのレベルは、移植前にブスルファンでの移植前骨髄処理を行った二次Ｃ５７ＢＬ／６レシピエントにおいて２０週間にわたって維持された（図１３Ｅ、図１３Ｆ）。このことは、長期再増殖ＨＳＰＣが形質導入されていたことを示している。

【０８３２】

群２では、インビボでの選択サイクルを４回行ったところ、γ－グロビン＋ＲＢＣのパーセントは６倍に上昇し、２９週目には平均で７６％に達した（図１４Ａ）。γ－グロビン発現は赤血球特異的であり、このことは、フローサイトメトリーによって、ゲートしたＴｅｒ１１９＋赤血球細胞または免疫磁気的に単離したＴｅｒ１１９＋赤血球細胞におけるγ－グロビンの発現を分析し、Ｔｅｒ１１９－細胞のものと比較することによって示された（図１４Ｂ、図１４Ｃ）。他の試験（Ｍｉｃｃｉｏ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．１０５（３０）：１０５４７－１０５５２，２００８，Ｚｈａｏ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．１１３（２３）：５７４７－５７５６，２００

９）と一致して、（有核かつ増殖性の赤血球）前駆細胞が骨髄（または脾臓）を出て、その核を喪失する前にそうした前駆細胞のレベルで選択が生じた。このことは、骨髄及び脾臓におけるγ－グロビン＋Ｔｅｒ１１９＋細胞の増加が、インビボでの選択前と比較してインビボでの選択後に優勢に生じたことに反映されている（図１４Ｄ）。しかしながら、末梢血（脱核ＲＢＣが優勢な場所）中のＴｅｒ１１９＋細胞におけるγ－グロビン＋マーキングの全体的な増加（図１４Ｂ）は、おそらく、サラセミアバックグラウンドによって生じる「自然の」インビボ選択による相加効果に起因するものであろう。ＲＢＣ中のマウスα－グロビンに対するヒトγ－グロビンの比率をＨＰＬＣによって測定したところ、この比率は、１４週目にはほとんど検出不可能なレベルであったが、２９週目には１０％に上昇した（図１４Ｅ及び図１５；ＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウス（ベースライン（図１５Ｂ）、１６週目（図１５Ｃ）及び２９週目（図１５Ｄ））、ならびにＣＤ４６ｔｇ対照（図１５Ａ）を参照のこと）。同様に、処理したマウスの血液細胞中のγ－グロビンｍＲＮＡのレベルも上昇し、２９週目には、マウスβ－グロビンｍＲＮＡに対するヒトγ－グロビンｍＲＮＡの比率が１０％に達した（図１４Ｆ）。インビボでの形質導入から２９週目に処理ＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスで測定された細胞当たりのγ－グロビン遺伝子コピー数は１．５であった（図１６）。

【０８３３】

インビボでの形質導入／選択後のＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスのサラセミア表現型の好転．

最終用量での$O^6$ＢＧ／ＢＣＮＵ処理から６週間後にＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスを　殺し、分析用として造血組織を収集した。インビボでの形質導入後２９週目の血液学的パラメーターはベースラインを超えて有意に改善し（図１７Ａ）（ＲＢＣ：８．５３±０．１６Ｍ／μｌと７．１±０．１３Ｍ／μｌと対比（Ｐ＝０．０１）、ヘモグロビン：１１．２７±０．３９ｇ／ｄｌと９．７±０．１８ｇ／ｄｌとの対比（Ｐ＝０．０５）、ヘマトクリット：４１．３７％±０．８１％と３０．７％±０．４６％との対比（Ｐ＝０．００００１）、平均赤血球容積：４８．６３±０．３６ｆｌと４３．５±０．３８ｆｌとの対比（Ｐ＝０．００３）、ＲＢＣ分布幅：３９．５％±０．８％と４３％±０．３％との対比（Ｐ＝０．００６）、網状赤血球：３１．１３％±３．１７％と４２．４％±１．４３％との対比（Ｐ＝０．０５））、特定の赤血球指標（ヘマトクリット［ＨＣＴ］、ＲＢＣ、平均赤血球容積）については、その対照ＣＤ４６ｔｇ対応赤血球指標とレベルが区別不可能であり、このことは、完全近くにまで表現型が修正されたことを示唆している。血液塗抹標本の網状赤血球染色からは、処理したＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスでは網状赤血球数が著しく低下して３分の１になり、γ－グロビン＋ＲＢＣのパーセントが最高となることが実証された（図１７Ｂ）。低色素性であり、高度に断片化しており、かつ形状が変形しているベースラインＲＢＣが、ほぼ正色素性であり、形状が良好であり、かつサイズ多様性が少ないＲＢＣに置き換わったことは、処理したＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスの末梢血塗抹標本におけるサラセミア表現型が好転したことを示している（図１７Ｃ、上パネル）。ＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスの骨髄では、赤血球系譜の成熟が遮断されていること（前赤芽球及び好塩基性赤芽球が高頻度で見られることによって示される）とは対照的に、対照マウス及び処理したＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスから得られたｃｙｔｏｓｐｉｎ調製物では成熟中の赤芽球（多染性赤芽球及び正染性赤芽球が存在することによって示される）が優勢であった（図１７Ｃ、中央パネル）。非処理ＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスでは著しい実質内ヘモジデリン沈着が観察された一方で、ＣＤ４６ｔｇマウス及び処理ＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスで検出し得た鉄蓄積はごく限られたものにすぎなかった（図１７Ｃ、下パネル）。このことと一致して、処理動物では脾臓サイズ（測定可能な代償性造血特徴）が顕著に減少した（図１７Ｄ、図１７Ｅ）。

【０８３４】

この統合されたインビボ形質導入／選択手法によって未分化ＨＳＣが遺伝子改変されたかどうかを決定するために、（形質導入後）２９週目に処理ＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ

－３マウスから収集した骨髄細胞を、ブスルファンでの亜致死性処理または致死性の全身照射（ＴＢＩ）のいずれかを行った後のＣ５７ＢＬ／６二次レシピエントに移植した（図１８Ａ、図１８Ｂ）。予想通り、ＴＢＩを行ったマウスでの生着率はブスルファン処理動物のものよりも高かったが、発現レベルを生着レベルで補正すると、γ－グロビン＋ＲＢＣの頻度に有意な差は存在しなかった。移植由来（ＣＤ４６＋）赤血球の７５％超が二次移植後２０週目にγ－グロビン＋であり、ブスルファンでの準骨髄破壊的移植前処理によって生じた競争的条件の下で２９週目に一次処理マウスに見られたものと同様のマーキング率が、正常なレシピエントバックグラウンド（ＨＤＡｄ－γ－グロビン／ＨＤＡｄ－ＳＢで形質導入したＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３ＨＳＰＣが選択的優位性を有さない）において得られた（図１８Ｃ、図１８Ｄ）という事実は、この手法によって長期的再増殖ＨＳＣの遺伝子修正が生じるという結論をさらに裏付けるものである。さらに、移植後２０週目に二次Ｃ５７ＢＬ／６レシピエントにブスルファンでの移植前処理を行った後、この二次Ｃ５７ＢＬ／６レシピエントを動員処理及びインビボでの形質導入に供したところ、γ－グロビン発現細胞が顕著に増加し、発現／ＭＦＩが有意に増加した（図１８Ｅ）。

【０８３５】

ＨＤＡｄ－γ－グロビン／ｍｇｍｔ＋ＨＤＡｄ－ＳＢを用いてインビボでＨＳＰＣの形質導入を行った後、Ｏ$^{6}$－ＢＧ／ＢＣＮＵによるインビボでの選択を行うことの安全性．

マウス試験において、この手順の忍容性は良好であった。明らかな血液学的異常は観察されなかった。　殺時点（Ｏ－ＧＢ／ＢＣＮＵの最終用量投与から６週間後）で、血液学的数値はすべて正常範囲内であったが、総ＷＢＣ数はインビボ選択の前のレベルと比較して低下しており、このことは、ＷＢＣ（具体的には、リンパ球）に対する薬物処理の細胞減少作用を示唆している（図１９Ａ、図１９Ｂ）。この作用は、骨髄中のＣＤ３＋細胞、ＣＤ１９＋細胞、及びＧｒ－１＋細胞の頻度が、その処理前または選択前の対応細胞の頻度と比較して減少したことにも反映されていた（図１９Ｃ）。注目すべきことに、ＷＢＣ及び血小板は、その最下点（２５～２７週目（最後のＯ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵ注射から２～４週間後）でさえ、形成不全レベル（すなわち、好中球数＜１，０００個／μｌ、血小板数＜２０，０００個／μｌ）に到達することは決してなく、ＷＢＣは３０週目（最後のＯ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵ注射から７週間後）には回復し始めた。このことは、ＣＤ４６ｔｇモデルにおいて最後のＯ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵ注射から１０週間後に処理前レベルへのＷＢＣ数及びリンパ球数の復帰が観測されたこと（図７Ａ）も加味すると、これらのインビボ選択薬物の細胞減少作用が軽度かつ一過性のものであることを示唆している。重要なことに、骨髄細胞におけるＬＳＫ細胞及びＴｅｒ１１９＋細胞のパーセント組成、ならびに骨髄細胞のコロニー形成能が、インビボでのＨＳＰＣの形質導入／選択による影響を受けることはなかった（図１９Ｃ、図１９Ｄ）。

【０８３６】

考察．

異常ヘモグロビン症のエクスビボＨＳＰＣ遺伝子治療が臨床的に進歩していることは明白であるにもかかわらず、臨床的に適したＨＳＰＣ生着率に到達するには骨髄破壊的移植前処理が必要になることは大きな制限である。さらに、技術的に複雑であるが故に、そのような処理が実行可能であるのは、専門化及び／または正式認可されたごく少数のセンターのみである。開発されているインビボＨＳＰＣ遺伝子治療は、骨髄破壊的前処理及びＨＳＰＣ細胞移植を必要せず、それ故に、サラセミアのＨＳＰＣ遺伝子治療をより安全かつ利用しやすくするものである。この手法の中心発想は、骨髄からＨＳＰＣを動員し、末梢血中に循環ＨＳＰＣが多数存在する間に、ＨＳＰＣ指向型のＨＤＡｄ５／３５＋＋遺伝子導入ベクター系を静脈内注射してそうしたＨＳＰＣの形質導入を行うことである。ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクター系の新規の特徴には、（ａ）静脈内注射後に非造血組織が感染を受けることを回避しつつ未分化ＨＳＣの効率的な形質導入を可能にするＣＤ４６親和性増強型ファイバー、（ｂ）細胞因子に依存することなく機能し、かつ遺伝子選択性を伴わない無作為な導入遺伝子組み込みを媒介するＳＢ１００Ｘトランスポゼースベースの組み込み系、ならびに（ｃ）低用量のＯ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵでの短期的処理によって形質導入未分

化ＨＳＣのプールに影響を与えることなく子孫細胞の選択的な生存及び増殖を媒介するＭＧＭＴ$^{Ｐ１４０Ｋ}$発現カセット、が含まれる（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ　Ｍｅｔｈｏｄｓ．Ｃｌｉｎ　Ｄｅｖ．８：５２－６４，２０１８）。現在使用されているＳＩＮ－レンチウイルス（ＳＩＮ－ＬＶ）ベクターからＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターが区別される追加の特徴には、その挿入容量が大きい（３０ｋｂ）ことが含まれ、この試験では、この大容量を利用することで、マイクロＬＣＲ／β－プロモーター促進性γ－グロビン遺伝子及びＥＦ１Ａプロモーター促進性ＭＧＭＴ$^{Ｐ１４０Ｋ}$遺伝子（１１．８ｋｂサイズ）を含めた。さらに、ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターの産生では、大スケールでのプラスミドトランスフェクションは不要であり、撹拌培養物１リットル当たり３×１０$^{１２}$個超の感染性粒子が得られる。注目すべきことに、異常ヘモグロビン症の臨床治験に使用されるＳＩＮ－ＬＶベクターの収量は少なくとも２桁低いものである。

【０８３７】

インビボ手法の効率．

他の遺伝性疾患（すなわち、Ｘ連鎖ＳＣＩＤ（Ｃａｖａｚｚａｎａ－Ｃａｌｖｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ．２８８（５４６６）：６６９－６７２，２０００）、ＡＤＡ－ＳＣＩＤ（Ｇａｓｐａｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉ　Ｔｒａｎｓｌ　Ｍｅｄ．３（９７）：９７ｒａ８０．２０１１）、またはウィスコット・アルドリッチ症候群（Ａｉｕｔｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ．３４１（６１４８）：１２３３１５１，２０１３））のＨＳＰＣ遺伝子治療では、ＨＳＰＣの安定形質導入率が１％未満でも大幅な臨床効果が得られることとは対照的に、患者の異常ヘモグロビン症の表現型を修正するには赤血球前駆細胞の少なくとも２０％が修正される必要がある（Ｐｅｒｓｏｎｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．９７（１０）：３２７５－３２８２，２００１、Ａｎｄｒｅａｎｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．；８７（８）：３４９４－３４９９，１９９６、Ｎｅｇｒｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．１１７（２０）：５３２１－５３３１，２０１１）。異常ヘモグロビン症のマウスモデルでは、全α－グロビンｍＲＮＡの１５％に当たるγ－グロビン発現が生じれば治療に十分なものであった（Ｐｅｒｓｏｎｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．２００１；９７（１０）：３２７５－３２８２、ＭｃＣｏｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ　Ｍｅｄ．７：２６３－２７４，２０１６、Ｐｅｓｔｉｎａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ．１７（２）：２４５－２５２，２００９）。この試験では、インビボでの形質導入／選択後に、インビボ形質導入ＣＤ４６ｔｇモデル及びインビボ形質導入ＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３モデルにおいて骨髄赤芽球の６０％超がγ－グロビンを発現した（図２Ｃ及び図１４Ａ）。これによって循環ＲＢＣの４０％～９７％がγ－グロビンを発現するようになった（図２Ｄ及び図１４Ｂ）。重要なことに、これら両方の動物モデルにおいてＲＢＣでのγ－グロビンマーキングが持続することも、二次レシピエントにおいて実証され、このことは、長期的に増殖する未分化ＨＳＣがベクター系によって最初に形質導入されたことを示唆している。

【０８３８】

ｑＰＣＲ試験では、圧倒的大多数の骨髄細胞において細胞当たり２～３つの組み込み導入遺伝子コピーが検出された。初期の試験（Ｚｈａｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．１１３（２３）：５７４７－５７５６，２００９、Ｚｉｅｌｓｋｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ．９（６）：９２３－９３１，２００４）と一致して、コピー数の多いクローンがインビボで選択されることは見られなかった。ゲノム全域にわたる組み込み部位分析を考慮すると、最初に形質導入されたＨＳＣは１，０００個であると推定された。このことは、マウスが有するＨＳＣの個数が１０，０００～２０，０００であることを考慮すると（Ａｂｋｏｗｉｔｚ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．１００（７）：２６６５－２６６７，２００２、Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．１０７（９）：３７６４－３７７１，２００６）、ＨＳＣの５％～１０％がベクター系の標的となったことを意味することになり、このことは、インビボでの選択後に造血がポリクローナルに再構成される上でも、長期的な治療効果を得る上でも強固な基礎となる。

【０８３９】

中間型サラセミアモデルでは、ほぼ完全な表現型修正が達成された。主要な血液学的パラメーター（ＨＣＴ、ＲＢＣ、平均赤血球容積）は、「健康な」（親ＣＤ４６ｔｇ）マウスその対応パラメーターと区別不可能なものであった。ＲＢＣの指標及び形態の修正度は、個々のマウスにおけるγ－グロビン発現細胞のレベルと相関していた。末梢ＲＢＣ及び赤血球骨髄前駆細胞は、形態及び成熟プロセスの両方において健康なマウスのものと類似していた。髄外造血及び実質内鉄沈着は消退し、脾臓サイズは顕著に減少した。ＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３モデルにおけるサラセミア表現型は、白血球増加／リンパ球増加によっても特徴付けられるものであった（図１０）。（白血球増加／リンパ球増加は、脾臓が摘出されたサラセミア／鎌状赤血球症患者または機能性の疾患関連無脾症を有する患者においても見られることが多い（Ｂｒｏｕｓｓｅ ｅｔ ａｌ．，Ｂｒ Ｊ Ｈａｅｍａｔｏｌ．１６６（２）：１６５－１７６，２０１４））。興味深いことに、ＣＤ４６＋＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスのＷＢＣ数は、インビボでの形質導入後２９週目には「健康な」ＣＤ４６ｔｇマウスのレベルに戻った（図１９Ａ）。この効果は、手法によるサラセミア表現型の好転が赤血球コンパートメントを超えて広がることで、ＷＢＣが正常化すると共に、おそらくは全体的な脾臓機能も正常化する可能性が高いことを示唆している。

【０８４０】

注目すべきことに、ＣＤ４６ｔｇマウスでの試験とは対照的に、サラセミアバックグラウンドが存在する状況であり、かつＯ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵ処理を行わない状況の下では、１３％に当たるγ－グロビン＋ＲＢＣがＣＤ４６＋／＋／Ｈｂｂｔｈ－３マウスの末梢血中で循環し、このレベルは、二次レシピエントにおいて長期的に維持された。このことは、γ－グロビン遺伝子の発現がサラセミア遺伝子改変赤血球前駆細胞に生存優位性を付与したことを示しており、この生存優位性の付与は、サラセミアメジャーのマウスモデルにおけるエクスビボでのレンチウイルスベクターＨＳＰＣ遺伝子治療で報告されたことと同様であった（Ｍｉｃｃｏ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．１０５（３０）：１０５４７－１０５５２，２００８）。一方で、サラセミアマウスモデルの表現型を修正するにはＯ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵ処理が必要であった。このことは、グロビンマーキング率が低いことが理由で必要が出てくる場合には、誘導性のインビボ選択系によって簡単な薬理学的介入による治療効果の引き上げが可能であることを示唆している。

【０８４１】

マウスサラセミアモデルにおけるγ－グロビンのレベルをさらに上昇させるためには、下記の可能性が考慮され得る：（ａ）細胞当たりの組み込み導入遺伝子コピー数が増加するようにＨＤＡｄ－ＳＢベクターとＨＤＡｄ－γ－グロビン／ｍｇｍｔベクターとの比を１：１から１：３に変更することができる（Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，ＰＬｏＳ Ｏｎｅ．８（１０）：ｅ７５３４４，２０１３）。（ｂ）２６．１ｋｂバージョンのβ－グロビンＬＣＲを使用してγ－グロビン発現を促進することで、導入遺伝子の組み込み位置効果を最小化することも計画される（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｖｉｒｏｌ．７９（１７）：１０９９９－１１０１３，２００５）。（ｃ）ＳＢ１００Ｘベースのγ－グロビン遺伝子付加系に加えて、ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクター中にＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を含めてγ－グロビンサプレッサー領域を破壊し、内在性γ－グロビン遺伝子を再活性化させることもできる（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．１３１（２６）：２９１５－２９２８，２０１８）。

【０８４２】

動員からの時間と発現との関係性を評価するために、Ｇ－ＣＳＦ及びＡＭＤ３１００での動員後にＨＤＡｄ－ｍｇｍｔ／ＧＦＰベクター＋ＨＤＡｄ－ＳＢベクターをｈＣＤ４６ｔｇマウスに投与した。図２０Ａ及び図２０Ｅでは血清中抗ＨＤＡｄ抗体を測定したものが示される。動員から４日後または４週間と４日後にＧＦＰを測定した（図２０Ｂ（「Ｂ」）及び図２０Ｃ（「Ｃ」））。２回目の動員及びＨＤＡｄ注射（１回目のものから４週間後（図２０Ｄ））。結果は図２０Ｆに示される。２回目の動員（図２０Ｄ（「Ｄ」））では、ウイルスに対する中和血清抗体の生成によって末梢血液細胞の形質導入は生じなか

った。しかしながら、二次移植レシピエントにおけるインビボ形質導入試験が示すように（図１８Ｅ）、抗ＨＤＡｄ抗体の生成が医薬的に遮断することができれば、２回目の処理によってγ－グロビン＋ＲＢＣのパーセントもγ－グロビン発現レベル／ＭＦＩも上昇し得る。

【０８４３】

インビボＨＳＰＣ形質導入／選択手法の安全性．

この手法を使用すると、骨髄破壊的前処理／移植前処理の必要性及びその関連毒性がなくなると同時に、宿主に移植前処理を行わずに単に物質／ベクターを静脈内注射及び皮下注射することによって宿主のＨＳＰＣが効率的に標的となる。重要なことに、この試験に関与したすべての動物においてこの手順の忍容性は良好であった。

【０８４４】

Ｇ－ＣＳＦ／ＡＭＤ３１００（プレリキサホル）に基づくＨＳＰＣの動員に関しては、手法の安全性及び効率性は臨床的に証明されており、この手法は、サラセミアメジャーに対して現在行われている治験のすべてにおいて、ＨＳＰＣ動員、及び白血球アフェレーシスによる収集に日常的に使用されている（Ｐｓａｔｈａ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．１７（５）：３６４－３７８，２０１７、Ｋａｒｐｏｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．１２６（５）：６１６－６１９，２０１５）。この試験で使用した動員レジメンに代わるものとして、他の手法では、合成小分子によってＣＸＣＲ４を継続的に遮断してＨＳＰＣの動員効率を上げることが行われ得る（Ｋａｒｐｏｖａ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．１２９（２１）：２９３９－２９４９，２０１７）。

【０８４５】

ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを静脈内注射することによって生じる注射後３日目のＣＤ４６ｔｇマウスにおける導入遺伝子発現は、動員ＨＳＰＣ及びＰＢＭＣ以外の組織では生じない（Ｒｉｃｈｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．１２８（１８）：２２０６－２２１７，２０１６）。このことは、第１世代のＣＤ４６標的指向性Ａｄ５／３５ベクター及びＣＤ４６標的指向性Ａｄ５／１１ベクターを静脈内注射したヒヒでの初期の試験と一致した（Ｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．１２８（１８）：２２０６－２２１７，２０１６）。この指向性の考え得る理由は、非造血組織には効率的なウイルス形質導入を可能にするほど十分な高さのＣＤ４６受容体密度及び到達性が存在しないというものである（Ｒｉｃｈｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．１２８（１８）：２２０６－２２１７，２０１６、Ｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｅｘｐ Ｈｅｍａｔｏｌ．３４（６）：７１３－７２０，２００６）。ここでは、トランスポゾンベクター（図２１Ａ）を使用するインビボでの形質導入／選択から１８週目に、細胞当たりの組み込み導入遺伝子コピー数を、異なる組織において測定した。図２１Ｂ及び図２１Ｃには、コピー数に対する効率が示される。さまざまな組織における細胞当たりの組み込みトランスポゾンコピーが示される（図２１Ｄ）。骨髄、ＰＢＭＣ、及び脾臓におけるコピー数は２．５であった。組み込み導入遺伝子は、肝臓、肺、及び腸から得られたゲノムＤＮＡにおいても検出された。こうした器官におけるシグナルは、浸潤性血液細胞及び／または常在マクロファージを起源とするものであることが、ＧＦＰベクター系を用いた以前の研究によって示されている（Ｒｉｃｈｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．２０１６；１２８（１８）：２２０６－２２１７）。

【０８４６】

ＨＤＡｄベクターの静脈内注射は（それのみならず他のウイルスベクターの静脈内注射も）、炎症促進性サイトカインの放出と関連するものであるが（Ａｔａｓｈｅｖａ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｖｉｒｏｌ．２１：１０９－１１３，２０１６、Ｇｒｉｅｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ．３：１６００７９，２０１６）、この放出は、ウイルス注射の前日に糖質コルチコイドでの前処理を行うか（Ｓｅｒｅｇｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．１７（４）：６８５－６９６，２００９）、またはベクター用量を分割すること（Ｉｌｌｉｎｇｗｏｒｔｈ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｏｎｃｏｌｙｔｉｃｓ．５：６２－７４，２０１７）によって効率的に遮断され得る。静脈内注射された腫瘍溶解性アデノウイルスが良好な安全性プロ

ファイルを有することは、ＣＤ４６標的指向性の腫瘍溶解性アデノウイルスを用いる治験を含めて、多数の臨床治験において実証されている（Ｇａｒｃｉａ－Ｃａｒｂｏｎｅｒｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ Ｃａｎｃｅｒ．５（１）：７１，２０１７）。

【０８４７】

インビボ選択の安全性、及び$O^6$ＢＧ／ＢＣＮＵによって刺激される増殖によって長期静止期ＨＳＰＣのリザーバーが枯渇し得るという懸念に関しては、ＨＳＰＣの消耗または優位なクローンの出現を伴わずに長期的な多系譜選択が生じることを示す証拠が大型動物モデルを用いた試験から得られている（Ｂｅａｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ．１２０（７）：２３４５－２３５４，２０１０、Ｎｅｆｆ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ．１１２（１０）：１５８１－１５８８，２００３）。こうしたモデルでは、造血系及び髄外の毒性プロファイルは許容可能なものであった。本試験及び以前のマウス試験（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ．８：５２－６４，２０１８、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．１３１（２６）：２９１５－２９２８，２０１８）では、インビボ選択の忍容性は良好であり、骨髄抑制は生じなかった。$O^6$ＢＧ／ＢＣＮＵ処理に際して骨髄ＨＳＰＣの頻度が変化することは観察されなかった。ＷＢＣ数、具体的にはリンパ球数に軽度の減少が見られたが、この減少は一過性のものであった。$O^6$ＢＧ（ＤＮＡ修復プロセスの阻害剤）及びＢＣＮＵ（アルキル化剤）での低用量処理を３回または４回行うことで、インビボで選択されたＨＳＰＣが生存するようになるが、この処理は、理論的には、変異及び腫瘍形成を引き起こす可能性がある。そのような処理が行われたサル及びイヌでの長期的な経過観察試験はこのリスクに相反しており、発がんの徴候を示唆するものではなかった（Ｂｅａｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ．１２０（７）：２３４５－２３５４，２０１０、Ｒａｄｋｅ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉ Ｔｒａｎｓｌ Ｍｅｄ．９（４１４）：ｅａａｎ１１４５，２０１７、Ｂｅａｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．１１３（２１）：５０９４－５１０３，２００９）。このリスクをＨＳＰＣにおいて評価するために、ＭＧＭＴ$^{P140K}$発現ＨＤＡｄベクターでＣＤ３４＋細胞の形質導入を行い、このＣＤ３４＋細胞を、ＭＧＭＴ$^{P140K}$発現によって保護されない細胞の９８％が死滅する用量での$O^6$ＢＧ／ＢＣＮＵ処理に供してインビトロ試験を実施した（図２２Ａ～２２Ｃ）。薬物への曝露から１４日目に、処理なしのＣＤ３４＋細胞及び処理を生き延びた細胞のＩｌｌｕｍｉｎａ全エクソームシークエンシングを実施した。この結果は、下記の表に示される。薬物処理を生き延びたＣＤ３４＋細胞と非処理ＣＤ３４＋細胞とを全エクソームシークエンシングによって比較した。試料配列をＨｏｍｏ ｓａｐｉｅｎｓ参照ゲノム（ＵＣＳＣ ｈｇ１９）と比較した。

【表１３】

試料＃１：非処理$CD34^+$細胞

| 総アライメントリード数 | アライメントリードパーセント | 標的アライメントリード数 | リードエンリッチメント率 | 延長標的アライメントリード数 | 延長リードエンリッチメント率 |
|---|---|---|---|---|---|
| 46,870,836 | 80.51% | 38,437,631 | 82.01% | 40,158,769 | 85.68% |
| 総アライメント塩基数 | アライメント塩基パーセント | 標的アライメント塩基数 | 塩基エンリッチメント率 | 延長標的アライメント塩基数 | 延長塩基エンリッチメント率 |
| 6,544,191,633 | 75.45% | 4,308,625,487 | 65.64% | 5,541,019,474 | 84.67% |

【表１４】

試料＃２：選択されたＣＤ３４$^{+}$細胞

| 総アライメントリード数 | アライメントリードパーセント | 標的アライメントリード数 | リードエンリッチメント率 | 延長標的アライメントリード数 | 延長リードエンリッチメント率 |
|---|---|---|---|---|---|
| 47,858,908 | 81.07% | 39,945,698 | 81.38% | 40,463,838 | 84.555 |
| 総アライメント塩基数 | アライメント塩基パーセント | 標的アライメント塩基数 | 塩基エンリッチメント率 | 延長標的アライメント塩基数 | 延長塩基エンリッチメント率 |
| 6,590,512,869 | 74.93% | 4,339,416,710 | 65.84% | 5,523,089,486 | 83.80% |

【０８４８】

アミノ酸置換がタンパク質機能に影響を与えるかどうかを予測するフィルターとしてＳｏｒｔｉｎｇ Ｉｎｔｏｌｅｒａｎｔ ｆｒｏｍ Ｔｏｌｅｒａｎｔ（ＳＩＦＴ；ｕｓｗｅｓｔ．ｅｎｓｅｍｂｌｅ．ｏｒｇにてオンラインで利用可能）を使用して、処理試料におけるシークエンス済の４７，８５８，９０８塩基対当たり１２６個のデノボ変異（塩基対当たりの変異数２．６３×１０$^{-6}$）を同定した。ＣｌｉｎＶａｒをフィルターとして使用して、病理学的作用を有する可能性のある６つの変異を見つけた。表１１には、特有変異がどの染色体に見られたかについてのまとめが示される：

【表１５】

表１３

| 特有変異の数 | |
|---|---|
| 1番染色体 | 793 |
| 2番染色体 | 502 |
| 3番染色体 | 369 |
| 4番染色体 | 243 |
| 5番染色体 | 253 |
| 6番染色体 | 341 |
| 7番染色体 | 383 |
| 8番染色体 | 241 |
| 9番染色体 | 312 |
| 10番染色体 | 269 |
| 11番染色体 | 536 |
| 12番染色体 | 362 |
| 13番染色体 | 94 |
| 14番染色体 | 252 |
| 15番染色体 | 271 |
| 16番染色体 | 475 |
| 17番染色体 | 527 |
| 18番染色体 | 94 |
| 19番染色体 | 755 |
| 20番染色体 | 283 |
| 21番染色体 | 92 |
| 22番染色体 | 276 |
| ミトコンドリア染色体 | 0 |
| X染色体 | 351 |
| Y染色体 | 6 |
| 合計 | 8080 |

【０８４９】

Ｏ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵ処理が変異を生じさせるという知見は予想外のものではない。しかしながら、エクソームシークエンシングデータの結果は不明である。ヒト集団では、機能喪失型バリアントがよく見られる。Ｅｘｏｍｅ　Ａｇｇｒｅｇａｔｉｏｎ　Ｃｏｎｓｏｒｔｉｕｍによる最近の分析では、機能喪失型変異を有する遺伝子が３，２３０個同定され、こうしたバリアントの７２％が、現在確立されているヒト疾患表現型を有さない（Ｌｅｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ．５３６（７６１６）：２８５－２９１，２０１６）。

【０８５０】

ＳＢ１００Ｘトランスポゼース遺伝子及びＦｌｐｅリコンビナーゼ遺伝子を保有するＨ

ＤＡｄ－ＳＢベクターは、組み込まれることなく、細胞分裂の間に消失する（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ．９：１４２－１５２，２０１８）。以前に公開されたデータ（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ．９：１４２－１５２，２０１８）と一致して、骨髄Ｌｉｎ－細胞での試験の終了時点でｑＰＣＲを行ったところ、組み込まれたＨＤＡｄ－ＳＢベクターもエピソームＨＤＡｄ－ＳＢベクターも検出不可能であった。ＳＢ１００Ｘトランスポゼースは、遺伝子または遺伝子付近への組み込み選択性を伴うことなく無作為な導入遺伝子組み込みを媒介する（Ｒｉｃｈｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．１２８（１８）：２２０６－２２１７，２０１６、Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，ＰＬｏＳ Ｏｎｅ．８（１０）：ｅ７５３４４，２０１３）。この無作為パターンは、優位な組み込み部位／クローンを発生させることなくインビボ選択後に維持される。理論的には、無作為組み込みは、レンチウイルスまたはＡＡＶベクターでの形質導入の間に生じる活性遺伝子への選択的組み込みと比較して相対的に安全である（Ｄｅｙｌｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．１１（４）：４４２－４４７，２００９、Ｂａｒｔｈｏｌｏｍａｅ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．１９（４）：７０３－７１０，２０１１、Ｓｃｈｒｏｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ．１１０（４）：５２１－５２９，２００２）。注目すべきことに、β－サラセミアに対するＳＩＮ－ＬＶベースの臨床治験では、ＨＭＧＡ２癌原遺伝子のイントロンへの組み込みによって１人の患者で良性のクローン優位性が引き起こされた（Ｃａｖａｚｚａｎａ－Ｃａｌｖｏ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ．４６７（７３１３）：３１８－３２２，２０１０）。

【０８５１】

ＳＢ１００Ｘ介在性の無作為な導入遺伝子組み込みと変異原性選択剤での処理との複合作用から潜在的な腫瘍原性が生じるリスクを低減するために、第１のリスク因子が除去されるようにベクター系を設計した。このベクター系は、染色体セーフハーバー部位へと標的指向化されたγ－グロビン組み込みを媒介し、マウスのＲＢＣの７０％超に安定なγ－グロビンマーキングを生じさせた（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，２１ｓｔ Ａｎｎｕａｌ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｏｆ Ｇｅｎｅ ａｎｄ Ｃｅｌｌ Ｔｈｅｒａｐｙ Ｍｅｅｔｉｎｇ．Ａｂｓｔｒａｃｔ ９７２）。

【０８５２】

この手法の安全性についての明確な実証は、非ヒト霊長類での長期的な試験ではこれが最初のものであり得る。この関連では、マカク及びヒヒの骨髄ＣＤ３４＋細胞がヒトＣＤ３４＋細胞と同じくらい効率的にＡｄ５／３５ベクターによって形質導入されることに注目すべきであり（Ｔｕｖｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｖｉｒｏｌ．８０（２４）：１２１０９－１２１２０，２００６）、さらには、ＧＦＰを発現する組み込みＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターによってマカクにおいて動員ＣＤ３４＋細胞がインビボで直接的に形質導入されることが実証されている（Ｈａｒｗｏｒｔｈ ｅｔ ａｌ．，２１ｓｔ Ａｎｎｕａｌ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｏｆ Ｇｅｎｅ ａｎｄ Ｃｅｌｌ Ｔｈｅｒａｐｙ Ｍｅｅｔｉｎｇ．Ａｂｓｔｒａｃｔ ９９５）。

【０８５３】

手法の臨床的橋渡しに向けて．

ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターの生産では、撹拌培養物１リットル当たり５×１０$^{12}$個のウイルス粒子（ｖｐ）が常に得られる。ＦｌｅｘｉｏｎのＦＸ２０１ベクターについては、ｃＧＭＰグレードのＨＤＡｄの生産が確立されている。静脈内に注射されるウイルスに対する自然免疫反応を薬理学的に制御するためのプロトコールは、マウス向けのものよりもヒト向けものの方が開発が進んでおり、ｒＡＡＶベクターを高用量で静脈内注射する臨床治験において現在実際に使用されている。しかしながら、Ａｄ５カプシドタンパク質に対して指向化された中和血清抗体を大半のヒトが有しており、この中和血清抗体によって、ＨＤＡｄ５／３５ベクター（すなわち、Ａｄ５カプシドタンパク質及びキメラＡｄ３５ファイバーを含むベクター）を用いるインビボでの形質導入が遮断されることになる。本開示に記載の代替物には、Ａｄ３５由来のベクターが含まれる。Ａｄ３５は、既に知

られる５７のヒト血清型のうちで最も希少なものの１つであり、その血清陽性率は７％未満であり、Ａｄ３５はＡｄ５との交差反応性を有さない（Ｖｏｇｅｌｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｖｉｒｏｌ．７７（１５）：８２６３－８２７１，２００３、Ａｂｂｉｎｋ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｖｉｒｏｌ．８１（９）：４６５４－４６６３，２００７、Ｋｏｓｔｅｎｓｅ ｅｔ ａｌ．，ＡＩＤＳ．１８（８）：１２１３－１２１６，２００４、Ｆｌｏｍｅｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｎｆｅｃｔ Ｄｉｓ．１５５（６）：１１２７－１１３４，１９８７、Ｂａｒｏｕｃｈ ｅｔ ａｌ．，Ｖａｃｃｉｎｅ．２９（３２）：５２０３－５２０９，２０１１）。Ａｄ３５は、Ａｄ５と比較して免疫原性が低く（Ｊｏｈｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１８８（１２）：６１０９－６１１８，２０１２）、この免疫原性の低さの理由の一部は、Ａｄ３５ファイバーノブによる細胞活性化の減弱化にある（Ａｄａｍｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｇｅｎ Ｖｉｒｏｌ．９３（ｐｔ６）：１３３９－１３４４，２０１２、Ａｄａｍｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ １０８（１８）：７４９９－７５０４，２０１１、Ｓｈｏｊｉ ｅｔ ａｌ．，ＰＬｏＳ Ｏｎｅ．７（１）：ｅ３０３０２，２０１２）。ヒトＣＤ４６トランスジェニックマウス（Ｓａｋｕｒａｉ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．１３（１４）：１１１８－１１２６，２００６、Ｓａｋｕｒａｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．１６（４）：７２６－７３３，２００８）及び非ヒト霊長類（Ｓａｋｕｒａｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．１６（４）：７２６－７３３，２００８）において静脈内注射後に生じる組織（肝臓を含む）への形質導入は最小限のもの（ＰＣＲによって検出可能な程度のもの）にすぎない。第１世代のＡｄ３５ベクターは、ワクチン接種目的で臨床的に使用されている（Ｂａｄｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ Ｉｎｔｅｒｎ Ｍｅｄ．１６４（５）：３１３－３２２，２０１６、Ｋａｚｍｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ １１４（９）：２４２５－２４３０，２０１７）。ヒトでの今後の試験については、インビボＨＳＰＣ遺伝子治療のためのＨＤＡｄ３５＋＋に基づいてベクターが生成されることになる。

【０８５４】

まとめると、これは、サラセミアに対する従来のレンチウイルスベクターエクスビボ遺伝子治療に対する代替となるものであり、これによって、治療が単純化すると共に、理論的には、サラセミアメジャーが流行し、ＨＳＰＣ移植が実行不可能な資源の乏しい地域でそうした治療を利用することが可能になり得る。

【０８５５】

実施例２．２９ｋｂのβ－グロビン遺伝子座制御領域を使用するマウスサラセミアのインビボ造血幹細胞遺伝子治療

【０８５６】

実施例１では、インビボで改変されたＨＳＰＣにおいてγ－グロビン遺伝子の発現を促進する能力の顕著な進歩について記載されている。実施例１では、γ－グロビンの発現のレベルをさらに上昇させるために、より長いバージョン（例えば、２６．１ｋｂ）のβ－グロビンＬＣＲを使用してγ－グロビンの発現を促進し得ることについても記載されている。この実施例では、追跡分析の結果が提供される。

【０８５７】

本明細書に記載のように、造血幹／前駆細胞（ＨＳＰＣ）を動員した後、組み込みヘルパー依存型アデノウイルスＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを静脈内注射すると、長期再増殖細胞が効率的に形質導入され、形質導入されたＨＳＰＣがインビボで選択された後にマウスモデルにおいて疾患が軽快した。ＨＤＡｄ５／３５＋＋注射と関連する急性自然免疫毒性は、適切な予防によって制御され、これによってこの手法が臨床的橋渡しとして実行可能なものとなった。この技術は、サラセミアメジャーまたは鎌状赤血球症の遺伝子治療を行うための簡単なインビボＨＳＰＣ形質導入手法として使用することができる。こうした疾患を治癒させるには、治療用タンパク質（γ－グロビンまたはβ－グロビン）を高レベルで発現させる必要があり、このことはレンチウイルスベクターでは達成困難であり、この理由は、レンチウイルスベクターのゲノムサイズには制限があり、この制限によって

、より大きな制御エレメントを含めることが不可能なことによるものである。この実施例では、ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターの３５ｋｂという挿入容量を利用することで、全長２９ｋｂのβ－グロビン遺伝子座転写制御領域が効率的にＨＳＰＣに導入され得ることが実証される。インビボでのＨＳＰＣの形質導入から得られる赤血球細胞中のγ－グロビンレベルは安定したものであり、この安定したγ－グロビンレベルによってマウス中間型サラセミアが完全に治癒する。注目すべきことに、これは、最小のインビボＨＳＰＣ選択レジメンを用いて達成された。この試験では、大きな制御領域を含めたＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターが、高レベルの導入遺伝子発現を必要とする疾患の遺伝子治療に存在する課題に対処し得るものであることが実証される。

【０８５８】

序論．

異常ヘモグロビン症（サラセミアメジャー及び鎌状赤血球貧血など）の遺伝子治療が成功する上では、導入された遺伝子が、組み込み位置効果及び転写サイレンシングを伴うことなく赤血球細胞中で高レベル発現することが好ましい。β－グロビン遺伝子座制御領域（ＬＣＲ）は、そのような使用において有利であると考えられている。遺伝子治療用途については、ＨＳ１～ＨＳ５を含むβ－グロビンＬＣＲが、遺伝子とシス連結されると、そうした遺伝子を高レベルで発現させることがトランスジェニックマウスにおいて示されている（Ｇｒｏｓｖｅｌｄ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ ５１：９７５－９８５，１９８７）。しかしながら、このバージョンのＬＣＲは、レンチウイルスベクター（挿入容量８ｋｂ）において使用するには大きすぎ、それ故に、切断型である「小型」ＬＣＲバージョンまたは「マイクロ」ＬＣＲバージョンが開発されている。例えば、サラセミア患者において現在行われている臨床治験では、２．７ｋｂの小型ＬＣＲ（ＨＳ２～ＨＳ４をカバーする）及び２６６ｂｐのβ－グロビンプロモーターを含むレンチウイルスが使用されている（Ｎｅｇｒｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ １５：６４－８１，２０１５）。実施例１では、ＨＳ１～ＨＳ４と、ＣＤ４６トランスジェニックマウスまたはＣＤ４６／Ｈｂｂ$^{th3}$サラセミアマウスにおいてγ－グロビンを発現させるためのβ－グロビンプロモーターと、を含む５．９ｋｂのβ－グロビンＬＣＲバージョンを用いた（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ １２９：５９８－６１５，２０１９）。インビボＨＳＰＣ形質導入／選択手法を用いることで、末梢血赤血球のほぼ１００％においてγ－グロビンマーキングが達成された一方で、成体型マウスα－グロビンのものに対するγ－グロビンの発現レベルは１０～１５％であり、細胞当たりの平均組み込みベクターコピー数（ＶＣＮ）は２～３であった。

【０８５９】

$\beta_0$／$\beta_0$サラセミアまたは鎌状赤血球貧血を完全に治癒させるには、治療用グロビン（γ－グロビンまたはβ－グロビンのいずれか）の赤血球細胞中発現レベルを２０％にすることが必要であると一般に考えられている（Ｆｉｔｚｈｕｇｈ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ １３０：１９４６－１９４８，２０１７）。このレベルに到達させるための方法の１つは、ＨＳＰＣの形質導入を改善することによってＶＣＮを増加させるか、またはベクター用量を増加させることによってＶＣＮを増加させることによるものである。しかしながら、そのような手法は、毒性が生じるリスクを上昇させることが他の状況において歴史的に観察されており、このリスクの原因の少なくとも一部は、利用するベクター系の組み込みパターンが無作為であることによるものである。この実施例では、より強い転写エレメント、すなわち、より長いＬＣＲバージョンを利用することで、ＣＤ４６トランスジェニックマウスのインビボでのＨＳＰＣの形質導入後のＲＢＣ中のγ－グロビンの発現を増加させた。

【０８６０】

白血球アフェレーシス、骨髄破壊的前処理、及びＨＳＰＣ移植を必要としない新規のインビボＨＳＰＣ形質導入手法が提供されている（Ｒｉｃｈｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，１２８：２２０６－２２１７，２０１６）。この手法では、インビボでのＨＳＰＣの形質導入に適した新たなベクタープラットホーム、すなわち、ヘルパー依存型のカプシ

ド改変アデノウイルスベクター（ＨＤＡｄ５／３５＋＋）が使用される。こうしたベクターの特徴には、静脈内注射後に非造血組織が感染を受けることを回避しつつ未分化ＨＳＣの効率的な形質導入を可能にするＣＤ４６親和性増強型ファイバー、及び最大で３０ｋｂという挿入容量、が含まれる。到達性が限られるため、骨髄中に局在するＨＳＰＣの形質導入をベクター（ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを含む）の静脈内注射によって行うことは不可能であり、この形質導入を行うことは、そうしたベクターが、骨髄細胞上に存在する受容体を標的とした場合でさえ不可能である（Ｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ，１６：６６４－６７７，２００５、及びＮｉ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ，１３：１０７２－１０８１，２００６）。顆粒球－コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）とＣＸＣＲ４アンタゴニストＡＭＤ３１００（ＭＯＺＯＢＩＬ（商標）、ＰＬＥＲＩＸＡ（商標））とを併用すると未分化前駆細胞が効率的に動員されることが動物モデル及びヒトにおいて示されている（Ｆｒｕｅｈａｕｆ ｅｔ ａｌ．，Ｃｙｔｏｔｈｅｒａｐｙ，１１：９９２－１００１，２００９、及びＹａｎｎａｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ，２４：８５２－８６０，２０１３）。Ｇ－ＣＳＦ／ＡＭＤ３１００を使用してＨＳＰＣを骨髄から末梢血流に動員した後、ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターの静脈内注射を行った。このことは、ヒトＣＤ４６トランスジェニックマウス（Ｒｉｃｈｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，１２８：２２０６－２２１７，２０１６、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ，９：３９０－４０１，２０１８、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，１３１：２９１５－２９２８．２０１８、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ，１２９：５９８－６１５．２０１９、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ Ａｄｖ，３：２８８３－２８９４，２０１９、及びＷａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ，８：５２－６４，２０１８）、ヒト化マウス（Ｒｉｃｈｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，１２８：２２０６－２２１７，２０１６）、ならびにアカゲザル（Ｈａｒｗｏｒｔｈ ｅｔ ａｌ．，ＡＳＣＧＴ ２１ｔｈ Ａｎｎｕａｌ ｍｅｅｔｉｎｇ，２０１８，ＤＯＩ：１０．１０１６／ｊ．ｙｍｔｈｅ．２０１８．０５．００１）において以前に示されている。末梢において形質導入されたＨＳＰＣは骨髄に戻り、そこで長期的に存続する。増殖優位性が存在しない場合、インビボで形質導入されたＨＳＰＣが効率的に骨髄から遊離し、下流の分化に寄与することはない。$O^6$ＢＧ／ＢＣＮＵを用いて短期的に動物を処理することで、$mgmt^{P140K}$遺伝子によって改変されたＨＳＰＣに増殖刺激が加わり、その後に末梢血液細胞の８０％超において導入遺伝子が安定的に発現する（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ，８：５２－６４，２０１８）。

【０８６１】

ＨＤ－Ａｄ５／３５＋＋ゲノムは宿主細胞ゲノムに組み込まれることはなく、細胞分裂時に消失する。遺伝子治療目的、及びインビボで形質導入されたＨＳＰＣの長期的な追跡目的で、導入遺伝子の組み込みが可能になるようにＨＤ－Ａｄ５／３５＋＋ベクターを改変した。この改変は、高活性Ｓｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙトランスポゼース系（ＳＢ１００）を含めることによって実施した（Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，ＰＬｏＳ Ｏｎｅ，８：ｅ７５３４４，２０１３、Ｈａｕｓｌ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ，１８：１８９６－１９０６，２０１０、及びＹａｎｔ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ，２０：９９９－１００５，２００２）。このトランスポゼースは、第２のベクターからトランスで共発現するものであり、導入遺伝子カセットと隣接する特定のＤＮＡ配列（逆方向反復配列（「ＩＲ」））を認識し、染色体ＤＮＡのＴＡジヌクレオチドへの組み込みを引き起こす。レトロウイルスによる組み込みとは異なり、ＳＢ１００ｘ介在性組み込みは、標的遺伝子の転写状況に依存しない（Ｙａｎｔ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ，２５：２０８５－２０９４，２００５）。ＳＢ１００ｘ介在性の導入遺伝子組み込みは無作為であり、がん原遺伝子の活性化と関連しないことがいくつかの試験によって実証されている（Ｒｉｃｈｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，１２８：２２０６－２２１７，２０１６、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ

Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ，８：５２－６４，２０１８、Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，ＰＬｏＳ Ｏｎｅ，８：ｅ７５３４４，２０１３、Ｈａｕｓｌ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ，１８：１８９６－１９０６，２０１０、及びＹａｎｔ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ，２０：９９９－１００５，２００２）。ＳＢ１００ｘベースの組み込み系の利点は、細胞の効率的な相同ＤＮＡ修復機構に依存しないことである。後者はＨＳＰＣにおいては非常に重要なことであり、これは、ＨＳＰＣではＤＮＡ修復酵素及び組換え酵素の活性が低いためである（Ｂｅｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ，１５：３７－５０，２０１４）。ＣＤ４６トランスジェニックマウス（Ｒｉｃｈｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，１２８：２２０６－２２１７，２０１６、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ，１２９：５９８－６１５．２０１９、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ，２７：２１９５－２２１２，２０１９、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ，９：１４２－１５２，２０１８、及びＷａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｖｉｒｏｌ，７９：１０９９９－１１０１３，２００５）ならびにヒトＣＤ３４＋細胞（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ，２７：２１９５－２２１２，２０１９）においてＨＤＡｄ３５＋＋－トランスポゾンベクターとＳＢ１００ｘ／Ｆｌｐｅ発現ベクターとのインビボＨＳＣ同時感染を行うことで、遺伝子への選択性が存在せずとも、細胞当たりの導入遺伝子コピー数が２となる無作為な導入遺伝子組み込みが生じることが実証された。

【０８６２】

ヒトゲノムは、三次元構造で組織化されており、制御領域（すなわち、転写因子結合部位）の間の長距離相互作用は、通常はループ形成を介して生じる。こうした相互作用のほとんどが、トポロジカルドメイン（ＴＡＤ）と関連して生じる。ＴＡＤは、エンハンサーが他の制御領域と相互作用して転写を制御する染色体構造の機能性単位であると考えられている。ＴＡＤ／ＬＣＲ境界分離は、エンハンサー及びプロモーターの探索間隔を制限し、望ましくない制御性接触が生じることを阻止するものと考えられている。こうしたドメインの両側に位置する境界は、異なる哺乳動物細胞型の間で、さらには種にさえまたがって保存されている。

【０８６３】

現在使用されるレンチウイルスベクター及びｒＡＡＶ遺伝子導入ベクターに含まれるエンハンサー／プロモーターは小さなものにすぎないことから、導入遺伝子発現のレベル及び組織特異性が最適に満たないこと、導入遺伝子がサイレンシングを受けること、及びベクター組み込み部位周囲の制御領域との意図しない相互作用が生じること、がしばしば起こり得る。最悪のシナリオでは、後者によってがん原遺伝子が活性化し得る。

【０８６４】

遺伝子治療の安全性及び効率性を向上させるために、遺伝子付加方針にＴＡＤを使用すべきである。ＴＡＤのサイズ中央値は８８０ｋｂである。ハイスループット染色体立体配座捕捉（３Ｃ）アッセイならびにその後続の４Ｃプロトコール、５Ｃプロトコール、及びＨｉ－Ｃプロトコール、ならびにファイバー－Ｓｅｑアッセイのさらなる進歩に伴って制御性ゲノムの調査が急速に進むことになり、遺伝子治療目的では、この調査によって、決定的なコアエレメントのみを含むＴＡＤが与えられる可能性がある。β－グロビン遺伝子座制御領域（ＬＣＲ）は、ＴＡＤの定義に該当するものである。

【０８６５】

カプシド改変ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターは、インビボでのＨＳＰＣ遺伝子治療に使用されている（Ｌｉ ＆ Ｌｉｅｂｅｒ，ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．５９３（２４）：３６２３－４８，２０１９、Ｒｉｃｈｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．１２８（１８）：２２０６－１７，２０１６）。この手法では、ＨＳＰＣが骨髄から動員され、末梢血中に循環ＨＳＰＣが多数存在する間にＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターが静脈内注射される。こうしたベクターは、ＣＤ４６（未分化ＨＳＰＣ上に発現する受容体）を標的とする（Ｒｉｃｈｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．１２８（１８）：２２０６－１７，２０１６）。形質導入されたＨＳＰＣは骨髄に戻り、そこで長期的に存続する。無作為組み込みは、活

性増強型Ｓｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙトランスポゼース（ＳＢ１００ｘ）によって媒介される（Ｂｏｅｈｍｅ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ．５（７）：ｅ３３７，２０１６）。標的指向化組み込みは、相同性依存性ＤＮＡ修復を介して達成され得る（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２７（１２）：２１９５－２１２，２０１９）。この手法が適用された結果、マウス中間型サラセミアの軽快（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ．１２９（２）：５９８－６１５，２０１９）、マウス血友病の修正（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ Ａｄｖ．３（１９）：２８８３－９４，２０１９）、及び自然発生がんの好転（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．８０（３）：５４９－５６０，２０１９）が生じた。非ヒト霊長類での最初のデータでは、糖質コルチコイド、ＩＬ６受容体アンタゴニスト、及びＩＬ１β受容体アンタゴニストでの前処理と組み合わせてＨＤＡｄ５／３５＋＋の静脈内注射後の自然免疫応答を抑制した場合、インビボＨＳＰＣ遺伝子治療手法が安全であることが示されている（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，２３ｒｄ Ａｎｎｕａｌ ＡＳＧＣＴ ｍｅｅｔｉｎｇ．２０２０；ａｂｓｔｒａｃｔ ＃５４６）。ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを静脈内注射することによって生じる注射後３日目のＣＤ４６ｔｇマウスにおける導入遺伝子発現は、動員ＨＳＰＣ及びＰＢＭＣ以外の組織では生じなかった（Ｒｉｃｈｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．１２８（１８）：２２０６－１７，２０１６、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ．１２９（２）：５９８－６１５，２０１９）。このことは、非ヒト霊長類においても最近確認された。この指向性の考え得る理由は、非造血組織には効率的なウイルス形質導入を可能にするほど十分な高さのＣＤ４６受容体密度及び到達性が存在しないというものである（Ｒｉｃｈｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．１２８（１８）：２２０６－１７，２０１６、Ｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．１６（６）：６６４－７７，２００５）

【０８６６】

ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを用いた以前の試験では、４．３ｋｂのＨＳ１～ＨＳ４小型ＬＣＲ（β－グロビン遺伝子座制御領域）を０．６６ｋｂのβ－グロビンプロモーターと併用することで、インビボでのＨＳＰＣの形質導入後にヒトγ－グロビンの発現が促進された（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ．１２９（２）：５９８－６１５，２０１９、Ｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｅｘｐ Ｈｅｍａｔｏｌ．３４（６）：７１３－２０，２００６）。Ｈｂｂ$^{ｔｈ３}$／ＣＤ４６$^{＋／＋}$サラセミアマウスでは、末梢血赤血球のほぼ１００％において安定な（８＋ヶ月）γ－グロビンマーキングが達成され、表現型がほぼ完全に修正された（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ．１２９（２）：５９８－６１５，２０１９）。しかしながら、成体型マウスα－グロビンのものに対するγ－グロビンの発現レベルは１０～１５％にすぎず、細胞当たりの平均組み込みベクターコピー数（ＶＣＮ）は２であり、これによってこの手法を臨床的橋渡しとしてサラセミアメジャーまたはＳＣＤに適用することが特に課題となった。ここでは、完全な表現型修正を達成するために、長さ２９ｋｂのγ－グロビン発現カセットを含むβ－グロビンＴＡＤコアエレメントを含めることによってＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターの大容量性を利用した。

【０８６７】

この関連で、別の意図として、ＳＢ１００ｘ系が３２．４ｋｂのトランスポゾンの効率的な組み込みを媒介し得ることを実証することを試みた。プラスミドベースのＳＢ系を用いた試験から、ＳＢの組み込み活性は、トランスポゾンと長さと負に相関するものと考えられた（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ．９：１４２－５２，２０１８、Ｋａｒｓｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍａｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ（ＮＹ）．３（３）：２４１－５，２００１）。このことを考慮して、比較的小さな（４ｋｂ～６ｋｂ）トランスポゾンを保有する最初のＳＢベースのＨＤＡｄベクターがＫａｙ及びＥｈｒｈａｒｄｔのグループによって開発された（Ｔｕｒｃｈｉａｎｏ ｅｔ ａｌ．，ＰＬｏＳ Ｏｎｅ．９（１１）：ｅ１１２７１２，２０１４、Ｙａｎｔ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０（１０）：９９９－１００５，２００２）。

【０８６８】
最近では、ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを使用して、エクスビボまたはインビボでのＨＳＰＣの形質導入を行った後に１０．８ｋｂのトランスポゾン（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ Ａｄｖ．３（１９）：２８８３－９４，２０１９）及び１１．８ｋｂのトランスポゾン（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ．１２９（２）：５９８－６１５，２０１９、Ｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｅｘｐ Ｈｅｍａｔｏｌ．３４（６）：７１３－２０，２００６）がＨＳＰＣにおいてＳＢ１００ｘ介在性に効率的に組み込まれることが実証された。この実施例では、ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベースのＳＢ１００ｘベクター系によって３２．４ｋｂのトランスポゾンが組み込まれ得るという証拠が提供される。

【０８６９】
全体として、正常マウス及びサラセミアマウスでのこうしたインビボ試験、ならびにヒトＣＤ３４＋細胞を用いるインビトロ試験は、記載の長鎖ＬＣＲを含むＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターが異常ヘモグロビン症の治療に有効な治療ツールとなり得ることを示す。

【０８７０】
材料及び方法．

【０８７１】
構成要素位置：
ＨＳ５→ＨＳ１（２１．５ｋｂ）：Ｃｈｒ１１，５２９２３１９→５２７０７８９；β－プロモーター：ｃｈｒ１１，５２２８６３１→５２２７０２３、及び３’ＨＳ１：Ｃｈｒ１１，５２０６８６７→５２０３８３９。

【０８７２】
ＨＤＡｄベクター：
ＨＤＡｄ－ＳＢベクター及びＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲベクターの生成については以前に記載されている（Ｒｉｃｈｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ １２８：２２０６－２２１７，２０１６、Ｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｅｘｐ Ｈｅｍａｔｏｌ ３４（６）：７１３－２０，２００６）。ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲベクターの生成については、コスミドベクターｐＷＥ１５（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，Ｌａ Ｊｏｌｌａ，ＣＡ）に基づいて対応シャトルプラスミドを得た。ｐＷＥ．Ａｄ５－ＳＢ－ｍｇｍｔは、Ａｄ５ ５’ＩＴＲ（ヌクレオチド１～４３６）及びＡｄ５ ３’ＩＴＲ（ヌクレオチド３５７４１～３５９３８）、ｐＢＳ－μＬＣＲ－γ－グロビン－ｍｇｍｔ（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ １２９：５９８－６１５，２０１９）由来のヒトＥＦ１αプロモーター－ｍｇｍｔ$^{Ｐ１４０Ｋ}$－ＳＶ４０ｐＡ－ｃＨＳ４カセット、ＳＢ１００ｘ特異的ＩＲ／ＤＲ部位、ならびにＦＲＴ部位を含む。ｐＡｄ．ＬＣＲ－β－ＧＦＰ（２１．５ｋｂのヒトβ－グロビンＬＣＲを含む）（Ｈｕｄｅｃｅｋ ｅｔ ａｌ．，Ｃｒｉｔ Ｒｅｖ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ５２（４）：３５５－３８０，２０１７）中のＧＦＰ－ＢＧＨｐＡ断片をヒトγ－グロビン遺伝子及びその３’ＵＴＲ領域（Ｃｈｒ１１：５，２４７，１３９→５，２４９，８０４）によって置き換えた（ｐＡｄ－長鎖ＬＣＲ－β－γ－グロビン）。このプラスミドｐＡｄ－長鎖ＬＣＲ－β－γ－グロビンは、２１．５ｋｂのヒトβ－グロビンＬＣＲ及び３．０ｋｂのヒトβ－グロビン３’ＨＳ１を含む。ＬＣＲ－β－γ－グロビン－３’ＨＳ１を含む２８．９ｋｂの断片を、ＥＦ１α－ｍｇｍｔ－ＳＶ４０ｐＡ－ｃＨＳ４カセットの下流に挿入してｐＷＥ．Ａｄ５－ＳＢ－ｍｇｍｔに含めた（ｐＷＥ．Ａｄ５－ＳＢ－長鎖ＬＣＲ－γ－グロビン／ｍｇｍｔ）。完全な長鎖ＬＣＲ－γ－グロビン／ｍｇｍｔカセットがＳＢ１００ｘ特異的ＩＲ／ＤＲ部位及びＦＲＴ部位と隣接するようにした。得られたプラスミドを、Ｇｉｇａｐａｃｋ ＩＩＩ Ｐｌｕｓ Ｐａｃｋａｇｉｎｇ Ｅｘｔｒａｃｔ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，Ｌａ Ｊｏｌｌａ，ＣＡ）を使用してファージにパッケージングし、増殖させた。ＨＤ－Ａｄ－長鎖ＬＣＲ－γ－グロビン／ｍｇｍｔウイルスを生成させるために、Ｉ－ＣｅｕＩで消化することによってプラスミドからウイルスゲノムを遊離させ、１１６細胞でのレスキュー用とした。ヒト集団におけるＨＢＧ１遺伝子については、そのバリアントが２つ知られており、これらのバリア

ントは、単一アミノ酸バリエーション（７６－イソロイシンまたは７６－スレオニン）を有する。７６－Ｉｌｅ　ＨＢＧ１バリアントを使用した。このＨＢＧ１バリアントの頻度範囲は、欧州の１３％～東アジアの７３％である。

【０８７３】

ＨＤＡｄウイルスを生成させるために、ＦｓｅＩで消化することによってプラスミドからウイルスゲノムを遊離させ、Ａｄ５／３５＋＋－Ａｃｒヘルパーウイルスを用いる１１６細胞でのレスキュー用とした（Ｐａｌｍｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ　８：８４６－８５２，２００３）。このヘルパーウイルスは、ＡｄＮＧ１６３－５／３５＋＋の派生体であり、これは、Ａｄ５ファイバーテール、Ａｄ３５ファイバーシャフト、及び親和性増強型Ａｄ３５＋＋ファイバーノブから構成されるキメラファイバーを含むＡｄ５／３５＋＋ヘルパーベクターである（Ｒｉｃｈｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ　１２８：２２０６－２２１７，２０１６）。ＳｐＣａｓ９活性を阻害することが最近示されたヒトコドン最適化ＡｃｒＩＩＡ４－Ｔ２Ａ－ＡｃｒＩＩＡ２配列を合成し（Ｙａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ．９２（２５）：１１６０８－１２，１９９５）、シャトルプラスミドｐＢＳ－ＣＭＶ－ｐＡにクローニングした（ｐＢＳ－ＣＭＶ－Ａｃｒ－ｐＡ）。その後、Ｉｎ－ＦｕｓｉｏｎＨＤクローニングキット（Ｔａｋａｒａ）によってｐＢＳ－ＣＭＶ－Ａｃｒ－ｐＡから２．０ｋｂのＣＭＶ－Ａｃｒ－ｐＡカセットを増幅し、ｐＮＧ１６３－２－５／３５＋＋のＳｗａＩ部位に挿入した（Ｒｉｃｈｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ　１２８：２２０６－２２１７，２０１６）。次に、ＰａｃＩで消化することによってウイルスゲノムを遊離させ、Ａｄ５／３５＋＋－Ａｃｒヘルパーウイルスをレスキューし、２９３細胞（ＨＥＫ２９３）において増殖させた。ＨＤＡｄ－ＳＢの生成については、以前に記載されている（Ｒｉｃｈｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ１２８：２２０６－２２１７，２０１６）。ヘルパーウイルスの混入レベルは０．０５％未満であった。調製物はすべて、細菌エンドトキシンを含まないものであった。

【０８７４】

ＣＤ３４$^{+}$細胞の培養：

Ｇ－ＣＳＦによって動員処理した成体ドナーに由来するＣＤ３４$^{+}$細胞を凍結ストックから回復させ、イスコフ改変ダルベッコ培地（ＩＭＤＭ）中で一晩インキュベートした。このＩＭＤＭは、１０％の熱非働化ＦＣＳ、１％のＢＳＡ、０．１ｍｍｏｌ／ｌの２－メルカプトエタノール、４ｍｍｏｌ／ｌのグルタミン及びペニシリン／ストレプトマイシン、Ｆｌｔ３リガンド（Ｆｌｔ３Ｌ、２５ｎｇ／ｍｌ）、インターロイキン３（１０ｎｇ／ｍｌ）、トロンボポエチン（ＴＰＯ）（２ｎｇ／ｍｌ）、ならびに幹細胞因子（ＳＣＦ）（２５ｎｇ／ｍｌ）が添加されたものである。細胞の９８％超がＣＤ３４＋であることがフローサイトメトリーによって示された。サイトカイン及び増殖因子は、Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ（Ｒｏｃｋｙ　Ｈｉｌｌ，ＮＪ）から入手した。ＣＤ３４$^{+}$細胞の形質導入は、低接着性の１２ウェルプレートにおいてウイルスを用いて行った。

【０８７５】

赤血球のインビトロでの分化：

赤血球細胞へのヒトＨＳＰＣの分化は、Ｄｏｕａｙ　ｅｔ　ａｌ．（Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　４８２：１２７－１４０，２００９）に記載のプロトコールに基づいて実施した。簡潔に記載すると、ステップ１では、$10^{4}$個細胞／ｍｌの密度の細胞をＩＭＤＭ中で７日間インキュベートした。このＩＭＤＭは、５％のヒト血漿、２ＩＵ／ｍｌのヘパリン、１０μｇ／ｍｌのインスリン、３３０μｇ／ｍｌのトランスフェリン、１μＭのヒドロコルチゾン、１００ｎｇ／ｍｌのＳＣＦ、５ｎｇ／ｍｌのＩＬ－３、３Ｕ／ｍｌのエリスロポエチン（Ｅｐｏ）、グルタミン、及びペニシリン－ストレプトマイシンが添加されたものである。ステップ２では、$1\times10^{5}$個細胞／ｍｌの密度の細胞をＩＭＤＭ中で３日間インキュベートした。このＩＭＤＭは、５％のヒト血漿、２ＩＵ／ｍｌのヘパリン、１０μｇ／ｍｌのインスリン、３３０μｇ／ｍｌのトランスフェリン、１００ｎｇ／ｍｌのＳＣＦ、３Ｕ／ｍｌのＥｐｏ、グルタミン、及びペニシリン／ストレプトマイ

シンが添加されたものである。ステップ３では、１×１０$^{6}$個細胞／ｍｌの密度の細胞をＩＭＤＭ中で１２日間インキュベートした。このＩＭＤＭは、５％のヒト血漿、２ＩＵ／ｍｌのヘパリン、１０μｇ／ｍｌのインスリン、３３０μｇ／ｍｌのトランスフェリン、３Ｕ／ｍｌのＥｐｏ、グルタミン、及びペニシリン／ストレプトマイシンが添加されたものである。

【０８７６】

形質導入されたＣＤ３４＋細胞のインビトロでの選択：

インビトロ分化プロトコールのステップ１の５日目にＯ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵを用いて形質導入ＣＤ３４＋細胞の選択を行った。簡潔に記載すると、ＣＤ３４＋細胞を５０μＭのＯ$^{6}$ＢＧと共に１時間インキュベートした後、３５μＭのＢＣＮＵと共にさらに２時間インキュベートした。次に、細胞を２回洗浄し、新鮮なステップ１培地中に再浮遊させた。

【０８７７】

Ｌｉｎ$^{-}$細胞培養：

Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ（Ｂｅｒｇｉｓｃｈ Ｇｌａｄｂａｃｈ，Ｇｅｒｍａｎｙ）から入手したＬｉｎｅａｇｅ Ｃｅｌｌ Ｄｅｐｌｅｔｉｏｎキットを使用してＭＡＣＳによって全マウス骨髄細胞から系譜陰性細胞を単離した。１０％のＦＣＳ、１０％のＢＳＡ、ペニシリン－ストレプトマイシン、グルタミン、１０ｎｇ／ｍｌのヒトＴＰＯ、２０ｎｇ／ｍｌのマウスＳＣＦ、及び２０ｎｇ／ｍｌのヒトＦｌｔ－３Ｌが添加されたＩＭＤＭ中でＬｉｎ$^{-}$細胞を培養した。

【０８７８】

グロビンＨＰＬＣ：

個々のグロビン鎖レベルの定量化は、ＳＰＤ－１０ＡＶダイオードアレイ検出器及びＬＣ－１０ＡＴバイナリポンプを備えたＳｈｉｍａｄｚｕ Ｐｒｏｍｉｎｅｎｃｅ機器（Ｓｈｉｍａｄｚｕ，Ｋｙｏｔｏ，Ｊａｐａｎ）で実施した。ＶｙｄａｃＣ４逆相カラム（Ｈｉｃｈｒｏｍ，ＵＫ）を使用して、トリフルオロ酢酸含量０．１％の水／アセトニトリルの４０％→６０％グラジエント混合物を流速１ｍｌ／分で適用した。

【０８７９】

フローサイトメトリー：

１％のＦＣＳが添加されたＰＢＳ中に１×１０$^{6}$個細胞／１００μＬで細胞を再浮遊させ、ＦｃＲ遮断試薬（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ａｕｂｕｒｎ ＣＡ）と共に氷上で１０分間インキュベートした。次に、１０$^{6}$個細胞当たり１００μＬの染色抗体溶液を添加し、暗所、氷上で３０分間インキュベートした。インキュベート後、細胞をＦＡＣＳ緩衝液（ＰＢＳ、１％ＦＢＳ）中で１回洗浄した。二次染色溶液を用いて染色ステップを再度実施した。洗浄後、ＦＡＣＳ緩衝液中に細胞を再浮遊させ、ＬＳＲＩＩフローサイトメーター（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓａｎ Ｊｏｓｅ，ＣＡ）を使用して分析した。前方散乱領域及び側方散乱領域のゲートを使用して残骸を除外した。次に、前方散乱高及び前方散乱幅のゲートを使用して単一細胞をゲートした。次に、ＦｌｏｗＪｏ（バージョン１０．０．８、ＦｌｏｗＪｏ，ＬＬＣ）を使用してフローサイトメトリーデータを解析した。ＬＳＫ細胞のフロー分析については、ビオチン結合型系譜検出カクテル（カタログ番号：１３０－０９２－６１３；Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）ならびにｃ－Ｋｉｔに対する抗体（カタログ番号：１２－１１７１－８３）及びＳｃａ－１に対する抗体（カタログ番号：２５－５９８１－８２）、ならびにＡＰＣ結合型ストレプトアビジンを用いて細胞を染色した。ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）から入手した他の抗体には、抗マウスＬＹ－６Ａ／Ｅ（Ｓｃａ－１）－ＰＥ－シアニン７（クローンＤ７）、抗マウスＣＤ１１７（ｃ－Ｋｉｔ）－ＰＥ（クローン２Ｂ８）、抗マウスＣＤ３－ＡＰＣ（クローン１７Ａ２；カタログ番号：１７－００３２－８２）、抗マウスＣＤ１９－ＰＥ－シアニン７（クローンｅＢｉｏ１Ｄ３；カタログ番号：２５－０１９３－８２）、及び抗マウスＬｙ－６６（Ｇｒ－１）－ＰＥ（クローンＲＢ６－８Ｃ５；カタログ番号：１２－５９３１－８２）が含まれる。抗マウスＴｅｒ－１１９－ＡＰＣ（クローン：Ｔｅｒ－１１９；カタログ番号：１１６２１１）は、

Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ（Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）から入手した。

【０８８０】

ヒトγ－グロビンの発現を検出する細胞内フローサイトメトリー：

ＦＩＸ＆ＰＥＲＭ（商標）（Ｎｏｒｄｉｃ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｓｕｓｔｅｒｅｎ，Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）細胞透過処理キット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）を使用し、製造者のプロトコールに従った。簡潔に記載すると、１×１０$^{6}$個の細胞を１００μｌのＦＡＣＳ緩衝液（１％のＦＣＳが添加されたＰＢＳ）中に再浮遊させ、１００μｌの試薬Ａ（固定化媒体）を添加し、室温で２～３分間インキュベートした後、予冷した無水メタノールを１ｍｌ添加し、混合し、暗所、氷上で１０分間インキュベートした。次に、ＦＡＣＳ緩衝液で試料を洗浄し、１００μｌの試薬Ｂ（透過処理媒体）及び０．３μｇのヘモグロビンγ抗体（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｄａｌｌａｓ，ＴＸ、カタログ番号ｓｃ－２１７５６ＰＥ）中に再浮遊させ、室温で３０分間インキュベートした。洗浄後、ＦＡＣＳ緩衝液中に細胞を再浮遊させ、分析した。図４６には、フローサイトメトリーのゲート方針が示される。

【０８８１】

リアルタイム逆転写ＰＣＲ：

製造者のフェノール－クロロホルム抽出方法に従ってＴＲＩｚｏｌ（商標）試薬（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用することによって５０～１００μｌの血液から全ＲＮＡを抽出した。Ｑｕａｎｔｉｔｅｃｔ逆転写キット（Ｑｉａｇｅｎ）及びｐｏｗｅｒ　ＳＹＢＲ（商標）ｇｒｅｅｎ　ＰＣＲ　ｍａｓｔｅｒ　ｍｉｘ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用した。ＳｔｅｐＯｎｅＰｌｕｓ　ｒｅａｌ－ｔｉｍｅ　ＰＣＲ　ｓｙｓｔｅｍ（ＡＢ　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）でリアルタイム定量的ＰＣＲを実施した。下記のプライマー対を使用した：マウスＲＰＬ１０（ハウスキーピング）フォワード（配列番号１８９）及びリバース（配列番号１９０）、ヒトγ－グロビンフォワード（配列番号１９１）及びリバース（配列番号１９２）、マウスβ－メジャーグロビンフォワード（配列番号１９３）及びリバース（配列番号１９４）、マウスαグロビンフォワード（配列番号２１２）及びリバース（配列番号２１３）。

【０８８２】

ベクターコピー数の測定：

Ｑｕｉｃｋ－ＤＮＡ　ｍｉｎｉｐｒｅｐキット（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を使用して骨髄細胞から全ＤＮＡを抽出した。ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲ－γ－グロビン／ｍｇｍｔウイルスから抽出したウイルスＤＮＡを段階希釈し、標準曲線に使用した。ｐｏｗｅｒ　ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　ＰＣＲ　ｍａｓｔｅｒ　ｍｉｘを使用してＳｔｅｐＯｎｅＰｌｕｓ　ｒｅａｌ－ｔｉｍｅ　ＰＣＲ　ｓｙｓｔｅｍ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）でのｑＰＣＲを３連で実施した。９．６ｎｇのＤＮＡ（９６００ｐｇ／６ｐｇ／細胞＝１６００細胞）を１０μＬの反応に使用した。下記のプライマー対を使用した：ヒトγ－グロビンフォワード（配列番号１９５）及びリバース（配列番号１９６）。

【０８８３】

組み込み部位分析．

手順の説明については図２７を参照のこと。図２８Ｄの無作為化データについては、ポアソン回帰挿入モデル（ＰＲＩＭ）を使用することで、マウス参照ゲノム（ｍｍ９）の各染色体の長さに沿って重複しない２０キロベース枠に対する予想挿入率を計算して創出した。このＰＲＩＭアルゴリズムによって、各枠内のＴＡジヌクレオチドの数、枠が存在する染色体、及び特有挿入の総数に基づいて統計モデルを生成させた。各枠について、予想挿入数を計算し、観察された挿入数と比較してｐ値を得た。次に、ボンフェローニ補正を適用して、挿入トランスポゾンの検出のエンリッチメントを示す枠を同定した。次に、参照ゲノムからＴＡ含有無作為配列を生成させ、Ｂｏｗｔｉｅ２を使用してマッピングし、実際の組み込みデータに対してプロットした。計算及びプロットは、Ｒに含まれるｇｇｐ

ｌｏｔ２を使用して実施した。図は、ＨＯＭＥＲ及びＣｈＩＰｓｅｅｋｅｒを使用して描いた。

【０８８４】

組み込み部位分析（インバースＰＣＲ）．

他に記載のものに改変を加えたインバースＰＣＲによって全骨髄細胞中の連結部を分析した（Ｈｕｄｅｃｅｋ ｅｔ ａｌ．，Ｃｒｉｔ Ｒｅｖ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ５２（４）：３５５－８０，２０１７）。簡潔に記載すると、製造者の説明に従ってＱｕｉｃｋ－ＤＮＡ ｍｉｎｉｐｒｅｐキット（Ｚｙｍｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を使用することによって骨髄細胞からゲノムＤＮＡを単離した。５～１０μｇのＤＮＡをＳａｃＩで消化し、分子内反応を促進する条件の下で再ライゲーションした。ライゲーション混合物をフェノール／クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって精製した後、ＫＯＤ Ｈｏｔ Ｓｔａｒｔ ＤＮＡポリメラーゼを使用するネステッドＰＣＲ（各３０サイクル）に使用した。下記のプライマーを使用した：ＥＦ１α ｐ１フォワード（配列番号１９７）及びリバース（配列番号１９８）、ＥＦ１α ｐ２フォワード（配列番号１９９）及びリバース（配列番号２００）、３’ＨＳ１ ｐ１フォワード（配列番号２０１）及びリバース（配列番号２０２）、ならびに３’ＨＳ１ ｐ２フォワード（配列番号２０３）及びリバース（配列番号２０４）。配列番号１９７～２０４では、下流クローニングに使用した塩基が下線付きで示される。ＰＣＲ増幅産物をゲルで精製し、クローニングし、シークエンスし、アライメントして組み込み部位を同定した。

【０８８５】

ＲＮＡ－ｓｅｑ分析は、Ｏｍｅｇａ Ｂｉｏｓｅｒｖｉｃｅｓ（Ｎｏｒｃｒｏｓｓ，ＧＡ）によって実施した。データの解析は、ＯｎＲａｍｐ ＢｉｏＩｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ，Ｉｎｃ．（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）によって開発されたＨｙｐｅｒＳｃａｌｅアーキテクチャを用いてＲｏｓａｌｉｎｄ（ｒｏｓａｌｉｎｄ．ｏｎｒａｍｐ．ｂｉｏ／にてオンラインで利用可能）によって行った。リードのトリミングはｃｕｔａｄａｐｔを使用して行った。品質スコアの評価はＦａｓｔＱＣを使用して行った。個々の試料リードは、ＨＴｓｅｑ４を使用して定量化し、ＤＥＳｅｑ２ Ｒライブラリーを使用して相対対数発現量（ＲＬＥ）によって正規化した。ＤＥｓｅｑ２は、倍率変化及びｐ値の計算ならびに任意選択の共変量補正の実施にも使用した。遺伝子の発現差異を示す最終的なヒートマップのための遺伝子のクラスター化は、ｆｐｃ Ｒライブラリーを使用するＰＡＭ（Ｐａｒｔｉｔｉｏｎｉｎｇ Ａｒｏｕｎｄ Ｍｅｄｏｉｄｓ）法を使用して実施した。Ｉｎｔｅｒｐｒｏ９、ＮＣＢＩ１０、ＭＳｉｇＤＢ１１、ＭＳｉｇＤＢ１２、ＲＥＡＣＴＯＭＥ１３、ＷｉｋｉＰａｔｈｗａｙｓを含めて、エンリッチメント解析にはいくつかのデータベース源を参照した。エンリッチメントは、実験と関連する一連のバックグラウンド遺伝子に対して計算した。

【０８８６】

ボルケーノプロットは、ｐ値に対して倍率変化を対数スケールでプロットするカスタムＰｙｔｈｏｎスクリプトを用いて作成した。

【０８８７】

動物：

【０８８８】

試験の承認：

動物を使用する実験はすべて、ｔｈｅ ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎによって示される施設ガイドラインに従って実施した。ｔｈｅ ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎは、Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ ｆｏｒ ｔｈｅ Ａｓｓｅｓｓｍｅｎｔ ａｎｄ Ａｃｃｒｅｄｉｔａｔｉｏｎ ｏｆ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ａｎｉｍａｌ Ｃａｒｅ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ（ＡＡＬＡＣ）が公認する研究施設であり、この大学で実施される生きた動物を扱う研究はすべて、Ｏｆｆｉｃｅ ｏｆ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ａｎｉｍａｌ Ｗｅｌｆａｒｅ（ＯＬＡＷ）Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ａｓｓｕｒａｎｃｅ（ＰＨＳ）ポリシー、ＵＳＤＡ Ａｎｉｍａｌ Ｗｅｌｆ

ａｒｅ Ａｃｔ ａｎｄ Ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎｓ、Ｇｕｉｄｅ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅ ｏｆ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ａｎｉｍａｌｓ、及び管理を行うＩｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ Ａｎｉｍａｌ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ（ＩＡＣＵＣ）ポリシーに従うものである。試験は、ｔｈｅ ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ ＩＡＣＵＣ（プロトコール第３１０８－０１号）によって承認されたものである。

【０８８９】

エクスビボ及びインビボでのＨＳＰＣの形質導入試験は、完全なヒトＣＤ４６遺伝子座を含むＣ５７Ｂｌ／６ベースのトランスジェニックマウスモデル（ｈＣＤ４６ｔｇ）を用いて実施した。こうしたマウスは、ヒトと同様のパターン及びレベルでｈＣＤ４６を発現する（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ．８：５２－６４，２０１８）。

【０８９０】

Ｈｂｂ$^{ｔｈ３}$／ＣＤ４６＋／＋マウスの交配繁殖及びスクリーニング：

３回の戻し交配の後、ＣＤ４６についてのＨｂｂ$^{ｔｈ３}$マウスのホモ接合性を、ｇＤＮＡに対するＰＣＲ（ＣＤ４６Ｆ－５’プライマー（配列番号２０５）及びＣＤ４６Ｒプライマー（配列番号２０６）を使用するもの）ならびにＣＤ４６ＭＦＩを測定することが可能なフローサイトメトリーによって確認した。Ｈｂｂ$^{ｔｈ３}$／ＣＤ４６$^{＋}$／$^{＋}$マウスのサラセミア表現型は、以下に記載のように、ギムザ／メイ・グリュンワルド染色を行った後に末梢血塗抹標本によって評価した。

【０８９１】

骨髄Ｌｉｎ$^{－}$細胞移植：

６～８週齢の雌性Ｃ５７ＢＬ／６マウスをレシピエントとした。移植日に、レシピエントマウスに１０００Ｒａｄの照射を行った。照射から４時間後、尾静脈を介して１×１０$^{６}$個のＬｉｎ$^{－}$細胞を静脈内注射した。このプロトコールは、エクスビボで形質導入したＬｉｎ$^{－}$細胞の移植、及び二次レシピエントへの移植に使用した。

【０８９２】

ＨＳＰＣ動員及びインビボ形質導入：

この手順については、Ｒｉｃｈｔｅｒ，ｅｔ ａｌ．，（２０１６）Ｂｌｏｏｄ １２８：２２０６－２２１７に以前に記載されている。マウスにおけるＨＳＰＣの動員は、ヒト組換えＧ－ＣＳＦ（Ａｍｇｅｎ Ｔｈｏｕｓａｎｄ Ｏａｋｓ、ＣＡ）を皮下注射（５μｇ／マウス／日、４日）した後、５日目にＡＭＤ３１００（５ｍｇ／ｋｇ）（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を皮下注射することによって行った。さらに、ウイルス注射の１６時間前及び２時間前にデキサメタゾン（１０ｍｇ／ｋｇ）を動物に腹腔内注射した。ＡＭＤ３１００の注射から３０分後及び６０分後に、各ウイルスにつき注射当たり４×１０$^{１０}$ｖｐの用量で、後眼窩静脈叢を介してＨＤＡｄベクターを動物に静脈内注射した。４週間後、Ｏ$^{６}$ＢＧ／ＢＣＮＵによるインビボでの選択を開始した。

【０８９３】

二次骨髄移植：

Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙから入手した６～８週齢の雌性Ｃ５７ＢＬ／６マウスをレシピエントとした。移植日に、レシピエントマウスに１０００Ｒａｄの照射を行った。インビボで形質導入したＣＤ４６ｔｇマウスから骨髄細胞を無菌的に単離し、ＭＡＣＳを使用して、系譜決定細胞が除去された細胞を単離した。照射から４時間後、マウス当たり１×１０$^{６}$個細胞として細胞を静脈内注射した。２０週目に、二次レシピエントを　殺し、ＭＡＣＳによって血液、骨髄、及び脾臓からＣＤ４６＋細胞を単離するか、または二次レシピエントを動員処理及びインビボでの形質導入に供した（上記のように行った）。すべての二次レシピエントにおいて４週目に免疫抑制を開始した。

【０８９４】

血液学的分析：

血液試料をＥＤＴＡ被覆管に収集し、ＨｅｍａＶｅｔ ９５０ＦＳ（Ｄｒｅｗ Ｓｃｉ

ｅｎｔｉｆｉｃ）で分析を実施した。

【０８９５】

組織分析：

厚さ２．５μｍの脾臓組織切片及び肝臓組織切片を４％のホルムアルデヒド中で少なくとも２４時間固定化し、脱水し、パラフィン中に包埋した。髄外造血の組織学的評価にはヘマトキシリン－エオシン染色を使用した。組織切片中のヘモジデリンの検出は、パールプルシアンブルー染色によって実施した。簡潔に記載すると、フェロシアン化カリウムと蒸留水希釈塩酸との等体積混合物（２％）で組織切片を処理した後、ニュートラルレッドで対比染色した。細胞外造血及びヘモジデリン沈着を定量化するために、少なくとも３匹の動物から得られた５つの異なる組織切片中の１０個の無作為領域を、マウス群について盲検化された研究者によって評価した。脾臓サイズは、脾臓重量（ｍｇ）／体重（ｇ）の比率として評価した。

【０８９６】

血液分析及び骨髄サイトスピン：

血液試料をＥＤＴＡ被覆管に収集し、ＨｅｍａＶｅｔ　９５０ＦＳ（Ｄｒｅｗ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｔｅｒｂｕｒｙ，ＣＴ）で分析を実施した。末梢血塗抹標本及び骨髄細胞サイトスピン調製物の染色は、ギムザ／メイ・グリュンワルド／ギムザ（Ｍｅｒｃｋ，Ｄａｒｍｓｔａｄｔ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を用いて、それぞれ５分間及び１５分間行った。網状赤血球の染色は、ブリリアントクレシルブルーで行った。血液塗抹標本上での網状赤血球の計数は、試料群の割り付けについて盲検化された研究者によって行った。スライド上には動物番号のみを示した（動物当たり５つのスライド、５つの無作為な１ｃｍ$^2$区画）。

【０８９７】

統計解析：

データは、平均値±平均値の標準誤差（ＳＥＭ）として示される。複数群の比較については、一元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）及び二元配置ＡＮＯＶＡを、多重比較のためのボンフェローニ事後検定と併用した。群化変数が１つの群の間の差は、対応のない両側スチューデントｔ検定によって決定した。ノンパラメトリック解析については、クラスカル・ウォリス検定を使用した。統計解析は、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍバージョン６．０１（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ　Ｉｎｃ．，Ｌａ　Ｊｏｌｌａ，ＣＡ）を使用して実施した。＊ｐ≦０．０５、＊＊ｐ≦００．０００１．Ｐ値が０．０５未満である場合に有意と見なした。

【０８９８】

結果．

【０８９９】

ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを静脈内注射するインビボ形質導入試験のモデルとして、完全なヒトＣＤ４６遺伝子座を含むことでヒトと同様のパターン及びレベルでｈＣＤ４６を発現するトランスジェニックマウス（ｈＣＤ４６ｔｇマウス）（Ｋｅｍｐｅｒ，ｅｔａｌ．，（２００１）Ｃｌｉｎ　Ｅｘｐ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　１２４：１８０－１８９）を使用した。

【０９００】

長鎖β－グロビンＬＣＲを含むＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクター．

実施例１に記載の試験では、１．６ｋｂのβ－グロビンプロモーターに連結された４．３ｋｂの小型ＬＣＲ（ＨＳ１～ＨＳ４のコアエレメント（Ｌｉｓｏｗｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ　１１０：４１７５－４１７８，２００７）を含む）の制御下でγ－グロビンを発現するＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクター（図２３、「ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲ」）（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｉｎｖｅｓｔ　１２９：５９８－６１５，２０１９）を使用した（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｉｎｖｅｓｔ　１２９：５９８－６１５，２０１９、Ｌｉ，ｅｔ　ａｌ．，（）Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｃｌｉｎ　Ｄｅｖ　９：１４２－１５２，２０１８）。この実施例では、γ－グロビン遺

伝子の発現を最大化するために下記のエレメントを含むＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを構築した：ｉ）全長ＨＳ５～ＨＳ１領域を含む２１．５ｋｂのＬＣＲ、ｉｉ）１．６ｋｂのβ－グロビンプロモーター、ｉｉｉ）γ－グロビンｍＲＮＡを安定化するためのβ－グロビン３’ＵＴＲ、及びｉｖ）３’ＨＳ１領域。このベクターをＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲ（図２３、「ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲ」）と命名した。組み込みを媒介させるために、ＬＣＲ－ベクターは、ＳＢ１００ｘ／Ｆｌｐｅ発現ＨＤＡｄベクター（図２３、「ＨＤＡｄ－ＳＢ」）と併用される。トランスポゾンベクター（ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲ及びＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲ）は、逆方向／同方向反復配列（ＩＲ／ＤＲ）モチーフ（ＳＢ１００ｘトランスポゼースによって認識される）及びｆｒｔ部位（Ｆｌｐｅリコンビナーゼの存在下で導入遺伝子カセットを環状化させることを可能にする）を含む。ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲ及びＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲは両方共、遍在性に活性なＥＦ１ａプロモーターの制御下にあり、かつ安定的に形質導入された細胞を低用量のＯ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵ処理によって選択することを可能にするための変異Ｏ$^{6}$－メチルグアニン－ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ（ｍｇｍｔ$^{Ｐ１４０Ｋ}$）の遺伝子も保有するようにした（Ｈａｕｓｌ ｅｔ ａｌ．，Ｂ．Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ １８（１１）：１８９６－９０６，２０１０、Ｎｅｆｆ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ １１２（１０）：１５８１－８，２００３）。

【０９０１】

エクスビボＨＳＰＣ形質導入／移植試験．

ヒトではすべての有核細胞上にＣＤ４６が発現するが、マウスの対応オルソログは精巣にのみ存在する。ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを静脈内注射するインビボ形質導入試験のモデルとして、完全なヒトＣＤ４６遺伝子座を含むことでヒトと同様のパターン及びレベルでｈＣＤ４６を発現するトランスジェニックマウス（ＣＤ４６ｔｇマウス）を使用した（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ ８：５２－６４，２０１８）。ＳＢ１００ｘが３２．４ｋｂのトランスポゾンの組み込みを媒介し得るかどうかは事前には未知であったため、ＨＳＰＣの形質導入効率を制御し得る状況においてエクスビボＨＳＰＣ形質導入試験を実施した。ＣＤ４６ｔｇマウス骨髄系譜陰性（Ｌｉｎ$^{－}$）細胞（ＨＳＰＣを濃縮した細胞画分）に対して、ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲ＋ＨＤＡｄ－ＳＢを用いる形質導入をエクスビボで実施した（図２４Ａ）。次に、エクスビボで形質導入した細胞を致死性照射Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに移植した。ＣＤ４６陽性ＰＢＭＣに基づく４週目の時点の生着率は９５％超であった。移植から１ヶ月後、４回のＯ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵ処理にマウスを供すことで、γ－グロビン／ｍｇｍｔ導入遺伝子が組み込まれた前駆細胞を選択的に増殖させた（図２４Ａ）。各回のインビボ選択を経るに伴ってγ－グロビン陽性末梢赤血球（ＲＢＣ）のパーセントは上昇し、試験の終了時点までには９５％超に到達した（図２４Ｂ）。２０週目に動物を　殺し、骨髄単核細胞（ＭＮＣ）を分析した。ｑＰＣＲによって測定した平均ＶＣＮは２．８コピー／細胞であった。フローサイトメトリーによって検出したところ、赤血球Ｔｅｒ１１９$^{＋}$細胞の８５．４６（＋／－５．９）％、非赤血球（Ｔｅｒ１１９$^{－}$）骨髄ＭＮＣの１４．５４（＋／－２．３）％においてγ－グロビンが発現していた（図２４Ｃ）。

【０９０２】

ＳＢ１００ｘによって組み込まれた導入遺伝子がγ－グロビン発現の起源であることを実証するために、移植後２０週目に収集した骨髄単核細胞（ＭＮＣ）から得たゲノムＤＮＡに対してインバースＰＣＲ（ｉＰＣＲ）分析を実施した。ｉＰＣＲプロトコールは、ＳａｃＩでのゲノムＤＮＡの消化、再ライゲーション／環状化ステップ、ネステッドＰＣＲ、及びベクター／染色体連結部のシークエンシングを含むものである（図２４Ｄ）。（図２４Ｅ）は、３つの代表的なＰＣＲ産物、ならびに４番染色体、１５番染色体、及びＸ染色体上の組み込み部位の局在を示す。増幅産物のシークエンシングを行うことで、ＳＢ１００ｘ介在性の組み込みに典型的なベクター／染色体連結部（こうしたベクターＩＲ／ＤＲ－染色体連結部にはＴＡジ－ヌクレオチドが含まれている）が存在することが実証された（図２４Ｆ）。まとめると、エクスビボＨＳＰＣ形質導入試験では、ＳＢ１００ｘによって組み込まれたトランスポゾンを起源としてγ－グロビンが長鎖グロビンＬＣＲによっ

て高レベルで発現した。

【０９０３】

ＣＤ４６ｂトランスジェニックマウスにおけるＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターでのインビボＨＳＰＣ形質導入（短鎖ＬＣＲ含有ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターと長鎖ＬＣＲ含有ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターとの対比）．

ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲと、実施例１で既に使用した小型ＬＣＲ含有ベクター（本明細書では「ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲ」と称される）との対比を実施した（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ １２９：５９８－６１５，２０１９、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ ９：１４２－１５２，２０１８）（図２３）。ＣＤ４６トランスジェニックマウスをＧ－ＣＳＦ／ＡＭＤ３１００による動員処理に供し、ベクターを静脈内注射し、５週間後にインビボ選択に供した（図２５Ａ）。γ－グロビン陽性赤血球（ＲＢＣ）のパーセントは、インビボ選択の各回を経るに伴って増加し、２０週目には両方のベクターで９５％超に達した（図２５Ｂ）。２０週目の試料から得られたＲＢＣ溶解物で実施したＨＰＬＣでは、γ－グロビン／成体型マウスα－グロビンのパーセントにベクター間有意差は存在しなかった（図２５Ｃ）。このことは、ｍＲＮＡレベルでも反映されていた（図２５Ｄ）。

【０９０４】

ｑＰＣＲによって２０週目に測定した骨髄単核細胞（ＭＮＣ）中のベクターコピー数は２．５コピー／細胞であり（図２５Ｅ）、そのベクター間差は有意なものではなかった。これによって、「長い」３２．４ｋｂのトランスポゾンの組み込みは、「短い」１１．８ｋｂのトランスポゾンの組み込みと同じくらい効率的なものであることが示された。これらのベクターによるインビボでのＨＳＰＣの形質導入の後に３２．４ｋｂのトランスポゾンがＳＢ１００ｘ介在性に組み込まれたことで、赤血球細胞の圧倒的多数においてγ－グロビンが発現したにもかかわらず、血液学的な異常が生じることはなかった（２０週目）（図２６Ｂ）。骨髄細胞組成（図２６Ｃ）及び骨髄Ｌｉｎ－細胞のコロニー形成能（図２６Ｄ）に群間有意差は存在しなかった。

【０９０５】

インビボ形質導入及びＳＢ１００ｘ介在性組み込みが長期再増殖ＨＳＰＣにおいて生じたことを実証するための二次移植では、骨髄細胞組成（図２６Ｃ）及び骨髄Ｌｉｎ－細胞のコロニー形成能（図２６Ｄ）に群間有意差は存在しなかった。インビボでのＨＳＰＣの形質導入後２０週目に収集した骨髄Ｌｉｎ－細胞を、ｈＣＤ４６導入遺伝子を有さない致死性照射Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに移植した。移植細胞が二次レシピエントにおいて多系譜再構築を導く能力を１６週間にわたって評価した。「一次」インビボＨＳＰＣ形質導入マウスと同様に、骨髄細胞組成または末梢血における血液学的パラメーターに対する高レベルグロビン発現の影響は観察されなかった。

【０９０６】

２０週目に収集した骨髄Ｌｉｎ－細胞は、ゲノム全域にわたる組み込み部位分析を実施するためにも使用した。このアッセイでは、線形増幅介在性ＰＣＲ（ＬＡＭ－ＰＣＲ）方針を採り、その後に組み込み連結部のシークエンシングを行った（図２７）。図２８Ａには、マウスゲノムにわたる組み込み部位の分布が示される。組み込まれた導入遺伝子カセットは正確に処理されたものであり、同定されたＩＲ／ＤＲ染色体連結部はＴＡジヌクレオチドを含んでいた（図２８Ｂ）。組み込みの圧倒的多数が遺伝子間領域内及びイントロン領域内で生じており、その頻度は、それぞれ８３％及び１７％であった（図２８Ｃ）。この組み込みは、全マウスゲノムのいずれの所与の枠での選択的組み込みも伴わない無作為なものであった（図２８Ｄ）。がん原遺伝子内またはがん原遺伝子付近での組み込みは見られなかった。このＳＢ１００ｘ介在性組み込みパターンは、以前に研究と一致している（Ｒｉｃｈｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ １２８（１８）：２２０６－１７，２０１６、Ｎｅｆｆ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ １１２（１０）：１５８１－８，２００３、Ｋｅｍｐｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｅｘｐ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１２４（２）：１８０－９，２００１、Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，ＰＬｏＳ Ｏｎｅ

８（１０）：ｅ７５３４４，２０１３、Ｙａｎｔ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２０（１０）：９９９－１００５，２００２）。

【０９０７】

二次レシピエントの分析．

インビボ形質導入が長期再増殖ＨＳＰＣにおいて生じたことを実証するために、ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲ及びＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲを用いるインビボでのＨＳＰＣの形質導入から２０週目に収集した骨髄Ｌｉｎ$^{-}$細胞を致死性照射Ｃ５７Ｂｌ／６マウス（ｈＣＤ４６導入遺伝子を有さない）に移植した。移植細胞が二次レシピエントにおいて多系譜再構成を導く能力を１６週間にわたって評価した。ＰＢＭＣにおけるＣＤ４６発現に基づく生着率は９５％であり、安定を保っていた（図２９Ａ）。フローサイトメトリーによって測定したＲＢＣのγ－グロビンマーキング率は９０～９５％の範囲内であり、安定していた（図２９Ｂ）。γ－グロビン$^{+}$ＲＢＣのパーセントに２つのベクター間での有意差は存在しなかった。平均組み込みベクターコピー数もまた、２つのベクター間で有意に異なることはなく、このことは、長期再増殖細胞における両方のトランスポゾンの組み込みが等しく効率的であることを示している（図２９Ｃ）。興味深いことに、マウス成体型グロビン鎖に対するγ－グロビン鎖のパーセントは、ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲベクターについては経時的に増加し、マウスα－グロビンの２０～２５％に到達した（図２９Ｄ及び図２９Ｅ）。対照的に、ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲで形質導入した骨髄細胞の二次レシピエントにおけるγ－グロビン／マウスα－グロビンのパーセントは増加しなかった。γ－グロビン発現赤血球細胞のパーセントは、ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲのものの方が有意に高かった（図２９Ｆ）。γ－グロビンの発現レベルを高めることに加えて、長鎖ＬＣＲは、より厳密な赤血球特異的発現も生じさせており、このことは、非赤血球（Ｔｅｒ１１９$^{-}$）画分と比較して赤血球（Ｔｅｒ１１９$^{+}$）画分においてγ－グロビン発現骨髄細胞のパーセントが有意に高いことによって示された（図２７Ｈ）。インビボでのＨＳＰＣの形質導入後１６週目に骨髄ＭＮＣを収集した場合、当該骨髄ＭＮＣにおける細胞当たりのベクターコピー数について、ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲとＨＤａｄ－長鎖ＬＣＲとの間で統計的に有意な差は存在しなかった（図２７Ｉ）。「一次」インビボＨＳＰＣ形質導入マウスと同様に、骨髄細胞組成または末梢血における血液学的パラメーターに対する高レベルグロビン発現の影響は観察されなかった（図３０Ａ～３０Ｄ）。

【０９０８】

ヒトＣＤ３４＋の形質導入、インビトロ選択、及び赤血球分化の後の２つのベクターの比較．

マウス赤血球細胞のような異種系におけるヒトβ－グロビンＬＣＲの機能は、ＬＣＲ内に結合する転写因子の保存の欠如に起因して最適に満たないものである可能性がある。したがって、ヒト細胞におけるインビトロ試験を実施した（図３１Ａ）。ＧＣＳＦによる動員処理を行った健康なドナーから得たヒトＣＤ３４＋細胞を、４０００ｖｐ／細胞の総ＭＯＩ（すなわち、ＣＤ３４＋細胞の大半に形質導入が生じるＭＯＩ（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ ９：３９０－４０１，２０１８））で行うＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲ＋ＨＤＡｄ－ＳＢまたはＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲ＋ＨＤＡｄ－ＳＢでの形質導入に供した。次に、形質導入細胞を赤血球分化（ＥＤ）、及び導入遺伝子が組み込まれた細胞の$O^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵによる選択に供した。１８日間にわたる形質導入細胞の増殖の間に、エピソームベクターの大半が消失する。ＥＤの終了時点で、フローサイトメトリーによって明らかにしたγ－グロビン＋無核細胞（すなわち、核を失った網状赤血球）のパーセントは、ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲ＋ＨＤＡｄ－ＳＢの状況で有意に高かった（図３１Ｂ）。ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲ＋ＨＤＡｄ－ＳＢで形質導入された細胞におけるγ－グロビン鎖レベルが有意に高いことはＨＰＬＣ分析によっても実証された（図３１Ｃ）。

【０９０９】

中間型サラセミアのマウスモデルにおけるインビボでのＨＳＰＣの形質導入（ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲとＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲとの対比）（γ－グロビンレベル）．

こうした試験については、マウスのＨｂｂ－ベータ１遺伝子欠失及びＨｂｂ－ベータ２遺伝子の欠失についてヘテロ接合型のＨｂｂ$^{th3}$マウス（Ｙｏｓｈｉｄａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉ　Ｒｅｐ　７：４３６１３，２０１７）と（ＣＤ４６＋／＋）マウスとを（４回にわたって）交配繁殖させた。得られたＨｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６$^{+/+}$マウスは、典型的な中間型サラセミア表現型を有する（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｉｎｖｅｓｔ，１２９：５９８－６１５．２０１９）。Ｈｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６$^{+/+}$マウスを動員処理に供し、ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲベクター系及びＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲベクター系を静脈内注射し、４週間後にインビボ選択に供した（図３２Ａ及び図３２Ｅ）。重要なことに、ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲを用いたインビボ形質導入では、末梢赤血球のγ－グロビンマーキング率は、インビボ選択の２回目のサイクル後に既に平均４０％であり、３回目のサイクル後には１０匹のマウス中９匹において９０％超に達し、当該インビボ形質導入の１２週目にはすべてのマウスにおいてほぼ１００％近くでプラトーに達した（図３２Ｂ及び図３２Ｆ）。対照的に、ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲを用いて形質導入したマウスについては、７匹のマウス中２匹のＲＢＣのγ－グロビンマーキング率が１００％に到達するのに４回のインビボ選択サイクルが必要であり、１００％のマーキング率が達成されたのは、形質導入後１６週目になってようやくのことであった。マーキング率が１００％の時点では、成体型マウスα－グロビン鎖に対するヒトγ－グロビン鎖のパーセント（ＨＰＬＣによって測定した）は、両方のベクターで経時的に増加し（疾患背景に起因する可能性が高い）、ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲ及びＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲを用いたインビボ形質導入から１６週目までには、それぞれ平均で２２％（最大：３５％）及び１１％（最大：１９％）に達した（図３２Ｇ及び図３２Ｈ、２１週目のデータについては図３２Ｃ及び図３２Ｄ）。ＣＤ４６ｔｇマウスで観察されたものと同様に、骨髄単核細胞の分析から、ＶＣＮは両方のベクターで同等であり、赤血球細胞中のグロビンの発現レベルはＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲの方が高いことが示された（図３３）。まとめると、こうしたデータは、ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲに勝る優位性をＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲが有していることを実証するものであり、この優位性は、ｉ）マーキング率１００％への到達に必要な集中的なインビボ選択が少なくてすむこと、及びｉｉ）ＳＣＤ患者及びサラセミアメジャー患者に理論的には治癒が生じることになるＲＢＣ中γ－グロビンレベルが達成されること、によるものである。

【０９１０】

血液学的パラメーターの修正．

異なる時点での表現型修正が示される。Ｃ５７ＢＬ６マウスならびにＴｏｗｎｅｓ　ＳＣＡマウス（処理前及び長鎖ＬＣＲ処理後１０週目）の赤血球形態の正常化を比較した顕微鏡写真（図３４）、ならびにＴｏｗｎｅｓマウス（処理前）及びＴｏｗｎｅｓマウス（長鎖ＬＣＲ処理後１０週目）の赤血球生成（網状赤血球数）の正常化を示す顕微鏡写真（図３５）が示される。１４週目に染色した血液細胞形態（ギムザ染色及びメイ・グリュンワルド染色）が示される（図３６Ａ）。処理後１６週目にマウスを　　殺した。低色素性であり、高度に断片化しており、かつ形状が変形しているベースラインＲＢＣが、ほぼ正色素性であり、形状が良好なＲＢＣに置き換わったことは、処理したＨｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６$^{+/+}$マウスの末梢血塗抹標本におけるサラセミア表現型が好転したことを示している（図３７Ａの左パネル、２１週目データについては、図３６Ｂを参照のこと）。末梢血中の網状赤血球のレベルは正常ＣＤ４６ｔｇマウスと同等であった（図３７Ａの右パネル、図３９も併せて参照のこと）。図３６Ｂの右パネルでは、２１週目の類似データを見ることができる。骨髄のサイトスピン調製物では、Ｈｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６$^{+/+}$マウスの骨髄での赤血球系譜の成熟が遮断されていること（好塩基性赤芽球が高頻度で見られることによって示される）とは対照的に、対照マウス及び処理したＨｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６$^{+/+}$マウスから得られたサイトスピン調製物では成熟中の多染性赤芽球及び正染性赤芽球が優勢であった（図３７Ｂ、２１週目のデータについて図３６Ｃを参照のこと）。長鎖ＬＣＲベクターで形質導入したマウス、短鎖ＬＣＲベクターで形質導入したマウス、及び対照ＣＤ４６ｔｇマウスの赤血球パラメーターの正常化について示される（図３８）。インビボでの形質導入後１６週目の血液学的パラメーターは、両方のベクターについて、処理前

のパラメーターと比較して有意に改善した（図３８、図３９Ａ）。白血球、赤血球、ＭＣＨＣ、ＭＣＶ、及びＲＤＷ－ＣＶについては、形質導入マウスはＣＤ４６ｔｇ対照と区別不可能であった（図３９Ａ）。しかしながら、ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲと比較してＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲベクターで処理した動物に有利となる有意差が存在した。具体的には、末梢血における網状赤血球のパーセントは、非処理Ｈｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$マウス、ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲ処理Ｈｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$マウス、及びＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲ処理Ｈｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$マウスについて、それぞれ４０．９、２６．８、及び９．２％であった（図３８）。さらに、ヘモグロビンレベル及びヘマトクリットは、ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲ処理群の方が高かった。

【０９１１】

髄外造血及びヘモジデリン沈着の修正．

脾臓サイズ（測定可能な代償性造血特徴）は、どちらのベクターで動物を処理しても正常にまで低減され、ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲとＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲとの間に有意差は存在しなかった（図４０Ａ）。Ｈｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$マウスとは対照的に、ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲでの処理後には脾臓切片及び肝臓切片で髄外赤血球生成を示すフォーカスは観測されず、ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲ処理マウスでは髄外赤血球生成が検出されたが、ごく限られたものにすぎなかった（図４０Ｂ）。非処理Ｈｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$マウスでは、脾臓及び肝臓における著しいヘモジデリン沈着が顕著であった（図４１の２つ目のパネル）。組織をパール染色した後のシグナルは、ＣＤ４６ｔｇ（図４１の１つ目のパネル）及びＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲ処理Ｈｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$マウス（図４１の３つ目のパネル）で同等に低かった一方で、ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲ処理動物とＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲ処理動物との比較（Ｎ＝５）では、脾臓組織１ｃｍ$^{2}$当たりの青色スポット数が、ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲ処理動物の方が２．７（＋／－０．８）倍多かった。

【０９１２】

まとめると、ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲ処理動物における網状赤血球、血液パラメーター、細胞外造血、及びヘモジデリン沈着は、対照ＣＤ４６ｔｇマウスのものと有意に異なることはなく、このことは、表現型が完全に修正されたことを示している。さらに、いくつかの表現型パラメーターにおいてはサラセミアマウスを治癒させる上でＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲよりもＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲの方が優れていることが判明し、この優位性は、長鎖ＬＣＲから発現するγ－グロビンのレベルがより高いことに起因する可能性が高い。

【０９１３】

ヒトＣＤ３４＋の形質導入及び赤血球分化の後の２つのベクターの比較．

マウスでのデータを強固なものにするために、ヒト細胞においてインビトロ試験を実施した（図３１Ａ）。ＧＣＳＦによる動員処理を行った健康なドナーから得たヒトＣＤ３４$^{+}$細胞を、４０００ｖｐ／細胞の総ＭＯＩ（すなわち、ＣＤ３４$^{+}$細胞の大半に形質導入が生じるＭＯＩ（Ｙａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ．９２（２５）：１１６０８－１２，１９９５））で行うＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲ＋ＨＤＡｄ－ＳＢまたはＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲ＋ＨＤＡｄ－ＳＢでの形質導入に供した。次に、形質導入細胞を赤血球分化（ＥＤ）、及び導入遺伝子が組み込まれた細胞のＯ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵによる選択に供した。１８日間にわたる形質導入細胞の増殖の間に、エピソームベクターの大半が消失する。

【０９１４】

Ｈｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６ｔｇマウスにおけるインビボでのＨＳＣ形質導入後２１週目に骨髄を収集した。（図４２Ａ）骨髄ＭＮＣにおける細胞当たりのベクターコピー数を示す。２つの群の間の差は有意なものではないが、試料サイズを大きくして分析すれば有意になる可能性がある。（図４２Ｂ、図４２Ｃ）γ－グロビン発現の赤血球特異性を示す。（図４２Ｂ）γ－グロビン発現赤血球（Ｔｅｒ１１９$^{+}$）細胞及び非赤血球（Ｔｅｒ１１９$^{-}$）細胞のパーセントを示す。＊ｐ＜０．０５。統計解析は、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して実施した。

【０９１５】

ＣＤ４６ｔｇマウス及びＣＤ４６$^{+/+}$／Ｈｂｂ$^{th-3}$マウス（アデノウイルスドナーベクターの投与前）から得られた肝臓切片及び脾臓切片をヘマトキシリン／エオシン染色することによって示した髄外造血を示す（図４３）。鉄沈着は、脾臓中の細胞質ヘモジデリンが青色色素で染まったものとしてパール染色によって示される。

【０９１６】

ＥＤの終了時点で、ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲの状況のものと比較してＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲの状況では、フローサイトメトリーによって明らかになったγ－グロビン$^{+}$脱核細胞（すなわち、核を失った網状赤血球）のパーセントは有意に高く（図３１Ｂ）、ＨＰＬＣによるγ－グロビン鎖レベルも有意に高いものであった（図３１Ｃ）。１８日目に測定したベクターコピー数は、両ベクター共に２であった（図３１Ｄ）。

【０９１７】

まとめると、エクスビボＨＳＰＣ形質導入試験及びマウスでのインビボＨＳＰＣ形質導入試験、ならびにヒトＨＳＰＣでのインビトロ試験は、ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲが異常ヘモグロビン症の遺伝子治療に適したものであることを裏付けるものである。

【０９１８】

考察．

この実施例では、白血球アフェレーシス、骨髄破壊的前処理、及びＨＳＰＣ移植を必要としないインビボＨＳＰＣ遺伝子治療手法の臨床的開発に関する研究について記載されている（Ｒｉｃｈｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．１２８（１８）：２２０６－１７，２０１６）。こうしたものは、異常ヘモグロビン症のエクスビボＨＳＰＣ遺伝子治療を広く適用する上で決定的な障壁であり、高齢の患者や併存疾患を有する患者では特に障壁となる。この手法の安全性及び効率性は、いくつかのマウス疾患モデル（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ．１２９（２）：５９８－６１５，２０１９、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ Ａｄｖ．３（１９）：２８８３－９４，２０１９、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ．９：３９０－４０１，２０１８）及び最近では非ヒト霊長類（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，２３ｒｄ Ａｎｎｕａｌ ＡＳＧＣＴ ｍｅｅｔｉｎｇ．２０２０；ａｂｓｔｒａｃｔ ＃５４６）において実証されている。これら両方の種において、ＨＤＡｄ５／３５＋＋の静脈内注射と関連する主要な問題、すなわち急性自然免疫応答は、炎症促進性サイトカインを遮断する予防レジメンによって対処されている。

【０９１９】

エクスビボＨＳＰＣ遺伝子治療状況においてサラセミアメジャー患者及びＳＣＤ患者においてγ－グロビンまたはβ－グロビンの発現を治癒レベルに到達させることは依然として難題である。これを実現するには、ＨＳＰＣへの形質導入プロセスを最適化するか、または感染多重度を増やすことによって組み込み導入遺伝子コピーの数を増やすことが手法には求められる。しかしながら、ＶＣＮを増やすことには、遺伝毒性が誘発されるリスクが伴う。他の試みでは、グロビン発現カセットをさらに最適化することに焦点が当てられている（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．８０（３）：５４９－６０，２０２０）。ペイロード容量が大きなＨＤＡｄベクターを用いることで、レンチウイルスベクター及びｒＡＡＶベクターにつきまとうゲノムサイズ制限を克服する機会が得られる。この試験は、全長２９ｋｂのβ－グロビンＬＣＲ／プロモーターエレメントを含む組み込みＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを用いるインビボＨＳＰＣ遺伝子治療によってＲＢＣ中でγ－グロビンの治癒レベルが達成され得ることを実証するものである。

【０９２０】

サラセミアマウスでは、ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲでマウス処理すると、ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲで処理した動物と比較してＲＢＣにおけるγ－グロビンマーキング率１００％の達成が早期化し、この達成に要するマウスのＯ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵインビボ選択サイクル数が低下した。このことは、この手法を臨床的橋渡しとして適用する上で重要なことである。Ｏ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵによるインビボ選択系は、γ－グロビン陽性ＲＢＣのパーセントの上昇制御を可能にするものである一方で、一過性の白血球減少、及び胃腸管に対する副作用も

生じさせる（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｉｎｖｅｓｔ．１２９（２）：５９８－６１５，２０１９）。ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲを用いるとインビボ選択の強度が低くて済むことについての考え得る説明は、Ｏ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵへの耐性を付与するｍｇｍｔ$^{Ｐ１４０Ｋ}$遺伝子の発現を促進するＥＦ１αプロモーターがサイレンシングされることを長鎖ＬＣＲが阻止するというものであり得る。この仮説は、骨髄ＭＮＣ中のｍｇｍｔ　ｍＲＮＡレベル（ＶＣＮで正規化したもの）がＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲの方が有意に高く観察されたことによって裏付けられる（図４８）。

【０９２１】

この試験では、ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲを使用するインビボ手法の治療的側面に焦点を当てたが、将来的に扱うべき機構的疑問が多く残されている。こうした未解決の疑問の１つは、遠位及び近位の遺伝子のトランス活性化を長鎖ＬＣＲが阻止するかどうかということである。さらに、ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲによってγ－グロビンの発現レベルが高まること（ｍＲＮＡレベルでも反映される）が転写開始の活性上昇に起因するのか、もしくは組み込まれたベクターコピーのサイレンシングが弱まることに起因するのか、またはこれらの両方に起因するのかは、完全には明らかになっていない。ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲで処理したＨｂｂ$^{ｔｈ３}$／ＣＤ４６マウスでは、マウス成体型グロビン鎖に対するγ－グロビン鎖のパーセントが経時的に上昇すること（この現象は二次レシピエントのＣＤ４６ｔｇモデルでも見られた）が観察され、このことは、サイレンシング（具体的には、長期再増殖細胞でのサイレンシング）が経時的に生じたが、長鎖ＬＣＲによってこのサイレンシングからの保護が生じたことを示している可能性がある。組み込まれたベクターコピー当たりのｍｇｍｔ$^{Ｐ１４０Ｋ}$ｍＲＮＡレベルが高まることも（図４８）、長鎖ＬＣＲによってサイレンシングから保護されるという仮説を裏付ける。こうした疑問を扱うために、形質導入したＣＤ３４$^{＋}$細胞クローンに焦点を当てた試験が将来行われることになり、こうした試験では、ＬＡＭ－ＰＣＲ／ＮＧＳ（組み込み部位）、染色体立体配座捕捉法、及びＲＮＡ－Ｓｅｑを使用するゲノム全域にわたる解析が行われることになる。こうした試験を行うには、ＳＢ１００ｘトランスポゼース介在性の導入遺伝子組み込み及びインビボ選択プロセスが、望ましくないゲノム変化／再編成を引き起こさないことが前提条件となる。このことを評価する試みとして、ＳＢ１００ｘ介在性組み込み及びＯ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵでの選択をインビトロで行った後にｍｇｔｍ／ＧＦＰ導入遺伝子を安定的に発現するヒトＣＤ３４$^{＋}$細胞に対してＲＮＡ－Ｓｅｑを実施した（図４７Ａ）。１７６個の遺伝子のみに多少の発現変化が見られ、ヒストン遺伝子に選択性が見られた（図４７Ｂ）。このことは、ＳＢ１００ｘが重大な遺伝毒性を引き起こさないことを示しており、このことは、組み込み部位分析においてクローン優位性が存在しないこと、及び長期試験において血液学的副作用が存在しないことによっても裏付けられる。

【０９２２】

ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベースのＳＢ１００ｘ系を使用するインビボでのＨＳＰＣの形質導入後／選択から１６～２３週間後の骨髄ＭＮＣにおいて分析した組み込み導入遺伝子のコピー数は、１３．８ｋｂ（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｉｎｖｅｓｔ．１２９（２）：５９８－６１５，２０１９）～３２．４ｋｂの範囲のトランスポゾンについて、細胞当たり２であった。触媒的に生成されるトランスポゾン／トランスポゼース複合体が形成されるには、トランスポゼース分子によってトランスポゾンの両末端が物理的に近接して結び付かなくてはならない（Ｕｃｈｉｄａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｃｏｍｍｕｎ．１０（１）：４４７９，２０１９）。この制限については、ｆｒｔ部位をＨＤＡｄベクターに含めることによって対処されており、これらのｆｒｔ部位は、共発現Ｆｌｐｅリコンビナーゼによって認識されてトランスポゾンの環状化を引き起こす（Ｔｕｒｃｈｉａｎｏ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ．９（１１）：ｅ１１２７１２，２０１４）。ここで報告されるデータは、このプロセスによって、ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターが保有するトランスポゾンのサイズとはほとんど無関係に組み込みが生じ得ることを示唆している。

【０９２３】

この試験は、延長したＴＡＤ／ＬＣＲコアエレメントを使用すると治療用導入遺伝子の発現レベルが上昇することを実証するものである。β－グロビンＬＣＲについては数十年間研究が行われているが、他の遺伝子／クラスターのＴＡＤコアエレメントについては特徴付けが進んでいない。ＴＡＤのサイズ中央値は８８０ｋｂである。ハイスループット染色体立体配座捕捉（３Ｃ）アッセイならびにその後続の４Ｃプロトコール、５Ｃプロトコール、及びＨｉ－Ｃプロトコール、ならびにファイバー－Ｓｅｑアッセイのさらなる進歩に伴って制御性ゲノムの調査が急速に進むことになり、遺伝子治療目的では、この調査によって、決定的なコアエレメントのみを含むＴＡＤが与えられる可能性がある（Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．，ＢＭＣ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ．２０（１）：２１７，２０１９）。

【０９２４】

まとめると、この実施例は、マウスにおけるＨＳＰＣのインビボでの形質導入を行うためのＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターと関連して大型の制御エレメントを用いることで、サラセミアメジャー及び鎌状赤血球貧血が治癒すると考えられる遺伝子発現閾値を満たすγ－グロビンレベルを与えるベクターが得られることを示すものである。

【０９２５】

ヒトβ－グロビン遺伝子クラスターは１１番染色体に存在しており、約１００ｋｂに及んでいる。β－グロビン遺伝子座は、シス制御エレメント及び活性なβ－グロビン遺伝子から構成される赤血球特異的な空間構造を形成することが提唱されており、この空間構造は活性クロマチンハブ（ＡＣＨ）と呼ばれる（Ｔｏｌｈｉｕｓ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ，１０：１４５３－１４６５，２００２）。コアＡＣＨは発生的に保存されており、上流５’ＤＮＡｓｅ高感受性領域１～５（グロビンＬＣＲと呼ばれる）及び下流３’ＨＳ１、ならびに赤血球特異的トランス作用性因子からなる（Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．，２７：４５５１－６５，２００７）。遺伝子治療用途については、ＨＳ１～ＨＳ５を含む２３ｋｂのβ－グロビンＬＣＲ＋３ｋｂの３’ＨＳ１領域がトランスジェニックマウスにおいてシス連結遺伝子を赤血球特異的かつ位置非依存的に高レベルで発現させることは注目すべきことである（Ｇｒｏｓｖｅｌｄ，Ｃｅｌｌ，５１：９７５－９８５，１９８７）。３０＋ｋｂのＨＤＡｄベクターを用いれば、このＬＣＲの制御下に置いた導入遺伝子を送達するためのツールとして利用可能となる。

【０９２６】

多くの遺伝性疾患の修正には、治療用遺伝子を組織限局的に高レベルで発現させることが必要であり、ＬＣＲを用いることによってこの発現を達成できる（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ １００：３０７７－３０８６，２００２）。β－サラセミアメジャー及び鎌状赤血球貧血を治癒させるには、ＨＳＰＣにおける遺伝子マーキング率が約２０％となり、赤血球細胞における治療用グロビン鎖（β－グロビンまたはγ－グロビン）の産生率が２０％となる必要があると考えられている（Ｆｉｔｚｈｕｇｈ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ １３０：１９４６－１９４８，２０１７）。レンチウイルスベクターでは、そのサイズ制限が故に、使用可能なβ－グロビンＬＣＲが切断形態のもののみであり、これによって、修正遺伝子発現レベル要件を満たすことが困難である（Ｕｃｈｉｄａ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｃｏｍｍｕｎ １０：４４７９，２０１９）。レンチウイルス介在性のＨＳＰＣ形質導入の後の発現レベルを上昇させるための方針は、ベクター用量を増やし、これによって組み込み導入遺伝子コピーの数を増やすことである。しかしながら、この手法は遺伝毒性及び腫瘍原性が生じるリスクを増大させるものである。他の試みでは、グロビン発現カセットをさらに最適化することに焦点が当てられている（Ｕｃｈｉｄａ，ｅｔ ａｌ．，（２０１９）Ｎａｔ Ｃｏｍｍｕｎ １０：４４７９）。ＨＤＡｄベクターは、その挿入容量が３０ｋｂであり、後者の概念を実現する上で理想的なツールである。この実施例では、２９ｋｂのγ－グロビン発現カセットを保有するＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを生成させ、インビトロでのＨＳＰＣの形質導入の後、及びＣＤ４６トランスジェニックマウスにおけるインビボでのＨＳＰＣの形質導入の後に検証した。

【０９２７】

ＨＤＡｄベクター系では、γ－グロビンカセットの組み込みはＳＢ１００ｘトランスポ

ゼースによって媒介される。ＳＢ／トランスポゾン系を使用する非ウイルス遺伝子導入は、ＣＤ１９ ＣＡＲ Ｔ細胞療法（Ｋｅｂｒｉａｅｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ １２６：３３６３－３３７６，２０１６）、加齢黄斑変性（Ｈｕｄｅｃｅｋ ｅｔ ａｌ．，Ｃｒｉｔ Ｒｅｖ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ５２：３５５－３８０，２０１７、Ｔｈｕｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ ６：３０２－３１４，２０１７）、及びアルツハイマー病（Ｅｙｊｏｌｆｓｄｏｔｔｉｒ ｅｔ ａｌ．，Ａｌｚｈｅｉｍｅｒｓ Ｒｅｓ Ｔｈｅｒ ８：３０，２０１６）を対象として臨床的に使用されている。ＨＤ－Ａｄ介在性のＳＢ遺伝子導入は、Ｋａｙ及びＥｈｒｈａｒｄｔのグループによって開拓された。この研究者らの研究では、トランスポゾンは比較的小さなもの（４ｋｂ～６ｋｂ）であった（Ｈａｕｓｌ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ １８：１８９６－１９０６，２０１０、Ｙａｎｔ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２０：９９９－１００５，２００２）。この実施例は、１１．８ｋｂのトランスポゾンの効率と同等の効率で、同等のＶＣＮ（細胞当たりのコピー数２～３）に基づいて３２．４ｋｂのトランスポゾンを組み込む能力をＳＢ１００ｘが有することを初めて実証するものである。この発見自体は、ＳＢ介在性組み込みの効率がＳＢトランスポゾンのサイズと逆相関するという知見と矛盾する（Ｋａｒｓｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍａｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ（ＮＹ）３：２４１－２４５，２００１）。当該系は、サイズ制限から解放されているものと思われる。第１に、触媒的に生成されるトランスポゾン／トランスポゼース複合体が形成されるには、トランスポゼース分子によってトランスポゾンの両末端が物理的に近接して結び付かなくてはならない（Ｈｕｄｅｃｅｋ ｅｔ ａｌ．，Ｃｒｉｔ Ｒｅｖ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ５２：３５５－３８０，２０１７）。この制限については、ｆｒｔ部位をＨＤＡｄベクターに含めることによって対処されており、これらのｆｒｔ部位は、共発現Ｆｌｐｅリコンビナーゼによって認識されてトランスポゾンの環状化を引き起こす（Ｙａｎｔ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２０：９９９－１００５，２００２）。大型のコンストラクトの転位を制限する第２の機構は、自己組み込み（すなわち、トランスポゾン内のＴＡジヌクレオチドへの組み込み）と呼ばれる自殺的転位機構である（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，ＰＬｏＳ Ｇｅｎｅｔ １０：ｅ１００４１０３，２０１４）。ＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲとＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲとの間でＶＣＮに差異が見られないことはインビボ選択と関連している可能性があり、このインビボ選択によって、ｍｇｍｔ$^{Ｐ１４０Ｋ}$がある特定のレベルで発現するＨＳＰＣ及び前駆細胞（すなわち、閾値ＶＣＮに到達している細胞）が濃縮される。

【０９２８】

Ｏ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵインビボ選択系は強力なものであるため、末梢血赤血球のほぼ１００％がγ－グロビンを含んでいた。このインビボ選択手法は骨髄の細胞組成には影響を与えないが、白血球を減少させる。それ故に、細胞毒性薬物であるＢＣＮＵを使用しない代替手法に労力が費やされている。注目すべきは、マウスサラセミアモデルでの試験によって裏付けられたように（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ １２９：５９８－６１５，２０１９）、異常ヘモグロビン症患者では医薬的なインビボ選択は不要であり得ることであり、この理由は、遺伝子が修正されたＨＳＰＣが非修正細胞に勝る増殖優位性を獲得することによるものである（Ｐｅｒｕｍｂｅｔｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ １１４：１１７４－１１８５，２００９）。

【０９２９】

一次動物及び二次レシピエントにおいてＨＤＡｄ－短鎖ＬＣＲでのＶＣＮとＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲでのＶＣＮとが同等であることを考慮すると、ＲＢＣ及び骨髄赤血球前駆細胞におけるγ－グロビンレベル（ＨＰＬＣ及びｑＲＴ－ＰＣＲによって測定したもの）は、長鎖ＬＣＲを含むベクターのものの方が有意に高かった。興味深いことに、２つのベクターの間のこの差は、二次レシピエントにおいてより顕著であった。このことは、形質導入された長期再増殖ＨＳＰＣを起源とするＲＢＣにおけるγ－グロビンレベルがより高いことを暗示している。さらに、ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲは、より強い赤血球特異性を示した。

こうした効果は、ＨＤＡｄ－長鎖ＬＣＲ中にはＬＣＲエレメントが追加されていること（これによって、ＬＣＲのクロマチン開放能力に起因して転写因子への到達性が向上する（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ　１００：３０７７－３０８６，２００２））及び／または転写因子が追加で結合すること（これによってγ－グロビン遺伝子の転写が増加する）に起因するものであり得る。このＬＣＲの別の特徴は特筆すべきものであり、すなわち、このＬＣＲは、自己制御単位として働く能力を有しており、このことは、無作為組み込み後に付近に存在する遺伝子のトランス活性化が低減されることを暗示している。このことと関連して、より完全なＬＣＲバージョンを使用することで、この手法の潜在的な遺伝毒性が低減される。

【０９３０】

実施例３．内在性胎児型グロビンのＣＲＩＳＰＲ誘発性再活性化とＳＢ１００×トランスポゼース介在性のγ－グロビン遺伝子付加とを併用するインビボＨＳＣ遺伝子治療はマウスモデルの鎌状赤血球症を治癒させる．

【０９３１】

遺伝性高胎児グロビン血症患者、及びより最近では遺伝子治療患者では、鎌状赤血球症（ＳＣＤ）の表現型修正度は、胎児型γ－グロビンの発現レベルと相関する。ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを用いるインビボでの造血幹細胞／前駆細胞（ＨＳＰＣ）の形質導入後にＳＢ１００×トランスポゼース介在性にγ－グロビン遺伝子が付加されることで、成体型マウスグロビンに対するγ－グロビンの％が１０～１５％に達し、それによって、中間型サラセミアマウスモデルの表現型が不完全ではあるもののかなり修正されることが最近報告された。γ－グロビンプロモーター中のγ－グロビンリプレッサー結合部位をＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９によってゲノム編集することで、内在性γ－グロビンが効率的に再活性化されることも示されている。この実施例は、これら２つの機構を併用することで、インビボでのＨＳＰＣの形質導入後にγ－グロビンを治癒レベルに到達させるものである。

【０９３２】

両方のモジュールを含むＨＤＡｄ５／３５＋＋アデノウイルスベクター（ＨＤＡｄ－統合）を生成させ、インビトロでの検証、ならびに「健康な」ＣＤ４６／β－ＹＡＣマウスならびにＳＣＤマウスモデル（ＣＤ４６／Ｔｏｗｎｅｓ）（マウスのα－グロビン遺伝子及びβ－グロビン遺伝子がヒトα－グロビン遺伝子及びヒト鎌状β$^{S}$／胎児型γ－グロビン遺伝子で置き換えられている）でのインビボでのＨＳＰＣの形質導入の後の検証に供した。このＨＤＡｄ－統合には、標的部位の切断が完了した後に自己活性化するＣａｓ９発現低減機構を含めた。これによって、インビボでの切断頻度が有意に上昇するという結果が得られ、この上昇は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９によって編集されたＨＳＰＣの生存率が向上したことに起因する可能性が最も高い。重要なことに、γ－グロビン付加単位またはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９再活性化単位のいずれかを単独で含むＨＤＡｄベクターと比較して、ＨＤＡｄ－統合を用いて形質導入した後のＲＢＣで見られたγ－グロビン量は有意に多いものであった。統合ベクターを用いてＣＤ４６／ＴｏｗｎｅｓマウスのＨＳＣへの形質導入をインビボで行ってから１３週目には、赤血球中のγ－グロビンレベルは、成体型ヒトα鎖及びβ$^{S}$鎖のものの３０％に達した。これによって、ＳＣＤの表現型が完全に修正された。

【０９３３】

序論：

【０９３４】

ＳＣＤ遺伝子治療：

鎌状赤血球症及びβ－サラセミアは、世界的に最も一般的な単一遺伝子病であり、その罹患新生児は毎年３１７，０００人に上る。ＳＣＤは、ｂ－グロビン遺伝子の第１のエクソン上に変異が１つ存在する（β$^{S}$アレル）ことによって引き起こされるものであり、結果的に、欠陥のあるヘモグロビン四量体の形成を招く。このヘモグロビン四量体は、酸素濃度が低くなると重合して赤血球を破壊する。ＳＣＤは、実質的な病的状態、生活の質の低下、及び平均余命の短期化と関連している。ＳＣＤの臨床経過は、ＨＰＦＨ形質を有す

る患者で見られるように胎児型γ－グロビン遺伝子が高度に発現する場合は改善される（Ｃｏｎｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ ２１：２６１－２８１，１９６３、Ｓｔａｍａｔｏｙａｎｎｏｐｏｕｌｏｓ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ ４６：６８３－６９２，１９７５）。ＳＣＤでは、γ－グロビンは、Ｈｂ四量体への組み込みについて鎌状β－グロビンと競合し、鎌状ヘモグロビン（ＨｂＳ）の重合を阻害することによって強力な抗鎌状化機能を発揮する。ＨｂＦレベルを上昇させる薬理学的治療は、すべての患者に等しく有効なわけではない。β－異常ヘモグロビン症の遺伝子治療の開発は、適合ドナーの利用可能性が限られており、最若年患者へのＨＳＰＣ移植の適用が限られていることによって正当化されている。現在のＳＣＤ遺伝子治療手法は、ＨＳＰＣを修正し、それをインビトロで培養し、インタクトなβ－グロビン発現カセット、抗鎌状化β－グロビン発現カセット、または胎児型γ－グロビン発現カセットのいずれかを保有するレンチウイルスベクターでの形質導入に供し、移植前骨髄処理患者へと再移植するというものである。γ－グロビン遺伝子付加レンチウイルスベクターを用いる第Ｉ相遺伝子治療治験は有望なものであるが、すべてのＳＣＤ症状の長期的な治癒は、これまでのところは達成されていない（Ｄｅｍｉｒｃｉ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ Ｍｏｌ Ｇｅｎｅｔ．，２０２０．ｄｏｉ：１０．１０９３／ｈｍｇ／ｄｄａａ０８８）。この疾患を治癒させるには、ＲＢＣ中のγ－グロビンレベルが成体型α－グロビンの少なくとも２０％でなくてはならず、最適には、β$^{S}$レベルが低減されるべきである。これをレンチウイルスベクターで達成することは困難であり、この理由は、その挿入サイズ制限によって全長グロビンＬＣＲまたは多様式ゲノム編集カセットを使用することが阻まれることによるものである（Ｕｃｈｉｄａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｃｏｍｍｕｎ １０：４４７９，２０１９）。

【０９３５】

インビボＨＳＰＣ遺伝子治療－γ－グロビン遺伝子付加：

エクスビボＨＳＰＣ遺伝子治療の主なリスクは、移植と関連する病的状態である（Ａｎｕｒａｔｈａｐａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｌ Ｂｌｏｏｄ Ｍａｒｒｏｗ Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ ２０：２０６６－２０７１，２０１４、Ｌｕｃａｒｅｌｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ Ｒｅｖ １６：８１－８５，２００２、Ｓｔｏｒｂ ｅｔ ａｌ．，Ｈｅｍａｔｏｌｏｇｙ Ａｍ Ｓｏｃ Ｈｅｍａｔｏｌ Ｅｄｕｃ Ｐｒｏｇｒａｍ：３７２－３９７，２００３）。さらに、レンチウイルスベクターを使用することには、導入遺伝子発現がサイレンシングされるか、または染色体がん原遺伝子が活性化されるリスクが伴う。重要なことは、この手法は複雑かつ高価であり、それ故に、ＳＣＤが蔓延する、資源が限られた国々での実施が困難なものであるということである。インビボＨＳＰＣ遺伝子治療手法は簡単なものが開発されている。このインビボＨＳＰＣ遺伝子治療手法は、ＧＣＳＦ／ＡＭＤ３１００の皮下注射を行ってＨＳＰＣを骨髄から末梢血流に動員し、組み込みヘルパー依存型アデノウイルスベクター系（ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクター）の静脈内注射を行うものである。こうしたベクターは、３０＋ｋｂの挿入容量を有し、ＣＤ４６（未分化ＨＳＰＣ上に発現する受容体）を標的とする（Ｒｉｃｈｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ １２８：２２０６－２２１７，２０１６）。ＨＤＡｄ５／３５＋＋の静脈内注射と関連する自然毒性は、マウス及び非ヒト霊長類では糖質コルチコイド、ＩＬ６受容体アンタゴニスト、及びＩＬ１β受容体アンタゴニストでの前処理を行うことによって制御できる（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，２３ｒｄ Ａｎｎｕａｌ ＡＳＧＣＴ ｍｅｅｔｉｎｇ．２０２０；ａｂｓｔｒａｃｔ ＃５４６）。無作為な導入遺伝子組み込みは、活性増強型Ｓｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙトランスポゼース（ＳＢ１００ｘ）によって媒介される（Ｂｏｅｈｍｅ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ ５：ｅ３３７，２０１６）。この系では、導入遺伝子カセットは逆方向反復配列（ＩＲ）（ＳＢ１００ｘトランスポゼースによって認識される）及びｆｒｔ部位（ＦｌｐリコンビナーゼのＦｌｐリコンビナーゼの存在下で導入遺伝子カセットを環状化することを可能にする）と隣接する。第２のベクターであるＨＤＡｄ－ＳＢは、ＦｌｐリコンビナーゼＦｌｐリコンビナーゼ及びＳＢ１００ｘをトランスで供給して、ゲノムＤＮＡのＴＡジヌクレオチドへのＧＦＰカセットの組み込みを媒介する（Ｍａｔｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｇｅｎｅｔ ４１：７５３－７６１，２００９）。

ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを用いた以前の試験では、４．３ｋｂのＨＳ１～ＨＳ４含有小型ＬＣＲ（β－グロビン遺伝子座制御領域）を０．６６ｋｂのβ－グロビンプロモーターと併用することで、インビボでのＨＳＰＣの形質導入の後にヒトγ－グロビンの発現が促進された（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ １２９：５９８－６１５，２０１９、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ ９：１４２－１５２，２０１８）。Ｈｂｂ$^{th3}$／ＣＤ４６$^{+/+}$サラセミアマウスでは、末梢血赤血球のほぼ１００％においてγ－グロビンマーキングが安定して（８＋ヶ月）達成され、表現型がほぼ完全に修正された（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ １２９：５９８－６１５，２０１９）。しかしながら、γ－グロビンの発現レベルは、成体型マウスα－グロビンの発現レベルの１０～１５％にすぎず（細胞当たりの平均組み込みベクターコピー数（ＶＣＮ）は２であった）、これによって、この手法を臨床的橋渡しとしてＳＣＤに適用することが特に課題となった

【０９３６】

インビボＨＳＰＣ遺伝子治療－内在性γ－グロビンの再活性化：

遺伝性高胎児ヘモグロビン血症（ＨＰＦＨ）（良性の遺伝子疾患）では、変異によってγグロビンからβグロビンへのスイッチが弱まり、生涯を通じて胎児型グロビン（ＨｂＦ）のレベルが高いことで、こうした障害の臨床症状が緩和される（Ｆｏｒｇｅｔ，Ａｎｎ Ｎ Ｙ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ８５０：３８－４４，１９９８）。β－グロビン遺伝子座内に大きな欠失を創出するか（Ｓａｎｋａｒａｎ，Ｈｅｍａｔｏｌｏｇｙ Ａｍ Ｓｏｃ Ｈｅｍａｔｏｌ Ｅｄｕｃ Ｐｒｏｇｒａｍ ２０１１：４５９－４６５，２０１１）またはＨＢＧプロモーター中に変異を導入することによってＨＰＦＨ変異を再規定しようとする初期の研究は、赤血球細胞中のＨｂＦのレベルを上昇させることが可能なものである（Ｗｉｅｎｅｒｔ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｃｏｍｍｕｎ ６：７０８５，２０１５、Ｔｒａｘｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｍｅｄ ２２：９８７－９９０，２０１６、Ｌｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ １３０：２８４，２０１７）。ＢＣＬ１１Ａが胎児型グロビンリプレッサーとして発見されたことに伴って、こうした試みは、その焦点が絞られ、ＨＢＧプロモーター中のＢＣＬ１１Ａ結合部位を標的として破壊するか（Ｍａｓｕｄａ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ３５１：２８５－２８９，２０１６）、または赤血球ｂｃｌ１１ａエンハンサーを破壊してＢＣＬ１１Ａ発現を低減するもの（Ｗｕ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｍｅｄ ２５：７７６－７８３，２０１９）となった（こうした破壊は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９または最近では塩基エディター（Ｚｅｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｍｅｄ ２６：５３５－５４１，２０２０）によって行われる）。ＨＢＧ１／ＨＢＧ２プロモーターを標的とするＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を用いることで、ヒトβ－グロビン遺伝子座トランスジェニック（β－ＹＡＣ）マウスにおいてγ－グロビンが再活性化された（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ １３１：２９１５－２９２８，２０１８）。インビボでのＨＳＰＣの形質導入後に標的部位が効率的に破壊されたことで、成体マウスの赤血球においてヒトβ－グロビンからγ－グロビンへの発現のスイッチが明らかに生じ、このスイッチは、ＨＳＰＣの二次移植が行われた後も維持された。長期的な経過観察試験において血液学的な異常は検出されず、このことは、ＨＢＧプロモーターの編集が造血に負の影響を与えないことを示している。

【０９３７】

ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターからＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９が発現すると、幹細胞機能、及び形質導入ＨＳＰＣ（具体的には、ヒトＨＳＰＣ）の生存が損なわれ得ることが以前に報告された（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ ９：３９０－４０１，２０１８）。それ故に、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９発現を短期化するための手法が開発された（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ ９：３９０－４０１，２０１８、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ ２７：２１９５－２２１２，２０１９）。

【０９３８】

ここでの目的は、ＳＢ１００ｘ介在性のγ－グロビン遺伝子付加とγ－グロビンの再活

性化とを組み合わせることによって、β－ＹＡＣマウス、ならびにＴｉｍ　Ｔｏｗｎｅｓ（ｈα／ｈα：：β$^{S}$／β$^{S}$）が発症する鎌状赤血球症のマウスモデルにおいてインビボでのＨＳＰＣの形質導入後にγ－グロビンの治癒レベルを達成することとした（Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ　１０８：１１８３－１１８８，２００６）。このモデルでは、マウスα－グロビン遺伝子がヒトα－グロビンで置き換えられ、マウス成体型β－グロビン遺伝子が、ヒト鎌状β$^{S}$－グロビン遺伝子及び胎児型γ－グロビン遺伝子が一緒に連結されたもので置き換えられている。このモデルは、鎌状赤血球症の重要な表現型特徴を示す。

【０９３９】

材料及び方法

【０９４０】

試薬：

Ｇ－ＣＳＦ（Ｎｅｕｐｏｇｅｎ（商標））（Ａｍｇｅｎ　Ｔｈｏｕｓａｎｄ　Ｏａｋｓ，ＣＡ）及びＡＭＤ３１００（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）を使用した。Ｏ$^{6}$－ＢＧ及びＢＣＮＵは、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（Ｓｔ，Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）から入手した。

【０９４１】

ＨＤＡｄベクター：

ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ（「切断」）、ＨＤＡｄ－ＳＢ－付加（「付加」）、及びＨＤＡｄ－ＳＢについては以前に記載されている（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ　１３１（２６）：２９１５－２９２８，２０１８、Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｉｎｖｅｓｔ　１２９：５９８－６１５，２０１９）。ｐＨＣＡ－統合のクローニングは３ステップで行った。ステップ１）ＨＢＧ１／２プロモーター領域中のＢＣＬ１１Ａ結合部位を標的とするｓｇＨＢＧ＃２（配列番号２５８）を合成し、アニーリングさせ、ｐＳＰｇＲＮＡ（Ａｄｄｇｅｎｅ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ）のＢｂｓＩ部位に挿入してｐＳＰ－ｓｇＨＢＧ＃２を得た。ｐＳＰ－ｓｇＨＢＧ＃２中の０．４ｋｂのＵ６－ｓｇＨＢＧ＃２断片を増幅し、ｐＢＳＴ－ｓｇＡＡＶＳ１－ｍｉＲ（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ　２７：２１９５－２２１２，２０１９）のＢａｍＨＩ部位にクローニングしてｐＢＳＴ－ｓｇＨＢＧ＃２－ｍｉＲを得た。ステップ２）１．５ｋｂのＰＧＫ－ｍｇｍｔ－ｂＧＨポリＡ断片をｇＢｌｏｃｋ（ＩＤＴ，Ｎｅｗａｒｋ，ＮＪ）として合成し、ＣｌａＩで消化したｐＢＳ－ＬＣＲ－グロビン－ｍｇｍｔ（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ　２７：２１９５－２２１２，２０１９）とライゲーションしてｐＢＳ－ＬＣＲ－グロビン－ＰＧＫ－ｍｇｍｔを得た。次に、ｐＢＳ－Ｆｒｔ－ＩＲ領域を含む４．８ｋｂの配列をｐＢＳ－ＦＲＴ－ＩＲ－Ｅｆ１α－ｍｇｍｔ（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ　８０：５４９－５６０，２０２０）から増幅し、ＥｃｏＲＶ－ＫｐｎＩで消化したｐＢＳ－ＬＣＲ－グロビン－ＰＧＫ－ｍｇｍｔとライゲーションしてｐＢＳ－Ｆｒｔ－ＩＲ－ＬＣＲ－グロビン－ＰＧＫ－ｍｇｍｔを得た。このステップでは、後のｉｎｆｕｓｉｏｎクローニング（Ｔａｋａｒａ，Ｍｏｕｎｔａｉｎ　Ｖｉｅｗ，ＣＡ）のための１５ｂｐのホモロジーアーム（ＨＡ）を含むプライマーを使用した。２つのＦｒｔ－ＩＲ要素と隣接する２つの１５ｂｐ　ＨＡをＰａｃＩで消化して露出させて、以下に記載の改変ｐＨＣＡコンストラクトとの再統合が促進され得るようにした。ステップ３）ｐＨＣＡＳ１Ｓ－ＭＣＳ（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ　２７：２１９５－２２１２，２０１９）の５．３ｋｂのＸｂａＩ断片をＸｂａＩでの制限酵素消化によって欠失させ、再ライゲーションを行うことでｐＨＣＡＳ１Ｓ１－ＭＣＳを得た。Ｕ６プロモーターから始まってＳＶ４０ポリＡシグナル配列で終わる７．６ｋｂのＣＲＩＳＰＲカセットをｐＢＳＴ－ｓｇＨＢＧ＃２－ｍｉＲから増幅し、ｐＨＣＡＳ１Ｓ１－ＭＣＳのＮｈｅＩ部位にクローニングしてｐＨＣＡＳ１Ｓ１－ＭＣＳ－ｓｇＨＢＧ＃２を形成させた。最後に、ｐＢＳ－Ｆｒｔ－ＩＲ－ＬＣＲ－グロビン－ＰＧＫ－ｍｇｍｔ中の１２．０ｋｂのＨＡ隣接グロビン／ｍｇｍｔカセットをＰａｃＩ処理によって遊離させ、ＰａｃＩで消化したｐＨＣＡＳ１Ｓ１－ＭＣＳ－ｓｇＨＢＧ＃２と再統合させてｐＨＣＡ－統合を得た。この最終

コンストラクトを、いくつかの制限酵素（ＨｉｎｄＩＩＩ、ＥｃｏＲＩ、及びＰｍｅＩ）によってスクリーニングし、導入遺伝子を含む全領域をシークエンシングすることによって確認した。

【０９４２】

ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターの産生については、対応するプラスミドをＰｍｅＩで直鎖化し、ＡｄＮＧ１６３－５／３５＋＋を含む１１６細胞（Ｐａｌｍｅｒ　＆　Ｎｇ，Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ　８：８４６－８５２，２００３）においてレスキューした。ＡｄＮＧ１６３－５／３５＋＋は、Ａｄ５ファイバーテール、Ａｄ３５ファイバーシャフト、及び親和性増強型Ａｄ３５＋＋ファイバーノブから構成されるキメラファイバーを含むＡｄ５／３５＋＋ヘルパーベクターである（Ｒｉｃｈｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ　１２８：２２０６－２２１７，２０１６）。他に詳細に記載されるように（Ｐａｌｍｅｒ　＆　Ｎｇ，Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ　８：８４６－８５２，２００３）１１６細胞においてＨＤ－Ａｄ５／３５＋＋ベクターを増幅した。ヘルパーウイルスの混入レベルは０．０５％未満であることが明らかとなった。力価は２～５×$10^{12}$ｖｐ／ｍｌであった。

【０９４３】

この実施例のベクターは図１０１に示されており、これらのベクターには、ＨＤＡｄ統合アデノウイルスベクターが含まれ、このＨＤＡｄ統合アデノウイルスベクターは、（ｉ）γ－グロビン導入遺伝子をコードする核酸（「付加」）（トランスポゾン中に存在する）と、（ｉｉ）内在性γ－グロビンの発現を増加させるためのＨＢＧ１／２標的指向性ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９系をコードする核酸（「ＣＲＩＳＰＲ」）（トランスポゾン中には存在しない）と、の両方を含む（これら２つが一緒になって「統合」を形成する）。二重ベクターに関するさらなる開示については、図９６、図１０２、図９７Ａ～９７Ｄ、図９８Ａ～９８Ｎ、図９９Ａ～９９Ｕも併せて参照のこと。

【０９４４】

具体的には、図９６は、ＨＤＡｄ－ＴＩ－統合ベクターの模式図を示し、このＨＤＡｄ－ＴＩ－統合ベクターでは、ＣＲＩＳＰＲ系は、２つの異なる部位（ＨＢＧプロモーター及び赤血球ｂｃｌ１１ａエンハンサー）を標的とし、これによってガンマ再活性化が増加する。図１０２は、ＨＤＡｄ－統合において、Ｆｌｐｅリコンビナーゼがｆｒｔ部位と相互作用するとトランスポゾンが環状化し、ＣＲＩＳＰＲカセットを含むベクターの直鎖断片が残ることがどのように生じるかを示す。こうしたベクター部分は環状化トランスポゾンがＳＢ１００ｘによって宿主ゲノムに組み込まれる間に急速に消失することが、ＳＢ１００ｘ／Ｆｌｐｅ系を用いた以前の研究によって実証された（Ｙａｎｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，２０：９９９－１００５，２００２）。図９７Ａは、ＨＤＡｄ－ＳＢ及びＨＤＡｄ－統合を同時感染させると、Ｆｌｐｅが発現し、ＩＲと隣接するトランスポゾンを遊離させ、その後にこの遊離トランスポゾンがＳＢ１００ｘトランスポゼースによってゲノムに組み込まれることがどのように生じるかを示す。同時に、ＨＢＧ１　ＣＲＩＳＰＲ及びｂｃｌ１１ａ－Ｅ　ＣＲＩＳＰＲが発現し、ＤＮＡインデルを生じさせ、これらのＤＮＡインデルによってγ－グロビンが再活性化されることになる。トランスポゾンがＦｌｐ介在性に遊離すると、ＣＲＩＳＰＲカセットは分解されることになり、それによって毒性が回避される。ＣＲＩＳＰＲ系は、２つの異なる部位（ＨＢＧプロモーター及び赤血球ｂｃｌ１１ａエンハンサー）を標的とし、これによってγ再活性化が増加する。標的指向化方針（図９７Ｂ）、赤血球特異的ＢＣＬ１１Ａエンハンサー（図９７Ｃ）、及びＨＢＧプロモーターにおけるＢＣＬ１１Ａ結合部位（図９７Ｄ）も示される。

【０９４５】

図９８Ａ～９８Ｎでは、二重ＣＲＩＳＰＲベクター及びγ－グロビン再活性化について示される。ＨＤＡｄ－Ｂｃｌ１１ａｅ－ＣＲＩＳＰＲ、ＨＤａｄ－ＨＢＧ－ＣＲＩＳＰＲ、ＨＤＡｄ－二重－ＣＲＩＳＰＲ、ＨＤＡｄ－スクランブル型（図９８Ａ）、及び二重ｇＲＮＡベクターとしてのＨＤ－Ａｄ５／３５＋＋ＣＲＩＳＰＲベクター（図９８Ｂ）のベクター設計が示される。図９８Ｃでは、ＨＤ－Ａｄ５／３５＋＋ＣＲＩＳＰＲでのヒト赤

血球前駆細胞株（ＨＵＤＥＰ－２）の形質導入がＨＵＤＥＰ－２の分化前後の画像と共に示される。ＨＤ－ＡＤ５／３５＋＋「二重」ｇＲＮＡベクターは、非処理（ＵＮＴＲ）、ＢＣＬ１１Ａベクター、またはＨＢＧベクターと比較して細胞生存率（図９８Ｄ）にも増殖（図９８Ｅ）にも負の影響を与えない。二重ベクターは、標的遺伝子座（（図９８Ｆ）Ｂｃｌ１１ａエンハンサー及び（図９８Ｇ）ＨＢＧプロモーター）に対する一重ｇＲＮＡベクターで観察された編集レベルと同様の編集レベルを達成する。さらに、ＨＤ－ＡＤ５／３５＋＋「二重」ｇＲＮＡベクターは、一重ｇＲＮＡベクターで観察された編集レベルと同様の標的遺伝子座編集レベルを達成する（図９８Ｈ）。ＨＤ－Ａｄ５／３５「二重」ｇＲＮＡベクターで形質導入したＨＵＤＥＰ－２細胞では、一重ｇＲＮＡベクターと比較して、フローサイトメトリーによって観察されたＨｂＦ＋細胞のパーセントは有意に高かった（図９８Ｉ）。二重標的化が行われた試料では、全ガンマグロビン発現量（ＨＰＬＣによって測定したもの）が有意に高かった（図９８Ｊ）。シングルノックアウトクローンと比較してダブルノックアウトクローンで観察された胎児型グロビンの発現量は有意に高く、このことは、２つの変異が相乗効果を有する可能性があり、これによってガンマ発現／細胞が高まることを暗示している（図９８Ｋ）。図９８Ｌは、末梢血に動員されたＣＤ３４＋細胞がＨＤＡｄ５／３５＋＋ＣＲＩＳＰＲベクターで形質導入されたことを示す。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９による細胞毒性を最小化するために、抗Ｃａｓ９ペプチドを発現するＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターによる細胞の形質導入を続けて行った。亜致死性照射ＮＳＧマウスに細胞を移植し、分析した。移植後１０週目の時点で、ＨＤ－Ａｄ５／３５「二重」ｇＲＮＡベクターで形質導入した細胞は、一重ｇＲＮＡベクターで形質導入した細胞と同様の生着を示した。すべての群において系譜組成は同様であった（図９８Ｍ）。二重ｇＲＮＡベクターによって形質導入及び編集したＣＤ３４＋細胞はＮＳＧマウスにおいて効率的に生着した（図９８Ｎ）。さらに、生着した二重標的化細胞は、相対的に編集レベルが低かったにもかかわらず、赤血球分化後に、一重標的化細胞と比較して高い対照対比レベルでガンマグロビンを発現した（図９８Ｎ）。

【０９４６】

図９９Ａでは、正常ＣＤ３４＋細胞及びサラセミアＣＤ３４＋細胞を二重編集してエクスビボで形質導入するための実験設計が示される。正常ＣＤ３４＋細胞の１５日目のコロニーにおけるＨＢＦ発現（図９９Ｂ）、ＭＦＩ（図９９Ｃ）、及びＨＢＦ発現を示すフローサイトメトリーデータ（図９９Ｄ）が示される。正常ＣＤ３４＋細胞の赤血球分化（ＥＤ）後のＨＢＦ発現（図９９Ｅ）及びＭＦＩ（図９９Ｆ）が示される。正常ＣＤ３４＋細胞への形質導入（ｔｘｄ）から４８時間後のＨＢＧ部位に対するＴＥ７１（図９９Ｇ）及びＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１（図９９Ｈ）が示される。図９９Ｉでは、ＥＣにおけるＨＢＦ発現、及び赤血球分化を説明するフローサイトメトリーデータを見ることができる。図９９Ｊ～９９Ｕは、サラセミアＣＤ３４＋細胞における結果を示す。０日目の細胞、非形質導入細胞、及びＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞の免疫表現型（図９９Ｊ）、ならびに非形質導入細胞とＣＲＩＳＰＲ－二重で形質導入した細胞とを１１日間にわたって比較した増殖曲線（図９９Ｋ）。１５日目のコロニーにおけるＨＢＦ発現（図９９Ｌ）及びＭＦＩ（図９９Ｍ）が示される。ＥＣにおけるＨＢＦ発現（図９９Ｐ）、ＭＦＩ（図９９Ｑ）、ならびにＰ０４及びＰ１８でのＨＢＦ発現を説明するフローサイトメトリーデータ（図９９Ｒ）も示される。赤血球分化のｐ０４（図９９Ｓ）及びｐ１８（図９９Ｔ）でのＨＢＧ部位に対するＴＥ７１が示され、図９９Ｕは、形質導入後４８時間のＢＣＬ１１Ａ部位に対するＴＥ７１を示す。

【０９４７】

ＨＵＤＥＰ－２細胞／赤血球分化：

１００ｎｇ／ｍｌのＳＣＦ、３ＩＵ／ｍｌのＥＰＯ、$10^{-6}$Ｍのデキサメタゾン、及び１μｇ／ｍｌのドキシサイクリン（ＤＯＸ）が添加されたＳｔｅｍＳｐａｎ　ＳＦＥＭ培地（ＳＴＥＭＣＥＬＬ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）中でＨＵＤＥＰ－２細胞（Ｋｕｒｉｔａ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ　８：ｅ５９８９０，２０１３）を培養した。５％のヒトＡＢ血清、１００ｎｇ／ｍｌのＳＣＦ、３ＩＵ／ｍｌのＥＰＯ、１０μｇ／ｍ

ｌのインスリン、３３０μｇ／ｍｌのトランスフェリン、２Ｕ／ｍｌのヘパリン、及び１μｇ／ｍｌのＤＯＸを含むＩＭＤＭ中で赤血球分化を６日間誘導した。

【０９４８】

コロニー形成単位（ＣＦＵ）アッセイ：

製造者の説明に従ってマウスｌｉｎｅａｇｅ ｃｅｌｌ ｄｅｐｌｅｔｉｏｎキット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）を使用して骨髄ＭＮＣ中の系譜決定細胞を除去することによって系譜マイナス（Ｌｉｎ$^{-}$）細胞を単離した。マウス完全培地を含むＣｏｌｏｎｙＧＥＬ（Ｒｅａｃｈｂｉｏ，Ｓｅａｔｔｌｅ，ＷＡ）を製造者のプロトコールに従って使用してＣＦＵアッセイを実施した。播種から１０日後にコロニー数を数えた。

【０９４９】

Ｔ７ＥＩミスマッチヌクレアーゼアッセイ：

提供プロトコールに従ってＰｕｒｅＬｉｎｋ Ｇｅｎｏｍｉｃ ＤＮＡ Ｍｉｎｉ Ｋｉｔ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を使用してゲノムＤＮＡを単離した（Ｍｉｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２５：７７８－７８５，２００７）。ＨＢＧ１／２プロモーターの標的部位を含むゲノムセグメントをＰＣＲプライマー（ＨＢＧ１／２フォワード（配列番号２７０）、リバース（配列番号２７１））によって増幅した。ＰＣＲ産物をハイブリダイゼーションさせ、２．５ユニットのＴ７ＥＩ（ＮＥＢ）を用いて３７℃で２０分間処理した。消化したＰＣＲ産物を１０％ ＴＢＥ ＰＡＧＥ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）によって分離し、エチジウムブロマイドで染色した。１００ｂｐのＤＮＡラダー（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用した。ＩｍａｇｅＪソフトウェアを使用してバンド強度を解析した。切断％＝（１－ｓｑｒｔ（親バンド／（親バンド＋切断バンド））×１００％。

【０９５０】

フローサイトメトリー：

１％のＦＣＳが添加されたＰＢＳ中に１×１０$^{6}$個細胞／１００μＬで細胞を再浮遊させ、ＦｃＲ遮断試薬（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ａｕｂｕｒｎ ＣＡ）と共に氷上で１０分間インキュベートした。次に、１０$^{6}$個細胞当たり１００μＬの染色抗体溶液を添加し、暗所、氷上で３０分間インキュベートした。インキュベート後、細胞をＦＡＣＳ緩衝液（ＰＢＳ、１％ＦＢＳ）中で１回洗浄した。二次染色については、二次染色溶液を用いて染色ステップを再度実施した。洗浄後、ＦＡＣＳ緩衝液中に細胞を再浮遊させ、ＬＳＲＩＩフローサイトメーター（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓａｎ Ｊｏｓｅ，ＣＡ）を使用して分析した。前方散乱領域及び側方散乱領域のゲートを使用して残骸を除外した。次に、前方散乱高及び前方散乱幅のゲートを使用して単一細胞をゲートした。次に、ＦｌｏｗＪｏ（バージョン１０．０．８、ＦｌｏｗＪｏ，ＬＬＣ）を使用してフローサイトメトリーデータを解析した。ＬＳＫ細胞のフロー分析については、ビオチン結合型系譜検出カクテル（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）（カタログ番号：１３０－０９２－６１３）ならびにｃ－Ｋｉｔに対する抗体（カタログ番号：１２－１１７１－８３）及びＳｃａ－１に対する抗体（カタログ番号：２５－５９８１－８２）、ならびにＡＰＣ結合型ストレプトアビジンを用いて細胞を染色した。ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）から入手した他の抗体には、抗マウスＬＹ－６Ａ／Ｅ（Ｓｃａ－１）－ＰＥ－シアニン７（クローンＤ７）、抗マウスＣＤ１１７（ｃ－Ｋｉｔ）－ＰＥ（クローン２Ｂ８）、抗マウスＣＤ３－ＡＰＣ（クローン１７Ａ２）（カタログ番号：１７－００３２－８２）、抗マウスＣＤ１９－ＰＥ－シアニン７（クローンｅＢｉｏ１Ｄ３）（カタログ番号：２５－０１９３－８２）、及び抗マウスＬｙ－６６（Ｇｒ－１）－ＰＥ（クローンＲＢ６－８Ｃ５）（カタログ番号：１２－５９３１－８２）が含まれる。抗マウスＴｅｒ－１１９－ＡＰＣ（クローン：Ｔｅｒ－１１９）（カタログ番号：１１６２１１）は、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）から入手した。

【０９５１】

ヒトγ－グロビンの発現を検出する細胞内フローサイトメトリー：
ＦＩＸ＆ＰＥＲＭ（商標）細胞透過処理キット（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用し、製造者のプロトコールに従った。簡潔に記載すると、１×１０$^{6}$個の細胞を１００μｌのＦＡＣＳ緩衝液（１％のＦＣＳが添加されたＰＢＳ）中に再浮遊させ、１００μｌの試薬Ａ（固定化媒体）を添加し、室温で２～３分間インキュベートした後、予冷した無水メタノールを１ｍｌ添加し、混合し、暗所、氷上で１０分間インキュベートした。次に、ＦＡＣＳ緩衝液で試料を洗浄し、１００μｌの試薬Ｂ（透過処理媒体）及び１μｇのヘモグロビンγ抗体（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ番号ｓｃ－２１７５６ＰＥ）中に再浮遊させ、室温で３０分間インキュベートした。洗浄後、ＦＡＣＳ緩衝液中に細胞を再浮遊させ、分析した。

【０９５２】
グロビンＨＰＬＣ：
個々のグロビン鎖レベルの定量化は、ＳＰＤ－１０ＡＶダイオードアレイ検出器及びＬＣ－１０ＡＴバイナリポンプを備えたＳｈｉｍａｄｚｕ Ｐｒｏｍｉｎｅｎｃｅ機器（Ｓｈｉｍａｄｚｕ，Ｋｙｏｔｏ，Ｊａｐａｎ）で実施した。ポリペプチド用のＶｙｄａｃ２１４ＴＰ（商標）Ｃ４逆相カラム（２１４ＴＰ５４カラム，Ｃ４，３００Å，５μｍ，内径４．６ｍｍ×２５０ｍｍ）（Ｈｉｃｈｒｏｍ，ＵＫ）を使用した。トリフルオロ酢酸含量０．１％の水／アセトニトリルの４０％→６０％グラジエント混合物を流速１ｍＬ／分で適用した。

【０９５３】
ベクターコピー数の測定：
細胞当たりのアデノウイルスゲノムコピー数の絶対的定量化については、提供プロトコールに従ってＰｕｒｅＬｉｎｋ Ｇｅｎｏｍｉｃ ＤＮＡ Ｍｉｎｉ Ｋｉｔ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して細胞からゲノムＤＮＡを単離し、ｑＰＣＲのテンプレートとして使用した。このｑＰＣＲは、ｐｏｗｅｒ ＳＹＢＲ（商標）ｇｒｅｅｎ ＰＣＲ ｍａｓｔｅｒ ｍｉｘ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して実施した。下記のプライマー対を使用した：ヒトγ－グロビンフォワード（配列番号１９５）及びリバース（配列番号１９６）、ｍｇｍｔフォワード（配列番号２２０）及びリバース（配列番号２２１）。

【０９５４】
リアルタイム逆転写ＰＣＲ：
製造者のフェノール－クロロホルム抽出方法に従ってＴＲＩｚｏｌ（商標）試薬（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用することによって５×１０＾６個の分化ＨＵＤＥＰ－２細胞または１００μｌの血液から全ＲＮＡを抽出した。Ｑｕａｎｔｉｔｅｃｔ逆転写キット（Ｑｉａｇｅｎ）及びｐｏｗｅｒ ＳＹＢＲ（商標）ｇｒｅｅｎ ＰＣＲ ｍａｓｔｅｒ ｍｉｘ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用した。ＳｔｅｐＯｎｅＰｌｕｓ ｒｅａｌ－ｔｉｍｅ ＰＣＲシステム（ＡＢ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）でリアルタイム定量的ＰＣＲを実施した。下記のプライマー対を使用した：マウスＲＰＬ１０（ハウスキーピング）フォワード（配列番号１８９）及びリバース（配列番号１９０）、ヒトγ－グロビンフォワード（配列番号１９１）及びリバース（配列番号１９２）、ヒトβ－グロビンフォワード（配列番号２１６）及びリバース（配列番号２１７）、マウスβ－メジャーグロビンフォワード（配列番号１９３）及びリバース（配列番号１９４）、マウスαグロビンフォワード（配列番号２１２）及びリバース（配列番号２１３）。

【０９５５】
Ｃａｓ９ウエスタンブロット：
形質導入後のさまざまな時点で３×１０$^{6}$個のＨＵＤＥＰ－２細胞を収集し、ＰＢＳで２回洗浄し、５％のβ－メルカプトエタノールを含むＬａｅｍｍｌｉ緩衝液で溶解させた。試料を９５℃で５分間煮沸し、１３，０００ｇで１０分間遠心分離することによって清澄化した。溶解物１０μＬを、４～１５％プレキャストタンパク質ゲル（Ｂｉｏ－Ｒａｄ

）を使用するＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分離した。ブロット中のＣａｓ９タンパク質を抗Ｃａｓ９－ＨＲＰ（クローン７Ａ９－３Ａ３）（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｄａｎｖｅｒｓ，ＭＡ）によって探索した。Ｐｉｅｒｃｅ（商標）ＥＣＬ Ｐｌｕｓ Ｗｅｓｔｅｒｎ Ｂｌｏｔｔｉｎｇ Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）での処理後にＸ線フィルム上での化学発光検出を実施した。Ｃａｓ９の検出後、ブロットを抗体除去処理に供し、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（クローンＡＣ－７４）から入手した抗β－アクチン抗体によって再探索して内部対照とした。

【０９５６】

動物：

動物を使用する実験はすべて、ｔｈｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎによって示される施設ガイドラインに従って実施した。ｔｈｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎは、Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ ｆｏｒ ｔｈｅ Ａｓｓｅｓｓｍｅｎｔ ａｎｄ Ａｃｃｒｅｄｉｔａｔｉｏｎ ｏｆ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ａｎｉｍａｌ Ｃａｒｅ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ（ＡＡＬＡＣ）が公認する研究施設であり、この大学で実施される生きた動物を扱う研究はすべて、Ｏｆｆｉｃｅ ｏｆ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ａｎｉｍａｌ Ｗｅｌｆａｒｅ（ＯＬＡＷ）Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ａｓｓｕｒａｎｃｅ（ＰＨＳ）ポリシー、ＵＳＤＡ Ａｎｉｍａｌ Ｗｅｌｆａｒｅ Ａｃｔ ａｎｄ Ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎｓ、Ｇｕｉｄｅ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅ ｏｆ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ａｎｉｍａｌｓ、及びｔｈｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ ＷａｓｈｉｎｇｔｏｎのＩｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ Ａｎｉｍａｌ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ（ＩＡＣＵＣ）ポリシーに従うものである。試験は、ｔｈｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ ＩＡＣＵＣ（プロトコール第３１０８－０１号）によって承認されたものである。ヒトＣＤ４６ゲノム遺伝子座を含み、かつヒトと同様のレベル及びパターンでＣＤ４６を発現するＣ５７Ｂｌ／６ベースのトランスジェニックマウス（ｈＣＤ４６$^{+/+}$マウス）については以前に記載されている（Ｋｅｍｐｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｅｘｐ Ｉｍｍｕｎｏｌ １２４：１８０－１８９，２００１）。２４８ｋｂの野生型β－グロビン遺伝子座酵母人工染色体（β－ＹＡＣ）を保有するトランスジェニックマウスを使用した（Ｐｅｔｅｒｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ Ｎ Ｙ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ８５０：２８－３７，１９９８）。β－ＹＡＣマウスをヒトＣＤ４６$^{+/+}$マウスと交配させることで、インビボＨＳＰＣ形質導入試験のためのβ－ＹＡＣ$^{+/-}$／ＣＤ４６$^{+/+}$マウスを得た。マウスの遺伝子型判定には下記のプライマーを使用した：ＣＤ４６フォワード（配列番号２３３）及びリバース（配列番号２３４）、β－ＹＡＣ（γ－グロビンプロモーター）フォワード（配列番号２４２）及びリバース（配列番号２４３）。

【０９５７】

鎌状赤血球症マウスモデル：

Ｊａｃｋｓｏｎ ＬａｂｏｒａｔｏｒｙからＴｏｗｎｅｓ雄性マウス（Ｈｂｂ$^{tm2}$（ＨＢＧ１，ＨＢＢ＊）Ｔｏｗまたはｈα／ｈα：：β$^{S}$／β$^{S}$）（ＪＡＸ ｓｔｏｃｋ ＃０１３０７１）を購入し、ヒトＣＤ４６トランスジェニック雌性マウスと交配繁殖させた。図１０９Ａに示されるように、３回の交配繁殖の後、ＣＤ４６、ＨｂＳ、及びＨＢＡについてホモ接合型のマウスを得た。このマウスを実験に使用した。遺伝子型判定には下記のプライマーを使用した：ＨＢＢプライマー（配列番号２４６、配列番号２５１、及び配列番号７０）、ならびにＨＢＡプライマー（配列番号２７２～２７４）、ならびに上に示されるＣＤ４６プライマー（配列番号２３３及び配列番号２３４）。ＰＣＲの結果は、ベンダーによって提供されるプロトコールに従って解釈した。

【０９５８】

ＨＳＰＣの動員及びインビボでの形質導入：

マウスにおけるＨＳＰＣの動員は、ヒト組換えＧ－ＣＳＦを皮下注射（５μｇ／マウス／日、４日）した後、５日目にＡＭＤ３１００（５ｍｇ／ｋｇ）を皮下注射することによ

って行った。さらに、ウイルス注射の１６時間前及び２時間前にデキサメタゾン（１０ｍｇ／ｋｇ）を動物に腹腔内注射した。ＡＭＤ３１００の注射から３０分後及び６０分後に、注射当たりの用量を４×１０$^{10}$個ウイルス粒子（ｖｐ）として後眼窩静脈叢を介してウイルスベクターを動物に静脈内注射した。

【０９５９】

インビボ選択：

形質導入から１週間後（Ｔｏｗｎｅｓモデル）または４週間後（β－ＹＡＣモデル）に選択を開始した。時間間隔を３０分としてＯ$^{6}$－ＢＧ（１５ｍｇ／ｋｇ、ＩＰ）をマウスに２回注射した。２回目のＯ$^{6}$－ＢＧ注射から１時間後にカルムスチン（ＢＣＮＵ）を５ｍｇ／ｋｇでマウスに注射（ＩＰ）した。さらに２回の選択（１回目の選択から２週間後及び４週間後の時点で実施）を実施し、ＢＣＮＵの用量を、それぞれ７．５ｍｇ／ｋｇ及び１０ｍｇ／ｋｇとした。

【０９６０】

免疫抑制：

ミコフェノール酸モフェチル（ＣｅｌｌＣｅｐｔ静脈内注射用）は、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ（Ｈｉｌｌｓｂｏｒｏ，ＯＲ）から入手した。ラパマイシン（Ｒａｐａｍｕｎｅ／シロリムス）及びメチルプレドニゾロンは、Ｐｆｉｚｅｒ（ＮｅｗＹｏｒｋ，ＮＹ）から入手した。ミコフェノール酸モフェチル（２０ｍｇ／ｋｇ／日）、ラパマイシン（０．２ｍｇ／ｋｇ／日）、メチルプレドニゾロン（２０ｍｇ／ｋｇ／日）の腹腔内注射を１日１回実施した。

【０９６１】

二次骨髄移植：

Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙから入手した６～８週齢の雌性Ｃ５７ＢＬ／６マウスをレシピエントとした。移植日に、レシピエントマウスに１０００Ｒａｄの照射を行った。インビボで形質導入したＣＤ４６ｔｇマウスから骨髄細胞を無菌的に単離し、系譜決定細胞が除去された細胞を上記のようにＭＡＣＳを使用して単離した。照射から６時間後、マウス当たり１×１０$^{6}$個細胞として細胞を静脈内注射した。終点分析に向けて、移植から１６週間の間、二次レシピエントを保持した。すべての二次レシピエントにおいて４週目に免疫抑制を開始した。

【０９６２】

組織分析：

厚さ２．５μｍの脾臓組織切片及び肝臓組織切片を４％のホルムアルデヒド中で少なくとも２４時間固定化し、脱水し、パラフィン中に包埋した。髄外造血の組織学的評価にはヘマトキシリン－エオシン染色を使用した。組織切片中のヘモジデリンの検出は、パールプルシアンブルー染色によって実施した。簡潔に記載すると、フェロシアン化カリウムと蒸留水希釈塩酸との等体積混合物（２％）で組織切片を処理した後、ニュートラルレッドで対比染色した。脾臓サイズは、脾臓重量（ｍｇ）／体重（ｇ）の比率として評価した。

【０９６３】

血液分析：

血液試料をＥＤＴＡ被覆管に収集し、ＨｅｍａＶｅｔ ９５０ＦＳ（Ｄｒｅｗ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｔｅｒｂｕｒｙ，ＣＴ）で分析を実施した。末梢血塗抹標本をギムザ／メイ・グリュンワルド（Ｍｅｒｃｋ，Ｄａｒｍｓｔａｄｔ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を用いて、それぞれ５分間及び１５分間染色した。網状赤血球の染色は、ブリリアントクレシルブルーで行った。血液塗抹標本上での網状赤血球の計数は、試料群の割り付けについて盲検化された研究者によって行った。スライド上には動物番号のみを示した（動物当たり５つのスライド、５つの無作為な１ｃｍ$^{2}$区画）。

【０９６４】

統計解析：

複数群の比較については、一元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）及び二元配置ＡＮＯＶＡを、多重比較のためのボンフェローニ事後検定と併用した。統計解析は、ＧｒａｐｈＰａｄ

Ｐｒｉｓｍバージョン６．０１（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ　Ｉｎｃ．，Ｌａ　Ｊｏｌｌａ，ＣＡ）を使用して実施した。

【０９６５】

結果及び考察

【０９６６】

γ－グロビン遺伝子付加、及び自己不活型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９（γ－グロビン再活性化用）のためのＨＤＡｄ－統合ベクター：

ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターの３０ｋｂという挿入容量を利用して２つの治療用カセットを１つのベクターに含めた（図１００、上パネル、「ＨＤＡｄ－統合」）：ｉ）β－グロビンプロモーターと組み合わさってヒトγ－グロビンの発現を促進するＨＳ１～ＨＳ４含有小型ＬＣＲからなるカセット（ＳＢ１００ｘによるグロビン遺伝子付加用）（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｉｎｖｅｓｔ　１２９：５９８－６１５，２０１９）。このカセットは、遍在性に活性なＰＧＫプロモーターの制御下にある変異Ｏ$^{6}$－メチルグアニン－ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ（ｍｇｍｔ$^{Ｐ１４０Ｋ}$）の遺伝子と連結されることで、安定して形質導入された細胞を低用量のＯ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵ処理によって選択することを可能にする（Ｎｅｆｆ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｉｎｖｅｓｔ　１１２：１５８１－１５８８，２００３、Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｃｌｉｎ　Ｄｅｖ　８：５２－６４，２０１８）。このγ－グロビン／ｍｇｍｔ$^{Ｐ１４０Ｋ}$トランスポゾンカセットは、ｆｒｔ部位及びＩＲと隣接している。ｉｉ）ＩＲ／ｆｒｔと隣接するトランスポゾンの外側に配置されたＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９発現カセット。このモジュールは、ＨＢＧ１／２プロモーター中のＢＣＬ１１Ａ結合部位を標的とするＵ６プロモーター促進性ｓｇＲＮＡと、ＥＦ１αプロモーターの制御下にあるＳｐＣａｓ９と、からなる。ＨＤＡｄ統合とＨＤＡｄ－ＳＢとを同時感染させ、ＳＢ１００ｘ及びＦｌｐｅリコンビナーゼが発現すると、ＩＲと隣接するγ－グロビン／ｍｇｍｔ$^{Ｐ１４０Ｋ}$カセットの組み込みが媒介され、これと同時に、ベクターが破壊され、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９の発現が停止することになる（図１０１）。こうしてＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９の発現が短期化すると、ゲノム編集された細胞の生存率及び長期再増殖細胞のパーセントが上昇することになる。比較として、これら２つの異なるモジュールを別々に含むＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクター（ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ（「切断」）及びＨＤＡｄ－ＳＢ－付加（「付加」））をこの試験に含めた（図１００、中央パネル－「ＨＤＡｄ－切断」及び「ＨＤＡｄ－ＳＢ－付加」）。

【０９６７】

ＨＵＤＥＰ－２細胞におけるベクターの検証：

ヒト臍帯血由来赤血球前駆（ＨＵＤＥＰ－２）細胞（Ｋｕｒｉｔａ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ　８：ｅ５９８９０，２０１３）において仮説を最初に検証した。ＨＵＤＥＰ－２細胞は、ＢＣＬ１１Ａを発現すると共に、β－グロビンを優勢に発現し、さらに、レベルは低いものにすぎないがγ－グロビンも発現するヒト造血幹細胞・前駆細胞由来不死化赤血球前駆細胞株である。ＨＵＤＥＰ－２細胞は、γ－グロビン再活性化試験に広く使用されている（Ｃａｎｖｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　５２７：１９２－１９７，２０１５）。圧倒的多数の細胞が形質導入されるＭＯＩでＨＤＡｄ－統合＋／－ＨＤＡｄ－ＳＢをＨＵＤＥＰ－２細胞に感染させてから４日後に、前述の赤血球分化培地中で細胞をさらに８日間増殖させた（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ　２７：２１９５－２２１２，２０１９）。細胞を分化／増殖に供すとＣａｓ９のウエスタンブロットシグナルは急激に減衰した。この減衰は、ＨＤＡｄ－統合ベクターのエピソームコピーが失われたことに起因する可能性が最も高い（図１０３Ａ）。図１０２にはＨＤＡｄ－統合ベクターを使用するＣａｓ９発現制御の模式図が示される。一方で、試験を行った１２日の間、Ｃａｓ９を検出することは可能であった。ＨＤＡｄ－ＳＢとの同時感染を行うと、Ｃａｓ９の発現が３５％（分化後３日目）～５０％（分化後８日目）減少し（図１０３Ｂ）、このことは、図１０１に記載の自己不活化機構の効果を示している。フローサイトメトリーによるγ－グロビンマーキングの分析（図１０３Ｃ）は、γ－グロビン遺伝子付加モ

ジュール及びγ－グロビン再活性化モジュールの相加効果を示唆するものであった。

【０９６８】

ＣＤ４６／β－ＹＡＣマウスにおけるインビボでのＨＳＰＣの形質導入．

ＨＢＧ１／２プロモーターを標的とするＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを用いたインビボでのＨＳＰＣの形質導入の後にＣＤ４６／β－ＹＡＣマウスにおいてヒトγ－グロビンが再活性化されることが以前に実証されている（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ １３１：２９１５－２９２８，２０１８）。ここでは、同様のプロトコールに従って新たなＨＤＡｄ－統合ベクターを評価した。Ｇ－ＣＳＦ／ＡＭＤ３１００での動員処理にＣＤ４６／β－ＹＡＣマウスを供し、「切断」ベクター、「付加」ベクター、及び「統合」ベクターを静脈内注射し、４週間後に３回のインビボ選択に供した（図１０４Ａ）。γ－グロビン陽性ＲＢＣのパーセントはインビボ選択の各回を経るに伴って増加し、「統合」ベクターについては、最終回の$O^6$ＢＧ／ＢＣＮＵ注射から２週間後に９５％超に達した（図１０４Ｂ）。「切断」ベクターでの再活性化は、効率が低下したものであり（６０％）、動物間の変動も大きくなった。１８週目に、ＲＢＣ溶解物中のグロビン鎖をＨＰＬＣによって分析した。クロマトグラムは、ヒトβ－グロビン、再活性化されたヒトＧγ／Ａγ（ＨＢＧ１／２）、及び付加された７６－Ｉｌｅ Ｇγバリアントの個別ピークを示す（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ ９：１４２－１５２，２０１８）（図１０４Ｃ左パネル、図１０５）。注目すべきは、「切断」ベクターで処理したマウスでは、その一部のみではあったが、Ｇγ及びＡγの同時再活性化が見られたことである（図１０５）。「切断」ベクターで処理したマウス及び「統合」ベクターで処理したマウスの大部分ではＡγのみが再活性化され、これは、ＨＢＧ１プロモーター及びＨＢＧ２プロモーターの両方がＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９によって同時に切断された結果としてＨＢＧ２遺伝子が欠失したことに起因する可能性が最も高い（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ １３１：２９１５－２９２８，２０１８）。図１０４Ｃ（右パネル）は、ヒトβ－グロビンに対するγ－グロビンタンパク質のレベルを示す。「切断」ベクター、「付加」ベクター、及び「統合」ベクターについて、γ－グロビンタンパク質の平均％は、それぞれ７％、１１％、及び１７％であった。ｍＲＮＡレベルでも同様のパターンが見られた（図１０４Ｄ）。「切断」ベクターと「付加」ベクターとの間の差は有意ではなかった一方で、「統合」ベクターで得られたγ－グロビンのレベルは有意に高かった。ＨＢＧプロモーター標的部位がＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９介在性に切断されたパーセントをＰＢＭＣ及び骨髄ＭＮＣにおいて１８週目に測定したところ、このパーセントは、「切断」ベクターと比較して「統合」ベクターの方が有意に高かった（図１０４Ｅ、図１０６）。このことは、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９発現を減少させる機構によるもの、そして可能性としては、ＣＲＩＳＰＲによって編集された後にインビボ選択によって増殖したＨＳＰＣがより良好に生存したことによるものである可能性が最も高い。骨髄ＭＮＣ中のベクターコピー数は、「付加」ベクター及び「統合」ベクターで同等であったが、例外として、形質導入及びベクター組み込みがより良好であることに起因して「統合」ベクターの方がγ－グロビンレベルが上昇した（図１０４Ｆ）。異なるマウスにおいて個々の前駆細胞コロニーでの分析を行うと、ＶＣＮの範囲は細胞当たり１～６コピーであった（図１０４Ｇ）。γ－グロビン遺伝子付加及びＣＲＩＳＰＲ切断介在性のγ－グロビン再活性化が長期再増殖ＨＳＣにおいて生じたことを実証するために、「切断」ベクター及び「統合」ベクターを用いてβ－ＹＡＣ／ＣＤ４６マウスにおいてインビボでのＨＳＰＣの形質導入を行ってから１８週目に収集した骨髄Ｌｉｎ$^-$細胞を致死性照射Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに移植した。移植細胞が二次レシピエントにおいて多系譜再構成を導く能力を１６週間にわたって評価した。ＰＢＭＣにおけるＣＤ４６発現に基づく生着率は９５％であり、安定を保っていた。フローサイトメトリーによって測定したＲＢＣのγ－グロビンマーキング率も安定しており、１６週目の時点で「切断」ベクター及び「統合」ベクターについて、それぞれ７０％及び９５％の範囲であった（図１０７Ａ）。ＨＰＬＣ（図１０７Ｂ）またはｑＲＴ－ＰＣＲ（図１０７Ｃ）によって測定したγ－グロビンの発現レベル（マウスβ－メジャーに対する相対値）は一次マウスと同等であった。図１０７Ｂは、移植後１６週目のヒトβ

－グロビンに対するγ－グロビンタンパク質のレベルを示す。図１０７Ｃ及び図１０７Ｄは、マウスβ$^{メジャー}$－グロビンに対するγ－グロビンタンパク質のレベル及びヒトβ－グロビンに対するγ－グロビンタンパク質のレベルを示す。

【０９６９】

ＨＳＰＣの遺伝子操作または赤血球細胞からのγ－グロビンの発現による血液、脾臓、及び骨髄の細胞組成への影響は観察されなかった。図１０７Ｅは、「統合」ベクター（黒抜き記号）での形質導入後１６週目の血液、脾臓、及び骨髄のＭＮＣにおける系譜陽性細胞組成を非形質導入対照マウス（白抜き記号）と比較したものを示す。図１０７Ｆは、血液、脾臓、及び骨髄中の細胞当たりのトランスポゾンの組み込みコピー数を示す。

【０９７０】

ＳＣＤ（Ｔｏｗｎｅｓ）マウスにおけるインビボでのＨＳＰＣの形質導入試験．

このモデルでは、マウスα－グロビン遺伝子がヒトα－グロビンで置き換えられ、マウス成体型β－グロビン遺伝子が、ヒト鎌状β$^{S}$－グロビン遺伝子及び胎児型γ－グロビン遺伝子が一緒に連結されたもので置き換えられている。β－グロビン遺伝子（ＨＢＧ１）は、５’隣接配列の１４００ｂｐを含んでおり、この１４００ｂｐは、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９によって切断されるＢＣＬ１１Ａ標的部位を含む。これによってβ－グロビン遺伝子が再活性化されることになる。Ｔｏｗｎｅｓモデルのゲノムは、別のＳＣＤマウスモデルであるＢｅｒｋｅｌｅｙモデル（Ｈｂａ$^{0}$／$^{0}$Ｈｂｂ$^{0}$／$^{0}$Ｔｇ（Ｈｕ－小型ＬＣＲα１$^{G}$γ$^{A}$γ$^{δ}$β$^{S}$））（ヒトグロビン導入遺伝子のコピーを２つ超有するものと思われる（Ｐａｓｚｔｙ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７８：８７６－８７８，１９９７））のゲノムと比較して特徴付けが進んでいる。

【０９７１】

ＨＤＡｄ５／３５＋＋ＨＳＰＣ遺伝子治療に適したＴｏｗｎｅｓモデルを作製するために、ＴｏｗｎｅｓマウスをヒトＣＤ４６トランスジェニックマウスと交配繁殖させた。３回の戻し交配を行った後、ヒトＣＤ４６及び２つのヒト（α、β$^{S}$／γ）グロビン遺伝子についてホモ接合型のマウスを実験に使用した（図１０８Ａ）。この三重ホモ接合型ＣＤ４６／Ｔｏｗｎｅｓマウスは鎌状赤血球（図１０８Ｂ）、重症貧血、末梢血中の網状赤血球率４０％、ならびに白血球増加及び血小板増加（図１０８Ｃ）を示した。後者は、造血の乱れが赤血球系譜を超えて拡大していることを示す。別の特徴的な特徴は、髄外造血の結果としての脾腫であった（図１０８Ｄ）。

【０９７２】

ＧＣＳＦ／ＡＭＤ３１００での動員処理にＣＤ４６／Ｔｏｗｎｅｓマウスを供し、このＣＤ４６／ＴｏｗｎｅｓマウスにＨＤＡｄ－統合ベクター＋ＨＤＡｄ－ＳＢベクターを静脈内注射した。形質導入から１週間後にＯ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵでのインビボ選択を開始し、４週目及び６週目にＢＣＮＵ用量を増やしてこのインビボ選択を繰り返した（５ｍｇ／ｋｇ→７．５ｍｇ／ｋｇ→１０ｍｇ／ｋｇ）。ベースラインでは、ＭＦＩは低いがＲＢＣのγ－グロビン陽性率は平均で５％であり、このことは、ＣＤ４６／Ｔｏｗｎｅｓマウス中での胎児型グロビンの抑制が不完全なものであることを示している。３回のインビボ選択を経ると、グロビン陽性ＲＢＣのパーセントは上昇し、試験の終了時点（インビボ形質導入後１３週目）までには９５％超に達した（図１０９Ａ）。ＲＢＣ溶解物のＨＰＬＣ分析から、γ－グロビンレベルはヒトα－グロビンまたはβ$^{S}$－グロビンの３０％であることが示された（図１０９Ｂ左パネル）。付加されたγ－グロビン及び再活性化されたＡγのピークは明確に視認可能なものであった（図１０９Ｂ右パネル）。ＣＤ４６／β－ＹＡＣモデルで見られたように、全γ－グロビンレベルへの再活性化γ－グロビンの寄与は、付加γ－グロビンのものと比較して少ないものであった（図１０９Ｃ）。フローサイトメトリーによって検出されたベースラインでのγ－グロビンレベルは低く、ＨＰＬＣの検出限界を下回るものであった。ＲＢＣ中のグロビンｍＲＮＡの分析は、ＨＰＬＣによってタンパク質レベルで見られた値を反映するものであった（図１０９Ｄ）。ＨＤＡｄ－統合でのインビボＨＳＣ遺伝子治療の後のＳＣＤ ＣＤ４６／Ｔｏｗｎｅｓモデルにおけるγ－グロビンレベルは、「健康な」ＣＤ４６／β－ＹＡＣマウスのものと比較して高かった。

【０９７３】
骨髄試料では所期のゲノム改変の両方が１３週目から検出された。細胞当たりの組み込みγ－グロビン遺伝子数は平均で２．５であった（図１０９Ｅ）。Ｔ７ＥＩアッセイによって測定した標的部位切断効率は、２５～３０％の範囲内であり、全骨髄ＭＮＣ、Ｌｉｎ－細胞、ＰＢＭＣ、及び脾細胞において同等であった（図１０９Ｆ）。ＣＤ４６／Ｔｏｗｎｅｓ　ＨＳＰＣの遺伝子改変が安定したものであることを示すために、インビボ形質導入から１３週目に収集したＬｉｎ－細胞を二次致死性照射Ｃ５７Ｂｌ／６レシピエントに移植した。ＲＢＣにおけるγ－グロビンマーキングは、成体型ヒトグロビンの３０％のレベル（図１１０Ｂ）で１６週間にわたって安定していた（図１１０Ａ）。

【０９７４】
マウスモデルにおけるＳＣＤの表現型修正：
統合ベクターを用いたインビボでのＨＳＰＣの形質導入から１３週目に、ＣＤ４６／Ｔｏｗｎｅｓマウスにおける鎌状赤血球症の表現型特徴を分析した。末梢血塗抹標本上で数えた網状赤血球の平均パーセントは、親である（「健康な」）ＣＤ４６トランスジェニックマウス、処理前のＣＤ４６／Ｔｏｗｎｅｓマウス、及び処理後１３週目のＣＤ４６／Ｔｏｗｎｅｓマウスについて、それぞれ５％、３９％、及び５％であった（図１１１Ａ及び１１１Ｃ）。処理したマウスでは、血色素が減少し、幅広く異なるサイズ／形状（鎌状赤血球）を有し、細胞が断片化していることによって特徴付けられるＣＤ４６／Ｔｏｗｎｅｓマウスの血液塗抹標本中の赤血球形態（図１０８Ｂを参照のこと）が、ＣＤ４６マウスで見られる正球性の赤血球外観へと戻った（図１１１Ｂ）。ＲＢＣ数、ＷＢＣ数、及び血小板数、ならびに赤血球特徴（例えば、ヘモグロビン及びヘマトクリット）を含む血液学的パラメーターは、ＣＤ４６マウスと処理ＣＤ４６／Ｔｏｗｎｅｓマウスとで同様であった（図１１１Ｃ）。同様に、処理したＣＤ４６／Ｔｏｗｎｅｓマウスから得られた肝臓及び脾臓の組織学的分析からは、実質内鉄沈着及び髄外造血が存在しないことを含めて、正常化が生じていることが示された（図１１２Ａ）。処理したＣＤ４６／Ｔｏｗｎｅｓマウスにおける脾臓サイズ（測定可能な代償性造血特徴）は、父性ＣＤ４６マウスのものと同等であった（図１１２Ｂ）。

【０９７５】
全体として、こうしたデータは、ＣＤ４６／Ｔｏｗｎｅｓマウスの鎌状赤血球症が完全に治癒したことを示す。このことは、ＳＢ１００×トランスポゼース介在性のγ－グロビン遺伝子付加（主な寄与要因）とＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９誘発性の内在性γ－グロビン再活性化との統合によって高γ－グロビンレベル（２０％超）が達成されたことと直接的に関連するものと想定される。さらに、こうした結果は、ＨＤＡｄ－統合ゲノムからＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９発現カセットがＦｌｐｅ／ＳＢ１００ｘ介在性に切除されることによってＣａｓ９発現が減少し、これによってＣＲＩＳＰＲ編集ＨＳＰＣの安全性及びパーセントが上昇することを実証するものである。この系をさらに改善するものには、ＲＢＣ中のβ$^{S}$量を低減するための手法が含まれ得る（この低減は、例えば、ＳＣＤ変異を修正するプライムエディターをＨＤＡｄ－統合ベクターに含めることによってなされる）。

【０９７６】
実施例４．Ａｄ３５ベクターの生成

【０９７７】
この実施例では、Ａｄ３５ベクターの生成及びＣＤ３４＋細胞への形質導入効率の実証について記載される。異なる構造（ＬｏｘＰ配置が異なることを含む）を有する３つのＡｄ３５ベクター例を生成させた。

【０９７８】
図１１３には、代表的なＡｄ５／３５ヘルパーウイルスゲノムの左末端が示される。濃灰色の影付き配列は天然のＡｄ５配列に対応し、影なしの配列または薄灰色で強調された配列は人工的に導入したものである。薄灰色で強調された配列は、（縦列反復）ｌｏｘＰ配列の２つのコピーである。「ｃｒｅリコンビナーゼ」タンパク質が存在する場合、２つのｌｏｘＰ配列の間のヌクレオチド配列が欠失する（１つのｌｏｘＰコピーが残る）。ｌ

ｏｘＰ部位の間のＡｄ５配列は（産生細胞の核中で）アデノウイルスＤＮＡをカプシドにパッケージングする上で必要不可欠なものであるため、これが欠失するとヘルパーアデノウイルスゲノムＤＮＡがパッケージング欠損となる。結果的に、欠失プロセスの効率は、ヘルパーゲノムＤＮＡのパッケージング（望ましくないヘルパーウイルス「混入」）レベルに直接的に影響を及ぼす。上記の観点から、同じスキームをＡｄ５以外のアデノウイルス血清型にあてはめるには、下記のことを達成することが望ましい：１．パッケージングに必要不可欠な配列を同定し、そうした配列をｌｏｘＰ配列挿入と隣接させ、ｃｒｅリコンビナーゼの存在下では欠失し得るようにすること。配列に類似性がほどんど存在しない場合、こうした配列を同定することは容易ではない。２．ヘルパーウイルスの（ｃｒｅリコンビナーゼの非存在下での）増殖及びパッケージングにｌｏｘＰ配列の挿入が与える影響が最小となるであろう場所を天然のＤＮＡ配列の中で決定すること。３．ヘルパー依存型アデノウイルスの産生（すなわち、ｃｒｅリコンビナーゼ発現細胞株（１１６細胞株など）での産生）の間にパッケージング配列が効率的に欠失し、ヘルパーウイルスがパッケージングされることを最小限に保つことを可能にするｌｏｘＰ配列間間隔を決定すること。

【０９７９】

図１１４は、代表的なＡｄ５パッケージングシグナル（配列番号４９）とＡｄ３５パッケージングシグナル（配列番号５０）とのアライメントを示す。パッケージングシグナルの同定においてはＡｄ５の左末端配列とＡｄ３５の左末端配列とのアライメントをとることが有用である。パッケージングに重要なＡｄ５配列中モチーフ（ＡＩ～ＡＶ）は線で示される（Ｓｃｈｍｉｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｖｉｒｏｌ．，７１（５）：３３７５－４，１９９７の図１Ｂも併せて参照のこと）。例示のｌｏｘＰ挿入部位の位置は黒矢印によって示される。これらの挿入はＡＩ～ＡＩＶと隣接しており、ＡＶを破壊している。さらなるパッケージングシグナルＡＶＩ及びＡＶＩＩ（Ｓｃｈｍｉｄ　ｅｔ　ａｌ．に示されるもの）は、Ａｄ５ヘルパーウイルスのＥ１欠失の一部としてこのベクター中から欠失している。

【０９８０】

図１１５は、Ａｄ３５ベクターｐＡｄ３５ＧＬＮ－５Ｅ４の模式図である。これは、組換え操作手法を使用してベクター化されたＡｄ３５ゲノム（ＡＴＣＣから入手したＨｏｌｄｅｎ株）（ＰＭＩＤ：２８５３８１８６）から得られた第１世代（Ｅ１／Ｅ３欠失）Ａｄ３５ベクターである。次に、このベクタープラスミドを、ｌｏｘＰ部位の挿入に使用した。

【０９８１】

パッケージング部位（ＰＳ）１　ＬｏｘＰ挿入部位は、ヌクレオチド１７８及びヌクレオチド３４４の後に位置する。このＡｄ３５ベクターの例は、配列番号２８６に示される。このＬｏｘＰ配置によって、ＡＩ～ＡＩＶが除去されると予想される。ＡＶＩ及びＡＶＩＩ（３４４の後に位置する）を含む残りのパッケージングシグナルは欠失している（位置３４５～３１１３のＥ１欠失の一部として欠失している）。ＰＳ２　ＬｏｘＰ挿入部位はヌクレオチド１７８及びヌクレオチド４８１の後に位置する。このＡｄ３５ベクターの例は、配列番号５１に示される。さらに、ヌクレオチド１７９～３６５は欠失しているため、ＡＩ～ＡＶは存在しない。残りのパッケージングモチーフ（ＡＶＩ及びＡＶＩＩ）は、ＨＤＡｄ産生の間にｃｒｅリコンビナーゼによって除去可能である。Ｅ１の欠失で４８２～３１１３は欠失している。ＰＳ３　ＬｏｘＰ挿入部位はヌクレオチド１５４及びヌクレオチド４８１の後に位置する。このＡｄ３５ベクターの例は、配列番号５２に示される。これら３つのベクターのパッケージングシグナル構造は図１１６に示される。

【０９８２】

これら３つの操作されたベクターはレスキュー可能なものである。ＬｏｘＰ部位が再配置されたウイルスゲノムのパーセントは、ＰＳ１、ＰＳ２、及びＰＳ３について、それぞれ５０％、２０％、及び６０％であった。再配置は、ｌｏｘＰ部位がウイルスの複製及び遺伝子発現に決定的に影響を及ぼす場合に生じる。

【０９８３】
図１１７には、このＨＤＡｄ３５プラットホームと現在のＨＤＡｄ５／３５プラットホームとの比較が示される。両方のベクターがＣＭＶ－ＧＦＰカセットを含む。このＡｄ３５ベクターは、免疫原性であるＡｄ５カプシドタンパク質を含まない。これら２つのベクターが示すインビトロでのＣＤ３４＋細胞の形質導入効率は同等であった。ブリッジング試験は、インビトロでのＣＤ３４＋細胞の形質導入効率が同等であることを示している。Ｇ－ＣＳＦで動員処理したドナーから得られたヒトＨＳＣ（末梢ＣＤ３４＋細胞）の形質導入を、ＨＤＡｄ３５（Ａｄ３５ヘルパーＰ－２で産生させた）またはＡｄ３５由来のファイバーを有するＡｄ５カプシドを含むキメラベクターを用いて５００ｖｐ／細胞、１０００ｖｐ／細胞、２０００ｖｐ／細胞のＭＯＩで行った。３つの独立した実験においてウイルスの添加から４８時間後にＧＦＰ陽性細胞のパーセントを測定した。

【０９８４】
サル試験で使用するためにＰＳ２ヘルパーベクターを（図１１８に示されるように）作製し直した。以下の操作を行ってこのバージョンを作製した：Ｅ１領域の欠失、変異パッケージングシグナルとＬｏｘｐとの隣接配置、変異パッケージング配列の使用、Ｅ３領域（２７４３５→３０５４０）の欠失、Ａｄ５Ｅ４ｏｒｆ６での置換、ｃｏｐＧＦＰカセットと隣接するスタッファーＤＮＡの挿入、及びノブへの変異導入によるＡｄ３５Ｋ＋＋の作製。

【０９８５】
図１１９は、変異パッケージングシグナル配列を示す。残基１～１３７はＡｄ３５ＩＴＲである。太字のテキストはＳｗａＩ部位であり、Ｌｏｘｐ部位はイタリック体で示され、変異パッケージングシグナルは下線付きで示される。明確には、こうした配列は図１１９に個別に示される。

【０９８６】
Ａｄ３５ヘルパーベクターパッケージングシグナルバリアントを４つ作製した（図１２０Ａ）。Ｅ３領域（２７３８８→３０４０２）を欠失させ、ＣＭＶ－ｅＧＦＰカセットをＥ３欠失内に配置し、Ａｄ３５Ｋ＋＋を存在させ、ｃｏｐＧＦＰの代わりにｅＧＦＰを使用した。これら４つのパッケージングシグナルバリアント中のＬｏｘＰ部位は、示される位置に存在する（図１２０Ａ）。４つのヘルパーベクターはすべて、レスキュー可能なものであった。

【０９８７】
図１２０Ｂは、特定のＬｏｘＰ部位を有する８つの追加のパッケージングシグナルバリアントを表す模式図である。

【０９８８】
ある特定の追加のヘルパーベクター及びパッケージングシグナルバリアントでは、図１２０Ａ中のヘルパーベクターに変更を施した（Ｅ３欠失の短縮（２７６０９→３０４０２）など）。

【０９８９】
実施例５．ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを用いるエクスビボ及びインビボでの造血幹細胞の形質導入を行った後のＡＡＶＳ１トランスジェニックマウスにおける標的指向化組み込み及び高レベル導入遺伝子発現．

【０９９０】
この実施例に含まれる情報の少なくともいくつかは、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．（Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．，２７（１２）：２１９５－２２１２，２０１９；ｅ－ｐｕｂ Ａｕｇｕｓｔ １９，２０１９）に公開されたものである。

【０９９１】
患者に行われる現在の造血幹細胞遺伝子治療では、遺伝子送達にレンチウイルスベクターが使用される（Ｎａｄｉｎｉ，ＥＭＢＯ Ｍｏｌ Ｍｅｄ，１１，２０１９、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ，１７，１１８６－１１９４，２００７）。レンチウイルスベクターによるヒトゲノムへの組み込みは効率的なものであるが、活性に転写さ

れる遺伝子へと強く偏っている。この半無作為的な組み込みパターンには、がん関連遺伝子を含めて、付近の遺伝子の発現が乱れるというリスクが伴う。それ故に、当該分野の主な目的は、導入遺伝子の組み込みを事前選択部位へと標的指向化することである。ヒトゲノムへの標的指向化組み込みについては多くの「セーフハーバー」が提唱されている（例えばＡＡＶＳ１及びＣＣＲ５）（Ｐａｐａｐｅｔｒｏｕ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ，２９，７３－７８，２０１１）。セーフハーバー部位の基準には、（ｉ）いずれの遺伝子の５’末端からの距離も５０ｋｂ超であること、（ｉｉ）がん関連遺伝子からの距離が３００ｋｂ超であること、（ｉｉｉ）いずれのマイクロＲＮＡからの距離も３００ｋｂ超であること、（ｉｖ）遺伝子転写単位の外側に位置すること、及び（ｖ）超保存領域の外側に位置すること、が含まれる。１９番染色体中のＡＡＶＳ１遺伝子座は、ＡＡＶＳ１部位中の特定のモチーフ（ＲＢＳ）を認識するウイルスコードタンパク質Ｒｅｐ７８によって媒介される組み込みに野生型ＡＡＶによって使用される（Ｍｕｚｙｃｚｋａ，Ｃｕｒｒ Ｔｏｐ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ，１５８，９７－１２９，１９９２、Ｈｕｓｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＰＬｏＳ Ｐａｔｈｏｇ，６，ｅ１０００９８５，２０１０）。いくつかのＡＡＶ血清型に対する抗体が検出可能であることによって裏付けられるようにヒト集団の大多数がＡＡＶに遭遇したことがあるにもかかわらず、いずれの認識可能な病状も伴わないことから、ＡＡＶＳ１への組み込みは安全であり得るという結論が下された（Ｈｅｎｃｋａｅｒｔｓ ｅｔ ａｌ．，Ｆｕｔｕｒｅ Ｖｉｒｏｌ，５，５５５－５７４，２０１０）。さらに、この遺伝子座は、ＤＮＡｓｅＩ高感受性部位と、ＣＤ３４＋細胞及びｉＰＳ細胞においてオープンクロマチン立体配座を維持するインスレーターと、を含む（ｖａｎ Ｒｅｎｓｂｕｒｇ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ，２０，２０１－２１４，２０１３、Ｌｏｍｂａｒｄｏ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｍｅｔｈｏｄｓ，８，８６１－８６９，２０１１、Ｏｇａｔａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｖｉｒｏｌ，７７，９０００－９００７，２００３）。このことによってゲノム編集ツールの到達性が高まるようになり、その一方で、高レベルの導入遺伝子発現が支援されることになる（ｖａｎ Ｒｅｎｓｂｕｒｇ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ，２０，２０１－２１４，２０１３、Ｖｏｉｇｔ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｍｏｌ Ｍｅｄ，８６，１２０５－１２１９，２００８）。

【０９９２】

導入遺伝子組み込みの標的指向化は、相同組換え修復（ＨＤＲ）を介して達成され得る（Ｌｏｍｂａｒｄｏ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｍｅｄ，２０，１１０１－１１０３，２０１４）。操作された部位特異的ヌクレアーゼによる切断が生じると、その後に非相同末端結合（ＮＨＥＪ）（典型的には、可変的な挿入もしくは欠失（インデル）を引き起こす誤りがちなＤＮＡ修復経路）またはＨＤＲ（相同ドナーテンプレートをコピーすることによってＤＮＡを修復する）を介してＤＮＡ二本鎖切断が解消される。切断部位の両側に存在するゲノム配列に相同的なＤＮＡと隣接する外来性ＤＮＡを送達すると、そうした外来性配列が部位特異的様式で組み込まれ得る。

【０９９３】

標的指向化組み込みを達成するための現在の手法は、エンドヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡ及びドナープラスミドＤＮＡ（Ｂｌａｉｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｖｉｓ Ｅｘｐ，ｅ５３５８３，２０１６、Ｄｒｅｙｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ，６９，１９１－２００，２０１５、Ｋｕｈｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉ Ｒｅｐ，７，１５１９５ ２０１７、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｍｅｄ Ｒｅｐ，１５，１３１３－１３１８，２０１７）、組み込み欠損レンチウイルスベクター（ＩＤＬＶ）（Ｌｏｍｂａｒｄｏ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｍｅｄ，２０，１１０１－１１０３，２０１４、Ｒｉｏ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｍｏｌ Ｍｅｄ，６，８３５－８４８，２０１４）、またはｒＡＡＶ６ベクター（Ｄｅ Ｒａｖｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ，３４：４２４－４２９，２０１６、Ｈｕｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ，２６，４６－４６７，２０１８、Ｊｏｈｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉ Ｒｅｐ，８：１２１４４，２０１８）をインビトロで電気穿孔によってＨＳＣに導入することに基づくもので

ある。デザイナーインテグラーゼ（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，１４３１，２９１５－２９２８，２０１８、Ｓａｙｄａｍｉｎｏｖａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｃｌｉｎ　Ｄｅｖ，１，１４０５７，２０１５）及びこの試験ではドナーテンプレートを送達するためにヘルパー依存型アデノウイルス（ＨＤＡｄ５／３５＋＋）ベクターを開発した。ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターはヒトＣＤ４６（未分化ＨＳＣ上に発現する受容体）を標的とする（Ｒｉｃｈｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，１２８，２２０６－２２１７，２０１６）。ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターは、そのゲノムを非分裂細胞の核に効率的に送達する能力を有することから、ドナーＤＮＡの量を高めること（効率的な標的指向化組み込みの必要要件）が可能になる。ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクター及びＨＤＡｄ３５ベクターは、最大で３０ｂｐの外来ＤＮＡを保有可能なことから、所与の標的部位に相同的な長いドナー配列区間を収容することができる。これによって、相同組換えによる遺伝子標的化の効率が向上することになり、この効率は、相同領域の長さと直接的に相関する（Ｂａｌａｍｏｔｉｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，３２４，２２９－２３７，２００４、Ｏｈｂａｙａｓｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ，１０２，１３６２８－１３６３３，２００５、Ｓｕｚｕｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ，１０５，１３７８１－１３７８６，２００８）。こうしたベクターは、高収率で得ることが容易であり、ＨＳＣ指向性が強いため、インビボでのＨＳＣの形質導入に利用されている（Ｒｉｃｈｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，１２８，２２０６－２２１７，２０１６）。この手法の中心発想は、Ｇ－ＣＳＦ／ＡＭＤ３１００を使用して骨髄からＨＳＣを動員し、末梢血中に循環ＨＳＣが多数存在する間に、ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを静脈内注射してそうした循環ＨＳＣの形質導入を行うことである。形質導入された細胞は骨髄に戻り、そこで長期的に存続する。この手法の安全性及び効率性は、内在性胎児型グロビンのＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９介在性の再活性化（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，１４３１，２９１５－２９２８，２０１８）または効率的な無作為一過性組み込みを媒介する高活性Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙトランスポゼース（ＳＢ１００ｘ）を使用する胎児型グロビン遺伝子付加（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｉｎｖｅｓｔ，１２９，５９８－６１５，２０１９）のいずれによっても、異常ヘモグロビン症のＣＤ４６トランスジェニックマウスモデルにおいてこれまでに実証された。ＳＢ１００ｘ介在性の導入遺伝子組み込みは、理論的には、レンチウイルスベクターの準無作為組み込みと比較して安全であるが、導入遺伝子サイレンシング、付近の遺伝子に対する望ましくない効果、及びゲノム再編に関する懸念が依然として生じる。したがって、この試験の目的は、ＡＡＶＳ１への標的指向化組み込みが生じるようにＨＤＡｄ５／３５＋＋ベースのインビボＨＳＣ形質導入手法を改変することとした。

【０９９４】

ヒトＡＡＶＳ１遺伝子座に相同的な配列はげっ歯類には存在しない（Ｓａｍｕｌｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，ＥＭＢＯ　Ｊ，１０，３９４１－３９５０，１９９１）。これまでにトランスジェニックげっ歯類モデルは２つ報告されており、これらのモデルは、ラットゲノムまたはマウスゲノム（Ｘ染色体）中に３．５ｋｂのＡＡＶＳ１遺伝子座断片（ラットでは頭－尾結合された７つのコピー）を含む（Ｒｉｚｚｕｔｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｖｉｒｏｌ，７３，２５１７－２５２６，１９９９）。トランスジェニックマウスではＡＡＶＳ１のオープンクロマチン構造が維持されることが研究によって示された（Ｙｏｕｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｖｉｒｏｌ，７４，３９５３－３９６６，２０００）。ＡＡＶＳ１トランスジェニックマウスは、Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓによって配給されている（Ｂａｋｏｗｓｋａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ，１０，１６９１－１７０２，２００３）。Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｓのウェブサイトの記載によれば、こうしたマウスでは、８．２ｋｂのヒトＡＡＶＳ１遺伝子座断片のコピーが単一ゲノム部位に５つ挿入されている。このマウスを、ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターでの形質導入に適したＡＡＶＳ１トランスジェニックマウスを作製するためにヒトＣＤ４６遺伝子座トランスジェニックマウスと交配させた（Ｋｅｍｐｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ　Ｅｘｐ　Ｉｍｍｕｎｏ

ｌ，１２４，１８０－１８９，２００１）。動物試験はすべて、ＡＡＶＳ１／ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$マウスを用いて実施した。

【０９９５】

材料及び方法．

【０９９６】

細胞：

Ｇ－ＣＳＦによって動員処理した成体ドナーからＣＤ３４$^{+}$細胞を得た。細胞を凍結ストックから回復させ、ＳｔｅｍＳｐａｎ　Ｈ３０００（ＳＴＥＭＣＥＬＬ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｖａｎｃｏｕｖｅｒ，Ｃａｎａｄａ）中で一晩インキュベートした。このＳｔｅｍＳｐａｎ　Ｈ３０００は、ペニシリン／ストレプトマイシン、Ｆｌｔ３リガンド（Ｆｌｔ３Ｌ、２５ｎｇ／ｍｌ）、インターロイキン３（１０ｎｇ／ｍｌ）、トロンボポエチン（ＴＰＯ）（２ｎｇ／ｍｌ）、及び幹細胞因子（ＳＣＦ）（２５ｎｇ／ｍｌ）が添加されたものである。２０００ｖｐ／細胞のＭＯＩでＨＤＡｄベクターを用いて細胞の形質導入を行い、示されるように細胞を分析した。ＨＵＤＥＰ－２細胞．ＨＵＤＥＰ－２細胞（Ｋｕｒｉｔａ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ，８，ｅ５９８９０，２０１３）も入手した。以前に説明されたようにＳＣＦ、ＥＰＯ、ドキシサイクリン、及びデキサメタゾンの存在下でＨＵＤＥＰ－２細胞を培養した（Ｃａｎｖｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，５２７，１９２－１９７，２０１５）。５００～１０００ｖｐ／細胞のＭＯＩでＨＤＡｄベクターを用いて細胞の形質導入を行い、示されるように細胞を分析した。

【０９９７】

ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクター：

ＨＤＡｄ－ＳＢ、ＨＤＡｄ－ＩＲ－ＧＦＰ／ｍｇｍｔ、及びＨＤＡｄ－ＩＲ－γ－グロビン／ｍｇｍｔについては以前に記載されている（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｃｌｉｎ　Ｄｅｖ，９，１４２－１５２，２０１８、Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｃｌｉｎ　Ｄｅｖ，８，５２－６４，２０１８）。ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲベクターのクローニングについては、ヒトＡＡＶＳ１遺伝子座を標的とするｓｇＲＮＡ（配列番号２０７）（Ｍａｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，３３９，８２３－８２６，２０１３）を合成し、アニーリングさせ、ｐＳＰｇＲＮＡ（Ａｄｄｇｅｎｅ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ）のＢｂｓＩ部位に挿入してｐＳＰ－ｓｇＡＡＶＳ１を得た。ｐＬｅｎｔｉＣＲＩＳＰＲｖ２（Ａｄｄｇｅｎｅ）から増幅したＣａｓ９コード配列、ｐＳＰ－ｓｇＡＡＶＳ１をＢａｍＨＩで消化することによって遊離させたＵ６ｓｇＡＡＶＳ１断片、及び以前に記載されたマイクロＲＮＡ標的領域（ｍｉＲ－１８３／２１８）（Ｓａｙｄａｍｉｎｏｖａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｃｌｉｎ　Ｄｅｖ，１，１４０５７，２０１５）をｐＢＳ－Ｔ－ＥＦ１α（Ｓａｙｄａｍｉｎｏｖａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｃｌｉｎ　Ｄｅｖ，１，１４０５７，２０１５）のＥｃｏＲＶ－ＮｏｔＩ部位、ＢａｍＨＩ部位、及びＮｏｔＩ部位に順次クローニングしてｐＢＳＴ－ｓｇＡＡＶＳ１－ｍｉＲを形成させた。組換えアデノウイルスプラスミドを得るために、Ｕ６プロモーターから始まってＳＶ４０ポリＡシグナル配列で終わる８ｋｂのカセットをｐＢＳＴ－ｓｇＡＡＶＳ１－ｍｉＲから増幅し、ＮｈｅＩ－ＸｍａＩで消化したｐＨＣＡ（Ｓａｎｄｉｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ，９７，１００２－１００７，２０００）とＧｉｂｓｏｎ　ａｓｓｅｍｂｌｙ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）によってライゲーションすることで、対応するｐＨＣＡ－ｓｇＡＡＶＳ１－ｍｉＲプラスミドを得た。

【０９９８】

ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーベクターの構築については、ＡＡＶＳ１　ＣＲＩＳＰＲ切断部位のすぐ隣に位置する２つの０．８ｋｂホモロジーアーム（ＨＡ）をｇＢｌｏｃｋｓ（ＩＤＴ，ＳａｎＪｏｓｅ，ＣＡ）として合成した。ＰＡＭ配列を含む２３ｂｐのｓｇＡＡＶＳ１を５’ＨＡの上流及び３’ＨＡの下流のそれぞれに１つ含めてドナーカセットの遊離が媒介されるようにした。ＥＦ１α－ｍｇｍｔ－２Ａ－ＧＦＰ－ｐＡ断片は、ＧｅｎＳｃ

ｒｉｐｔ（Ｎａｎｊｉｎｇ，Ｃｈｉｎａ）によって合成されたものであり、この断片を、オーバーラップＰＣＲによって２つの５’ＨＡとライゲーションしてｓｇＡＡＶＳ１－５’ＨＡ－Ｅｆ１α－ｍｇｍｔ－２Ａ－ＧＦＰ－ｐＡ－３’ＨＡ－ｓｇＡＡＶＳ１を形成させ、その後、このｓｇＡＡＶＳ１－５’ＨＡ－Ｅｆ１α－ｍｇｍｔ－２Ａ－ＧＦＰ－ｐＡ－３’ＨＡ－ｓｇＡＡＶＳ１をｐＨＣＡ（Ｓａｎｄｉｇ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ，９７，１００２－１００７，２０００）のＸｍａＩ部位に挿入してＧＦＰドナーベクターｐＨＣＡ－ＡＡＶＳ１－ＧＦＰ－ｍｇｍｔを得た。

【０９９９】

ＨＤＡｄ－グロビン－ドナーベクターのクローニングは３ステップで行った。ステップ１）ＥｃｏＲＶ－ＫｐｎＩでの消化によってｐＨＭ５－ＦＲ－ＩＲ－ＬＣＲ－グロビン－ｍｇｍｔ（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ，９，１４２－１５２，２０１８）から１１．８ｋｂのＬＣＲ－グロビン－ｍｇｍｔカセットを遊離させ、ｐＢＳ－Ｚ（Ｓａｙｄａｍｉｎｏｖａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ，１，１４０５７，２０１５）から増幅した２．８ｋｂのプラスミド骨格とライゲーションさせることで、ｐＢＳ－ＬＣＲ－グロビン－ｍｇｍｔを得た。ＡＡＶＳ１－ｔｇマウスの骨髄細胞から単離したゲノムＤＮＡから、ＰＡＭ配列を含む２３ｂｐのｓｇＡＡＶＳ１を含むプライマーを使用してＡＡＶＳ１ ＣＲＩＳＰＲ切断部位のすぐ隣に位置する２つの１．８ｋｂ ＨＡをＰＣＲ増幅した。この５’側ＨＡ及び３’側ＨＡを、それぞれｐＢＳ－ＬＣＲ－グロビン－ｍｇｍｔのＥｃｏＲＶ部位及びＫｐｎＩ部位に順次挿入してｐＢＳ－ＡＡＶＳ１－グロビン－ｍｇｍｔを得た。ステップ２）ｐＨＣＡのｎｔ１５８８～１２１２１領域をＥｃｏＲＩ消化によって欠失させ、自己ライゲーションさせてｐＨＣＡＳ１を得た。２つのアニーリングしたオリゴ配列を挿入することによってｐＨＣＡＳ１の最初のＰａｃＩ部位を破壊した。新たなＰａｃＩクローニング部位をＢｓｔＢＩ部位に創出してｐＨＣＡＳ１－ＭＣＳを得た。このクローニング部位は、ＰａｃＩでの消化時に２つの１５ｂｐ相同領域が露出するように設計した。１．５ｋｂのＮｈｅＩ断片を除去することによってｐＨＣＡＳ１－ＭＣＳのサイズをさらに減らしてｐＨＣＡＳ１Ｓ－ＭＣＳを得た。ステップ３）上記２ステップから得られた２つの最終コンストラクトをＰａｃＩで消化した後、産物をＧｉｂｓｏｎ Ａｓｓｅｍｂｌｙによって再統合することで、グロビンドナーベクターｐＨＣＡ－ＡＡＶＳ１－グロビン－ｍｇｍｔを得た。

【１０００】

ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターの生成については、対応するプラスミドをＰｍｅＩで直鎖化し、Ａｄ５／３５＋＋－Ａｃｒヘルパーベクター（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，２０１８．Ｂｌｏｏｄ，１４３１，２９１５－２９２８）を含む１１６細胞（Ｐａｌｍｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ，８，８４６－８５２，２００３）において他に詳細に記載されるようにレスキューした（Ｐａｌｍｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ，８，８４６－８５２，２００３）。ヘルパーウイルスの混入レベルは０．０５％未満であることが明らかとなった。力価は６～１２×$10^{12}$ｖｐ／ｍｌであった。この試験で使用したＨＤＡｄベクターはすべて、Ａｄ５ファイバーテール、Ａｄ３５ファイバーシャフト、及び親和性増強型Ａｄ３５＋＋ファイバーノブから構成されるキメラファイバーを含む。（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｖｉｒｏｌ，８２，１０５６７－１０５７９，２００８）。

【１００１】

ミスマッチ感受性ヌクレアーゼアッセイＴ７Ｅ１アッセイ．

以前に記載されたようにゲノムＤＮＡを単離した（Ｍｉｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ，２５，７７８－７８５，２００７）。ＡＡＶＳ１標的部位を含むゲノムセグメントを、下記のプライマーを使用してＫＯＤ Ｈｏｔ Ｓｔａｒｔ ＤＮＡポリメラーゼによって増幅した（ＭｉｌｌｉｐｏｒｅＳｉｇｍａ，Ｂｕｒｌｉｎｇｔｏｎ，ＭＡ）：ＡＡＶＳ１フォワード（配列番号２０８）、リバース（配列番号２０９）。ＰＣＲ産物をハイブリダイゼーションさせ、２．５ユニットのＴ７ＥＩ（ＮＥＢ）を用いて３７℃で２０分間処理した。消化したＰＣＲ産物を６％ ＴＢＥ ＰＡＧＥ（Ｂｉｏ

－Ｒａｄ）によって分離し、エチジウムブロマイドで染色した。ＩｍａｇｅＪソフトウェアを使用してバンド強度を解析した。切断％＝（１－ｓｑｒｔ（親バンド／（親バンド＋切断バンド））×１００％。

【１００２】

次世代シークエンシング：

挿入／欠失（インデル）のディープシークエンシングについては、予想ＡＡＶＳ１切断部位をまたぐ２５０ｂｐの領域を増幅し、産物を、Ｉｌｌｕｍｉｎａシステムを使用してシークエンスした。以前に記載されたようにゲノムＤＮＡを単離した（Ｓａｙｄａｍｉｎｏｖａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ，１，１４０５７，２０１５）。ＡＡＶＳ１標的部位を含む２４９ｂｐのゲノム領域を下記のプライマーを使用して増幅した：ＡＡＶＳ１フォワード（配列番号２１０）、リバース（配列番号２１１）。増幅産物を、ＡＭＰｕｒｅ ＸＰビーズ（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，ＩＮ）を使用して精製した後、クレノウ断片を使用してｄＡ付加反応を実施した。産物とＩｌｌｕｍｉｎａ適合アダプターとを、Ｔ４リガーゼ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）によってライゲーションさせた。ＰＣＲによって特有のバーコード配列を導入することで、同じシークエンシング実行時に複数の試料をシークエンシングできるようにした。各ステップの後にはＡＭＰｕｒｅ ＸＰビーズでの精製を行った。最終的なライブラリーをＱｕｂｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）によって定量化し、Ａｇｉｌｅｎｔ ２１００ Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒで試験して増幅産物の平均サイズを決定した。増幅産物を等モル濃度でプールし、Ｉｌｌｕｍｉｎａ ＭｉＳｅｑシステムでのディープシークエンシングに供した。増幅産物当たり$10^5$リードを生成させて適切に変異型を探った。Ｃａｓ－Ａｎａｌｙｚｅｒオンラインツール（ｒｇｅｎｏｍｅ．ｎｅｔ／ｃａｓ－ａｎａｌｙｚｅｒ／＃！にて利用可能）（Ｐａｒｋ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ，３３，２８６－２８８，２０１７）（ＮＧＳデータ解析向けにＪａｖａＳｃｒｉｐｔ（登録商標）ベースで実行されるもの）を使用してシークエンシングデータをＡＡＶＳ１参照配列にアライメントした。

【１００３】

フローサイトメトリー：

$1\times10^6$個細胞／１００μＬでＦＡＣＳ緩衝液（１％の熱非働化ＦＢＳが添加されたＰＢＳ）中に細胞を再浮遊させ、ＦｃＲ遮断試薬（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ａｕｂｕｒｎ ＣＡ）と共に氷上で１０分間インキュベートした。次に、$10^6$個細胞当たり１００μＬの染色抗体溶液を添加し、暗所、氷上で３０分間インキュベートした。インキュベート後、細胞をＦＡＣＳ緩衝液中で１回洗浄した。二次染色については、二次染色溶液を用いて染色ステップを再度実施した。洗浄後、ＦＡＣＳ緩衝液中に細胞を再浮遊させ、ＬＳＲＩＩフローサイトメーター（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓａｎ Ｊｏｓｅ，ＣＡ）を使用して分析した。前方散乱領域及び側方散乱領域のゲートを使用して残骸を除外した。次に、前方散乱高及び前方散乱幅のゲートを使用して単一細胞をゲートした。次に、ＦｌｏｗＪｏ（バージョン１０．０．８、ＦｌｏｗＪｏ，ＬＬＣ）を使用してフローサイトメトリーデータを解析した。ＬＳＫ細胞のフロー分析については、ビオチン結合型系譜検出カクテル（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）ならびにｃ－Ｋｉｔに対する抗体及びＳｃａ－１に対する抗体、ならびにＡＰＣ結合型ストレプトアビジンを用いて細胞を染色した。ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）から入手した他の抗体には、抗マウスＬＹ－６Ａ／Ｅ（Ｓｃａ－１）－ＰＥ－シアニン７（クローンＤ７）、抗マウスＣＤ１１７（ｃ－Ｋｉｔ）－ＰＥ（クローン２Ｂ８）、抗マウスＣＤ３－ＡＰＣ（クローン１７Ａ２）、抗マウスＣＤ１９－ＰＥ－シアニン７（クローンｅＢｉｏ１Ｄ３）、及び抗マウスＬｙ－６６（Ｇｒ－１）－ＰＥ（クローンＲＢ６－８Ｃ５）が含まれる。Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃから入手した他の抗体には、抗ヒトＣＤ４６－ＡＰＣ（クローン：ＲＥＡ３１２）が含まれる。抗マウスＴｅｒ－１１９－ＡＰＣ（クローン：Ｔｅｒ－１１９）は、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）から入手した。

【１００４】
ヒトγ－グロビンの細胞内染色は、Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚから入手したＰＥ結合型抗ヒトγ－グロビン抗体（クローン５１．７）を使用して実施した。Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎから入手したＦｉｘ＆Ｐｅｒｍ細胞透過処理キットを製造者の説明に従って使用した。
【１００５】
リアルタイム逆転写ＰＣＲ：
製造者のフェノール－クロロホルム抽出方法に従ってＴＲＩｚｏｌ（商標）試薬（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用することによって５０～１００μＬの血液から全ＲＮＡを抽出した後、Ｑｉａｇｅｎから入手したＱｕａｎｔｉｔｅｃｔ逆転写キットを使用して逆転写してｃＤＮＡを生成させた。キット中で提供されるｇＤＮＡ除去試薬でＲＮＡ試料を処理することによってゲノムＤＮＡ混入の可能性を排除した。Ｐｏｗｅｒ ＳＹＢＲ Ｇｒｅｅｎ ＰＣＲ ｍａｓｔｅｒ ｍｉｘ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を使用して比較リアルタイムＰＣＲを実施し、ＳｔｅｐＯｎｅＰｌｕｓ ｒｅａｌ－ｔｉｍｅ ＰＣＲ ｓｙｓｔｅｍ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）で実行した。下記のプライマー対を使用した：マウスＲＰＬ１０（ハウスキーピング）フォワード（配列番号１８９）及びリバース（配列番号１９０）、ヒトγ－グロビンフォワード（配列番号２１４）及びリバース（配列番号２１５）、マウスβ－メジャーグロビンフォワード（配列番号１９３）及びリバース（配列番号２１７）。
【１００６】
グロビンＨＰＬＣ：
個々のグロビン鎖レベルの定量化は、ＳＰＤ－１０ＡＶダイオードアレイ検出器及びＬＣ－１０ＡＴバイナリポンプを備えたＳｈｉｍａｄｚｕ Ｐｒｏｍｉｎｅｎｃｅ機器（Ｓｈｉｍａｄｚｕ，Ｋｙｏｔｏ，Ｊａｐａｎ）で実施した。ＶｙｄａｃＣ４逆相カラム（Ｈｉｃｈｒｏｍ，ＵＫ）を使用して、トリフルオロ酢酸含量０．１％の水／アセトニトリルの３８％→５８％グラジエント混合物を流速１ｍｌ／分で適用した。
【１００７】
コロニー形成単位アッセイ．
２５００個のＬｉｎ－細胞をＣｏｌｏｎｙＧＥＬ１２０２マウス完全培地（ＲｅａｃｈＢｉｏ，Ｓｅａｔｔｌｅ ＷＡ）に３連で播種し、５％$CO_2$、最大湿度下、３７℃で１２日間インキュベートした。Ｌｅｉｃａ ＭＳ５解剖顕微鏡（Ｌｅｉｃａ Ｍｉｃｒｏｓｙｓｔｅｍｓ）を使用してコロニーの数を数えた。ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーで形質導入したマウスから得られたコロニーについては、ＧＦＰ陽性コロニーの数を数え、ピッキングし、分析した。
【１００８】
ベクターコピー数の測定：
骨髄細胞または単一コロニーから得られた全ＤＮＡをＰｕｒｅＬｉｎｋ Ｇｅｎｏｍｉｃ ＤＮＡ Ｍｉｎｉ Ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）によって抽出した。ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーまたはＨＤＡｄ－グロビン－ドナーから抽出したウイルスＤＮＡを段階希釈し、標準曲線の作成に使用した。ｐｏｗｅｒ ＳＹＢＲ Ｇｒｅｅｎ ＰＣＲ ｍａｓｔｅｒ ｍｉｘを使用してＳｔｅｐＯｎｅＰｌｕｓ ｒｅａｌ－ｔｉｍｅ ＰＣＲ ｓｙｓｔｅｍ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）でｑＰＣＲを２連で実施した。１０μＬの反応に５ｎｇのＤＮＡを使用した。下記のプライマー対を使用した：ＧＦＰフォワード（配列番号２１８）及びリバース（配列番号２１９）、ならびにｍｇｍｔフォワード（配列番号２２０）及びリバース（配列番号２２１）。ヒトγ－グロビンプライマーについては、リアルタイム逆転写ＰＣＲのパラグラフに記載した。
【１００９】
ＡＡＶＳ１トランスジェニックマウスにおけるＡＡＶＳ１遺伝子座の局在．
ＴＬＡライブラリーは、以前に記載されたように調製した（ｄｅ Ｖｒｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ，３２，１０１９－１０２５，２０１４）。簡潔に記載すると、全骨髄細胞から得られたＤＮＡをホルムアルデヒドによる架橋処理に供して

からＮｌａＩＩＩで消化した。ライゲーション及び架橋解除処理を行った後、ＤＮＡを精製した。この産物をＮｓｐＩでさらに消化し、ライゲーションさせることで、２ｋｂの環状キメラＤＮＡを得た。キメラＤＮＡを、ＡＡＶＳ１特異的ＴＬＡプライマー（フォワード（配列番号２２２）及びリバース（配列番号２２３））を使用してＰＣＲ増幅した。製造者のプロトコールに従ってＩｌｌｕｍｉｎａ　Ｎｅｘｔｅｒａ　ＸＴ　ＮＧＳキットを使用してＰＣＲ増幅産物からＴＬＡライブラリーを調製した。ＮｏｖａＳｅｑでペアエンドシークエンシングを実施した。ＴＬＡプロトコールではＤＮＡが再シャフリングされるため、スプリットリード認識アライナーＢＷＡ（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ，２６，５８９－５９５，２０１０）を使用してリードのアライメントを実施した。このアライメントでは、以前に推奨された設定（ｂｗａｓｗ　－ｂ　７）を使用した（オンラインでｇｉｔｈｕｂ．ｃｏｍ／Ｃｅｒｇｅｎｔｉｓ／Ｃｅｒｇｅｎｔｉｓ_ｃｏｍｍｏｎを参照のこと）（Ｖａｉｎ－Ｈｏｍ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ，４５，ｅ６２）。こうしたアライメントｂａｍファイルを、ｄｅｅｐＴｏｏｌｓ（Ｒａｍｉｒｅｚ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ，４２，Ｗ１８７－１９１，２０１４）を使用してＲＰＫＭ正規化ｂｉｇｗｉｇファイルに変換した。ＷａｓｈＵエピゲノムブラウザ（Ｚｈｏｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｍｅｔｈｏｄｓ，８，９８９－９９０，２０１１）を使用してゲノム規模の分布を視覚化した。

【１０１０】

サザンブロット．

マウス骨髄から得られたゲノムＤＮＡをＥｃｏＲＩまたはＢｌｐ１で消化し、Ｐｒｉｍｅ－Ｉｔ　ＲｍＴ　Ｒａｎｄｏｍ　Ｐｒｉｍｅｒ標識キット（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して$^{32}$Ｐ標識したＡＡＶＳ１特異的プローブまたはＧＦＰ特異的プローブを用いるサザンブロットに供した。取り込まれていない$^{32}$Ｐ　ｄＣＴＰを、ＭｉｃｒｏＳｐｉｎ　Ｇ２５カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を介する遠心分離によって除去した。ＰｅｒｆｅｃｔＨｙｂ　Ｐｌｕｓハイブリダイゼーション緩衝液（Ｓｉｇｍａ）中でハイブリダイゼーションを実施した。ブロットをＡｍｅｒｓｈａｍ　Ｈｙｂｏｎｄ－ＸＬフィルム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）に曝露した。

【１０１１】

インバースＰＣＲ：

全骨髄細胞、単一コロニー、ＨＵＤＥＰ－２細胞混合物、またはクローンにおける連結部を、他に記載のものに改変を加えたインバースＰＣＲによって分析した（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｖｉｒｏｌ，７９，１０９９９－１１０１３，２００５）。簡潔に記載すると、ゲノムＤＮＡ溶解緩衝液（１００ｍＭのＴｒｉｓ－Ｃｌ（ｐＨ８．０）、５０ｍＭのＥＤＴＡ、１％（ｗ／ｖ）のＳＤＳ、及び４００μｇ／ｍＬのプロテイナーゼＫ）と共に５５℃で一晩振盪しながらインキュベートした後、フェノール－クロロホルム抽出に供し、イソプロパノールで沈降させ、７０％のエタノールで洗浄することによってゲノムＤＮＡを単離した。ＤＮＡ試料を１０ｍＭのＴｒｉｓ／ＨＣＬ緩衝液（ｐＨ８．５）に溶解させた。５０μＬの反応液中、３７℃で５μｇのＤＮＡを３０ＵのＮｃｏＩで５時間消化した。熱不活化及び精製後、消化ＤＮＡを、５００μＬの反応緩衝液中、１６℃で２．５μＬのＴ４リガーゼ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｍ０２０２Ｌ）で一晩処理して分子内ライゲーションを行った。熱不活化及び精製後、再ライゲーション産物を、ＫＯＤ　Ｈｏｔ　Ｓｔａｒｔ　ＤＮＡポリメラーゼを使用するインバースＰＣＲに使用した。下記のプライマーを使用した：ＥＦ１αフォワード（配列番号２２４）及びリバース（配列番号２２５）、ｐＡフォワード（配列番号２２６）及びリバース（配列番号２２７）、ＨＳ４フォワード（配列番号２２８）及びリバース（配列番号２２９）。ＧＦＰドナーベクターで処理した試料の５’連結部及び３’連結部の分析には、それぞれＥｆ１αプライマー対及びｐＡプライマー対を使用した。グロビンドナーベクターで処理した試料の５’連結部及び３’連結部の分析には、それぞれＨＳ４プライマー対及びＥＦ１αプライマー対を使用した。ＰＣＲ増幅産物をゲル精製し、クローニングし、シークエンスし、ア

ライメントして組み込み部位を同定した。
【１０１２】
イン・アウトＰＣＲ：
インバースＰＣＲのセクションに記載のようにゲノムＤＮＡを抽出した。２５μｌの反応液中でのＫＯＤ Ｈｏｔ Ｓｔａｒｔ ＤＮＡポリメラーゼによるイン・アウトＰＣＲのテンプレートとして５ｎｇのゲノムＤＮＡを直接的に使用した。下記のＰＣＲプログラムを使用した：９４℃２分；９８℃１０秒、６６℃３０秒、及び６８℃１．５分を５サイクル；９８℃１０秒、６３℃３０秒、及び６８℃１．５分を５サイクル；９８℃１０秒、６０℃３０秒、及び６８℃１．５分を１５サイクル；６８℃５分。イン・アウトＰ１（配列番号２３０）、イン・アウトＰ２（配列番号２３１）、及びイン・アウトＰ３（配列番号２３２）をプライマーとして使用した。産物を１％のアガロースゲル中で分離した。１つの１．６ｋｂ単一バンドは、両方のアレルへの標的指向化組み込を示し、１つの１．６ｋｂバンド＋１つの２．０ｋｂバンドは、一方のアレルへの標的指向化組み込みを示し、１つの２．０ｋｂ単一バンドは、オフターゲット組み込みの可能性を示す。
【１０１３】
オフターゲット切断部位のインシリコでの予測：
オンラインツール（ｓａｎｇｅｒ．ａｃ．ｕｋ／ｈｔｇｔ／ｗｇｅ／ｆｉｎｄ＿ｏｆｆ＿ｔａｒｇｅｔｓ＿ｂｙ＿ｓｅｑにて利用可能）を使用してＡＡＶＳ１ガイド配列のヒトゲノム中オフターゲット部位またはマウスゲノム中オフターゲット部位を予測した。
【１０１４】
動物試験：
実験はすべて、管理を行うＩｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ Ｒｅｖｉｅｗ Ｂｏａｒｄ及びＩＡＣＵＣからの承認をもって実施した。マウスは、特定病原体が存在しない施設内に収容した。Ｂａｋｏｗｓｋａ ｅｔ ａｌ．（Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ，１０，１６９１－１７０２，２００３）に記載のようにマウスの凍結保存胚からＡＡＶＳ１トランスジェニックマウス（Ｃ３；Ｂ６－Ｔｇ（ＡＡＶＳ１）Ａ１Ｘｏｂ／Ｊ）（Ｔｈｅ Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）を個体復元させた。マウスは、ヒトＡＡＶＳ１遺伝子座についてヘミ接合型である。ＡＡＶＳ１トランスジェニックマウスをヒトＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$マウスと交配させてエクスビボ試験用のＡＡＶＳ１$^{+}$／$^{-}$／ＣＤ４６$^{+}$／$^{-}$マウス及びインビボＨＳＣ形質導入試験用のＡＡＶＳ１$^{+}$／$^{-}$／ＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$マウスを得た。ＣＤ４６マウスの遺伝子型判定には下記のプライマーを使用した：フォワード（配列番号２３３）及びリバース（配列番号２３４）。マウスがＣＤ４６についてホモ接合型であるか、またはヘテロ接合型であるかについては、フローサイトメトリーによって検出したＰＢＭＣ上のＣＤ４６発現の強度差によって同定した。ＡＡＶＳ１導入遺伝子の遺伝子型判定は、Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｓの推奨プロトコールに従ってＰＣＲによって実施した。
【１０１５】
骨髄Ｌｉｎ細胞移植：
６～８週齢の雌性Ｃ５７ＢＬ／６マウスをレシピエントとした。移植日に、レシピエントマウスに１０００Ｒａｄの照射を行った。照射から４時間後、尾静脈を介して１×１０$^{6}$個のＬｉｎ$^{-}$細胞を静脈内注射した。このプロトコールを、エクスビボで形質導入したＬｉｎ$^{-}$細胞の移植、及び二次レシピエントへの移植に使用した。
【１０１６】
ＨＳＣの動員及びインビボでの形質導入：
この手順については以前に記載されている（Ｒｉｃｈｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，１２８，２２０６－２２１７，２０１６）。簡潔に記載すると、ヒト組換えＧ－ＣＳＦ（Ａｍｇｅｎ Ｔｈｏｕｓａｎｄ Ｏａｋｓ，ＣＡ）を皮下注射（５μｇ／マウス／日、４日）した後、５日目にＡＭＤ３１００（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を皮下注射（５ｍｇ／ｋｇ）することによってマウスにおいてＨＳＣを動員した。さらに、ウイルス注射の１６時間前及び２時間前にデキサメタゾン（１０ｍｇ／ｋｇ）を動物に腹腔内注射した。ＡＭＤ３１００の注射から３０分後及び６０分後に、各ウイルスにつき注射当たり４

×１０$^{10}$ｖｐの用量で、後眼窩静脈叢を介してＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ及びＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーまたはＨＤＡｄ－グロビン－ドナーを動物に静脈内注射した。４週間後、時間間隔を３０分としてＯ$^{6}$－ＢＧ（１５ｍｇ／ｋｇ、ＩＰ）をマウスに２回注射した。２回目のＯ$^{6}$－ＢＧ注射から１時間後にＢＣＮＵ（５ｍｇ／ｋｇ、ＩＰ）をマウスに注射した。２回目のサイクルではＢＣＮＵ用量を１０ｍｇ／ｋｇに増やした。ＢＣＮＵ及びＯ$^{6}$－ＢＧは両方共、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから入手した。

【１０１７】

統計解析：

複数群の比較については、一元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）及び二元配置ＡＮＯＶＡを、多重比較のためのボンフェローニ事後検定と併用した。統計解析は、ＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍバージョン６．０１（ＧｒａｐｈＰａｄ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｉｎｃ．，Ｌａ Ｊｏｌｌａ，ＣＡ）を使用して実施した。

【１０１８】

結果

【１０１９】

ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲベクター及びＨＤＡｄ－ドナーベクターの設計．

ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を発現するＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを創出した。このベクターは、ＡＡＶＳ１遺伝子座内にｄｓＤＮＡ切断を創出する能力を有する（図５５Ａ）。この遺伝子座への部位特異的な組み込みが生じると、一次ヒト細胞において副作用を伴うことなく導入遺伝子が強固に発現するようになることが以前の研究によって実証された（Ｌｏｍｂａｄｒｏ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｍｅｔｈｏｄｓ，８，８６１－８６９，２０１１）。対応するＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲベクターの活性を試験するために、ヒトＣＤ３４＋細胞（ＨＳＣを濃縮した細胞画分）の形質導入を行った。感染から３日目にＡＡＶＳ１部位特異的な切断が４２％の頻度で生じたことがミスマッチ感受性ヌクレアーゼアッセイＴ７Ｅ１アッセイによって実証された（図５５Ｂ）。ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲによる挿入／欠失（インデル）のディープシークエンシングについては、予想ＡＡＶＳ１切断部位をまたぐ２５０ｂｐの領域に対するＰＣＲ増幅を実施し、産物を、Ｉｌｌｕｍｉｎａシステムを使用してシークエンスした（図５５Ｃ）。インデルの８０％は、１～２０ｂｐの範囲の欠失であり、１０％のみが１～２ｂｐのマイクロインサートであった。

【１０２０】

ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターをドナーベクターとして使用した。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９標的部位のすぐ隣に位置する領域に相同的な０．８ｋｂの長さの領域と両側で隣接するＧＦＰ及びｍｇｍｔ$^{Ｐ１４０Ｋ}$の発現カセットを第１のＨＤＡｄ－ドナーベクターに含めた（図５５Ｄ）。直鎖の二本鎖アデノウイルスゲノムは、それが細胞に侵入し、核に転位されるとウイルスによって産生される「末端タンパク質（ＴＰ）」と共有結合で連結される（Ｓｈｅｎｋ，Ｆｉｅｌｄｓ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，２：２１１１－２１４８，１９９６）。このことは、ＨＤＡｄ５／３５＋＋ゲノムにも当てはまり、この場合、ＴＰはヘルパーウイルス由来のものである。ドナー中に遊離ＤＮＡ末端が存在しないことによってＨＤＲが大幅に減少すると考えられる（Ｃｒｉｓｔｅａ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｂｉｏｅｎｇ，１１０，８７１－８８０，２０１３）。ＡＡＶＳ１ ＣＲＩＳＰＲのｓｇＲＮＡ標的部位をドナーベクターに含めてドナー導入遺伝子カセットと隣接させた（図５５Ｄ）。したがって、ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲとＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーとが同時感染すると、染色体ＡＡＶＳ１標的部位中にｄｓＤＮＡ切断が創出されると同時に、核内に侵入しているＨＤＡｄ－ドナーゲノムからドナーカセットが遊離することになる。同時感染したＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーベクターからＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ介在性にドナーカセットが遊離する効率は、総ＭＯＩを１０００ｖｐ／細胞及び２０００ｖｐ／細胞として感染を行ってから２日目のＣＤ３４$^{+}$細胞ではそれぞれ１３．２％及び１８．１％であることが実証された（図５５Ｅ）。この知見は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９が二本鎖の直鎖アデノウイルスＤＮＡを切断する能力を有することを示しており、このことは、抗ウイルス治療にも有意義なことである。

【１０２１】
インビトロでの標的指向化組み込み．
最初に、インビトロでの標的指向化組み込みについてＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－ドナーベクター系を試験し、無作為組み込みを媒介するＳＢ１００ｘベクター系と直接的に比較した（図５６Ａ）。ＨＵＤＥＰ－２細胞（ヒト赤血球前駆細胞）を使用した。この細胞株は二倍体であり、さらに、単一コロニーの増殖が可能であり、こうしたことは、組み込み部位分析が容易になる特徴である。ＨＵＤＥＰ－２細胞の形質導入から２日目に実施したＧＦＰフローサイトメトリーから、ＧＦＰ陽性細胞のパーセントは、ＳＢ１００ｘ介在性の組み込み系及び標的指向化組み込み系で同様であることが実証され、このことは、形質導入率が同様であることを示している（図５６Ｂ、上パネル）。ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナー単独での形質導入でも同様のＧＦＰマーキング結果が得られたことから、２日目のＧＦＰ発現はおそらくエピソームゲノムを起源とするものである。形質導入細胞を２１日間培養した後は、ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナー単独の状況ではＧＦＰ発現が見られなくなったことが示すように、細胞増殖に起因してエピソームゲノムは消失した。２１日目の時点で、細胞のＧＦＰ陽性率は、ＳＢ１００ｘ介在性の組み込み系及び標的指向化組み込み系で、それぞれ４．５２％及び１．８２％であった（図５６Ｂ、下パネル）。このことは、ＳＢ１００ｘ系の方が安定形質導入率が高いことを示唆している。しかしながら、ＧＦＰ発現のレベル（平均蛍光強度（ＭＦＩ）によって反映される）は、２１日目の細胞集団においても（図５６Ｃ）、単一クローンレベルでも（図５６Ｄ）、ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーで形質導入した細胞の方が高かった。単一クローンにおいてベクター組み込み分析を実施した。導入遺伝子カセットと隣接する相同領域は長いものであるため、ベクター組み込み部位分析に一般に使用されるツール（例えば、ＬＡＭ－ＰＣＲ）を利用することは不可能であった。ベクター－細胞ＤＮＡ連結部の存在を実証するために、エンドヌクレアーゼによってゲノムＤＮＡを切断して４ｋｂの断片とし、そうした断片を環状化させた後、導入遺伝子特異的プライマーを用いるＰＣＲを行うインバースＰＣＲ（ｉＰＣＲ）法を使用した（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｖｉｒｏｌ，７９，１０９９－１１０１３，２００５）。ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーで形質導入したＨＵＤＥＰ－２細胞から得られたコロニーを３６個試験し、そのすべてが、ＡＡＶＳ１部位に組み込まれた導入遺伝子を有することが結果から示された（図５７Ａ）。このことは、標的指向化組み込みがなされたクローンでは導入遺伝子が均一に高レベル発現したことと一致する。ＡＡＶＳ１特異的プライマー及び導入遺伝子特異的プライマーを用いたイン・アウトＰＣＲからは、３６個のコロニーのうちの３つでは、両方のアレルに組み込みが生じており、３６個のうちの３１個は、一方のアレルに組み込みを有し、２つは、見たところ鎖状体組み込みを有することが明らかとなった（図５７Ｂ）。対照的に、ＳＢ１００×介在性の無作為組み込みでは、特定の遺伝子座が選択的に標的となることはなく（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２０１９．Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｉｎｖｅｓｔ，１２９，５９８－６１５、Ｂｏｅｈｍｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ，５，ｅ３３７，２０１６）、その結果、遺伝子サイレンシングのレベルは多様なものであった（図５６Ｅ）。ＳＢ１００×介在性組み込みがなされたクローンと標的指向化組み込みがなされたクローンとでは、検出されたベクターコピー数のレベルは同様であった（図５６Ｆ）。

【１０２２】
まとめると、ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナー系は、高い効率で標的指向化組み込みを生じさせ、その結果、ＳＢ１００ｘ介在系と比較して高いレベルでＧＦＰを発現させることがインビトロ試験によって示された。安定な組み込みの効率は標的指向化系と比較して４０％低かった。

【１０２３】
ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーを用いるＡＡＶＳ１／ＣＤ４６　ＨＳＣのエクスビボでの形質導入、及びその後の致死性照射レシピエントへの移植．
次に、ＡＡＶＳ１／ＣＤ４６ｔｇマウスから得られたＨＳＣにおいて標的指向化組み込

み系を試験した。系譜陰性（Ｌｉｎ－）細胞（ＨＳＣを濃縮した骨髄細胞画分）のエクスビボでの形質導入後の標的部位切断頻度は、ＭＯＩを１０００ｖｐ／細胞としてＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲベクターで形質導入した後では２５％であった（図５８Ａ）。図５８Ｂには、０％及び５０％の切断率での挿入／欠失のパーセントが示される。図５８Ｃには配列の例が示される。ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ単独、ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナー単独、及び両方の組み合わせを用いてエクスビボで形質導入したＡＡＶＳ１／ＣＤ４６Ｌｉｎ－細胞を致死性照射Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに移植し、その後にこれらのマウスを１６週間経過観察した（図５９Ａ）。ＰＢＭＣ上でのヒトＣＤ４６の発現に基づく移植細胞の生着を、示される時点でのＣＤ４６＋ＰＢＭＣのパーセントによって測定した。形質導入したドナー細胞はＣＤ４６を発現するものであるが（図６０Ｂ）、レシピエントとしたＣ５７Ｂｌ／６マウスはＣＤ４６を発現しないものである。図６０Ｃ及び図６０Ｄには、ＰＢＭＣ（血液）、脾臓、及び骨におけるＣＤ４６＋細胞のパーセントが示される。コロニー及びプールしたコロニー細胞においてもＧＦＰマーカーの発現を分析した。

【１０２４】

３つすべての状況でドナー細胞の生着率は同等であり（図６０）、このことは、ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲベクター及びＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲベクター＋ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーベクターによってＨＳＣに導入されたゲノム改変がＨＳＣ生物学に有害作用を及ぼすことはなく、具体的には、致死性照射レシピエントの多系譜再増殖に有害作用を及ぼさなかったことを示唆している。導入遺伝子を安定的に発現するＨＳＣ／前駆細胞を$O^6$ＢＧ／ＢＣＮＵによって３回選択した後にはＰＢＭＣにおいてＧＦＰマーキング率１００％への到達が見られた（図５９Ｂ、図５９Ｃ）。選択前（移植から４週間間）にはＧＦＰ＋ＰＢＭＣのパーセントは１．１％であり、このことは、標的指向化組み込みが希少な事象であることを示している。ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーのみで形質導入を行ったＬｉｎ－細胞を移植したマウスにおけるＧＦＰ＋ＰＢＭＣの平均％は０．２％未満であった。この点によって、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９介在性にｄｓＤＮＡを切断して安定な導入遺伝子発現を達成する必要性が出てくる。移植後１６週目に分析したマウスでは、骨髄、脾臓、及びＰＢＭＣにおいて分析したすべての系譜にＧＦＰマーキングが生じていることが示された（図５９Ｄ）。血液、脾臓、及び骨髄（図６１Ｂ、図６１Ｃ）を含めて、二次移植レシピエントにおいてＧＦＰマーキング率は１６週間維持され、このことは、ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲベクター＋ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーベクター系によって未分化ＨＳＣが遺伝子改変されたことを実証するものであり（図６１Ａ）、コロニー及びプールしたコロニー細胞についても同様のことが示された（図６１Ｄ）。図６１Ｅ及び図６１Ｆには、ヒトＣＤ４６＋細胞のパーセントならびに血液、脾臓、及び骨髄におけるパーセントがさらに示される。

【１０２５】

ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーを用いるＡＡＶＳ１／ＣＤ４６ｔｇマウスにおけるインビボでのＨＳＣの形質導入．

ＡＡＶＳ１／ＣＤ４６トランスジェニックマウスにおけるインビボでのＨＳＣの形質導入については、Ｇ－ＣＳＦ／ＡＭＤ３１００を皮下注射することによってＨＳＣを骨髄から末梢血流に動員し、ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲベクター＋ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーベクターを静脈内送達することによってインビボで形質導入した（図６２Ａ）。$O^6$ＢＧ／ＢＣＮＵでのインビボ選択を３サイクル経ると、マウスの６０％がＰＢＭＣにおけるＧＦＰ発現を示し、個々の動物でのＧＦＰ＋ＰＢＭＣのパーセントは３５～９５％の範囲であった（図６２Ｂ）。インビボ形質導入から１６週目には、血液、脾臓、及び骨髄中の単核細胞に同様のマーキングが見られた（図６２Ｃ）。ＧＦＰマーキングは、血液、脾臓、及び骨髄中のＣＤ３＋系譜細胞、ＣＤ１９＋系譜細胞、及びＧｒ－１＋系譜細胞において見られた（図６２Ｄ）。「レスポンダー」の骨髄では、ＬＳＫ細胞（ＨＳＣが濃縮された画分）の５０％超がＧＦＰ陽性であった（図６２Ｄ、最後の群）。このことは、ＨＳＣの機能性アッセイ（前駆細胞コロニーを形成する能力）にも反映されていた（図６２Ｅ）。さらに、未分化の長期再増殖ＨＳＣの形質導入は、二次レシピエントにおいても示された（示

される時点でのＧＦＰ＋ＰＢＭＣのパーセント（図６３Ａ）、血液、脾臓、及び骨髄中のＧＦＰ＋細胞のパーセント（図６３Ｂ、図６３Ｃ）、ヒトＣＤ４６＋細胞のパーセント（図６３Ｄ）、ならびに血液、脾臓、及び骨髄におけるパーセント（図６３Ｅ）を参照のこと）。インビボでのＨＳＣの形質導入／選択手順が骨髄細胞組成及び造血に負の影響を与えることはなかった（図６２Ｆ）。

【１０２６】

ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ及びＨＤＡｄ－グロビン－ドナーベクターを用いるエクスビボ及びインビボでのＨＳＣの形質導入．

ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーベクターを用いる試験は、大半の動物においてＨＳＣが安定的に形質導入されることを示唆しているが、レスポンダー率を高めることが望ましいであろう。これを達成するには、ＨＤＲ介在性組み込みの効率を向上させることが必要になり、この向上は、ホモロジーアームの長さを延長することによって達成され得る（Ｂａｌａｍｏｔｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，３２４，２２９－２３７，２００４、Ｏｈｂａｙａｓｈｉ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ，１０２，１３６２８－１３６３３，２００５、Ｓｕｚｕｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ，１０５，１３７８１－１３７８６，２００８）。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９切断部位の両側に位置するＡＡＶＳ１ゲノム配列に相同的な１．８ｋｂの領域を有する新たなＨＤＡｄ－ドナーベクターを生成させた（図６４Ａ）。異常ヘモグロビン症の遺伝子治療での適用に向けて、小型γ－グロビンＬＣＲの制御下にあるヒトγ－グロビン遺伝子（ＨＢＧ１）を使用した。このＨＤＡｄ－グロビン－ドナーベクターを、エクスビボのＨＳＣ形質導入プロトコール及びインビボのＨＳＣ形質導入プロトコールの両方で試験した。エクスビボでの形質導入状況では（図６４Ｂ）、すべてのマウスがレスポンダーとなり、マウスの末梢赤血球（ＲＢＣ）の８０％がγ－グロビンを発現することが観察された（図６４Ｃ）。血液及び骨髄中のγ－グロビン陽性赤血球（Ｔｅｒ１１９$^{+}$）細胞のパーセントは、非赤血球（Ｔｅｒ１１９$^{-}$）細胞のものと比較して有意に高かった（図６４Ｄ）。同じことがγ－グロビンＭＦＩにも当てはまった（図６４Ｅ）。このことは、小型ＬＣＲによって赤血球細胞の選択的な発現が生じることを示唆している。１６週目の時点でのγ－グロビンのレベルは、成体型マウスγ－グロビンのレベルに対するパーセントで、ＨＰＬＣによって測定すると２０．５２（＋／－５．６６）％であり（図６４Ｆ）、ｑＲＴ－ＰＣＲによって測定すると２２．３３（＋／－６．２１）％であった（図６４Ｇ）。ＳＢ１００ｘ系を用いて同じレジメン下で実施した以前の試験では、γ－グロビン発現レベルは、ＨＰＬＣによるものが１５．７４（＋／－２．６９）％であり、ｑＲＴ－ＰＣＲによるものが１５．４０（＋／－９．２１）％であった（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ，９，１４２－１５２，２０１８）。このことは、ＳＢ１００ｘ系と比較して標的指向化組み込み系の方がγ－グロビンの発現レベルが高いことを暗示している。$\beta_0$／$\beta_0$サラセミア患者または鎌状赤血球症患者については成体型グロビンに対するγ－グロビンのパーセントが２０％であることが治癒レベルであると考えられており（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，．Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ，１２９，５９８－６１５，２０１９）、実際、標的指向化組み込み系については、γ－グロビンの発現レベルがこの治癒レベルの範囲内にあることになる。以前の試験（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，．Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ，１２９，５９８－６１５，２０１９）と一致して、１６週目に単一Ｌｉｎ$^{-}$細胞由来のコロニーにおいて測定したゲノム当たりの組み込みベクターコピー数は平均で２であった（図６４Ｈ）。Ｌｉｎ$^{-}$細胞のエクスビボでのＨＳＣの形質導入は、致死性照射レシピエントにおける多系譜生着及び完全な造血再構成を行うその能力に影響を与えることはなかった（示される時点でのヒトＣＤ４６＋細胞のパーセント（図６５Ａ）、血液、脾臓、及び骨髄におけるパーセント（図６５Ｂ）を参照のこと）。二次ＨＳＣ移植レシピエントの分析からは、ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲベクター＋ＨＤＡｄ－グロビン－ドナーベクターを用いてエクスビボで形質導入を行った後にインビボでの選択を行っても長期再増殖能力を有するＨＳＣのプールに影響が及ぶことはないことが示された（ＲＢＣにおけるヒトγ－グロビン＋細胞のパーセ

ント（図６６Ａ）、ヒトＣＤ４６＋細胞のパーセント（図６６Ｂ）、ならびに血液及び骨髄におけるパーセント（図６６Ｃ）を参照のこと）。

【１０２７】

ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲベクター＋ＨＤＡｄ－グロビン－ドナーベクターを用いたインビボＨＳＣ形質導入試験では（図６７Ａ）、インビボでの選択後に５匹中４匹のマウスがＲＢＣにおいてγ－グロビンを安定的に発現し、個々のマウスにおけるγ－グロビン$^{+}$ＲＢＣのパーセントは４０～９７％の範囲であった（図６７Ｂ）。γ－グロビン発現は、赤血球細胞選択的であることが明らかとなった（図６７Ｃ、図６７Ｄ）。ＲＢＣ中のγ－グロビンの発現レベルは、成体型マウスγ－グロビンの発現レベルに対するパーセントで、ＨＰＬＣによるものが２３．９７（＋／－７．２２）％であり（図６７Ｅ、図６７Ｈ）、ｑＲＴ－ＰＣＲによるものが２４．５３（＋／－７．３４）％であった（図６７Ｆ）。個々のマウスにおける細胞当たりのベクターコピー数は、１．５～２．５の範囲であった（図６７Ｇ）。同じインビボＨＳＣ形質導入／選択状況において、γ－グロビンベクターに基づいてＳＢ１００ｘを使用すると、γ－グロビンレベルは、ＨＰＬＣによるもので１０．５（＋／－３．１）％であり、ｑＲＴ－ＰＣＲによるもので１２．１７（＋／－３．３８）％であり、ゲノム当たりの組み込みベクターコピー数は平均で２であった（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ，１２９，５９８－６１５，２０１９）。ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－グロビン－ドナーを用いてインビボで形質導入してから１６週目に収集した骨髄Ｌｉｎ$^{-}$細胞を致死性照射レシピエントに移植したところ、生着率は１００％となり、１６週間にわたってＲＢＣにおいてγ－グロビンが安定的に発現し、成体型β－グロビンに対するγ－グロビンの平均レベルは２４％であった（示される時点でのＰＢＭＣにおけるヒトＣＤ４６＋細胞のパーセント（図６８Ａ）、示される時点での末梢血におけるγ－グロビン＋細胞のパーセント（図６８Ｂ）、マウスβ－メジャータンパク質に対するパーセントとしてのヒトγ－グロビン（図６８Ｃ）、ならびに血液、脾臓、及び骨髄におけるパーセント（図６８Ｄ）を参照のこと）。

【１０２８】

まとめると、ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－グロビン－ドナーを用いてＨＳＣ形質導入試験を行った結果、ＳＢ１００ｘベースの系を用いた以前の試験で達成されたものと比較して有意に高いレベルでγ－グロビンが安定的に発現した。

【１０２９】

ＡＡＶＳトランスジェニックマウスにおけるＡＡＶＳ１遺伝子座の局在．

組み込み部位分析のためのインバースＰＣＲ（ｉＰＣＲ）を行うには、ＡＡＶＳ１／ＣＤ４６トランスジェニックマウスのゲノム中のＡＡＶＳ１遺伝子座の局在について知る必要がある。このことを突き止めるために、物理的に近位の配列を架橋することを行う標的遺伝子座増幅（ＴＬＡ）／ＰＣＲ技術を使用した（ｄｅ Ｖｒｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ，３２，１０１９－１０２５ ２０１４、材料及び方法を参照のこと）。次に、ＡＡＶＳ１／ＣＤ４６－ｔｇマウス由来の骨髄細胞から得られたＴＬＡデータを参照マウスゲノムとアライメントした（図６９）。ＴＬＡの結果は、１４番染色体の位置（Ｃｈｒ１４：１１０４４３８７１～１１０４６１８３４）に１８ｋｂのＡＡＶＳ１遺伝子座が組み込まれていることを示すものである（図５５Ｂ）。この情報を使用して、プライマーを使用して遺伝子座のシークエンスを行った（図７０）。左から右向き及び右から左向きでＡＡＶＳ１遺伝子座の反復配列が存在していることが明らかとなった。両末端に位置する反復配列（＃１及び＃５）は切断型であり、それぞれ４．５ｋｂ及び２．８ｋｂの長さを有してた。反復配列＃５は、５’相同領域を完全に欠いていた。この一連の標的部位は組み込み部位分析を複雑化するものであった。図７０には、ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－ドナー系による組み込みの理論的な結果のいくつかが概略として示される。

【１０３０】

ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－ドナーを用いるエクスビボ及びインビボでのＨＳＣの形質導入後の染色体への組み込み．

最初に、１６週目に収集した骨髄細胞から得られたＤＮＡに対してゲノムサザンブロットを実施した。ＡＡＶＳ１に特異的なプローブを用いてＥｃｏＲＩ消化ゲノムＤＮＡのハイブリダイゼーションを行ったところ、分析したマウスのすべてにおいて３．９ｋｂに特異的なバンドが存在することが示され、このバンドは、ＡＡＶＳ１遺伝子座の反復配列のうちの１つ（または複数）にドナーカセットが組み込まれたことを示すものである（図７１Ａ）。ＧＦＰプローブを用いてＢｌｐ１消化ＤＮＡのハイブリダイゼーションを行ったところ、１０匹中５匹のマウスにおいて５．８ｋｂのシグナルが得られ、これは、全長反復配列＃２～４への組み込みを表すものである（図７１Ｂ）。５ｋｂのシグナル及び６ｋｂのシグナルは、それぞれ反復配列＃１及び反復配列＃５への組み込みが生じた結果である可能性がある。１０匹中２匹のマウスでは、いくつかのＡＡＶＳ１モチーフ反復配列への組み込みが生じたものと思われた。導入遺伝子／染色体連結部の存在を実証するために、マウスから得られたゲノムＤＮＡに対してｉＰＣＲを実施した（図７２Ａ、図７２Ｂ）。分析した８匹中６匹のマウスにおいて、ＡＡＶＳ１部位へのＨＤＲ介在性の組み込みと一致するＰＣＲ産物が得られた（図７２Ｂ）。これらのマウスの何匹かには、５番染色体上のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９オフターゲット部位のうちの１つへの組み込みに由来するバンドが追加で存在した（図７２Ｂ）。連結部としてＩＴＲを含む全長ＨＤＡｄゲノムが組み込まれたことに由来するバンドも見られた。興味深いことに、こうした組み込み全長ＨＤＡｄゲノムは、１４番染色体（ＣＲＩＳＰＲ　ＡＡＶＳ１標的部位を含む染色体）上に存在した（図７２Ｂ）。骨髄細胞のプールから得られたこうした結果を紐解くために、ＧＦＰ$^{+}$骨髄Ｌｉｎ$^{-}$細胞を播種して、単一細胞由来の前駆細胞コロニーを得た（図７２Ｃ）。ＡＡＶＳ１へのＨＤＲ組み込みに特異的なバンドを１つのみ有するマウス（例えば、マウス＃９４３）から得られたコロニーを分析すると、すべてのコロニーにおいて均一なシグナルが得られた一方で、追加のオフターゲット組み込みを有するマウス（例えば、＃９４６）から得られたコロニーは、オンターゲット組み込みのみを有するコロニーの数が１０中９であり、１つのコロニーは、オンターゲット組み込みとオフターゲット組み込みとの両方を含む（このことは、ゲノム当たりの平均組み込み導入遺伝子数が２であるために可能になる）というキメラパターンを示した。ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲベクター及びＨＤＡｄ－グロビン－ドナーベクターを用いたエクスビボ形質導入試験及びインビボ形質導入試験での骨髄細胞の組み込み部位分析でも同様の結果が得られた（図７３Ａ及び図７３Ｂ（オンターゲット組み込み（図７３Ａ）ならびにオンターゲット組み込み及び／またはオフターゲット組み込みを有する試料（図７３Ｂ）を示す））。ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－グロビン－ドナーを用いたエクスビボＨＳＣ形質導入状況では、ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナーベクターを用いたインビボＨＳＣ形質導入試験と比較して、標的指向化組み込みを有する動物の割合が高いことが明らかとなった。このことは、相同領域が長くなったことに基づくＨＤＲ効率の向上によるものであり得る。

【１０３１】

全体として、こうした組み込み試験は、ＡＡＶＳ１遺伝子座への標的指向化組み込みの頻度が高いことを示す。組み込みの一部はＣＲＩＳＰＲオフターゲット部位に生じ、これに加えておそらくは、標的部位を含む染色体上でＣＲＩＳＰＲ誘発性の大きな欠失が生じた領域に生じたものと思われる。

【１０３２】

考察．

ガンマ－レトロウイルスベクターとは対照的に、自己不活型レンチウイルスベクターは、臨床的なＨＳＣ遺伝子治療治験では、挿入部位と関連する悪性クローンの増殖と結び付いてはいない。しかしながら、非ヒト霊長類での最近の研究が示すように、このリスクを完全に排除することは不可能である（Ｅｓｐｉｎｏｚａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ，６，１０７４－１０８６，２０１９）。理論的には、ＳＢ１００ｘによって媒介される組み込みパターンが無作為であること、ならびに活性な遺伝子及びプロモーターへの組み込みが選択的に生じないことによって、安全性は増すはずであるが、遺伝毒性に関する懸念は残る。したがって、当該分野での主眼は、事前に選択された部位（ＡＡＶＳ１部位

など）を標的として導入遺伝子を組み込むことに向けられている。ヒトＨＳＣでのジンクフィンガーヌクレアーゼｍＲＮＡ及びＡＡＶ６介在性のドナーテンプレートの送達では、ＡＡＶＳ１遺伝子座への標的指向化組み込み率は５０％を超えた（Ｄｅ Ｒａｖｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ，３４，４２４－４２９，２０１６）。ドナーテンプレートの送達にＡＡＶＳ１特異的ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ ＲＮＰ及びＡＡＶ６を用いた他の研究では、部位特異的な組み込みの頻度は２５％であった（Ｊｏｈｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，２０１８．Ｓｃｉ Ｒｅｐ，８，１２１４４）。ＣＣＲ５への標的指向化組み込みについても同様の割合が達成された（Ｈｕｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ，２６，４５６－４６７，２０１８）。

【１０３３】

ＡＡＶＳ１へのこの標的指向化組み込み手法は、新たな側面を多く有する。（ｉ）ドナーテンプレートの送達にヘルパー依存型カプシド改変ＨＤＡｄベクターが使用される。対応ゲノムは、ウイルスＴＰタンパク質と両末端が共有結合で連結された二本鎖の直鎖ＤＮＡである。一本鎖ＡＡＶ６ドナーベクターとは対照的に、二本鎖の直鎖アデノウイルスＤＮＡはＨＤＲに最適なテンプレートではないと考えられる。この潜在的不利を補うために、ＡＡＶＳ１ ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９切断部位をＨＤＡｄ－ドナーベクターに含めて遊離の「組換え誘導性」ＤＮＡ末端が創出されるようにした。（ｉｉ）ＨＤＡｄベクターの挿入容量は３０ｋｂであるため、ｒＡＡＶ６ベクターまたはＩＤＬＶベクターならパッケージング容量を超過してしまうことになるホモロジーアームを含めることが可能であった。以前の研究（Ｂａｌａｍｏｔｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，３２４，２９－２３７，２００４、Ｏｈｂａｙａｓｈｉ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ，１０２，１３６２８－１３６３３，２００５、及びＳｕｚｕｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ，１０５，１３７８１－１３７８６，２００８）ならびに０．８ｋｂの相同領域を有するＨＤＡｄ－ドナーベクターと１．８ｋｂの相同領域を有するＨＤＡｄ－ドナーベクターとの比較は、相同性が上昇すると、導入遺伝子を高レベル発現するレスポンダーマウスの数、ならびに標的指向化組み込みが生じるマウスの割合が改善されることを示唆している。（ｉｉｉ）ＨＤＡｄ５／３５＋＋の挿入容量が大きいことによって$mgmt^{P140K}$ベースのインビボ選択カセットをドナーテンプレートに含めることも可能になり、これによって、形質導入された未分化ＨＳＣのプールに影響を与えることなく低用量の$O^6$ＢＧ／ＢＣＮＵでの短期的処理によって子孫細胞の選択的な生存及び増殖が媒介された（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ，８，５２－６４，２０１８）。ＨＤＲ及び結果的なＨＳＣへの標的指向化組み込みの効率が低いことを考慮すると（Ｇｅｎｏｖｅｓｅ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，５１０，２３５－２４０，２０１４）、インビボでのＨＳＣの選択は、末梢血液細胞において導入遺伝子マーキングを高レベルで達成する上で決定的なものであると思われる。（ｉｖ）最後に、ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターは高収率で産生させることが容易であり、未分化ＨＳＣへの指向性を有することから、動員処理動物への静脈内注射を介するインビボでのＨＳＣの形質導入に使用することができる。したがって、標的指向化された導入遺伝子組み込みを行う異常ヘモグロビン症のインビボＨＳＣ遺伝子治療の原理証明を実施することが可能であった。

【１０３４】

導入遺伝子（ＧＦＰまたはγ－グロビン）の安定的な発現を達成するには、ＨＤＡｄ－ドナーとＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲとの同時感染が必要不可欠であり、このことは、ゲノムＤＮＡがＣＲＩＳＰＲ介在性に切断されること、及び最も高い可能性としてはＨＤＡｄ－ドナーベクターからドナーテンプレートが遊離することが組み込みを大幅に刺激したことを示唆している。インビボでの選択の完了後に導入遺伝子を高レベルで安定的に発現するマウス（すなわち「レスポンダー」）の割合を、ＨＤＡｄ－ドナー＋ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲを用いたインビボでの形質導入後のＨＳＣへの導入遺伝子組み込みを示す指標とした。この指標は、ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ドナー＋ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲについては１６匹中６匹（３７．５％）であり、ＨＤＡｄ－グロビン－ドナー＋ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲにつ

いては５匹中４匹（８０％）であった。注目すべきは、標的指向化組み込みが高頻度で生じた場合の「レスポンダー」率は、エクスビボ形質導入状況において両ベクター共に１００％であったことである。このことは、標的指向化されたインビボＨＳＣ形質導入手法の律速因子がＨＳＣの感染効率であることを示している。最初の感染ステップは、ＨＳＣ動員レジメンを最適化し（Ｐｓａｔｈａ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ，２５，３１７－３２７，２０１４）、間隔を１日としてＨＤＡｄの注射を２回行うことによって理論的には改善可能である。

【１０３５】

こうしたデータは、エクスビボ及びインビボの形質導入状況においてＨＳＣへの標的指向化組み込みを達成する上でベクター系が有効なツールであることを示している。このことの大部分は、非分裂細胞の核へのＨＤＡｄ－ドナーベクターの送達効率が高いこと、ベクター骨格からドナーカセットを遊離させる能力が存在すること、及びＨＤＡｄベクターが大きな相同領域を収容する容量を有すること、によるものであり得る。

【１０３６】

この試験での重要な知見は、インビトロ、エクスビボ、及びインビボの形質導入状況において、標的指向化組み込み系によってＳＢ１００ｘベースの系と比較して高いレベルで導入遺伝子発現が生じるということであった。このことは、成体型グロビンレベルに対するγ－グロビンのレベルが２０％を超える必要がある異常ヘモグロビン症（$\beta_0$／$\beta_0$サラセミア及び鎌状赤血球症）の遺伝子治療に特に適することである。ＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ＋ＨＤＡｄ－グロビン－ドナーを用いてエクスビボまたはインビボで形質導入された「レスポンダー」マウスでは、こうした理論的治癒レベルが達成された。このことは、γ－グロビン遺伝子付加にＳＢ１００ｘトランスポゼース系を利用したサラセミアマウスモデルでの以前の研究（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ，１２９，５９８－６１５，２０１９）に勝るこの重要な改善である。ＨＳＣ（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ，１７，１１８６－１１９４，２００７、Ｈｕｓｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＰＬｏＳ Ｐａｔｈｏｇ，６，ｅ１０００９８５，２０１０、ｖａｎ Ｒｅｎｓｂｕｒｇ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ，２０，２０１－２１４，２０１３）及びＡＡＶＳ１トランスジェニックマウスにおいてオープンクロマチン立体形状を維持することが知られるＡＡＶＳ１遺伝子座に組み込みが生じた場合、その後の導入遺伝子発現に対するエピゲノム効果はあまり顕著ではない可能性がある。一方で、サイレンシングを受ける領域への導入遺伝子組み込みがＳＢ１００ｘ介在性に無作為に生じることを排除することは不可能である。

【１０３７】

組み込み部位分析は、ＨＵＤＥＰ－２細胞のインビトロでの形質導入後にほぼ１００％の効率で標的指向化組み込みが生じることを示唆している。エクスビボ及びインビボのＨＳＣ形質導入試験では、骨髄ゲノムＤＮＡに対するサザンブロット及びｉＰＣＲの両方によって、骨髄ＨＳＣにおいて効率的な標的指向化組み込みが生じることが示された。例えば、組み込み連結部のｉＰＣＲからは、マウスの７５％に標的指向化組み込みが生じており、こうしたマウスの大部分がオフターゲット組み込みを有さないことが実証された。このことは、単一ＣＦＵから得られたコロニーの分析によってさらに確認された。頻度は低かったが、インシリコで予測されたＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ９オフターゲット部位のうちの２つにも組み込みが見られた。さらに、１４番染色体（ＡＡＶＳ１遺伝子座を保有する染色体）に全長ＨＤＡｄ－ドナーゲノムが組み込まれることも見られた。ＨＤＡｄ ＩＴＲにはＤＮＡ切断が生じやすく、この結果、ゲノム部位にＤＮＡ切断が生じた場合に、非効率ではあるがそこに組み込みが生じ得ることが以前に明らかとなった（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｖｉｒｏｌ，７９，１０９９９－１１０１３，２００５、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｖｉｒｏｌ，８０，１１６９９－１１７０９，２００６）。標的部位付近に望ましくない大きな欠失／転座（７～８ｋｂ）がＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９によって誘導されることに関する最近の研究（Ｋｏｓｉｃｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ，３６，７６５－７７１，２０１８）を考慮すると、標的部位から遠く離れた位置

にＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９によってＤＮＡ切断が生じることが、完全なＨＤＡｄゲノムの組み込みに関与している可能性があり得る。全体として、大きな欠失／転座に関する報告は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９の安全性に疑問を投げかけるものである。一方で、動物におけるＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９介在性の生殖細胞系列編集と関連する発生的な作用は今までのところ報告されていないことから、そのような有害な染色体変化を有する細胞は発生の間に選択的に除去される可能性がある。この仮説は、ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ９による編集を受けたＨＳＣが移植され、ＨＢＧ１／２領域中の９ｋｂの欠失が時間と共にＰＢＭＣから消失した最近のＮＨＰ研究によって裏付けられる（Ｈｕｍｂｅｒｔ　ｅｔ　ａｌ．，２３ｒｄ　Ａｎｎｕａｌ　Ｍｅｅｔｉｎｇ　ｏｆ　ｔｈｅ　ＡＳＧＣＴ，ａｂｓｔｒａｃｔ　＃９７４，２０１９）。

【１０３８】

こうした研究から、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を使用する標的指向化組み込み試験にはＡＡＶＳ１ｔｇマウスモデルは最適下なものであると結論付けることができ、この理由は、ＡＡＶＳ１標的遺伝子座が複数存在しており、そのいくつかはＨＤＡｄ－ドナーベクターとの相同性領域を失うほどに切断されたものであったことによるものである。切断型ＡＡＶＳ１遺伝子座の存在は、以前に報告されたようにＡＡＶＳ１トランスジェニックマウスにおいて再編成が生じ得ることも示唆している（Ｌｉｎｄｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ，９３，７９６６－７９７２，１９９６）。

【１０３９】

実施例６．

免疫チェックポイント阻害剤での予防的インビボ造血幹細胞遺伝子治療は、同系マウス腫瘍モデルにおける腫瘍増殖を好転させる．

【１０４０】

この実施例に含まれる情報の少なくともいくつかは、Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．（Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．８０（３）：５４９－５６０，２０２０（２０１９年１１月１４日にオンラインで公開））に公開されたものである。

【１０４１】

がん関連の生殖細胞系列変異に対する集団規模の検査によって、卵巣癌及び乳癌の５分の１超が遺伝性リスクと関連することが明らかにされている。高リスク変異を有する女性に現在与えられる有効な選択肢は、卵管卵巣摘出及び／または乳房切除のみである。目的は、遺伝性変異の保因者に免疫予防を与える持続性の手法を開発することである。この手法では、腫瘍が造血幹／前駆細胞（ＨＳＰＣ）を骨髄から動員し、動員されたＨＳＰＣが腫瘍によって発がん促進細胞へと分化することが早期に生じるという事実が利用される。インビボでＨＳＰＣを遺伝子改変するために技術的に簡単な技術が開発されている。この技術は、ＨＳＰＣを動員し、組み込みＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを静脈内注射するというものである。ＧＦＰ発現ベクターを用いてインビボでのＨＳＰＣの形質導入を行い、その後に同系腫瘍細胞を移植すると、腫瘍浸潤性白血球においてＧＦＰマーキング率が８０％超となった。導入遺伝子の発現を制御するために、腫瘍へのＨＳＰＣの動員及び腫瘍による動員ＨＳＰＣの分化が生じたときにのみ活性化されるｍｉＲＮＡ制御系を開発した。この手法を、免疫チェックポイント阻害剤αＰＤ－Ｌ１－$\gamma_1$をエフェクター遺伝子として使用して試験した。マウス乳癌（ＭＭＣ）腫瘍を移植したインビボＨＳＰＣ形質導入マウスでは、最初に腫瘍増殖が生じた後に腫瘍は退縮し、観察期間を通じて再発することはなかった。この退縮はＴ細胞介在性のものであった。抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体を用いる「従来の」治療では顕著な抗腫瘍効果が得られなかった。このことは、αＰＤ－Ｌ１－$\gamma_1$の発現が早期に自己活性化することによってＭＭＣ腫瘍中の免疫抑制環境が克服され得ることを示している。この手法の有効性及び安全性を、典型的な生殖細胞系列変異を有する卵巣癌モデル（ＩＤ８　ｐ５３$^{-/-}$ｂｒｃａ２$^{-/-}$）において予防的状況及び治療的状況の両方でさらに検証した。

【１０４２】

材料及び方法．

【１０４３】
ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクター：
ＨＤＡｄ－ＳＢについては、Ｒｉｃｈｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．１２８：２２０６－２２１７，２０１６に記載されている。マウスαＰＤ－Ｌ１－γ$_1$導入遺伝子については、Ｅｎｇｅｌａｎｄ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２２：１９４９－１９５９，２０１４に記載されており、１１６細胞におけるＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクター産生については、Ｐａｌｍｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，３３－５３，２００９に記載されている。ヘルパーウイルスの混入レベルは０．０５％未満であることが明らかとなった。力価は６～１２×１０$^{12}$ｖｐ／ｍｌであった。この試験で使用したＨＤＡｄベクターはすべて、Ａｄ５ファイバーテール、Ａｄ３５ファイバーシャフト、及び親和性増強型Ａｄ３５＋＋ファイバーノブから構成されるキメラファイバーを含む（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｖｉｒｏｌ．８２：１０５６７－１０５７９，２００８）。ＨＤＡｄ調製物はすべて、１０１０ｖｐ中の野生型ウイルスのコピー数が１未満のものであった（このコピー数は、他に記載のプライマーを使用してｑＰＣＲによって測定した）（Ｈａｕｓｓｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＰＬｏＳ Ｏｎｅ．６：ｅ２３１６０，２０１１）。

【１０４４】
ＨＤＡｄ－ＧＦＰ／ｍｇｍｔベクター及びＨＤＡｄ－αＰＤ－Ｌ１γ$_1$ｍｉＲ４２３ベクターの構築．
ステップ１：ＰＧＫプロモーター、β－グロビン３’ＵＴＲ、及びＢＧＨポリＡ断片をｐＨＣＡ－ＨＢＧ－ＣＲＩＳＰＲ／ｍｇｍｔ（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．２０１８；１３１：２９１５－２９２８）からＰＣＲ増幅した後、Ｇｉｂｓｏｎ ａｓｓｅｍｂｌｙ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）によってｐＢＳ－Ｚ－Ｅｆ１α（Ｓａｙｄａｍｉｎｏｖａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ．１：１４０５７，２０１５）のＢｓｔＢＩ部位に挿入してｐＢＳ－ＰＧＫ－３’ＵＴＲを得た。ｐＨＭ５－ｆｒｔ－ＩＲ－ＥＦ１α－ｍｇｍｔ－２ａ－ＧＦＰ（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ．８：５２－６４，２０１８）からＧＦＰコード配列をＰＣＲ増幅し、ＥｃｏＲＩで直鎖化したｐＢＳ－ＰＧＫ－３’ＵＴＲとライゲーションしてｐＢＳ－ＰＧＫ－ＧＦＰを得た。ステップ２：ｐＨＭ５－Ｔ／μＬＣＲ－γ－グロビン－ｍｇｍｔ－ＦＲＴ２（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ ９：１４２－１５２，２０１８）からＥｆ１α－ｍｇｍｔ$^{Ｐ１４０Ｋ}$－ＳＶ４０ｐＡ－ｃＨＳ４インスレーターカセットを増幅し、ＰａｃＩで消化したｐＨＭ５－Ｔ／μＬＣＲ－γ－グロビン－ｍｇｍｔ－ＦＲＴ２とライゲーションしてｐＨＭ５－ＦＲＴ－ＩＲ－Ｅｆ１α－ｍｇｍｔを形成させた。下流で使用するためのＢｓｒＧＩ部位をプライマーによってｃＨＳ４の３’側に導入した。後のｉｎｆｕｓｉｏｎクローニング（Ｔａｋａｒａ，ＭｏｕｎｔａｉｎＶｉｅｗ，ＣＡ）のための１５ｂｐのホモロジーアーム（ＨＡ）を含むプライマーを使用してｐＨＭ５－ＦＲＴ－ＩＲ－Ｅｆ１α－ｍｇｍｔの細菌プラスミド骨格をｐＢＳ－Ｚ－Ｅｆ１α由来の骨格へと切り替えてｐＢＳ－ＦＲＴ－ＩＲ－Ｅｆ１α－ｍｇｍｔを得た。２つのＦｒｔ－ＩＲ要素と隣接する２つの１５ｂｐ ＨＡをＰａｃＩで消化して露出させて、以下に記載の改変ｐＨＣＡコンストラクトとの再統合が促進され得るようにした。次に、ステップ１に記載のｐＢＳ－ＰＧＫ－ＧＦＰからＰＧＫ－ＧＦＰ－３’ＵＴＲ－ＢＧＨｐＡ断片をｐＢＳ－ＦＲＴ－ＩＲ－Ｅｆ１α－ｍｇｍｔのＢｓｒＧＩ部位に移してｐＢＳ－ＦＲＴ－ＩＲ－ＧＦＰ／ｍｇｍｔを得た。ステップ３：２つのアニーリングしたオリゴ配列を挿入することによってｐＨＣＡ中の最初のＰａｃＩ部位を破壊した。２つのＨＡと一緒になった新たなＰａｃＩ部位をＢｓｔＢＩ部位に創出した。最後に、ｐＢＳ－ＦＲＴ－ＩＲ－ＧＦＰ／ｍｇｍｔ及び改変ｐＨＣＡの両方をＰａｃＩで消化した後、産物を、ｉｎｆｕｓｉｏｎクローニングによって再統合することでｐＨＣＡ－ＦＲＴ－ＩＲ－ＧＦＰ／ｍｇｍｔを得た。このｐＨＣＡ－ＦＲＴ－ＩＲ－ＧＦＰ／ｍｇｍｔをその後のウイルスレスキューに使用した。ＨＤＡｄ－αＰＤ－Ｌ１γ$_1$は、この実施例の他の箇所に記載のＨＤＡｄ－ＧＦＰ

／ｍｇｍｔと同様に構築し、この構築では変更点として、ステップ１のｐＢＳ－ＰＧＫ－３’ＵＴＲのＥｃｏＲＩにＧＦＰコード配列の代わりに抗ＰＤ－Ｌ１－γ１導入遺伝子を挿入した。マイクロＲＮＡによって制御される遺伝子発現については、合成した４×ｍｉＲ４２３オリゴ（フォワード（配列番号２４）、リバース（配列番号２５））をアニーリングさせ、ｐＢＳ－ＰＧＫ－３’ＵＴＲのＡｖｒＩＩ－ＸｈｏＩ部位に挿入してｐＢＳ－ＰＧＫ－ｍｉＲ４２３－３’ＵＴＲを得た。次に、このｐＢＳ－ＰＧＫ－ｍｉＲ４２３－３’ＵＴＲを抗ＰＤ－Ｌ１－γ１の挿入に使用した。

【１０４５】

ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－４２３は、４×ｍｉＲ４２３標的部位をＨＤＡｄ－ＧＦＰ／ｍｇｍｔの３’ＵＴＲに挿入することによって同様の様式で構築した。

【１０４６】

フローサイトメトリー：

１％のＦＣＳが添加されたＰＢＳ中に１×１０$^{6}$個細胞／１００μＬで細胞を再浮遊させ、ＦｃＲ遮断試薬（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ａｕｂｕｒｎ ＣＡ）と共に氷上で１０分間インキュベートした。次に、１０$^{6}$個細胞当たり１００μＬの染色抗体溶液を添加し、暗所、氷上で３０分間インキュベートした。インキュベート後、細胞をＦＡＣＳ緩衝液（ＰＢＳ、１％ＦＢＳ）中で１回洗浄した。二次染色については、二次染色溶液を用いて染色ステップを再度実施した。洗浄後、ＦＡＣＳ緩衝液中に細胞を再浮遊させ、ＬＳＲＩＩフローサイトメーター（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓａｎ Ｊｏｓｅ，ＣＡ）を使用して分析した。前方散乱領域及び側方散乱領域のゲートを使用して残骸を除外した。次に、前方散乱高及び前方散乱幅のゲートを使用して単一細胞をゲートした。次に、ＦｌｏｗＪｏ（バージョン１０．０．８、ＦｌｏｗＪｏ，ＬＬＣ）を使用してフローサイトメトリーデータを解析した。アイソタイプ一致対照をすべての実験に含めた。

【１０４７】

免疫表現型決定のためのフローサイトメトリー：

リンパ球フローサイトメトリーパネル８ｃ（ＣＤ４５－ＡＰＣ／Ｃｙ７、クローン３０－Ｆ１１、カタログ番号１０３１１６；ＣＤ３－ＡＰＣ、クローン１７Ａ２、カタログ番号１００２３６；ＣＤ４－ＰＥ／Ｃｙ７、クローンＧＫ１．５、カタログ番号１００４２２；ＣＤ８ａ－ＰＥ、クローン５３－６．７、カタログ番号１００７０８；ＣＤ２５－ＢＶ４２１、クローンＰＣ６１、カタログ番号１０２０４３；ＣＤ１９－ＢＶ５１０、クローン６Ｄ５、カタログ番号１１５５４６；これらの抗体はすべてＢｉｏＬｅｇｅｎｄから入手した）及び骨髄系パネル９ｃ（ＣＤ４５－ＡＰＣ／Ｃｙ７、クローン３０－Ｆ１１、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号１０３１１６；ＣＤ１１ｃ－ＡＰＣ、クローンＮ４１８、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号１１７３１０；Ｆ４／８０－ＰＥ、クローンＣ１：Ａ３－１、Ｃｅｄａｒｌａｎｅ、カタログ番号ＣＬ８９４０ＰＥ；ＭＨＣＩＩ－ＢＶ５１０、クローンＭ５／１１４．１５．２、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号１０７６３５；ＳｉｇｌｅｃＦ－ＰｅｒＣＰ、クローン１ＲＮＭ４４Ｎ、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、カタログ番号４６－１７０２－８２；Ｌｙ６Ｃ－ＢＶ４２１、クローンＡＬ－２１、ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、カタログ番号５６２７２７；ＣＤ１１ｂ－ＰＥ／Ｃｙ７、クローンＭ１／７０、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、カタログ番号２５－０１１２－８２；Ｌｙ６Ｇ－ＢＶ６０５、クローン１Ａ８、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号１２７６３９）を使用した。ゲート方針は図７６に示される。ＬＳＫ（系譜$^{-}$／Ｓｃａ－１$^{+}$／ｃ－Ｋｉｔ$^{+}$）細胞は、Ｒｉｃｈｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．２０１６；１２８：２２０６－２２１７に以前に記載されたように特徴付けた。下記の抗体も使用した：ビオチン結合型系譜検出カクテル（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、カタログ番号１３０－０９２－６１３）；抗マウスＬＹ－６Ａ／Ｅ（Ｓｃａ－１）－ＰＥ－シアニン７（クローンＤ７、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、カタログ番号２５－５９８１－８２）；抗マウスＣＤ１１７（ｃ－Ｋｉｔ）－ＰＥ（クローン２Ｂ８、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、カタログ番号１２－１１７１－８３）；抗マウスＣＤ３－ＡＰＣ（クローン１７Ａ２、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ

、カタログ番号１７－００３２－８２）；抗マウスＣＤ１９－ＰＥ－シアニン７（クローンｅＢｉｏ１Ｄ３，ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、カタログ番号２５－０１９３－８２）；抗マウスＬｙ－６Ｇ（Ｇｒ－１）－ＰＥ（クローンＲＢ６－８Ｃ５、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ、カタログ番号１２－５９３１－８２）；抗ヒトＣＤ４６－ＡＰＣ（クローンＥ４．３、ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ、カタログ番号５６４２５３）。

【１０４８】

ＩＦＮγ－フローサイトメトリー：

新たに収集した脾臓を、５０ｍＬのＦａｌｃｏｎチューブに取り付けた孔径７０μｍのセルストレーナーに通して脾細胞を単離した。３００×ｇで１０分間遠心分離後、１ｍＬの１×ＢＤ　Ｐｈａｒｍ　Ｌｙｓｅ（商標）溶解溶液（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ、カタログ番号５５５８９９）中に細胞を再浮遊させることによって赤血球を除去し、３０秒間インキュベートした。２０ｍＬのＲＰＭＩ－１６４０培地を添加して溶解反応を停止した。遠心分離し、ＲＰＭＩ－１６４０培地（１０％の熱非働化ＦＢＳ、１００ユニット／ｍｌのペニシリン、及び１００ｍｇ／ｍｌのストレプトマイシンを含む）中に再浮遊させた後、得られた脾細胞を、５％$CO_2$の加湿インキュベーター中で９６ウェル組織培養プレートにおいて５×$10^6$個細胞／ｍｌ（２００μｌ／ウェル）で培養した。１×細胞刺激カクテル＋タンパク質輸送阻害剤（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、カタログ番号００－４９７５－９３）を培養培地に添加して細胞内でＩＦＮ－γが産生誘導及び蓄積されるようにした。１２時間刺激後、細胞を収集し、上記の細胞表面マーカーで最初に染色した後、製造者の説明に従ってＩＦＮ－γの細胞内染色（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ、カタログ番号５０５８４２）に供した。

【１０４９】

Ｎｅｕ四量体フローサイトメトリー：

ＰＥ標識Ｈ－２Ｄｑ／ＲＮＥＵ４２０－４２９（Ｈ－２Ｄ（ｑ）ＰＤＳＬＲＤＬＳＶＦ）（配列番号２９０）四量体をＮａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ｏｆ　Ａｌｌｅｒｇｙ　ａｎｄ　Ｉｎｆｅｃｔｉｏｕｓ　Ｄｉｓｅａｓｅｓ　ＭＨＣ　Ｔｅｔｒａｍｅｒ　Ｃｏｒｅ　Ｆａｃｉｌｉｔｙ（Ａｔｌａｎｔａ，ＧＡ）から入手し、製造者の説明に従って使用した。

【１０５０】

フローサイトメトリー、ＦＡＣＳ、及びウエスタンブロットための腫瘍浸潤性白血球の単離：

腫瘍体積が５００$mm^3$に達した時点でマウスを　殺した。腫瘍を収集し、さいの目状に切断し、５ｍＬのＲＰＭＩ１６４０中で穏やかに撹拌しながら３７℃で３００Ｕ／ｍＬのコラゲナーゼＩ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ、カタログ番号Ｃ０１３０）及び１ｍｇ／ｍＬのディスパーゼＩＩ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、カタログ番号４９４２０７８００１）を用いて３０分間消化した。消化後、２０００Ｕ／ｍＬのＤＮａｓｅＩ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、カタログ番号２６０９１３）を添加して遊離ＤＮＡを除去することによって粘度を低下させた。シリンジプランジャーを使用して孔径７０μｍのセルストレーナーに消化組織を通すことによって単一細胞浮遊液を得た。その後、マウスＣＤ４５（ＴＩＬ）マイクロビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ａｕｂｕｒｎ　ＣＡ、カタログ番号１３０－１１０－６１８）を使用して単一細胞浮遊液から腫瘍浸潤性白血球を精製した。

【１０５１】

免疫蛍光試験：

アセトン／メタノール（１０分）を用いて腫瘍スライドを固定化し、ＰＢＳで２回洗浄した。５％のブロッティンググレードのミルク（Ｂｉｏ－Ｒａｄ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ）を含むＰＢＳを使用してスライドを室温で２０分間ブロッキングした後、一次抗体を含むＰＢＳ中、室温で１時間インキュベートした。次に、スライドをＰＢＳで２回洗浄し

、二次抗体と共に室温で１時間インキュベートした後、ＰＢＳで３回洗浄した。スライドをＰＢＳで２回洗浄し、蛍光染色用封入剤（Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ Ｂｕｒｌｉｎｇａｍｅ，ＣＡ）を乗せてから、蛍光顕微鏡を使用して分析した。ラミニンは、抗ラミニンポリクローナル（一次）抗体（１：２００；＃Ｚ００９７；Ｄａｋｏ，Ｃａｒｐｉｎｔｅｒｉａ，ＣＡ）及びヤギ抗ウサギＩｇＧ Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ５６８（二次）抗体（１：２００；Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を使用して検出した。

【１０５２】

マウス組織の免疫組織化学：

１０％のホルマリン中で組織を固定化し、ヘマトキシリン・エオシン染色に供した。試料はすべて、盲検様式で２人の熟達病理学者によって典型的な炎症徴候について調べた。

【１０５３】

Ｔ細胞アッセイ：

ＭＭＣ細胞（Ｎｅｕ陽性）、及び同系ｎｅｕ／ＣＤ４６トランスジェニックマウス由来の脾細胞（Ｎｅｕ陰性）をマイトマイシンＣ（最終濃度５０μｇ／ｍ）で２０分間処理した後、十分に洗浄した。被検動物（ＨＤＡｄ－αＰＤ－Ｌ１－$\gamma_1$処理）及び非処理対照動物（ナイーブ）から得られた脾細胞とマイトマイシンＣで処理した細胞とを１：１で混合し、１０Ｕ／ｍｌのＩＬ－２の存在下で１日間インキュベートした。対照脾細胞は、ＰＭＡ／イオノマイシンでも処理した。ＩＦＮγＥＬＩＳＡ（ＩｎＶｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号８８－７２１４－２２）によって上清中のＩＦＮγ濃度を測定した。

【１０５４】

マイクロＲＮＡアレイ分析は、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ ｍｉＲＮＡ ４．０アレイを使用してＵＷ Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ，Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ ＆ Ｍｅｔａｂｏｌｏｍｉｃｓ Ｆａｃｉｌｉｔｙ Ｃｏｒｅによって実施されたものである。

【１０５５】

リアルタイムＰＣＲ：

製造者の説明（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に従ってＴＲＩｚｏＩ（商標）を使用して腫瘍浸潤性白血球、ＰＢＭＣ、脾細胞、及び骨髄細胞から全ＲＮＡを抽出した後、Ｑｉａｇｅｎから入手したＱｕａｎｔｉＴｅｃｔ逆転写キット（カタログ番号２０５３１１）を使用して逆転写してｃＤＮＡを生成させた。キット中で提供されるｇＤＮＡ除去試薬を使用してゲノムＤＮＡ混入の可能性を排除した。Ｐｏｗｅｒ ＳＹＢＲ Ｇｒｅｅｎ ＰＣＲ ｍａｓｔｅｒ ｍｉｘ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を使用して比較リアルタイムＰＣＲを実施した。下記のプライマーを使用した：抗マウスＰＤＬ１フォワード（配列番号２３８）及びリバース（配列番号２３９）、マウスＰＰＩＡフォワード（配列番号２４０）及びリバース（配列番号２４１）、マウスＲＰＬ１０フォワード（配列番号１８９）及びリバース（配列番号１９０）。

【１０５６】

マウスＰＰＩＡを内部対照として使用した。第２の内部対照としてマウスＲＰＬ１０も含め、同様の結果が観察された。結果は、$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$法に従って計算し、対応腫瘍試料のｃＤＮＡレベルを１００％とする相対発現パーセントとして示した。

【１０５７】

系譜決定細胞が除去された（Ｌｉｎ$^-$）骨髄細胞の単離：

系譜決定細胞の除去については、製造者の説明に従ってマウスｌｉｎｅａｇｅ ｃｅｌｌ ｄｅｐｌｅｔｉｏｎキット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）を使用した。

【１０５８】

コロニー形成単位アッセイ．

総数２５００個のＬｉｎ$^-$細胞をＣｏｌｏｎｙＧＥＬ１２０２マウス完全培地（ＲｅａｃｈＢｉｏ，Ｓｅａｔｔｌｅ ＷＡ）に３連で播種し、５％$CO_2$、最大湿度下、３７℃で１２日間インキュベートした。Ｌｅｉｃａ ＭＳ５解剖顕微鏡（Ｌｅｉｃａ Ｍｉｃｒ

ｏｓｙｓｔｅｍｓ）を使用してコロニーの数を数えた。
【１０５９】
細胞：
ｎｅｕ／ＣＤ４６－ｔｇマウスにおける自然発生腫瘍からマウス乳癌（ＭＭＣ）細胞を確立した。ＭＭＣ細胞の確認は、Ｎｅｕ特異的モノクローナル抗体７．１６．４（Ｋｎｕｔｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２００４；６４：１１４６－１１５１）を使用して免疫蛍光によって実施した。ＴＣ－１細胞は、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）から入手した。ＴＣ－１細胞は、ＨＰＶ－１６のＥ６タンパク質及びＥ７タンパク質を安定的に発現する不死化マウス上皮細胞である。Ｃ５７Ｂｌ／６由来の卵巣癌ＩＤ８ ｐ５３－／－ｂｒｃａ２－／－細胞については以前に記載されている。Ｗａｌｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１６；７６：６１１８－６１２９。この細胞株は、ＩＤ８細胞のｐ５３及びｂｒｃａ２をＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９でノックアウトすることによって生成されたものである。ＭＭＣ細胞及びＴＣ－１細胞は、ＲＰＭＩ－１６４０中で維持し、このＲＰＭＩ－１６４０は、１０％のウシ胎児血清、１ｍｍｏｌ／ｌのピルビン酸ナトリウム、１０ｍｍｏｌ／１のＨＥＰＥＳ、２ｍｍｏｌ／ｌのＬ－グルタミン、１００ユニット／ｍｌのペニシリン、及び１００ｍｇ／ｍｌのストレプトマイシンが添加されたものである。ＩＤ８ ｐ５３－／－ｂｒｃａ２－／－細胞は、ＤＭＥＭ中で培養し、このＤＭＥＭは、４％のウシ胎児血清、１００μｇ／ｍＬのペニシリン、１００μｇ／ｍＬのストレプトマイシン、及びＩＴＳ（５μｇ／ｍＬのインスリン、５μｇ／ｍＬのトランスフェリン、及び５ｎｇ／ｍＬの亜セレン酸ナトリウム）が添加されたものである。ａｂｍ（Ｒｉｃｈｍｏｎｄ，ＢＣ，Ｃａｎａｄａ）から入手したＰＣＲマイコプラズマ検出キットを使用してマイコプラズマが存在しないことを確認した。増幅のために凍結保存細胞を解凍し、４回継代した。
【１０６０】
卵巣癌生検試料は、患者の特定につながることになる機密情報を一切排除してＰａｃｉｆｉｃ Ｏｖａｒｉａｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｏｎｓｏｒｔｉｕｍ（ＰＯＣＲＣ）検体リポジトリから提供された（Ｆｒｅｄ Ｈｕｔｃｈｉｎｓｏｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｅｎｔｅｒ ＩＲＢ プロトコール第６２８９号）。生検試料由来の腫瘍組織を４ｍｍ小片に切断し、Ｓｔｒａｕｓｓ ｅｔ ａｌ．（ＰＬｏＳ Ｏｎｅ．６：ｅ１６１８６，２０１１）に以前に記載されたようにコラゲナーゼ／ディスパーゼ（Ｒｏｃｈｅ）を用いて３７℃で２時間消化した。ヒトＣＤ４５マイクロビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ、カタログ番号１３０－０４５－８０１）を使用して磁気活性化細胞選別によって白血球を単離した。２つの高異型度漿液性卵巣癌生検試料から得られた腫瘍関連白血球をプールし、ｍｉＲＮＡ－ＳｅｑによってＲＮＡを分析し、ＬＣ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，ＬＬＣ（Ｈｏｕｓｔｏｎ，ＴＸ）による比較ＰＢＭＣ ＲＮＡと比較した。
【１０６１】
マイクロＲＮＡ分析：ｍｉＲＮＡ－Ｓｅｑ：
低分子ＲＮＡシークエンシングは、以前に記載されたように実施した（Ｖａｌｄｍａｎｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｍｅｄ．２０１６；２２：５５７－５６２．）。ｍｉＲＮｅａｓｙミニキット（Ｑｉａｇｅｎ カタログ番号１０７１０２３）を使用してＲＮＡを抽出した。ＡＴＰの非存在下でＴ４ ＲＮＡリガーゼ１（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ カタログ番号Ｍ０２０４）を使用して試料当たり１μｇのＲＮＡを３’ユニバーサルｍｉＲＮＡクローニングリンカー（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ カタログ番号Ｓ１３１５）とライゲーションさせた。ライゲーション試料を１５％尿素－ポリアクリルアミドゲルで泳動させた。低分子ＲＮＡ（１７～２８ｎｔ）に対応する断片をゲルから切り出し、Ｔ４ ＲＮＡリガーゼ１を再び使用して５’バーコードとライゲーションさせた。次に、ＵＷ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｍｅｄｉｃｉｎｅにおいて、バーコード付き試料をＩｌｌｕｍｉｎａ ＭｉＳｅｑ機

器でマルチプレックス化及びシークエンスして５０ｂｐのシングルエンドリードを得た。配列からバーコード及びアダプターをトリミングした後、Ｂｏｗｔｉｅバージョン０．１２．７を使用してｍｉＲＢａｓｅ上のマウスマイクロＲＮＡにアライメントし、このアライメントでは、２つのミスマッチを許容した（Ｌａｎｇｍｅａｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｅ　Ｂｉｏｌ．１０：Ｒ２５，２００９）。

【１０６２】

低分子ＲＮＡに対するノーザンブロット．

このプロトコールについては、Ｖａｌｄｍａｎｉｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｍｅｄ．２０１６；２２：５５７－５６２に記載されている。ｍｉＲＮＡ　４２３－５ｐに対する$^{32}$Ｐ－γ－ＡＴＰ標識プローブ（配列番号２３５）及びＵ６　ｓｎＲＮＡに対する$^{32}$Ｐ－γ－ＡＴＰ標識プローブ（配列番号２３６）を使用した。放射性ＲＮＡ分子量マーカーはＡｍｂｉｏｎから入手した。

【１０６３】

ウエスタンブロット：

組織溶解物をＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分離し、ブロットをニワトリ抗ＨＡタグ－ＨＲＰ（Ａｂｃａｍ，ａｂ１１９０）と共にインキュベートした。Ｐｉｅｒｃｅ（商標）ＥＣＬ　Ｐｌｕｓウエスタンブロット基質（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号３４０２９）での処理後にＸ線フィルム上での化学発光検出を実施した。

【１０６４】

αＰＤ－Ｌ１－$\gamma_1$　ＥＬＩＳＡ：

組換えマウスＰＤ－Ｌ１タンパク質（Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｃ、カタログ番号５００１０－Ｍ０８Ｈ）を２μｇ／ｍｌで使用してＥＬＩＳＡプレートを被覆した。被検動物から得られた血清を１：１０希釈してから添加し、ニワトリ抗ＨＡタグ－ＨＲＰ（Ａｂｃａｍ、ａｂ１１９０）を使用してαＰＤ－Ｌ１－$\gamma_1$を測定した。

【１０６５】

動物：

動物を使用する実験はすべて、管理を行うＩｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ　ＲｅｖｉｅｗＢｏａｒｄ及びＩＡＣＵＣからの承認をもって実施した。

【１０６６】

ｈＣＤ４６トランスジェニックマウス：ヒトＣＤ４６ゲノム遺伝子座を含み、ヒトと同様のレベル及びパターンでＣＤ４６を発現するＣ５７Ｂｌ／６ベースのトランスジェニック動物については、Ｋｅｍｐｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（Ｃｌｉｎ　Ｅｘｐ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．１２４：１８０－１８９，２００１）に記載されている。このＣ５７Ｂｌ／６ベースのトランスジェニック動物を、Ｃ５７Ｂｌ／６由来のＴＣ－１細胞を用いる移植試験に使用した。Ｎｅｕトランスジェニックマウス：Ｎｅｕ－ｔｇマウス（系統名：ＦＶＢ／Ｎ－Ｔｇ（ＭＭＴＶｎｅｕ）２０２Ｍｕｌ）は、Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（Ｂａｒ　Ｈａｒｂｏｒ，ＭＥ）から入手した。こうしたマウスは、変異を有さない非活性化ラットｎｅｕ（ゲノム当たりの導入遺伝子コピー数１）をマウス乳癌ウイルスプロモーターの制御下に保有する。インビボ形質導入試験については、ＣＤ４６ｔｇマウスとｎｅｕ－ｔｇマウスとを交配させてＣＤ４６$^{+}$／$^{+}$／ｎｅｕ$^{+}$マウスを得た。

【１０６７】

インビボでのＨＳＰＣの形質導入／選択：

図７４Ａを参照のこと。

【１０６８】

ＣＤ８細胞の枯渇：

２００μｇのラット抗マウスＣＤ８　ＩｇＧ（１６９．４；ＡＴＣＣ）を腹腔内注射してＣＤ８－Ｔ細胞を枯渇させた。注射を３日ごとに繰り返して枯渇を維持した。

【１０６９】

統計：

カプラン・マイヤー生存曲線及びログランク検定（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍバージョン４）によってインビボデータの統計的有意性を解析した。インビトロデータの統計的有意性は、両側スチューデントｔ検定（Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ　Ｅｘｃｅｌ）によって計算した。Ｐ値＞０．０５は統計的に有意ではない（ｎ．ｓ．）と見なした。

【１０７０】

結果及び考察．

【１０７１】

現在では、５０歳以前に乳癌を有すると診断された一等親血縁者または年齢を問わずに卵巣癌を有すると診断された一等親血縁者が少なくとも１人いる女性については遺伝子検査が行われる。標的指向化された捕捉及び超並列ゲノムシークエンシングを使用することで一連の多重遺伝子検査が確立されており、こうした多重遺伝子検査によって生殖細胞系列変異が検出され、がんの発症リスクを予測される。ＢＲＯＣＡは、こうした検査プラットホームの１つである（Ｗａｌｓｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ．１０８：１８０３２－１８０３７，２０１１、Ｓｈｉｒｔｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅｔ　Ｍｅｄ．１８：９７４－９８１，２０１６）。卵巣癌及び乳癌の５分の１超が遺伝性リスクと関連することがＢＲＯＣＡを使用して明らかにされている（Ｔｕｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ．１２１：２５－３３，２０１５）。問題は、高リスク保因者に与えられる現在の予防選択肢が日進月歩の遺伝子診断法に後れを取っていることである。不妊症、循環器疾患、骨粗鬆症、更年期症状、及び心理的影響を含めて、予防的な卵管卵巣摘出及び乳房切除には女性の生涯を通じて副作用が伴うことが予想される。血清マーカー（ＣＡ１２５及びＨＥ４など）を使用しても、卵巣癌による死亡率が顕著に低下することはなかった（Ｊａｃｏｂｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｌａｎｃｅｔ．３８７：９４５－９５，２０１６）。Ｈｅｒ２／ｎｅｕ、ＨＩＦ１α、またはＭＵＣ１のような腫瘍関連抗原に対する予防的ワクチンは、こうした抗原がすべての腫瘍細胞上に存在することに依存するものであり、抗原欠損変異体の発生に悩まされる（Ｋｎｕｔｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．６４：１１４６－１１５１，２００４）。

【１０７２】

目的は、腫瘍再発のリスクが高い患者、さらに最終的にはがん素因的遺伝性変異の保因者におけるがんの免疫予防を可能にする技術的に簡単な持続的手法を開発することである。腫瘍進行中は、ＨＳＰＣを活性化及び動員する特定のケモカインが悪性細胞によって多く分泌され、その結果、そうしたＨＳＰＣは血液循環に入り、腫瘍に局在し、そこで腫瘍支持細胞へと分化する（Ｈａｎａｈａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ．１４４：６４６－６７４，２０１１、Ｍａｎｔｏｖａｎｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｔｒｅｎｄｓ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．２３：５４９－５５５，２００２）。（例えば、漿液性卵管上皮内癌（ＳＴＩＣ）では）がん発症の早期にＨＳＰＣ由来の骨髄系細胞及びリンパ球系細胞が存在する（Ｏｋｌａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｆｒｏｎｔ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．１０：６９１，２０１９、Ｃｏｌｖｉｎ，Ｆｒｏｎｔ　Ｏｎｃｏｌ．４：１３７，２０１４、Ｂａｅｒｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｆｒｏｎｔ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．１０：１２７３，２０１９）。Ｓａｒｋａｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖ．３１：１１０９－１１２１，２０１７。この手法は、造血幹細胞の遺伝子改変に基づくものである。こうした細胞は、自己複製する能力を有するため、一度介入すれば治療効果は生涯にわたって続くことになる。白血球アフェレーシス、骨髄破壊的前処理、及び移植を伴わずにインビボでＨＳＰＣに遺伝子を送達することを可能にする、侵襲性が最小であり、かつ費用効率の高い技術が開発された（Ｒｉｃｈｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．１２８：２２０６－２２１７，２０１６、Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，ＪＣｌｉｎ　Ｉｎｖｅｓｔ．１２９：５９８－６１５，２０１９）。この手法の中心発想は、Ｇ－ＣＳＦ／ＡＭＤ３１００を使用して骨髄からＨＳＰＣを動員し、末梢血中に循環ＨＳＰＣが多数存在する間にＨＳＰＣ指向性ヘルパー依存型アデノウイルスＨＤＡｄ５／３５＋＋遺伝子導入ベクター系を静脈内注射してそうした循環ＨＳＰＣへの形質導入を行うことである。こうしたベクターはＣＤ４６（未分化造血幹細胞上に発現する受容体）を利用するものである。形質導入された細胞は骨髄に戻り、そこで長期的に存続する。この試

験において使用されるＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクター系の新規の特徴には、（ｉ）静脈内注射後に非造血組織（肝臓を含む）が感染を受けることを回避しつつ未分化ＨＳＰＣの効率的な形質導入を可能にするＣＤ４６親和性増強型ファイバー、（ｉｉ）細胞因子に依存することなく機能し、かつ遺伝子選択性を伴うことなく無作為な導入遺伝子組み込みを媒介し、細胞当たりの組み込みベクターコピー数が１～２となるＳＢ１００Ｘトランスポゼースベースの組み込み系（図７４Ａ）、ならびに（ｉｉｉ）低用量の$O^6$ＢＧ／ＢＣＮＵでの短期的処理によって形質導入未分化ＨＳＰＣのプールに影響を与えることなく子孫細胞の選択的な生存及び増殖を媒介するＭＧＭＴ$^{P140K}$発現カセット、が含まれる（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ．８：５２－６４，２０１８）。インビボＨＳＰＣ遺伝子治療方法の有効性及び安全性は、異常ヘモグロビン症のマウスモデルにおいて最近実証された（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ．１２９：５９８－６１５，２０１９、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．１３１：２９１５－２９２８，２０１８）。ここでは、がん増殖を阻止するためにこの手法が使用される。

【１０７３】

インビボでのＨＳＰＣの形質導入後の腫瘍浸潤性白血球におけるＧＦＰ発現．

同系腫瘍を有する２匹のヒトＣＤ４６トランスジェニックマウスモデルを用いた。（ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを用いてＨＳＰＣの形質導入を行うにはＣＤ４６が必要である）。乳房組織においてマウス乳癌ウイルスプロモーターからラットｎｅｕを過剰発現するヒトＣＤ４６／ラットｎｅｕトランスジェニックマウスを第１のモデルに含めた。Ｎｅｕ－ｔｇマウスではＮｅｕに対する活性な免疫寛容が生じ、この免疫寛容はＴｒｅｇに依存しており、乳癌患者において観察されるものと同様である（Ｋｎｕｓｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１７７：８４－９１，２００６）。マウス乳癌細胞（ＭＭＣ）は、ｎｅｕ／ＣＤ４６トランスジェニックマウス自然発生腫瘍に由来するＮｅｕ陽性乳癌細胞株である（図７５）。ｎｅｕ／ＣＤ４６ｔｇマウスにおいてＨＳＰＣを動員し、組み込みＧＦＰ発現ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクター（図７４Ａ）を注射した。以前の研究（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ．８：５２－６４，２０１８）と同様に、$O^6$ＢＧ／ＢＣＮＵでの３回の低用量処理を行うとＰＢＭＣの８０％においてＧＦＰが安定的に発現した（図７４）。インビボでのＨＳＰＣの形質導入から１７週目に同系ＭＭＣ細胞を乳腺脂肪体に移植し、腫瘍増殖を監視した。腫瘍の体積が７００ｍｍに達した時点で（Ｐａｌｍｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，２００９：３３－５３）動物を　殺し、ＧＦＰ発現を分析した。骨髄細胞、脾細胞、ＰＢＭＣ、及び腫瘍浸潤性白血球の８０％がＧＦＰを発現した（図７４Ｂ）。腫瘍では、主に腫瘍間質に$GFP^+$細胞が見られた（図７４Ｃ）。免疫表現型決定からは、$GFP^+$腫瘍浸潤性細胞がリンパ球（主にＴｒｅｇ）、好中球、ＤＣ／ＭＤＳＣ、及びマクロファージであることが示された（図７４Ｄ、図７６）。このパターンは、末梢血（図７４Ｄ）、骨髄、及び脾臓（図７７）における$GFP^+$細胞のものとは異なっており、このことは、特殊化した腫瘍促進細胞へのＨＳＰＣの分化が腫瘍によって活発に生じることを示している。インビボで形質導入されたＨＳＰＣが腫瘍へと効率的に動員されることが、ＣＤ４６ｔｇマウス及びＴＣ－１細胞（ＨＰＶ１６　Ｅ６／Ｅ７陽性マウス肺癌細胞株）からなる第２のモデルにおいてもさらに確認された（図７８Ａ～７８Ｃ）。

【１０７４】

腫瘍浸潤性白血球におけるｍｉＲＮＡ制御性の導入遺伝子発現．

図７４Ｂ及び図７８Ｃは、ＧＦＰ（遍在性に活性なＥＦ１αプロモーターの制御下にある）が腫瘍浸潤性白血球で発現するだけでなく、骨髄、脾臓、ＰＢＭＣ、及び常在マクロファージを含めて、他の組織でも発現することを示す。自己免疫反応を最小化するためには、治療用導入遺伝子が（ｉ）主に腫瘍で発現すること、（ｉｉ）腫瘍が発生し始めた場合にのみ自動的に活性化すること、及び（ｉｉｉ）腫瘍が消失した時点で停止すること、が治療手法に求められる。ｍｉＲＮＡによる制御を行うことで、こうした要件を満たすこ

とができる。造血中は、分化段階及び細胞系譜に応じてｍｉＲＮＡプロファイルが変化する（Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ．２００４；３０３：８３－８６）。腫瘍関連骨髄系細胞は、特殊なｍＲＮＡ発現プロファイル及びｍｉＲＮＡ発現プロファイルを有する（Ｔｈｏｒｓｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ．４８：８１２－８３０　ｅ８１４，２０１８）。最終的に、ヒトのさまざまな腫瘍型に見られる骨髄系細胞及びリンパ球系細胞のｍｉＲＮＡは高度に保存されている（Ｔｈｏｒｓｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ．４８：８１２－８３０　ｅ８１４，２０１８）。図７９Ａには、ｍｉＲＮＡによる導入遺伝子発現の制御原理が示される。インビボＨＳＰＣ形質導入マウスモデルを使用して、骨髄、脾臓、ＰＢＭＣ、及び腫瘍からＧＦＰ＋／ＣＤ４５＋細胞を選別し（図７４Ｂ、図７８Ｃ）、そのｍｉＲＮＡ発現プロファイルを分析した。目的は、骨髄細胞、血液細胞、及び脾臓細胞では高レベルで発現するが、腫瘍関連白血球では発現しないｍｉＲＮＡを発見することとした。全ＲＮＡ（５匹のマウスからプールしたもの）を次世代ｍｉＲＮＡシークエンシングに供した（図７９Ｂ、図７９Ｃ）。上記の基準を満たす一連のｍｉＲＮＡが同定された。ｎｅｕ／ＣＤ４６ｔｇ－ＭＭＣ（図７９Ｂ）及びＣＤ４６ｔｇ－ＴＣ－１モデル（図７９Ｃ）の両方においてリストの最上位に位置したｍｉＲＮＡであるｍｉＲ４２３－５ｐに焦点を絞った。ｍｉＲ－４２３－５ｐは、ヒト及びマウスの間で保存されているため、臨床に向けて手法をさらに発展させる上で使用可能なものである。ＭＭＣ腫瘍を有するインビボ形質導入マウス及びＴＣ－１腫瘍を有するインビボ形質導入マウスから得られたＧＦＰ＋画分におけるｍｉＲＮＡ－４２３－５ｐの発現プロファイルをマイクロＲＮＡアレイ（非掲載）及びノーザンブロット分析（図８１）によって検証した。

【１０７５】

ｍｉＲ－４２３－５ｐによる制御がヒトにおいても使用し得るものであるかどうかを評価するために、一連のヒト組織にわたってマイクロＲＮＡを評価した公開データセットにおけるｍｉＲ－４２３－５ｐのレベルを調べた。Ｌｕｄｗｉｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２０１６；４４：３８６５－３８７７。ｍｉＲ－４２３－５ｐが発現マイクロＲＮＡの上位２０％以内に入り、さらには組織（骨髄及び脾臓を含む）にわたって分布することも明らかとなった（図８２Ａ）。高異型度漿液性卵巣癌を有する患者２人から比較ＰＢＭＣ及び腫瘍生検試料を得た。腫瘍浸潤性（ＣＤ４５$^{+}$）白血球から得られたＲＮＡ及び比較ＰＢＭＣから得られたＲＮＡに対してｍｉＲＮＡ－Ｓｅｑを実施した（図８２Ｂ）。この分析によって、ＰＢＭＣでのｍｉＲ４２３－５ｐの発現レベルは高く、腫瘍浸潤性白血球でのｍｉＲ４２３－５ｐの発現レベルは低いことが確認された。こうしたデータは、マウスで観察された結果がヒト試験への橋渡しとなる可能性が高いことを実証するものである。

【１０７６】

ＨＳＰＣに対するＨＤＡｄ介在性のｍｉＲ－４２３標的部位発現の影響．

ｍｉＲＮＡ－４２３－５ｐはすべての正常組織で発現しており、それ故に、遺伝子発現の制御に関与する可能性が最も高い。「ｍｉｒｔａｒｂａｓｅ」においてｍｉＲ－４２３－５ｐの標的ｍＲＮＡを検索することで（ｍｉｒｔａｒｂａｓｅ．ｍｂｃ．ｎｃｔｕ．ｅｄｕ．ｔｗ／ｐｈｐ／ｄｅｔａｉｌ．ｐｈｐ？ｍｉｒｔｉｄ＝ＭＩＲＴ０００５８９＃ｔａｒｇｅｔにてオンラインで利用可能）、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤１Ａ（ＣＤＫＮ１Ａ）ｍＲＮＡが主要標的として同定された。他の標的ｍＲＮＡには、転写伸長因子Ａ様１（ＴＣＥＡＬ１）、ｂｃｌ２様１１（ｂｃｌ２Ｌ１１）、及び増殖関連２Ｇ４（ＰＡ２Ｇ４）が含まれる。ＨＤＡｄベクターからのｍｉＲ－４２３－５ｐ標的部位の発現が加わることがＣＤＫＮ１Ａの発現に影響するかどうかを評価するために、２つのＨＤＡｄ－ＧＦＰベクター（ＧＦＰを含むｍＲＮＡと連結された標的部位を含むもの及び含まないもの）を構築した（図８０Ａ）。圧倒的多数の細胞が形質導入されることになるＭＯＩでマウスＨＳＰＣ及びヒトＨＳＰＣ（すなわち、ｍｉＲ－４２３－５ｐが高レベルで発現する細胞型）の感染を行い（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ．２７（１２）：２１９５－２２１２，２０１９）、３日後にこれらのＨＳＰＣのＣＤＫＮ１Ａタンパク質レベル

をウエスタンブロットによって分析した（図８０Ｂ）。両方の細胞型において２つのＨＤＡｄベクターの間に有意差は見られなかった。さらに、前駆細胞コロニーアッセイにおいてもｍｉＲ－４２３－５ｐ標的部位が過剰発現することによる有害な作用は観察されなかった（図８０Ｃ）。本明細書の他の箇所に概略が示されるように、ｍｉＲ４２３－５ｐ標的部位を含む治療ベクターを用いたインビボでのＨＳＰＣの形質導入が造血異常を引き起こすことはなかった。以上のことから、こうしたことは、ＨＳＰＣにおいて開示のｍｉＲ－４２３－５ｐベースの制御系が安全であることを示唆している。

【１０７７】

免疫予防試験．

遺伝性の乳癌及び卵巣癌では、遺伝的バリアントによってＤＮＡ修復機構が破壊される結果、変異負荷が大きくなり、ネオアンチゲンが存在するようになる。これによって、非遺伝性の乳癌及び卵巣癌（コピー数が異常であり、免疫原性が低いことによって特徴付けられることが多い）と比較して免疫療法が腫瘍に効きやすくなる（Ｔｈｏｒｓｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ．２０１８；４８：８１２－８３０ ｅ８１４）。ここでは、免疫療法用導入遺伝子としてチェックポイント阻害剤αＰＤ－Ｌ１－γ１を選択した。これまでに、ウイルスによる遺伝子導入後にαＰＤ－Ｌ１－γ１が腫瘍内で発現すると腫瘍増殖が弱まることが示されている（Ｅｎｇｅｌａｎｄ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２２：１９４９－１９５９，２０１４、Ｒｅｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｆｒｏｎｔ Ｏｎｃｏｌ．９：５２，２０１９）。ＭＭＣ細胞培養では、ＰＤ－Ｌ１が強力に発現することが観察されており（図８３Ａ）、これによってＭＭＣ腫瘍はαＰＤ－Ｌ１－γ１治療感受性となるはずである。ｍｉＲ４２３－５ｐ標的部位のコピーを、αＰＤ－Ｌ１－γ１遺伝子と連結されたグロビン３’ＵＴＲに４つ導入した（図８３Ｂ）。実験スキームは、図７４Ａに示されるものと同じにした。対照ＨＤＡｄ－ＧＦＰ／ｍｇｍｔベクターを用いてインビボで形質導入したマウスでは、移植したＭＭＣ腫瘍が急速に増殖し、腫瘍細胞移植後３５日目までにはエンドポイント体積に達した（図８３Ｃ、左パネル）。αＰＤ－Ｌ１－γ１モデルでは、最初に腫瘍増殖が生じた後、７つ中６つの腫瘍が退縮し、観察期間（１００日）内に再発することはなかった。処理マウスに対して最初の注射から１１週間後にさらにＭＭＣ細胞を負荷したところ、このＭＭＣ細胞は処理マウスによって拒絶された。抗ＣＤ８ｍＡｂを注射することによってＣＤ８細胞を除去すると治療効果が消失した。観察期間の終了時点（１００日目）に抗腫瘍Ｔ細胞応答を測定した。フローサイトメトリーによる脾細胞の分析から、インターフェロン－γ（ＩＦＮγ）を産生するＣＤ４細胞及びＣＤ８細胞のパーセントが有意に高まっていることに加えて、Ｎｅｕ四量体の染色に陽性のＣＤ８細胞の頻度も高まっていることが示された（図８３Ｄ）。ＨＤＡｄ－αＰＤ－Ｌ１－γ１で処理した動物から得られた脾細胞では、（Ｎｅｕ陽性）ＭＭＣ細胞での刺激時にＮｅｕ陰性細胞での刺激時と比較して３０倍多くＩＦＮγが分泌された（図８３Ｅ）。予想通り、ナイーブＣＤ４６／ｎｅｕ－ｔｇマウスはＮｅｕ特異的Ｔ細胞を有してはいたが、こうしたＮｅｕ特異的Ｔ細胞は腫瘍増殖を制御できておらず、これは腫瘍中に免疫抑制Ｔ細胞が存在することによるものであった（Ｋｎｕｔｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００６；１７７：８４－９１）。

【１０７８】

ＭＭＣ／ｎｅｕトランスジェニックマウスモデルにおけるαＰＤ－Ｌ１－γ$_1$発現のキネティクス及び特異性．

ＨＤＡｄ－αＰＤＬ１γ$_1$ｍｉＲ４２３で処理した動物の個別の群では、移植後１７日目（腫瘍の収縮が始まる前）に腫瘍を収集した。こうした腫瘍（３００～４００ｍｍ$^3$）では、ウエスタンブロット分析によって観察された腫瘍中αＰＤ－Ｌ１－γ$_1$レベルが、ＰＢＭＣ、骨髄、及び脾臓中のものと比較して１０倍高かった（図８４Ａ）。腫瘍浸潤性白血球においてαＰＤ－Ｌ１－γ$_1$ｍＲＮＡが選択的に発現することはｑＲＴ－ＰＣＲによって確認した（図８４Ｂ）。この発現パターンは、腫瘍浸潤性の骨髄系細胞及びリンパ球系細胞以外のＨＳＰＣ子孫ではｍｉＲ－４２３制御によってαＰＤ－Ｌ１－γ$_1$発現が抑制されることを示唆するものであった。血清中αＰＤ－Ｌ１－γ$_1$は、ＭＭＣ細胞の注

射後に検出可能となり、腫瘍が消失すると減少した。このことは、αＰＤ－Ｌ１－γ$_1$発現の自己制御が機能していることを示しており（図８４Ｂ）、すなわち、ＨＳＰＧが腫瘍関連白血球へと分化した時点でのみ導入遺伝子の発現が始まったことを示している。ＭＭＣ細胞の注射後には自己免疫反応が観察され、この自己免疫反応は注射後２週目から始まり、毛の変色及び組織における炎症性浸潤に反映されていた（図８７（マウス（図８７Ａ）ならびに腎臓、肝臓、及び肺の試料（図８７Ｂ）を示す））。重要なことに、腫瘍消失から４週間後に　殺した動物では、すべての器官の組織構造が正常に戻っていた。この所見は、αＰＤ－Ｌ１－γ$_1$が発現し、血流に放出される間に限っては、一過性の自己免疫反応（ｎｅｕ発現組織／細胞型に対するものである可能性が最も高い）が生じ得ることを示している。注目すべきは、ｍｉＲ－４２３－５ｐ標的部位を含まないＨＤＡｄ　αＰＤ－Ｌ１－γ$_1$ベクターを用いた試験については、最後のＯ$^6$ＢＧ／ＢＣＮＵ処理から２週間後に処理動物に２０％超の体重減少が生じたため中止を余儀なくされたことである。このことは、αＰＤ－Ｌ１－γ$_1$の発現を制御する必要性を強調するものである。観察された自己免疫反応は、αＰＤ－Ｌ１－γ$_1$を腫瘍に物理的に繋留するか、または細胞内免疫調節エフェクター（例えば、発がん促進白血球を腫瘍死滅細胞へと再び偏向させるｍｉＲＮＡ）を使用することによって最小化され得る。さらに、抗体（Ｅｒｂｉｔｕｘ）依存性細胞毒性によってすべての形質導入細胞を破壊することが可能な切断型ＥＧＦＲ受容体をベクターに含めることもできる（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．２０１１；１１８：１２５５－１２６３）。

【１０７９】

ｎｅｕ－ｔｇ／ＭＭＣモデルでは他の免疫療法手法が腫瘍再発を阻止しなかったことを考慮すると（Ｋｎｕｔｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．６４：１１４６－１１５１，２００４、Ｂｕｒｇｅｎｔｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．３３：４８２－４９１，２０１０）、インビボＨＳＰＣ　αＰＤ－Ｌ１－γ$_1$遺伝子治療手法の効力は卓越したものである。この関連では、抗マウスＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体を４回腹腔内注射しても、腫瘍増殖に対する有意な効果は得られなかった（図８８Ａ、図８８Ｂ）。こうしたデータは、腫瘍発生の早期（ＨＳＰＣ子孫細胞が腫瘍に浸潤するとすぐ）にαＰＤ－Ｌ１－γ$_1$が腫瘍内で発現することで、サプレッサー免疫細胞とエフェクター免疫細胞とのバランスが腫瘍排除に有利となるように変化し得ることを示している。

【１０８０】

ｐ５３変異及びｂｒｃａ２変異を有する卵巣癌モデルにおける免疫学的な予防試験及び治療試験．

Ｃ５７Ｂｌ／６由来のマウス卵巣癌ＩＤ８細胞は、典型的ながん関連生殖細胞系列変異（ｂｒｃａ１、ｂｒｃａ２、ｐ５３、Ｎｆ１、Ｒｂ１、Ｐｔｅｎ．．．）を含まず、腹腔内注射後の腫瘍形成が不十分なものである。Ｗａｌｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．７６：６１１８－６１２９，２０１６。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９によって腫瘍サプレッサー遺伝子をノックアウトすることによって改善されたＩＤ８由来モデルを新たに創出した。これらのモデルでは、上記の欠点への対処がなされている。Ｗａｌｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２０１６；７６：６１１８－６１２９、Ｗａｌｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉ　Ｒｅｐ．２０１７；７：１６８２７。これらのモデルの１つは、ＩＤ８－ｐ５３$^{-/-}$－ｂｒｃａ２$^{-/-}$細胞である。２×１０$^6$個のＩＤ８－ｐ５３$^{-/-}$－ｂｒｃａ２$^{-/-}$細胞をＣＤ４６トランスジェニックマウスに腹腔内注射すると腫瘍が増殖し、６～８週間以内に腹水症（または死）が生じた（図８４Ｃ及び図８５Ａ）。腹腔内腫瘍は、他の器官（脾臓、肝臓、リンパ節）への浸潤を伴って腸間膜に沿って広がった。腹腔内ＩＤ８－ｐ５３$^{-/-}$－ｂｒｃａ２$^{-/-}$腫瘍における腫瘍浸潤性白血球の免疫表現型決定からは、免疫抑制ＤＣ／ＭＤＳＣならびにＴＡＭに加えてＴｒｅｇの存在が顕著であることが示された（図８５Ｂ）。腹膜ＩＤ８　ｐ５３$^{-/-}$ｂｒｃａ２$^{-/-}$腫瘍から腫瘍浸潤性Ｔ細胞（ＴＩＬ）、マクロファージ（ＴＡＭ）、及び好中球（ＴＡＮ）を単離し、ｍｉＲＮＡ－４２３－５ｐレベルをノーザンブロットによって分析した。ＭＭＣモデル及びＴＣ－１モデルで観察されたように、ｍｉＲ－４２３－５ｐは、骨髄単核

細胞では発現していたが、腫瘍浸潤性白血球（ＴＩＬ、ＴＡＮ、及びＴＡＭを含む）では検出不可能であり、このことは、腫瘍によって３つすべての細胞型が特異的に再プログラム化されていることを示す（図８５Ｃ）。

【１０８１】

最初に、予防的状況においてＩＤ８－Ｔｒｐ５３－／－－ｂｒｃａ２－／－モデルを使用した（図８５Ｄ）。ＨＤＡｄ－αＰＤＬ１γ$_1$ｍｉＲ４２３＋ＨＤＡｄ－ＳＢまたはＨＡｄ－ＧＦＰ－ｍｉＲ４２３＋ＨＤＡｄ－ＳＢ（対照）を用いてＨＳＰＣのインビボでの形質導入／選択を行った後にＩＤ８－ｐ５３－／－ｂｒｃａ２－／－細胞を腹腔内注射し、血清中αＰＤＬ１γ１レベルならびに病的状態及び腹水症の発症を監視した。インビボでの形質導入から７０日目までにすべての対照マウスがエンドポイントに達した一方で、ＨＤＡｄ－αＰＤＬ１γ$_1$ｍｉＲ４２３＋ＨＤＡｄ－ＳＢで処理した動物については、その１００％が、監視期間（腫瘍細胞接種後１１週間）の終了時点で生存していた（図８５Ｅ）。（細胞注射から）６週目付近に血清中αＰＤＬ１γ１レベルが上昇したことは、腫瘍が増殖し、血清中でのαＰＤＬ１γ１発現が活性化したことを示唆している（図８５Ｆ）。１１週目までには血清中αＰＤＬ１γ１はバックグラウンドレベルに戻り、このことは、腫瘍が排除されたことを示している。この試験では、自己免疫反応の徴候（例えば毛の変色）は観察されなかった。このことは、腫瘍と正常組織との間で共有される抗原（例えばＮｅｕ）が存在しないことに起因する可能性が最も高い。記載の手法の安全性の評価との関連では、ＨＤＡｄ－αＰＤＬ１γ$_1$ｍｉＲ４２３でのインビボＨＳＰＣ形質導入によって造血に異常が生じないことも示された（図８８Ｃ、図８８Ｄ）。同系腫瘍細胞を移植したマウスにおいて、示される時点でＰＢＭＣにおけるＧＦＰ陽性細胞のパーセントを測定し、ＧＦＰ陽性細胞を収集してｍｉＲＮＡｓｅｑ用とした（図８８Ｅ）。ｍｉＲＮＡが目的の発現パターンを有することが結果によって同定された（図５８Ｅ）。図８８Ｆには、腫瘍（ＴＩＬ）、ＰＢＭＣ、骨髄、及び脾臓におけるαＰＤＬ１に対するウエスタンブロット、ならびに相対ｍＲＮＡ発現としてαＰＤＬ１を定量化したものが示される。図８８Ｆには、腫瘍移植前、及び移植後の示される時点での血清中αＰＤＬＡ　ＥＬＩＳＡ　ＯＤ$_{450}$も示される。図８８Ｇ及び図８８Ｈには模式図が示される。

【１０８２】

予防手法は、腫瘍発生の非常に早い段階で自動的に開始されるという利点を有する一方で、高リスク変異を保有する健康な女性へのその即時適用については、臨床的橋渡しとして適用する上で規制的なハードルに直面することになる可能性がある。したがって、より現実的な目的は、第一選択治療後のがん再発を阻止するためにこの手法を使用することである。この場合、患者の化学療法治療にインビボＨＳＰＣ選択を直接的に組み込むことができる。図８６Ａでは、どのように臨床状況において、インビボでのＨＳＣの形質導入が腫瘍の大部分を手術で除去した後に開始されることになるか、または手術が選択肢とならない場合はインビボでのＨＳＣの形質導入が化学療法と一緒に開始されることになるかが示される。Ｏ$^6$ＢＧ／ＢＣＮＵによるインビボでの選択を化学療法と併用することができる。インビボでのＨＳＰＣの形質導入／選択の結果として、武装ＨＳＰＣはがんが再発するまでは休止状態となり、がんが再発するとそれが引き金となってＨＳＰＣが分化し、エフェクター遺伝子発現が活性化することになる。この状況には、腫瘍特異的ネオ抗原及び腫瘍の免疫表現型が外科的生検試料の分析から明らかになるという利点も存在し、こうしたことが明らかになれば、適切な免疫療法エフェクター遺伝子を選択することが可能になる。一方で、「完全に発達した」がん特徴（Ｈａｎａｈａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ．２０１１；１４４：６４６－６７４）を有するがんの再発を阻止することは、発生早期の腫瘍を標的とするよりも難易度が高い。

【１０８３】

そのような「治療」状況を模倣するために、ＩＤ８－Ｔｒｐ５３－／－－ｂｒｃａ２－／－細胞をＣＤ４６トランスジェニックマウスに最初に注射してから２週間後にインビボでのＨＳＰＣの形質導入／選択を行った（図８６Ｂ）。対照状況（ＨＤＡｄ－ＧＦＰ－ｍｉＲ４２３＋ＨＤＡｄ－ＳＢでＨＳＰＣの形質導入を実施）では腫瘍細胞注射後１２週目

までにすべてのマウスがエンドポイントに達した一方で、αＰＤＬ１－γ１発現ベクターで処理したマウスはすべて、１５週目の時点で健康であった（図８６Ｃ）。予防試験で見られたように、１１週目の血清中αＰＤＬ１－γ１レベルの上昇は、最初は腫瘍が増殖したが、自己制御型のαＰＤＬ１－γ１機構が活性化されると腫瘍が消失したことを示唆している（図８６Ｄ）。こうしたデータは、記載の手法が手術／第一選択化学療法後にがん再発を阻止し得ることを示す。

【１０８４】

ＴＣ－１（マウス肺－がん）腫瘍（図７８Ａ～８１）、ＭＭＣ（マウス乳癌）腫瘍（図７９Ａ～７９Ｃ及び図８１）、ならびにＩＤ８－ｐ５３$^{-}$／$^{-}$／ｂｒｃａ２$^{-}$／$^{-}$（マウス卵巣癌腫瘍）（図８５Ｃ）中に存在する腫瘍浸潤性白血球のｍＲＮＡプロファイリング／ノーザンブロット分析を実施した。３つのすべての腫瘍型においてｍｉＲ４２３－５ｐは検出不可能であるが、正常な造血コンパートメントにはｍｉＲ４２３－５ｐが高レベルで存在することが明らかとなった。ヒト卵巣癌生検試料から得られたデータ（図８２Ａ、図８２Ｂ）と併せると、このことは、ｍｉＲ４２３－５ｐベースの系が、エフェクター遺伝子発現を制御するために異なる腫瘍型に対して種にまたがって広く使用できるものであることを示す。

【１０８５】

がん発症のリスクの高さと関連する生殖細胞系列変異を有する女性に現在与えられる予防的選択肢が限られており、集団規模のスクリーニングが行われることに起因してこうした保因者の数が増えていることを考慮すると、このインビボＨＳＰＣ遺伝子治療手法は、主要な医学的問題に対処する有望な方針である。

【１０８６】

実施例７．分泌治療用タンパク質を高レベルで産生させるための工場として赤血球細胞を使用するインビボＨＳＣ遺伝子治療．

【１０８７】

この実施例は、インビボでのＨＳＣの形質導入／選択後に赤血球細胞において非赤血球タンパク質が発現し、当該発現タンパク質が成熟赤血球中に貯蔵されることを示す。この系を使用することで、１回の静脈内介入の後に治療的修正を長期的に得ることができる。この実施例に含まれる情報の少なくともいくつかは、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．（Ｂｌｏｏｄ Ａｄｖ ３（１９）：２８８３－２８９４，２０１９；ｅ－ｐｕｂ Ｏｃｔｏｂｅｒ ４，２０１９）に公開されたものである。

【１０８８】

成人では新たな赤血球が毎秒２４０万個産生される。人体に存在する細胞のほぼ４分の１が赤血球である（Ｐｉｅｒｉｇｅ ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ Ｒｅｖ．６０（２）：２８６－２９５，２００８）。赤血球生成の過程では、ＨＳＣは共通の骨髄系前駆細胞及び前赤芽球を経て正染性赤芽球（ライト染色に基づく）へと分化する。この段階で脱核が生じ、細胞は骨髄を出て網状赤血球として循環に入る。成人では循環赤血球の０．５％～２．５％（１×１０$^{5}$個／μｌ）、幼児では２％～６％が網状赤血球である。網状赤血球は、依然としてｍＲＮＡからヘモグロビンを産生する能力を有する。１～２日後、網状赤血球は最終的にすべてのオルガネラを失い、成熟赤血球となる。成熟赤血球は、もはやタンパク質を生合成する能力を有さない。系譜決定赤血球前駆細胞から赤血球への分化には７日を要する。赤血球の寿命は１２０日である。古い赤血球及び死滅赤血球は、脾臓の食細胞系によって除去される。

【１０８９】

ＨＳＣが系譜決定赤血球細胞へと分化すると、膨大な量のαグロビン鎖及びβグロビン鎖が産生され、その後に四量体ヘモグロビンとして赤血球中に蓄積される。健康な個体は、血液１００ｍｌ当たり１２～２０グラムのヘモグロビンを有し、赤血球重量の９５％をヘモグロビンが占める（細胞当たりのＨｂ分子数２７０×１０$^{6}$）。この効率的な生合成の基礎は、高レベルでの転写を可能にする強力な赤血球特異的遺伝子座制御領域（ＬＣＲ）、及び効率的に翻訳される安定なｍＲＮＡである。

【１０９０】
赤血球生成の驚異的な速度及び効率、ならびにヘモグロビン産生の強力な機構を、赤血球前駆細胞（前赤芽球から網状赤血球への分化段階を含む）からの非赤血球分泌タンパク質の産生に使用した。小型β－グロビンＬＣＲの制御下に導入遺伝子を置き、ｍＲＮＡを安定化させるためにβ－グロビン遺伝子の５’ＵＴＲ領域を導入遺伝子に含めた。治療用タンパク質の生涯にわたる長期的な産生を可能にするために、未分化ＨＳＣを遺伝子導入ベクターの標的とした。このインビボＨＳＣ形質導入手法では、Ｇ－ＣＳＦ／ＡＭＤ３１００誘発性に骨髄からＨＳＣを末梢血流に動員し、組み込みヘルパー依存型アデノウイルスベクター系を静脈内注射することが行われる。導入遺伝子の組み込みは、高活性Ｓｌｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙトランスポゼース（ＳＢ１００ｘ）を使用して（無作為なパターンで）達成されるが、特定の実施形態では、相同組換え修復を介して達成され得る。

【１０９１】
血液循環へと分泌される治療用タンパク質を高レベルで産生させるために赤血球細胞を使用し得ることの証拠または原理として、ここでは、遺伝子操作された形態の血液凝固第ＶＩＩＩ因子に焦点を当てた。この試験の結果は、血友病Ａの治療に適するものである。最近では、血友病Ｂ向けの肝臓指向化第ＩＸ因子遺伝子を導入するための組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）ベースの遺伝子治療を使用することで、臨床的な進歩がもたらされている（Ｈｉｇｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ．２０１１；８０７：４２９－４５７）。前臨床治験においても、ＦＶＩＩＩ発現ｒＡＡＶベクターで血友病Ａを治療することの実現可能性が動物モデルにおいて実証された（Ｂｒｏｗｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｃｌｉｎ　Ｄｅｖ．１：１４０３６，２０１４、Ｃａｌｌａｎ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ．１１（３）：ｅ０１５１８００，２０１６、Ｇｒｅｉｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈｕｍ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．２８（５）：３９２－４０２，２０１７）。しかしながら、肝臓に指向化されたｒＡＡＶ血友病Ａ遺伝子治療を広く適用することは、いくつかの障壁に直面する可能性がある：（ｉ）肝細胞中ではｒＡＡＶゲノムはそのほとんどがエピソームとして存在する性質を有しており、（特に小児では）細胞分裂に起因して失われてしまうこと、（ｉｉ）ｒＡＡＶベクターを産生させる費用が高いこと、（ｉｉｉ）ｒＡＡＶのパッケージング容量は限られたものであり、大きな転写制御エレメントを収容できないことから、遺伝子サイレンシングまたは遺伝毒性の阻止が必要になることが多いこと（Ｇｒｉｅｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｖｉｒｏｌ．７９（１５）：９９３３－９９４４，２００５、Ｃｈａｎｄｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｉｎｖｅｓｔ．１２５（２）：８７０－８８０，２０１５）、及び（ｉｖ）ｒＡＡＶによる組み込みががん原遺伝子付近で生じる可能性があることに起因して腫瘍原性のリスクが高まること（Ｒｕｓｓｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｇｅｎｅｔ．２０１５；４７（１０）：１１８７－１１９３）（こうしたことは、肝臓基礎疾患（ウイルス肝炎など）を有する患者または肝細胞が活性に分裂する小児（血友病患者の大部分を占める）に特に当てはまる）（Ｎａｕｌｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｃｅｌｌ　Ｏｎｃｏｌ．３（２）：ｅ１０９５２７１，２０１６、Ｎａｕｌｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｇｅｎｅｔ．４７（１０）：１１８７－１１９３，２０１５）。

【１０９２】
ＨＤＡｄベクターを使用して赤血球細胞からＦＶＩＩＩを発現させるための手法は、こうした問題に対処するものである。この試験では、ＧＦＰをレポーター遺伝子として小型ＬＣＲの制御下に置いて使用することで、インビボでのＨＳＣの形質導入／選択の後に赤血球細胞において非赤血球タンパク質を発現させ、成熟赤血球中にＧＦＰを蓄積させることが可能であることが示される（図８９Ａ～８９Ｈを参照のこと）。次に、この手法の結果、「健康な」ｈＣＤ４６トランスジェニックマウスにおいて、遺伝子操作された形態のＦＶＩＩＩが生理学的レベルで得られ、血漿中に抗ＦＶＩＩＩ抗体が存在するにもかかわらず、血友病Ａマウスモデルの表現型が修正されることが実証された。

【１０９３】
提唱される手法は、１回の静脈内介入後に、生涯にわたる治療的修正を与え得る。遺伝

子改変ＨＳＣが赤血球に分化すると大幅に増幅されること、及びこうした細胞のタンパク質合成機構が高効率であることによって、治癒レベルでのＦＶＩＩＩ産生の基礎が創出される。さらに、ＨＳＣの一部のみが遺伝子改変されることで、導入遺伝子産物に対する寛容が生じ得る。この新たに開発されたＨＳＣへのインビボ遺伝子送達手法は、骨髄破壊的前処理及びＨＳＣ移植が不要なものである。この手法では、Ｇ－ＣＳＦ／ＡＭＤ３１００を注射してＨＳＣを骨髄から末梢血流に動員し、組み込みヘルパー依存型アデノウイルス（ＨＤＡｄ）ベクター系を静脈内注射することが行われる（図９０Ｂ）。ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクター及びＨＤＡｄ３５ベクターは、ＣＤ４６（未分化ＨＳＣ上に発現する受容体）を標的とする。導入遺伝子の組み込みは、高活性Ｓｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙトランスポゼース（ＳＢ１００ｘ）を使用して（無作為なパターンで）達成される（図９０Ａ）。ＣＤ４６トランスジェニックマウスにおいてインビボでのＨＳＣの形質導入／選択を行った後、遺伝子操作されたヒト第ＶＩＩＩ因子バージョン（ＥＴ３）が超生理学的な血清中濃度及び活性で得られることが実証された（図９０Ｃ～９０Ｉ、図９１Ａ～９１Ｄ、図９２Ａ～９２Ｇ）。ＥＴ３遺伝子は、小型β－グロビンＬＣＲの制御下にあり、この小型β－グロビンＬＣＲによってＥＴ３発現が赤血球に限定された。赤血球細胞からはＥＴ３が高レベルで産生したにもかかわらず、造血に対する影響は観察されなかった。阻害性の抗ＥＴ３抗体が最初に生じた後は処理マウスの５０％において血清中抗体レベルは大幅に減少した。この減少は、胸腺においてＥＴ３が低レベルで発現し、寛容が生じたことによるものである可能性が最も高い。ＣＤ４６－ｔｇ／血友病Ａマウスから得られたＨＳＣへのエクスビボ及びインビボでの形質導入を行い、その後に致死性照射血友病Ａマウスへの移植を行った後、表現型修正が達成された。この達成は、第ＶＩＩＩ因子の血清中活性が生理学的なものとなり、ａＰＴＴが正常化し、尾の切除後の出血時間が正常化したことに基づくものである。

【１０９４】

考察．

ＦＶＩＩＩに加えて、他の分泌タンパク質にもこの手法を適用することができ、例えば、下記のものに適用できる：（ｉ）他の凝固因子（具体的には、ＦＸＩ、ＦＶＩＩ（Ｂｉｎｎｙ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．１１９（４）：９５７－９６６，２０１２）、フォン・ヴィレブランド因子（ＶＷＦ）（Ｄｅ Ｍｅｙｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ａｒｔｅｒｉｏｓｃｌｅｒ Ｔｈｒｏｍｂ Ｖａｓｃ Ｂｉｏｌ．２８（９）：１６２１－１６２６，２００８））、さらには微量凝固因子（すなわち第Ｉ因子、第ＩＩ因子、第Ｖ因子、第Ｘ因子、第ＸＩ因子、または第ＸＩＩＩ因子）、（ｉｉ）ポンペ病（酸性α－グルコシダーゼ）、ゴーシェ病（グルコセレブロシダーゼ）、ファブリー病（α－ガラクトシダーゼＡ）、及びムコ多糖症Ｉ型（α－Ｌ－イズロニダーゼ）のようなリソソーム蓄積症に対する酵素補充療法（ＥＲＴ）（交差補正機構を利用するもの）に現在使用されている酵素（Ｐｅｎａｔｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｎｈｅｒｉｔ Ｍｅｔａｂ Ｄｉｓ．４０（４）：５４３－５５４，２０１７）、（ｉｉｉ）免疫不全（例えば、ＳＣＩＤ－ＡＤＡ（Ｃｉｃａｌｅｓｅ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．２６（３）：９１７－９３１ ２０１８）（アデノシンデアミナーゼ））、（ｉｖ）循環器疾患（例えば、家族性アポリポタンパク質Ｅ（ＡｐｏＥ）欠損症及びアテローム性動脈硬化）（Ｗａｃｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ａｒｔｅｒｉｏｓｃｌｅｒ Ｔｈｒｏｍｂ Ｖａｓｃ Ｂｉｏｌ．３８（１）：２０６－２１７，２０１８）、（ｖ）ウイルスデコイ受容体（例えば、ＨＩＶについては可溶性ＣＤ４）（Ｆａｌｋｅｎｈａｇｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ．９：１３２－１４４，２０１７）が発現することによるウイルス感染、またはＨＩＶ感染（Ｋｕｈｌｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２７（１）：１６４－１７７，２０１９）、慢性ＨＣＶ感染（Ｑｕａｄｅｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｃｏｍｍｕｎ．１０（１）：２０７３，２０１９）、もしくはＨＢＶ感染（Ｋｕｃｉｉｎｓｋａｉｔｅ－Ｋｏｄｚｅ ｅｔ ａｌ．，Ｖｉｒｕｓ ｅｓ．２１１：２０９－２２１，２０１６）に対する広域中和抗体（ｂＮＡｂ）、ならびに（ｖｉ）がん（例えば、モノクローナル抗体（例えば トラスツズマブ（Ｚａｆｉｒ－Ｌａｖｉｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃ

ｏｎｔｒｏｌ Ｒｅｌｅａｓｅ．２９１：８０－８９，２０１８）またはチェックポイント阻害剤（例えば、ａＰＤＬ１（Ｅｎｇｅｌａｎｄ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２２（１１）：１９４９－１９５９，２０１４））の制御発現）。

【１０９５】

実施例８．

インビボでのＨＳＣの形質導入後の非ヒト霊長類におけるＳＢ１００ｘ介在性の遺伝子付加及びＢＥ介在性の内在性γ－グロビンの再活性化の両方の検証．

【１０９６】

この実施例では、インビボでのＨＳＣの形質導入後に非ヒト霊長類においてＳＢ１００ｘ介在性の遺伝子付加及びＢＥ介在性の内在性γ－グロビンの再活性化の両方が有効であるかを検証する試験について記載される。

【１０９７】

遺伝子導入ベクター：

ＨＤＡｄ－統合が遺伝子導入ベクターとして使用されることになる：このベクターは、下記の導入遺伝子を含み、これらの導入遺伝子は、ＳＢ１００ｘトランスポゼース介在性に無作為にゲノムに組み込まれる：ｉ）赤血球における発現を効率化するための小型ＬＣＲの制御下にあるアカゲザルγ－グロビン遺伝子、ｉｉ）遍在性に活性なＥＦ１ａプロモーターの制御下にあり、$O^6$ＢＧ／ＢＣＮＵで形質導入した細胞のインビボでの選択を行うためのアカゲザル$mgmt^{P140K}$、ｉｉｉ）遍在性に活性なＥＦ１ａプロモーターの制御下にあり、末梢血Ｔ細胞の形質導入試験及びベクターの生体内分布試験の分析を行うためのＧＦＰ。このベクターは、ＨＢＧプロモーター中のＢＣＬ１１ａリプレッサータンパク質結合部位を不活化することによって内在性γ－グロビンを再活性化すると共に、同時に赤血球ｂｃｌ１１ａエンハンサーを不活化する（これによって赤血球細胞におけるＢＣＬ１１ａリプレッサータンパク質の発現が低減される）ためのアデニン塩基エディターをさらに含むことになる。さらに、ＦｌｐリコンビナーゼＥ介在性にトランスポゾンが切除されると塩基エディター発現カセットが除去されることになり、その結果、ｉＣａｓ－ＢＥの発現が一過性のものにとどまる。最後に、ＳＢ１００ｘトランスポゼース及びＦｌｐリコンビナーゼを含むベクターが組み込まれることはなく、このベクターは、ＨＳＣ細胞が増殖する間に消失することになる（図１２１）。

【１０９８】

処理プロトコール：

以前に試験したＨＳＣ動員プロトコール及び$O^6$ＢＧ／ＢＣＮＵインビボ選択プロトコールを使用して３匹のＭａｃａｃａ ｍｕｌａｔｔａを用いて６ヶ月の試験を実施することになる（図１２２）。プロトコールは、１匹の動物の試験から開始されることになる。８週目（最後のインビボ選択サイクルの終了時点）までに重篤な合併症が生じない場合は残りの２匹の動物において試験が繰り返されることになる。

【１０９９】

動員：

午前中にＧＣＳＦ及びＳＣＦ（各５０μｇ／ｋｇ）が５日間皮下投与されることになる。最後の２日間はＧＣＳＦ／ＳＣＦにＡＭＤ３１００（５ｍｇ／ｋｇ）が加えられ、これらが午後に皮下投与されることになる。

【１１００】

前処理：

ＨＤＡｄ５／３５＋＋注射の１６時間前にデキサメタゾンが４ｍｇ／ｋｇで静脈内投与されることになる。ＨＤＡｄ５／３５＋＋注射の３０分前にメチルプレドニゾロン（２０ｍｇ／ｋｇ）及びデキサメタゾン（４ｍｇ／ｋｇ）が静脈内投与され、同時に、アナキンラ（１００ｍｇ）が皮下投与されることになる。

【１１０１】

ＨＤＡｄ注射：

ＨＤＡｄが２回静脈内注射されることになる：１）－１日目に低用量（$3\times10^{11}$ｖ

ｐ／ｋｇを含む２０ｍＬのリン酸緩衝生理食塩水を２ｍＬ／分で注射）が投与され、２）０日目に２つの完全用量（１×１０$^{12}$ｖｐ／ｋｇを含む２０ｍＬのリン酸緩衝生理食塩水を２ｍＬ／分で注射）が３０分の間隔を空けて投与されることになる。

【１１０２】

一過性の免疫抑制：

１日目から免疫抑制が開始され、Ｏ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵの第１の用量の投与（４週目）まで続き、必要に応じて、Ｏ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵの最後の用量の投与から２週間後まで継続されることになる。この免疫抑制は、０．２ｍｇ／ｋｇ／日のラパマイシン、３０ｍｇ／ｋｇ／日のミコフェノール酸モフェチル、及び０．２５ｍｇ／ｋｇ／日のタクロリムスを含むことになり、これらはすべて、食物を介して経口的に１日１回与えられる。

【１１０３】

Ｏ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵを用いるインビボでの選択：

Ｏ$^{6}$ＢＧ：１２０ｍｇ／ｍ$^{2}$のＯ$^{6}$ＢＧを含む２００ｍＬの生理食塩水が少なくとも３０分間にわたって動物に静脈内注入されることになる。Ｏ$^{6}$ＢＧの注入開始から６０分後にＢＣＮＵが投与されることになる。次に、ＢＣＮＵの投与から６～８時間後に別の用量のＯ$^{6}$ＢＧを含む２００ｍＬの生理食塩水が少なくとも３０分間にわたって動物に静脈内投与されることになる。この処理の１回目は、ＨＤＡｄ注射から４週間後に行われることになり、γ－グロビンマーキング及び血液学的分析に応じて、２週間の間隔を空けて２回目の処理及び３回目の処理（任意選択）が行われることになる。

【１１０４】

収集データ：

図１２２に示されるように血液試料が収集されることになる。１日に１回の物理的観察及び１週間に１回の体重測定が実施されることになる。

【１１０５】

血液試料：

２時間時点の血液試料及び６時間時点の血液試料については、下記のアッセイが実施されることになる：ＣＤ３４＋細胞におけるＧＦＰ＋細胞のパーセント、及びＣＤ３８－／Ｃｄ４５ＲＡ，ＣＤ９０＋細胞におけるＧＦＰ＋細胞のパーセントが定量化されることになり、コロニー形成単位アッセイを使用してＧＦＰ＋コロニーのパーセント、ＳＤＦ１－ａへの遊走、ならびにＣＸＣＲ４及び／またはＶＬＡ－４の発現パーセントが評価されることになる（例えば、図９３Ｂ～９３Ｅ）。他のすべての試料について、血液細胞数、化学、ｃ反応性タンパク質、及び炎症促進性サイトカインが測定されることになる。γ－グロビン発現はフローサイトメトリー（赤血球／非赤血球細胞）によって測定されることになり、γ－グロビンの再活性化レベル及びγ－グロビンの付加レベルはＨＰＬＣ及びｑＲＴ－ＰＣＲを使用して測定され、それらのレベルが比較されることになる。サイトスピン調製物を使用してγ－グロビンの免疫蛍光が評価されることになる。ベクターコピー数ならびにＣａｓ９、ＳＢ１００ｘ、及びＦｌｐｅのｍＲＮＡレベルが測定されることになる。白血球（ＣＤ４$^{+}$、ＣＤ８$^{+}$、ＣＤ２５、ＣＤ４５ＲＯ、ＣＤ４５ＲＡ、ＣＣＲ－７、ＣＤ６２Ｌ、ＦＯＸＰ３、インテグリンαｅβ７）におけるＧＦＰ発現が測定されることになる。

【１１０６】

骨髄試料：

４日目に骨髄試料が収集されることになり、その後は１ヶ月に１回収集される（図１２２を参照のこと）。フローサイトメトリーによって骨髄試料の系譜組成が評価されることになる。ＣＤ３４＋細胞中のベクターコピー数も測定されることになる。Ｔｅｒ１１９＋／Ｔｅｒ１１９－マーカーを用いて選別することによってフローサイトメトリーを使用してγ－グロビンが評価されることになる。ＨＰＬＣ及びｑＲＴ－ＰＣＲを使用してγ－グロビンの再活性化レベル及びγ－グロビンの付加レベルが測定され、これらのレベルが比較されることになる。こうした分析に加えて、剖検時にＣＤ３４＋細胞に対する全ゲノムシークエンシングが実施されてＳＢ１００介在性の組み込み及び塩基エディターによるオ

フターゲット効果が同定されることになる。ＣＤ３４＋細胞に対してはＲＮＡシークエンシングも実施されて処理前と処理後との間でｍＲＮＡプロファイル及びｍｉＲＮＡプロファイルが比較されることになる。

【１１０７】

剖検から得られる組織（生殖系列組織及び精液を含む）：

所定の組織学的分析が実施されることになり、主要組織群に対してベクターコピー数の測定が行われることになる。組織切片でのγ－グロビン及びＧＦＰ免疫蛍光の評価が行われることになる。

【１１０８】

得られる結果：

この実験によってインビボでのＨＳＣの形質導入後に非ヒト霊長類においてＳＢ１００ｘ介在性の遺伝子付加及びＢＥ介在性の内在性γ－グロビンの再活性化の両方が有効であるかが検証されることになる。ＳＣＡ患者が治癒することになる赤血球中γ－グロビン発現レベル（すなわち、成体型アカゲザルグロビンに対するγ－グロビンのレベルが２０％超であるγ－グロビン＋ＲＢＣが８０％超存在する）がベクターによって達成されることが実証されることになる。長期的な血液学的副作用が存在せず、望ましくないゲノム再編及びＨＳＣのトランスクリプトーム変化が生じないことも実証されることになる。最後に、ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターの静脈内注射によってメモリーＴ細胞が形質導入されることが実証されることになる。

【１１０９】

実施例９．内在性γ－グロビンの発現を再活性化するための塩基エディターを発現するＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを用いるヒトＨＳＣ及びアカゲザルＨＳＣの形質導入．

【１１１０】

シチジンデアミナーゼもしくはアデニンデアミナーゼまたはシチジントランスアミナーゼもしくはアデニントランスアミナーゼのいずれかと融合した不活性Ｃａｓ９は、胎児型グロビンを再活性化させるためのツールとして役立ち得る。シチジン塩基エディター（ＨＤＡｄ－Ｃ－ＢＥ）を発現するＨＤＡｄベクターと、赤血球ｂｃｌ１１ａエンハンサーを標的とし、決定的に重要なＧＡＴＡ結合モチーフを破壊するＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ベクターとを比較した（図１２３）。同じ領域に対する野生型ＣＲＩＳＰＲを発現するＨＤＡｄベクターを構築した。両方のベクターをヒトＣＤ３４＋細胞で試験した。ヒトＣＤ３４＋細胞をＨＤＡｄによる形質導入に供してから、１８日間にわたる赤血球分化に供した（図１２４Ａ）。ＨＤＡｄ－ｗｔＣＲＩＳＰＲで形質導入した細胞については、編集された標的部位のパーセントが徐々に減少することが観察され、この減少は、ＣＲＩＳＰＲ関連の細胞毒性に起因する可能性が最も高い（図１２４Ｂ）。ＨＤＡｄ－Ｃ－ＢＥベクターについては、ゲノム編集効率は低かったが、編集率は安定を保っており、結果的にγ－グロビンが同等に再活性化された（図１２４Ｃ）。ＨＤＡｄ－Ｃ－ＢＥで形質導入したＣＤ３４＋細胞の移植後の生着は、非形質導入対照細胞のものと同じくらい効率的であった（図１２５）。まとめると、こうしたデータは、ＨＳＣのゲノム編集を行うには、ｗｔＣＲＩＳＰＲ発現ベクターと比較して塩基エディターベクターの方が良好なツールである可能性があることを示している。より最近では、ＨＢＧ１／２プロモーター中の３つの異なる領域に対する一連のアデニンエディター発現ＨＤＡｄベクターが開発された。塩基エディターベクターを用いていくつかのリプレッサーレベルを同時に標的とすることによってγ－グロビン再活性化を実質的に増加させることができると予想される。この目的を達成するために、赤血球ｂｃｌ１１ａエンハンサーを標的とする塩基エディターを発現するＨＤＡｄベクター（図１２６、上パネル）またはＨＢＧ１／２中のＢＣＬ１１ａタンパク質結合部位を標的とする塩基エディターを発現するＨＤＡｄベクター（図１２６、下パネル）を試験した。インビトロ試験でのγ－グロビン再活性化は、２つのベクターについて、それぞれ９％及び５３％であった。

【１１１１】

ＳＣＡマウスモデル（Ｔｏｗｎｅｓモデル）（Ｂ６；１２９－Ｈｂｂ$^{tm2}$（ＨＢＧ１，Ｈ

ＢＢ＊）Ｔｏｗ／Ｈｂｂ$^{tm3}$（ＨＢＧ１，ＨＢＢ）ＴｏｗＨｂａ$^{tm1}$（ＨＢＡ）Ｔｏｗ／Ｊ；ｈα／ｈα：：β$^{A}$／β$^{S}$，ｈα／ｈα：：－３８３　γ－β$^{A}$／－１４００　γ－β$^{S}$）でのデータ

【１１１２】

このマウスは、対応マウス遺伝子の代わりにヒトα－グロビン、γ－グロビン（プロモーターを含む－３８３領域及び－１４００領域を含む）、β$^{87}$－ＳＣＡグロビンを含み、重度のＳＣＡ表現型を示し（図１２７Ａ）、末梢血中に網状赤血球が４０％存在し、ヘマトクリットが低く、ヘモグロビンレベルが低く、白血球が増加する（図１２７Ｂ）。こうしたマウスを交配繁殖させて、ＣＤ４６及び３つのグロビン遺伝子置換についてホモ接合性を達成した（ＣＤ４６／Ｔｏｗｎｅｓマウス）。以前に開発したＨＤＡｄ－ＨＢＧ－ＣＲＩＳＰＲベクターがＣＤ４６／ＴｏｗｎｅｓマウスにおけるインビボでのＨＳＣの形質導入後にγ－グロビンを活性化することになるかどうかを決定するための試験を行った（図１２８Ａ）。Ｏ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵでの選択を行わなくてもＲＢＣのγ－グロビンマーキング率は６０％に達し、このことは、Ｔｏｗｎｅｓマウスの赤血球生成に機能的な欠陥が存在することでゲノム編集ＨＳＣ／赤血球前駆細胞に強力な増殖刺激が加わったことを示している（図１２８Ｂ）。ＨＤＡｄ－ＨＢＧ－ＣＲＩＳＰＲベクターの治療効果は、赤血球表現型が大幅に改善し、末梢網状赤血球が５分の１に減少したことに反映されていた（図１２８Ｃ）。このことは、Ｏ$^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵによるインビボでのＨＳＣの選択を必要とすることなくこのモデル（及び潜在的にはＳＣＡ患者）での治癒の達成が可能であることを示す。

【１１１３】

非ヒト霊長類（ＮＨＰ）におけるインビボでのＨＳＣの遺伝子導入：

こうしたデータは、２匹のＮＨＰ（Ｍａｃａｃａ　ｎｅｍｅｓｔｒｉｎａ）から得たものであり、これらのＮＨＰには、Ｇ－ＣＳＦ、ＳＣＦ、及びＡＭＤ３１００での動員処理を行った後にＨＤＡｄ－ＧＦＰを注射した（図１２９Ａ、図９３Ａ、図９４Ｅ～９４Ｇ）。ベクター注射の直前、２時間後、及び６時間後に末梢血試料を収集した。単離したＣＤ３４＋細胞をエクスビボで培養し、播種してコロニー形成アッセイを実施した。ベクターの投与後に単離したＣＤ３４＋細胞の平均３％がＧＦＰ＋であり（図１２９Ｂ、図９３Ｂ、図９３Ｃ、図９４Ｈ）、このことは、末梢血に動員されたＣＤ３４＋細胞が１回のＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクター静脈内投与によって形質導入され得ることを示唆している。こうしたＣＤ３４＋細胞がコロニー形成能を保持しているかどうかを試験するためにコロニーアッセイを実施し、ＧＦＰ導入遺伝子を保有するコロニーのパーセントをＰＣＲによって決定した。注射後の時点から得られたＣＤ３４＋細胞に由来するコロニーの最大で５５％がベクターによる形質導入を受けていた（図１２９Ｃ、図９３Ｄ、図９４Ｉ～９４Ｍも併せて参照のこと）。最終的に、インビボでベクターの標的となった細胞が末梢血への動員後に骨髄コンパートメントに戻る能力を試験するために、ベクター投与から３日目後に動物のうちの１匹から骨髄穿刺液を収集した。骨髄に存在するＣＤ３４＋細胞の３．７％または２．９％がＧＦＰ＋であり、インビボ送達の前後で収集した細胞のコロニー形成能を比較したところ、明らかな差は観察されなかった（図１２９Ｄ、図９３Ｅ）。こうした非ヒト霊長類試験（マウスでのものよりも１０倍低いベクター用量で実施した）は、検証された前臨床モデルにおいて記載のインビボ送達手法が実行可能かつ安全であることを実証するものである。

【１１１４】

実施例１０．塩基エディターを用いるインビボＨＳＣ遺伝子治療は、β－ＹＡＣマウスにおいて胎児型γ－グロビンを効率的に再活性化することを可能にする

【１１１５】

この実施例では、ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターによってインビボで塩基エディターを送達することがゲノム操作（例えば、異常ヘモグロビン症を治療するためのもの）を正確に行う上で有用かつ有効な方針であることが実証される。

【１１１６】

塩基エディターは、標的ゲノム遺伝子座に対してヌクレオチド変異を正確に導入する能力を有し、二本鎖ＤＮＡ切断が回避されるという利点を与えるものである。ここでは、ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを介して送達される塩基エディターを用いることで、決定的に重要なモチーフを標的としてγ－グロビンの再活性化を制御した。設計を最適化することによって、ＢＣＬ１１Ａエンハンサーを標的とする、または天然に生じる遺伝性高胎児ヘモグロビン血症（ＨＰＦＨ）変異をＨＢＧ１／２プロモーター中に再創出するシチジン塩基エディター及びアデニン塩基エディター（ＣＢＥ及びＡＢＥ）の一団をレスキューすることに成功した。ＨＵＤＥＰ－２細胞において５つすべての被検ベクターが標的塩基の変換を効率的に導入し、γ－グロビンを実質的に再活性化させた。ＨＢＧ１／２プロモーター中に－１１３Ａ→Ｇ　ＨＰＦＨ変異を特異的に導入するＡＢＥベクターＨＤＡｄ－ＡＢＥ－ｓｇＨＢＧ＃２を使用することによって顕著なγ－グロビンタンパク質産生（β－グロビンに対して２３％）が観察された。したがって、下流の動物試験用としてこのベクターを選択した。ヒトβ－グロビン遺伝子座を含む２４８ｋｂを保有しており、それ故にグロビンスイッチを正確に反映するマウス（β－ＹＡＣマウス）を使用した。ＦＲＴ部位及びトランスポゾン部位と隣接するＥＦ１α－ＭＧＭＴ$^{Ｐ１４０Ｋ}$発現カセットをベクターに含めることで、形質導入細胞をインビボで選択できるようにした。ＨＤＡｄ－ＡＢＥ－ＨＢＧ＃２＋ＨＤＡｄ－ＳＢでのインビボ形質導入及び低用量での化学選択の後に測定した末梢赤血球におけるＨｂＦ陽性細胞率は平均で４０％を超えた。このことは、ヒトβ－グロビンに対するγ－グロビンの産生率が２１％であることと対応していた。全骨髄細胞での－１１３Ａ→Ｇ変換率は平均で２０％であった。非形質導入マウスと比較して、処理後に血液学的パラメーター、赤血球生成、及び骨髄細胞組成に変化は観察されず、このことは、この手法の安全性プロファイルが良好であることを実証するものである。上位にスコア付けされた潜在的オフターゲットゲノム部位に検出可能な編集は見つからなかった。形質導入から１６週目に一次マウスから骨髄系譜マイナス細胞を単離し、致死性照射Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスに注入した。ＨｂＦ陽性細胞のパーセントは二次レシピエントにおいて１６週間にわたって維持され、このことは、長期再増殖マウスＨＳＣにゲノム編集が生じていたことを示す。こうした知見は、ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターによって塩基エディターを送達することが異常ヘモグロビン症の治療のためのゲノム操作をインビボで正確に行うための有望な方針となることを実証するものである。

【１１１７】

ヌクレアーゼ（ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９など）に基づくゲノム操作方針は顕著な進歩を遂げており、複数の遺伝子治療研究が臨床評価相に入っている。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９介在性の遺伝子編集は、古典的な非相同末端結合（ＮＨＥＪ）を含む内在性修復機構を引き起こす二本鎖ＤＮＡ切断（ＤＳＢ）に依存するものである。ドナーＤＮＡテンプレートの存在下では、典型的には頻度が下がるが、相同組換え修復（ＨＤＲ）が生じ得る。血液障害の遺伝子治療に重要な造血幹細胞・前駆細胞（ＨＳＰＣ）中の目的遺伝子が高度に効率的に破壊されることが最新の研究によって実証されている（Ｍａｒｔｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　２４：８２１－８２８．ｅ８２５，２０１９、Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ　２５：７７６－７８３，２０１９）。一方で、望ましくない大きな断片欠失及びｐ５３依存性のＤＮＡ損傷応答（Ｈａａｐａｎｉｅｍｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，２４（７）：９２７－９０３，２０１８、Ｉｈｒｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，２４（７）：９３９－９４６，２０１８、Ｋｏｓｉｃｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　３６：７６５，２０１８）を生じさせることによってヌクレアーゼ誘導性のＤＳＢが宿主細胞に副作用を引き起こし得ることが研究によって報告されている（Ｈａａｐａｎｉｅｍｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，２４（７）：９２７－９０３，２０１８、Ｉｈｒｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，２４（７）：９３９－９４６，２０１８、Ｋｏｓｉｃｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　３６：７６５，２０１８）。

【１１１８】

塩基エディター（ＢＥ）は、ＤＳＢを創出することなく標的ゲノム遺伝子座に対してヌクレオチド置換を正確に導入する能力を有する。ＢＥは、ＤＳＢを創出する能力を有さない触媒的に無能化されたヌクレアーゼ（Ｃａｓ９ニッカーゼ（ｎＣａｓ９）など）を含み、このヌクレアーゼは、核酸塩基デアミナーゼ酵素と融合されており、さらに場合によってはＤＮＡグリコシラーゼ阻害剤とも融合されている。現在のところ、シチジン塩基エディター（ＣＢＥ）及びアデニン塩基エディター（ＡＢＥ）という２つの主要カテゴリーが存在し、ＣＢＥ及びＡＢＥは、それぞれＣ＞Ｔ変換及びＡ＞Ｇ変換を触媒し、こうした変換は、ｎＣａｓ９と対になったシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）によって決定される狭い標的化可能枠（通常は５塩基対ほど）において生じる（Ｇａｕｄｅｌｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ５５１：４６４－４７１，２０１７、Ｋｏｍｏｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ５３３：４２０－４２４，２０１６、Ｎｉｓｈｉｄａ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ３５３，２０１６）。ＣＢＥとＡＢＥとの間の主な差異はデアミナーゼ領域にあり、この領域にＣＢＥはシチジンデアミナーゼ（例えば、ＡＰＯＢＥＣ１）を含み、ＡＢＥでは、実験室で進化したＴａｄＡデオキシアデノシンデアミナーゼが使用される。さまざまな真核細胞において効率的に塩基編集が生じることが複数のグループによって報告されている（Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｅ Ｂｉｏｌｏｇｙ ２０：１０１，２０１９、Ｃｈａｄｗｉｃｋ ｅｔ ａｌ．，Ａｒｔｅｒｉｏｓｃｌｅｒ Ｔｈｒｏｍｂ Ｖａｓｃ Ｂｉｏｌ ３７：１７４１－１７４７，２０１７、Ｚｅｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ２６：５３５－５４１，２０２０、Ｌｉｍ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ，８２（４）：１１７７－１１８９，２０２０、Ｇａｏ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ５５３：２１７－２２１，２０１８）。ヒトで知られるすべての病原性単一ヌクレオチド多型（ＳＮＰ）の６０％が現在のＢＥによって元に戻せる可能性があり得ると予想されている（Ｒｅｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ １９：７７０－７８８，２０１８）。

【１１１９】

β－異常ヘモグロビン症は、正常β－グロビンの完全産生欠損または産生欠損を伴う遺伝性障害の一般的な一群であり、主には、β－サラセミア及び鎌状赤血球症（ＳＣＤ）が含まれる。特定の遺伝的欠損に応じて、β－サラセミア患者及びＳＣＤ患者はさまざまな重症度の疾患徴候を示す。新生児スクリーニング及び治療予防に伴ってＳＣＤ小児の死亡率は大きく減少してはいるものの、ほとんどのβ－サラセミアメジャー（$\beta^0$）患者及びＳＣＤ患者は生涯にわたる急性合併症及び慢性合併症に苦しめられる（Ｗａｒｅ ｅｔ ａｌ．，Ｌａｎｃｅｔ ３９０：３１１－３２３，２０１７、Ｈｉｇｇｓ ｅｔ ａｌ．，Ｌａｎｃｅｔ ３７９：３７３－３８３，２０１２）。一方で、成人患者によっては胎児型ヘモグロビン（ＨｂＦ）（妊娠段階の大半の期間で優勢になり、通常は出生後すぐにサイレンシングを受ける）のレベルが高く、こうした成人患者では疾患症状は著しく軽度化する。遺伝性高胎児ヘモグロビン血症（ＨＰＦＨ）のこの現象は、ＨｂＦが強力な保護効果を有することを実証するものであり、β－グロビン障害を有する患者に対する遺伝子治療方針としてγ－グロビンを再活性化させることに対する優れた理論的根拠を与える。

【１１２０】

ＨＰＦＨ変異は多くのものが報告されている（Ｏｒｋｉｎ ＆ Ｂａｕｅｒ，Ａｎｎｕａｌ Ｒｅｖｉｅｗ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ７０：２５７－２７１，２０１９及びＷｉｅｎｅｒｔ ｅｔ ａｌ．，Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ：ＴＩＧ ３４：９２７－９４０，２０１８によって概説されている）。ＨＢＧ１／２プロモーター中には主要なＨＰＦＨ ＳＮＰクラスターが３つ存在しており、これらのクラスターは、－１５０部位付近、－１７５部位付近、及び－２００部位付近に位置する。これらの部位にＨＰＦＨ変異を導入することで、ＨｂＦリプレッサー（例えば、ＢＣＬ１１Ａ及びＺＢＴＢ７Ａ）の結合部位を破壊するか、または活性化因子（例えば、ＴＡＬ１及びＫＬＦ１）の機能獲得型結合部位を創出してＨｂＦ発現の抑制を解除できる（Ｔｒａｘｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ２２：９８７－９９０，２０１６、Ｍａｒｔｙｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ５０：４９８－５０３，２０１８

）。ＨｂＦの再活性化は、ＨｂＦ制御因子（ＢＣＬ１１Ａ（主要なＨｂＦリプレッサー）など）の発現を調節することによっても達成され得る（Ｓａｎｋａｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　３２２：１８３９－１８４２，２００８）。ＢＣＬ１１Ａは発生的に不可欠な役割を果たすことからＢＣＬ１１Ａを直接的にノックアウトすることは選択肢とはならないが、ＢＣＬ１１Ａの赤血球特異的エンハンサーを編集することによってＢＣＬ１１Ａを部分的に下方制御することで、動物の生存能を維持しながら効率的にＨｂＦを誘導することが可能になる（Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ　２５：７７６－７８３，２０１９、Ｃａｎｖｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　５２７：１９２－１９７，２０１５）。ＢＥ：ｓｇＲＮＡリボ核タンパク質（ＲＮＰ）の電気穿孔導入を使用して、＋５８　ＢＣＬ１１Ａエンハンサー中の決定的に重要なモチーフを塩基エディターによって破壊することで、患者由来のＣＤ３４$^{+}$ＨＳＰＣにおいて治療ＨｂＦが誘導されることが最近の研究によって実証されている。

【１１２１】

最近では、インビボでのＨＳＣの形質導入によって簡易化された遺伝子治療手法が確立されている。キメラファイバーによってＨＳＣへの指向性が得られること、最も一般に使用される導入遺伝子が３２ｋｂ超のペイロードによって収容されることなどを含めて、有利な特性を複数有することから、ヘルパー依存型ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを使用した。この試験では、設計を最適化することで、ＢＣＬ１１ＡエンハンサーまたはＨＢＧ１／２プロモーターを標的とするＢＥベクターの一団を得ることに成功した。ここでは、トランスジェニックマウスモデルにおいて、ＨＤＡＤ－ＡＢＥベクター用いたインビボでの塩基編集によってＨＰＦＨ変異が再創出され、ＨｂＦが効率的に誘導されたことが示される。

【１１２２】

材料及び方法．

【１１２３】

インビボでの形質導入及び選択のための試薬：

Ｇ－ＣＳＦ（Ｎｅｕｐｏｇｅｎ（商標））（Ａｍｇｅｎ，Ｔｈｏｕｓａｎｄ　Ｏａｋｓ，ＣＡ）、ＡＭＤ３１００（ＭｉｌｌｉｐｏｒｅＳｉｇｍａ，Ｂｕｒｌｉｎｇｔｏｎ，ＭＡ）、及びデキサメタゾンリン酸エステルナトリウム（Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ　Ｋａｂｉ　ＵＳＡ，Ｌａｋｅ　Ｚｕｒｉｃｈ，ＩＬ）を使用した。Ｏ$^{6}$－ベンジルグアニン（Ｏ$^{6}$－ＢＧ）及びカルムスチン（ＢＣＮＵ）は、ＭｉｌｌｉｐｏｒｅＳｉｇｍａから入手した。

【１１２４】

ＨＤＡｄベクターの生成：

ハーバード大学のＤａｖｉｄ　Ｒ．Ｌｉｕの研究室によって開発された塩基編集系を使用した（Ｋｏｂｌａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　３６：８４３－８４６，２０１８）。ｐＣＭＶ＿ＡｎｃＢＥ４ｍａｘプラスミド及びｐＣＭＶ＿ＡＢＥｍａｘプラスミドは、Ａｄｄｇｅｎｅ（Ｗａｔｅｒｔｏｗｎ，ＭＡ）から購入した。Ａｄｄｇｅｎｅから入手した下記のプラスミドも使用した：図１３１Ａ及び図１３１Ｂに示されるＢＥ４、ＡＢＥ７．１０、ｐＬｅｎｔｉ－ＢＥ３ＲＡ－ＰＧＫ－Ｐｕｒｏ及びｐＬｅｎｔｉ－ＦＮＬＳ－ＰＧＫ－Ｐｕｒｏ、ならびにＢＥ３ＲＡ（Ｚａｆｒａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　３６：８８８－８９３，２０１８）。以下に記載のオリゴ及びｇＢｌｏｃｋｓは、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（ＩＤＴ）（Ｃｏｒａｌｖｉｌｌｅ，ＩＡ）によって合成されたものであり、表１４に示される。

【表１６】

表１４：塩基エディターのガイド配列.

| エディター | 名称 | 配列 (5'→3')* | 標的部位/注記 |
|---|---|---|---|
| BCL11A | | | |
| CBE | sgBCL#1 | TTTATCACAGGCTCCAGGAA | GATAA モチーフ |
| CBE | sgBCL#2 | TTTTATCACAGGCTCCAGGA | GATAA モチーフ |
| ABE | sgBCL#3 | TTTATCACAGGCTCCAGGAA | GATAA モチーフ |
| ABE | sgBCL#4 | TTTTATCACAGGCTCCAGGA | GATAA モチーフ |
| ABE-xCas9 | sgBCL#5 | CTGTGATAAAAGCAACTGTT | GATAA モチーフ, NGC PAM |
| ABE-xCas9 | sgBCL#6 | GATAAAAGCAACTGTTAGCT | GATAA モチーフ, NGC PAM |
| HBG | | | |
| CBE | sgHBG#1 | CTTGACCAATAGCCTTGACA | TGACCA, -114-115 CC>GG |
| ABE | sgHBG#2 | CTTGACCAATAGCCTTGACA | TGACCA, -113 A>G |
| ABE | sgHBG#3 | GCTATTGGTCAAGGCAAGGC | -111 T>C |
| ABE | sgHBG#4 | GTGGGGAAGGGGCCCCCAAG | -198 T>C |
| CBE-xCas9 | sgHBG#5 | CCTTCCCCACACTATCTCAA | -197 C>T, -196 C>T, NGC PAM |
| ABE-xCas9 | sgHBG#6 | AGATATTTGCATTGAGATAG | -175 T>C, NGT PAM |
| HBB | | | |
| CBE | sgHBB_停止 | CTTGCCCCACAGGGCAGTAA | HBB CDS, TGG > TAA (HBB 停止) |
| ABE | sgHBB_スキップ | AGACTCACCCTGAAGTTCTC | HBB イントロン, GT > GC (HBB スプライシングスキップ) |
| 陽性対照 | | | |
| CRISPR/Cas9 | sgHBG_CRISPR | CTTGTCAAGGCTATTGGTCA | TGACCA |
| 陰性対照 | | | |
| CBE | sgNeg | GGTGTCGAAATGAGAAGAAG | CCR5 CDS, nt673 C>T (CCR5 停止) |

下線部：決定的に重要なモチーフ中の標的塩基（複数可）.

*上から下の順：配列番号２４４、配列番号２４５、配列番号２４４、配列番号２４５、配列番号２４８～２５０、配列番号２５０、配列番号２５２～２５９.

【１１２５】

ＣＢＥコンストラクト及び第１バージョンのＡＢＥコンストラクト：

３ステップでクローニングを行った。ステップ１）ＥａｇＩ－ＮａｅＩ断片をｇＢｌｏｃｋ＃１で置き換えることによってＢＥ４中のＢｓｍＢＩ部位を破壊した。ＢｓｍＢＩ－ＮａｒＩ断片をｇＢｌｏｃｋ＃２で置き換えることによってｐＣＭＶ＿ＡｎｃＢＥ４ｍａｘ中のＢｓｍＢＩ部位を破壊した。ｐＢＳＴ－ＣＲＩＳＰＲと命名したＢｓｍＢＩ　ｓｇＲＮＡクローニング部位含有ベクターを、ｉｎｆｕｓｉｏｎ（Ｔａｋａｒａ，Ｍｏｕｎｔａｉｎ　Ｖｉｅｗ，ＣＡ）を使用して下記の４つの断片を統合させることによって生成させた：＃３ＦＲを使用してＬｅｎｔｉＣＲＩＳＰＲｖ２（Ａｄｄｇｅｎｅ）から増幅した２．３ｋｂのＵ６－フィラー－ｇＲＮＡ骨格断片、ｐＢＳＴ－ｓｇＢＣＬ１１Ａｅ１（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ　１３１：２９１５－２９２８，２０１８）からそれぞれ＃４ＦＲ及び＃５ＦＲを使用して増幅した１．４ｋｂ断片及び１．０ｋｂ断片、ならびに

ＢｓａＩ－ＢａｍＨＩでの消化によって遊離させたｐＢＳＴ－ｓｇＢＣＬ１１Ａｅ１の９．６ｋｂ断片。ｉｎｆｕｓｉｏｎを使用して下記の３つの断片を連結することによって中間体プラスミドｐＢＳ－Ｕ６－Ｅｆ１αを作製した：それぞれプライマー＃６ＦＲ及びプライマー＃７ＦＲを使用してｐＢＳＴ－ＣＲＩＳＰＲから増幅した３．６ｋｂのＵ６－フィラー－ｇＲＮＡ骨格－Ｅｆ１α配列及び２．９ｋｂのベクター骨格、ならびにＢｓｅＲＩクローニング部位を含む０．５ｋｂのｇＢｌｏｃｋ（＃８）。この中間体をＢｓｅＲＩで消化し、ＥａｇＩ－ＰｍｅＩ処理後のＢＥ４－ΔＢｓｍＢＩの５．５ｋｂ断片と再統合してｐＢＳ－ＢＥ４を得た。６．６ｋｂのｐＢＳ骨格－Ｕ６－フィラー－ｇＲＮＡ骨格－Ｅｆ１α配列を、＃９ＦＲを使用してｐＢＳ－ＢＥ４からＰＣＲ増幅し、その後にＮｏｔＩ－ＡｇｅＩで消化したｐＣＭＶ－ＡＢＥｍａｘ及びｐＣＭＶ＿ＡｎｃＢＥ４ｍａｘ－ΔＢｓｍＢＩとｉｎｆｕｓｉｏｎを使用して、それぞれｐＢＳ－ＡｎｃＢＥ４ｍａｘ及びｐＢＳ－ＡＢＥｍａｘを得た。次に、ｓｇＲＮＡオリゴを合成し、アニーリングさせ、ｐＢＳ－ＢＥ４、ｐＢＳ－ＡｎｃＢＥ４ｍａｘ、及びｐＢＳ－ＡＢＥｍａｘのＢｓｍＢＩ部位に挿入して、オールイン塩基編集要素を含むシャッタープラスミド（ｐＢＳ－ＡＢＥｍａｘ－ｓｇＨＢＧ＃２など）を得た。ステップ２）以前の説明（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ　８０：５４９－５６０，２０２０）と同様に、ＰａｃＩクローニング部位を有する２１．０ｋｂのｐＨＣＡＳ３－ＭＣＳベクターを生成させ、この生成では変更点として、ＥｃｏＲＩでの制限酵素消化及び１．８ｋｂのＥｃｏＲＩ断片との再ライゲーションによってスタッファーＤＮＡをトリミングして小さくした。＃１０ＦＲによってｐＨＣＡ－二重－ＭＧＭＴ－ＧＦＰ（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ　１３１：２９１５－２９２８，２０１８）から２．２ｋｂのＰＧＫ－ＭＧＭＴ$^{Ｐ１４０Ｋ}$－２Ａ－ＧＦＰ－ｂＧＨポリＡ配列を増幅し、ＰａｃＩで消化したｐＨＭ５－ＦＲＴ－ＩＲ－Ｅｆ１α－ＧＦＰ（Ｒｉｃｈｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ　１２８：２２０６－２２１７，２０１６）と再統合させてｐＨＭ５－ＦＩ－ＰＧＫ－ＭＧＭＴ－ＧＦＰを得た。その後、＃１１ＦＲ及びｉｎｆｕｓｉｏｎクローニングによってＩ－ＣｅｕＩ部位とＰＩ－ＳｃｅＩ部位との間の断片をこのコンストラクトからｐＨＣＡＳ３－ＭＣＳのＰｓｈＡＩ部位に移してｐＨＣＡＳ３－ＦＩ－ＰＧＫ－ＭＧＭＴ－ＧＦＰ－ＭＣＳを形成させた。ステップ３）ステップ１から得られたシャトルプラスミド、及びステップ２から得られたベクターをＰａｃＩで処理し、再統合させることで、最終コンストラクト（ｐＨＣＡ－ＡＢＥｍａｘ－ｓｇＨＢＧ＃２－ＦＩ－ＭＧＭＴ－ＧＦＰなど）を得た。ｓｇＲＮＡ配列が異なる最終ｐＨＣＡコンストラクトも同様に生成させ、この生成では変更点として、ステップ１において異なるｓｇＲＮＡを使用した。

【１１２６】

第２バージョンのＡＢＥコンストラクト：

第２バージョンのＡＢＥコンストラクトと第１バージョンとは、プロモーター、代替コドン使用、及びｍｉＲＮＡ制御性の遺伝子発現が異なる。このクローニングも３ステップで行った。ステップ１）ｍｉＲ１８３／２１８標的配列を含む１．５ｋｂの３’β－グロビンＵＴＲを、プライマー＃１２ＦＲを使用してｐＢＳＴ－ｓｇＨＢＧ１－ｍｉＲ（Ｌｉｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ　１３１：２９１５－２９２８，２０１８）から増幅した後、ｐＢＳ－ＡＢＥｍａｘ－ｓｇＨＢＧ＃２のＮｏｔＩ－ＨｐａＩ部位に挿入してｐＢＳ－ＡＢＥｍａｘ－ｓｇＨＢＧ＃２－ｍｉＲを得た。下記の４つの断片をＡｓｃＩ－ＥｃｏＲＶ消化ｐＢＳ－ＡＢＥｍａｘ－ｓｇＨＢＧ＃２－ｍｉＲとｉｎｆｕｓｉｏｎクローニングによって連結することによって第２バージョンのＡＢＥコンストラクトのためのシャトルプラスミド（例えば、ｐＢＳ－ＡＢＥｏｐｔｉ－ｓｇＨＢＧ＃２－ｍｉＲ）を得た：＃１３ＦＲを使用してｐＨＭ５－ＦＩ－ＰＧＫ－ＭＧＭＴ－ＧＦＰから増幅したヒトＰＧＫプロモーター、代替コドン使用によって配列反復性を低減した２つのＴａｄＡ遺伝子を含む２つのｇＢｌｏｃｋｓ（＃１４及び＃１５）、ならびに＃１６ＦＲを使用してｐＢＳ－ＡＢＥｍａｘ－ｓｇＨＢＧ＃２から増幅した１．９ｋｂの配列。ステップ２）ｐＨＭ－ＦＲＴ－ＩＲ－Ｅｆ１α－ＭＧＭＴ（Ｐ１４０Ｋ）－２Ａ－ＧＦＰ－ｐＡのＰｓｈＡＩ部位とＮｏｔＩ部位との間に位置するＳＶ４０ポリＡ配列をｂＧＨポリＡ配列（ｇＢｌｏｃｋ＃１

７）で置き換えてｐＨＭ－ＦＩ－Ｅｆ１α－ＭＧＭＴ（Ｐ１４０Ｋ）－ＧＦＰ－ｂＧＨｐＡを得た。次に、Ｉ－ＣｅｕＩ部位とＰＩ－ＳｃｅＩ部位との間に位置する４．９ｋｂのトランスポゾン全体を、＃１１ＦＲを使用してｐＨＣＡＳ３－ＭＣＳのＰｓｈＡＩ部位に移してｐＨＣＡＳ３－ＦＩ－Ｅｆ１α－ＭＧＭＴ－ＧＦＰ－ＭＣＳを得た。ステップ３）ステップ１から得られたコンストラクトとステップ２から得られたコンストラクトとをＰａｃＩ処理後にｉｎｆｕｓｉｏｎクローニングによって統合させてｐＨＣＡ－ＡＢＥｏｐｔｉ－ｓｇＨＢＧ＃２－ＦＩ－ＭＧＭＴ－ＧＦＰを得た。ｓｇＲＮＡ配列が異なる最終ｐＨＣＡコンストラクトを同様に生成させた。

【１１２７】

クローニングと関連するすべてのＰＣＲ増幅においてＰｈｕｓｉｏｎ Ｈｏｔ Ｓｔａｒｔ ＩＩ高忠実度ＤＮＡポリメラーゼを使用した。最終コンストラクトを、いくつかの制限酵素（ＨｉｎｄＩＩＩ、ＥｃｏＲＩ、及びＰｍｅＩ）によってスクリーニングし、導入遺伝子を含む全領域をシークエンシングすることによって確認した。

【１１２８】

ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターの産生については、対応するプラスミドをＰｍｅＩで直鎖化し、ＡｄＮＧ１６３－５／３５＋＋を含む１１６細胞（Ｐａｌｍｅｒ ＆ Ｎｇ，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ ８：８４６－８５２，２００３）においてレスキューした。ＡｄＮＧ１６３－５／３５＋＋は、Ａｄ５ファイバーテール、Ａｄ３５ファイバーシャフト、及び親和性増強型Ａｄ３５＋＋ファイバーノブから構成されるキメラファイバーを含むＡｄ５／３５＋＋ヘルパーベクターである（Ｒｉｃｈｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ １２８：２２０６－２２１７，２０１６）。他に詳細に記載されるように（Ｐａｌｍｅｒ ＆ Ｎｇ，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ ８：８４６－８５２，２００３）１１６細胞においてＨＤ－Ａｄ５／３５＋＋ベクターを増幅した。ヘルパーウイルスの混入レベルは０．０５％未満であることが明らかとなった。力価は、２～５×$10^{12}$ウイルス粒子（ｖｐ）／ｍＬであった。

【１１２９】

細胞株のトランスフェクション：

ベンダーの説明に従って２９３ＦＴ細胞（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及びＫ５６２細胞を培養した。製造者のプロトコールに従ってｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ３０００（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して４μｇのプラスミド（３μｇの塩基エディターまたはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９＋１μｇのｐＳＰ－ｓｇＢＣＬ１１ＡＥ（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ ９：３９０－４０１，２０１８））を、６ウェルプレートに事前に播種した２９３ＦＴ細胞にトランスフェクションした。供給者のプロトコールに従ってｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｉｏｎ（カタログ番号Ｖ４ＸＣ－２０２４）（Ｌｏｎｚａ，Ｂａｓｅｌ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を使用して２．６６μｇプラスミド（２μｇの塩基エディターまたはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９＋０．６μｇのｐＳＰ－ｓｇＢＣＬ１１ＡＥ）をＫ５６２細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションから４日後にゲノムＤＮＡを単離して分析用とした。

【１１３０】

ＨＵＤＥＰ－２細胞及び赤血球分化：

１００ｎｇ／ｍｌのＳＣＦ、３ＩＵ／ｍｌのＥＰＯ、$10^{-6}$Ｍのデキサメタゾン、及び１μｇ／ｍｌのドキシサイクリン（ＤＯＸ）が添加されたＳｔｅｍＳｐａｎ ＳＦＥＭ培地（ＳＴＥＭＣＥＬＬ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）中でＨＵＤＥＰ－２細胞（Ｋｕｒｉｔａ ｅｔ ａｌ．，ＰＬｏＳ Ｏｎｅ ８：ｅ５９８９０，２０１３）を培養した。５％のヒトＡＢ血清、１００ｎｇ／ｍｌのＳＣＦ、３ＩＵ／ｍｌのＥＰＯ、１０μｇ／ｍｌのインスリン、３３０μｇ／ｍｌのトランスフェリン、２Ｕ／ｍｌのヘパリン、及び１μｇ／ｍｌのＤＯＸを含むＩＭＤＭ中で赤血球分化を６日間誘導した。

【１１３１】

コロニー形成単位（ＣＦＵ）アッセイ：

製造者の説明に従ってマウスｌｉｎｅａｇｅ ｃｅｌｌ ｄｅｐｌｅｔｉｏｎキット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）を使用して骨髄ＭＮＣ中の系譜決定細胞を除去することによって系譜マイナス（Ｌｉｎ$^{-}$）細胞を単離した。マウス完全培地を含むＣｏｌｏｎｙＧＥＬ（Ｒｅａｃｈｂｉｏ，Ｓｅａｔｔｌｅ，ＷＡ）を製造者のプロトコールに従って使用してＣＦＵアッセイを実施した。播種から１０日後にコロニー数を数えた。

【１１３２】

Ｔ７ＥＩミスマッチヌクレアーゼアッセイ：

提供プロトコールに従ってＰｕｒｅＬｉｎｋ Ｇｅｎｏｍｉｃ ＤＮＡ Ｍｉｎｉ Ｋｉｔ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を使用してゲノムＤＮＡを単離した（Ｍｉｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２５：７７８－７８５，２００７）。赤血球ＢＣＬ１１Ａエンハンサーの標的部位を含むゲノムセグメントをＰＣＲプライマー（ＢＣＬ１１Ａフォワード（配列番号２４７）及びリバース（配列番号２６３））によって増幅した。ＰＣＲ産物をハイブリダイゼーションさせ、２．５ユニットのＴ７ＥＩ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）を用いて３７℃で３０分間処理した。消化したＰＣＲ産物を１０％ ＴＢＥ ＰＡＧＥ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）によって分離し、エチジウムブロマイドで染色した。１００ｂｐ ＤＮＡラダー（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用した。ＩｍａｇｅＪソフトウェアを使用してバンド強度を解析した。切断％＝（１－ｓｑｒｔ（親バンド／（親バンド＋切断バンド））×１００％。

【１１３３】

フローサイトメトリー：

１×１０$^{6}$個細胞／１００μＬでＦＡＣＳ緩衝液（ＰＢＳ、１％ＦＢＳ）中に細胞を再浮遊させ、ＦｃＲ遮断試薬（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ａｕｂｕｒｎ ＣＡ）と共に氷上で１０分間インキュベートした。次に、１０$^{6}$個細胞当たり１００μＬの染色抗体溶液を添加し、暗所、氷上で３０分間インキュベートした。インキュベート後、細胞をＦＡＣＳ緩衝液中で１回洗浄した。二次染色については、二次染色溶液を用いて染色ステップを再度実施した。洗浄後、ＦＡＣＳ緩衝液中に細胞を再浮遊させ、ＬＳＲＩＩフローサイトメーター（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓａｎ Ｊｏｓｅ，ＣＡ）を使用して分析した。前方散乱領域及び側方散乱領域のゲートを使用して残骸を除外した。次に、前方散乱高及び前方散乱幅のゲートを使用して単一細胞をゲートした。次に、ＦｌｏｗＪｏ（バージョン１０．０．８、ＦｌｏｗＪｏ，ＬＬＣ）を使用してフローサイトメトリーデータを解析した。ＬＳＫ細胞の分析については、ビオチン結合型系譜検出カクテル（カタログ番号１３０－０９２－６１３）（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）、ｃ－Ｋｉｔに対する抗体（クローン２Ｂ８、カタログ番号１２－１１７１－８３）、及びＳｃａ－１に対する抗体（クローンＤ７、カタログ番号２５－５９８１－８２）で細胞を染色した後、ＡＰＣ結合型ストレプトアビジン（カタログ番号１７－４３１７－８２）（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）での二次染色に供した。ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅから入手した他の抗体には、抗マウスＣＤ３－ＡＰＣ（クローン１７Ａ２）（カタログ番号１７－００３２－８２）、抗マウスＣＤ１９－ＰＥ－シアニン７（クローンｅＢｉｏ１Ｄ３）（カタログ番号２５－０１９３－８２）、及び抗マウスＬｙ－６６（Ｇｒ－１）－ＰＥ（クローンＲＢ６－８Ｃ５）（カタログ番号１２－５９３１－８２）が含まれる。抗マウスＴｅｒ－１１９－ＡＰＣ（クローンＴｅｒ－１１９）（カタログ番号１１６２１１）は、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ（ＳａｎＤｉｅｇｏ，ＣＡ）から入手した。

【１１３４】

ヒトγ－グロビンの発現を検出する細胞内フローサイトメトリー：

ＦＩＸ＆ＰＥＲＭ（商標）細胞透過処理キット（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用し、製造者のプロトコールに従った。簡潔に記載すると、５×１０$^{6}$個のＨＵＤＥＰ－２細胞を１００μＬのＦＡＣＳ緩衝液中に再浮遊させた。１００μ

Ｌの試薬Ａ（固定化媒体）を添加し、室温で２～３分間インキュベートした。次に、予冷した１ｍＬの無水メタノールを添加し、混合し、暗所、氷上で１０分間インキュベートした。次に、ＦＡＣＳ緩衝液で試料を洗浄し、０．６μｇのヘモグロビンγ抗体（クローン５１－７、カタログ番号ｓｃ－２１７５６ＰＥ）（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｄａｌｌａｓ，ＴＸ）を含む１００μＬの試薬Ｂ（透過処理媒体）中に再浮遊させ、室温で３０分間インキュベートした。洗浄後、細胞をＦＡＣＳ緩衝液中に再浮遊させ、分析した。

【１１３５】

グロビンＨＰＬＣ：

個々のグロビン鎖レベルの定量化は、ＳＰＤ－１０ＡＶダイオードアレイ検出器及びＬＣ－１０ＡＴバイナリポンプを備えたＳｈｉｍａｄｚｕ Ｐｒｏｍｉｎｅｎｃｅ機器（Ｓｈｉｍａｄｚｕ，Ｋｙｏｔｏ，Ｊａｐａｎ）で実施した。ポリペプチド用のＶｙｄａｃ２１４ＴＰ（商標）Ｃ４逆相カラム（２１４ＴＰ５４カラム，Ｃ４，３００Å，５μｍ，内径４．６ｍｍ×２５０ｍｍ）（Ｈｉｃｈｒｏｍ，ＵＫ）を使用した。トリフルオロ酢酸含量０．１％の水／アセトニトリルの４０％→６０％グラジエント混合物を流速１ｍＬ／分で適用した。

【１１３６】

ベクターコピー数の測定：

細胞当たりのアデノウイルスゲノムコピー数の絶対的定量化については、提供プロトコールに従ってＰｕｒｅＬｉｎｋ Ｇｅｎｏｍｉｃ ＤＮＡ Ｍｉｎｉ Ｋｉｔ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して細胞からゲノムＤＮＡを単離し、ｑＰＣＲのテンプレートとして使用した。このｑＰＣＲは、ｐｏｗｅｒ ＳＹＢＲ（商標）ｇｒｅｅｎ ＰＣＲ ｍａｓｔｅｒ ｍｉｘ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して実施した。下記のプライマー対を使用した：ＭＧＭＴフォワード（配列番号２２０）及びリバース（配列番号２２１）。

【１１３７】

リアルタイム逆転写ＰＣＲ：

ＴＲＩｚｏｌ（商標）試薬（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）の使用後にフェノール－クロロホルム抽出を行うことによって５×１０$^{6}$個の分化ＨＵＤＥＰ－２細胞または１００μＬの血液から全ＲＮＡを抽出した。ＱｕａｎｔｉＴｅｃｔ逆転写キット（Ｑｉａｇｅｎ）及びｐｏｗｅｒ ＳＹＢＲ（商標）ｇｒｅｅｎ ＰＣＲ ｍａｓｔｅｒ ｍｉｘ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用した。ＳｔｅｐＯｎｅＰｌｕｓ ｒｅａｌ－ｔｉｍｅ ＰＣＲ ｓｙｓｔｅｍ（ＡＢ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）でリアルタイム定量的ＰＣＲを実施した。下記のプライマー対を使用した：マウスＲＰＬ１０（ハウスキーピング）フォワード（配列番号１８９）及びリバース（配列番号１９０）、ヒトγ－グロビンフォワード（配列番号１９１）及びリバース（配列番号１９２）、ヒトβ－グロビンフォワード（配列番号２１６）及びリバース（配列番号２１７）、マウスβ－メジャーグロビンフォワード（配列番号１９３）及びリバース（配列番号１９４）、マウスαグロビンフォワード（配列番号２１２）及びリバース（配列番号２１３）。

【１１３８】

塩基編集の検出：

上記のようにゲノムＤＮＡを単離した。ＢＣＬ１１Ａエンハンサーの標的部位を含むゲノムセグメント及びＨＢＧ１／２プロモーターの標的部位を含むゲノムセグメントを、ＫＯＤ Ｈｏｔ Ｓｔａｒｔ ＤＮＡポリメラーゼ（ＭｉｌｌｉｐｏｒｅＳｉｇｍａ）を用いて増幅し、この増幅では、下記のプライマーを使用した：ＨＢＧ１フォワード（配列番号３１）、リバース（配列番号３３）；ＨＢＧ２フォワード（配列番号６９）、リバース（配列番号７２）；及び上に示されるＢＣＬ１１Ａプライマー。ＮｕｃｌｅｏＳｐｉｎ Ｇｅｌ ＆ ＰＣＲ Ｃｌｅａｎ－ｕｐキット（Ｔａｋａｒａ）を使用することによって増幅産物を精製し、下記のプライマーを用いてシークエンスした：ＨＢＧ１－ｓｅｑ（配

列番号１０５）、ＨＢＧ２－ｓｅｑ（配列番号２３７）、及びＢＣＬ１１Ａ－ｓｅｑ（配列番号２４７）。ＥｄｉｔＲ １．０．９（Ｋｌｕｅｓｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＣＲＩＳＰＲ Ｊ １：２３９－２５０，２０１８）を使用することによってサンガーシークエンシング結果から塩基編集レベルを定量化した。

【１１３９】

動物試験：

動物を使用する実験はすべて、ｔｈｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎによって示される施設ガイドラインに従って実施した。ｔｈｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎは、Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ ｆｏｒ ｔｈｅ Ａｓｓｅｓｓｍｅｎｔ ａｎｄ Ａｃｃｒｅｄｉｔａｔｉｏｎ ｏｆ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ａｎｉｍａｌ Ｃａｒｅ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ（ＡＡＬＡＣ）が公認する研究施設であり、この大学で実施される生きた動物を扱う研究はすべて、Ｏｆｆｉｃｅ ｏｆ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ａｎｉｍａｌ Ｗｅｌｆａｒｅ（ＯＬＡＷ）Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ａｓｓｕｒａｎｃｅ（ＰＨＳ）ポリシー、ＵＳＤＡ Ａｎｉｍａｌ Ｗｅｌｆａｒｅ Ａｃｔ ａｎｄ Ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎｓ、ｔｈｅ Ｇｕｉｄｅ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅ ｏｆ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ａｎｉｍａｌｓ、及びｔｈｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ ＷａｓｈｉｎｇｔｏｎのＩｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ Ａｎｉｍａｌ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ（ＩＡＣＵＣ）ポリシーに従うものである。試験は、ｔｈｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ ＷａｓｈｉｎｇｔｏｎＩＡＣＵＣ（プロトコール第３１０８－０１号）によって承認されたものである。ヒトＣＤ４６ゲノム遺伝子座を含み、かつヒトと同様のレベル及びパターンでＣＤ４６を発現するＣ５７ＢＬ／６Ｊベースのトランスジェニックマウス（ｈＣＤ４６$^{+/+}$マウス）については以前に記載されている（Ｋｅｍｐｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｅｘｐ Ｉｍｍｕｎｏｌ １２４：１８０－１８９，２００１）。２４８ｋｂの野生型β－グロビン遺伝子座酵母人工染色体（β－ＹＡＣ）を保有するトランスジェニックマウスを使用した（Ｐｅｔｅｒｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ Ｎ Ｙ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ８５０：２８－３７，１９９８）。β－ＹＡＣマウスをヒトＣＤ４６$^{+/+}$マウスと交配させることで、インビボＨＳＰＣ形質導入試験のためのβ－ＹＡＣ$^{+/-}$／ＣＤ４６$^{+/+}$マウスを得た。マウスの遺伝子型判定には下記のプライマーを使用した：ＣＤ４６フォワード（配列番号２３３）及びリバース（配列番号２３４）、β－ＹＡＣ（γ－グロビンプロモーター）フォワード（配列番号２４２）及びリバース（配列番号２４３）。

【１１４０】

ＨＳＰＣの動員及びインビボでの形質導入：

ヒト組換えＧ－ＣＳＦ（５μｇ／マウス／日、４日）を皮下（ＳＣ）注射した後、５日目にＡＭＤ３１００（５ｍｇ／ｋｇ）をＳＣ注射することによってマウスにおいてＨＳＰＣを動員した。さらに、ウイルス注射の１６時間前及び２時間前にデキサメタゾン（１０ｍｇ／ｋｇ、ＩＰ）を動物に投与した。ＡＭＤ３１００の注射から３０分後及び６０分後に、後眼窩静脈叢を介してウイルスベクター（２回用量のウイルス（４×１０$^{10}$ｖｐ／用量×２用量）を用いた）を動物に静脈内注射した。塩基編集ウイルス及びＳＢウイルスを１：１の比で同時送達した。

【１１４１】

インビボ選択：

形質導入から１週間後（Ｔｏｗｎｅｓモデル）または４週間後（β－ＹＡＣモデル）に選択を開始した。時間間隔を３０分としてＯ$^{6}$－ＢＧ（１５ｍｇ／ｋｇ、ＩＰ）をマウスに２回注射した。２回目のＯ$^{6}$－ＢＧ注射から１時間後に５ｍｇ／ｋｇのＢＣＮＵをマウスに注射（ＩＰ）した。さらに２回の選択（１回目の選択から２週間後及び４週間後の時点で実施）を実施し、ＢＣＮＵの用量を、それぞれ７．５ｍｇ／ｋｇ及び１０ｍｇ／ｋｇとした。

【１１４２】

二次骨髄移植：

Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙから入手した６～８週齢の雌性Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスをレシピエントとした。移植日に、レシピエントマウスに１０００Ｒａｄの照射を行った。インビボで形質導入したＣＤ４６ｔｇマウスから骨髄細胞を無菌的に単離し、系譜決定細胞が除去された細胞を上記のようにＭＡＣＳを使用して単離した。照射から６時間後、マウス当たり$1\times10^{6}$個細胞として細胞を静脈内注射した。終点分析に向けて、移植から１６週間の間、二次レシピエントを保持した。

【１１４３】

組織分析：

厚さ２．５μｍの脾臓組織切片及び肝臓組織切片を４％のホルムアルデヒド中で少なくとも２４時間固定化し、脱水し、パラフィン中に包埋した。髄外造血の組織学的評価にはヘマトキシリン－エオシン染色を使用した。組織切片中のヘモジデリンの検出は、パールプルシアンブルー染色によって実施した。簡潔に記載すると、フェロシアン化カリウムと蒸留水希釈塩酸との等体積混合物（２％）で組織切片を処理した後、ニュートラルレッドで対比染色した。

【１１４４】

血液分析：

血液試料をＥＤＴＡ被覆管に収集し、ＨｅｍａＶｅｔ ９５０ＦＳ（Ｄｒｅｗ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｔｅｒｂｕｒｙ，ＣＴ）で分析を実施した。末梢血塗抹標本をギムザ／メイ・グリュンワルド（Ｍｅｒｃｋ，Ｄａｒｍｓｔａｄｔ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を用いて、それぞれ５分間及び１５分間染色した。網状赤血球の染色は、ブリリアントクレシルブルーで行った。血液塗抹標本上での網状赤血球の計数は、試料群の割り付けについて盲検化された研究者によって行った。スライド上には動物番号のみを示した（動物当たり５つのスライド、５つの無作為な$1\ cm^{2}$区画）。

【１１４５】

統計解析：

複数群の比較については、一元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）及び二元配置ＡＮＯＶＡを、多重比較のためのボンフェローニ事後検定と併用した。統計解析は、ＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍバージョン６．０１（ＧｒａｐｈＰａｄ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｉｎｃ．，Ｌａ Ｊｏｌｌａ，ＣＡ）を使用して実施した。

【１１４６】

結果．

塩基エディター及びガイドＲＮＡの選択．

ＢＥ４（Ｋｏｍｏ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ Ａｄｖａｎｃｅｓ ３：ｅａａｏ４７７４，２０１７）、ＡｎｃＢＥ４ｍａｘ（Ｋｏｂｌａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ３６：８４３－８４６，２０１８）、ＢＥ３ＲＡ、及びＦＮＬＳ（Ｚａｆｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ３６：８８８－８９３，２０１８）を含めて、複数バージョンのシチジン塩基エディター（ＣＢＥ）の編集活性を比較した。これらの塩基エディター（ＢＥ）をサブクローニングし、遍在性ＥＦ１αプロモーターによる促進を受けるようにした。＋５８ ＢＣＬ１１Ａエンハンサー領域（Ｃａｎｖｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ５２７：１９２－１９７，２０１５）中のＧＡＴＡＡモチーフを標的とするガイドＲＮＡをヒトＵ６プロモーターの制御下で発現する第２のプラスミドを同時トランスフェクションに使用した。切断アッセイによって測定したところ、２９３ＦＴ細胞ではＢＥ３ＲＡで見られた編集率が高かったが（図１３１Ａ）、Ｋ５６２赤血球細胞ではＡｎｃＢＥ４ｍａｘ系が最も高い活性を示した（図１３１Ｂ）。したがって、下流の試験ではＡｎｃＢＥ４ｍａｘを使用した。アデニン塩基エディター（ＡＢＥ）については、Ｄａｖｉｄ Ｌｉｕのグループによって開発されたＡＢＥｍａｘ系を使用し、ＡｎｃＢＥ４ｍａｘに対するものと同様の手法を使用して最適化した（Ｋｏｂｌａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ３６：８４３－８４６，２０１８）。ガイド配列のスクリーニングにおいては、ＰＡＭ適合性が広いことからｘＣａｓ９（３．７）－ＢＥ４エディター及びｘＣａｓ９（３

．７）－ＡＢＥ（７．１０）エディターも使用した（Ｈｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　５５６：５７－６３，２０１８）。

【１１４７】

塩基エディターの最適な標的化可能枠は、プロトスペーサーの位置４～８（５’末端の最初の塩基を位置１として数えた場合）である。＋５８　ＢＣＬ１１Ａエンハンサー中のＧＡＴＡＡモチーフに特異的なシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）配列の一団（ｓｇＢＣＬ＃１～＃６）、または天然に生じるさまざまな遺伝性高胎児ヘモグロビン血症（ＨＰＦＨ）変異をＨＢＧ１／２プロモーター中に再創出するためのｓｇＲＮＡ配列の一団（ｓｇＨＢＧ＃１～＃６）を設計した。表１４には、これらの配列及びその特異的標的モチーフ／塩基が示される。赤血球前駆細胞株ＨＵＤＥＰ－２細胞（Ｋｕｒｉｔａ　ｅｔ　ａｌ．，ＰｌｏＳ　Ｏｎｅ　８：ｅ５９８９０，２０１３）においてこれらのガイド配列をそのγ－グロビン発現再活性化能力について試験した。トランスフェクションから４日目に細胞を赤血球分化に供した。ＣＣＲ５発現を標的とするが、ヘモグロビン関連遺伝子は標的としない陰性ＣＢＥ対照と比較して１２個すべてのｓｇＲＮＡ配列が有意なγ－グロビン発現を生じさせた（図１３０）。ｓｇＨＢＧ＃２では、分化から６日目のＨｂＦ$^{+}$細胞率が４１％となった。以前に記載されたＨＢＧプロモーター中ＢＣＬ１１Ａ結合部位標的指向性ＣＲＩＳＰＲベクターを陽性対照として使用し、このＣＲＩＳＰＲベクターで得られたＨｂＦ$^{+}$細胞率は８４％であった（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ　１３１：２９１５－２９２８，２０１８）。したがって、活性ならびに標的部位の多様性を考慮してｓｇＢＣＬ＃１（ＣＢＥ）、ｓｇＨＢＧ＃１（ＣＢＥ）、ｓｇＨＢＧ＃２（ＡＢＥ）、及びｓｇＨＢＧ＃４（ＡＢＥ）をウイルスベクター送達用として選択した。陰性対照ベクターｓｇＮｅｇ（ＣＢＥ）、ならびにｓｇＨＢＧ＃１及びｓｇＢＣＬ＃１の両方を含むベクター（二重、ＣＢＥ）も構築した。

【１１４８】

ＢＥを発現するヘルパー依存型アデノウイルスベクター（ＨＤＡｄ）の生成．

次に、インビボでＢＥを効率的に送達するためのウイルスベクターを生成させることを目的とした。必要な制御エレメントを含めると塩基エディターのサイズは８ｋｂを超えるため、１つのレンチウイルスベクター（ＬＶ）またはアデノ随伴ベクター（ＡＡＶ）に適合させることは困難である。造血幹細胞（ＨＳＣ）への形質導入を効率化するためにファイバーを改変してＨＤＡｄベクター（ＨＤＡｄ５／３５＋＋と呼ばれる）を開発した（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｃｌｉｎ　Ｄｅｖ　９：１４２－１５２，２０１８）。ＨＤＡｄベクターのパッケージング容量は３６ｋｂであることから、ＢＥ構成要素に十分なスペースを提供することができる。最初の試みでは、ＢＥ酵素（ＣＢＥについてはｒＡＰＯＢＥＣ１－ｎＣａｓ９－２×ＵＧＩまたはＡＢＥについては２×ＴａｄＡ－ｎＣａｓ９）をＥＦ１αプロモーターの制御下に置いた。ヒトＵ６プロモーターによって促進されるｓｇＲＮＡを含むＢＥ構成要素をすべてＨＤＡｄベクタープラスミドｐＨＣＡにクローニングした。ＦＲＴ部位及びトランスポゾン部位と隣接するＭＧＭＴ／ＧＦＰカセットも当該ベクターにクローニングして、Ｏ６ＢＧ／ＢＣＮＵ処理による形質導入細胞の選択が促進されるようにした（図１３２Ａ及び図１３２Ｂ）。注目すべきは、トランスポゾンの外側にＢＥ構成要素を配置したことである。この設計によって下記のｉ）及びｉｉ）が可能になった。ｉ）ＢＥが一過性発現し、その間にＭＧＭＴ／ＧＦＰの統合発現が維持される、及びｉｉ）ｓｌｅｅｐｙ　ｂｅａｕｔｙトランスポゼースを発現する別のベクター（ＨＤＡｄ－ＳＢ）との同時感染時に編集酵素がより迅速に分解される（さらなる議論及び／またはベクター設計のある特定の態様の追加例示については、実施例３も併せて参照のこと）。３リットルスピナーフラスコ当たりの収量は比較的低かったが（平均ウイルス粒子（すなわちｖｐ）数$1\times10^{12}$）、４つすべてのＣＢＥベクターがレスキューされた。このことは、ヌクレアーゼ発現を制御するための機構なしにはレスキュー不可能なＨＤＡｄ－ＣＲＩＳＰＲベクターとは対照的である（Ｓａｙｄａｍｉｎｏｖａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｃｌｉｎ　Ｄｅｖ　１：１４０５７，２０１５）。こうした結果は、ＤＳＢを誘発しないＢＥ系がＨＤＡｄ産生細胞に

与える毒性がＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９と比較して少なくあり得ることを示唆するものであった。ＡＢＥベクターについては、ウイルスに再編成が見られ、ＣｓＣｌグラジエントを用いる超遠心分離を行った後に明瞭なＨＤＡｄバンドが観察されなかった。ＡＢＥベクターとＣＢＥベクターとの間の主な差はデアミナーゼ領域にあるため、ＡＢＥベクター中の２つのＴａｄＡ－３２ａａ反復配列が原因エレメントであると推定された。したがって、第１バージョンのＡＢＥベクターに下記の改変を施した：ｉ）２つのＴａｄＡ－３２ａａ反復配列の間の配列反復性を代替コドン使用によってさらに低減した（図１３２Ｃ）、ｉｉ）ＢＥ酵素の促進にＰＧＫプロモーターを使用した（ＰＧＫプロモーターは、ＨＳＣでは構成的であるが（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ８０：５４９－５６０，２０２０）、１１６産生細胞ではＥｆ１αと比較して低いレベルで遺伝子発現を引き起こすことから（Ｑｉｎ ｅｔ ａｌ．，ＰｌｏＳ Ｏｎｅ５：ｅ１０６１１，２０１０）、潜在的なＴａｄＡ関連有害作用が排除される）、ｉｉｉ）ＢＥ発現をさらに制御するためにｍｉＲ１８３／２１８ベースの遺伝子制御系を利用した（Ｓａｙｄａｍｉｎｏｖａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ Ｄｅｖ １：１４０５７，２０１５）（図１３３Ａ）。設計を最適化したこの第２バージョンのコンストラクトでは、平均収量３．３×１０$^{12}$ｖｐ／スピナーフラスコ（通常の収量範囲内）で２つのＨＤＡｄ－ＡＢＥウイルスをレスキューすることに成功した（図１３３Ｂ）。

【１１４９】

次に、ＨＵＤＥＰ－２細胞においてＨＤＡｄベクターを調べた。５つすべての被検ベクターが効率的に標的塩基を変換し、実質的にγ－グロビンを再活性化させた（図１３３及び図１３４）。一過性トランスフェクションによるスクリーニングデータと一致して、ＨＤＡｄ－ＡＢＥ－ｓｇＨＢＧ＃２ベクターによって誘導されたＨｂＦ$^{+}$細胞レベルが最も高かった（１０００ｖｐ／細胞のＭＯＩで７１％）。興味深いことに、ｓｇＢＣＬ＃１及びｓｇＨＢＧ＃１が単独で介在した場合のＨｂＦ$^{+}$細胞率はそれぞれ１７％及び３９％であったが、ｓｇＢＣＬ＃１及びｓｇＨＢＧ＃１を同時に発現する二重標的指向性ベクターによって得られたＨｂＦの誘導レベルはｓｇＨＢＧ＃２のものと同等であり（図１３３Ｃ）、このことは相乗効果が得られたことを示している。陰性対照ベクターについては有意なＨｂＦ誘導は測定されなかった。ＨＰＬＣによって測定したγ－グロビンタンパク質レベルは、フローサイトメトリーデータと一致した。ｓｇＨＢＧ＃２での形質導入後に観察されたヒトβ－グロビンに対するヒトγ－グロビンのパーセントは２３％であり、このことは、スイッチが顕著に生じたことを実証している（図１３３Ｅ及び図１３３Ｈ）。ＭＯＩ １０００では、４つのｓｇＲＮＡの塩基変換頻度は２５～５１％の範囲内であった（図１３３Ｄ及び図１３４Ａ）。ｓｇＨＢＧ＃２については、位置５及び位置８でのＡ＞Ｇ変換検出率は、それぞれ４０％及び３４％であった（図１３３Ｄ）。$A_8$＞Ｇ変換は－１１３Ａ＞Ｇ ＨＰＦＨ変異を模倣したものである（表１４）（Ｍａｒｔｙｎ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ １３３（８）：８５２－８５６，２０１９）。ＨＢＧ１とＨＢＧ２との間で有意な編集差は見られなかった。単一細胞由来のクローンでは、$A_5$部位及び$A_8$部位で一方のアレルの編集が生じてＨｂＦ陽性細胞率が１００％となり（図１３３Ｆ及び図１３３Ｇ）、このことによって、ＨｂＦの抑制制御においてこれらの部位が決定的な役割を果たすことが確認された。ｓｇＨＢＧ＃１及びｓｇＨＢＧ＃４から得られたクローンにおいても同様の結果が示された。ｓｇＢＣＬ＃１で形質導入したクローンでは、ＢＣＬ１１ＡエンハンサーのＧＡＴＡＡモチーフでのＧ＞Ａ変異が両方のアレルで生じることで、ＨｂＦ発現細胞率が１５％となった（図１３４Ｂ及び図１３４Ｃ）。まとめると、こうしたデータは、ＢＣＬ１１ＡエンハンサーまたはＨＢＧ１／２プロモーター中の決定的に重要な部位に特異的なＨＤＡｄ－ＢＥベクターがＨｂＦ発現を効率的に再活性化し得ることを実証するものである。

【１１５０】

塩基エディターを用いるインビボでの形質導入後のβ－ＹＡＣマウスにおけるγ－グロビンの再活性化．

ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターを用いるインビボでのＨＳＣの形質導入によって簡易化

された遺伝子治療手法が確立された（Ｒｉｃｈｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ　１２８：２２０６－２２１７，２０１６）。したがって、この新規のインビボ方針を用いる塩基編集の効率を調べた。完全な８２ｋｂのβ－グロビン遺伝子座を含む２４８ｋｂのヒトＤＮＡを含むβ－ＹＡＣマウス（Ｐｅｔｅｒｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＮＡＳ　ＵＳＡ　９０：７５９３－７５９７，１９９３）を使用した。このマウスをヒトＣＤ４６トランスジェニックマウスと交配させることで、ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターでの形質導入を可能にした。ＨＵＤＥＰ－２細胞でのγ－グロビン発現の誘導には、効率が最も高いことからＨＤＡｄ－ＡＢＥ－ｓｇＨＢＧ＃２を選択した。Ｇ－ＣＳＦ／プレリキサホルでの動員処理後に、ＨＤＡｄ－ＡＢＥ－ｓｇＨＢＧ＃２ベクター及びＨＤＡｄ－ＳＢベクターをβ－ＹＡＣ／ＣＤ４６マウスに静脈内注射した。形質導入から４週間後に、ＭＧＭＴ－ＧＦＰ導入遺伝子が組み込まれた前駆細胞を選択的に増殖させるために４回の$O^6$ＢＧ／ＢＣＮＵ（$O^6$－ベンジルグアニン／カルムスチン）処理にマウスを供した（図１３５Ａ）。選択後、ＰＢＭＣのＧＦＰマーキング率は６０％に達した（図１３５Ｂ及び図１３５Ｃ）。注目すべきは、形質導入前は１％であった末梢血液細胞中γ－グロビン発現率が形質導入から１６週目には平均（ｎ＝９）で４３％に上昇したことであり、このことは、γ－グロビンが顕著に再活性化されたことを実証するものである（図１３５Ｄ及び図１３５Ｅ）。異なるマウスの間に存在した変動が大きかったことは、ＭＧＭＴ－２Ａ－ＧＦＰのバイシストロニック設計（ＭＧＭＴの発現が低下し、それ故にインビボ選択効率に影響が及び得る）によって生じたものである可能性がある。血液試料及び骨髄試料の両方においてγ－グロビン$^+$細胞の大半が赤血球（ＲＢＣ）画分（Ｔｅｒ－１１９$^+$）に存在した（図１３５Ｆ）。１６週目のＲＢＣ溶解物では、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）によって測定すると、ヒトβ－グロビンタンパク質に対するγ－グロビンのパーセントは最大で２１％であった（図１３５Ｇ及び図１３６）。γ－グロビンｍＲＮＡの発現は、ＨＰＬＣデータと一致していた（図１３５Ｈ）。１６週目の全骨髄単核細胞では、組み込みベクターコピー数は最大で２．５コピー／細胞（平均で１．４）であった（図１３５Ｉ）。

【１１５１】

ＨＢＧ１／２プロモーター中の塩基編集を分析した。ＨＢＧ１及びＨＢＧ２における$A_5$部位及び$A_8$部位でのＡ＞Ｇ変換頻度は平均で１５～３０％であった（図１３７Ａ～１３７Ｃ）。塩基編集頻度は、γ－グロビンの発現レベルと密接に相関することが明らかとなった（ピアソン検定、Ｒ＝０．９２、ｐ＜０．００１）（図１３７Ｄ）。γ－グロビン発現が最高であったマウスでは、８２％の標的塩基変換率が達成された（図１３７Ｂ）。注目すべきは、統計的な差は見られなかったものの、ＨＢＧ１領域及びＨＢＧ２領域の両方において$A_8$部位での変換％と比較して$A_5$での変換％が僅かに高いという傾向が存在したことである（図１３７Ｂ）。プロトスペーサー中に標的が複数存在する場合、一部の塩基エディターによっては前進性の編集を示すことが明らかにされている。しかしながら、$A_9$部位での編集は見れなかった（図１３７Ａ及び１３７Ｃ）。この理由は、最適な編集枠の外側に位置９が位置することによるものである可能性があり、このことは、編集可能な枠が狭いことを示している。

【１１５２】

まとめると、こうしたデータは、ＨＢＧ１／２プロモーターに特異的な塩基エディターを用いてインビボでの形質導入を行った後に選択を行うことで、β－ＹＡＣ／ＣＤ４６マウスにおいて効率的に標的塩基が変換され、γ－グロビンが再活性化されることを実証するものである。

【１１５３】

インビボでのＨＳＣの塩基編集後の安全性プロファイルの良好性及び効力の安定性．

１６週目に動物を安楽死させ、組織試料を複数の血液学的分析及び組織学的分析に供した。白血球（Ｋ／μＬ）、赤血球（Ｍ／μＬ）、Ｈｂ（ｇ／ｄＬ）、ＭＣＶ（ｆＬ）、ＭＣＨＣ（ｇ／ｄＬ）、ＲＤＷ（％）、及び血小板（Ｋ／μＬ）を含む血液学的パラメーターは、ナイーブβ－ＹＡＣ／ＣＤ４６マウスのものと同様であった（図１３８Ａ及び図１３８Ｂ）。ブリリアントクレシルブルー染色によって測定した末梢血中の網状赤血球のパ

ーセントは、処理なしのマウスのものと同等であった（図１３８Ｄ）。脾臓切片及び肝臓切片で髄外赤血球生成フォーカスは観察されなかった。ＰＢＭＣ、脾臓単核細胞、及び骨髄単核細胞の細胞組成は、対照マウスのものと区別不可能であることが明らかとなった（図１３８Ｃ）。さらに、以前に報告された他の遺伝子治療ベクター（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ　１３１：２９１５－２９２８，２０１８、Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｉｎｖｅｓｔ．１２９（２）：５９８－６１５，２０１８、Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ　２７：２１９５－２２１２，２０１９）と比較して、ＨＤＡｄ－ＡＢＥ－ｓｇＨＢＧ＃２は、インビボでの形質導入／選択後に体重、挙動、及び外観に明らかな変化を誘発しなかった。

【１１５４】

インビボ形質導入が長期再増殖ＨＳＰＣにおいて生じたことを実証するために、形質導入から１６週目に収集した骨髄系譜マイナス（Ｌｉｎ－）細胞を致死性照射Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウス（ヒトＣＤ４６遺伝子を有さない）に移植した。移植細胞が二次レシピエントにおいて多系譜再構成を導く能力を１６週間にわたって評価した。ＰＢＭＣにおけるｈｕＣＤ４６発現に基づく生着率は９５％を超えており、安定を保っていた（図１３９Ａ）。ＰＭＢＣのＧＦＰマーキングは一次マウスのものと同等であった（図１３９Ｂ）。γ－グロビン＋ＲＢＣのパーセントは平均で４０％であり、安定していた（図１３９Ｃ）。

【１１５５】

こうした知見が一緒になることで、インビボでのＨＳＣの塩基編集が全体的に安全であることが実証された。改変されたＨＳＰＣは長期間存続し、安定な導入遺伝子発現を伴って二次レシピエントマウスを再構成する能力を有していた。

【１１５６】

遺伝子間欠失は最小限であり、上位にスコア付けされたオフターゲット部位に対する編集は検出不可能である．

ＤＳＢに依存する遺伝子編集方針の妥協点は、ゲノムに大型断片欠失が生じる可能性があることである（Ｋｏｓｉｃｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　３６：７６５，２０１８）。ＤＳＢ生成ヌクレアーゼによってＨＢＧ１／２プロモーターを標的とする場合、ＨＢＧ１領域とＨＢＧ２領域との間の類似性が高いことに起因してこの副作用がより顕著になり得る。これら２つの領域の一方に特異的なガイド配列によって、もう一方も標的となる可能性がある。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を用いてＨＢＧ１／２プロモーター中のＢＣＬ１１Ａ結合部位を標的とすると４．９ｋｂの遺伝子間欠失が生じることが報告されている（Ｔｒａｘｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ　２２：９８７－９９０，２０１６、Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ　１３１：２９１５－２９２８，２０１８）。結果として、ＨＢＧ２遺伝子全体が除去される。したがって、半定量的ＰＣＲによってゲノム欠失を調べた（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ　１３１：２９１５－２９２８，２０１８）。２つの標的部位に隣接する一対のプライマーを使用して９．９ｋｂのゲノムセグメントを増幅した。４．９ｋｂの欠失が存在すれば、５．０ｋｂに短縮されたＰＣＲ増幅産物が余分に得られることになる。欠失パーセントは、標準曲線を確立することによって９．９ｋｂの増幅産物に対する５．０ｋｂの増幅産物の比と正に相関した（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ　１３１：２９１５－２９２８，２０１８の図７Ｃを参照のこと）。塩基エディターで処理したマウスでの平均４．９ｋｂ欠失率は１％未満であることが明らかとなった（図１４０）。何匹かのマウスでは、この欠失はかろうじて検出可能な程度のものであった。この欠失率は、ＨＤＡｄ－ＨＢＧ－ＣＲＩＳＰＲベクターで形質導入を行った場合に生じるものと比較して有意に低かった（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ　１３１：２９１５－２９２８，２０１８）。

【１１５７】

次に、オフターゲット分析を実施して系の忠実度を調べた。ヒトゲノム及びマウスゲノムの両方においてガイド配列とのミスマッチ塩基対（ｂｐ）数が２以下である潜在的なオフターゲット部位は存在しないことがインシリコ分析によって示された。ミスマッチｂｐ数が３である潜在的オフターゲット部位は、ヒト及びマウスではそれぞれ１０個及び２つ

存在した。これらの部位はすべて、プロトスペーサーのＰＡＭに近い側半分に少なくとも１ｂｐのミスマッチを有することから、これらの予測標的にオフターゲット編集が生じる可能性は低いと推測された。ミスマッチｂｐ数が４である潜在的標的は、ヒト及びマウスではそれぞれ７９個及び７４個存在するという結果が得られた。試験はマウスで実施したため、上位１０にスコア付けされたゲノム部位（ミスマッチｂｐ数３のゲノム部位が２つ、ミスマッチｂｐ数４のゲノム部位が７つ）をオンターゲット塩基編集導入率が最も高いマウスから増幅し、その後にサンガーシークエンシングを行った。これらの部位のいずれにも、検出可能な編集は存在しなかった。

【１１５８】

まとめると、こうしたデータから、遺伝子間欠失が最小限であり、インビボ塩基編集系が高忠実度であるという証拠が得られた。

【１１５９】

実施例１１．塩基エディター実施形態に関するさらなる説明

【１１６０】

図１４１は、血液学的分析（図１４１Ａ）及び骨髄ＭＮＣの細胞比較（図１４１Ｂ）を含めて塩基エディターの安全性プロファイルを示す。図１４２では、塩基エディターＢＥ４－ｓｇＢＣＬ１１ＡＥ１の活性から予想される編集の導入が示される。図１４３は、Ｃ→Ｔ塩基変換（上の画像）またはＧ→Ａ塩基変換（下の画像）を達成する場合の塩基編集効率の最大化に最適なプロトスペーサー配列並びを示す。図１４４は、プロトスペーサー内の位置４～８に標的Ｃが位置する場合にＣ→Ｔ編集を行うためのベクターを示す。図１４５は、ウイルスｇＤＮＡ（ＨＢＧ２－ｍｉＲ、アデニンエディター）の図を示し、この図は、単一の連続コンストラクトを表すものであるが、２つのセクションに分かれている（この分割は、単に表示を簡単にするためのものである）。図１４６は、ＴａｄＡ及びＴａｄＡ＊の配列を示す。サンガーシークエンシングを実施して配列の塩基編集を確認した（図１４７）。図１４８は、ＨＤＡｄ５／３５＋＋＿ＢＥ４－ｓｇＢＣＬ１１Ａｅ１－ＦＩ－ｍｇｍｔＧＦＰ（０４１３１８－１）ウイルスによる塩基編集を示し、図１４９は、示されるＭＯＩでのγ－グロビン＋細胞のパーセントを示す。図１５０は、塩基編集によってＨｂＦを再活性化するためのシチジン塩基エディター及びアデニン塩基エディターを示す。図１５１は、塩基エディターの例、及びさまざまなＭＯＩで塩基エディターを用いた場合のＨｂＦ＋細胞のパーセントを示す。図１５２は、ＨＵＤＥＰ－２細胞での２回目の試験から得られたＨｂＦ＋の％を示す。図１５３は、単一細胞由来クローンでの結果を示す。図１５４Ａ～１５４Ｓは、個々の単一細胞由来クローンを表すデータを示す。２９３ＦＴ細胞においても塩基エディターを試験した（図１５５）。図１５６Ａ～１５６Ｄは、サンガーシークエンシングの結果を示す。ＨＵＤＥＰ－２細胞においても塩基エディターを試験した（図１５７）。図１５８にはγ－グロビンの発現が示される。図１５９Ａ～１５９Ｄは、利用可能な場合は、サンガーシークエンシングの結果を示す。図１６０には、最大調製に向けてのコンストラクトの選択が示される。

【１１６１】

図１６１には、（例えば、ＨＤＡｄ－ＡＡＶＳ１－ＣＲＩＳＰＲまたはＨＤＡｄ－グロビン－ＢＥ４塩基エディターを用いて）編集したｈｕＣＤ４５＋細胞の生着が示される。

【１１６２】

図１６２には、ＨＵＤＥＰ－２細胞の一過性のトランスフェクション（Ｔ７ＥＩによる切断）が示される。

【１１６３】

ＨｂＦ向けの塩基編集コンストラクトの例としては、限定されないが、（１）ｐＨＣＡ－ＡＢＥｍａｘ－ｓｇＨＢＧ２－ｍｉＲ－ＦＩ－ｍｇｍｔＧＦＰ、（２）ｐＨＣＡ－ＡＢＥｍａｘ－ｓｇＨＢＧ４－ｍｉＲ－ＦＩ－ｍｇｍｔＧＦＰ、または（３）ｐＨＣＡ－ＡＢＥｍａｘ－二重－スキップ－ｍｉＲ－ＦＩ－ｍｇｍｔＧＦＰが挙げられ得る。

【１１６４】

塩基エディターの用途の少なくとも１つには、二重塩基編集ベクターが含まれ、この用

途の例は、図１６３に示される。

【１１６５】

単一細胞由来クローンでは、一方または両方のアレルの標的塩基の変換によってＨｂＦ陽性細胞率は１００％となった。ＡＢＥベクターＨＤＡｄ－ＡＢＥ－ＨＢＧ＃２を使用した場合、混合ＨＵＤＥＰ－２細胞のＨＢＧ１／２プロモーターの－１１３Ａ→Ｇ　ＨＰＦＨ変異率は６０％となった（図１３５を参照のこと）。このベクターを特定の別の動物試験用として選択した。動物試験は、ヒトβ－グロビン遺伝子座を含む２４８ｋｂを保有しており、それ故にグロビンスイッチを正確に反映するマウス（β－ＹＡＣマウス）において実施した（例えば、図１３７を参照のこと）。ＦＲＴ部位及びトランスポゾン部位と隣接するＥＦ１α－ｍｇｍｔ$^{Ｐ１４０Ｋ}$発現カセットをベクターに含めることで、形質導入細胞をインビボで選択できるようにした（例えば、図１３６を参照のこと）。ＨＤＡｄ－ＡＢＥ－ＨＢＧ＃２＋ＨＤＡｄ－ＳＢでのインビボ形質導入及び低用量の$Ｏ^{6}$ＢＧ／ＢＣＮＵでの選択の後に測定した末梢赤血球におけるＨｂＦ陽性細胞率は平均で３５％であった（図１３８）。８匹中１匹のマウスでは、ほぼ完全な－１１３Ａ→Ｇ変換及びＨｂＦ陽性細胞率９０％が達成された。血液細胞数に変化は見られなかった（図１４１）。骨髄試料の細胞組成は非形質導入マウスのものと同等であり、このことは、安全性プロファイルが良好であることを実証するものである（図１４１）。形質導入から１４週目の一次マウスから骨髄系譜マイナス細胞を単離し、致死性照射Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスに注入した。ＨｂＦ陽性細胞のパーセントは二次レシピエントにおいて１６週間にわたって維持され、このことは、長期再増殖マウスＨＳＣにゲノム編集が生じていたことを示す。こうした知見は、ＨＤＡｄ５／３５＋＋ベクターによってインビボで塩基エディターを送達することが、正確なゲノム操作（例えば、異常ヘモグロビン症の治療のためのもの）の方針であることを実証するものである。

【１１６６】

ＶＩＩ．最終パラグラフ

本明細書で開示及び参照される配列については、そのバリアントも含まれる。生物学的活性を消失させることなくどのアミノ酸残基を置換、挿入、または欠失に供し得るかを決定する上での指針は、当該技術分野でよく知られるコンピュータープログラム（ＤＮＡＳＴＡＲ（商標）（Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ）ソフトウェアなど）を使用して見つけることができる。好ましくは、本明細書に開示のタンパク質バリアント中のアミノ酸変更は、保存的アミノ酸変更であり、すなわち、同様の荷電アミノ酸または非荷電アミノ酸による置換である。保存的アミノ酸変更では、側鎖に関連を有するファミリーのアミノ酸のうちの１つによる置換が行われる。

【１１６７】

ペプチドまたはタンパク質における適切な保存的アミノ酸置換は、この技術分野の当業者に知られており、一般に、得られる分子の生物学的活性を変化させることなく行われ得る。一般に、ポリペプチドの非必須領域中の単一アミノ酸置換によって生物学的活性が実質的に変化することはないことを当業者なら認識するであろう（例えば、Ｗａｔｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ｇｅｎｅ，４ｔｈ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，１９８７，Ｔｈｅ　Ｂｅｎｊａｍｉｎ／Ｃｕｍｍｉｎｇｓ　Ｐｕｂ．Ｃｏ．，ｐ．２２４を参照のこと）。天然起源のアミノ酸は、一般に、下記の保存的置換ファミリーに分けられる：群１：アラニン（Ａｌａ）、グリシン（Ｇｌｙ）、セリン（Ｓｅｒ）、及びスレオニン（Ｔｈｒ）、群２：（酸性）：アスパラギン酸（Ａｓｐ）及びグルタミン酸（Ｇｌｕ）、群３：（酸性；極性負荷電残基及びそのアミドとしても分類される）：アスパラギン（Ａｓｎ）、グルタミン（Ｇｌｎ）、Ａｓｐ、及びＧｌｕ、群４：Ｇｌｎ及びＡｓｎ、群５：（塩基性；極性正荷電残基としても分類される）：アルギニン（Ａｒｇ）、リジン（Ｌｙｓ）、及びヒスチジン（Ｈｉｓ）、群６（大型脂肪族非極性残基）：イソロイシン（Ｉｌｅ）、ロイシン（Ｌｅｕ）、メチオニン（Ｍｅｔ）、バリン（Ｖａｌ）、及びシステイン（Ｃｙｓ）、群７（非荷電極性）：チロシン（Ｔｙｒ）、Ｇｌｙ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｃｙｓ、Ｓｅｒ、及びＴｈｒ、群８（大型芳香族残基）：フェニルアラ

ニン（Ｐｈｅ）、トリプトファン（Ｔｒｐ）、及びＴｙｒ、群９（非極性）：プロリン（Ｐｒｏ）、Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｐｈｅ、Ｍｅｔ、及びＴｒｐ、群１１（脂肪族）：Ｇｌｙ、Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、及びＩｌｅ、群１０（小型脂肪族非極性残基または小型脂肪族弱極性残基）：Ａｌａ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｐｒｏ、及びＧｌｙ、ならびに群１２（含硫）：Ｍｅｔ及びＣｙｓ。追加の情報については、Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ（１９８４）Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ　ａｎｄ　Ｃｏｍｐａｎｙにおいて見つけることができる。

【１１６８】

そのような変更を行う場合、アミノ酸のハイドロパシー指数が考慮され得る。相互作用的な生物学的機能をタンパク質に付与する上でのハイドロパシーアミノ酸指数の重要性は、当該技術分野で一般に理解されている（Ｋｙｔｅ　＆　Ｄｏｏｌｉｔｔｌｅ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５７（１），１０５－３２，１９８２）。各アミノ酸には、その疎水性特徴及び電荷特徴に基づいてハイドロパシー指数が割り当てられている（Ｋｙｔｅ　ａｎｄ　Ｄｏｏｌｉｔｔｌｅ，１９８２）。こうした値は下記のものである：Ｉｌｅ（＋４．５）、Ｖａｌ（＋４．２）、Ｌｅｕ（＋３．８）、Ｐｈｅ（＋２．８）、Ｃｙｓ（＋２．５）、Ｍｅｔ（＋１．９）、Ａｌａ（＋１．８）、Ｇｌｙ（－０．４）、Ｔｈｒ（－０．７）、Ｓｅｒ（－０．８）、Ｔｒｐ（－０．９）、Ｔｙｒ（－１．３）、Ｐｒｏ（－１．６）、Ｈｉｓ（－３．２）、グルタミン酸（－３．５）、Ｇｌｎ（－３．５）、アスパラギン酸（－３．５）、Ａｓｎ（－３．５）、Ｌｙｓ（－３．９）、及びＡｒｇ（－４．５）。

【１１６９】

当該技術分野では、ある特定のアミノ酸を同様のハイドロパシー指数またはハイドロパシースコアを有する他のアミノ酸によって置換し、同様の生物学的活性を有するタンパク質を依然として得ることができること、すなわち、生物学的機能的に同等のタンパク質を依然として得ることができることが知られている。そのような変更を行う場合、ハイドロパシー指数が±２以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±１以内であるアミノ酸の置換が特に好ましく、±０．５以内であるアミノ酸の置換がさらに特に好ましい。当該技術分野において、同様のアミノ酸の置換は、親水性に基づいても効率的に行われ得ることも理解されよう

【１１７０】

米国特許第４，５５４，１０１号に詳述されるように、アミノ酸残基には下記の親水性値が割り当てられている：Ａｒｇ（＋３．０）、Ｌｙｓ（＋３．０）、アスパラギン酸（＋３．０±１）、グルタミン酸（＋３．０±１）、Ｓｅｒ（＋０．３）、Ａｓｎ（＋０．２）、Ｇｌｎ（＋０．２）、Ｇｌｙ（０）、Ｔｈｒ（－０．４）、Ｐｒｏ（－０．５±１）、Ａｌａ（－０．５）、Ｈｉｓ（－０．５）、Ｃｙｓ（－１．０）、Ｍｅｔ（－１．３）、Ｖａｌ（－１．５）、Ｌｅｕ（－１．８）、Ｉｌｅ（－１．８）、Ｔｙｒ（－２．３）、Ｐｈｅ（－２．５）、Ｔｒｐ（－３．４）。アミノ酸を同様の親水性値を有する別のアミノ酸に置換し、生物学的に同等のタンパク質、具体的には免疫学的に同等のタンパク質を依然として得ることができることが理解されよう。そのような変更では、親水性値が±２以内であるアミノ酸の置換が好ましく、親水性値が±１以内であるアミノ酸の置換が特に好ましく、親水性値が±０．５以内であるアミノ酸の置換がさらに特に好ましい。

【１１７１】

上に概要が示されるように、アミノ酸置換は、アミノ酸側鎖置換基の関連類似性（例えば、その疎水性、親水性、電荷、サイズ、及び同様のもの）に基づくものであり得る。

【１１７２】

他の箇所に示されるように、遺伝子配列のバリアントには、コドン最適化バリアント、配列多型、スプライスバリアント、及び／または統計的に有意な程度にコードタンパク質の機能に影響を与えない変異、が含まれ得る。

【１１７３】

本明細書に開示のタンパク質配列、核酸配列、及び遺伝子配列のバリアントには、本明

細書に開示のタンパク質配列、核酸配列、または遺伝子配列との配列同一性％が少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくともまたは９９％である配列も含まれる。

【１１７４】

「配列同一性％」は、２つ以上の配列を比較することによって決定されるそれらの配列の間の関連性を指す。当該技術分野では、「同一性」は、タンパク質配列の鎖間の一致、核酸配列の鎖間の一致、及び遺伝子配列の鎖間の一致によって決定されるそのような配列の間の配列関連度も意味する。「同一性」（「類似性」と称されることが多い）は、既知の方法によって容易に計算でき、こうした方法には、Ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎａｌ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｌｅｓｋ，Ａ．Ｍ．，ｅｄ．）Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ（１９８８）に記載のもの、Ｂｉｏｃｏｍｐｕｔｉｎｇ：Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ａｎｄ Ｇｅｎｏｍｅ Ｐｒｏｊｅｃｔｓ（Ｓｍｉｔｈ，Ｄ．Ｗ．，ｅｄ．）Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ（１９９４）に記載のもの、Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ｄａｔａ，Ｐａｒｔ Ｉ（Ｇｒｉｆｆｉｎ，Ａ．Ｍ．，ａｎｄ Ｇｒｉｆｆｉｎ，Ｈ．Ｇ．，ｅｄｓ．）Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，ＮＪ（１９９４）に記載のもの、Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｖｏｎ Ｈｅｉｊｎｅ，Ｇ．，ｅｄ．）Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９８７）に記載のもの、及びＳｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｐｒｉｍｅｒ（Ｇｒｉｂｓｋｏｖ，Ｍ．ａｎｄ Ｄｅｖｅｒｅｕｘ，Ｊ．，ｅｄｓ．）Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ（１９９２）に記載のものが含まれる。好ましい同一性決定方法は、被検配列間の一致が最良となるように設計される。同一性及び類似性を決定するための方法は、公的に利用可能なコンピュータープログラムにおいて体系化されている。配列アライメント及び同一性パーセント計算は、ＬＡＳＥＲＧＥＮＥバイオインフォマティクスコンピューティングスイート（ＤＮＡＳＴＡＲ，Ｉｎｃ．，Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ）のＭｅｇａｌｉｇｎプログラムを使用して実施され得る。デフォルトパラメーター（ギャップペナルティ＝１０、ギャップ長ペナルティ＝１０）を用いてＣｌｕｓｔａｌアライメント法（Ｈｉｇｇｉｎｓ ａｎｄ Ｓｈａｒｐ ＣＡＢＩＯＳ，５，１５１－１５３（１９８９））を使用して多重配列アライメントも実施され得る。関連プログラムには、ＧＣＧプログラムスイート（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｐａｃｋａｇｅ Ｖｅｒｓｉｏｎ ９．０，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ（ＧＣＧ），Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ）、ＢＬＡＳＴＰ、ＢＬＡＳＴＮ、ＢＬＡＳＴＸ（Ａｌｔｓｃｈｕｌ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０（１９９０））、ＤＮＡＳＴＡＲ（ＤＮＡＳＴＡＲ，Ｉｎｃ．，Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ）、及びＳｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズムが組み込まれたＦＡＳＴＡプログラム（Ｐｅａｒｓｏｎ，Ｃｏｍｐｕｔ．Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．，［Ｐｒｏｃ．Ｉｎｔ．Ｓｙｍｐ．］（１９９４），Ｍｅｅｔｉｎｇ Ｄａｔｅ １９９２，１１１－２０．Ｅｄｉｔｏｒ（ｓ）：Ｓｕｈａｉ，Ｓａｎｄｏｒ．Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒ：Ｐｌｅｎｕｍ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．）も含まれる。本開示の文脈内では、解析に配列解析ソフトウェアが使用される場合、解析の結果は言及プログラムの「デフォルト値」に基づくものであることが理解されよう。本明細書で使用される「デフォルト値」は、任意の一連の値またはパラメーターを意味することになり、こうした一連の値またはパラメーターは、最初の初期化時にソフトウェアに最初に設定されるものである。

【１１７５】

バリアントには、本明細書に開示の配列に厳密なハイブリダイゼーション条件の下でハイブリダイゼーションすると共に、参照配列と同じ機能を与える核酸分子も含まれる。厳密なハイブリダイゼーション条件の例としては、５０％のホルムアミド、５×ＳＳＣ（７５０ｍＭのＮａＣｌ、７５ｍＭのクエン酸三ナトリウム）、５０ｍＭのリン酸ナトリウム（ｐＨ７．６）、５×デンハート溶液、１０％のデキストラン硫酸、及び２０μｇ／ｍｌ

の変性断片化サケ精子ＤＮＡを含む４２℃の溶液中で一晩のインキュベートを行い、その後に５０℃の０．１×ＳＳＣ中でフィルターを洗浄するものが挙げられる。ハイブリダイゼーション及びシグナル検出の厳密性の変更は、ホルムアミド濃度（ホルムアミドのパーセントを下げると厳密性が低下する）、塩条件、または温度を操作することによって主には達成される。例えば、中程度に高い厳密性条件には、６×ＳＳＰＥ（２０×ＳＳＰＥ＝ＮａＣｌ濃度３Ｍ、$NaH_2PO_4$濃度０．２Ｍ、ＥＤＴＡ濃度０．０２Ｍ、ｐＨ７．４）、０．５％のＳＤＳ、３０％のホルムアミド、１００μｇ／ｍｌのサケ精子ブロッキングＤＮＡを含む３７℃の溶液中で一晩のインキュベートを行い、その後に１×ＳＳＰＥ、０．１％のＳＤＳを用いて５０℃での洗浄を行うものが含まれる。さらに、厳密性をさらに下げるには、厳密なハイブリダイゼーションの後に実施される洗浄が、塩濃度を高めて（例えば、５×ＳＳＣを用いて）行われ得る。上記の条件の変形形態は、ハイブリダイゼーション実験でのバックグラウンドの抑制に使用される代替のブロッキング試薬を含め、及び／またはそれで置き換えることによって達成され得る。典型的なブロッキング試薬には、デンハート試薬、ＢＬＯＴＴＯ、ヘパリン、変性サケ精子ＤＮＡ、及び商業的に利用可能な専売製剤が含まれる。特定のブロッキング試薬を含めるには、適合性と関連する問題に起因して上記のハイブリダイゼーション条件を改変する必要があり得る。

【１１７６】

「特異的に結合する」は、結合ドメイン（例えば、ＣＡＲ結合ドメインまたはナノ粒子選択細胞を標的とするリガンドのもの）とその対応結合分子とが、関連環境試料中のいずれの他の分子または成分とも顕著に結び付くことなく$10^5 M^{-1}$以上の親和性またはＫａ（すなわち、１／Ｍの単位を有する特定の結合相互作用の平衡結合定数）で結び付くことを指す。本明細書では、「特異的に結合する」は、「結合する」とも称される。結合ドメインは、「高親和性」または「低親和性」として分類され得る。特定の実施形態では、「高親和性」結合ドメインは、Ｋａが少なくとも$10^7 M^{-1}$、少なくとも$10^8 M^{-1}$、少なくとも$10^9 M^{-1}$、少なくとも$10^{10} M^{-1}$、少なくとも$10^{11} M^{-1}$、少なくとも$10^{12} M^{-1}$、または少なくとも$10^{13} M^{-1}$である結合ドメインを指す。特定の実施形態では、「低親和性」結合ドメインは、Ｋａが最大$10^7 M^{-1}$、最大$10^6 M^{-1}$、最大$10^5 M^{-1}$である結合ドメインを指す。あるいは、親和性は、Ｍの単位を有する特定の結合相互作用の平衡解離定数（Ｋｄ）（例えば、$10^{-5} M$～$10^{-13} M$）として定義され得る。ある特定の実施形態では、結合ドメインは、「親和性の増強」が行われたものであり得る。「親和性の増強」は、野生型（または親）結合ドメインと比較して対応結合分子への結合が強まるように結合ドメインが選択または操作されることを指す。例えば、親和性の増強は、参照結合ドメインのものと比較して対応結合分子に対するＫａ（平衡結合定数）が大きいことに起因するか、または参照結合ドメインのものと比較して対応結合分子に対するＫｄ（解離定数）が小さいことに起因するか、または参照結合ドメインのものと比較して対応結合分子に対する解離速度（$K_{off}$）が低いことに起因し得る。特定の対応結合分子に特異的に結合する結合ドメインを検出するためのアッセイ、ならびに結合親和性を決定するためのアッセイについては、さまざまなもの（ウエスタンブロット、ＥＬＩＳＡ、及びＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）分析など）が知られている（例えば、Ｓｃａｔｃｈａｒｄ，ｅｔ ａｌ．，１９４９，Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．５１：６６０、及びＵＳ５，２８３，１７３、ＵＳ５，４６８，６１４、または同等の文献も併せて参照のこと）。

【１１７７】

別段の指定がない限り、本開示の実施においては、免疫学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、及び組換えＤＮＡの通常の手法を用いることができる。こうした方法については、下記の刊行物に記載されている。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ（１９８９）、Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌ，ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，（１９８７）、ｔｈｅ ｓｅｒｉｅｓ Ｍｅｔｈｏｄｓ ＩＮ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（Ａｃａｄ

emic Press，Inc.）、M.MacPherson，et al.，PCR：A Practical Approach，IRL Press at Oxford University Press（１９９１）、MacPherson et al.，eds.PCR 2：Practical Approach，（１９９５）、Harlow and Lane，eds.Antibodies，A Laboratory Manual，（１９８８）、及びR.I.Freshney，ed.Animal Cell Culture（１９８７）を参照のこと。

【１１７８】

当業者なら理解するであろうが、本明細書に開示の各実施形態は、その特定の記載の要素、ステップ、成分、または構成要素を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり得る。したがって、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅ）」または「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」という用語は、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」、「からなる」、または「から本質的になる」を記載するものと解釈すべきである。「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」または「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」という移行用語は、（主要量である場合でさえも）不特定の要素、ステップ、成分、または構成要素を含むこと、それに限定されないこと、及びをそれ含むことが可能であること、を意味する。「からなる」という移行句は、特定されない要素、ステップ、成分、または構成要素はいずれも除外するものである。「から本質的になる」という移行句は、特定の要素、ステップ、成分、または構成要素と、実施形態に実質的に影響を与えないものとに実施形態の範囲を限定するものである。実質的な影響があれば、本開示に記載の関連実験方法に従って請求効果を得る能力が統計的に有意に低減されることになる。

【１１７９】

別段の指定がない限り、本明細書及び特許請求の範囲において使用される成分量、特性（分子量など）、反応条件等を表す数はすべて、すべての場合において「約」という用語によって修飾されていると理解されるものとする。したがって、矛盾する指定がない限り、本明細書及び添付の特許請求の範囲に示される数値パラメーターは、本発明によって得ようとする所望の特性に応じて変動し得る近似値である。最低でも、特許請求の範囲への均等論の適用を制限することは意図しないが、少なくとも、報告される有効桁の数を踏まえ、通常の丸め手法を適用することによって、各数値パラメーターを解釈すべきである。さらに明瞭化することが求められる場合、「約」及び「およそ」という用語は本明細書で互換的に使用され、記載の数値または範囲と共に使用される場合は当業者によって合理的に理解される意味を有し、すなわち、記載の値または範囲と比較していくらか多いまたはいくらか少ないことを示し、この変動は、記載の値の±２０％の範囲内、記載の値の±１９％の範囲内、記載の値の±１８％の範囲内、記載の値の±１７％の範囲内、記載の値の±１６％の範囲内、記載の値の±１５％の範囲内、記載の値の±１４％の範囲内、記載の値の±１３％の範囲内、記載の値の±１２％の範囲内、記載の値の±１１％の範囲内、記載の値の±１０％の範囲内、記載の値の±９％の範囲内、記載の値の±８％の範囲内、記載の値の±７％の範囲内、記載の値の±６％の範囲内、記載の値の±５％の範囲内、記載の値の±４％の範囲内、記載の値の±３％の範囲内、記載の値の±２％の範囲内、または記載の値の±１％の範囲内である。

【１１８０】

本発明の広い範囲を示す数値範囲及びパラメーターが近似であるかにかかわらず、具体例に示される数値は可能な限り正確に報告されている。しかしながら、いずれの数値も、そのそれぞれの試験測定において見られる標準偏差に必然的に起因するある特定の誤差を本質的に含む。

【１１８１】

本明細書での値の範囲の記載は、単に、そうした範囲に入るそれぞれの個々の値に個別に言及することを簡潔化する方法とすることを意図するものにすぎない。本明細書に別段の指定がない限り、それぞれの個別値は、それが本明細書に個別に記載される場合と同様に本明細書に組み込まれる。本明細書に別段の指定がない限り、またはその他の状況で文

脈上明確に矛盾しない限り、本明細書に記載の方法はすべて、任意の適切な順序で実施することができる。本明細書で提供される例または例示の言葉（例えば、「など」）のいずれかまたはすべての使用は、単に、本発明の理解を容易にすることを意図するものにすぎず、そうした言葉を使用せずに請求される本発明の範囲を限定するものではない。本明細書のいずれの言葉も、本発明の実施に必要不可欠なないずれかの非請求要素を示すものとして解釈してはならない。

【１１８２】

本明細書に開示される本発明の代替の要素または実施形態を群化することは、限定とは解釈されない。それぞれの郡メンバーは、個別に言及及び請求されるか、または他の群メンバーもしくは本明細書に見られる他の要素との任意の組み合わせで言及及び請求され得る。利便性及び／または特許性の理由から、群のメンバーの１つ以上が、群に含められるか、または群から除外され得るものと予測される。いずれかのそのような包含または除外が生じた場合、本明細書は、改変された群を含むものと見なされ、したがって、添付の特許請求の範囲において使用されるすべてのマーカッシュ群の記述を満たす。

【１１８３】

本発明の実施に最良の様式であると本発明者らが認識するものを含めて、本明細書には本発明のある特定の実施形態が記載されている。当然のことながら、前述の説明を読めば、こうした記載の実施形態に対する変形形態が当業者に明らかになるであろう。本発明者らは、そのような変形形態を当業者が必要に応じて利用することを予想すると共に、本発明者らは、本明細書に具体的に記載されるものとは異なる様式で本発明を実施することを意図する。したがって、本発明は、本明細書に添付される特許請求の範囲に記載の主題の改変形態及び均等物をすべて、適用法によって許容されるものとして含む。さらに、本明細書に別段の指定がない限り、またはその他の状況で文脈上明確に矛盾しない限り、上記の要素の任意の組み合わせがその可能なすべての変形形態において本発明に含まれる。

【１１８４】

さらに、本明細書を通じて特許、印刷刊行物、学術論文、及び他の文書（本明細書での参照物）への参照が多数なされている。そうした参照物はそれぞれ、その全体がその参照教示内容を対象として参照によって本明細書に個別に組み込まれる。参照物が時を経て改訂される場合（例えば、配列データベースエントリー及び同様のもの）、そうした参照に含まれる内容は、本出願が優先権を主張する出願に当該参照が含められた日付のものとして組み込まれる。

【１１８５】

最後に、本明細書に開示される本発明の実施形態は本発明の原理を例示するものであることが理解されよう。利用され得る他の改変形態も本発明の範囲に含まれる。したがって、例として、限定されないが、本明細書の教示内容に従って本発明の代替構成が利用され得る。したがって、本発明は、明確に提示及び記載されるものに限定されない。

【１１８６】

本明細書に示される詳細は例としてのものであり、本発明の好ましい実施形態の例示的な議論を目的とするものにすぎず、本発明のさまざまな実施形態の原理及び概念的側面の説明として最も有用かつ理解が容易であると考えられるものを提供するために提示される。この点に関して、本発明の基礎的理解に必要なものよりも詳細に本発明の構造詳細を示そうとしているわけではなく、説明を図面及び／または例と併用することで、本発明のいくつかの形態が実施の際にどのように具体化し得るかを当業者に明らかにしようとするものである。

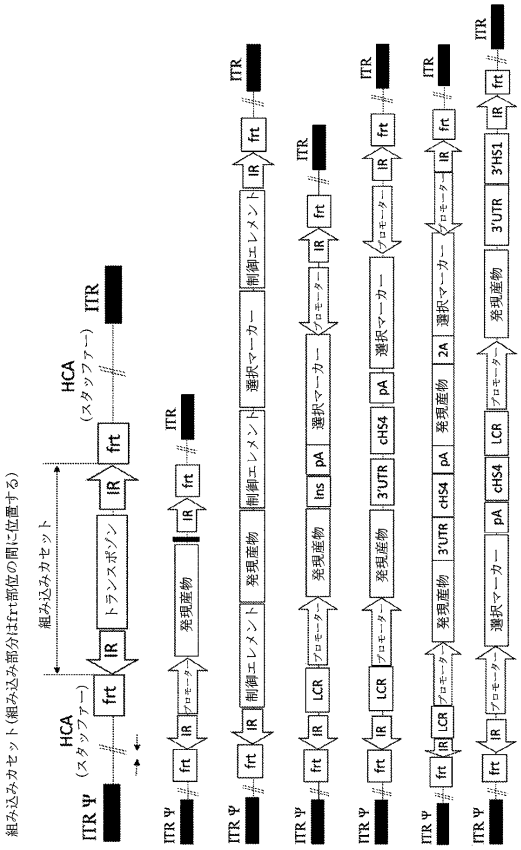
【１１８７】

本開示において使用される定義及び説明は、実施例の中で明確かつ曖昧さを残さずに改変されない限り、または意味を適用するといずれかの解釈が無意味もしくは本質的に無意味となる場合、任意の将来の解釈において優先される意図及び意向を有するものである。用語の解釈を当てはめると当該用語が無意味または本質的に無意味になる場合は、Ｗｅｂｓｔｅｒ’ｓ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ，３ｒｄ Ｅｄｉｔｉｏｎまたは当業者に知られる

辞書（Ｏｘｆｏｒｄ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｅｄｓ．Ａｔｔｗｏｏｄ Ｔ ｅｔ ａｌ．，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｏｘｆｏｒｄ，２００６）など）から定義が取得されるものとする。

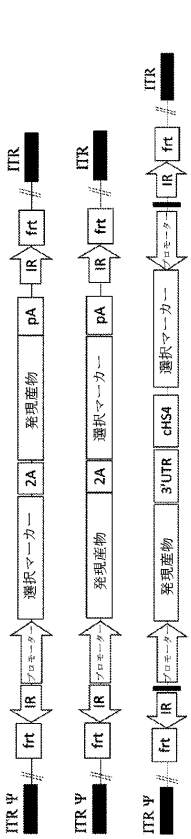
【図面】

【図１－１】



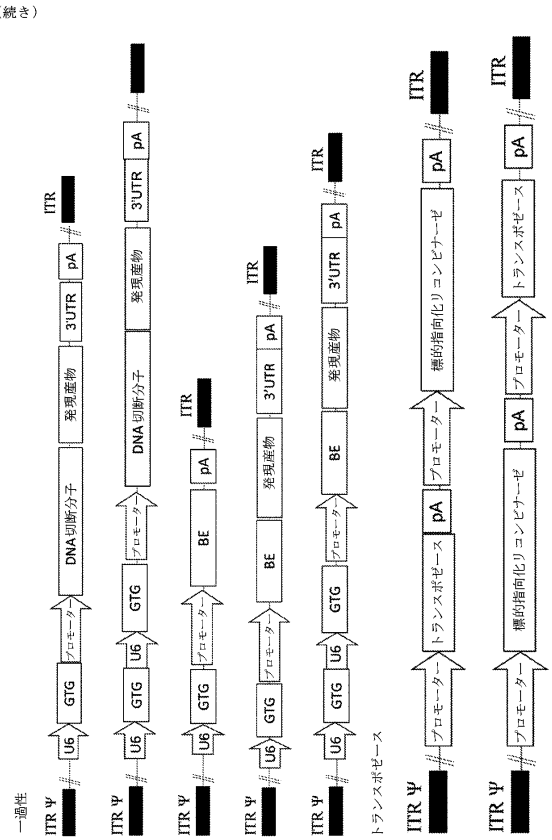

【図１－２】

（続き）

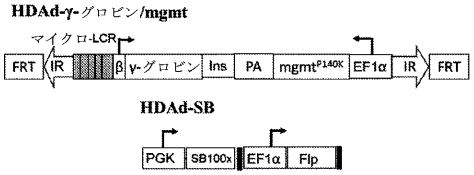


【図１－３】

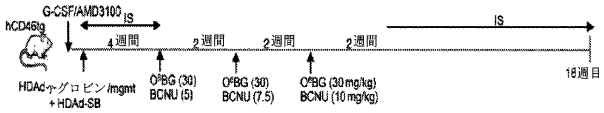
（続き）



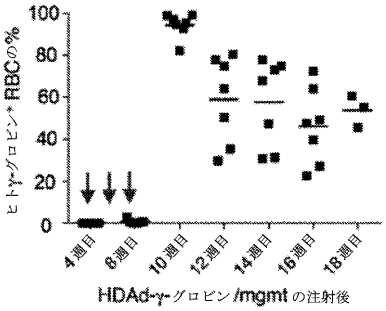

【図２Ａ】



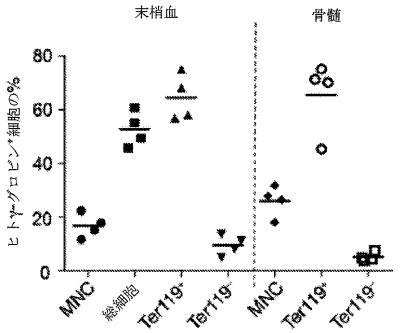

【図２Ｂ】



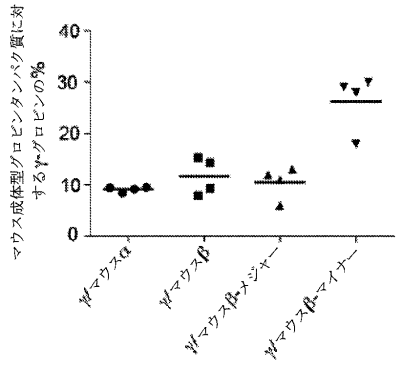

【図２Ｃ】



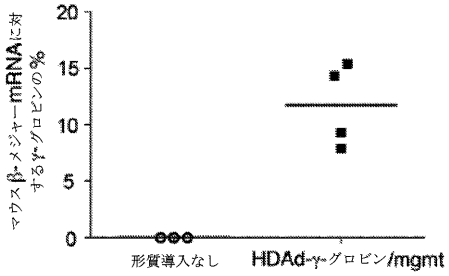
【図２Ｄ】



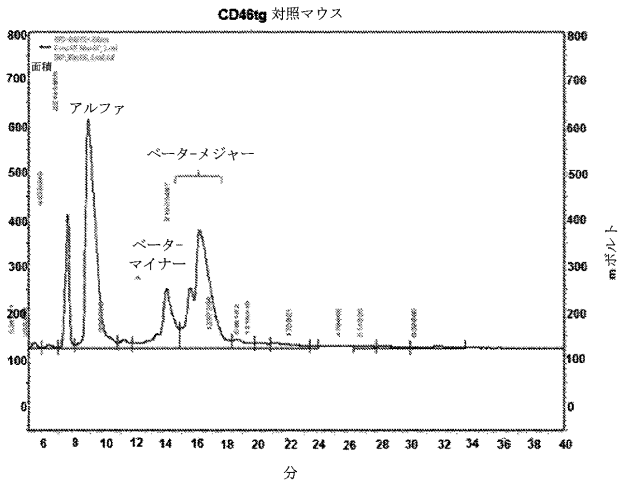

【図２Ｅ】




【図２Ｆ】

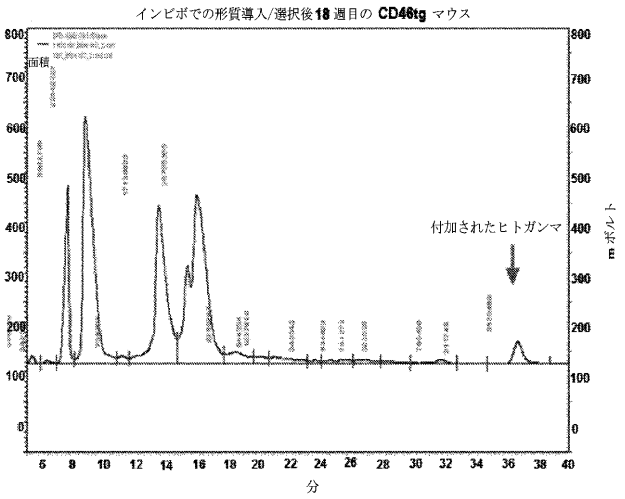



【図３－１】

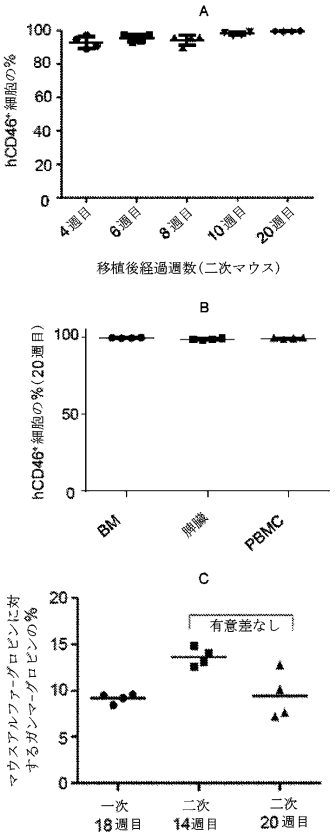


【図３－２】

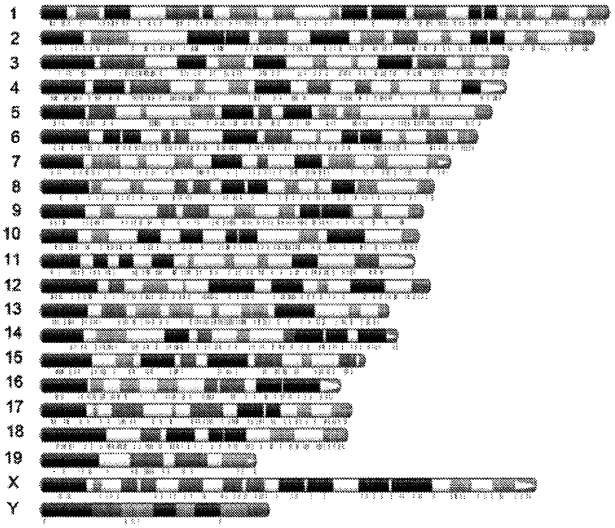
（続き）



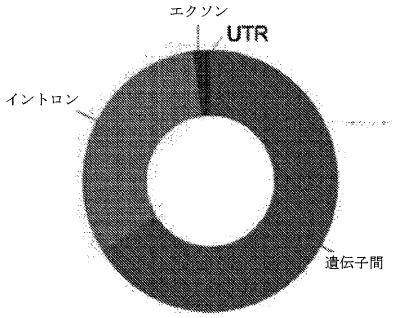

【図４】



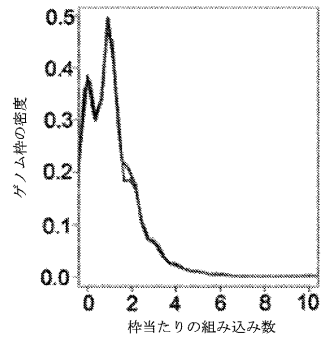

【図５Ａ】



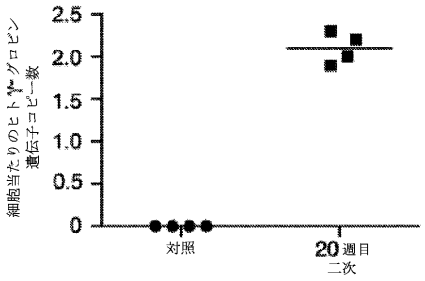

【図５Ｂ】



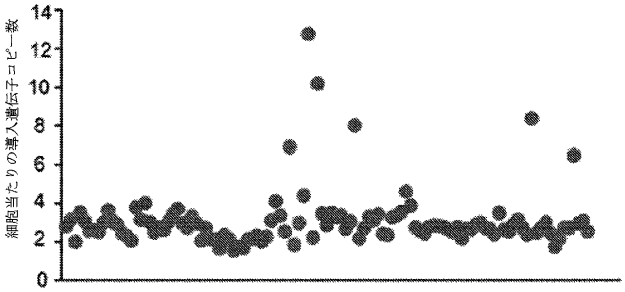
【図５Ｃ】



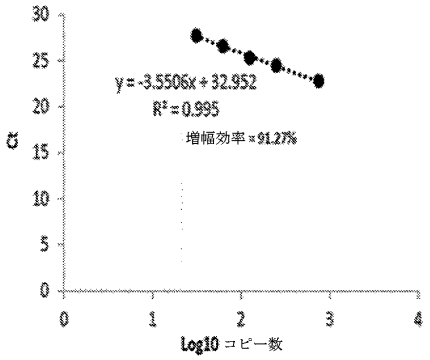

【図５Ｄ】

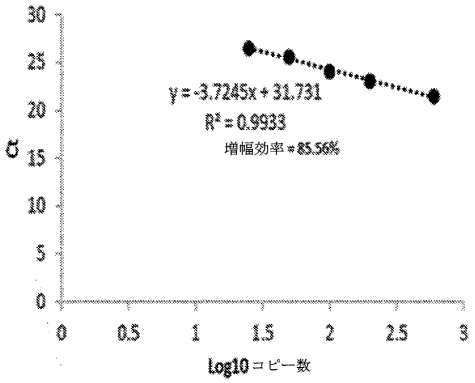



【図５Ｅ】

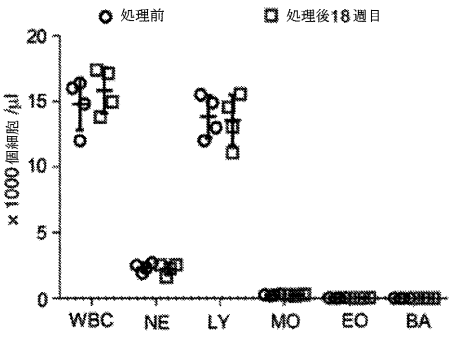



【図６】

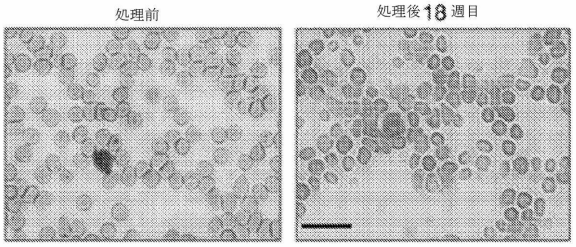


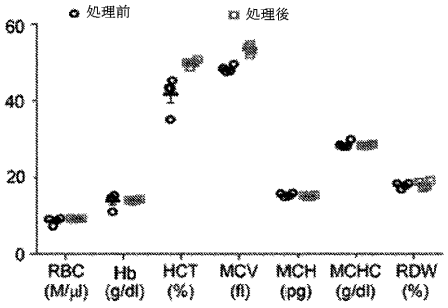
【図７Ａ】



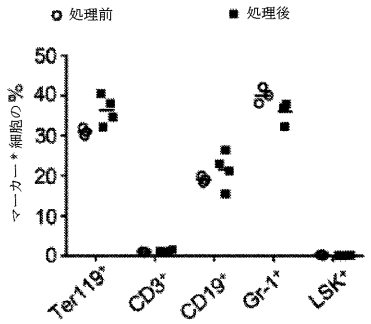

【図７Ｂ】



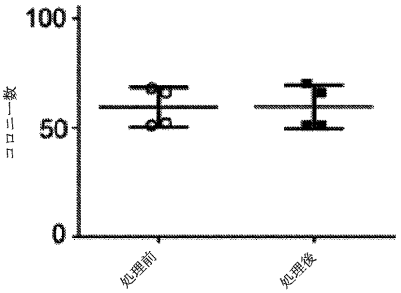

【図７Ｃ】



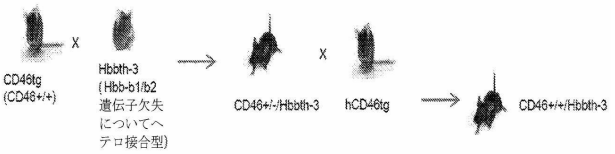

【図７Ｄ】



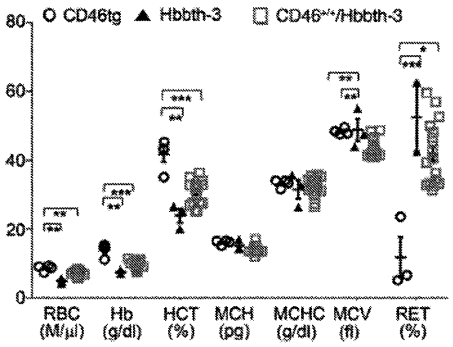

【図７Ｅ】



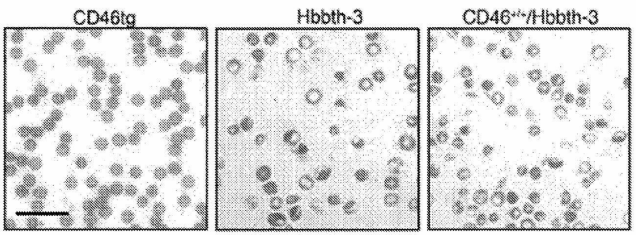

【図８】



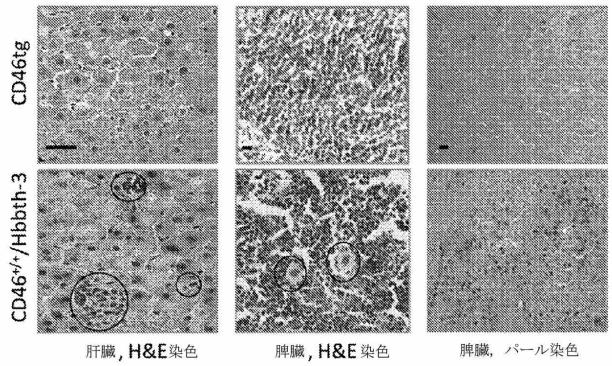
【図９Ａ】



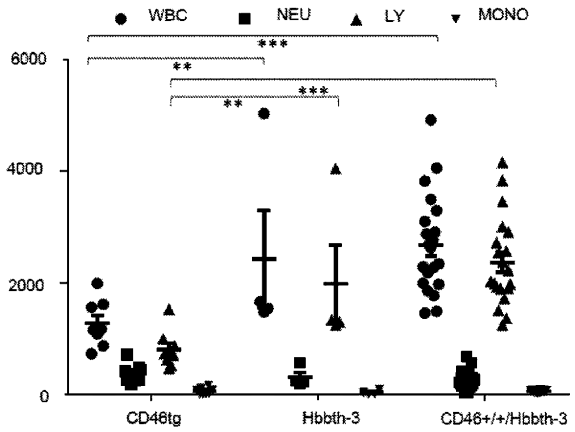

【図９Ｂ】



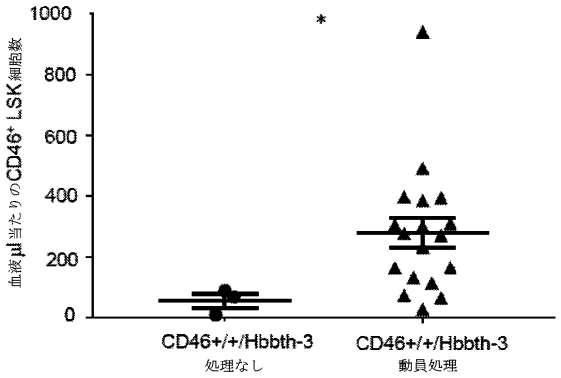

【図９Ｃ】



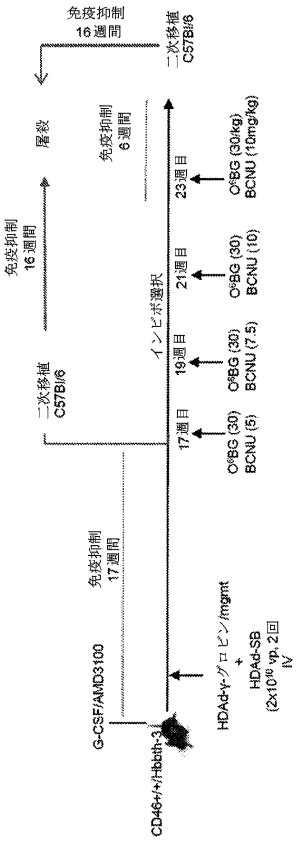

【図１０】



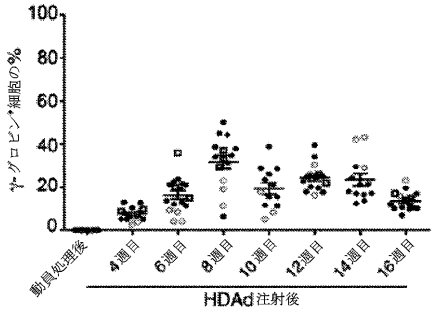
【図１１】



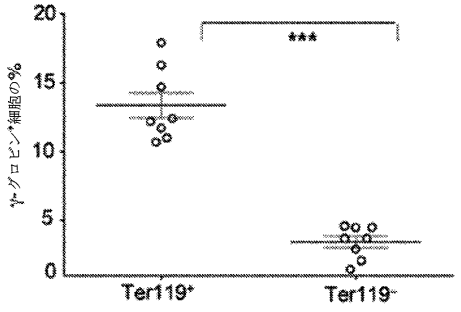

【図１２】



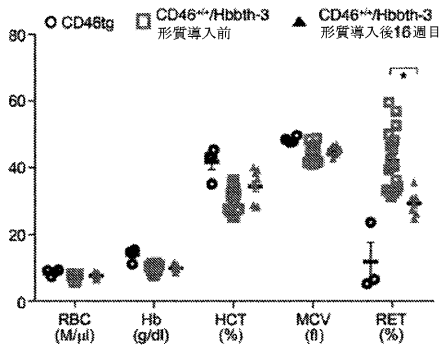

【図１３Ａ】



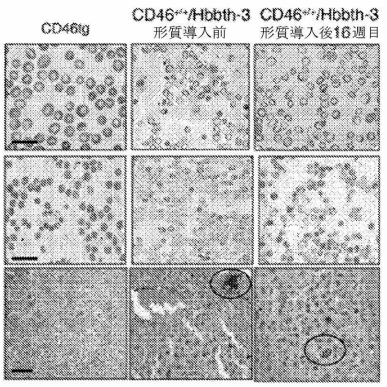

【図１３Ｂ】



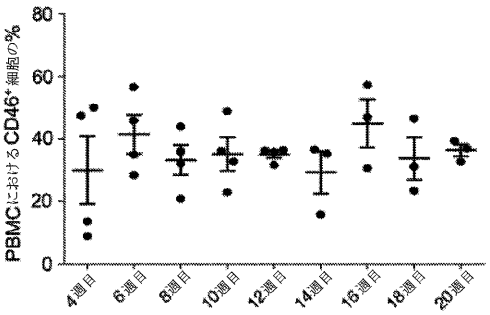
【図１３Ｃ】



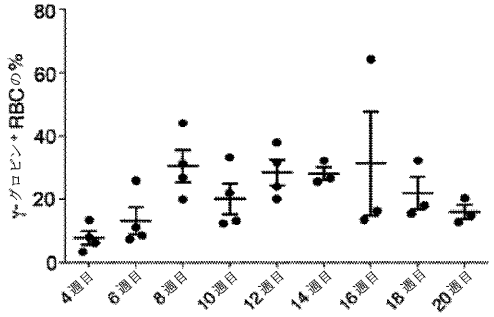

【図１３Ｄ】



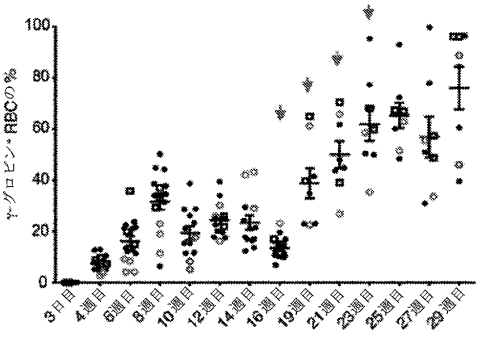

【図１３Ｅ】



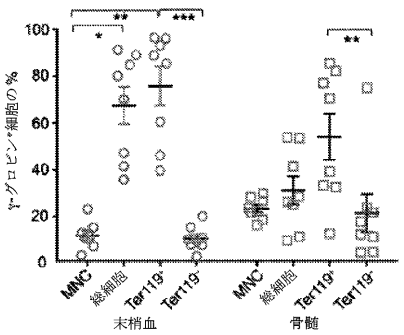

【図１３Ｆ】



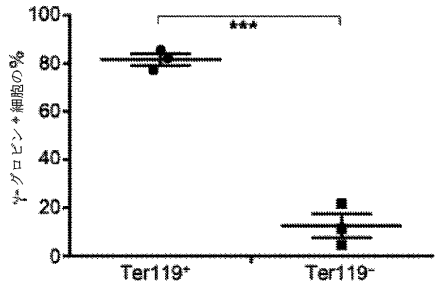

【図１４Ａ】



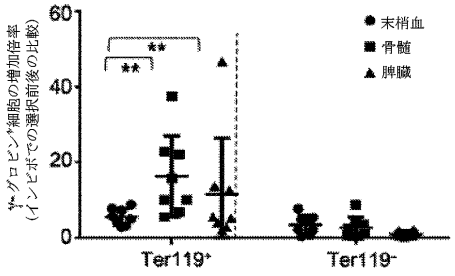

【図１４Ｂ】



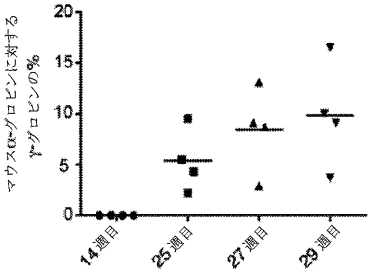
【図１４Ｃ】



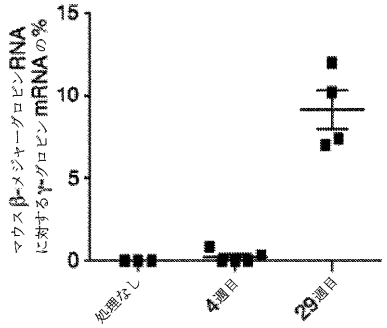

【図１４Ｄ】



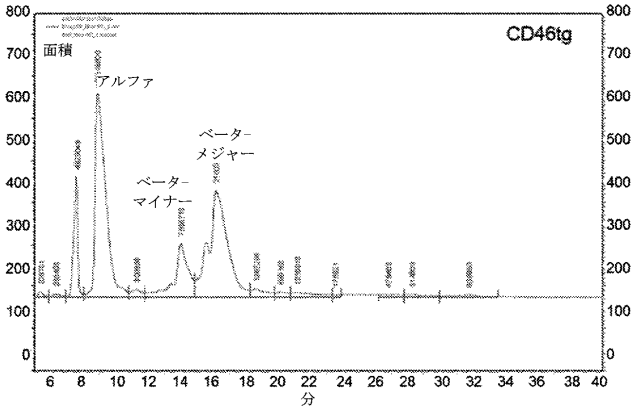

【図１４Ｅ】



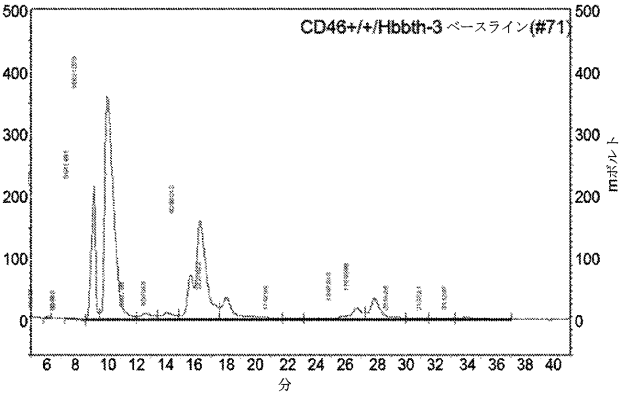

【図１４Ｆ】



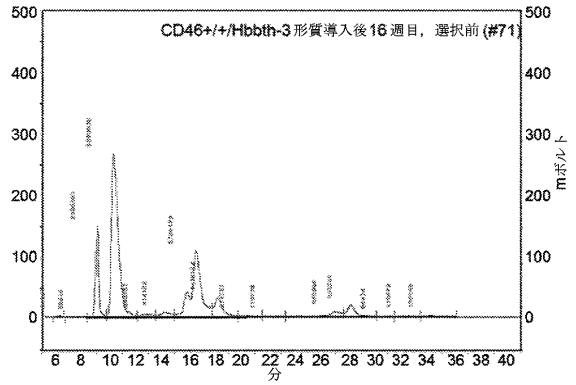

【図１５Ａ】



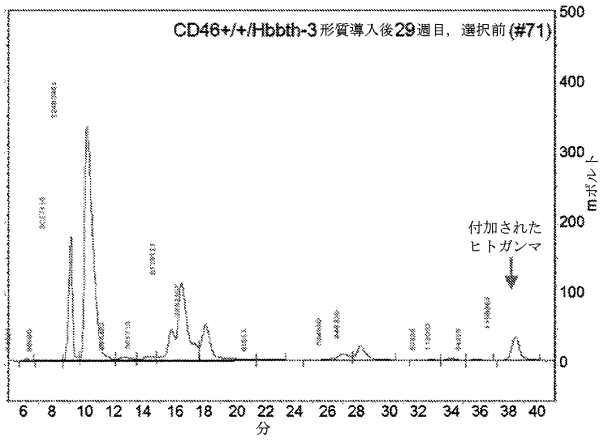

【図１５Ｂ】



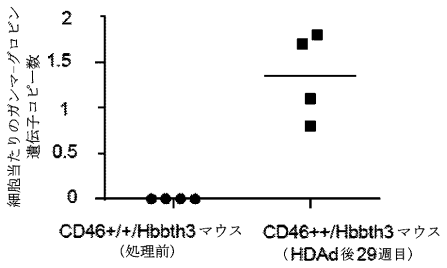
【図１５Ｃ】



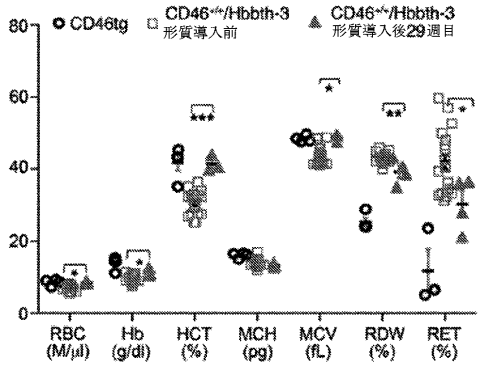

【図１５Ｄ】



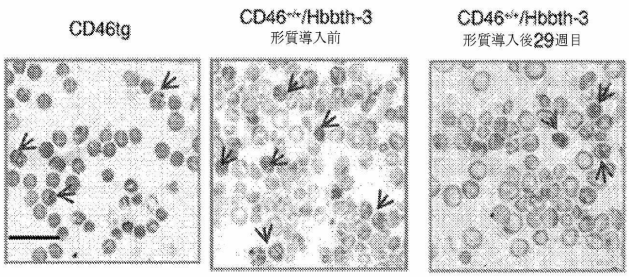

【図１６】



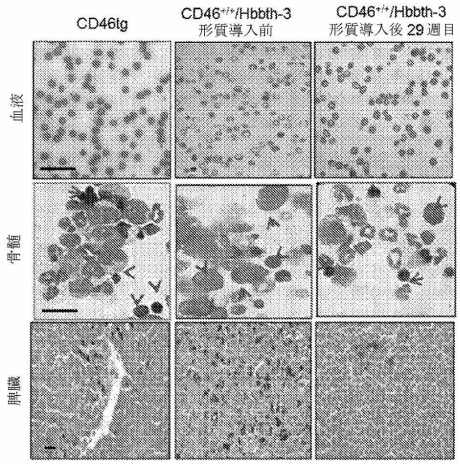

【図１７Ａ】



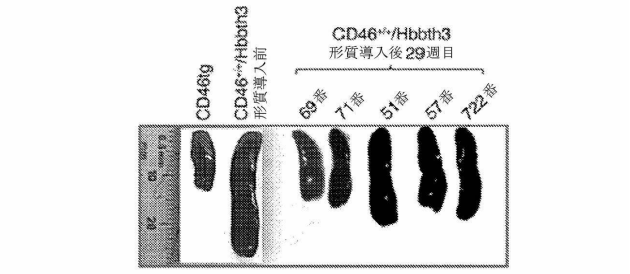
【図１７Ｂ】



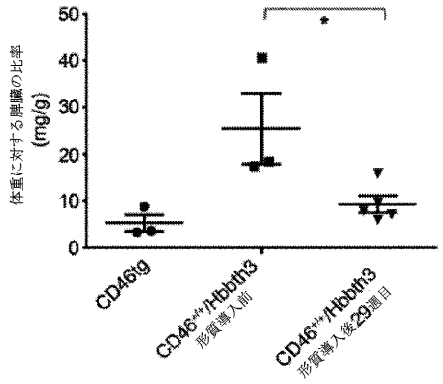

【図１７Ｃ】



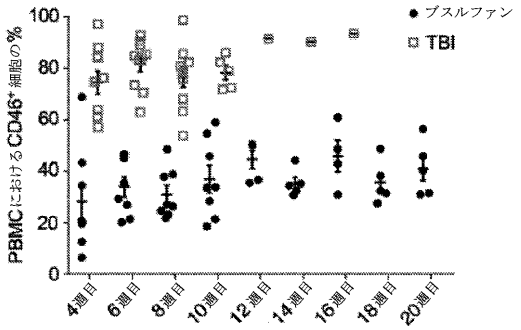

【図１７Ｄ】



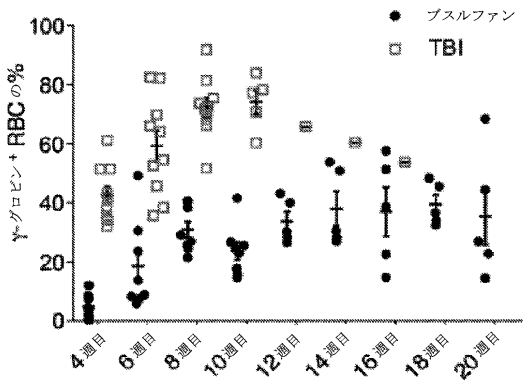

【図１７Ｅ】



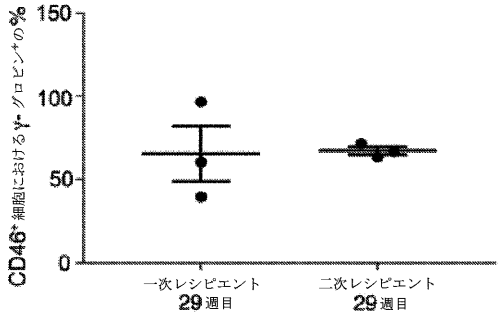
【図１８Ａ】



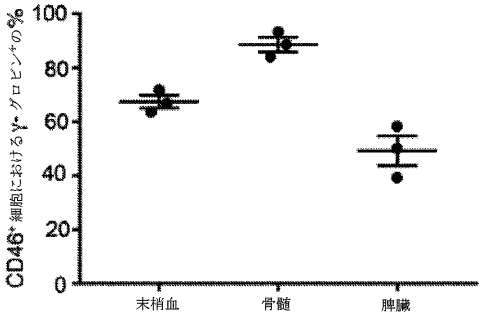

【図１８Ｂ】



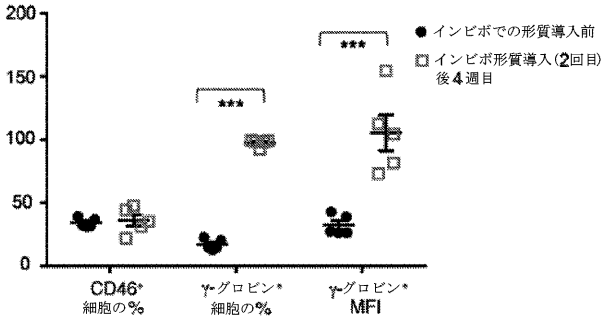

【図１８Ｃ】



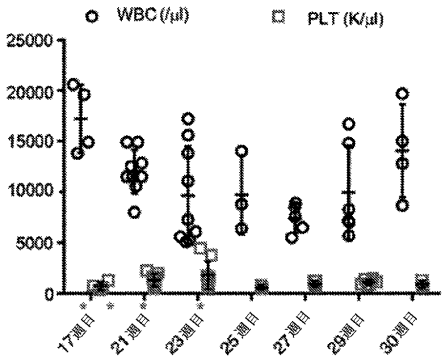

【図１８Ｄ】



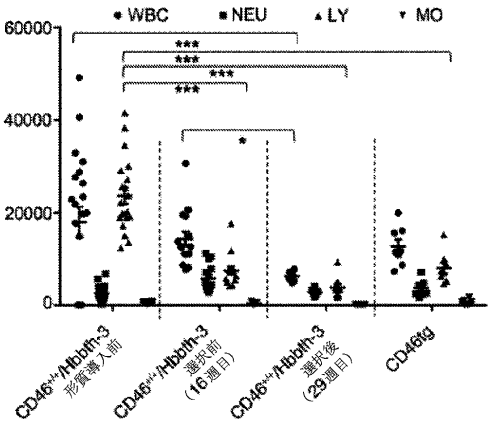

【図１８Ｅ】



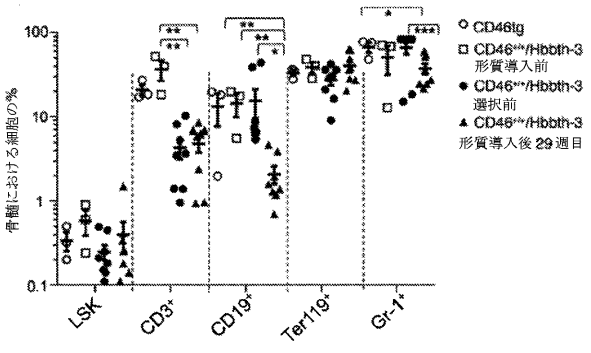

【図１９Ａ】



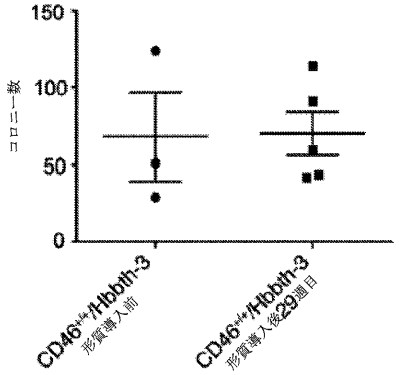
【図１９Ｂ】



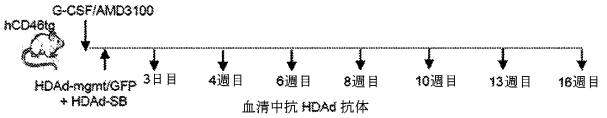

【図１９Ｃ】



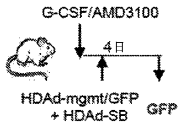

【図１９Ｄ】



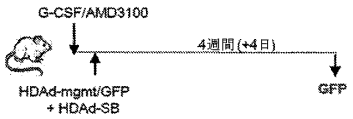

【図２０Ａ】



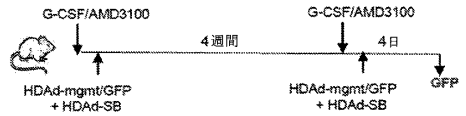

【図２０Ｂ】



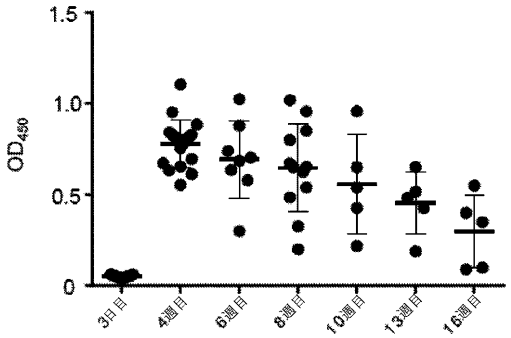

【図２０Ｃ】



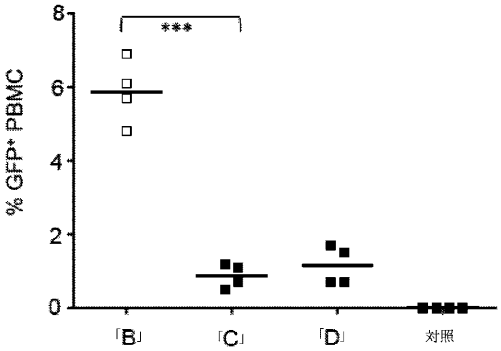
【図２０Ｄ】



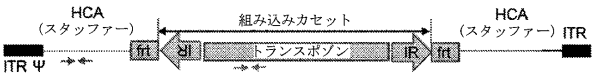

【図２０Ｅ】



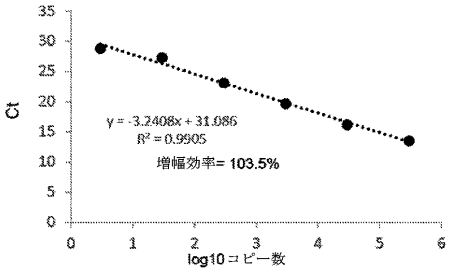

【図２０Ｆ】



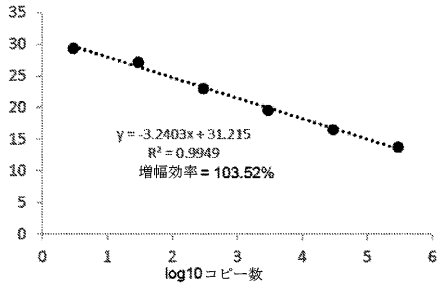

【図２１Ａ】



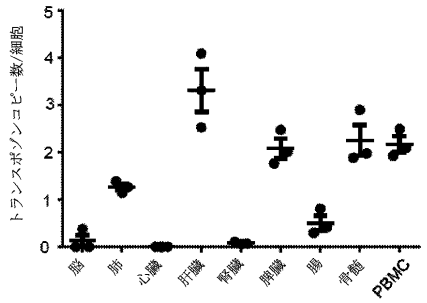

【図２１Ｂ】



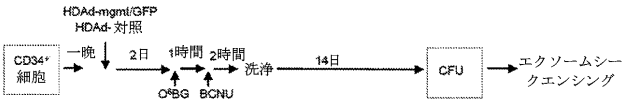

【図２１Ｃ】



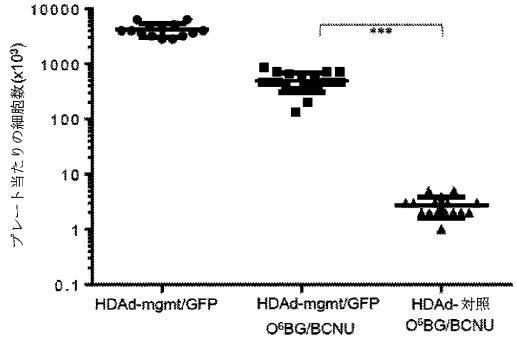
【図２１Ｄ】



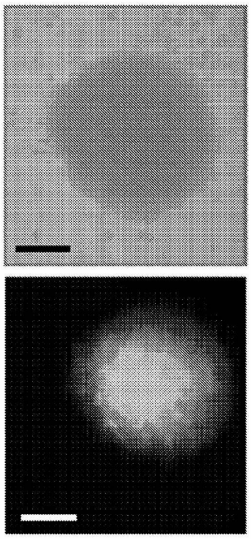

【図２２Ａ】




【図２２Ｂ】




【図２２Ｃ】



10

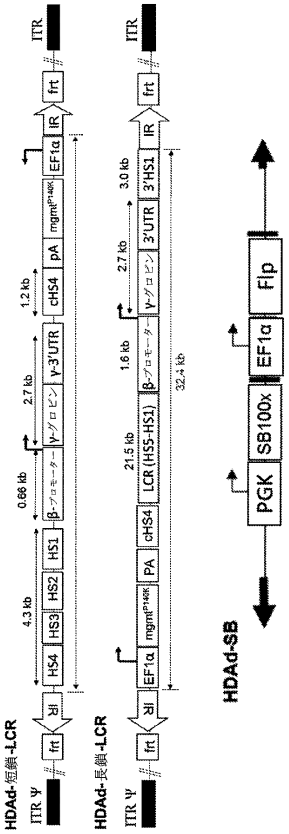
20

30

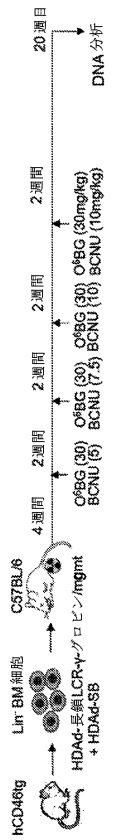
40

50

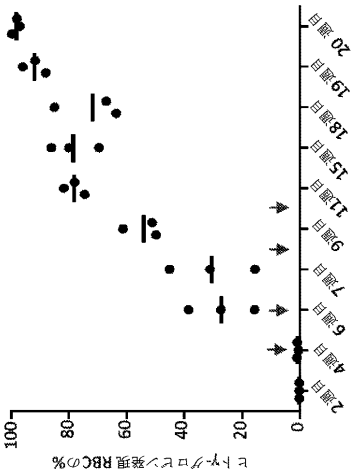
【図２３】



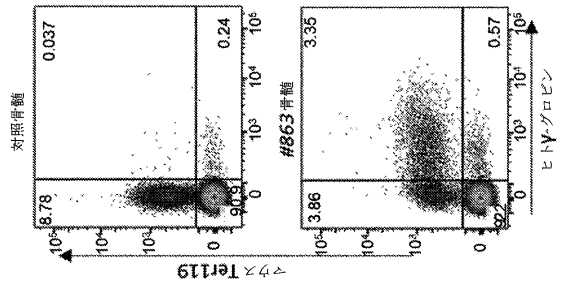

【図２４Ａ】



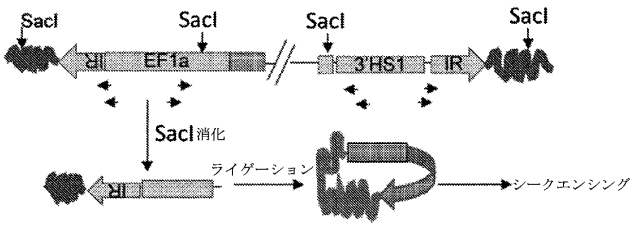

【図２４Ｂ】



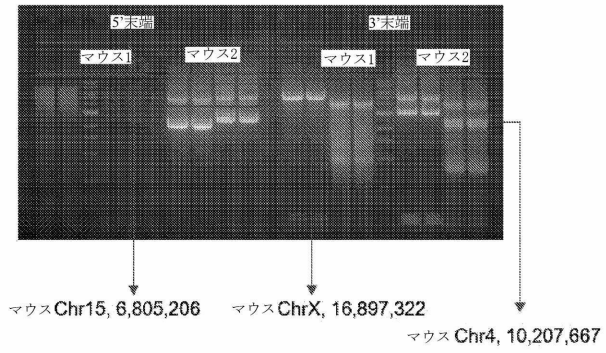

【図２４Ｃ】



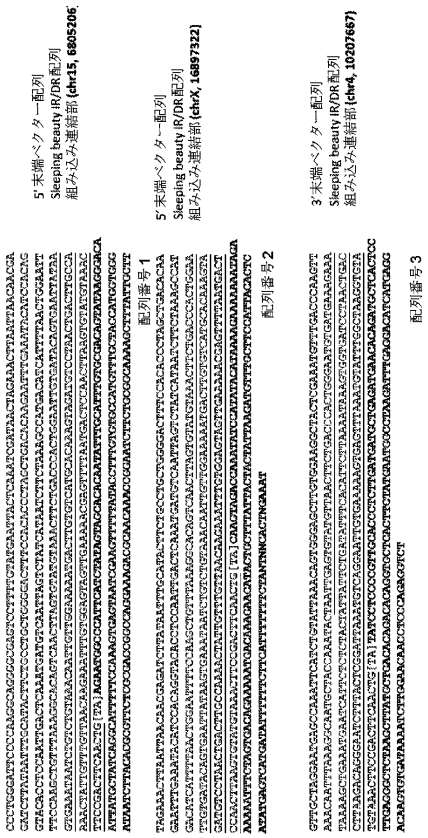
【図２４Ｄ】



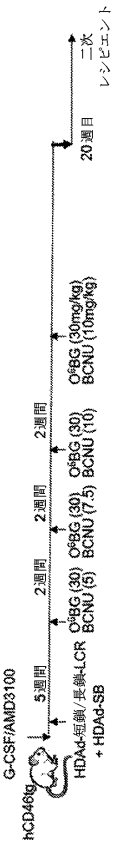

【図２４Ｅ】



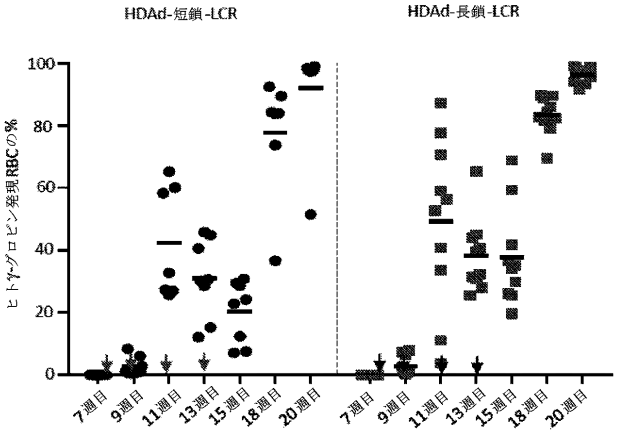

【図２４Ｆ】



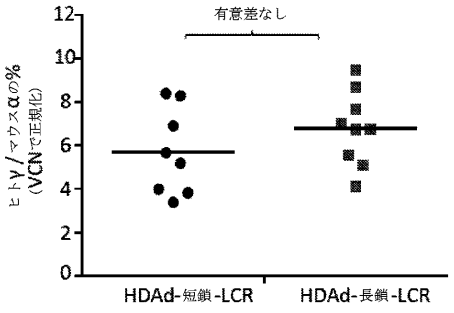

【図２５Ａ】



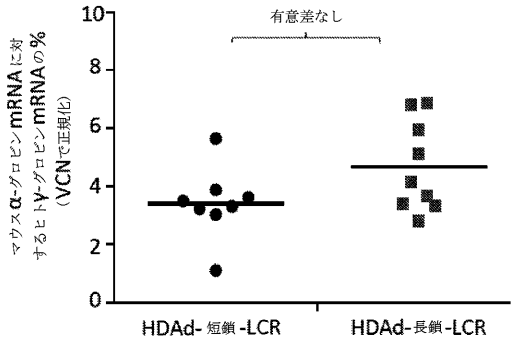
【図２５Ｂ】



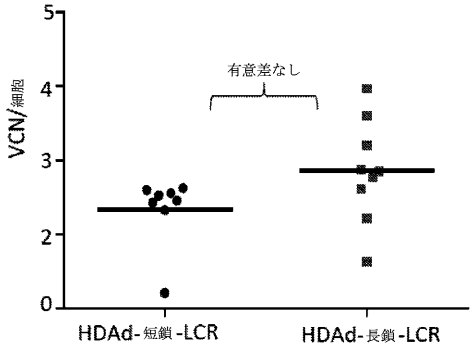

【図２５Ｃ】



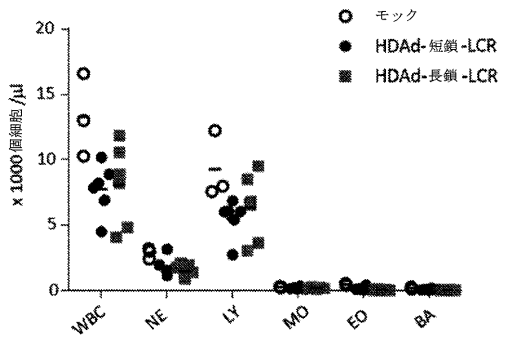

【図２５Ｄ】



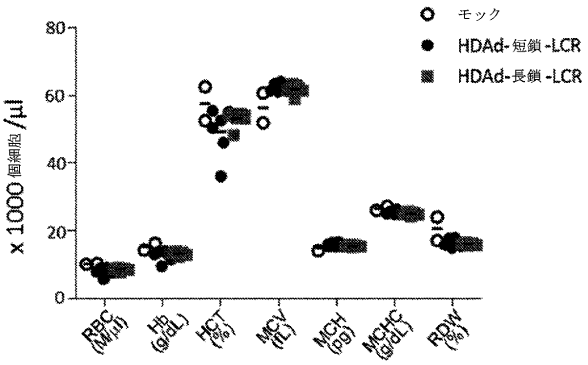

【図２５Ｅ】



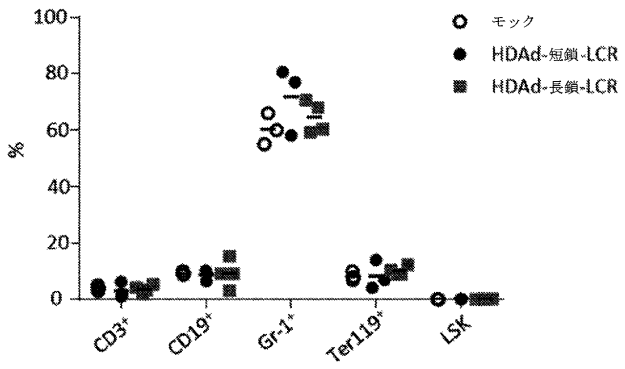

【図２６Ａ】



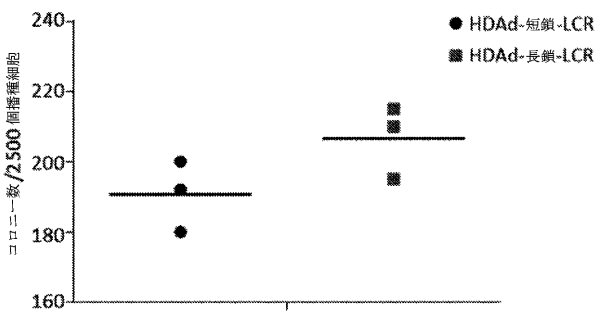

【図２６Ｂ】



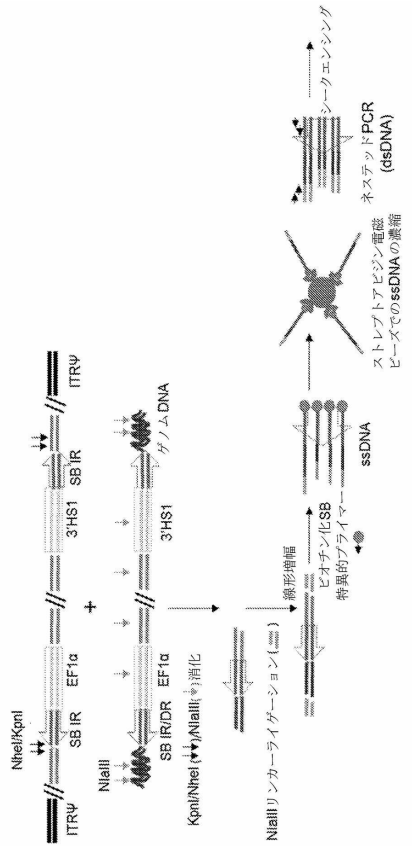
【図２６Ｃ】



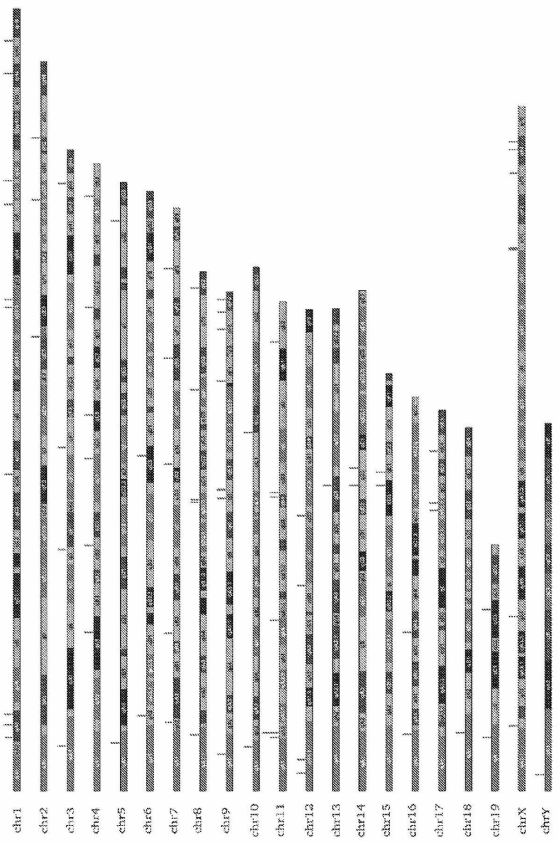

【図２６Ｄ】



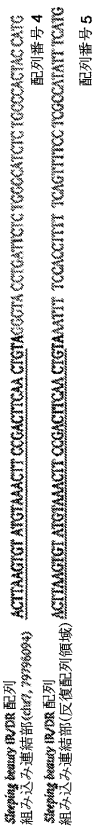

【図２７】



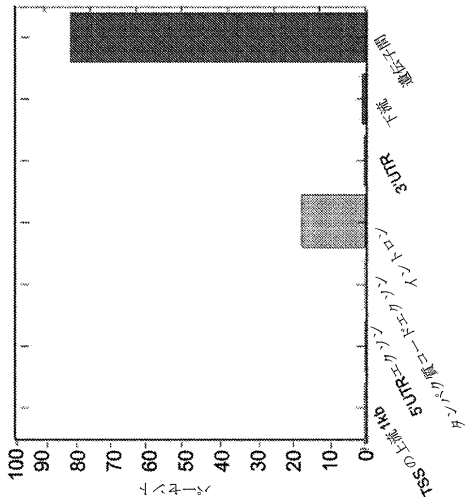

【図２８Ａ】



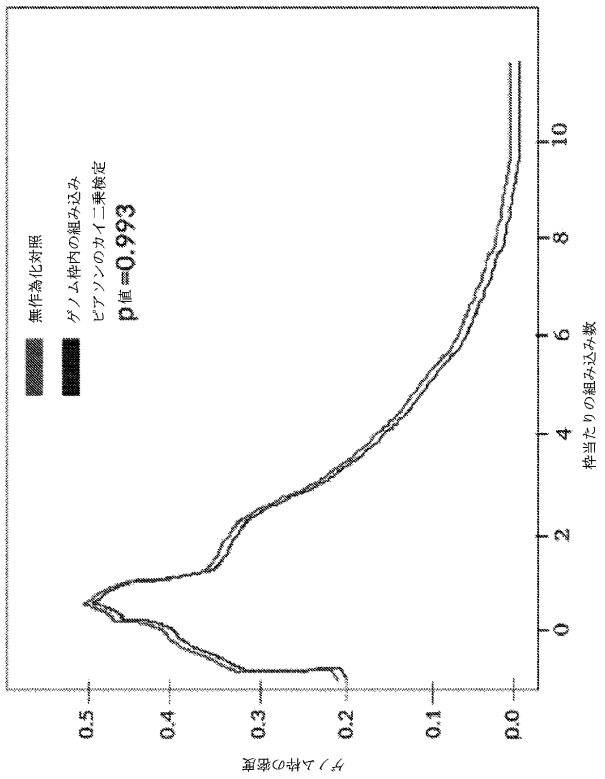
【図２８Ｂ】



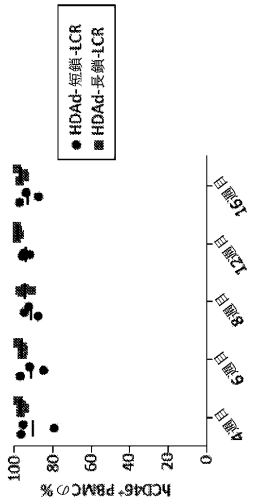

【図２８Ｃ】



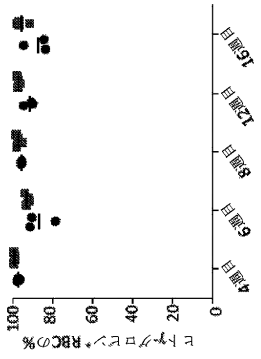

【図２８Ｄ】



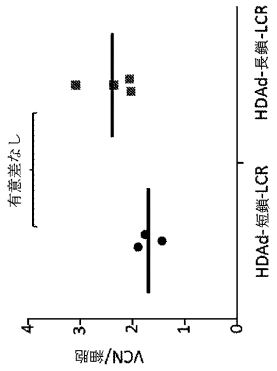

【図２９Ａ】



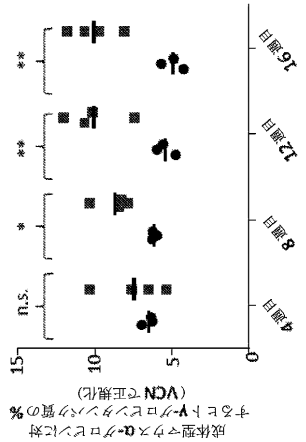
【図２９Ｂ】



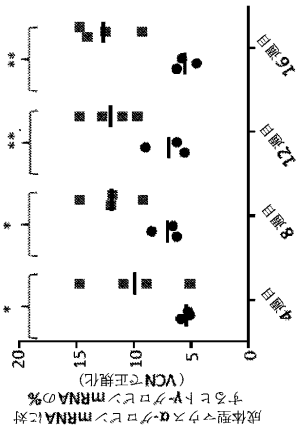

【図２９Ｃ】



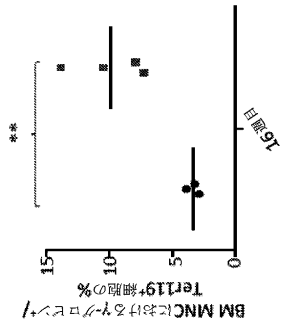

【図２９Ｄ】



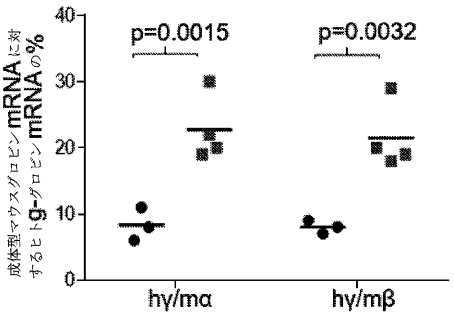

【図２９Ｅ】



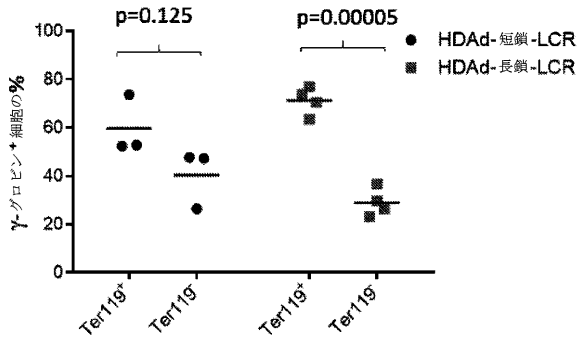

【図２９Ｆ】



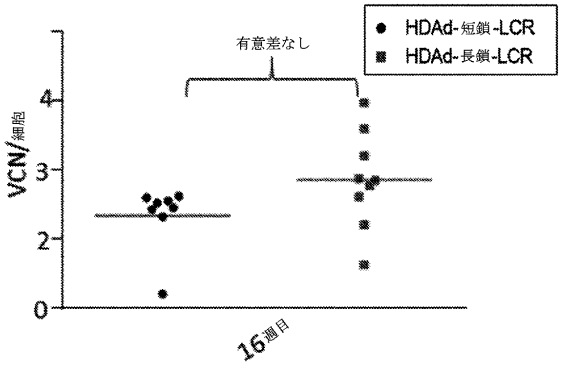

【図２９Ｇ】



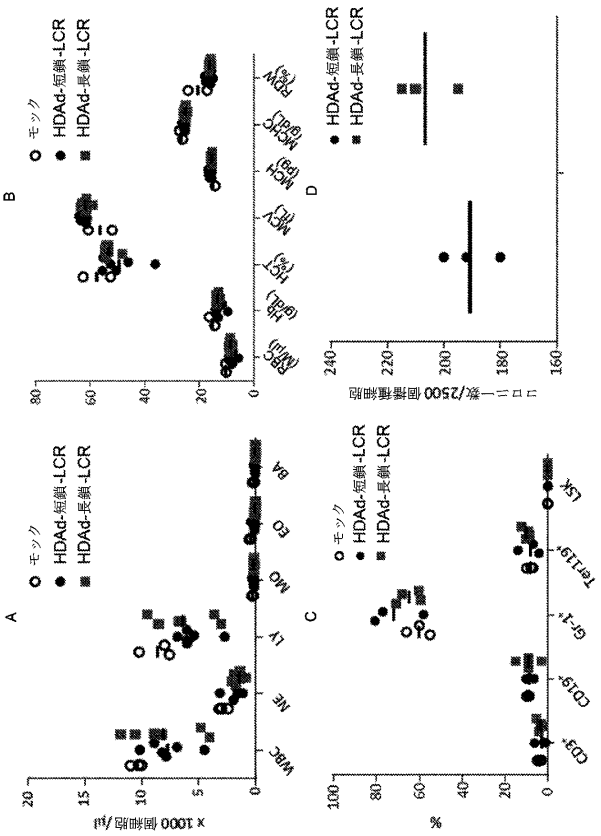
【図２９Ｈ】



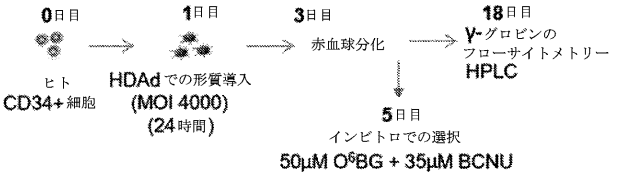

【図２９Ｉ】



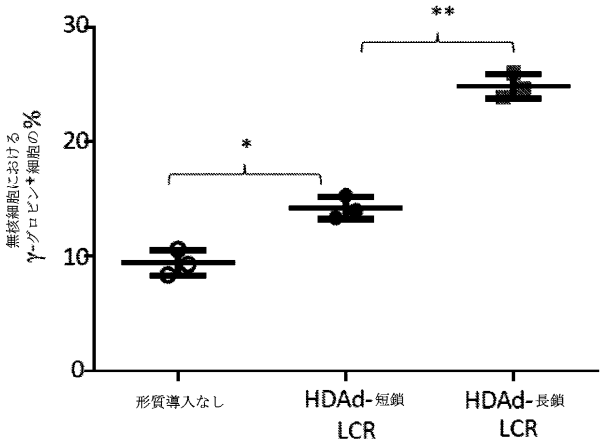

【図３０】



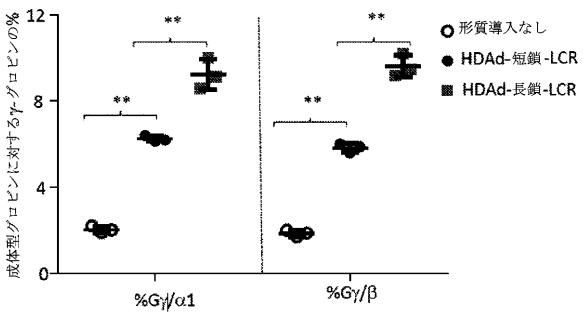

【図３１Ａ】



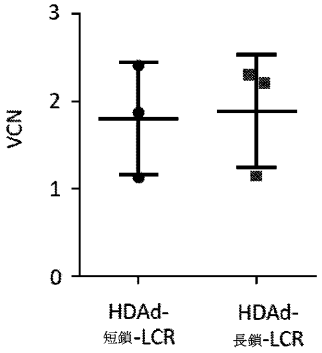
【図３１Ｂ】



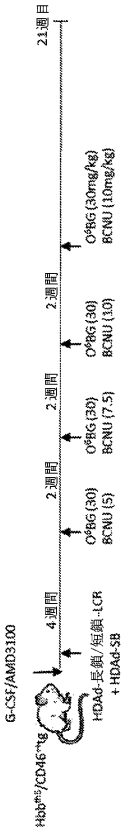

【図３１Ｃ】



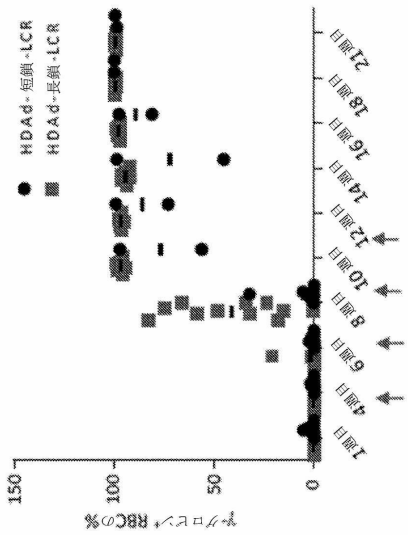

【図３１Ｄ】



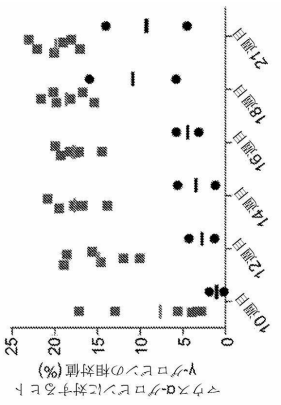

【図３２Ａ】



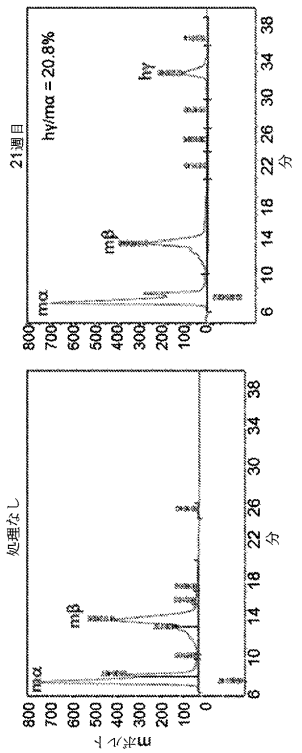
【図３２Ｂ】



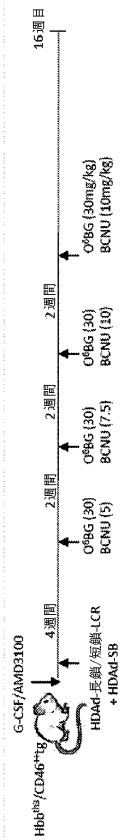

【図３２Ｃ】



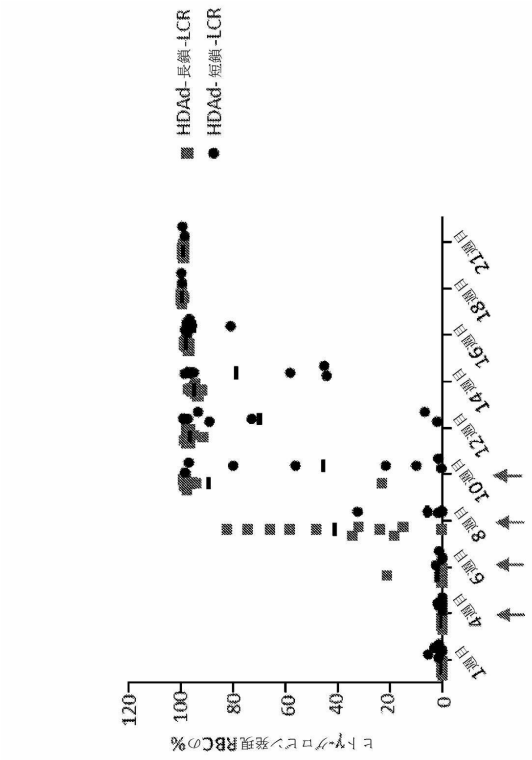

【図３２Ｄ】



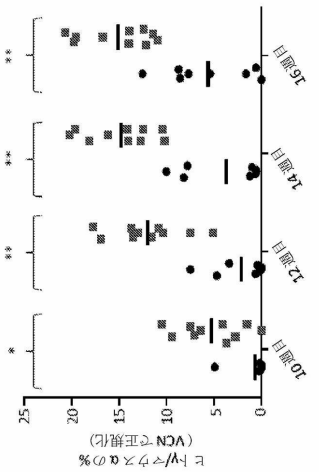

【図３２Ｅ】



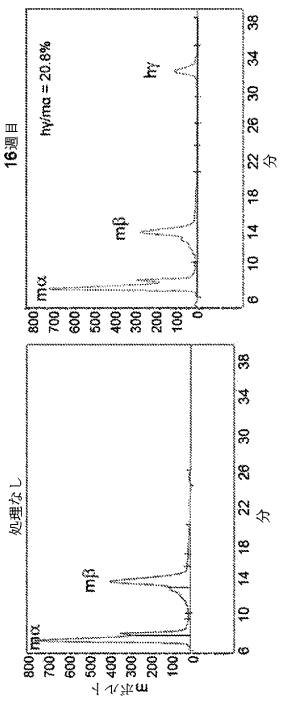
【図３２Ｆ】



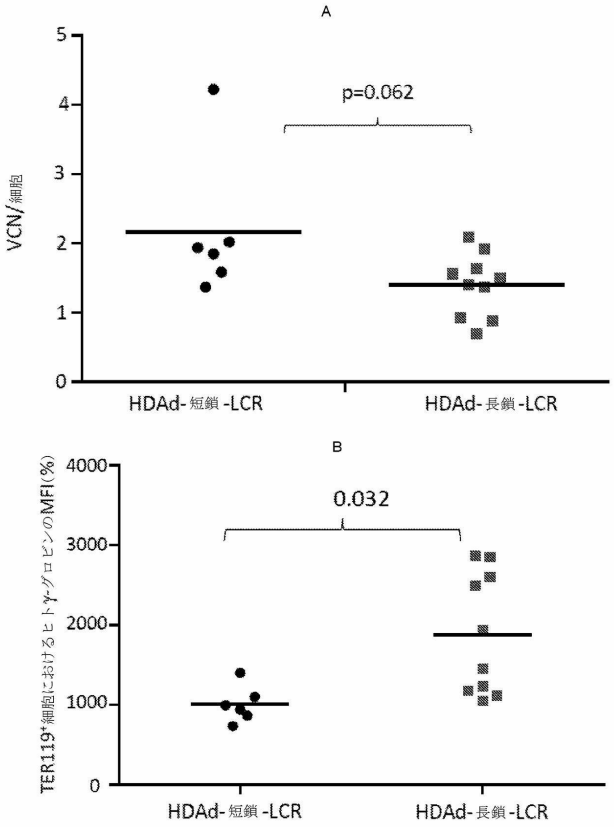

【図３２Ｇ】



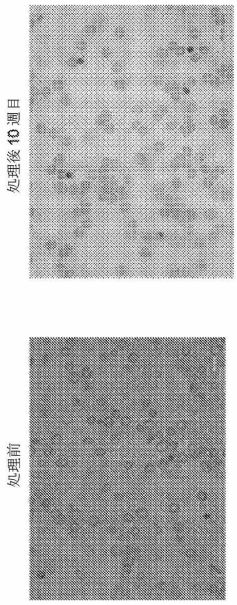

【図３２Ｈ】



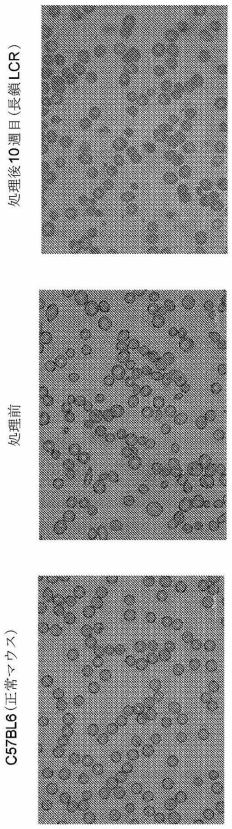

【図３３】



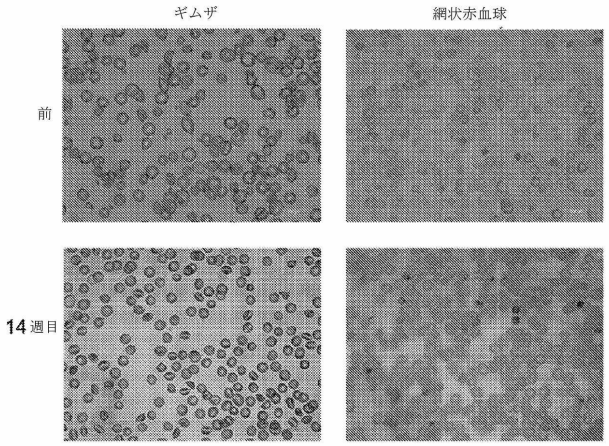
【図３４】



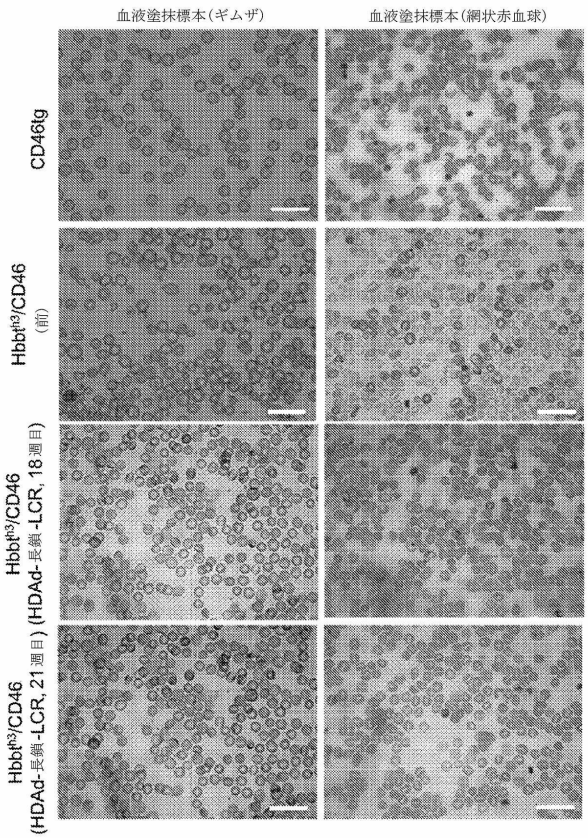

【図３５】



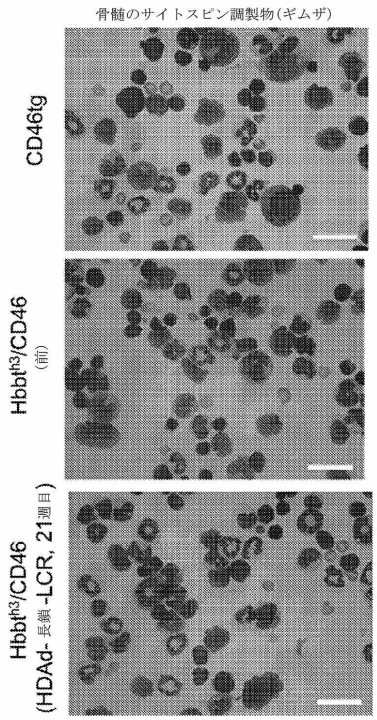

【図３６Ａ】



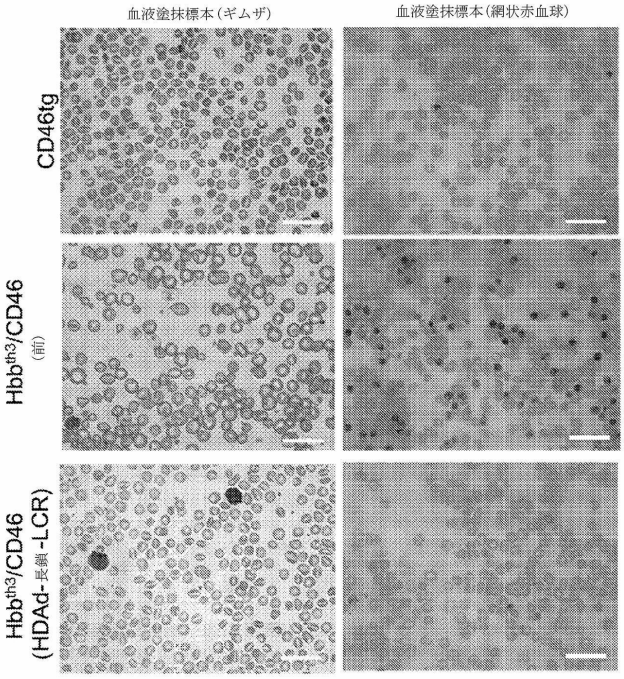

【図３６Ｂ】



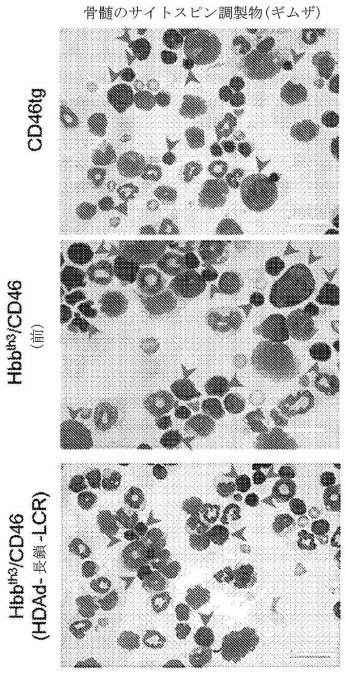
【図３６Ｃ】



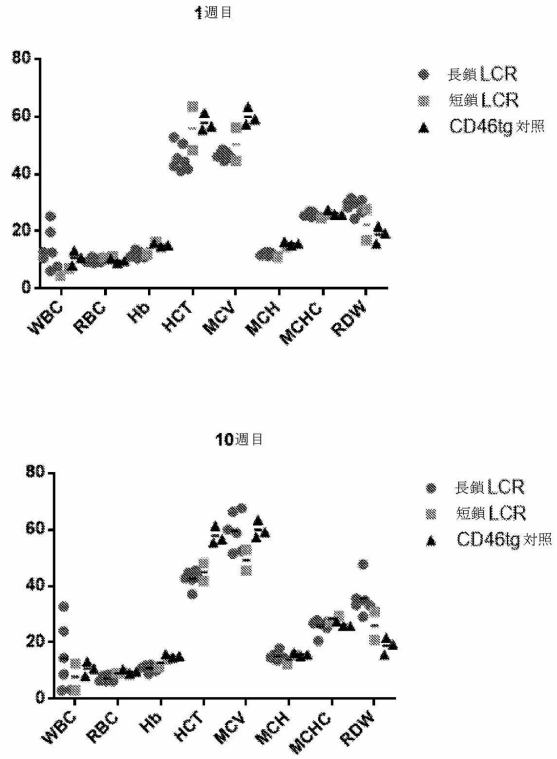

【図３７Ａ】



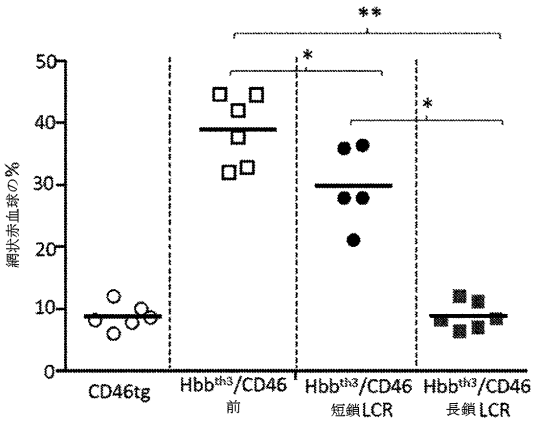

【図３７Ｂ】



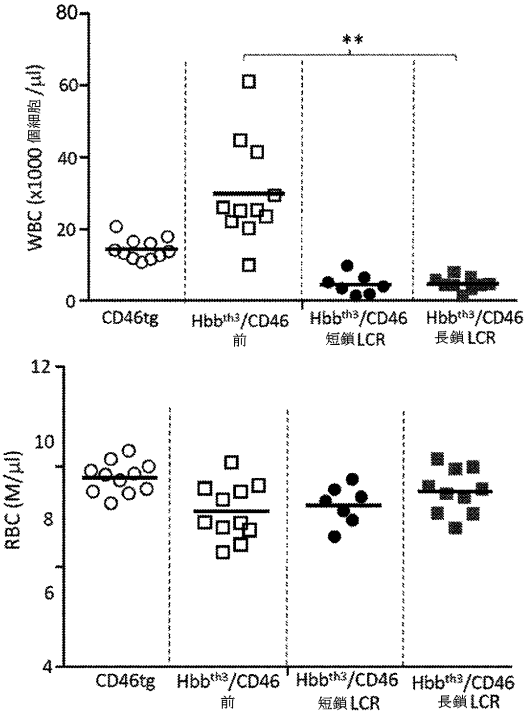

【図３８】



【図３９Ａ】

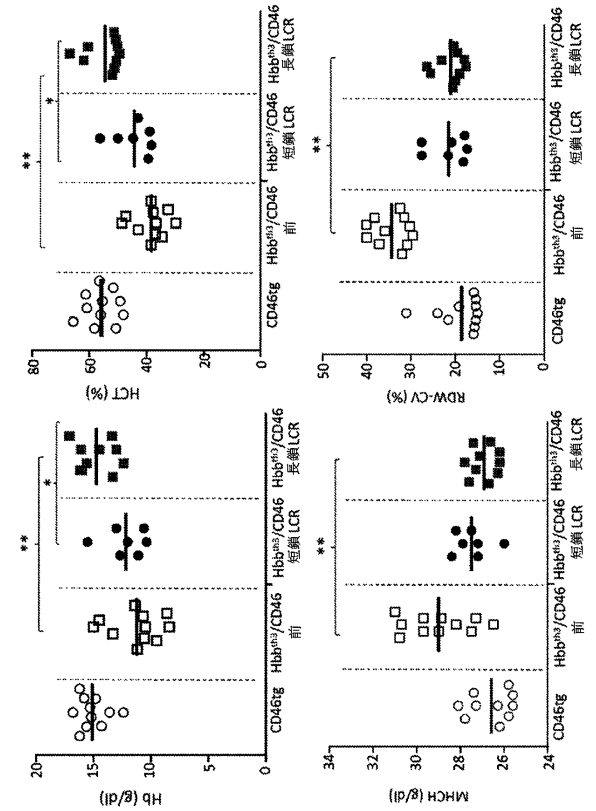



【図３９Ｂ－１】



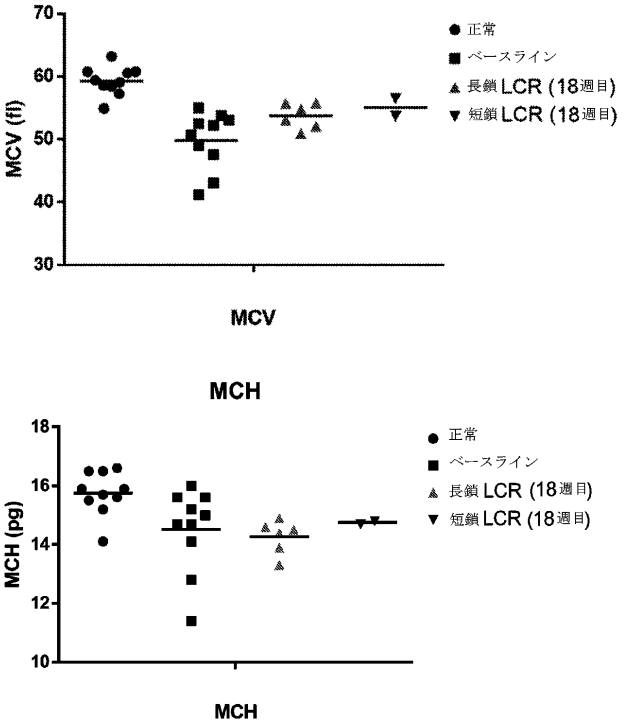

【図３９Ｂ－２】

（続き）

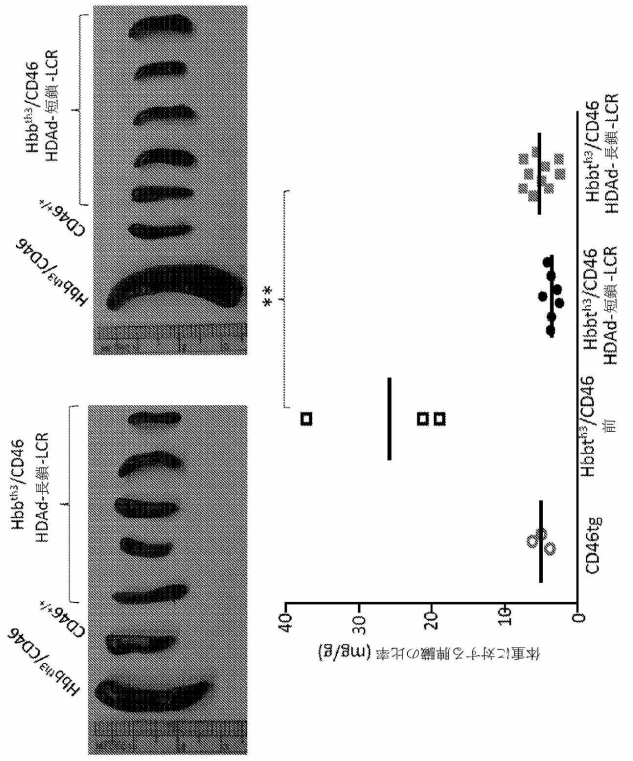



【図３９Ｂ－３】

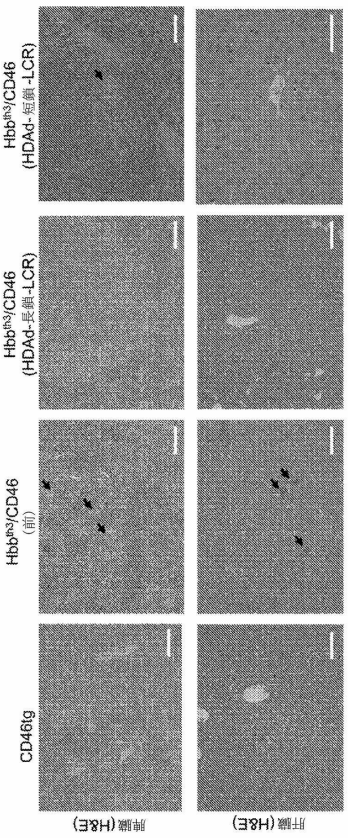
（続き）



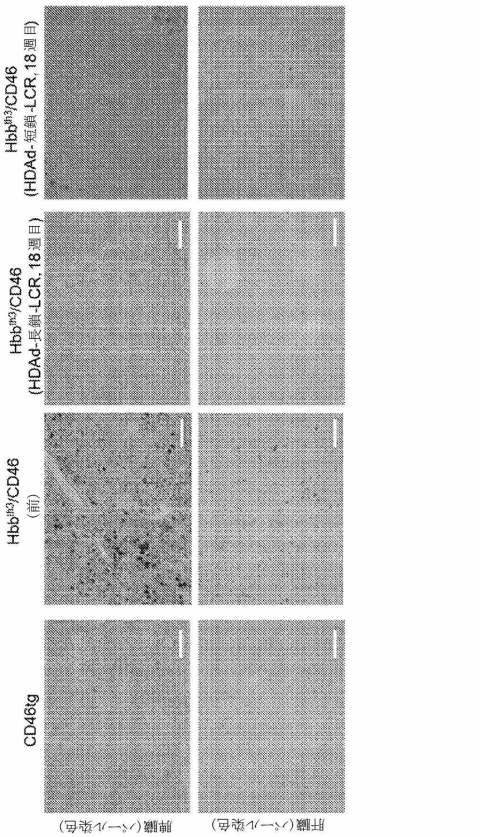
【図４０Ａ】



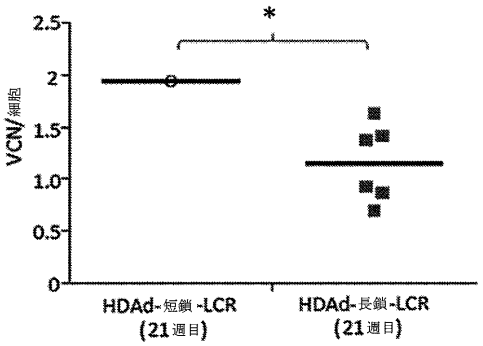

【図４０Ｂ】



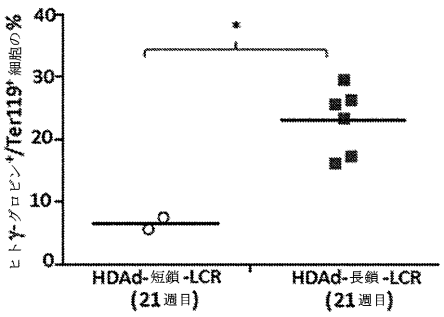

【図４１】



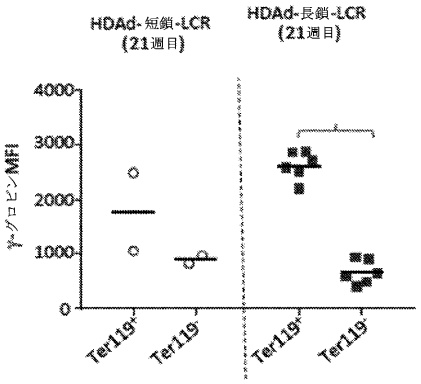

【図４２Ａ】



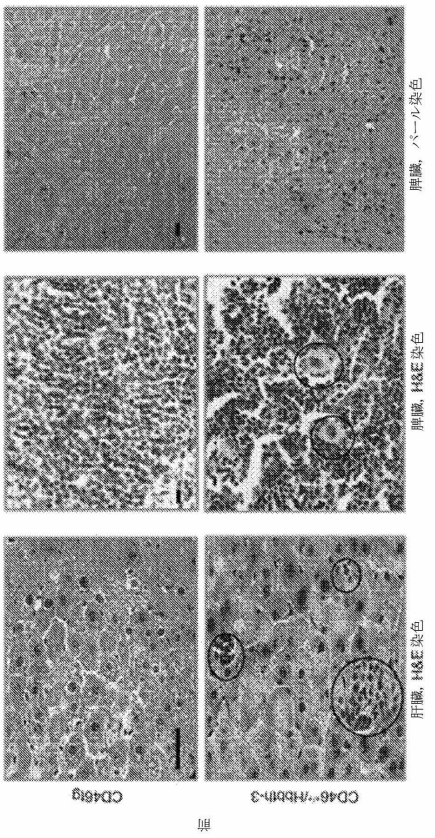
【図４２Ｂ】



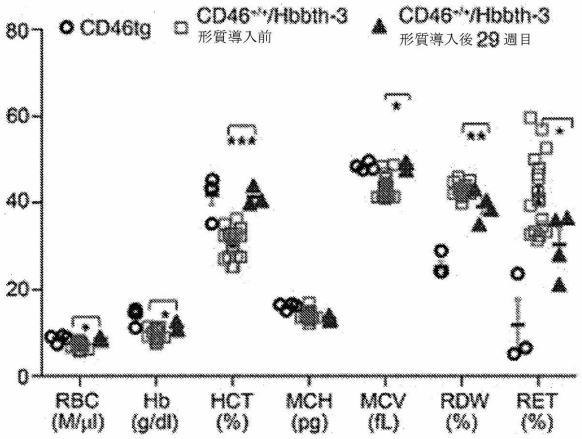

【図４２Ｃ】



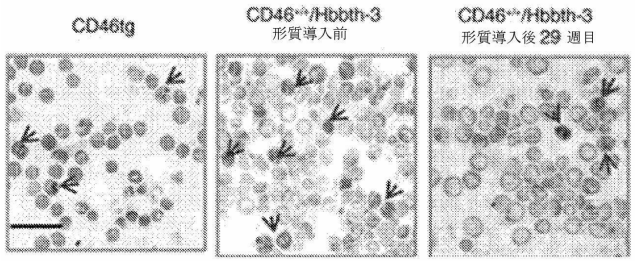

【図４３】



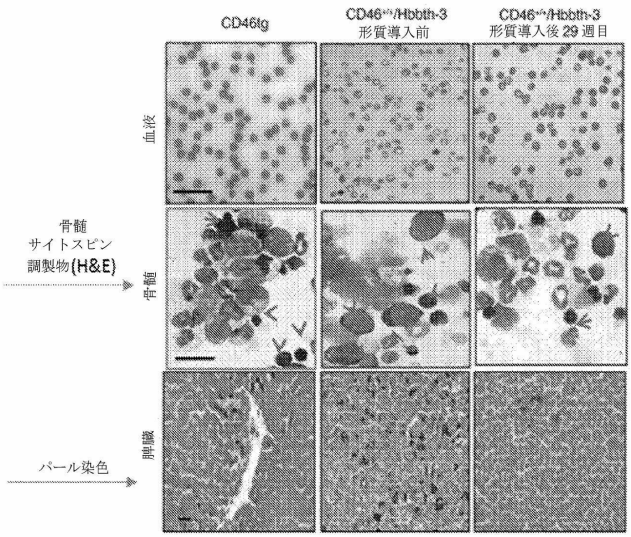

【図４４Ａ】



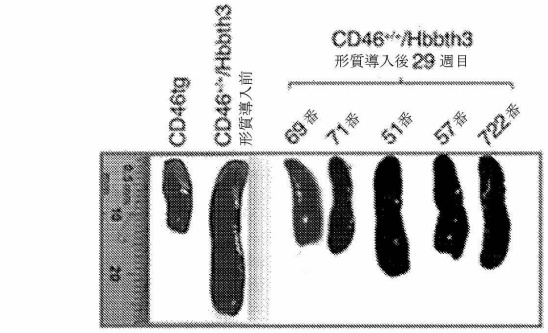
【図４４Ｂ】



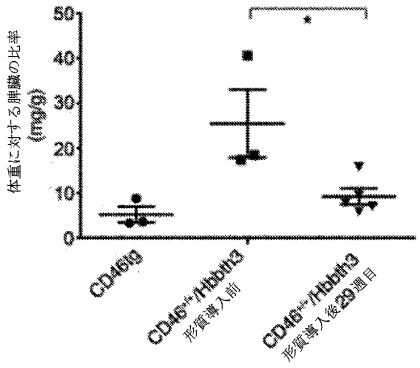

【図４４Ｃ】



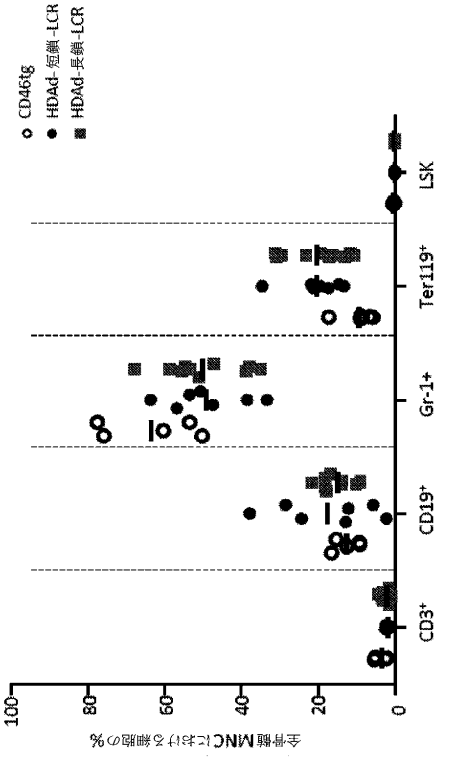

【図４４Ｄ】



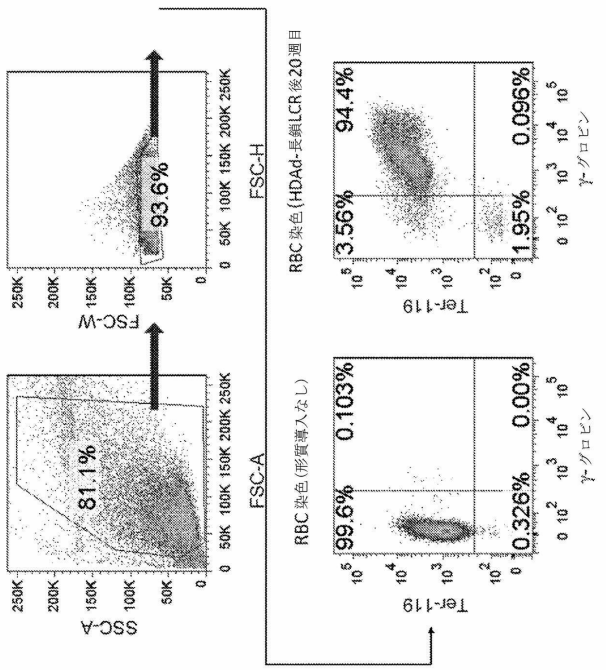

【図４４Ｅ】



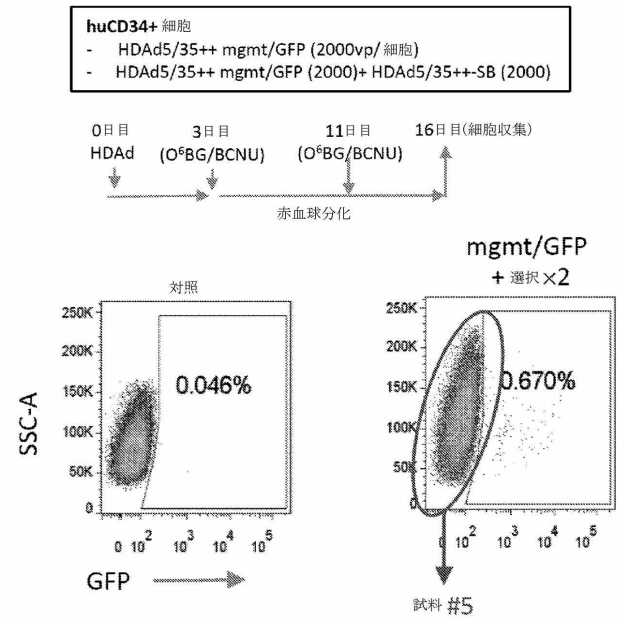
【図４５】




【図４６】

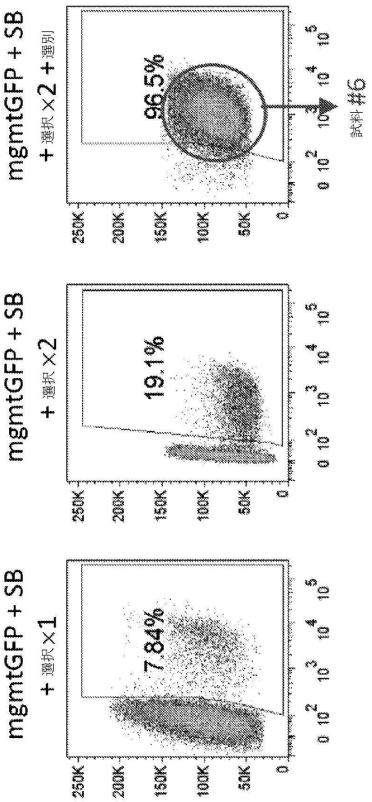



【図４７Ａ－１】

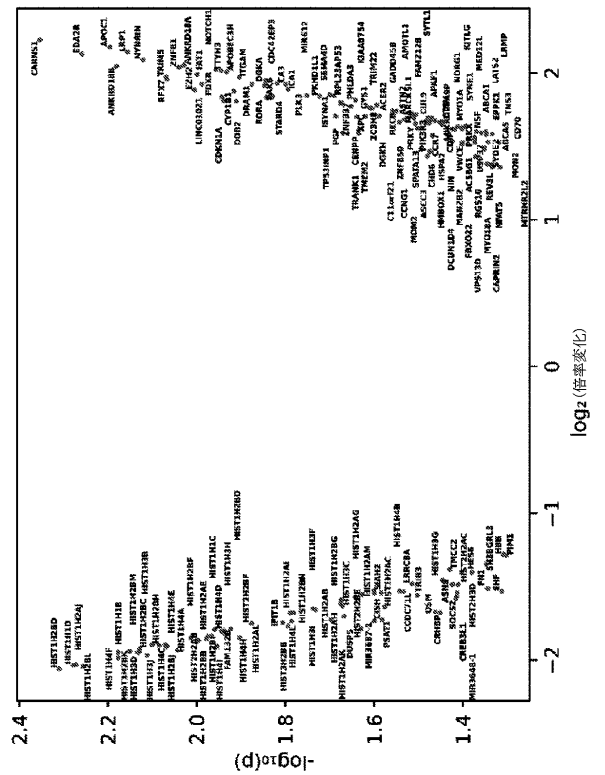



【図４７Ａ－２】

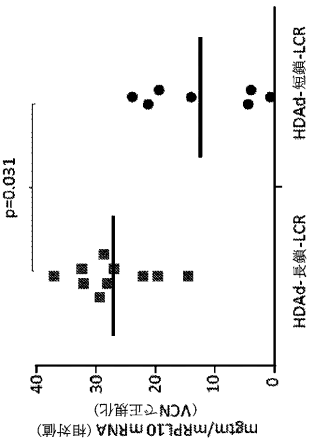
（続き）



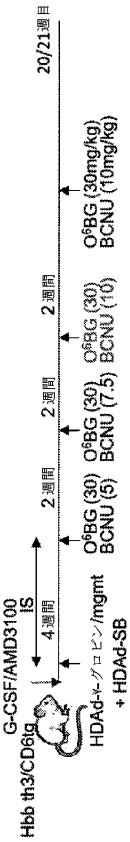
【図４７Ｂ】



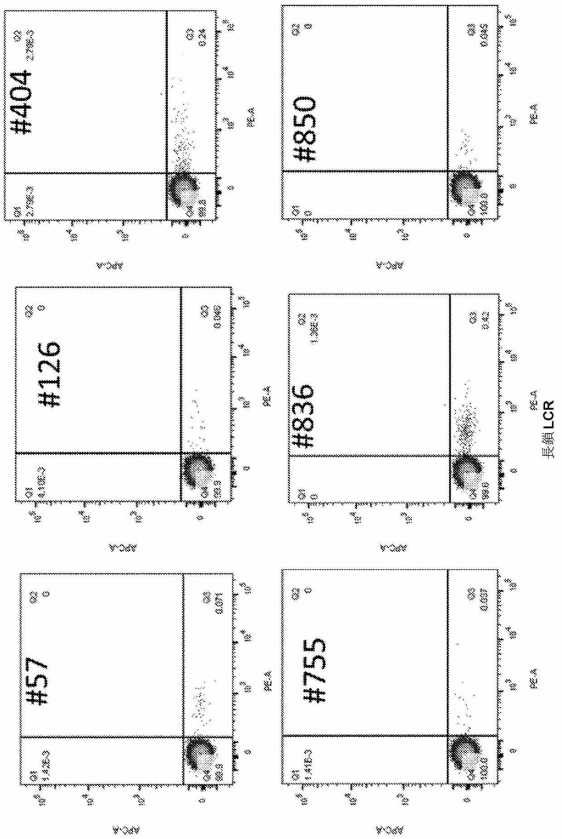

【図４８】




【図４９】

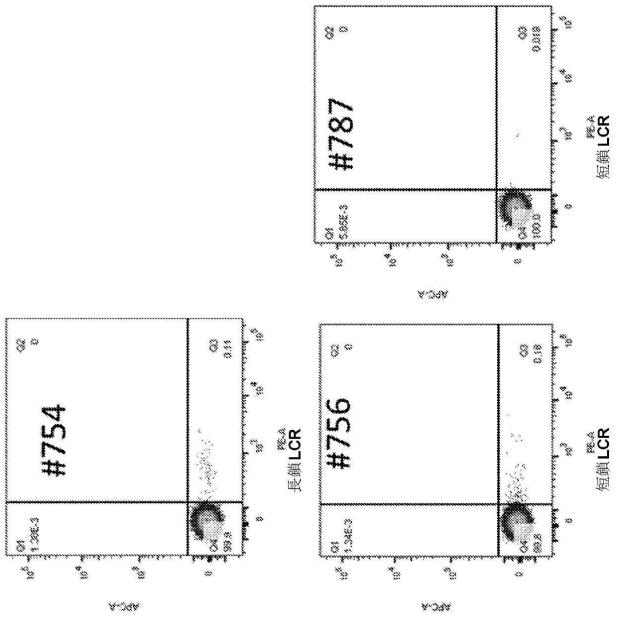



【図５０－１】

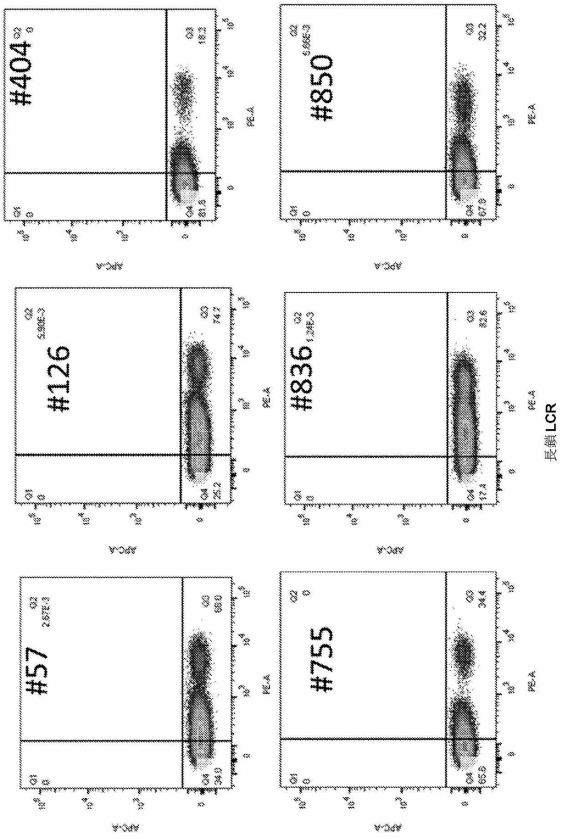


【図５０－２】

（続き）

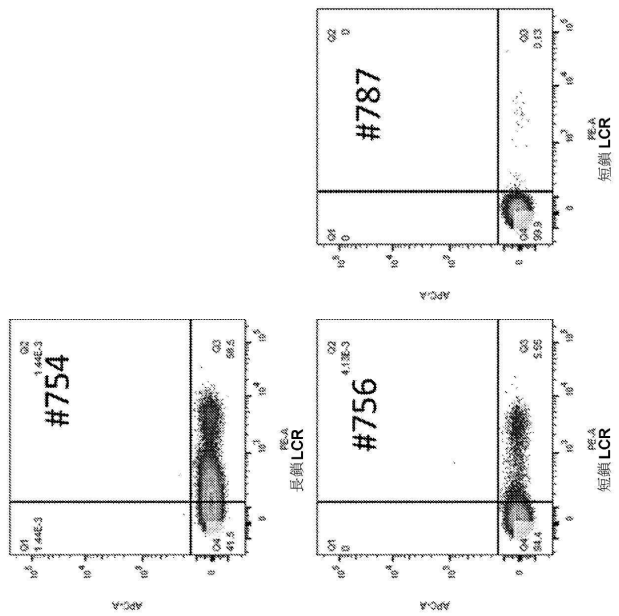



【図５１－１】

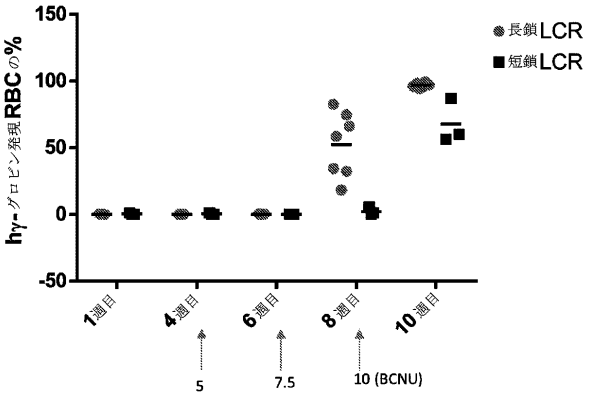



【図５１－２】

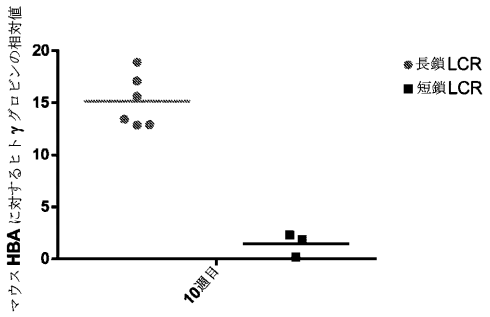
（続き）



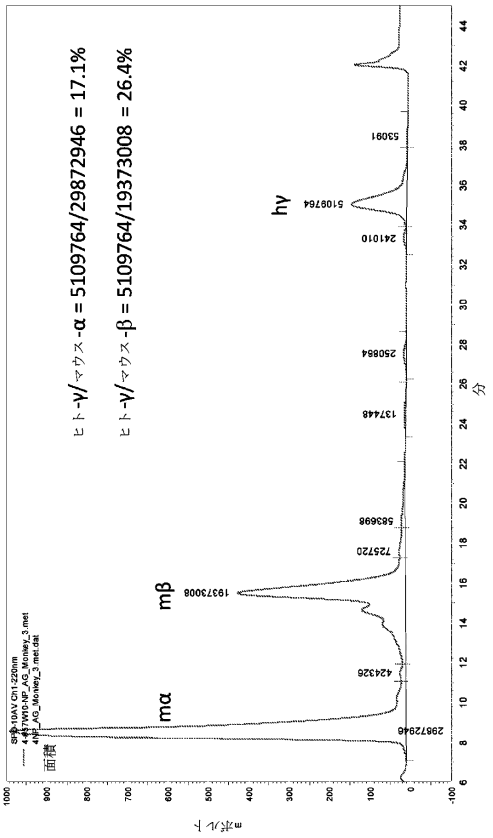

【図５２】



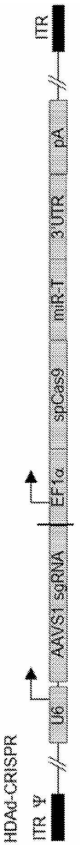
【図５３】



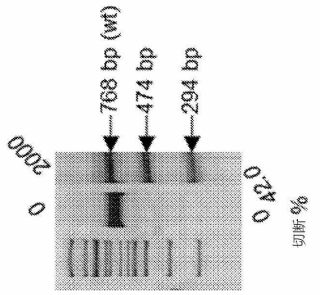

【図５４】



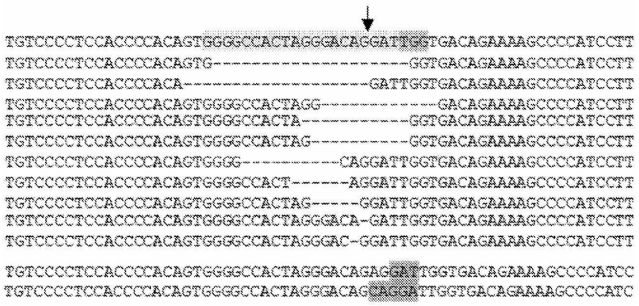

【図５５Ａ】




【図５５Ｂ】

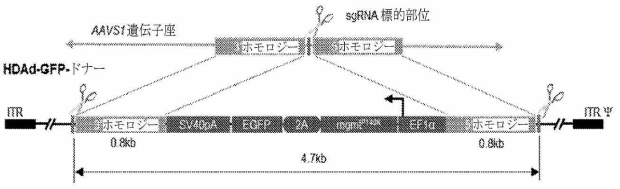


【図５５Ｃ】

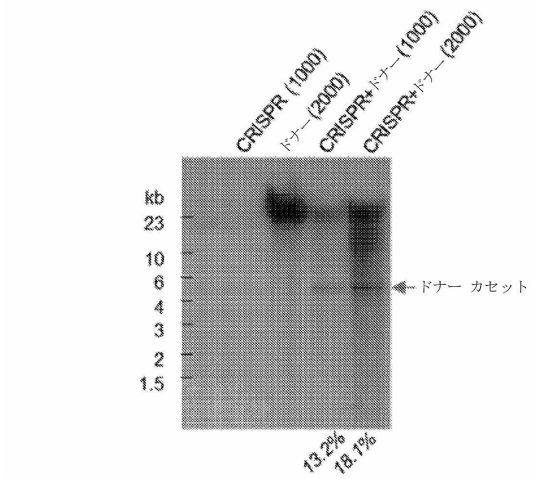



(配列番号6-18)

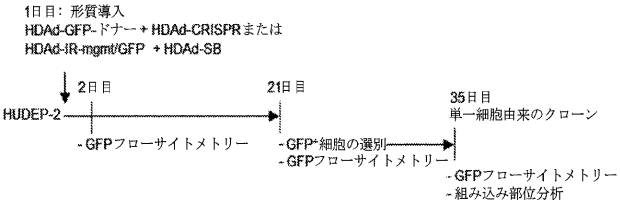
【図５５Ｄ】



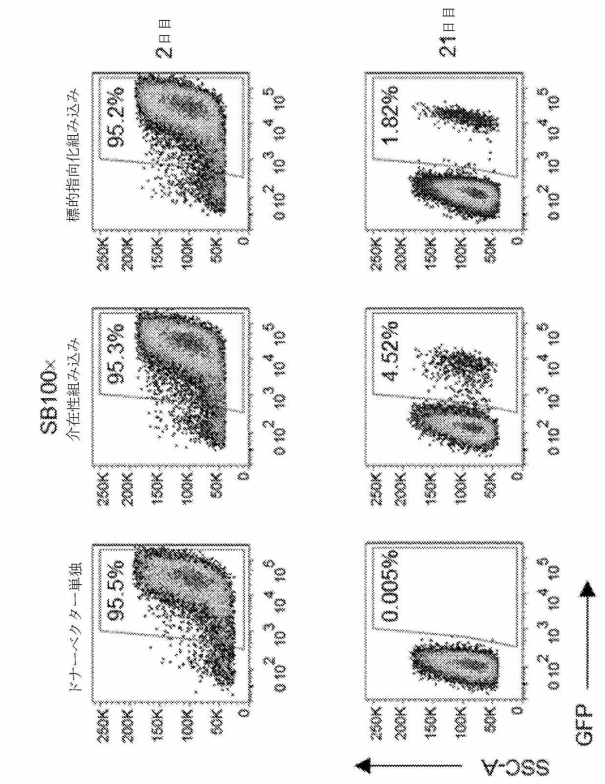

【図５５Ｅ】



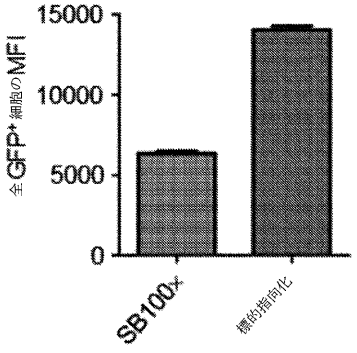

【図５６Ａ】



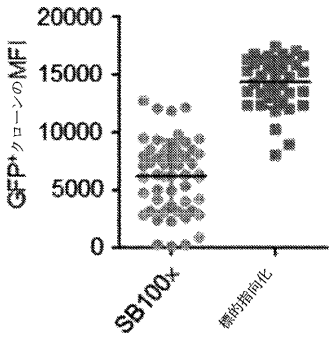
【図５６Ｂ】



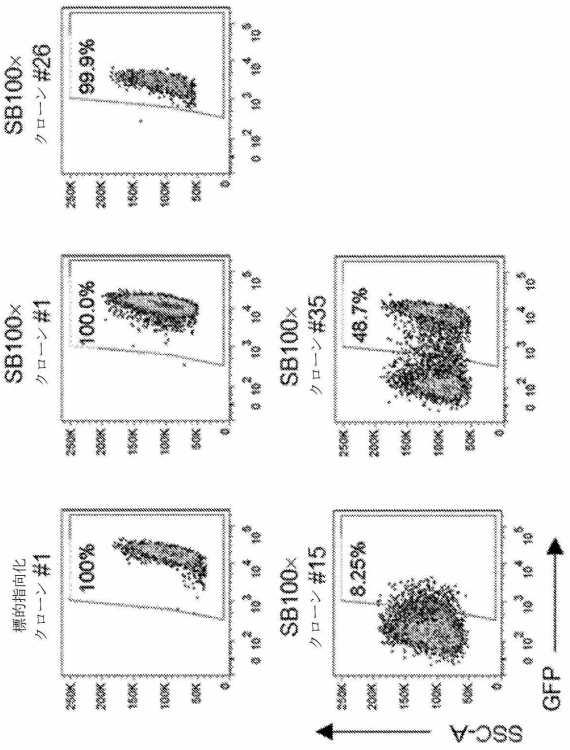

【図５６Ｃ】



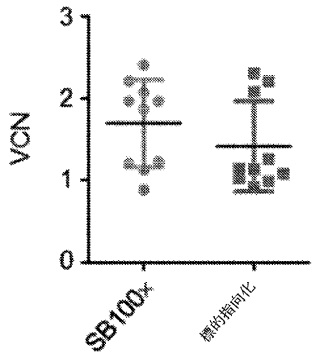

【図５６Ｄ】



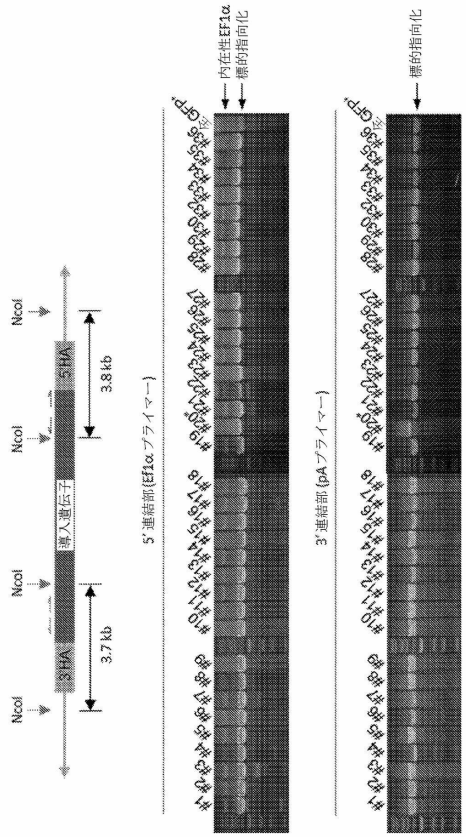

【図５６Ｅ】



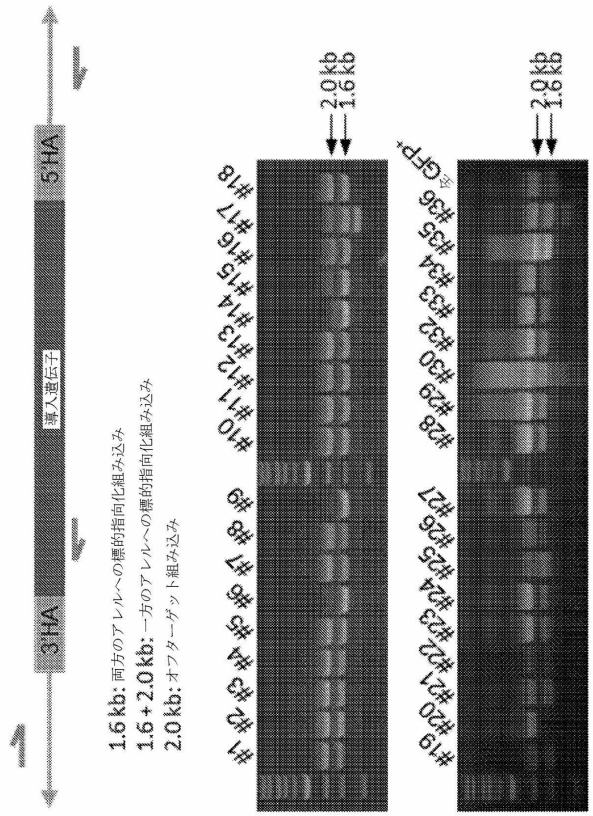
【図５６Ｆ】



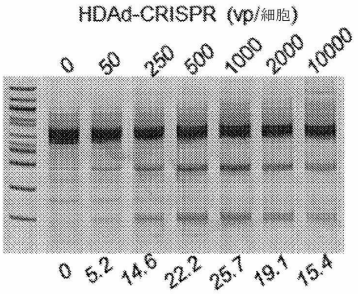

【図５７Ａ】



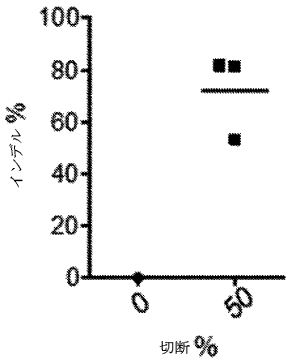

【図５７Ｂ】



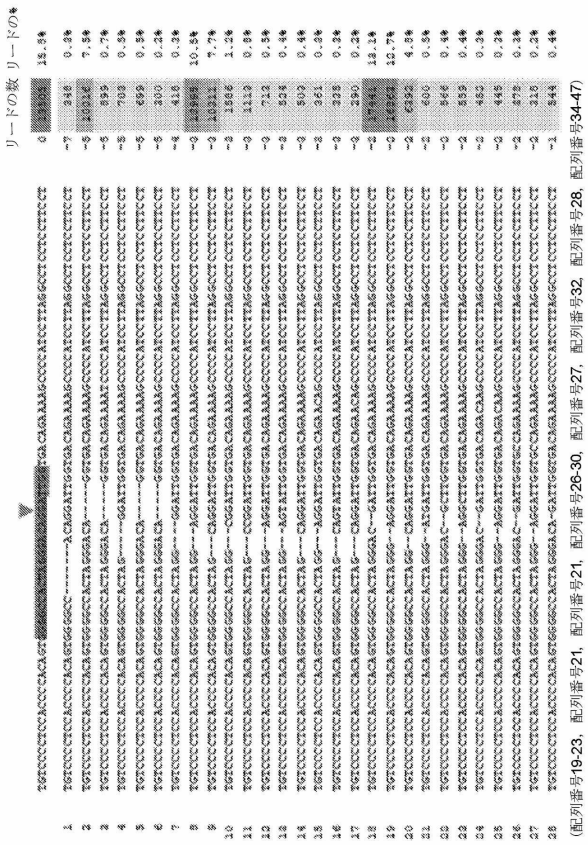

【図５８Ａ】



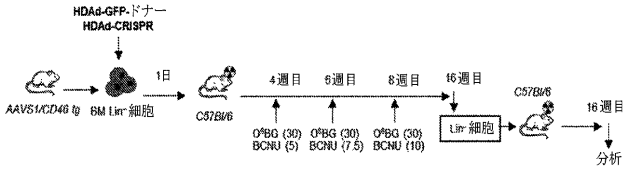
【図５８Ｂ】



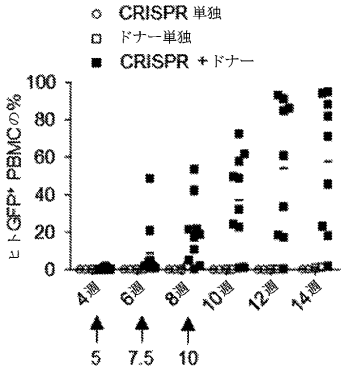

【図５８Ｃ】



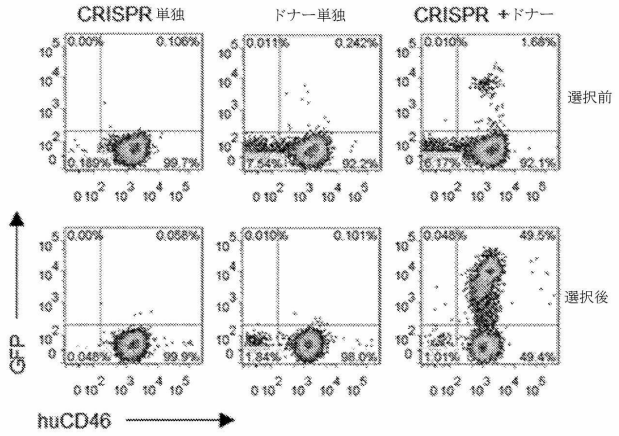

【図５９Ａ】



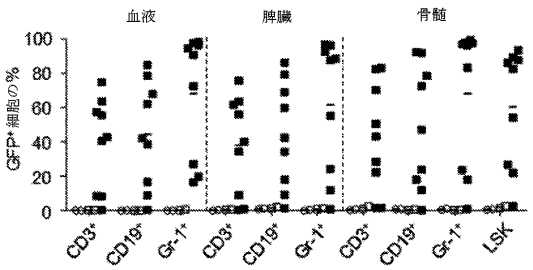

【図５９Ｂ】



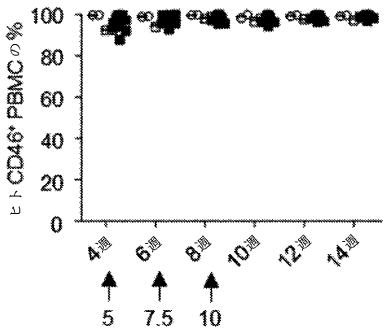
【図５９Ｃ】



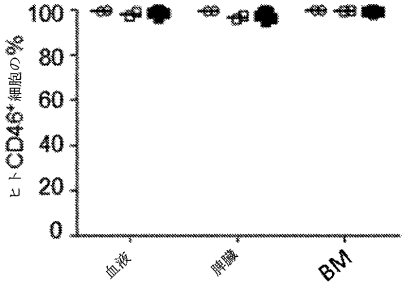

【図５９Ｄ】



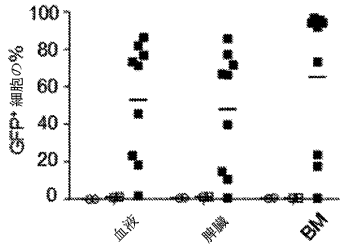

【図６０Ａ】



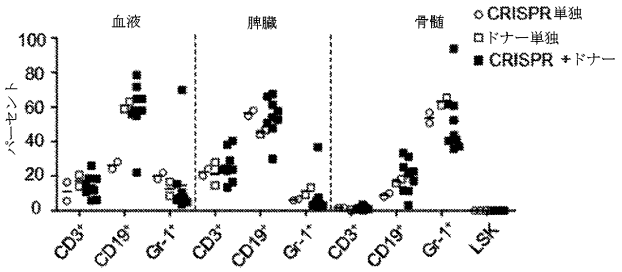

【図６０Ｂ】



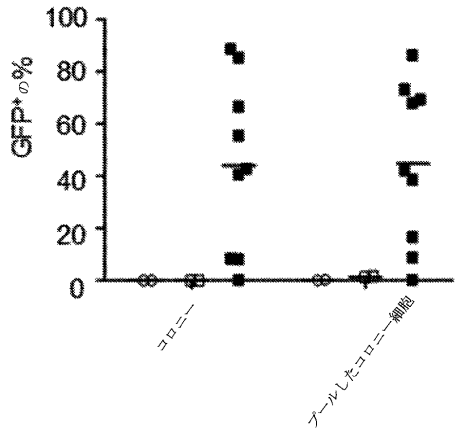

【図６０Ｃ】



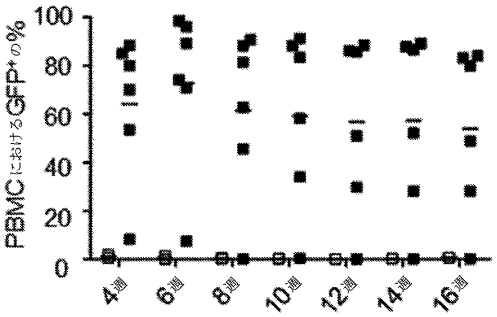

【図６０Ｄ】



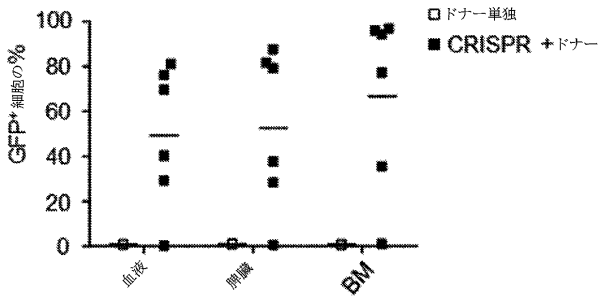
【図６０Ｅ】



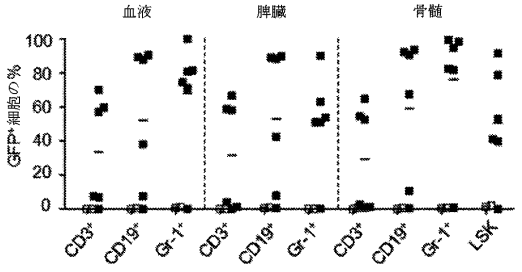

【図６１Ａ】



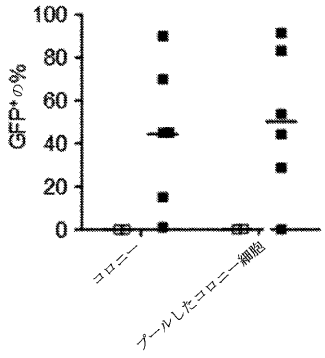

【図６１Ｂ】



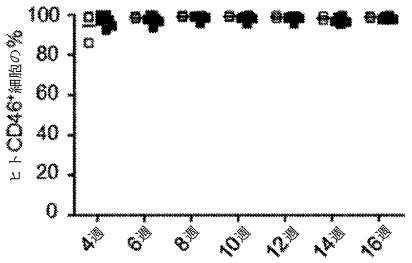

【図６１Ｃ】



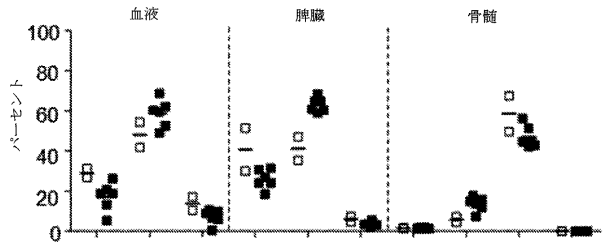

【図６１Ｄ】



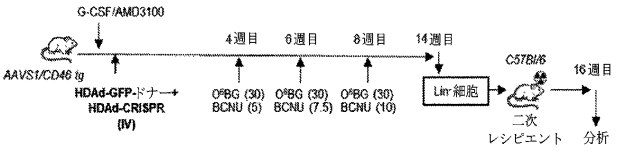

【図６１Ｅ】



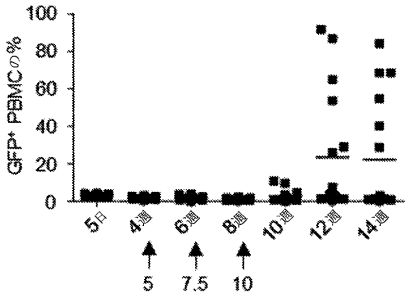
【図６１Ｆ】



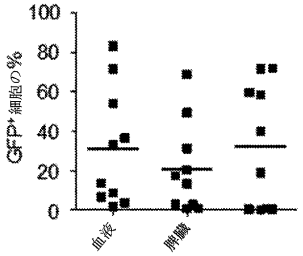

【図６２Ａ】



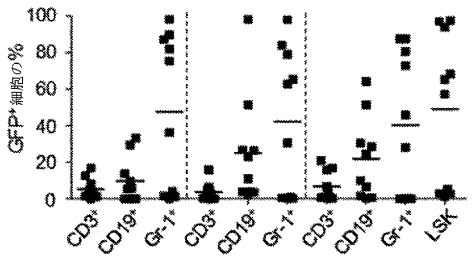

【図６２Ｂ】



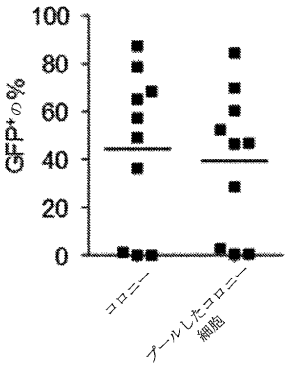

【図６２Ｃ】



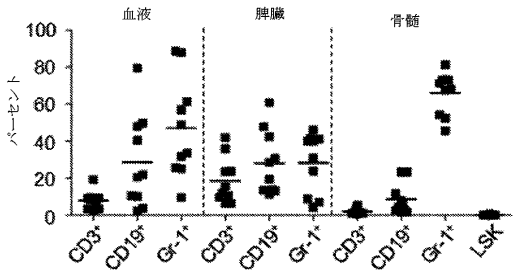

【図６２Ｄ】



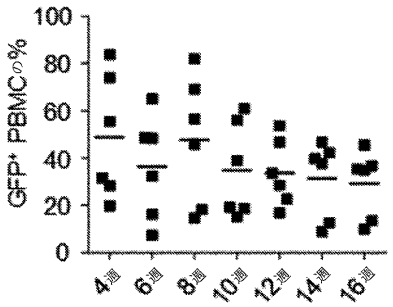

【図６２Ｅ】



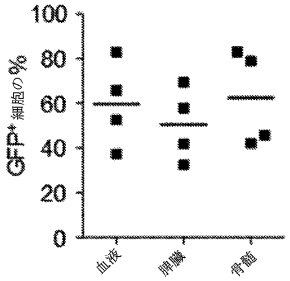
【図６２Ｆ】



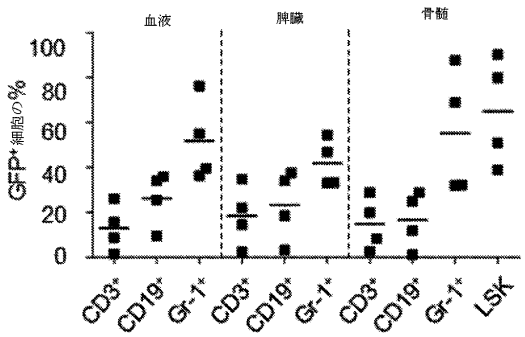

【図６３Ａ】



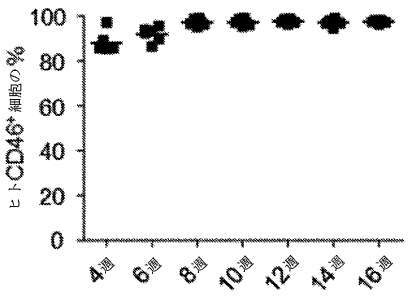

【図６３Ｂ】



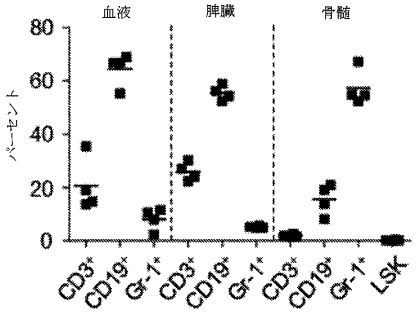

【図６３Ｃ】



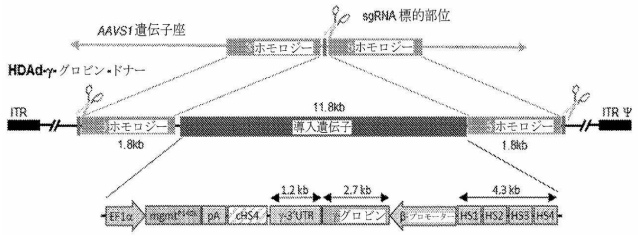

【図６３Ｄ】



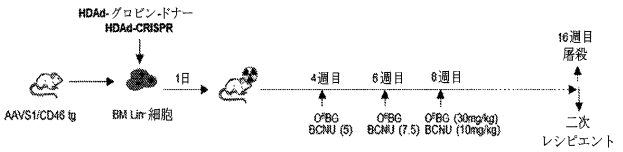

【図６３Ｅ】



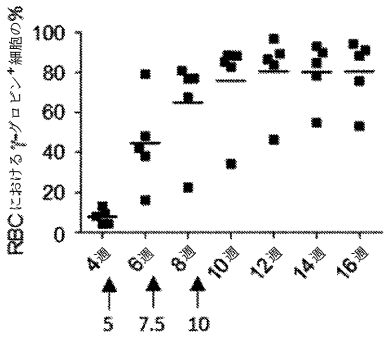
【図６４Ａ】



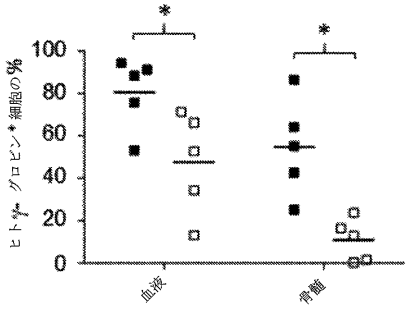

【図６４Ｂ】



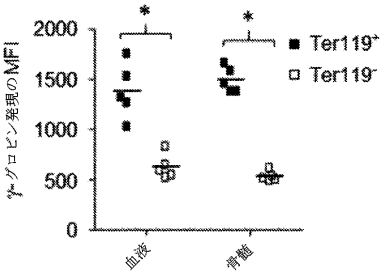

【図６４Ｃ】



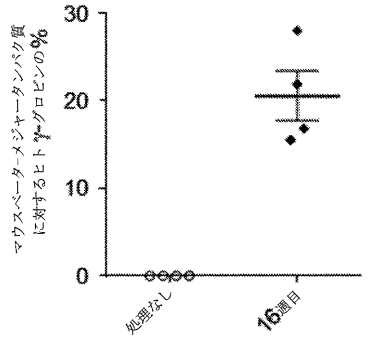

【図６４Ｄ】



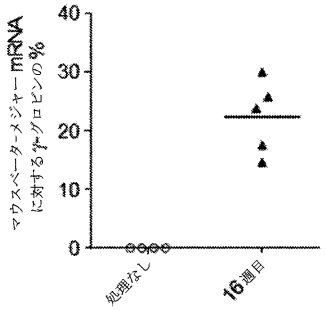

【図６４Ｅ】



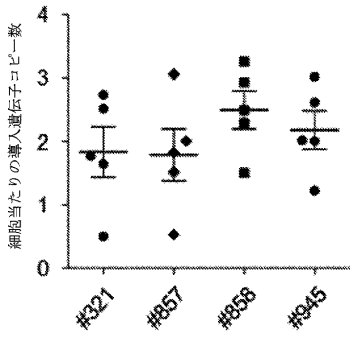

【図６４Ｆ】



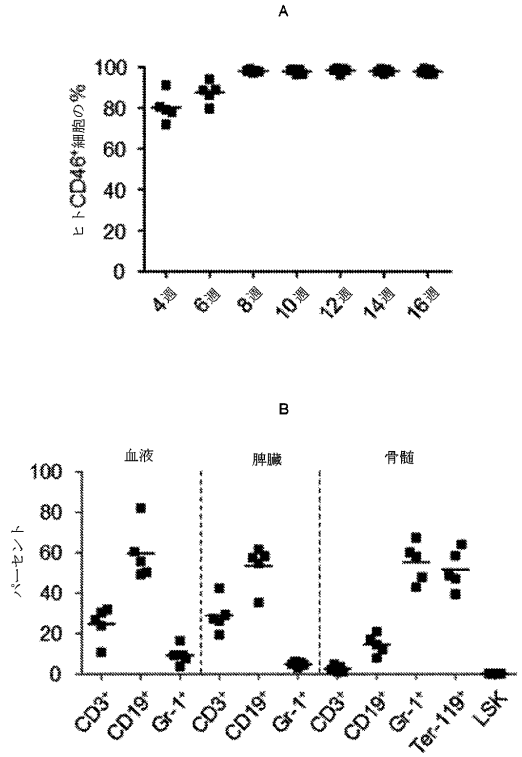
【図６４Ｇ】



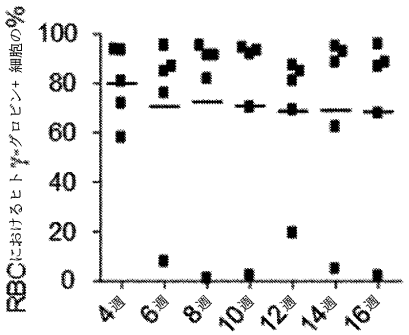

【図６４Ｈ】



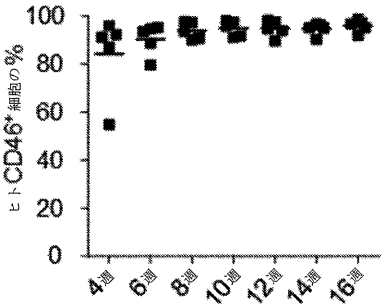

【図６５】



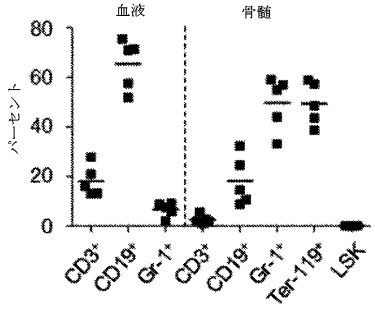

【図６６Ａ】



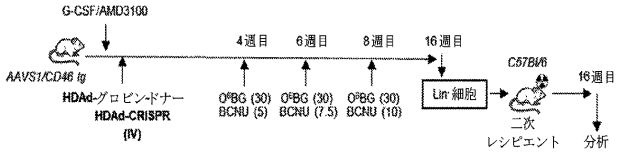
【図６６Ｂ】



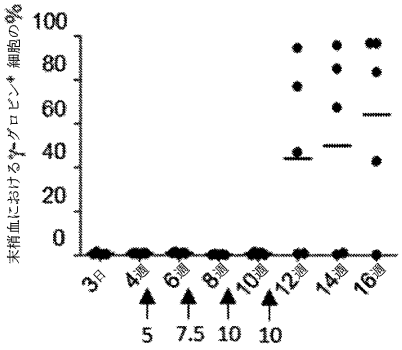

【図６６Ｃ】



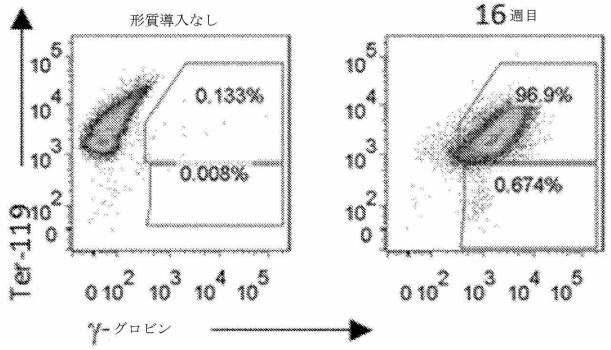

【図６７Ａ】



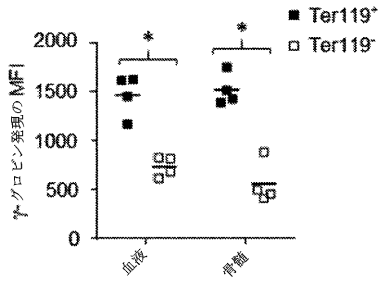

【図６７Ｂ】



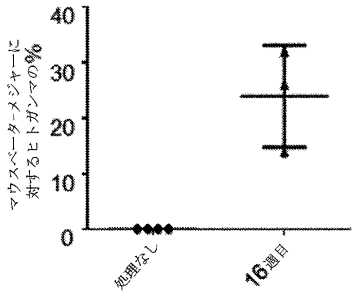

【図６７Ｃ】



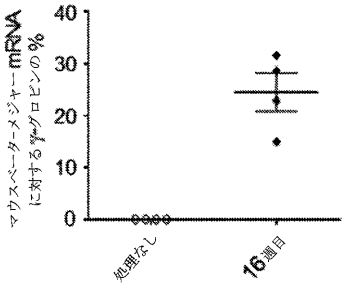

【図６７Ｄ】



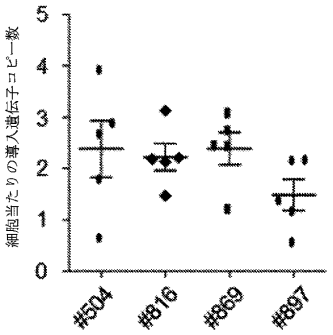
【図６７Ｅ】



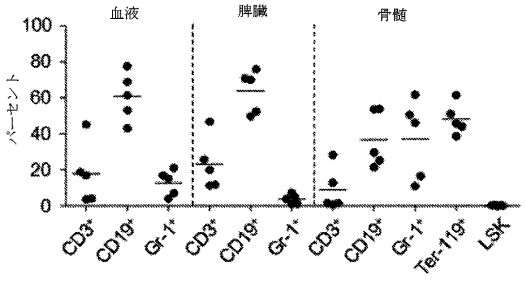

【図６７Ｆ】



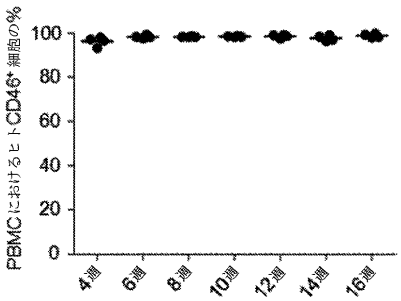

【図６７Ｇ】



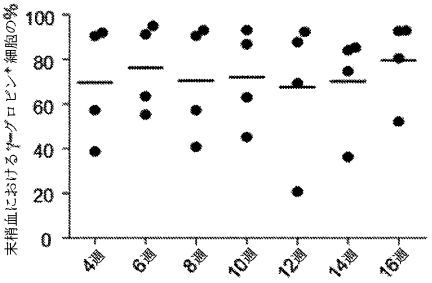

【図６７Ｈ】



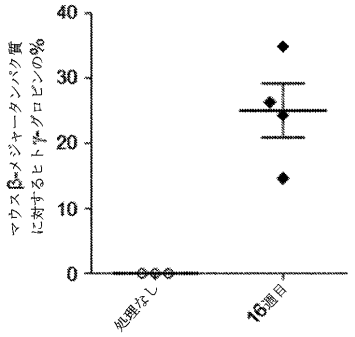

【図６８Ａ】



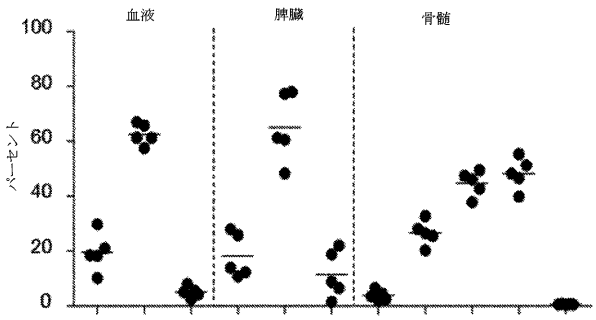

【図６８Ｂ】



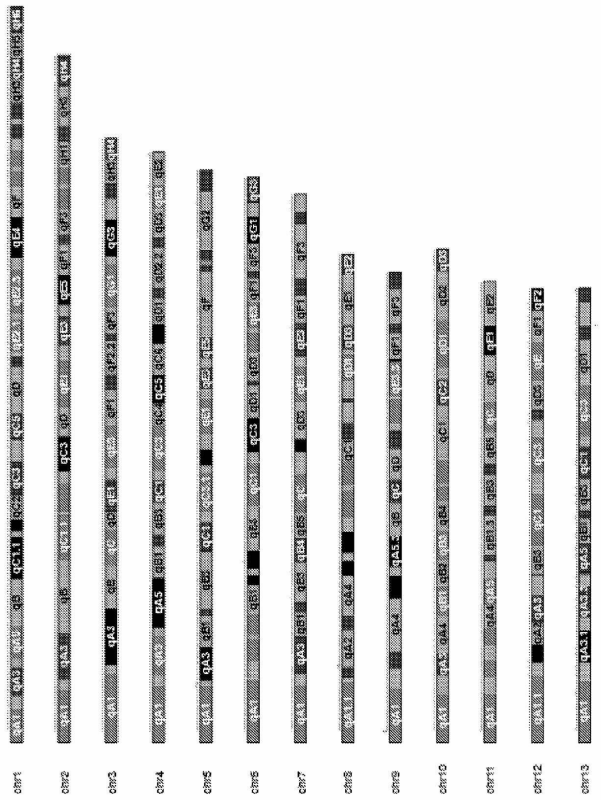
【図６８Ｃ】



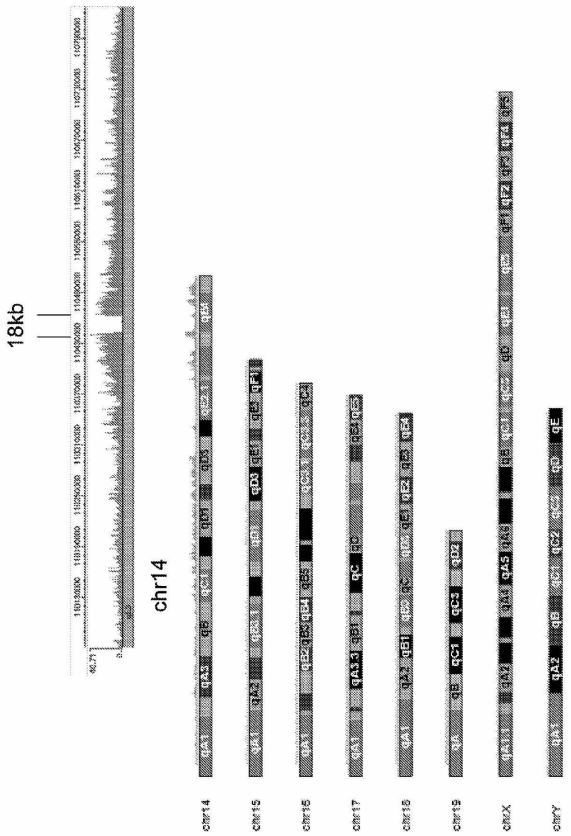

【図６８Ｄ】



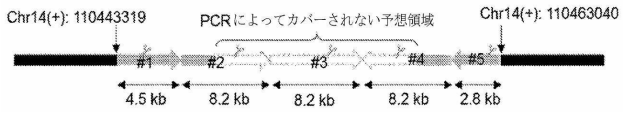

【図６９Ａ】



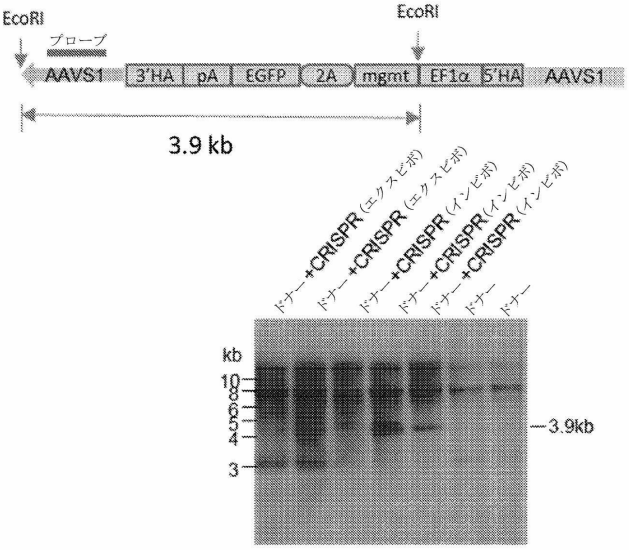

【図６９Ｂ】



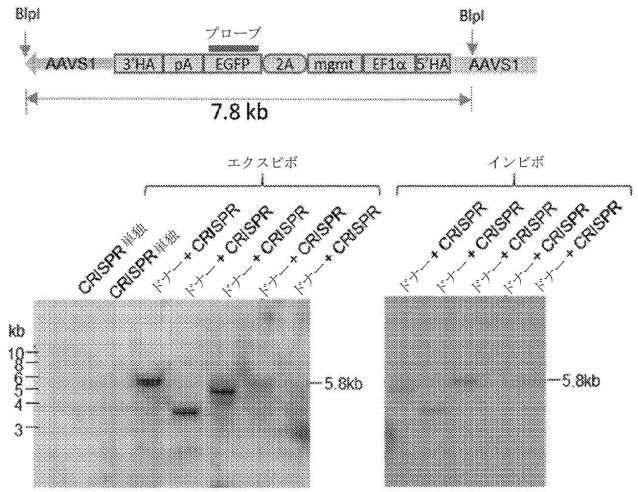
【図７０】



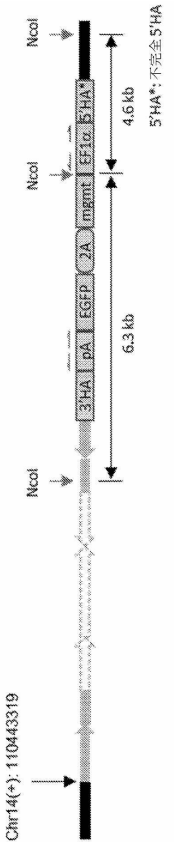

【図７１Ａ】



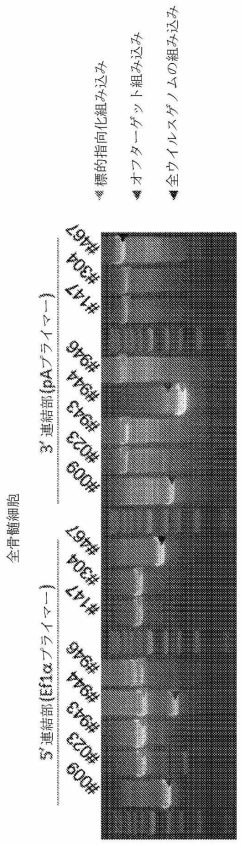

【図７１Ｂ】



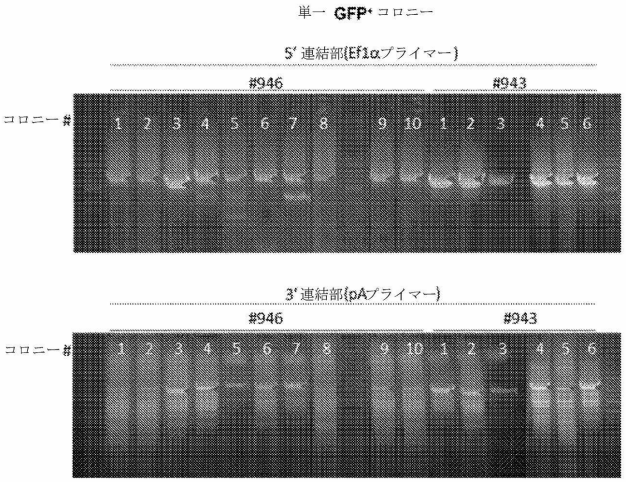

【図７２Ａ】



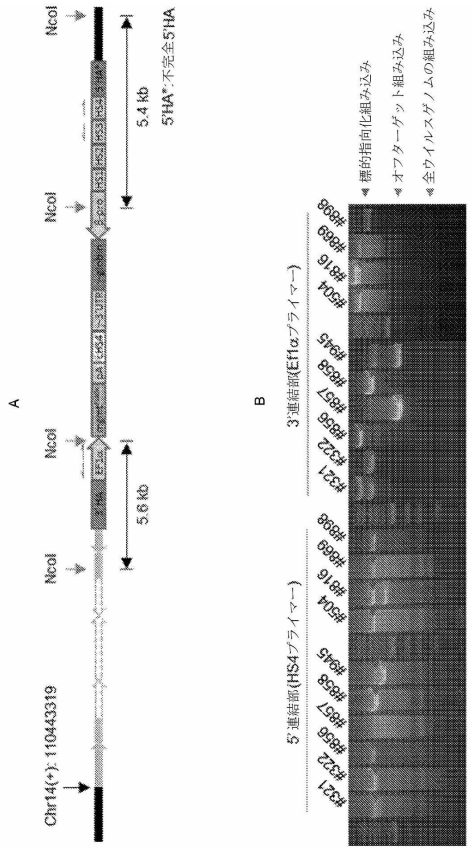
【図７２Ｂ】



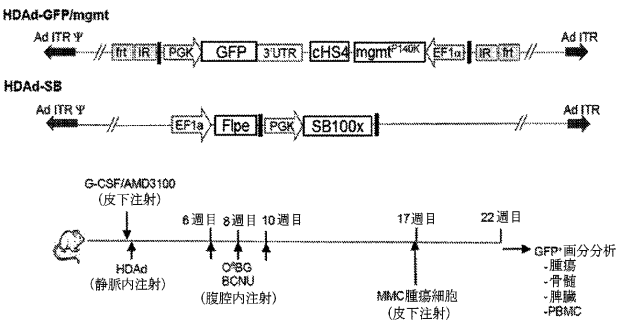

【図７２Ｃ】



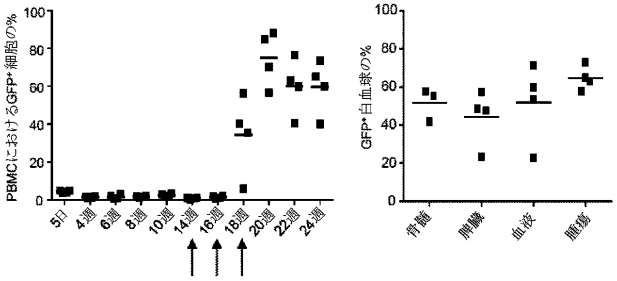

【図７３】



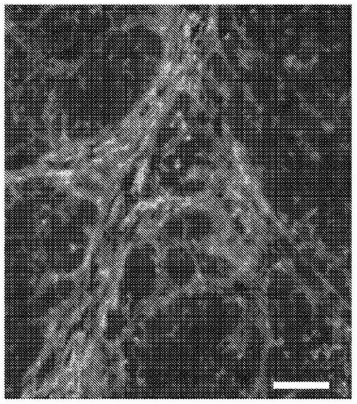

【図７４Ａ】



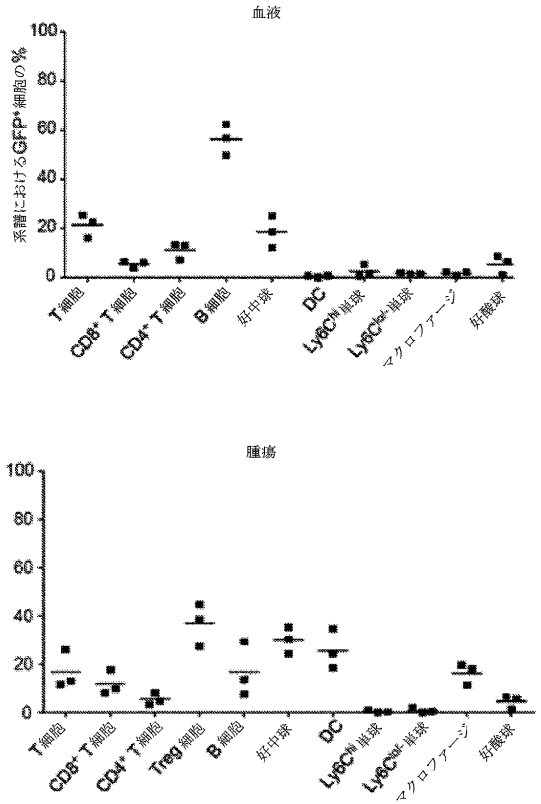
【図７４Ｂ】



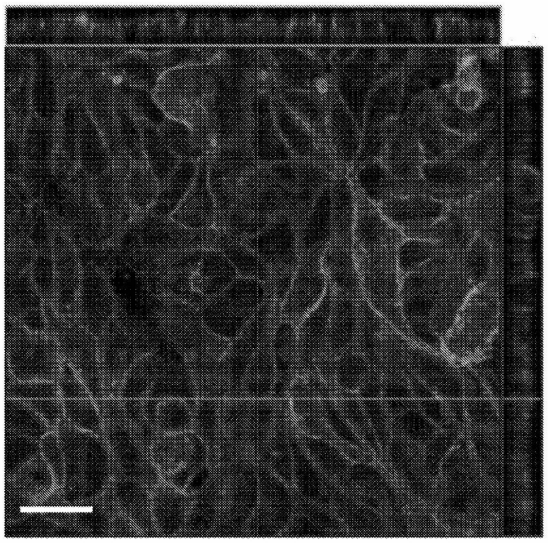

【図７４Ｃ】



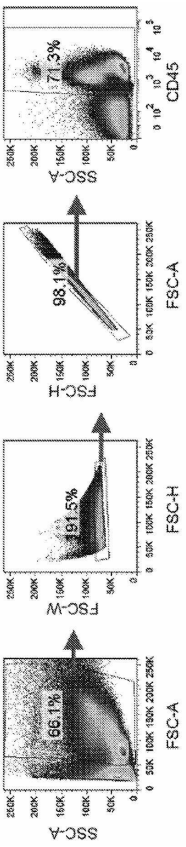

【図７４Ｄ】




【図７５】

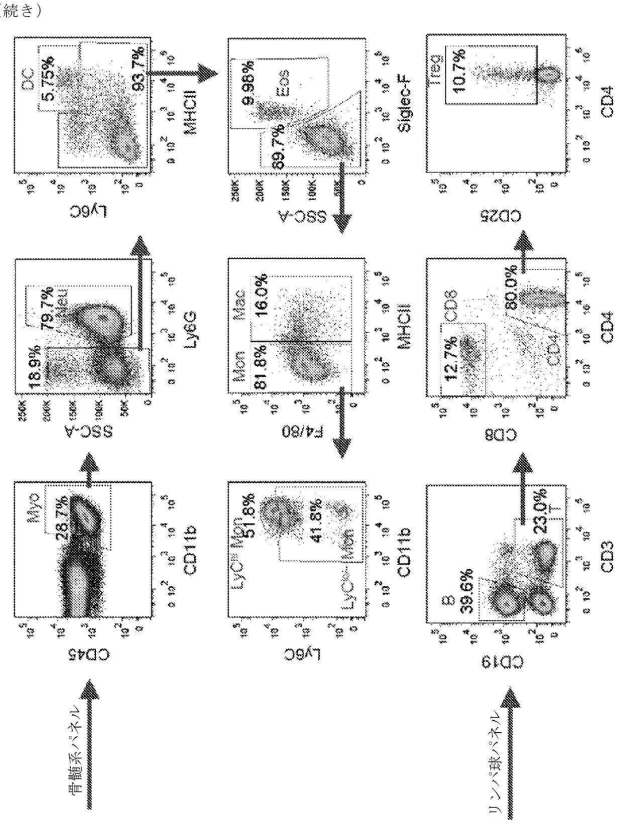


【図７６－１】

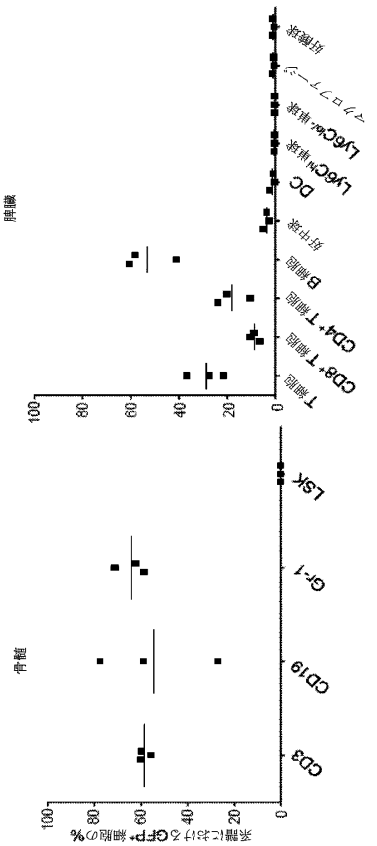



【図７６－２】

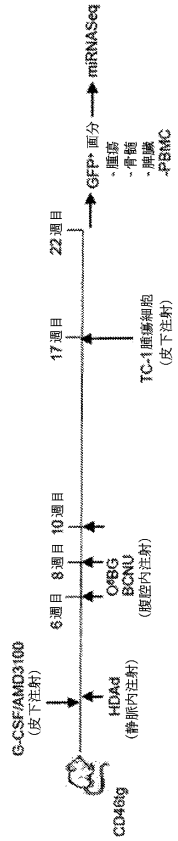
（続き）



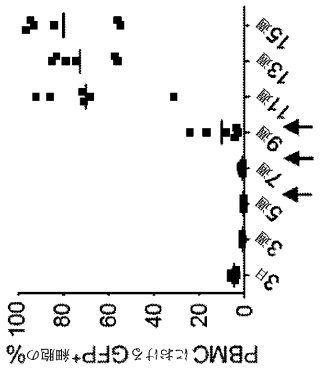

【図７７】



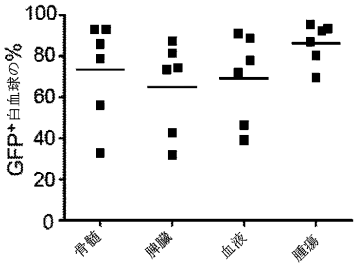

【図７８Ａ】



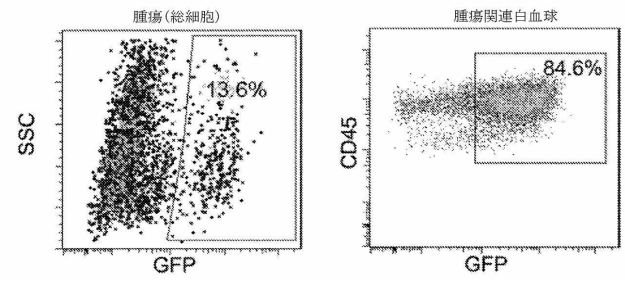
【図７８Ｂ】



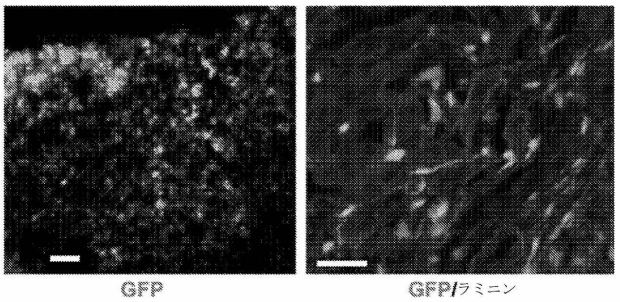

【図７８Ｃ】



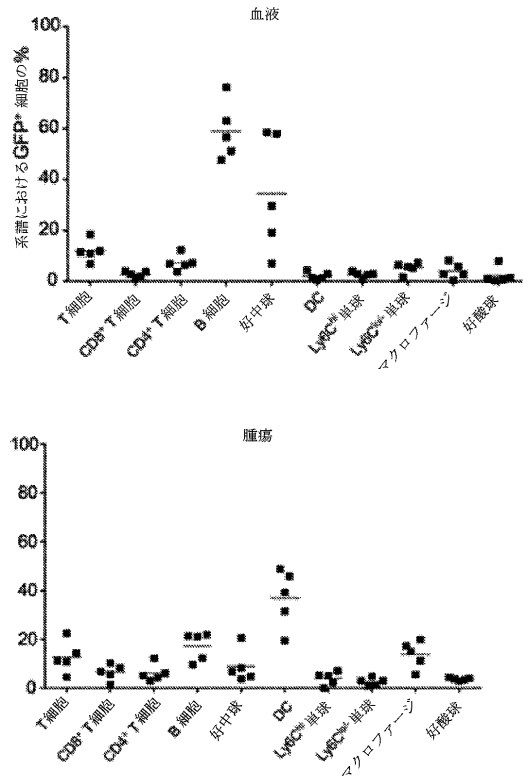

【図７８Ｄ】



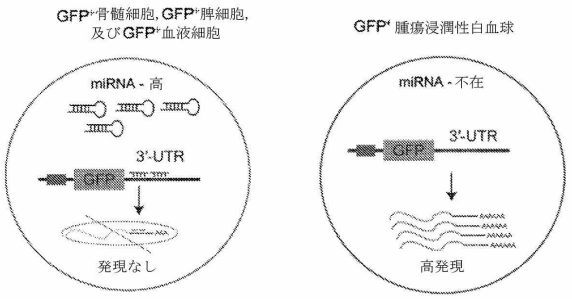

【図７８Ｅ】



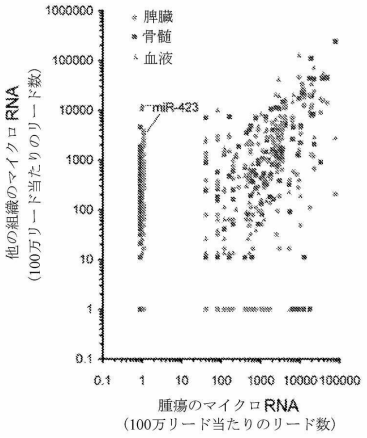
【図７８Ｆ】



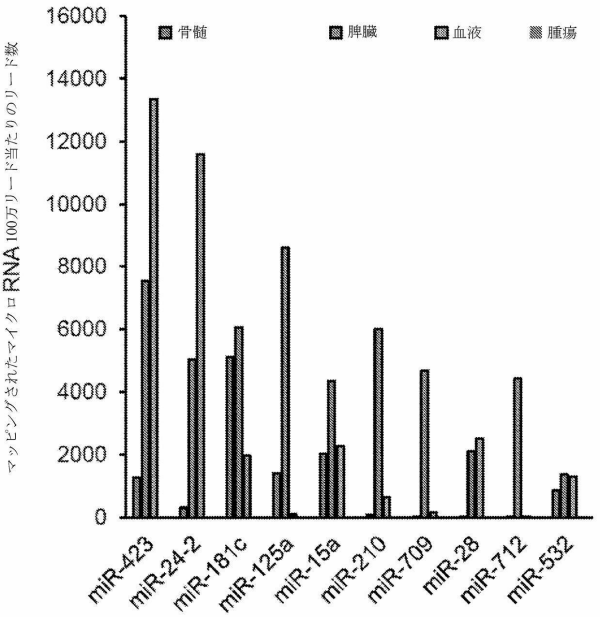

【図７９Ａ】



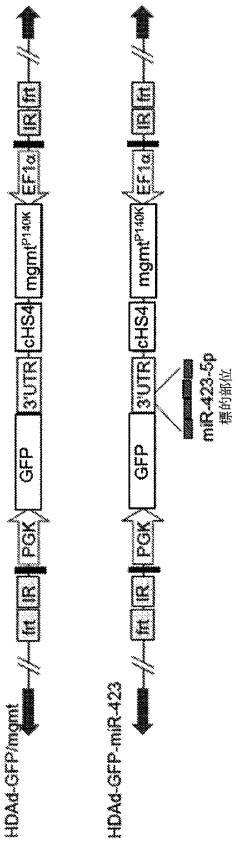

【図７９Ｂ】



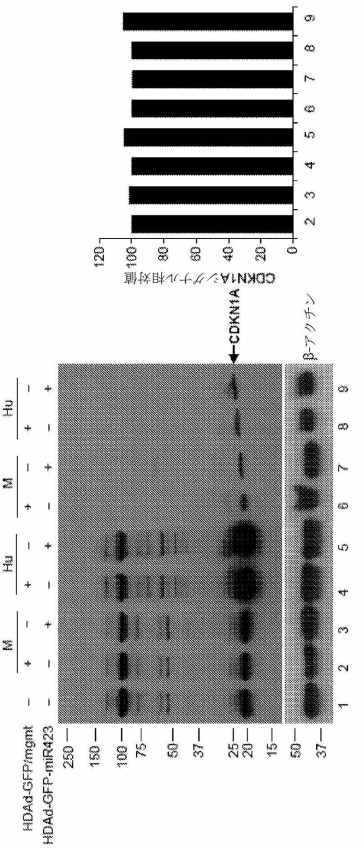

【図７９Ｃ】



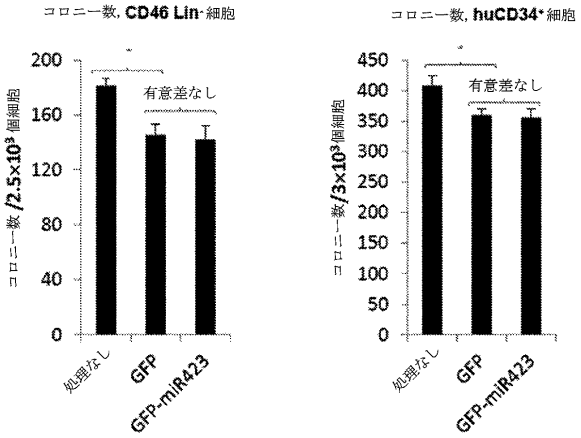
【図８０Ａ】



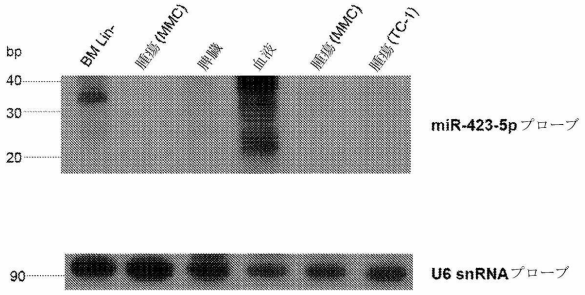

【図８０Ｂ】



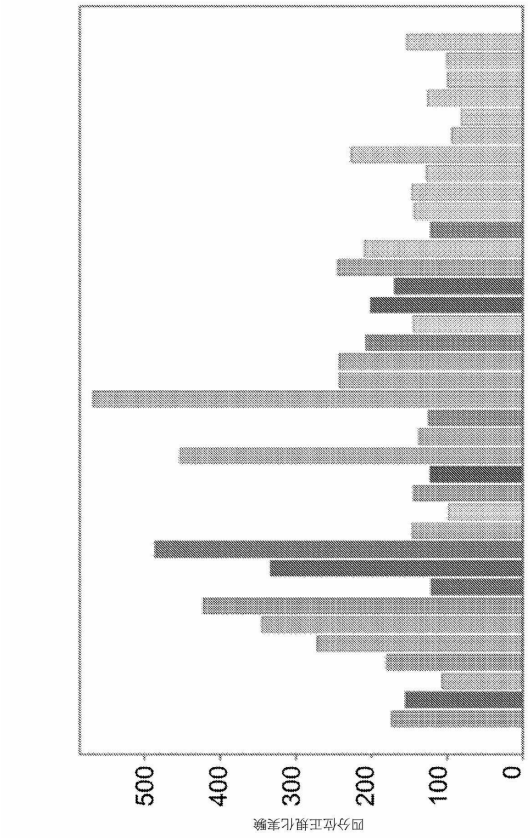

【図８０Ｃ】



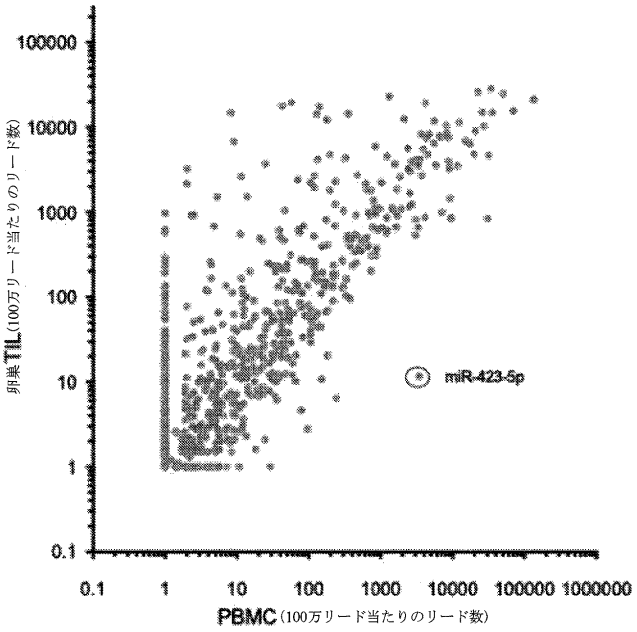

【図８１】



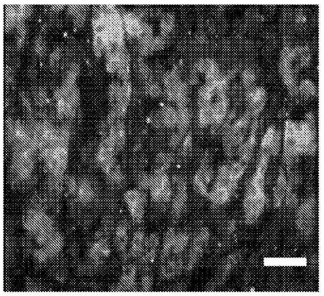
【図８２Ａ】



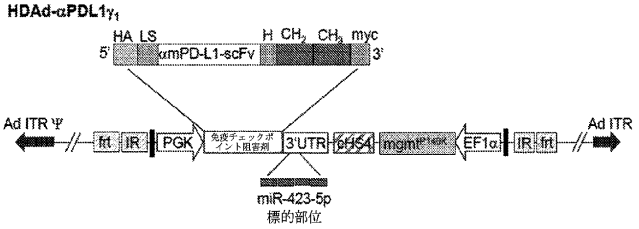

【図８２Ｂ】



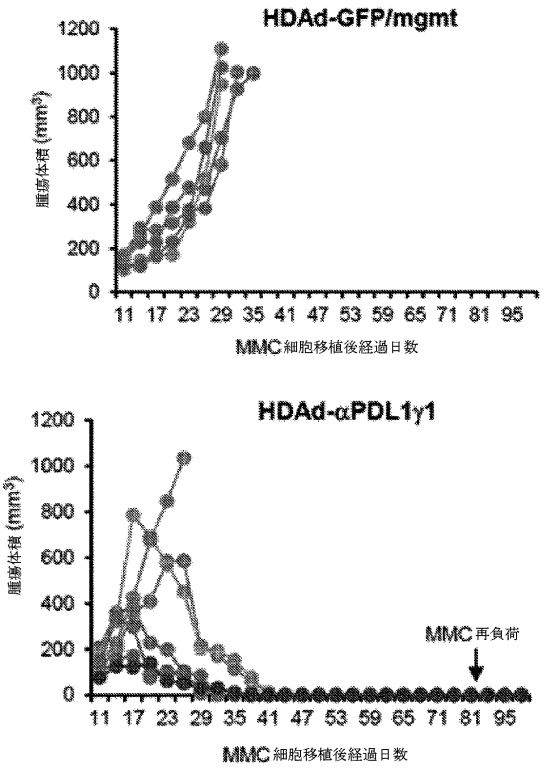

【図８３Ａ】



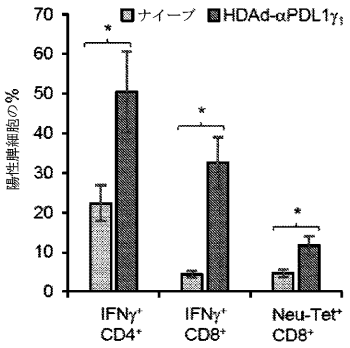
【図８３Ｂ】



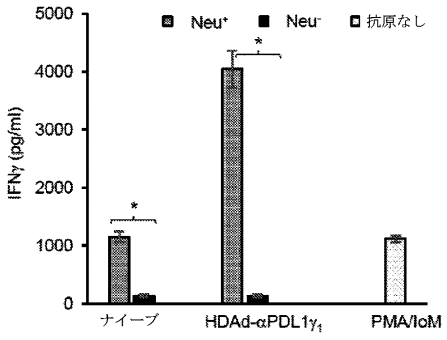
【図８３Ｃ】



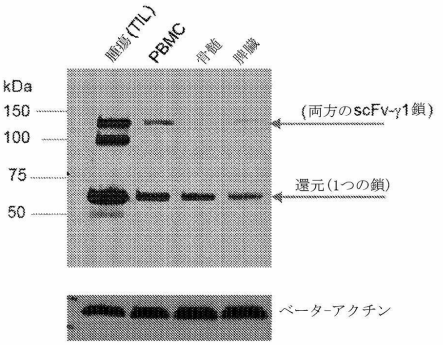

【図８３Ｄ】

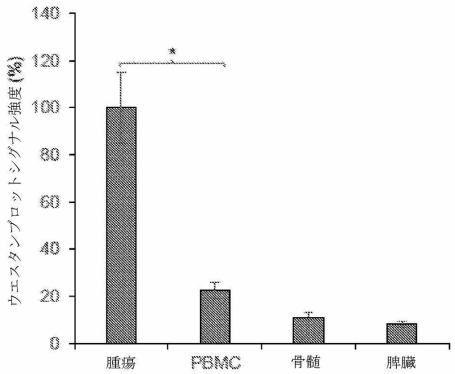



【図８３Ｅ】

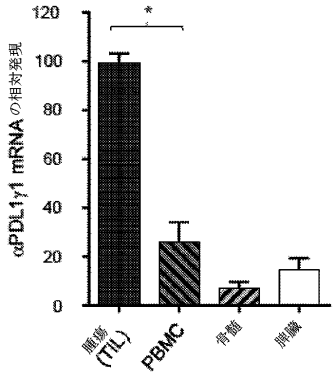



【図８４Ａ】

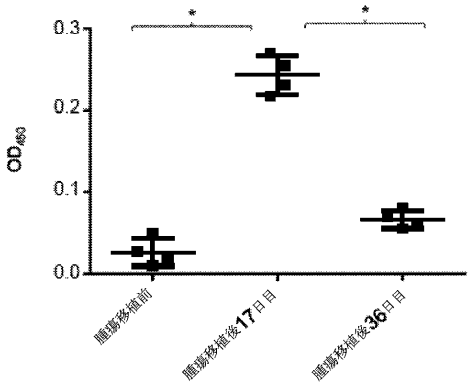


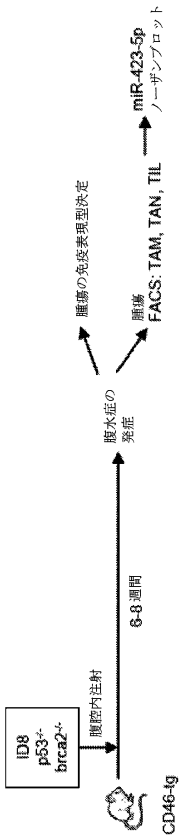
【図８４Ｂ】



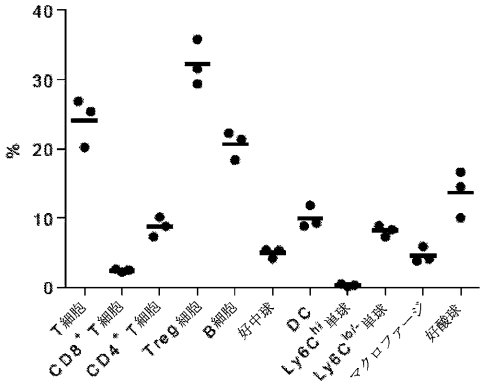

【図８４Ｃ】



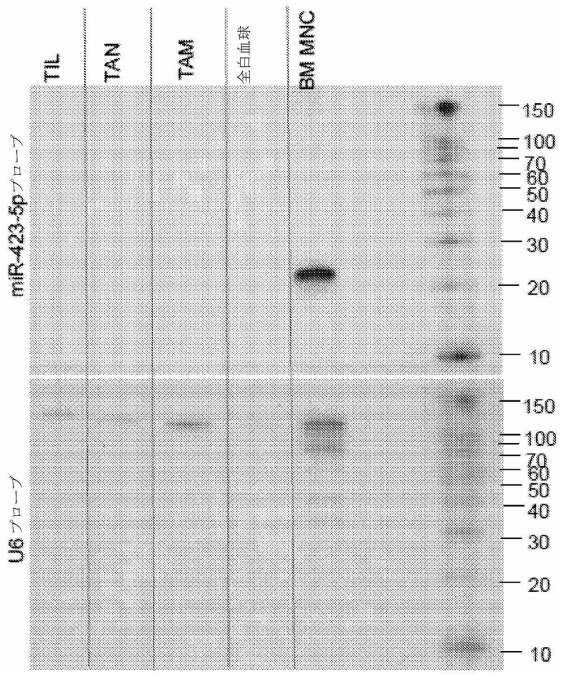

【図８５Ａ】



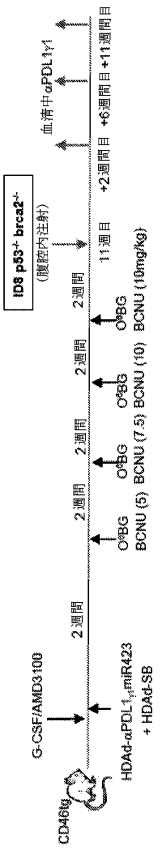

【図８５Ｂ】



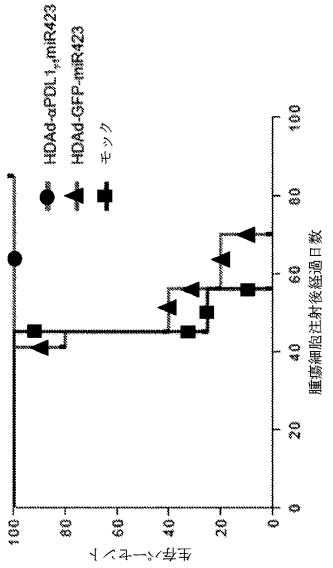
【図８５Ｃ】



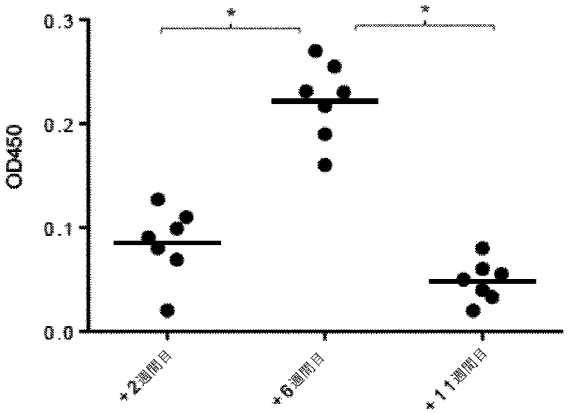

【図８５Ｄ】



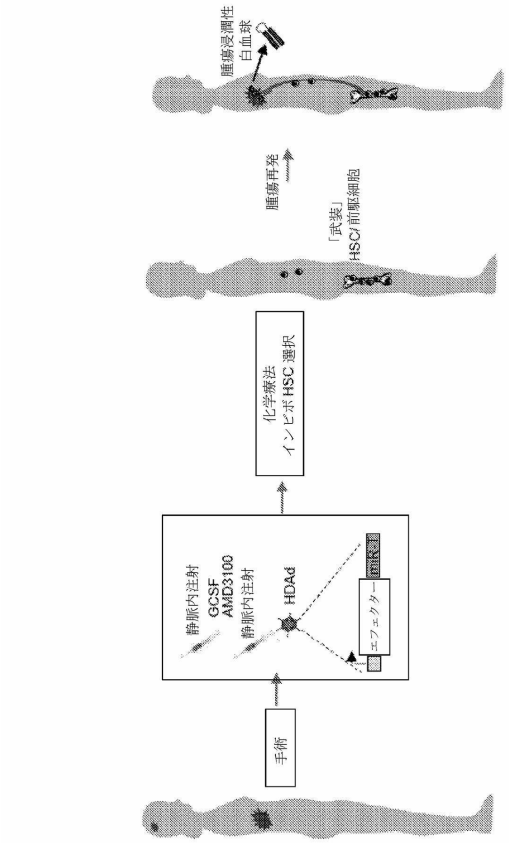

【図８５Ｅ】



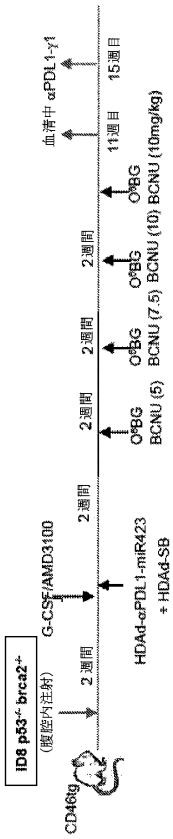

【図８５Ｆ】



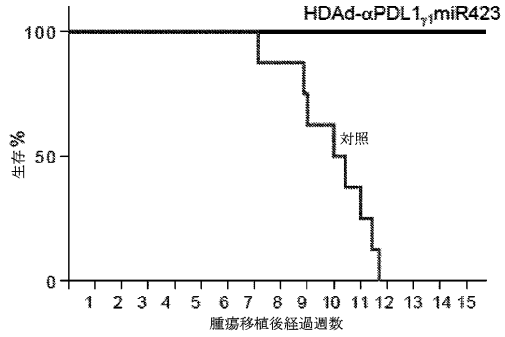
【図８６Ａ】



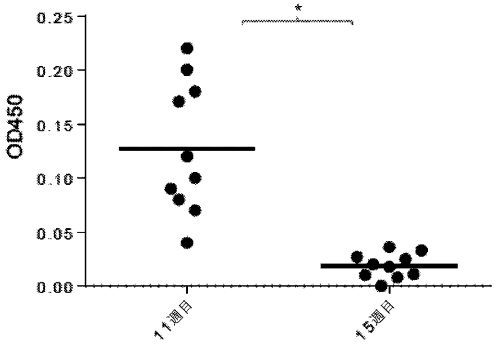

【図８６Ｂ】



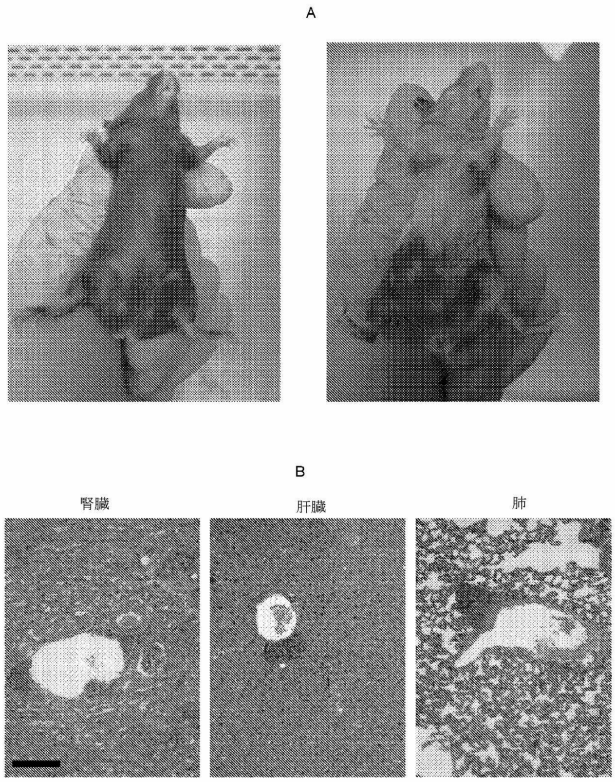

【図８６Ｃ】



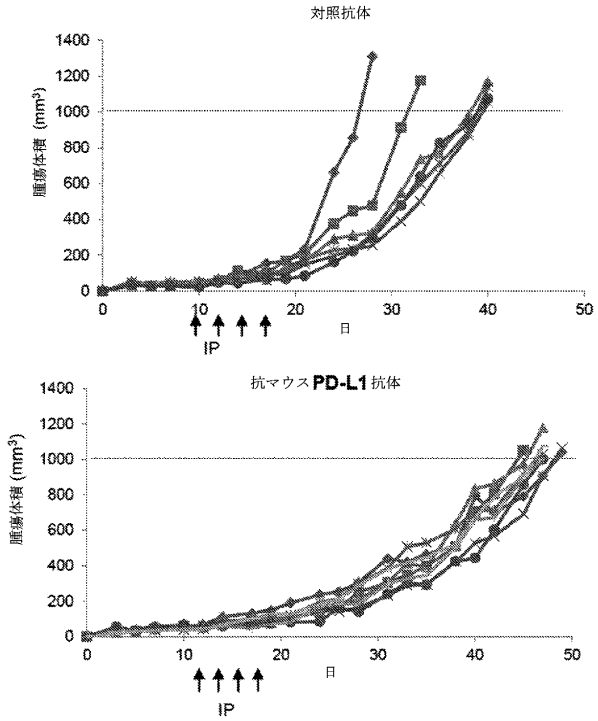

【図８６Ｄ】



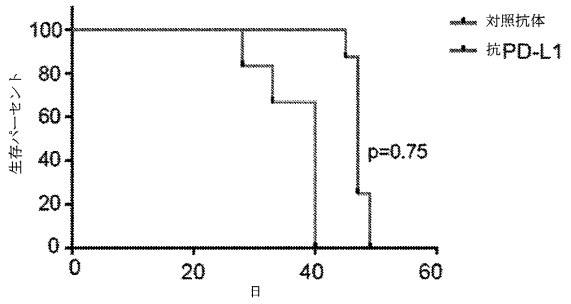
【図８７】



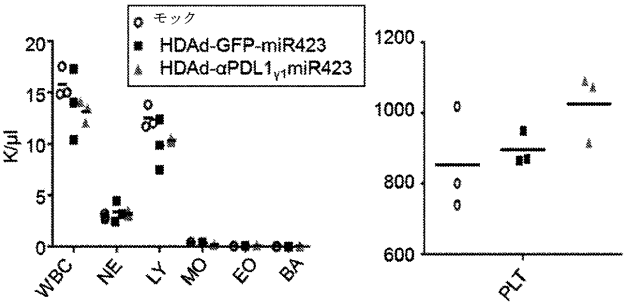

【図８８Ａ】



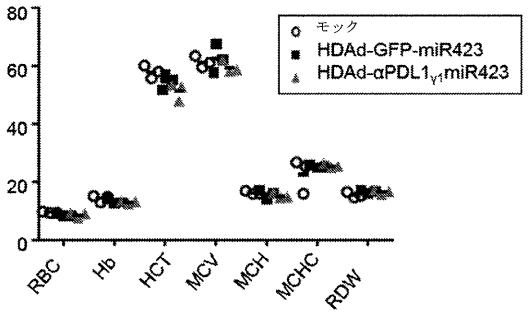

【図８８Ｂ】



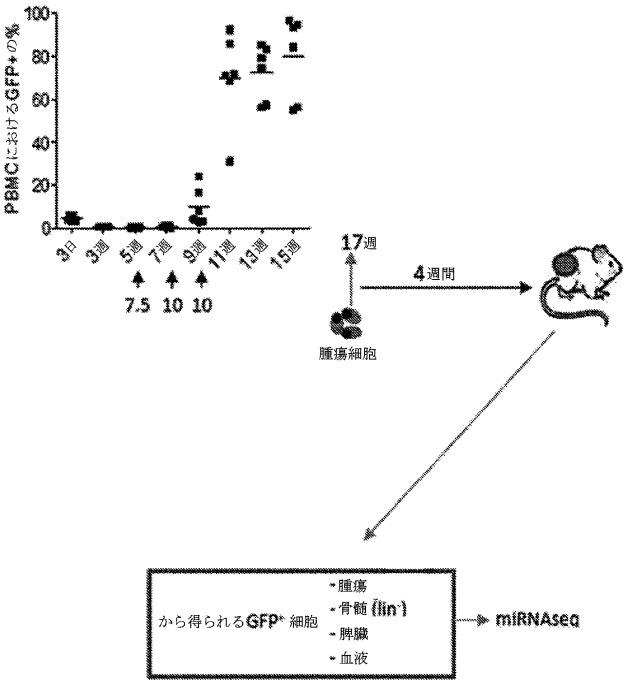

【図８８Ｃ】



【図８８Ｄ】

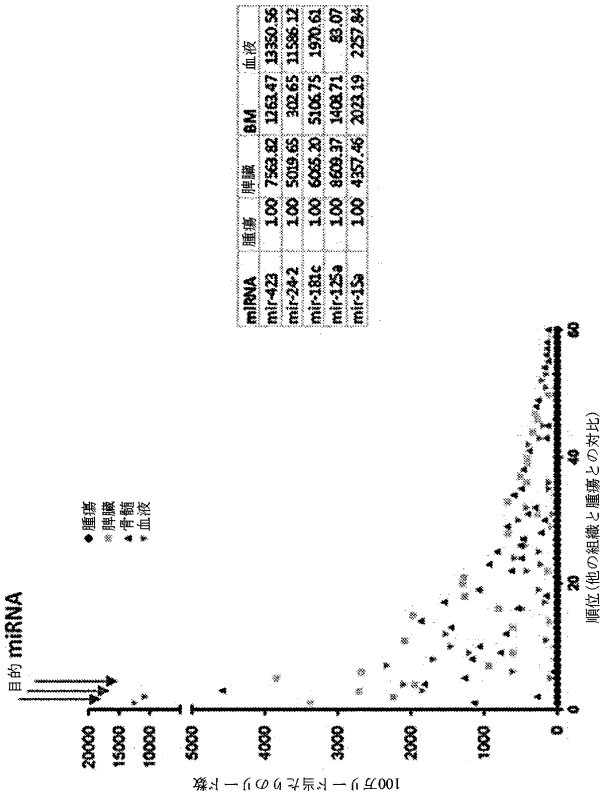



【図８８Ｅ－１】




【図８８Ｅ－２】

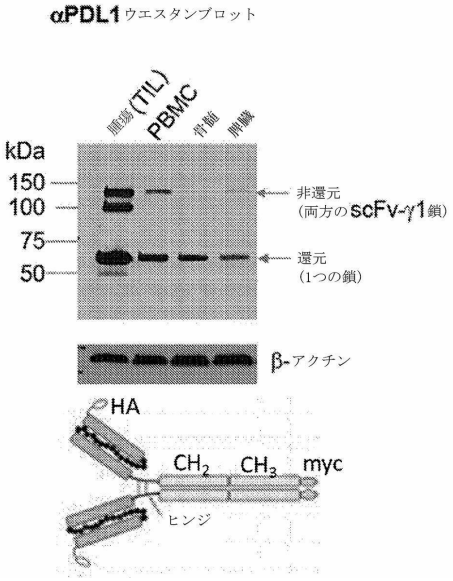
（続き）



| miRNA | 腫瘍 | 脾臓 | BM | 血液 |
|---|---|---|---|---|
| miR-423 | 1.00 | 7563.82 | 1263.47 | 13350.56 |
| miR-24-2 | 1.00 | 5019.65 | 302.65 | 11586.12 |
| miR-181c | 1.00 | 6065.20 | 5106.75 | 1970.61 |
| miR-125a | 1.00 | 8609.37 | 1408.71 | 83.07 |
| miR-15a | 1.00 | 4457.46 | 2023.19 | 2257.84 |

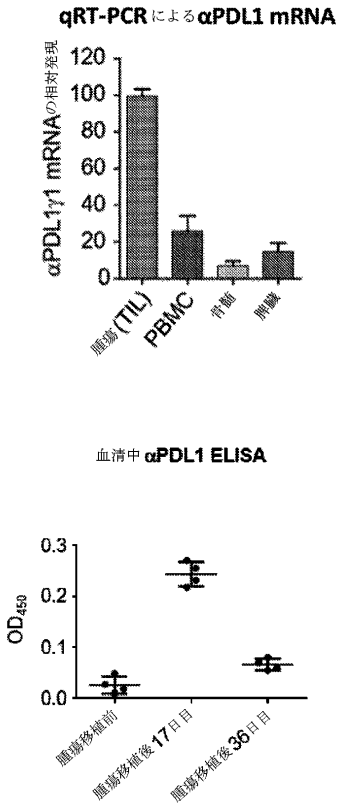


【図８８Ｆ－１】

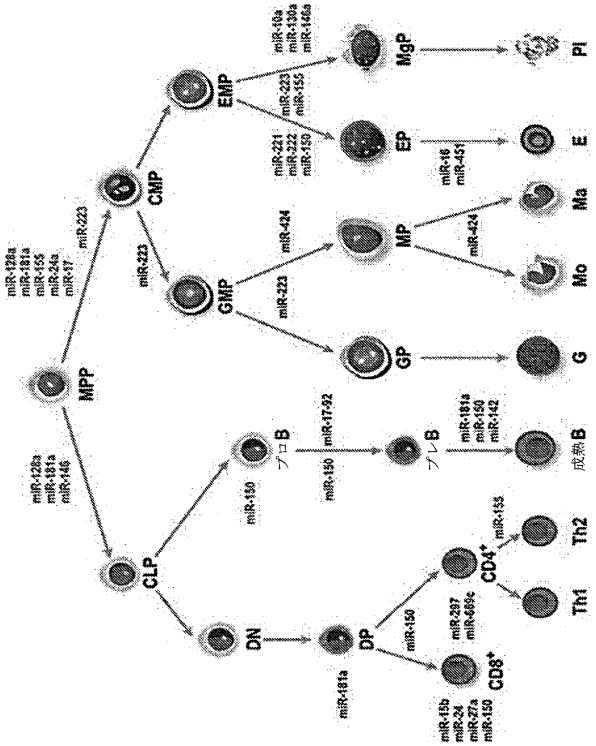


【図８８Ｆ－２】

（続き）

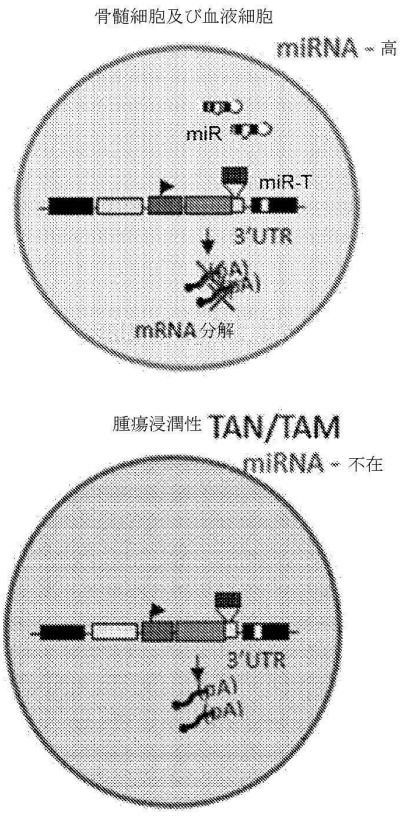



【図８８Ｇ－１】

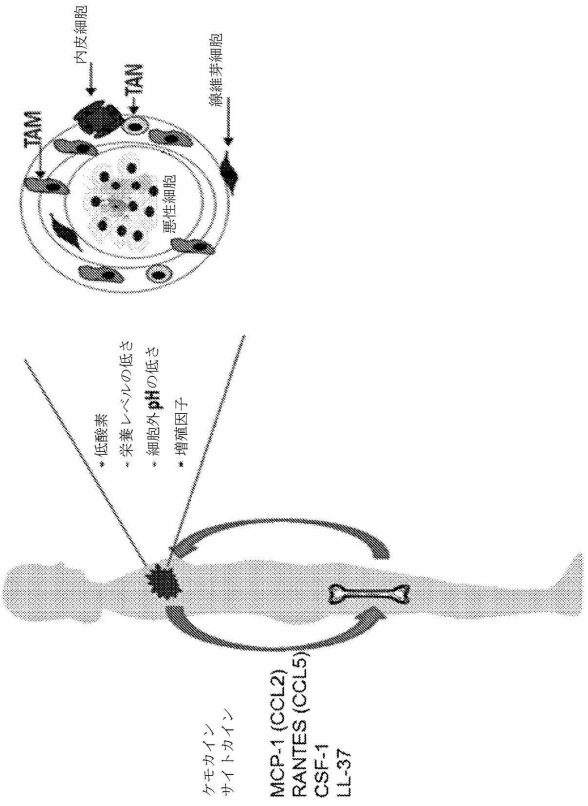



【図８８Ｇ－２】

（続き）

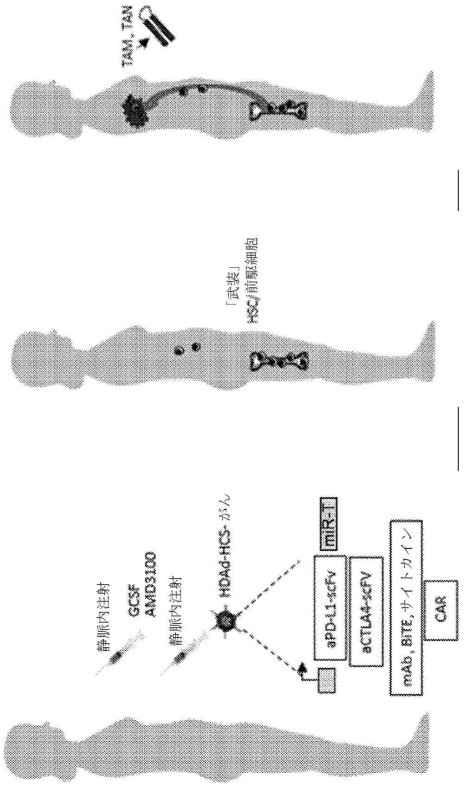



【図８８Ｈ－１】



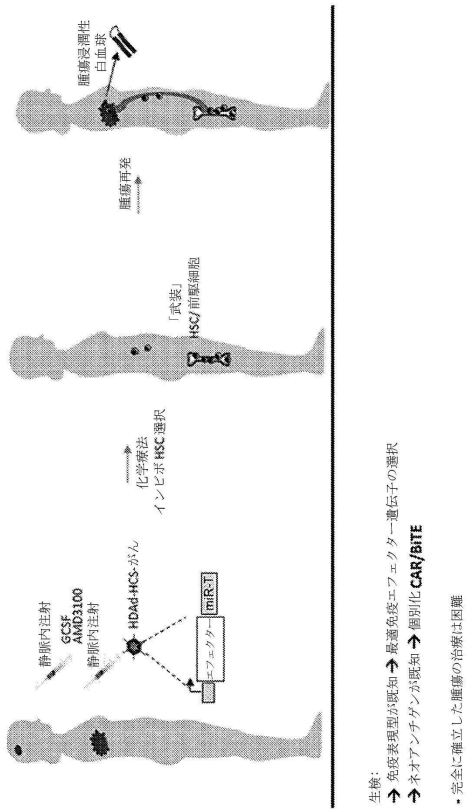
【図８８Ｈ－２】

（続き）

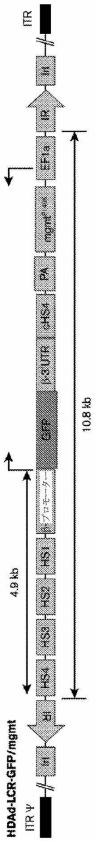



【図８８Ｈ－３】

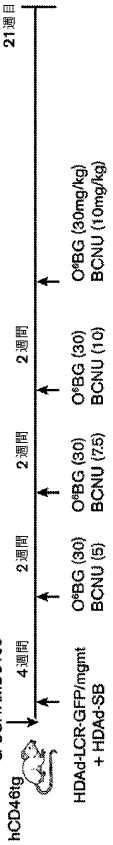
（続き）



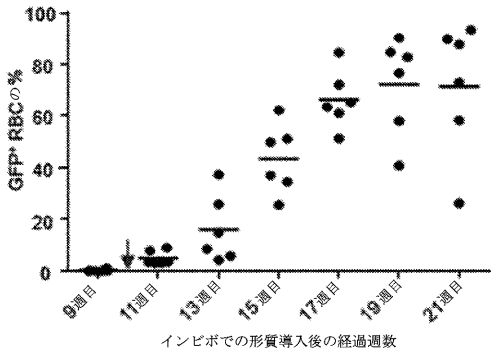

【図８９Ａ】



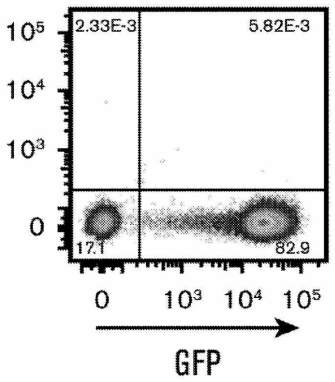

【図８９Ｂ】



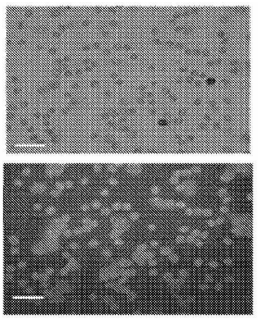
【図８９Ｃ】



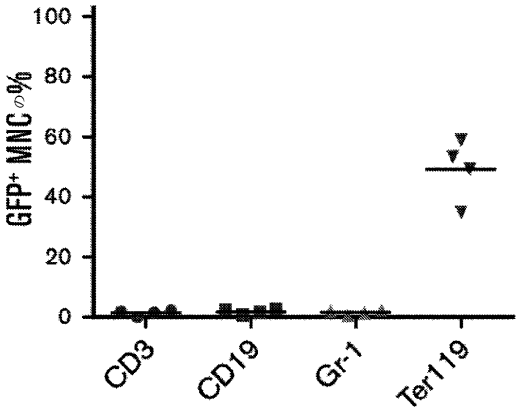

【図８９Ｄ】



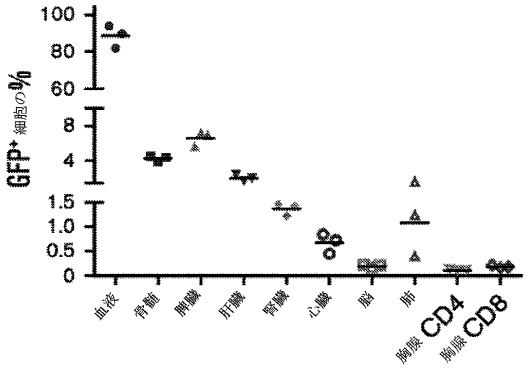

【図８９Ｅ】



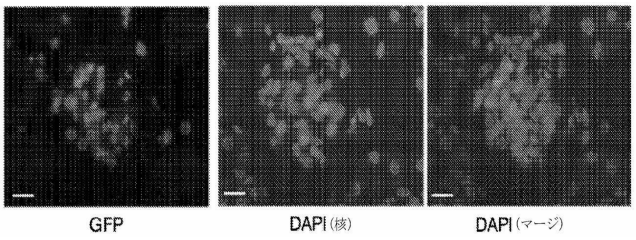
【図８９Ｆ】



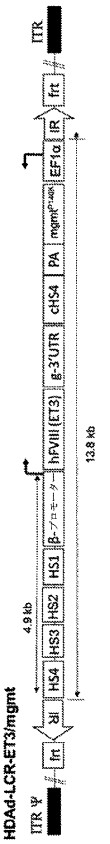

【図８９Ｇ】



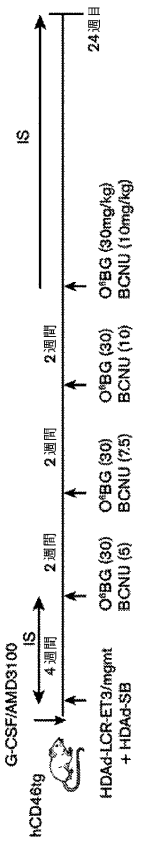

【図８９Ｈ】



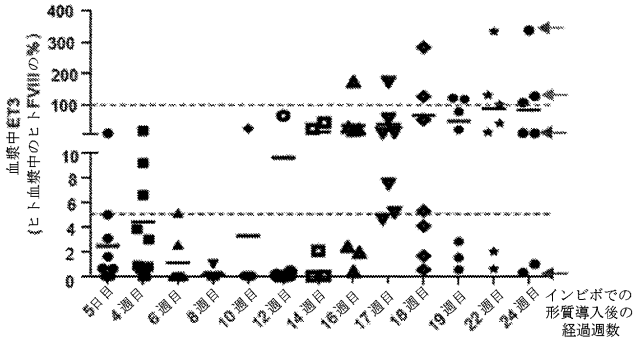
【図９０Ａ】



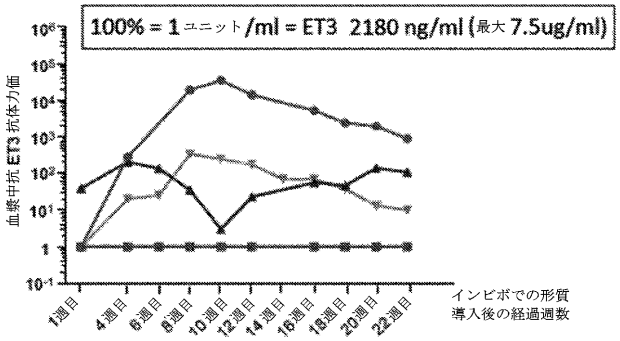

【図９０Ｂ】



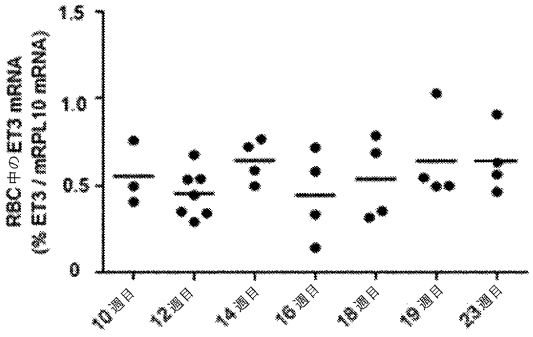

【図９０Ｃ】



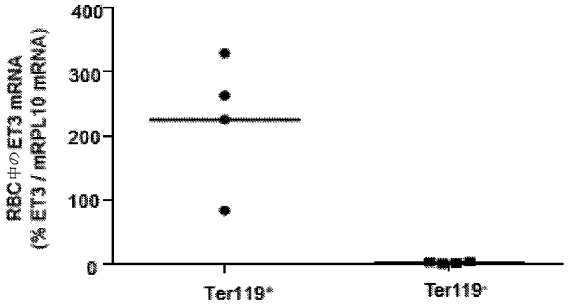

【図９０Ｄ】



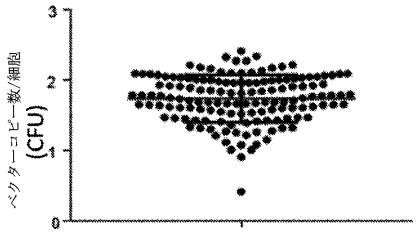
【図９０Ｅ】



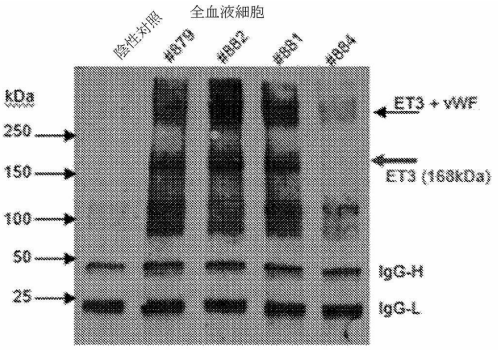

【図９０Ｆ】

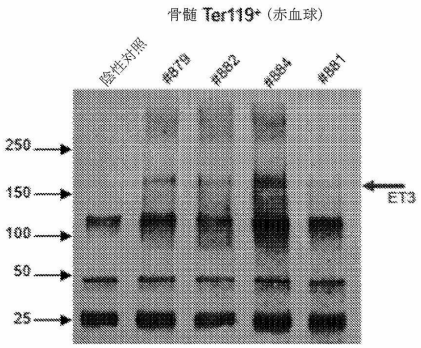



【図９０Ｇ】

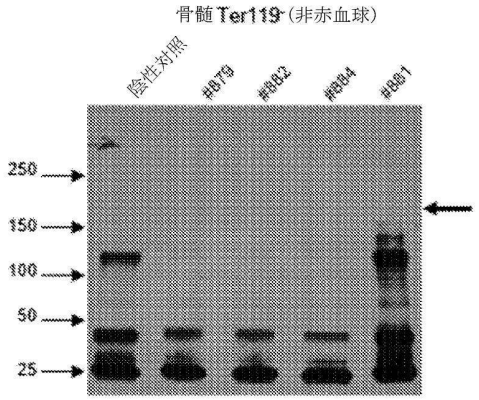



【図９０Ｈ－１】

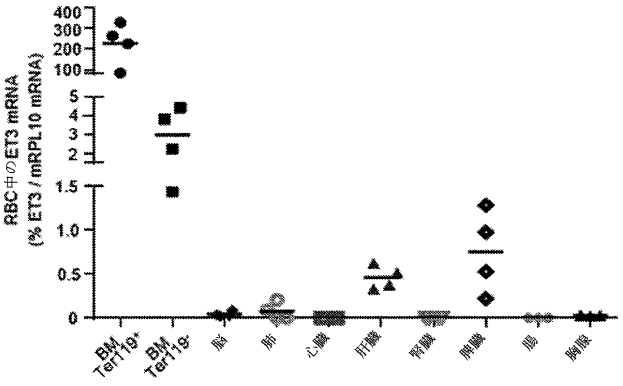


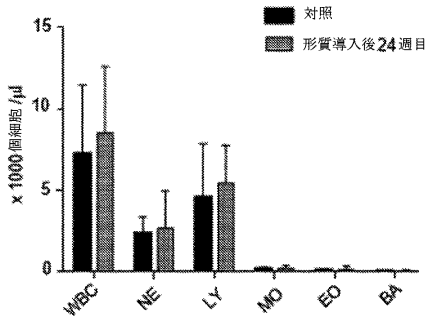
【図９０Ｈ－２】
（続き）



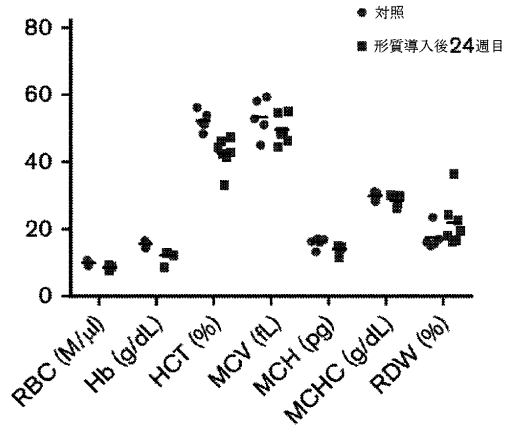

【図９０Ｉ】



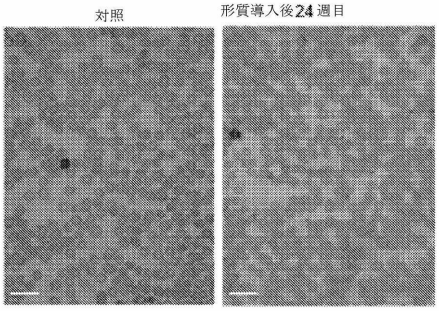

【図９１Ａ】



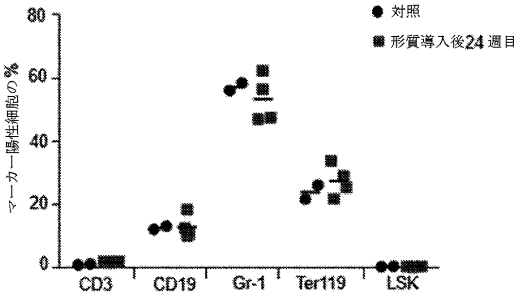

【図９１Ｂ】



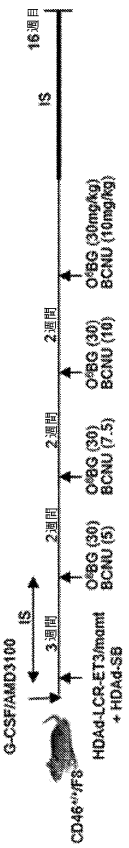

【図９１Ｃ】



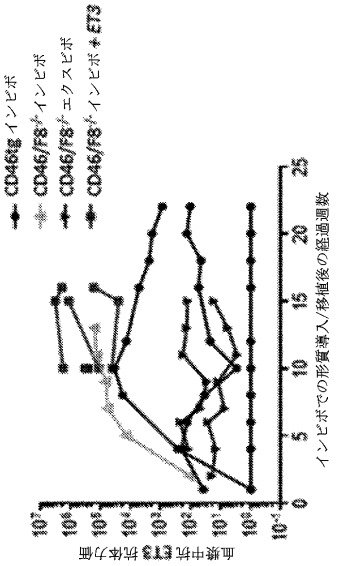

【図９１Ｄ】



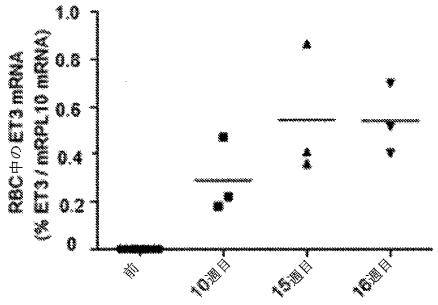
【図９２Ａ】



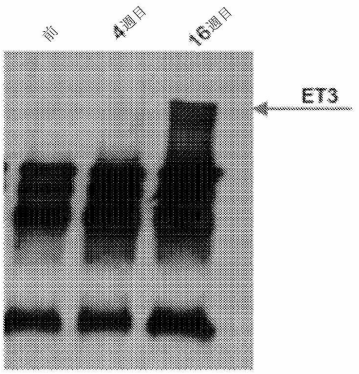

【図９２Ｂ】



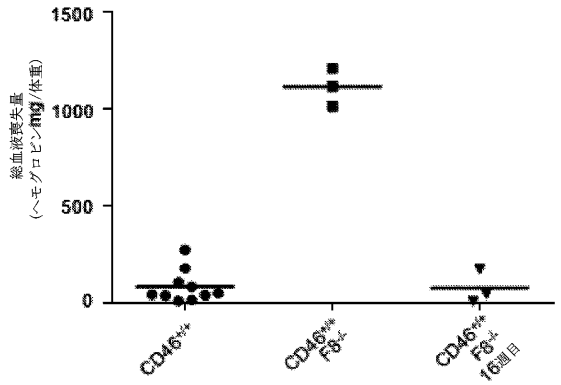

【図９２Ｃ】



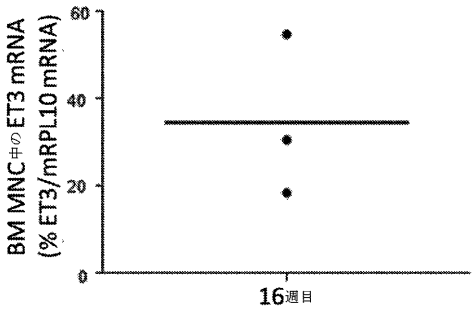

【図９２Ｄ】



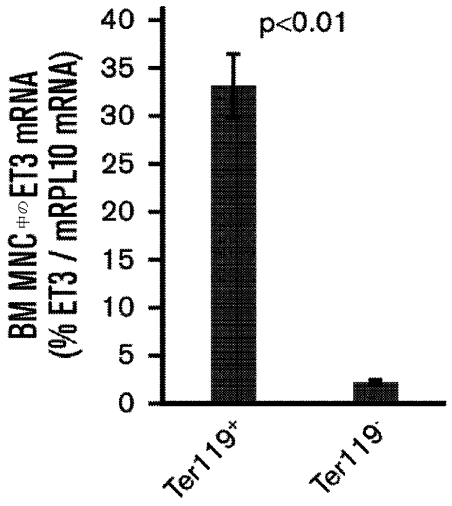
【図９２Ｅ】



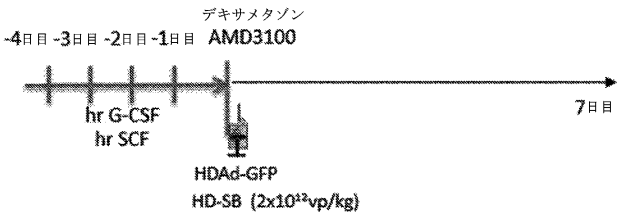

【図９２Ｆ】



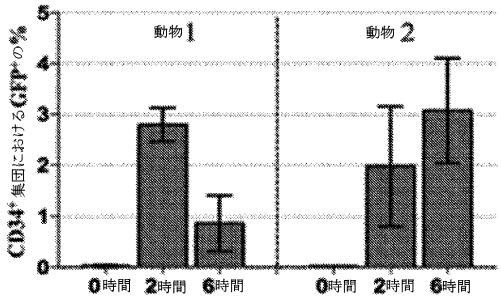

【図９２Ｇ】



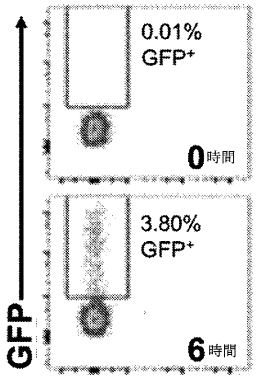

【図９３Ａ】



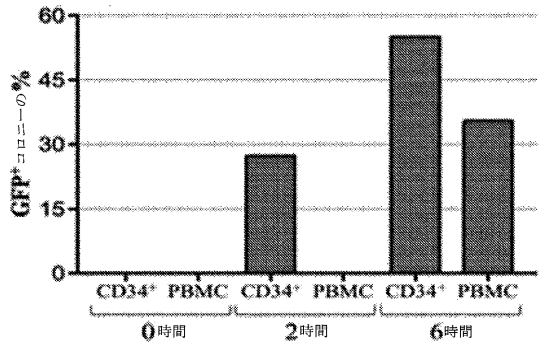

【図９３Ｂ】



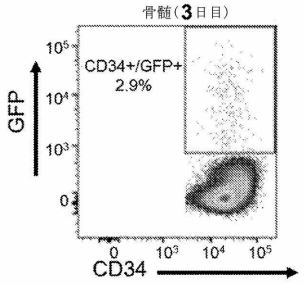

【図９３Ｃ】



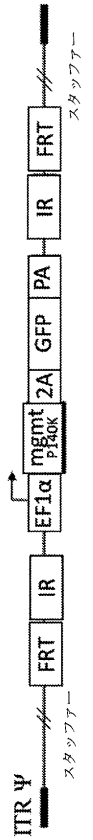
【図９３Ｄ】



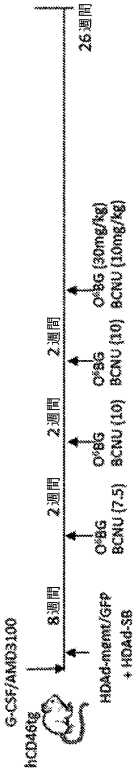

【図９３Ｅ】



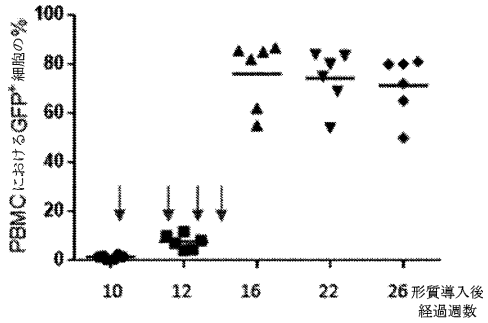

【図９４Ａ】



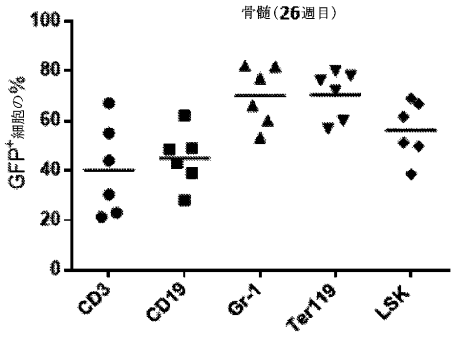

【図９４Ｂ】



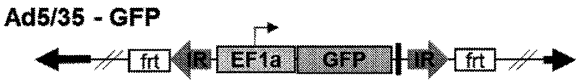
【図９４Ｃ】



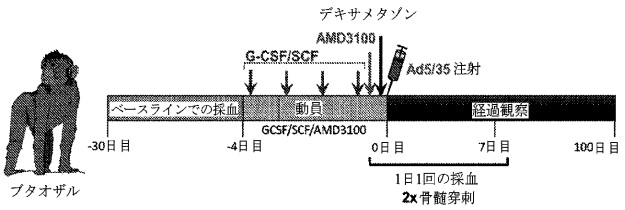

【図９４Ｄ】




【図９４Ｅ】



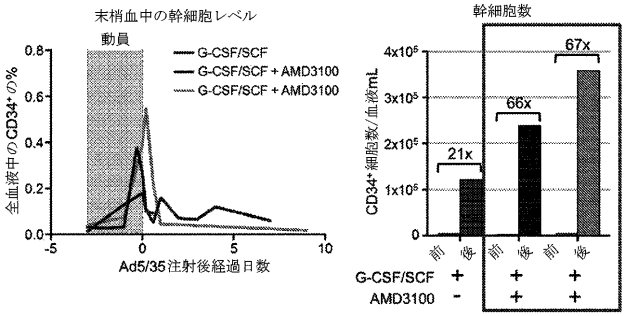

【図９４Ｆ】



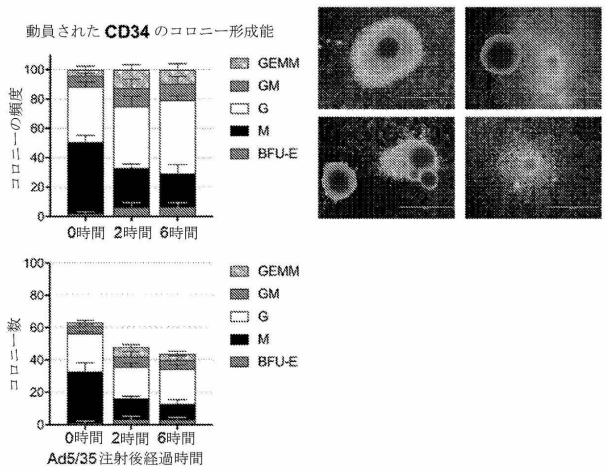

【図９４Ｇ】

| 動物ID | G-CSF | SCF | AMD3100 | 用量 |
|---|---|---|---|---|
| Z12406 | 50μg/kg | 50μg/kg | - | $2x10^{12}$vp/kg |
| Z13126 | 50μg/kg | 50μg/kg | 4mg/kg | $4x10^{12}$vp/kg |
| Z15263 | 50μg/kg | 50μg/kg | 4mg/kg | $3x10^{12}$vp/kg |

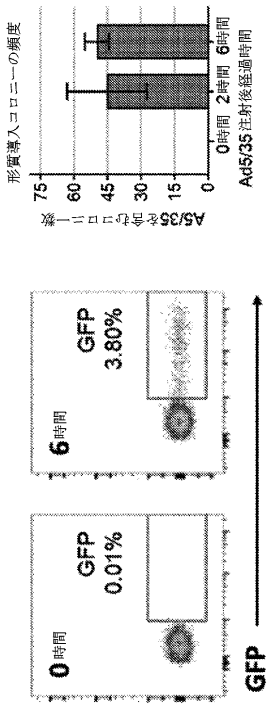
【図９４Ｈ】



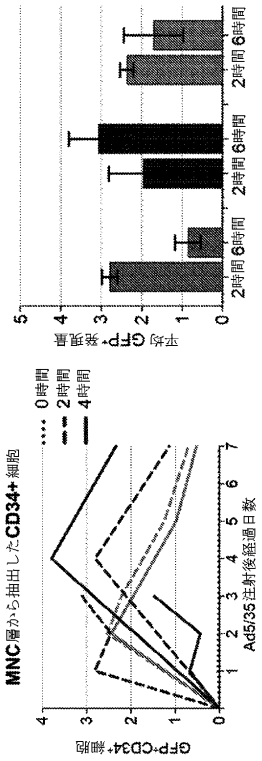
【図９４Ｉ】



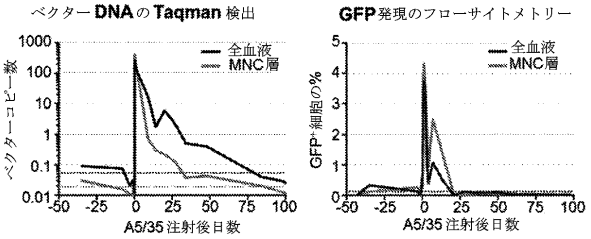

【図９４Ｊ】



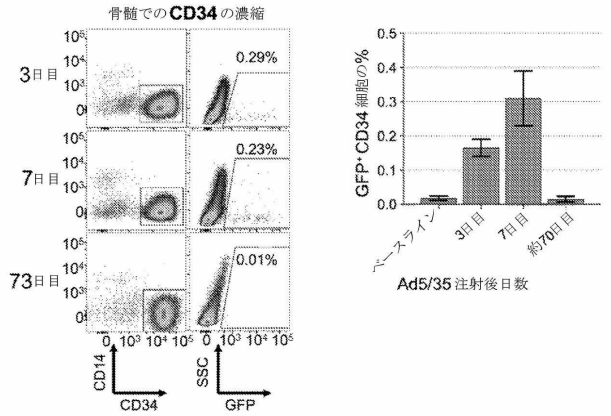

【図９４Ｋ】



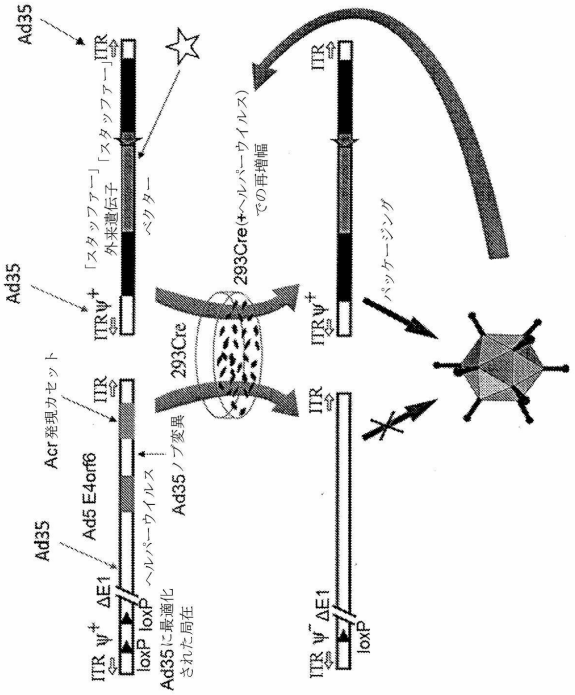

【図９４Ｌ】



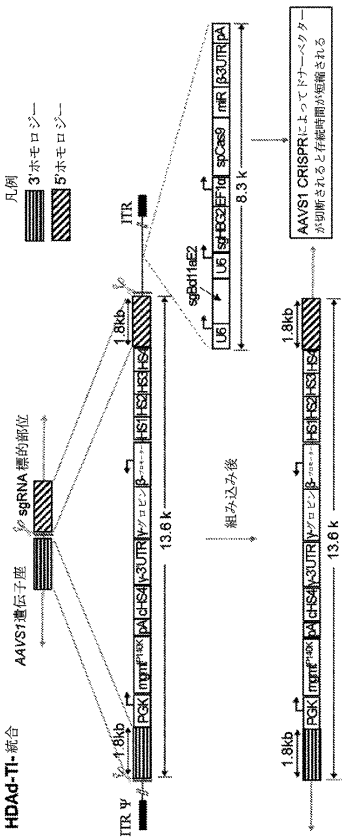
【図９４Ｍ】



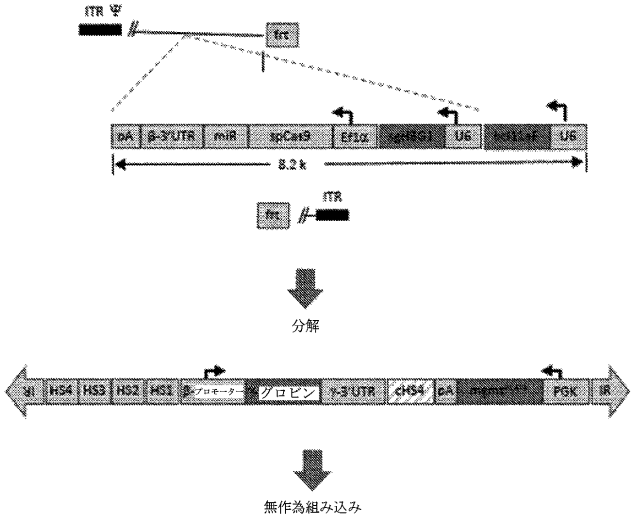

【図９５】



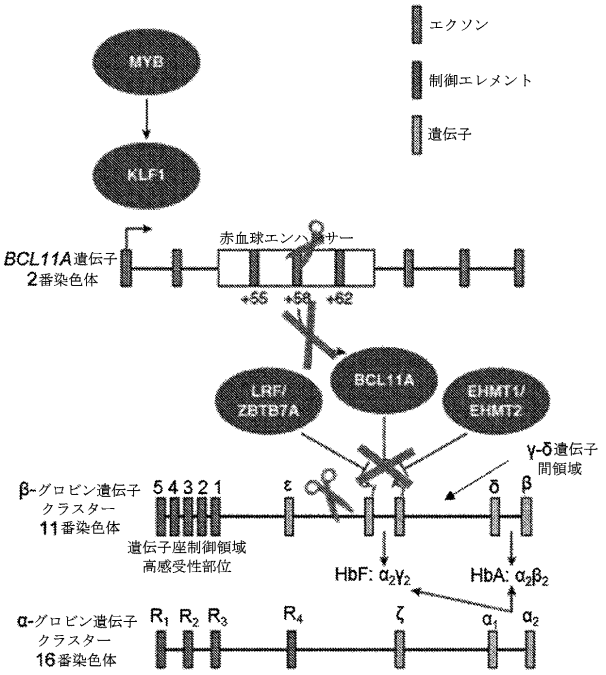

【図９６】



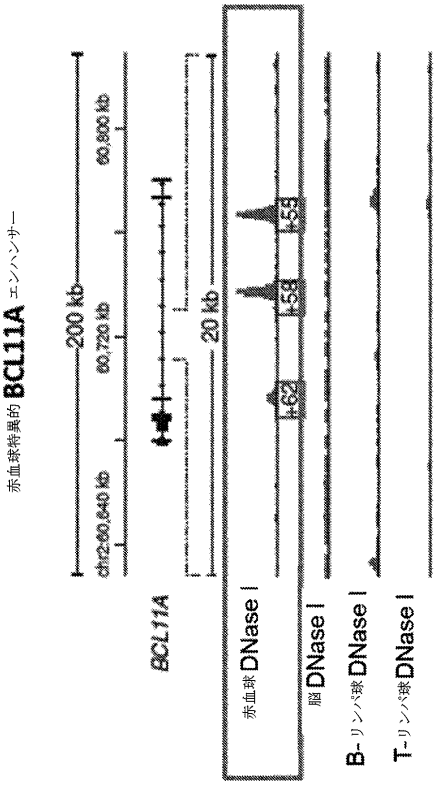

【図９７Ａ】



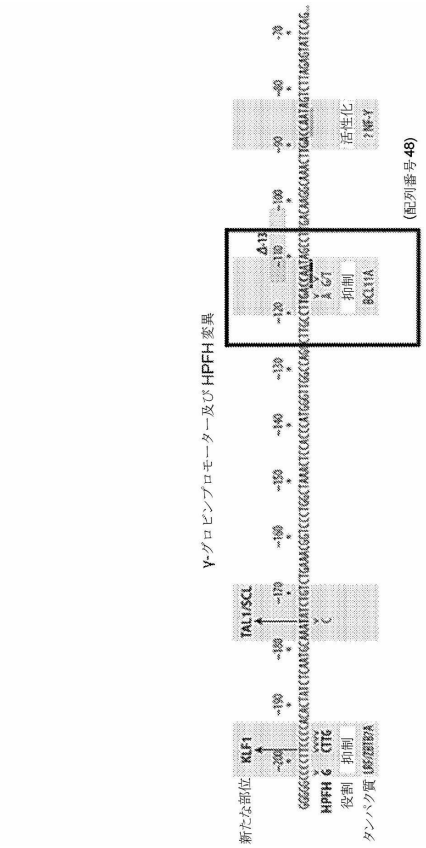
【図９７Ｂ】



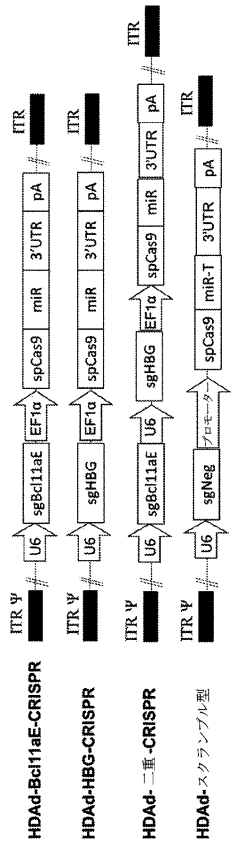

【図９７Ｃ】



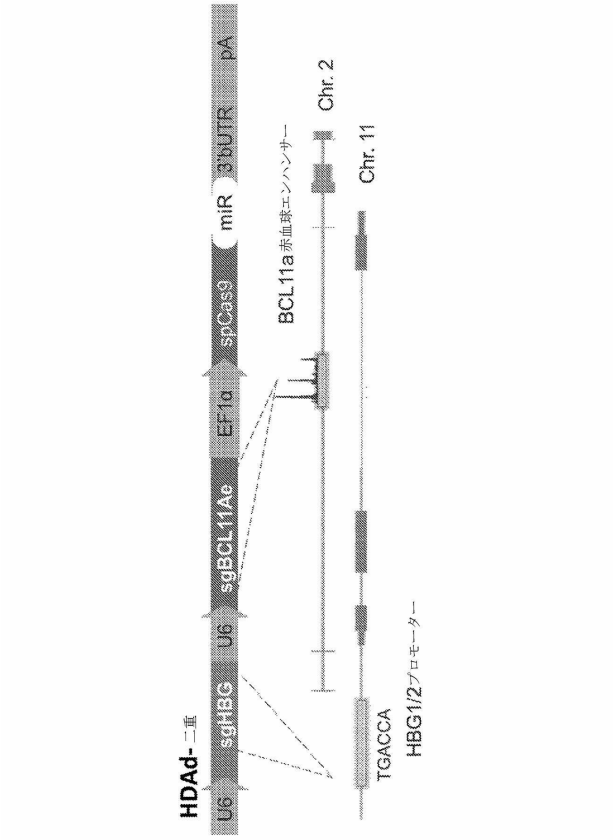

【図９７Ｄ】



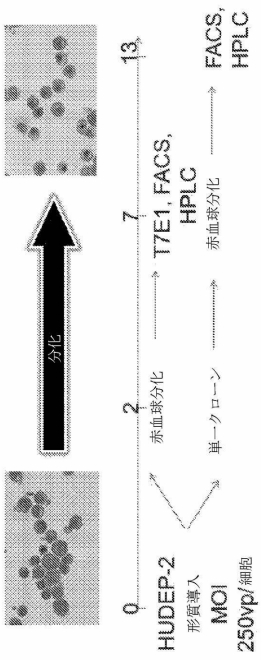

【図９８Ａ】



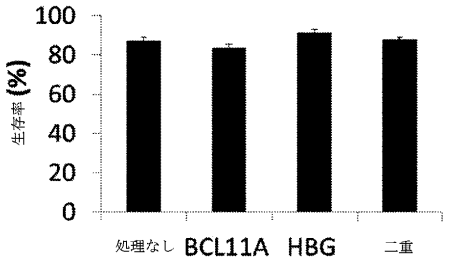
【図９８Ｂ】



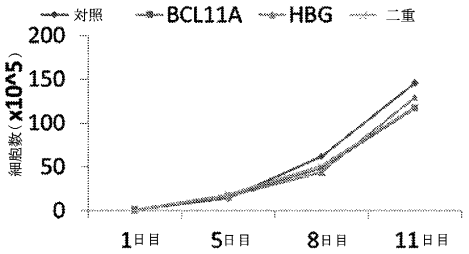

【図９８Ｃ】



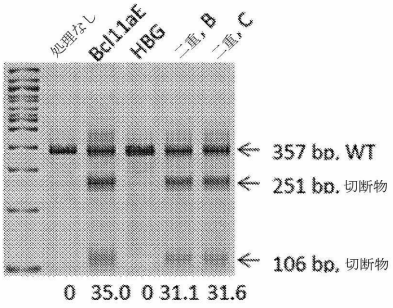

【図９８Ｄ】



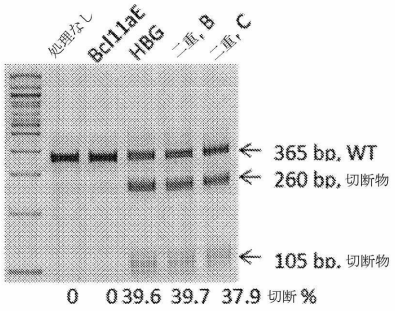

【図９８Ｅ】



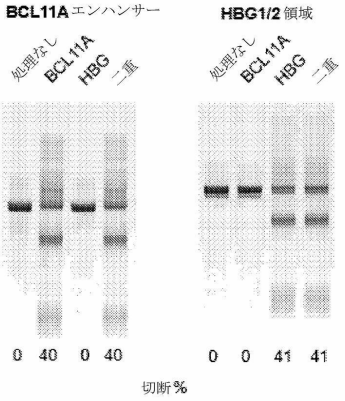
【図９８Ｆ】



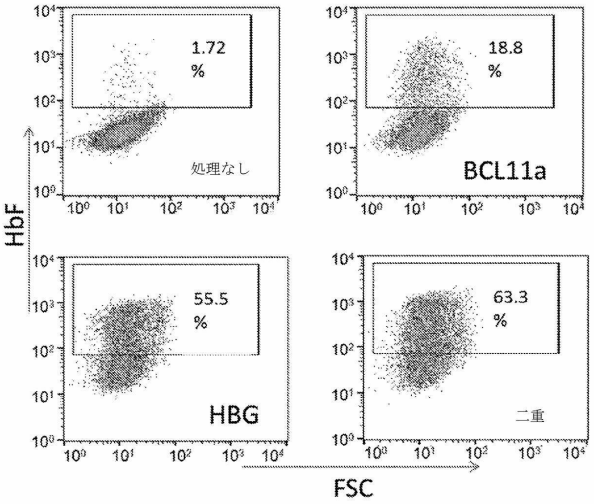

【図９８Ｇ】

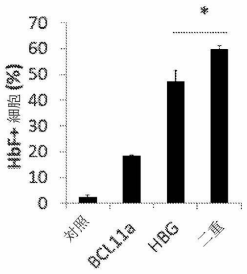



【図９８Ｈ】

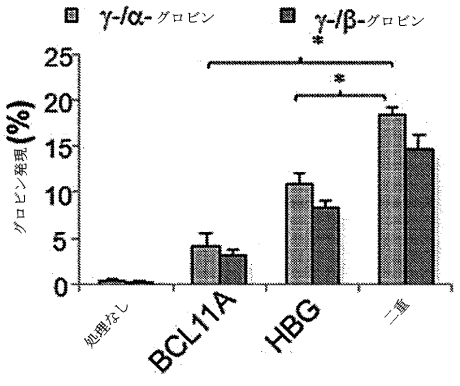



【図９８Ｉ】

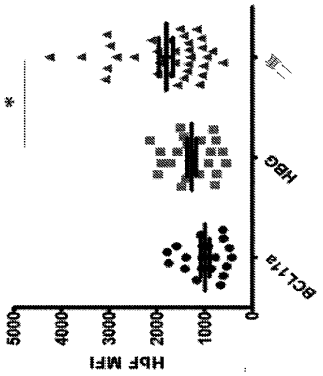


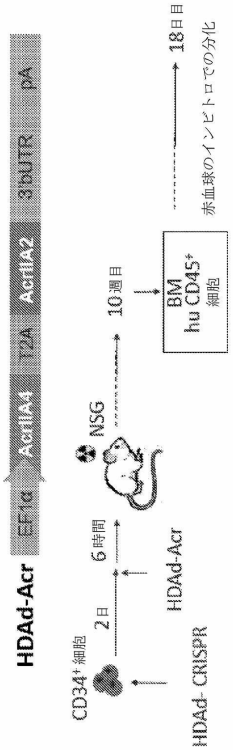
【図９８Ｊ】



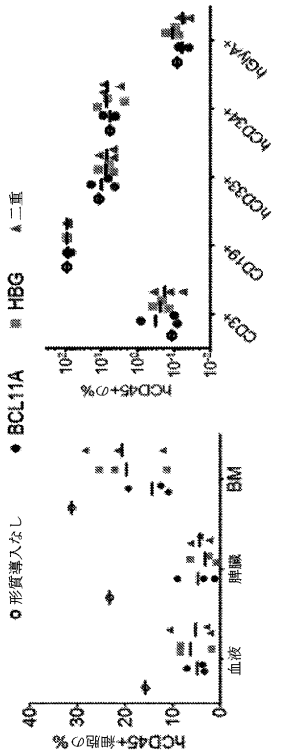

【図９８Ｋ】



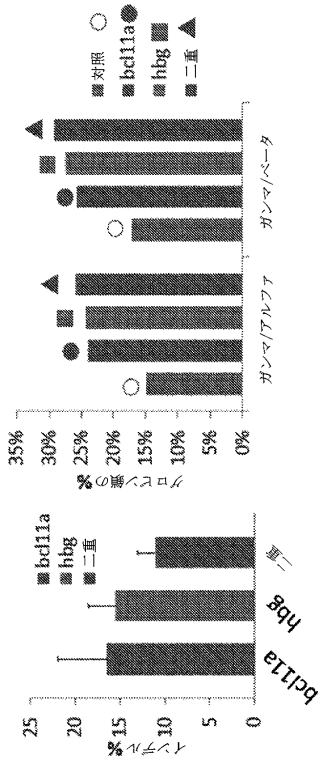

【図９８Ｌ】



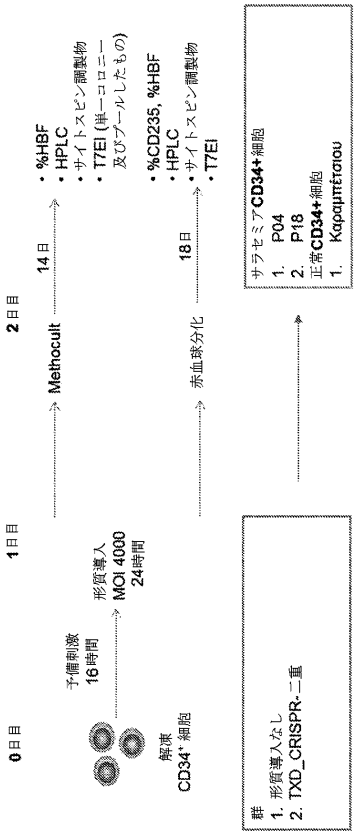

【図９８Ｍ】



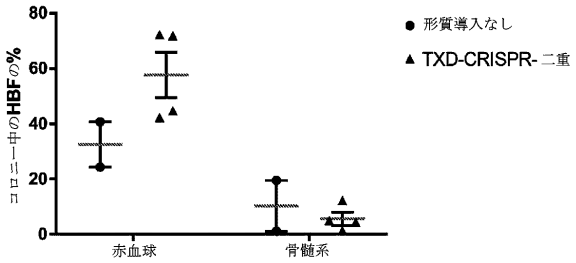
【図９８Ｎ】



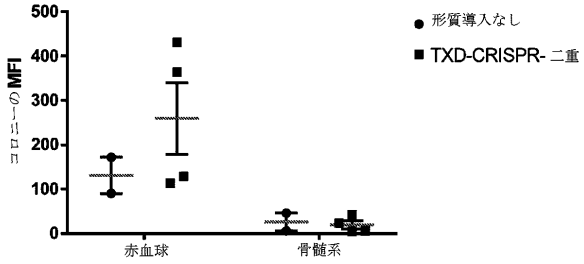

【図９９Ａ】



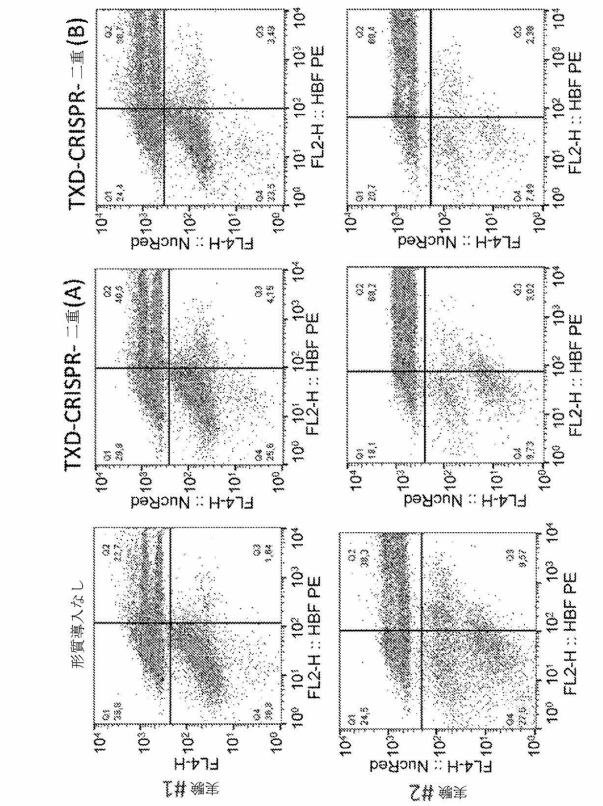

【図９９Ｂ】



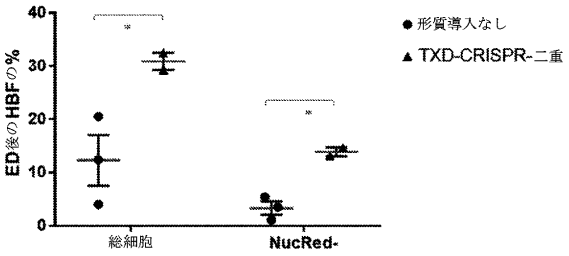

【図９９Ｃ】



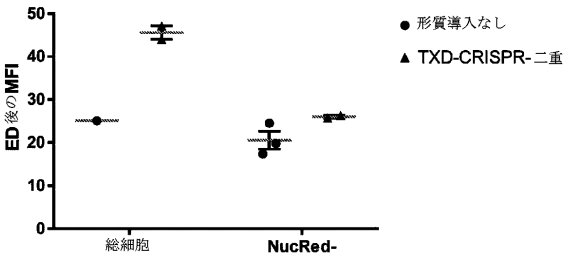
【図９９Ｄ】



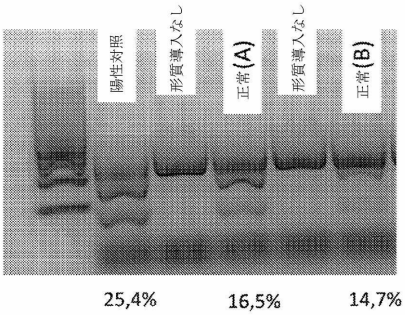

【図９９Ｅ】



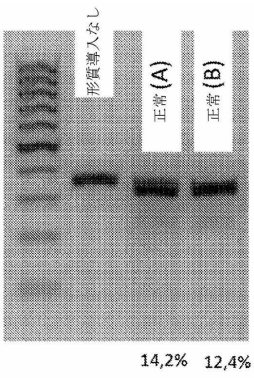

【図９９Ｆ】



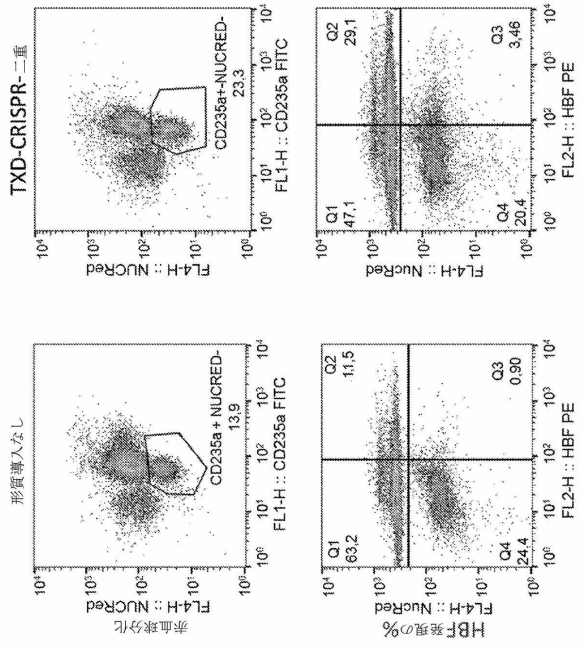

【図９９Ｇ】



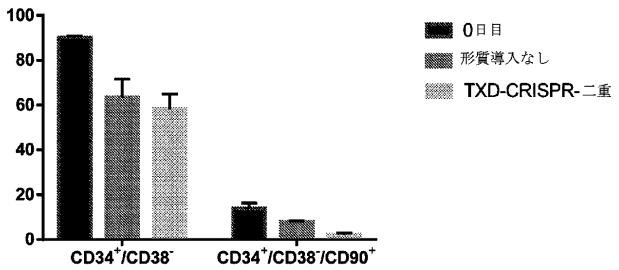
【図９９Ｈ】



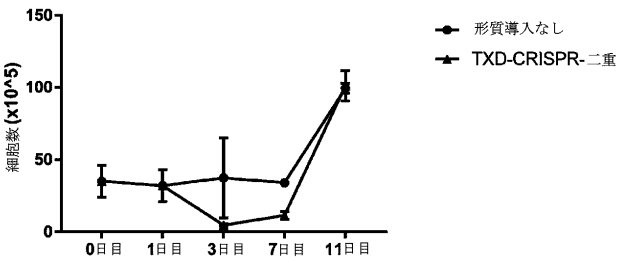

【図９９Ｉ】



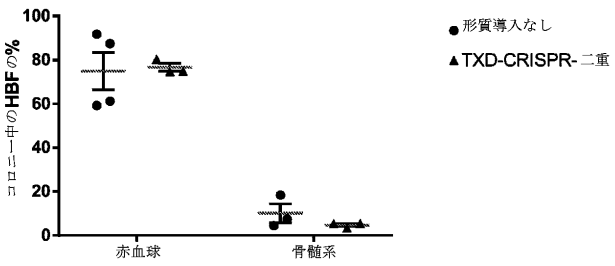

【図９９Ｊ】



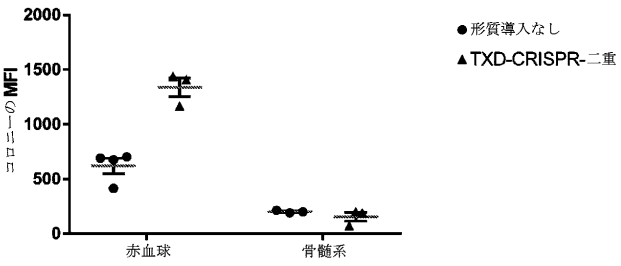

【図９９Ｋ】



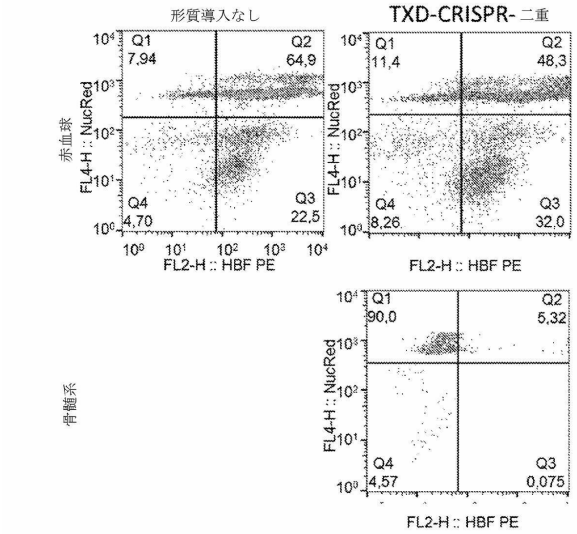
【図９９Ｌ】



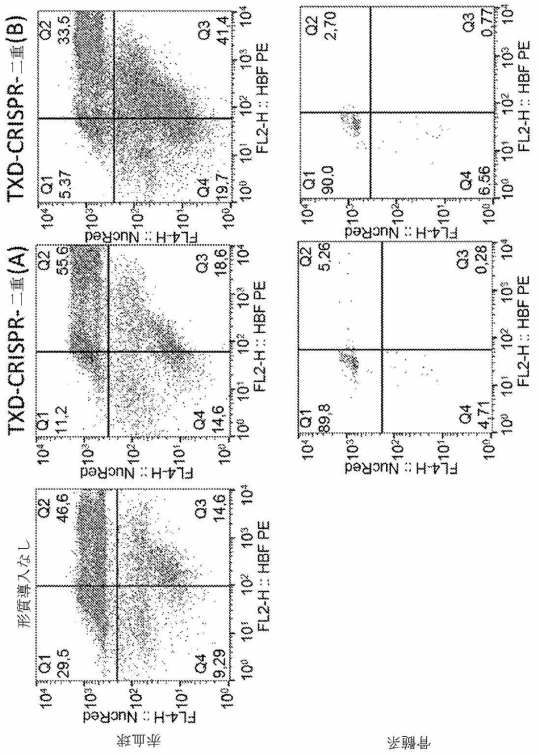

【図９９Ｍ】



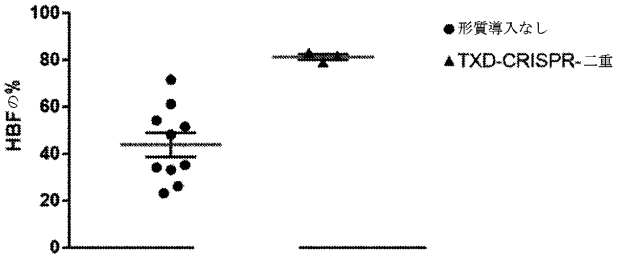

【図９９Ｎ】



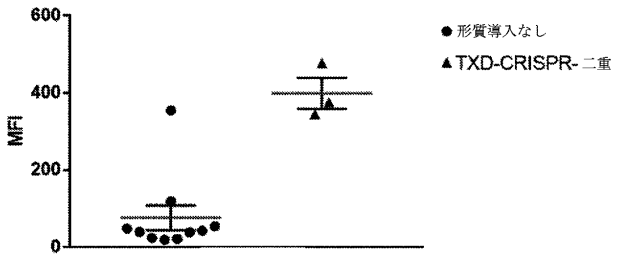

【図９９Ｏ】



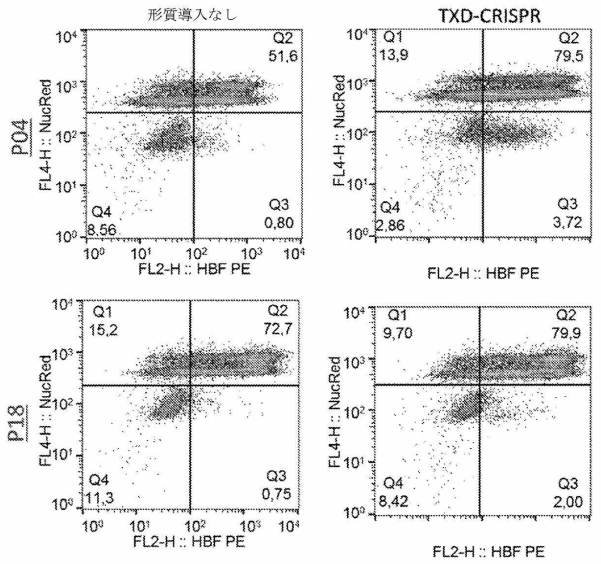

【図９９Ｐ】



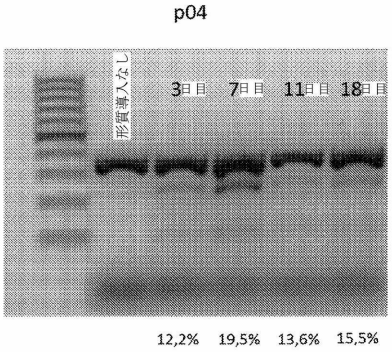

【図９９Ｑ】



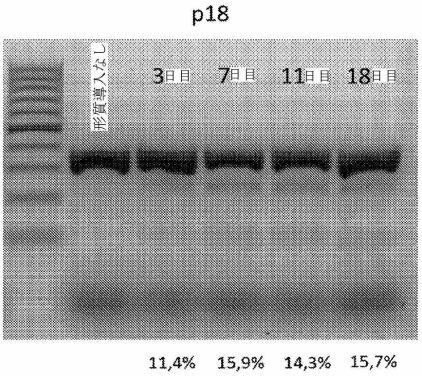
【図９９Ｒ】



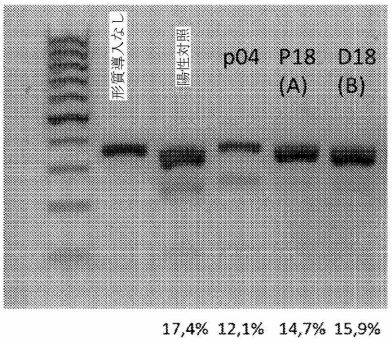

【図９９Ｓ】



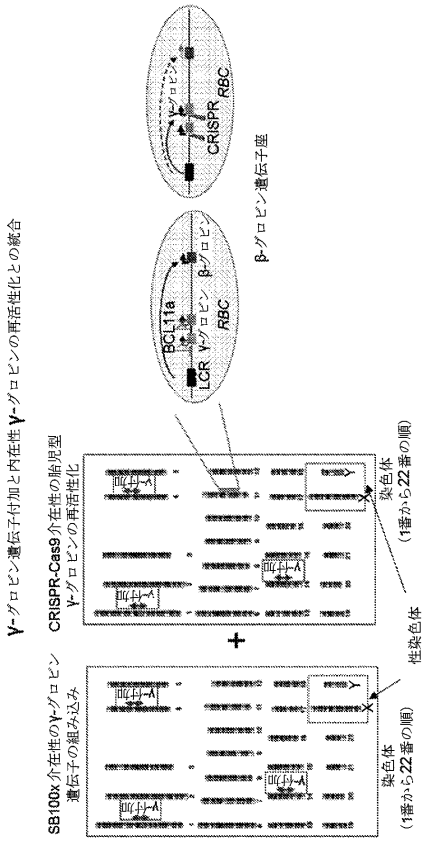

【図９９Ｔ】




【図９９Ｕ】

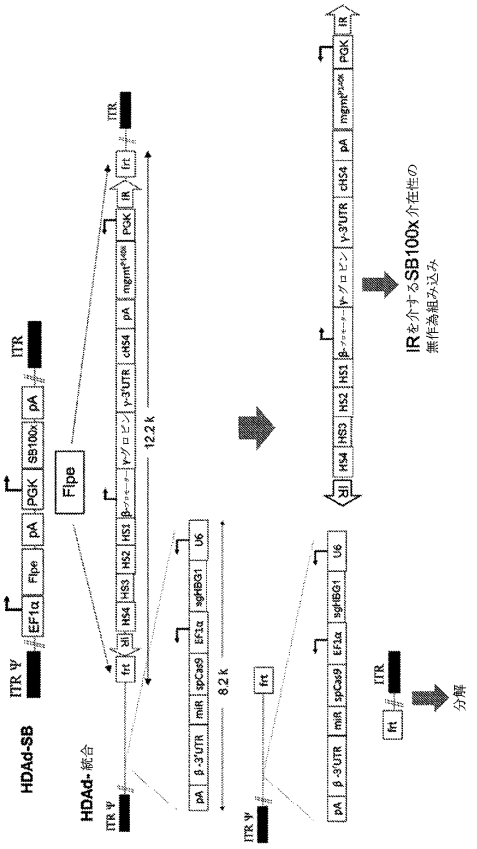


【図１００】

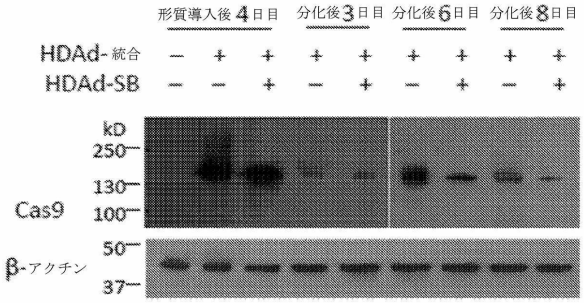



【図１０１】

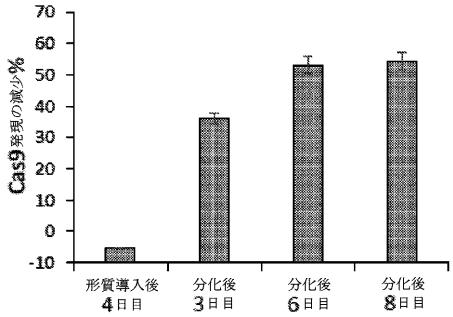
【図１０２】



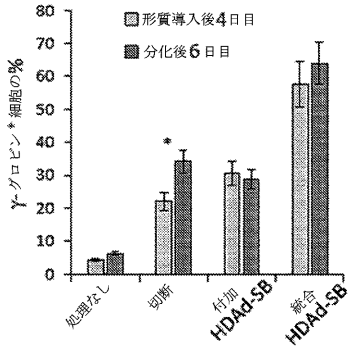

【図１０３Ａ】



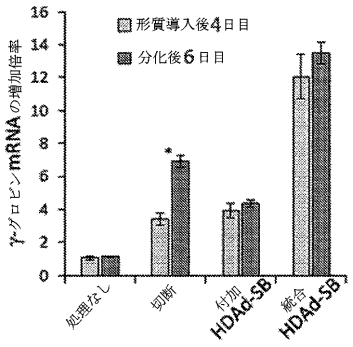
【図１０３Ｂ】



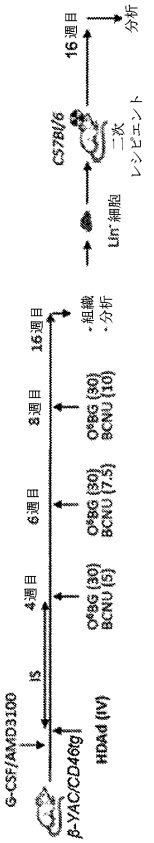

【図１０３Ｃ】



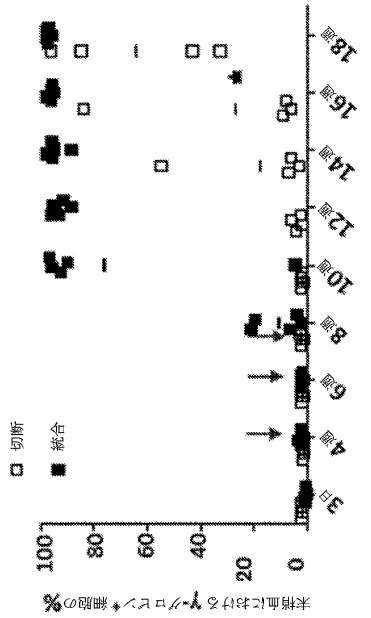

【図１０３Ｄ】



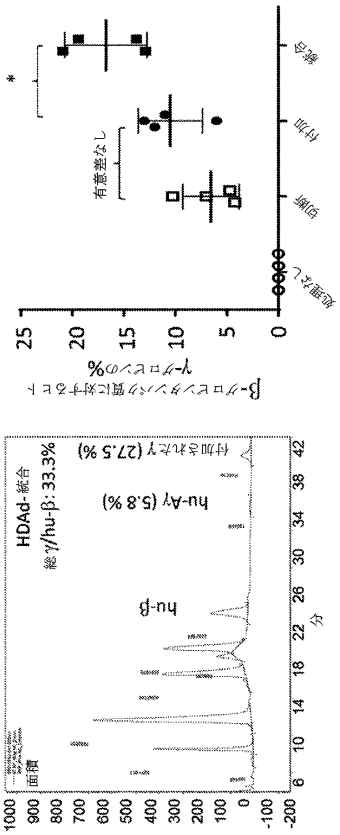

【図１０４Ａ】



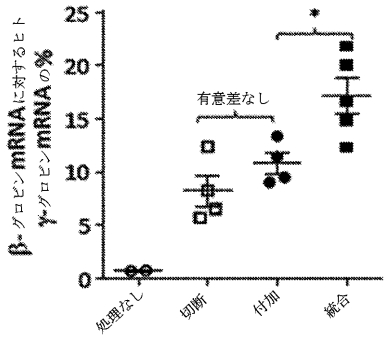
【図１０４Ｂ】



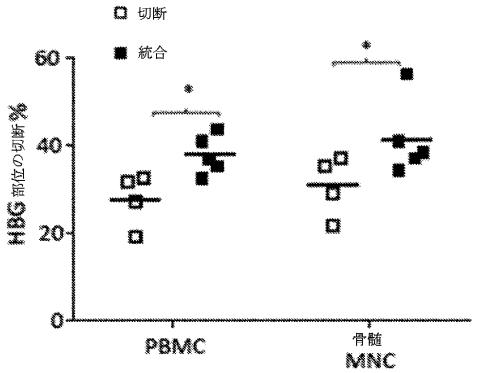

【図１０４Ｃ】



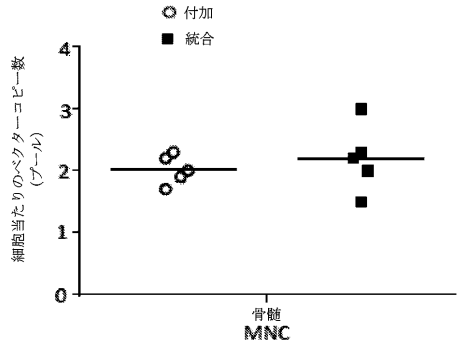

【図１０４Ｄ】



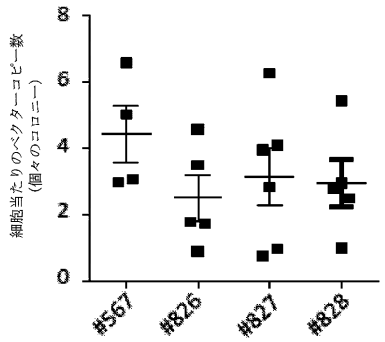

【図１０４Ｅ】



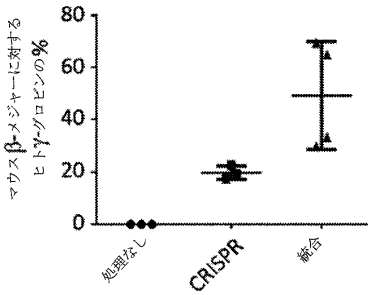
【図１０４Ｆ】



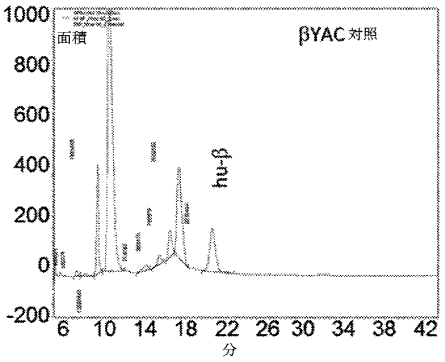

【図１０４Ｇ】




【図１０４Ｈ】

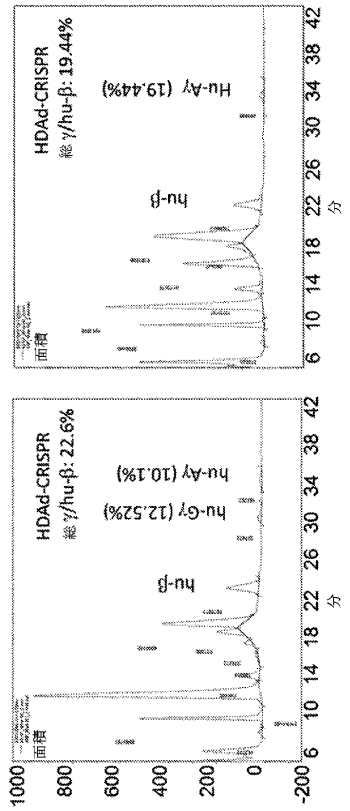



【図１０５－１】



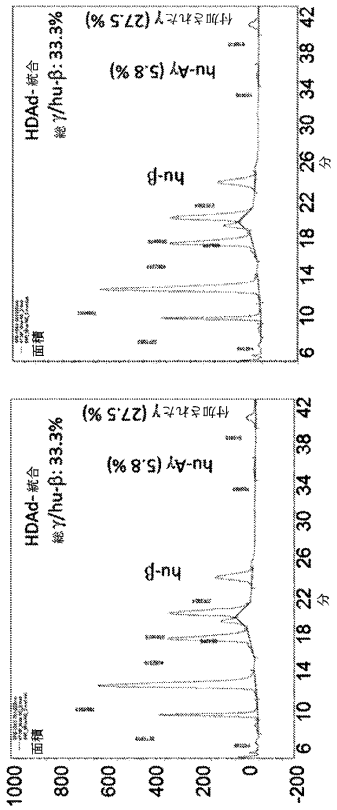
【図１０５－２】

（続き）

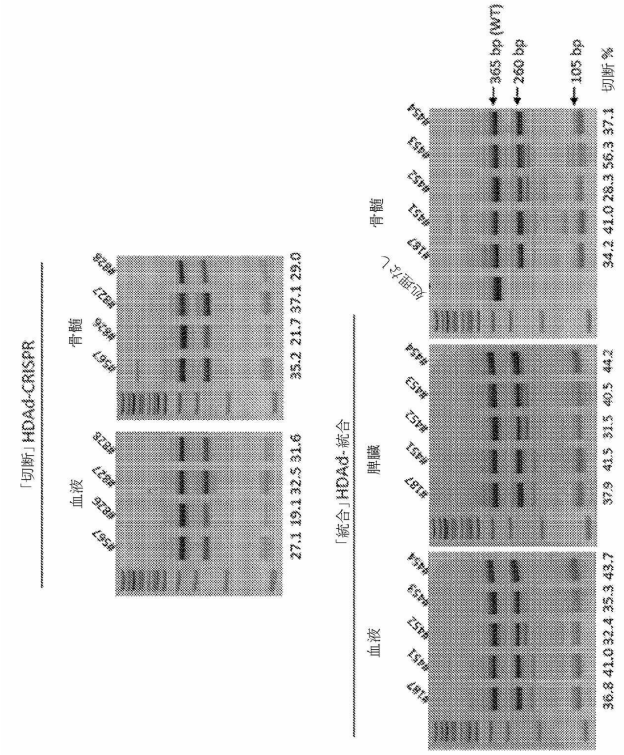



【図１０５－３】

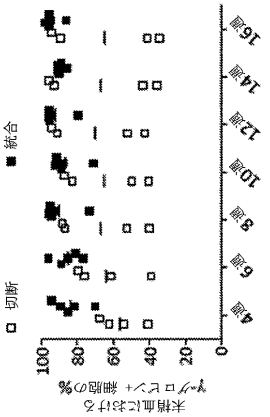
（続き）



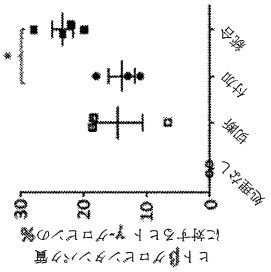

【図１０６】



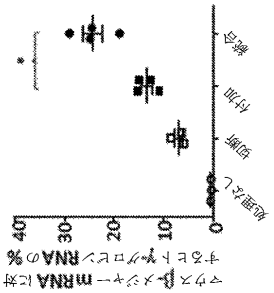

【図１０７Ａ】



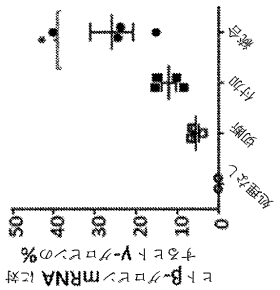
【図１０７Ｂ】



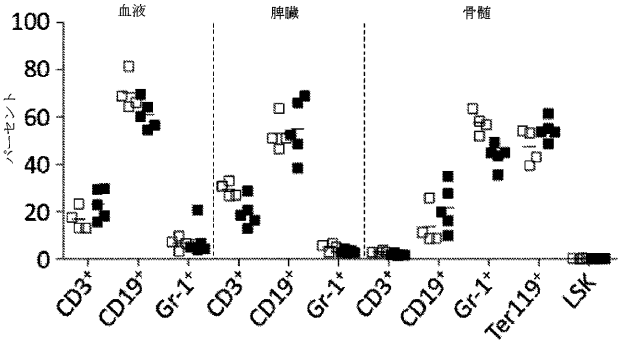

【図１０７Ｃ】



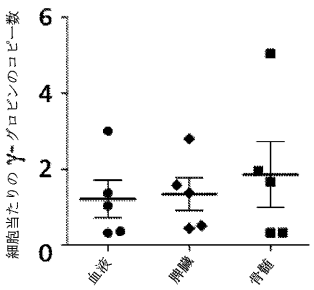

【図１０７Ｄ】



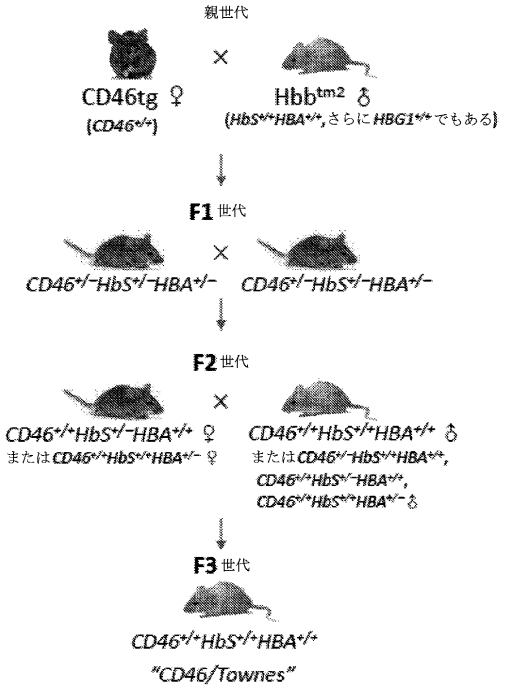

【図１０７Ｅ】



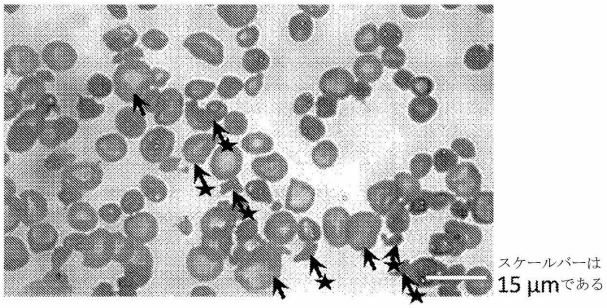
【図１０７Ｆ】



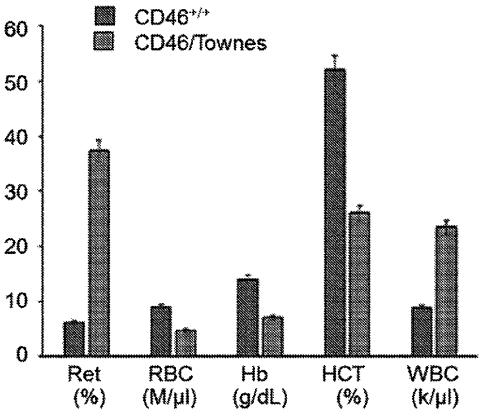

【図１０８Ａ】



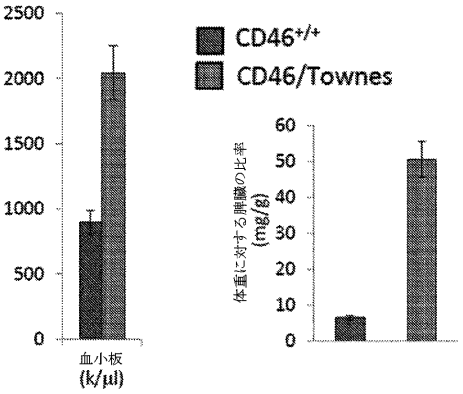

【図１０８Ｂ】



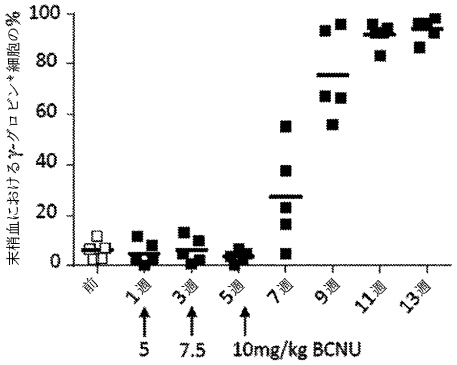

【図１０８Ｃ】



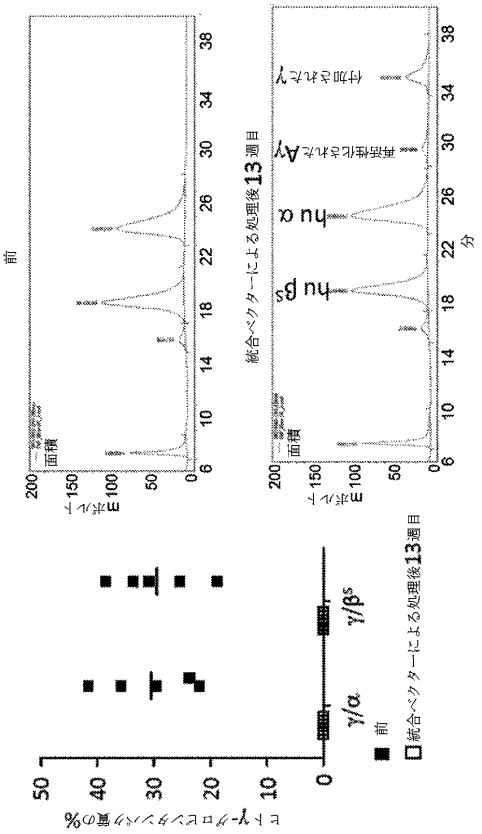
【図１０８Ｄ】



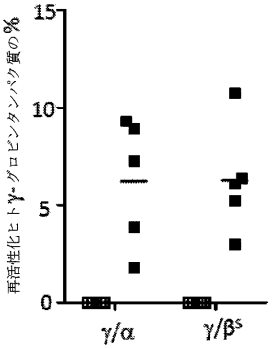

【図１０９Ａ】



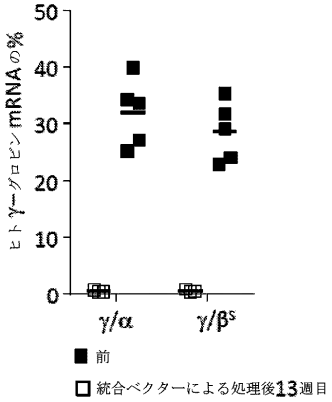

【図１０９Ｂ】



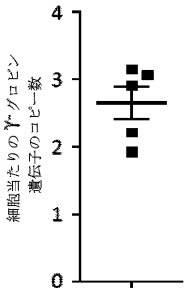

【図１０９Ｃ】



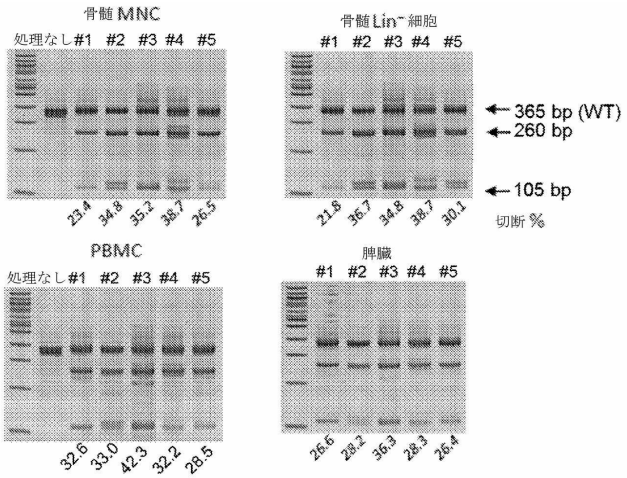
【図１０９Ｄ】



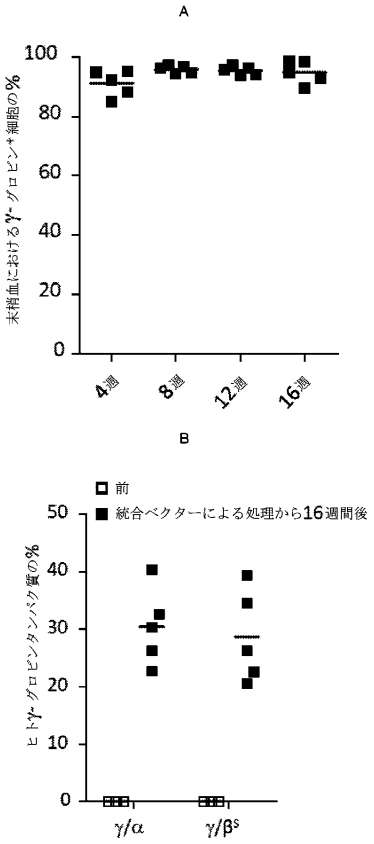

【図１０９Ｅ】



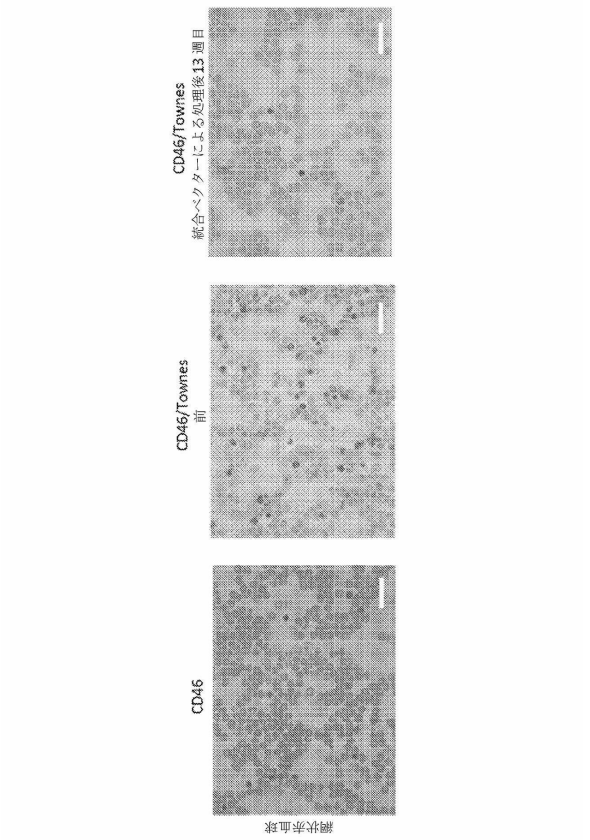

【図１０９Ｆ】



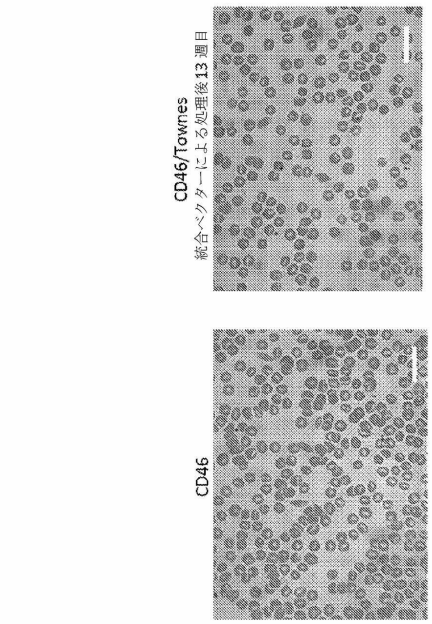

【図１１０】



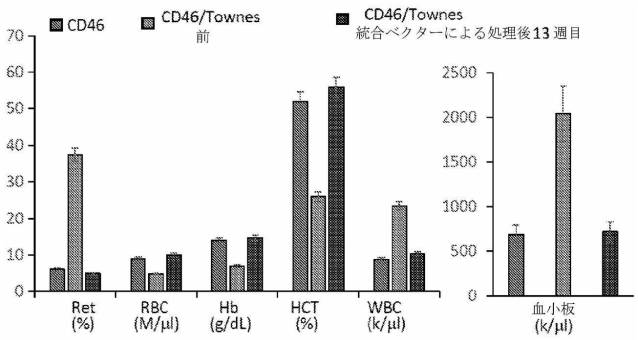
【図１１１Ａ】



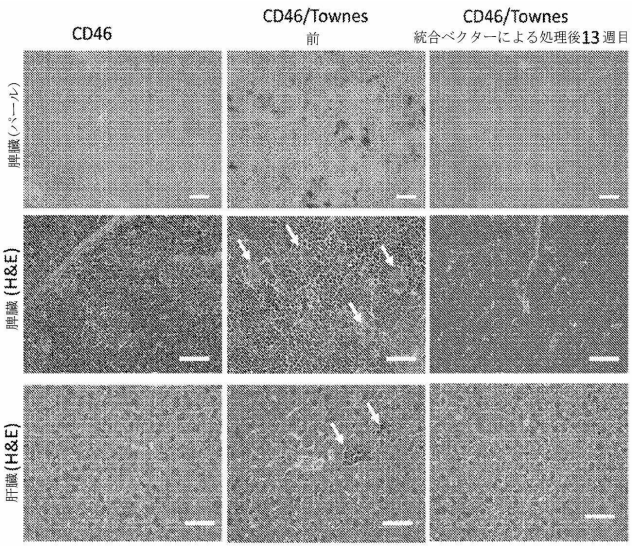

【図１１１Ｂ】



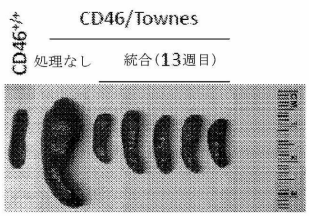

【図１１１Ｃ】



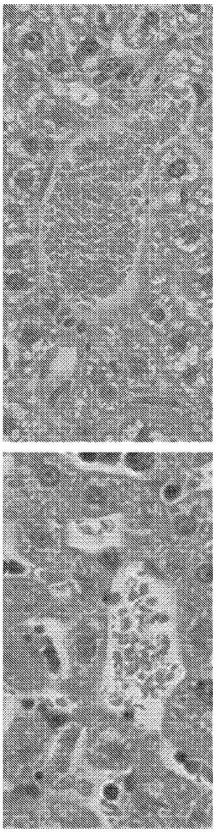

【図１１２Ａ】



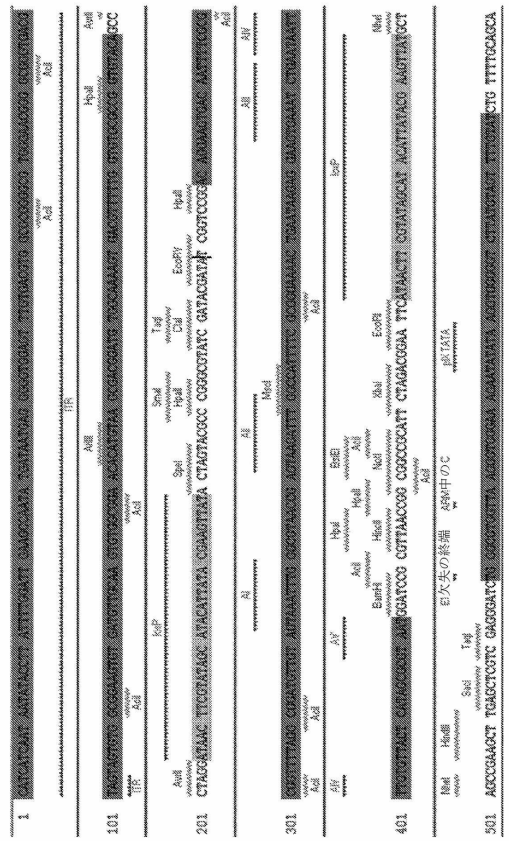
【図１１２Ｂ】



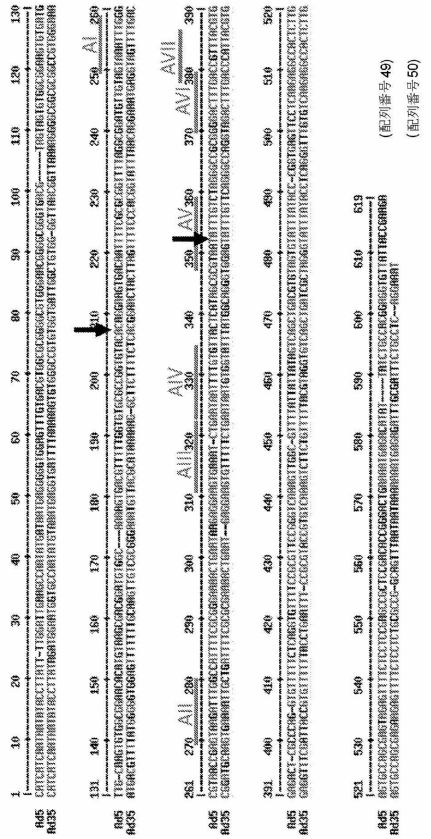

【図１１２Ｃ】



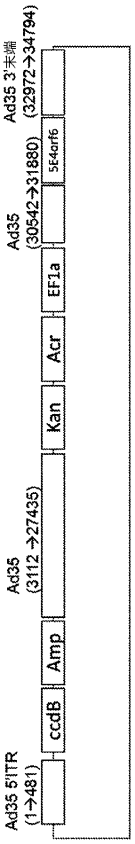
【図１１３】



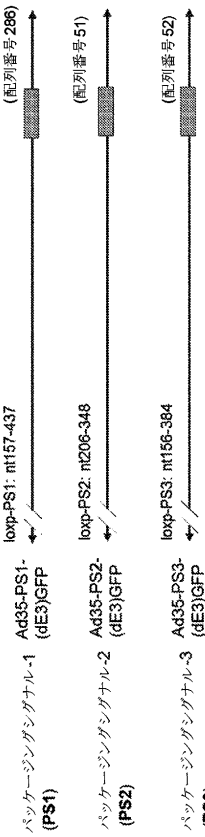

【図１１４】



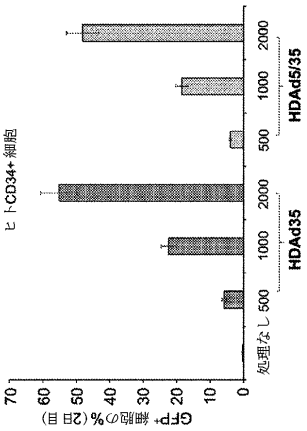
【図１１５】



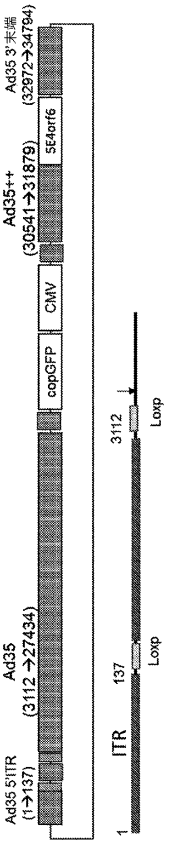

【図１１６】




【図１１７】




【図１１８】

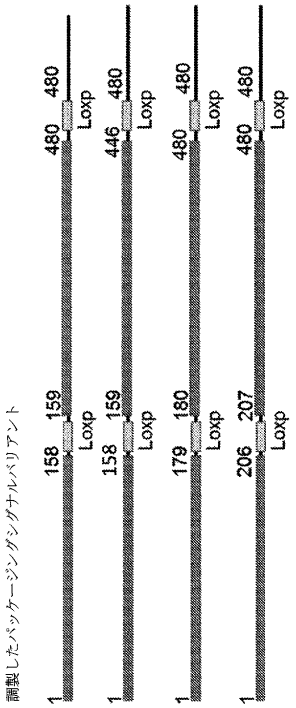


【図１１９】

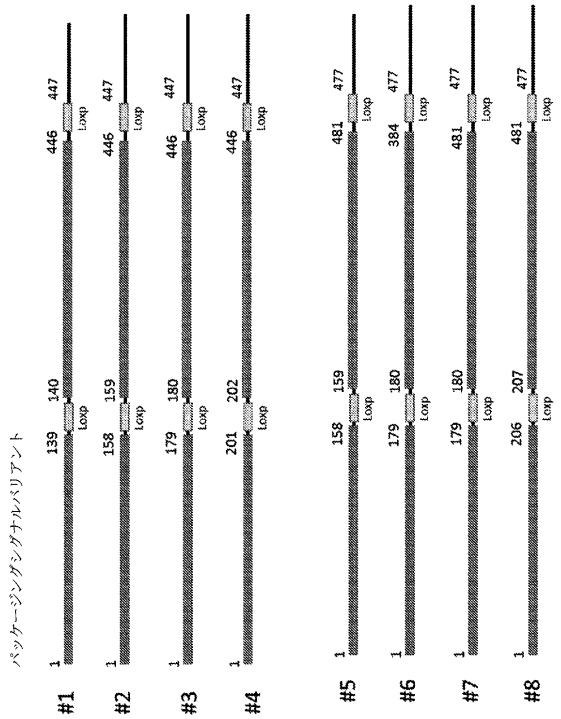
CATCATCAATAATATACCTTATAGATGGAATGGTGCCAATATGTAAATGAGGTGATTTTAAAAAGTGTGGGCCGTGTGGTGATTGG
CTGTGGGGTTAACGGTTAAAAGGGGCGGCGCCGTGGGAAAATGACGTTATTTAAATATAACTTCGTATAGCATACATTATA
CGAAGTTATGAGGTAGTTTTGTTCAGGGGCAAGTGAAAATTGACCCATTACGCGGGAAAACTGAATGAGGAAGTGTTTTCTGAA
TAATGTGGTATTTATGGCAGGGTGGAGTATTTGACCGGATCCAGGTAGACTTTGCTGATTTTCGTGGAGGTTTATAACTTCGTATA
GCATACATTATACGAAGTTATATTTTAAAT (配列番号264)

Ad35 ITR 1→137bp: (配列番号264の位置1-137)
CATCATCAATAATATACCTTATAGATGGAATGGTGCCAATATGTAAATGAGGTGATTTTAAAAAGTGTGGGCCGTGT
GGTGATTGGCTGTGGGGTTAACGGTTAAAAGGGGCGGCGCCGTGGGAAAATGACGTT
SwaI 部位：(配列番号264の位置146-145及び位置363-370) ATTTAAAT
LoxP 部位：(配列番号264の位置138-179及び位置329-362) ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT
変異パッケージングシグナル：(配列番号264の位置138-145)
GAGGTAGTTTTGTTCAGGGGCAAGTGAAAATTGACCCATTACGCGCGAAAACTGAATGAGGAAGTGTTTTTCTGAAT
AATGTGGTATTTATGGCAGGGTGGAGTATTTGACCGGATCCAGGTAGACTTTGCTGATTTTCGTGGAGGTTT

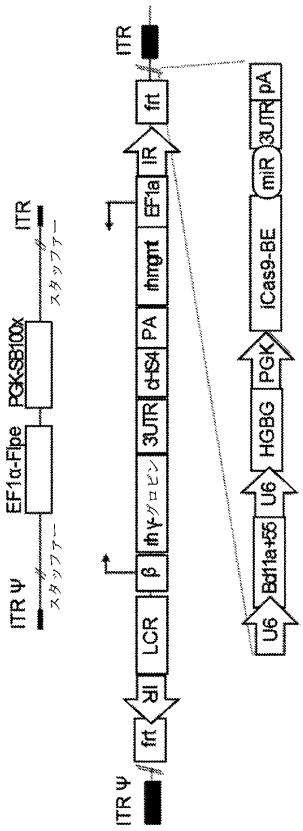
【図１２０Ａ】



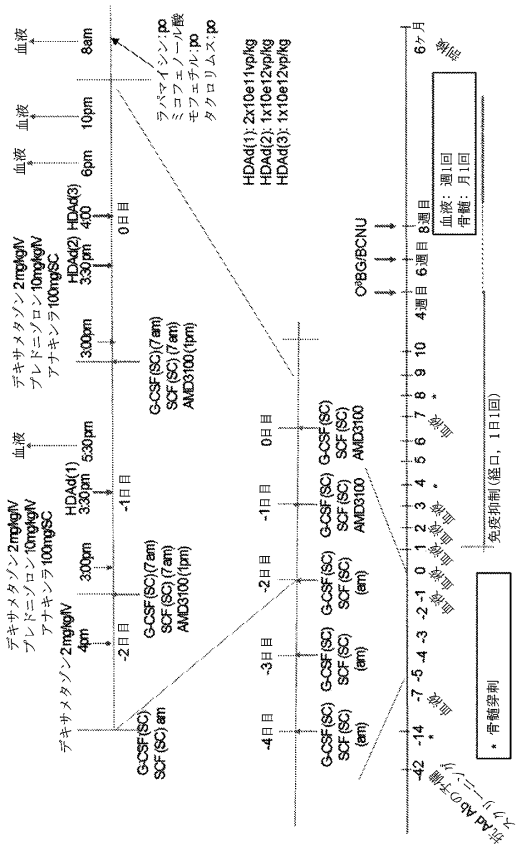

【図１２０Ｂ】



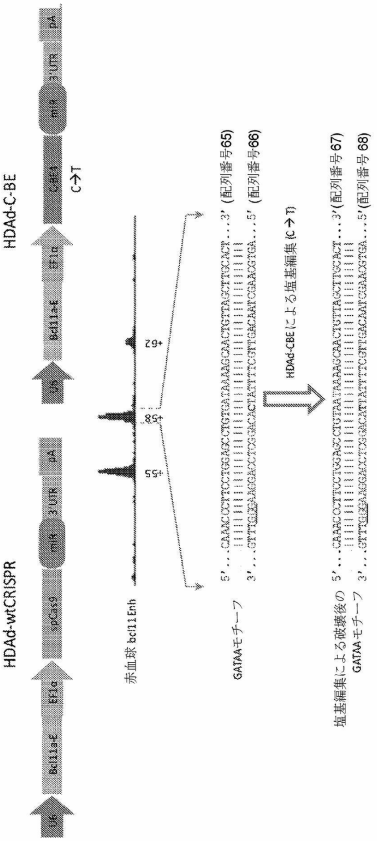

【図１２１】



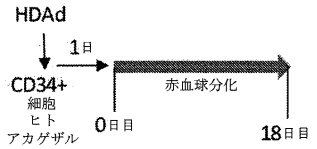
【図１２２】



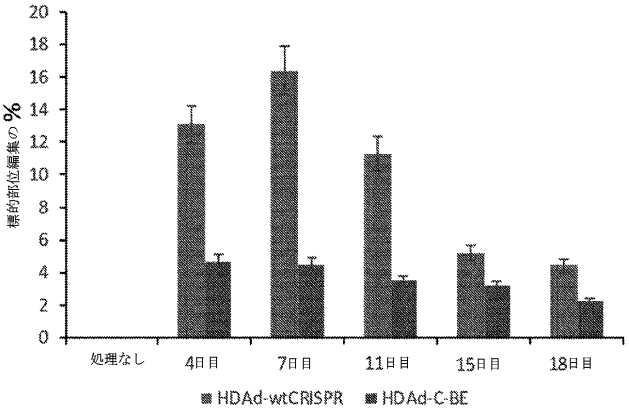

【図１２３】



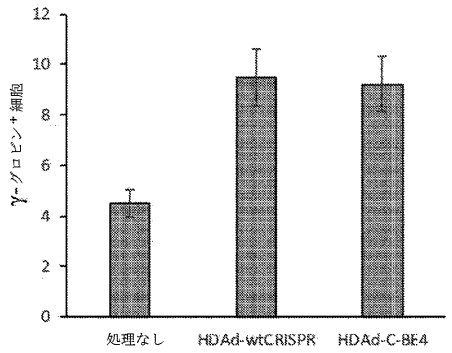

【図１２４Ａ】



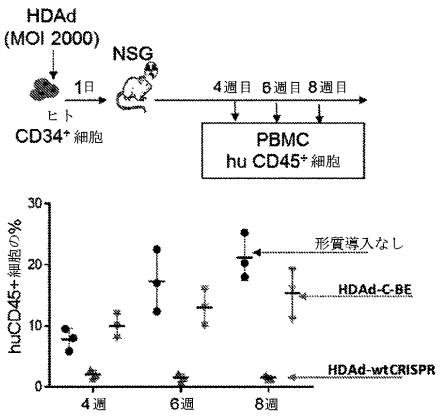

【図１２４Ｂ】



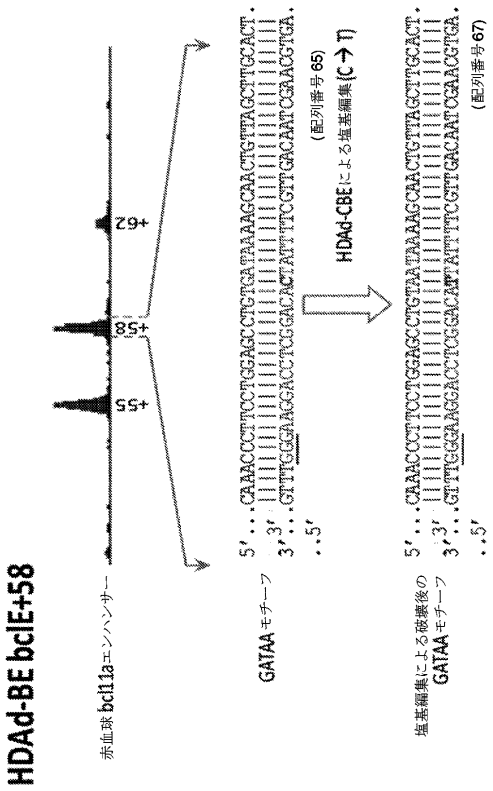
【図１２４Ｃ】




【図１２５】

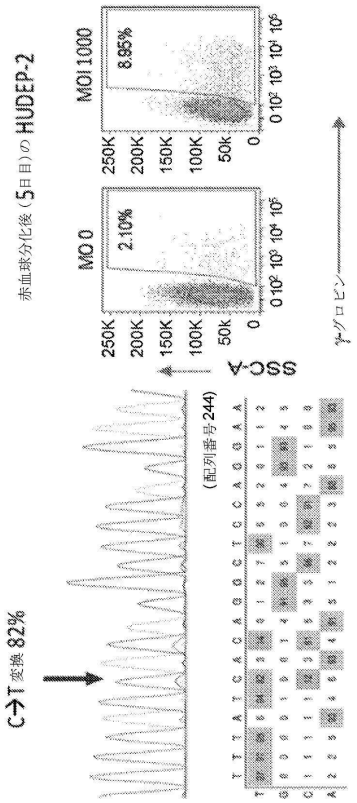



【図１２６－１】



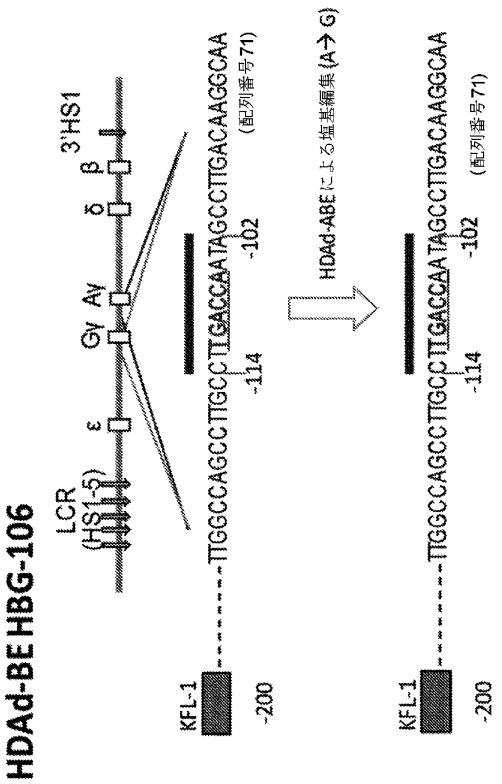

【図１２６－２】

（続き）



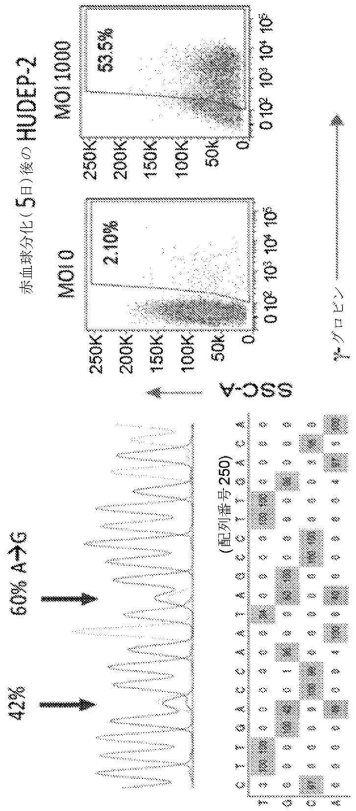
【図１２６－３】

（続き）

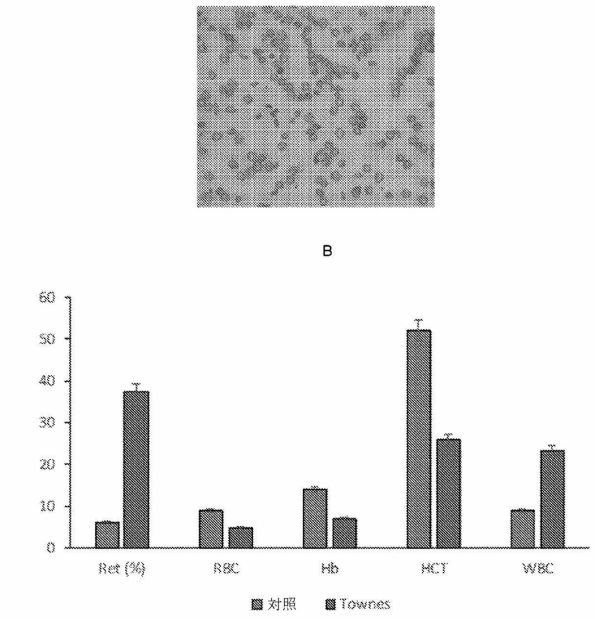



【図１２６－４】

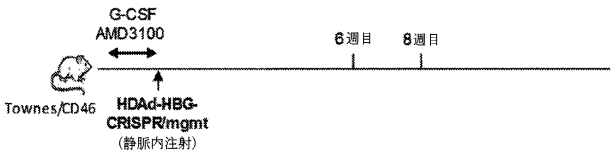
（続き）



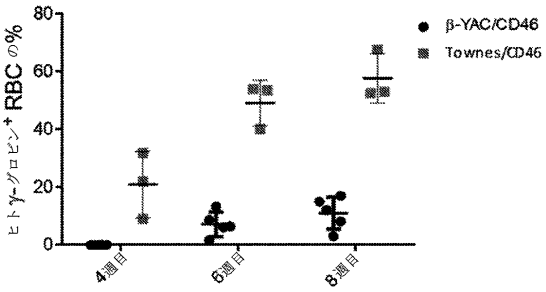

【図１２７】



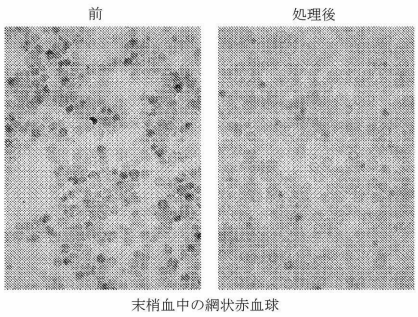

【図１２８Ａ】



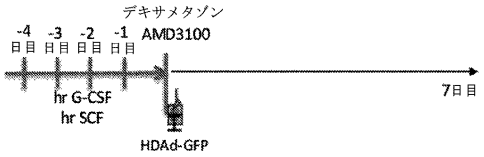
【図１２８Ｂ】



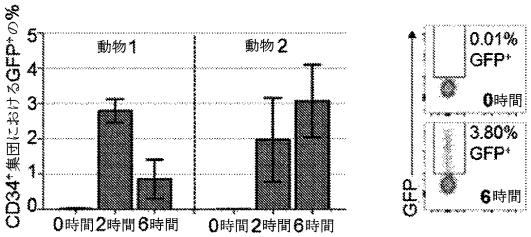

【図１２８Ｃ】



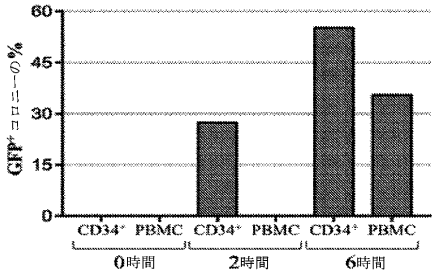

【図１２９Ａ】



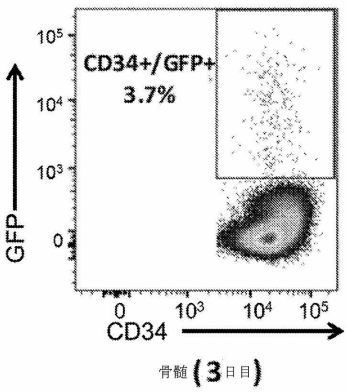

【図１２９Ｂ】



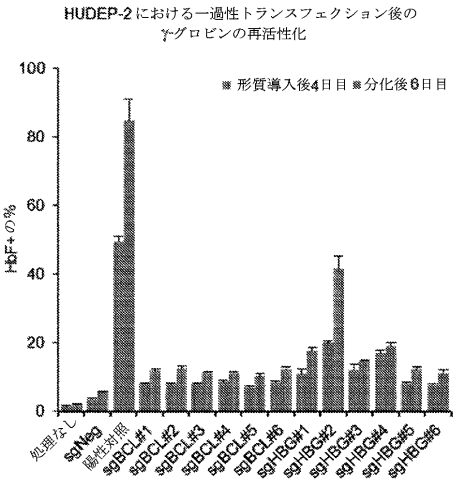

【図１２９Ｃ】



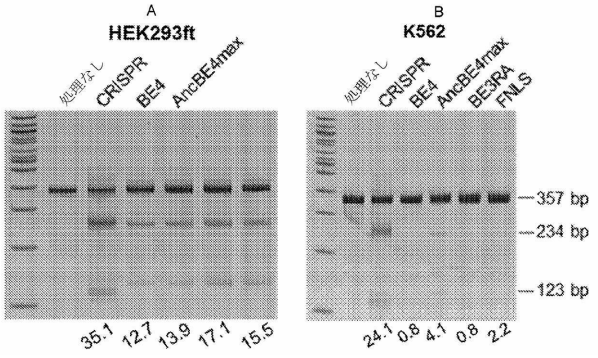

【図１２９Ｄ】



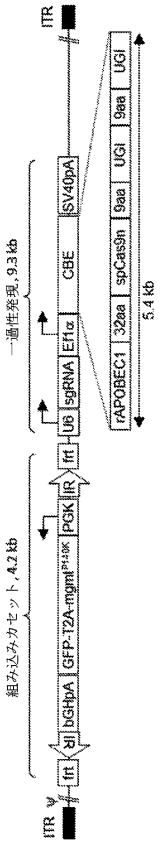
【図１３０】



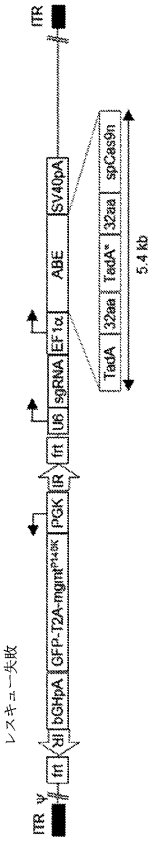

【図１３１】




【図１３２Ａ】



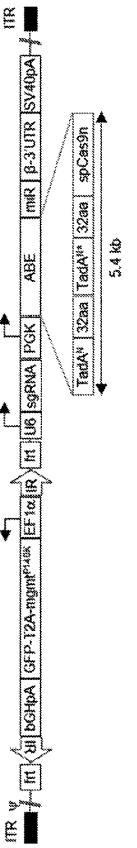

【図１３２Ｂ】



【図１３２Ｃ】

```
TadA*-32aa    1 TCTGAAGTGAGTTCAGCCACGAGTATTGGATGAGGCACGCACTGACCTTGGCAAAACGAGCCTGGGACG
TadA*-32aa    1 .....G..G.....TTC.............C.........A..T..C.............C..GA.G..AC.C..T.

TadA*-32aa   71 AAAGAGAAGTCCCCGTCGGCGCCGTGCTGGTGCACAACAATCGCGTGATCGGAGAAGGATGGGACAGGCC
TadA*-32aa   71 .G..G..G..G..T..G..A.....................TG.......A.A.........C..G..C.........AG.

TadA*-32aa  141 AATCGGACGCCACGACCCTACCGCACACGCAGATCATGGCACTGAGGCAGGGAGGACTGGTCATGCAG
TadA*-32aa  141 C.....C.TG.........A..A..C..T..C..A..T.....C.....A.....C..C.............

TadA*-32aa  211 AATTATCGCCTGATCGATCGCACCCTGTATGTGACACTGGAGCCATGCGTGATGTGCGCAGGAGCAATGA
TadA*-32aa  211 ..C..CA.A.....T..C.............C.......T.C.....T.....................C..C..C....

TadA*-32aa  281 TCCACAGCCGGATCGGGAAGAGTGGTGTTCGGAGCACGAGACGCCAAGACCGGAGCAGGCAGCCTGAT
TadA*-32aa  281 .....TCTA.......CC.C.........T..C.TGA.GA.T..A..A..T..C..C.......TCT.....

TadA*-32aa  351 GGATGTGCTGCACCACCCAGGCATGAACCACGGGTGGAGATCACAGAGGGCATCCTGCCAGACGAGTGC
TadA*-32aa  351 ...C.........T....C.........T...A.A..C..A..T..C.....A.............T..A..T

TadA*-32aa  421 GCCGCCCTGCTGAGCGATTTCTTTAGAATGAGGAGACAGGAGATCAAGGCCCAGAAGAAGGCACAGAGCT
TadA*-32aa  421 ..............T..T.........C.G...CCT.........T.T.T..T..T.............C.......

TadA*-32aa  491 CCACCGACTCTGGAGGCTCTAGCGGAGGATCCTCTGGAAGCGAGACACCAGGCACATCCGACGCCCAC
TadA*-32aa  491 .......TAG...C..A.........G..C.........CTCT.....C..T.....AG....AG...A..

TadA*-32aa  561 ACCAGAGTCTTCCGGCGGCTCCTCCGGAGGATCC (配列番号260)
TadA*-32aa  561 ...T..AAGCAG...G...AG.AG...G..GAG. (配列番号261)
```

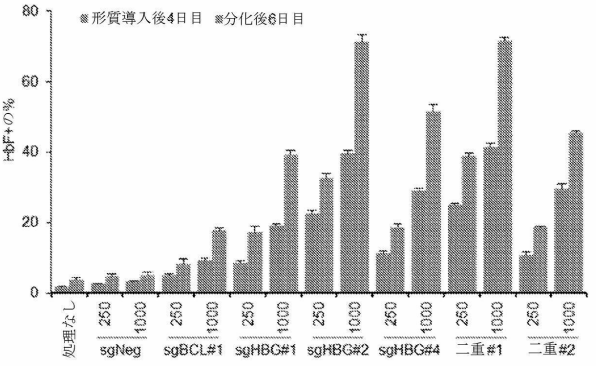
【図１３３Ａ】



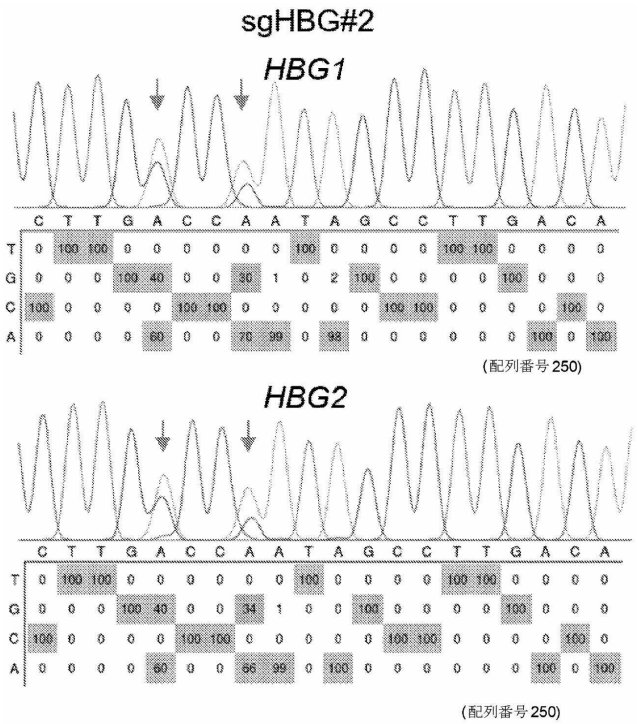

【図１３３Ｂ】

| 正式名称 | エディター | ガイドRNA | 収量 (× $10^{12}$ vp) |
|---|---|---|---|
| HDAd5/35++_BE4max-sgBCL#1-FI-mgmt/GFP | CBE | sgBCL#1 | 1.2 |
| HDAd5/35++_BE4max-sgHBG#1-FI-mgmt/GFP | CBE | sgHBG#1 | 0.8 |
| HDAd5/35++_ABEopti-sgHBG#2-FI-mgmt/GFP | ABE | sgHBG#2 | 3.8 |
| HDAd5/35++_ABEopti-sgHBG#4-FI-mgmt/GFP | ABE | sgHBG#4 | 2.8 |
| HDAd5/35++_BE4max-二重#1-FI-mgmt/GFP | CBE | sgBCL#1 + sgHBG#1 | 0.5 |
| HDAd5/35++_BE4max-sgNeg-FI-mgmt/GFP | CBE | sgNeg | 1.5 |

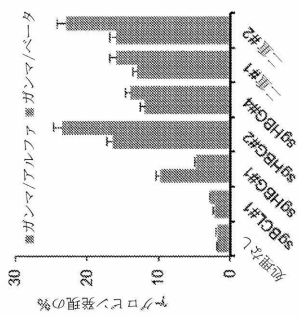
【図１３３Ｃ】



【図１３３Ｄ】

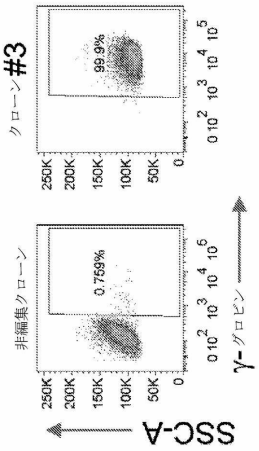



【図１３３Ｅ】

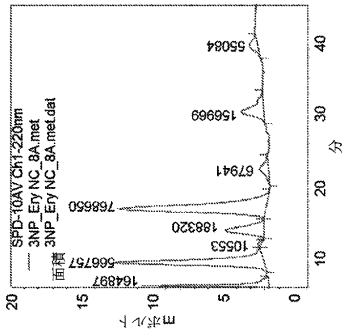



【図１３３Ｆ】

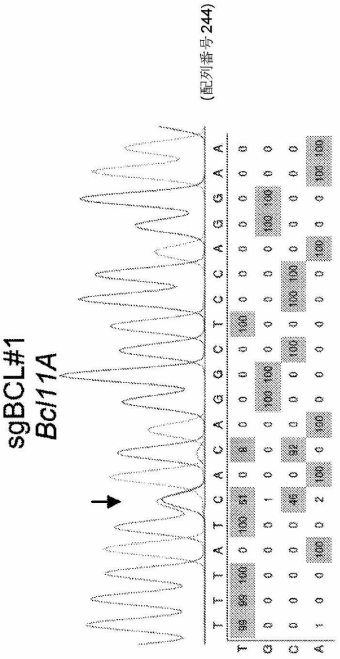
【図１３３Ｇ】



【図１３３Ｈ】

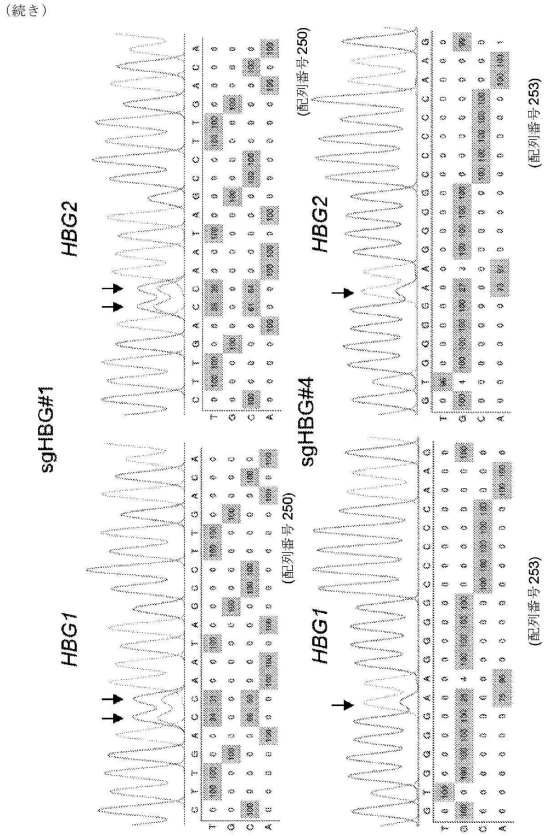



【図１３４Ａ－１】

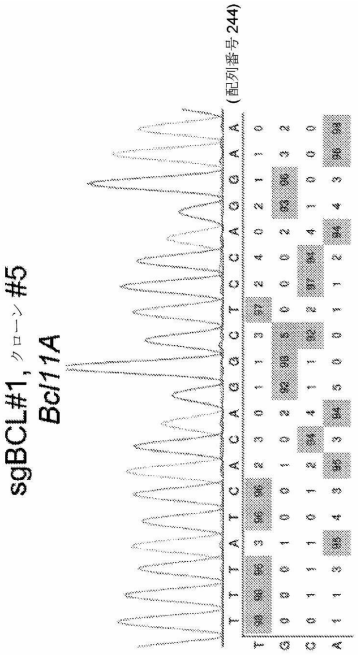



【図１３４Ａ－２】

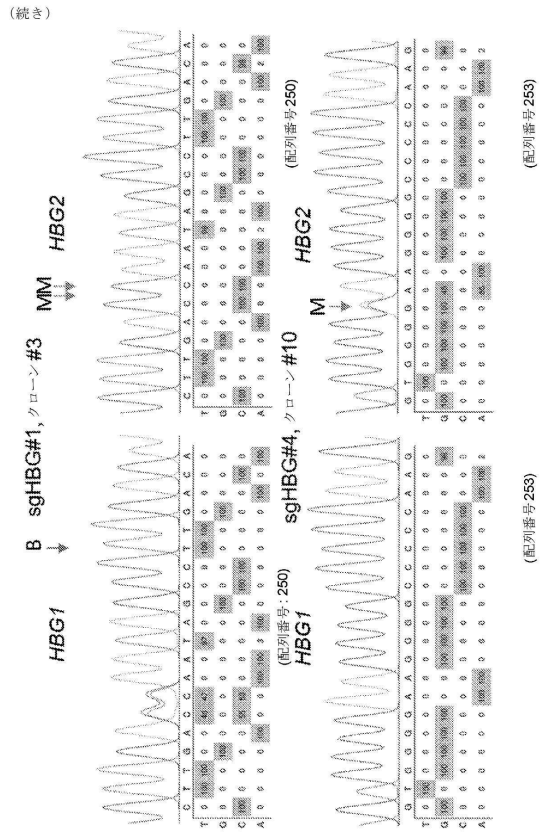
(続き)



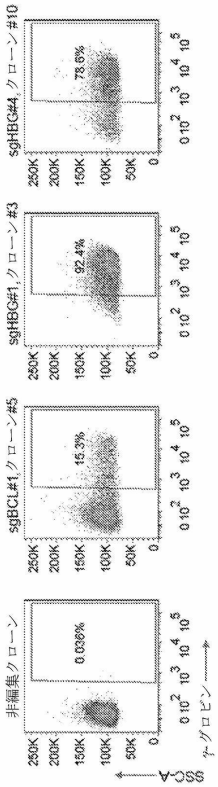

【図１３４Ｂ－１】



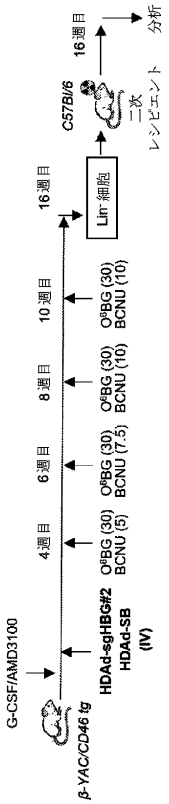
【図１３４Ｂ－２】



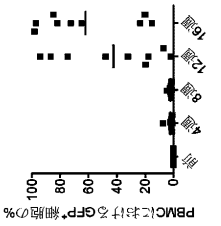

【図１３４Ｃ】



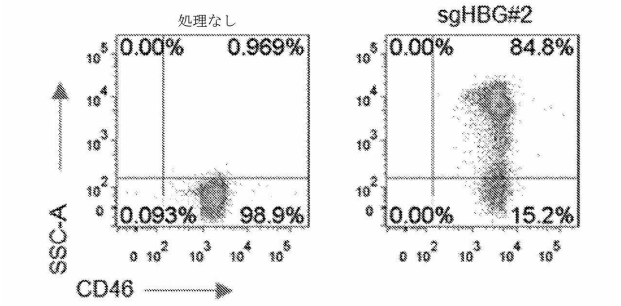

【図１３５Ａ】



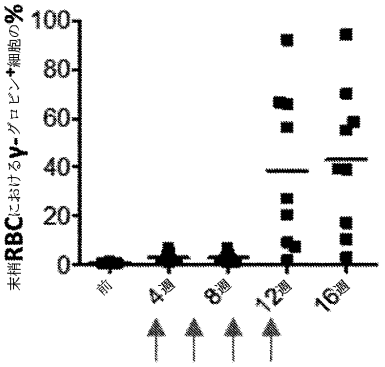

【図１３５Ｂ】



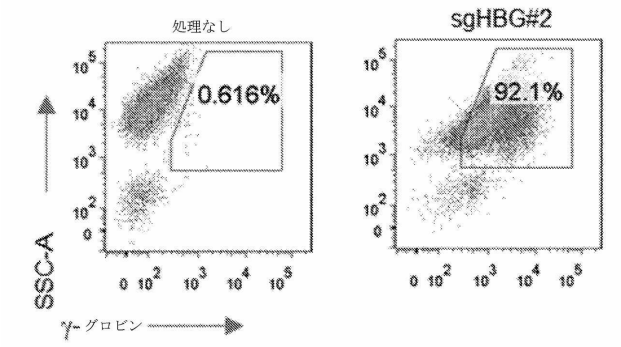
【図１３５Ｃ】



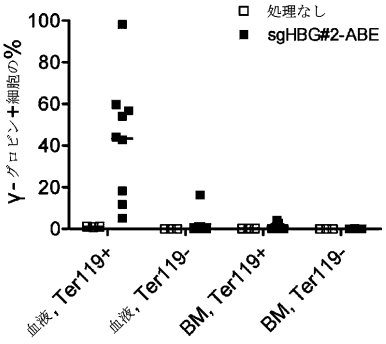

【図１３５Ｄ】



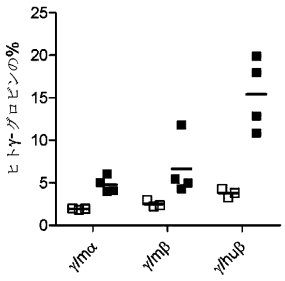

【図１３５Ｅ】



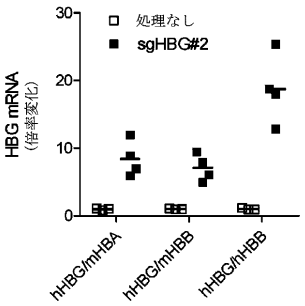

【図１３５Ｆ】



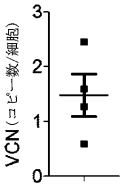

【図１３５Ｇ】



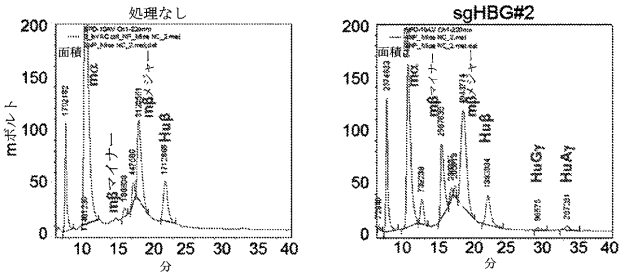

【図１３５Ｈ】



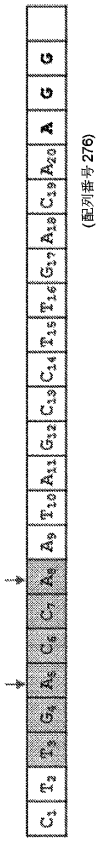
【図１３５Ｉ】



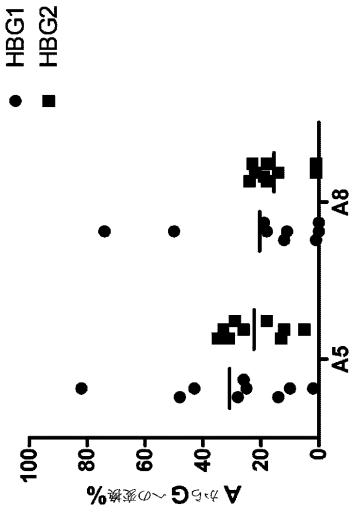

【図１３６】



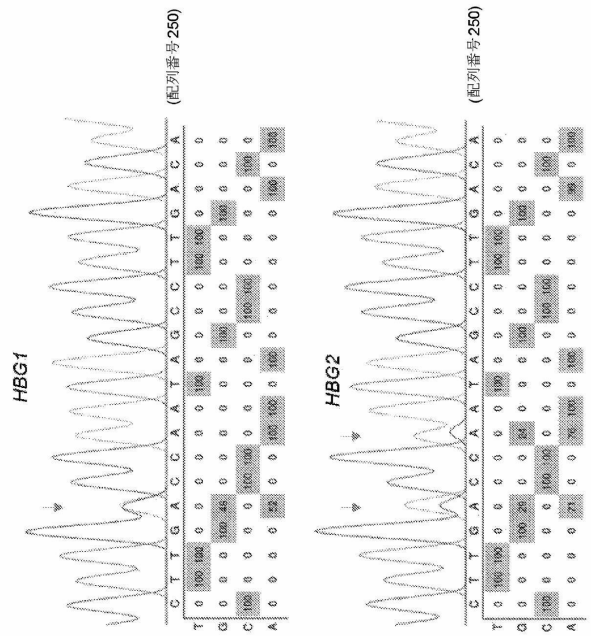

【図１３７Ａ】



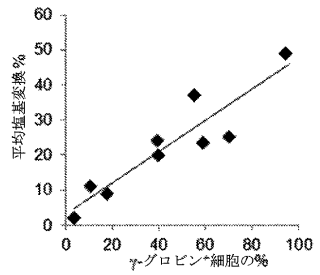

【図１３７Ｂ】



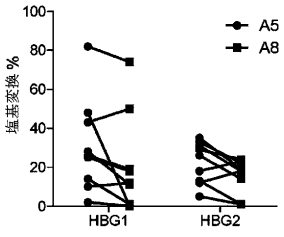
【図１３７Ｃ】



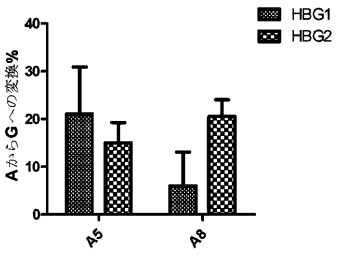

【図１３７Ｄ】



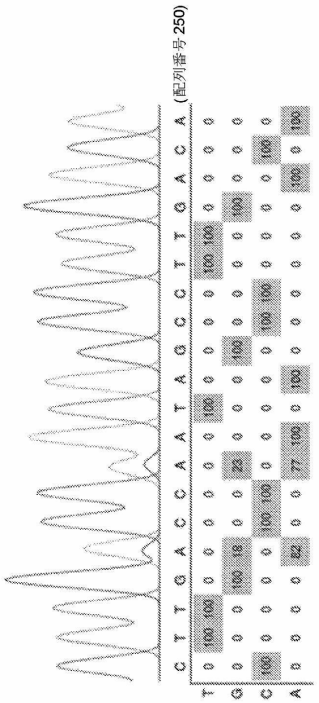

【図１３７Ｅ】



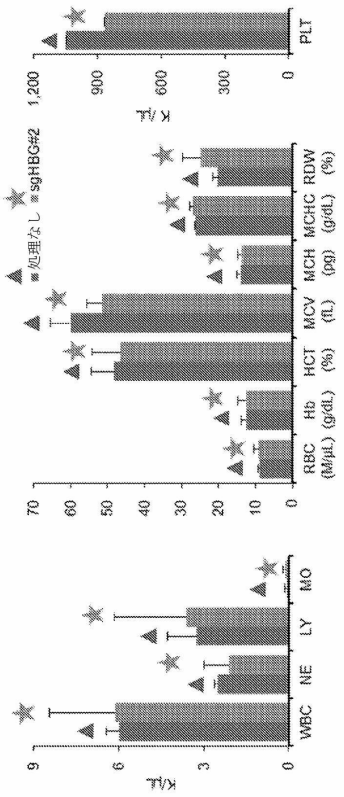

【図１３７Ｆ】



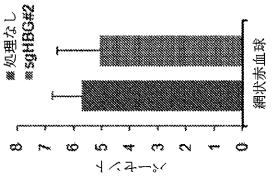
【図１３７Ｇ】



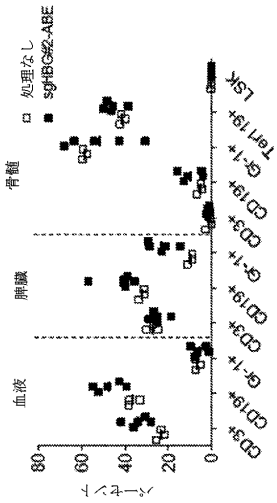

【図１３８Ａ】



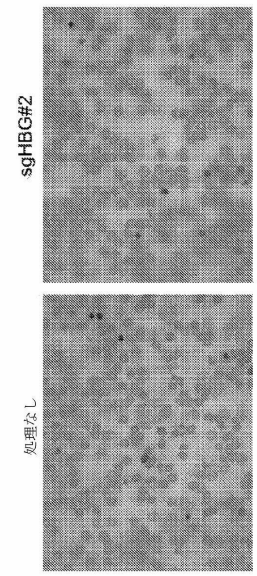

【図１３８Ｂ】



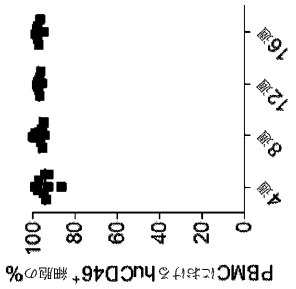

【図１３８Ｃ】



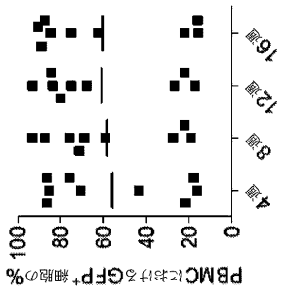
【図１３８Ｄ】



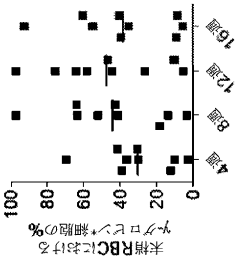

【図１３９Ａ】



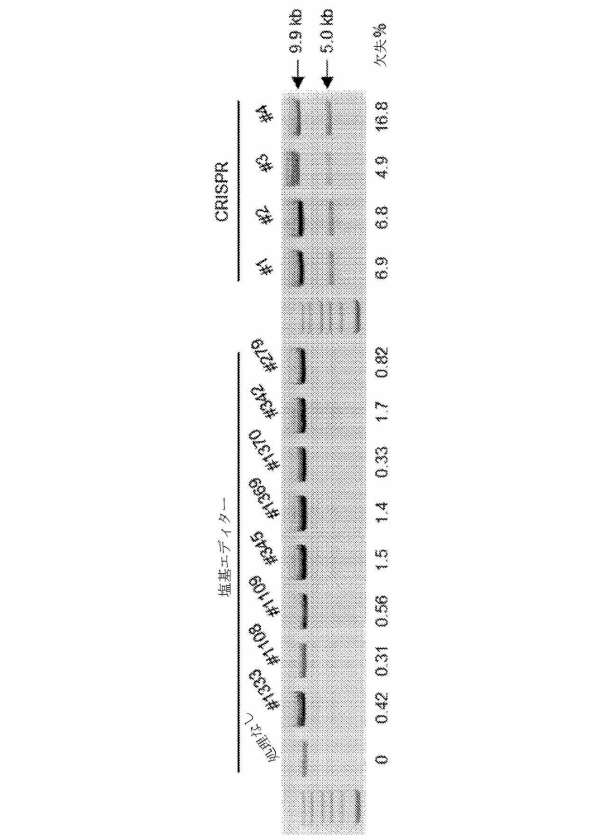

【図１３９Ｂ】



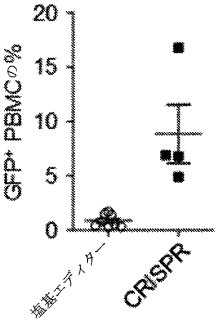

【図１３９Ｃ】



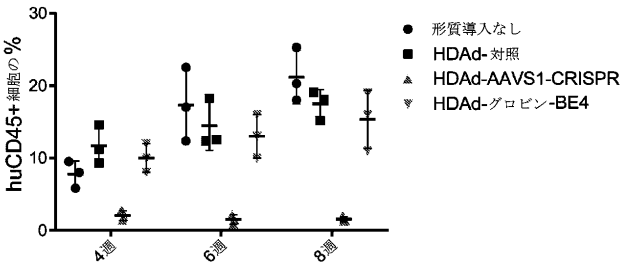
【図１４０Ａ】



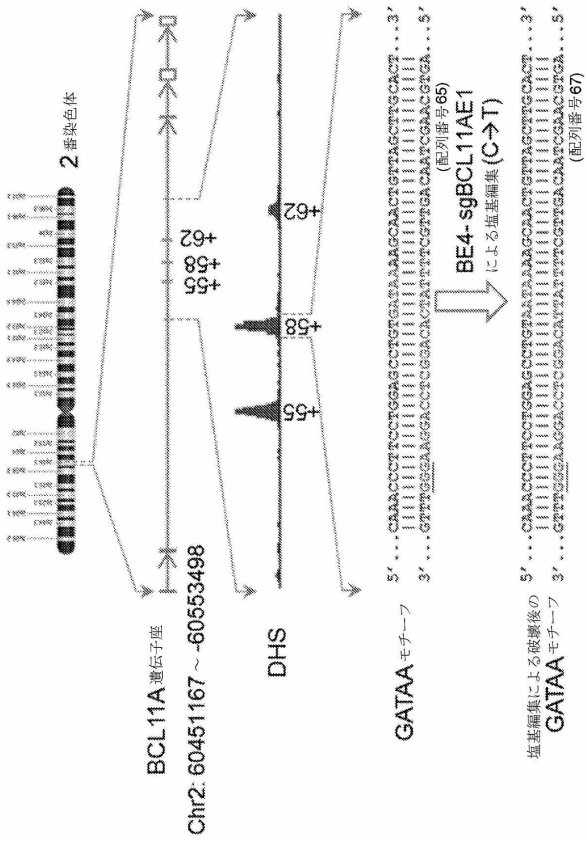

【図１４０Ｂ】



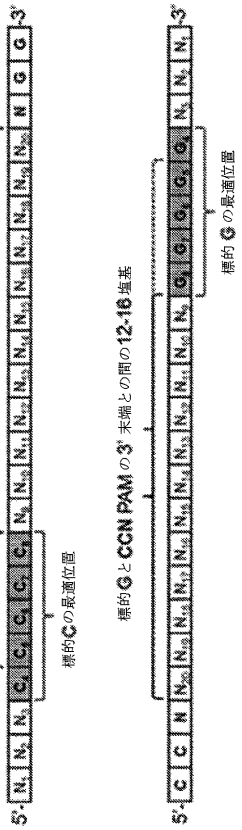

【図１４１】



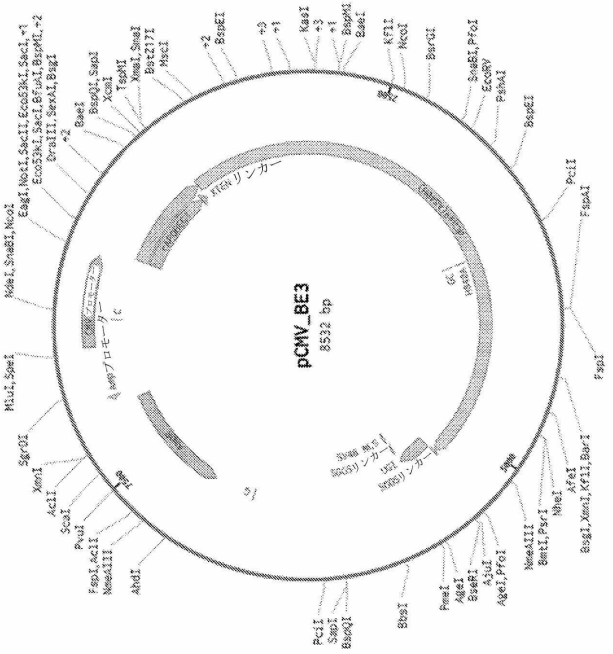

【図１４２】



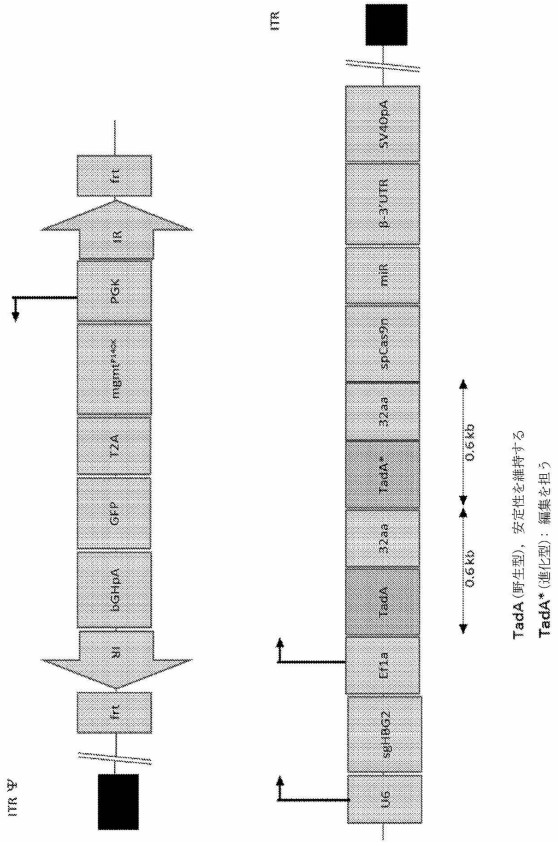
【図１４３】



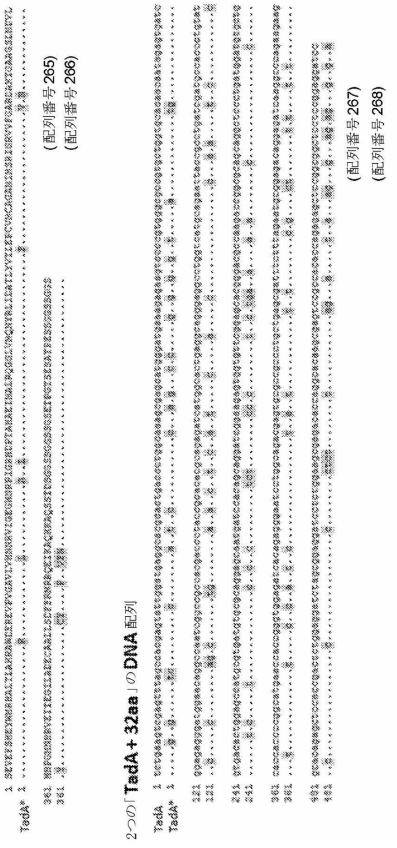

【図１４４】



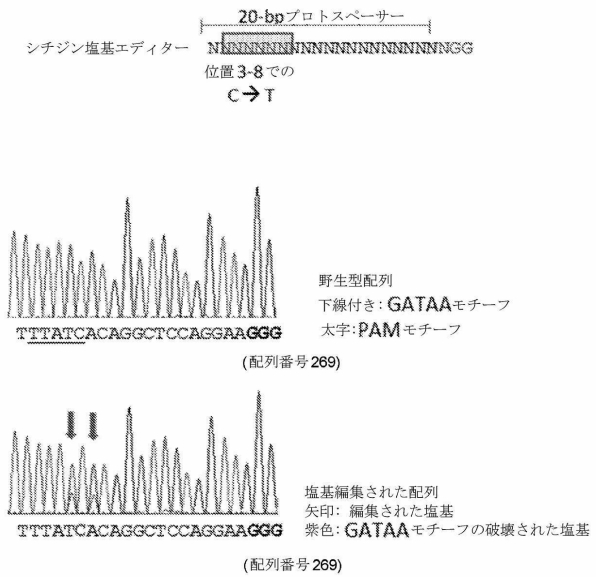

【図１４５】



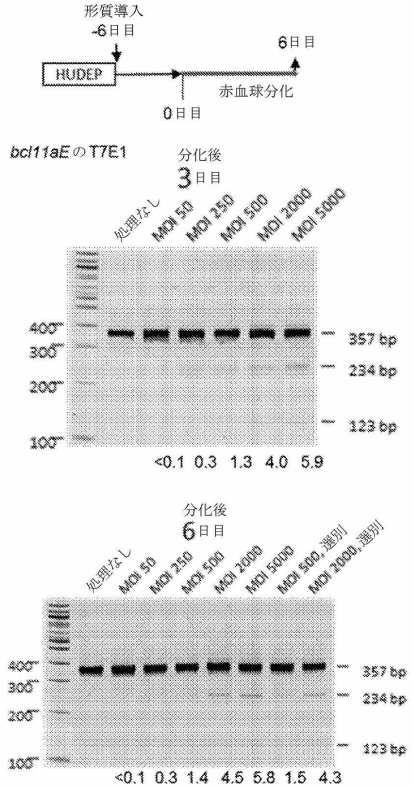

【図１４６】



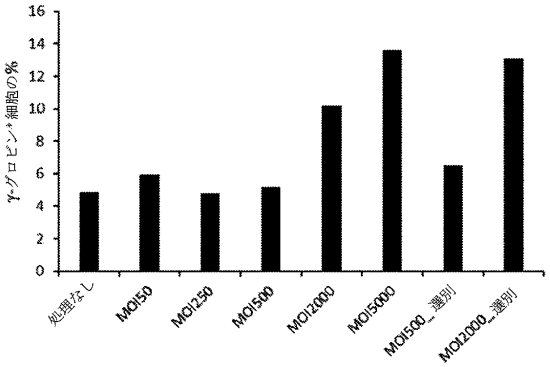
【図１４７】




【図１４８】




【図１４９】




【図１５０】

塩基編集による**HbF**の再活性化

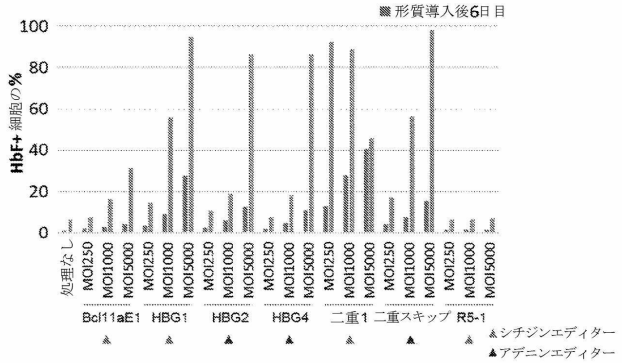
シチジン塩基エディター：C→T
アデニン塩基エディター：A→G

構築ベクター：

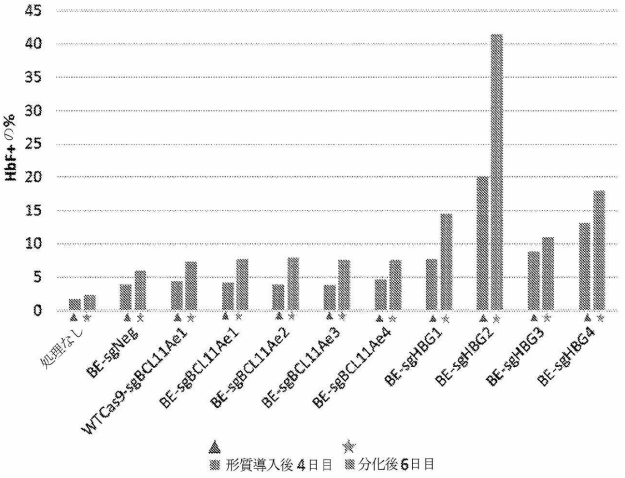
| | |
|---|---|
| pBS-AncBE4max-sgBCL11AE1 | +58 GATAモチーフ, G --> A |
| pBS-AncBE4max-sgBCL11AE2 | +58 GATAモチーフ, G --> A |
| pBS-ABEmax-sgBCL11AE3 | +58 GATAモチーフ, T --> C |
| pBS-ABEmax-sgBCL11AE4 | +58 GATAモチーフ, T --> C |
| pBS-AncBE4max-sgHBG1 | 13bp欠失, CCAATボックス, CC --> TT |
| pBS-ABEmax-sgHBG2 | 13bp欠失, CCAATボックス, A --> G |
| pBS-ABEmax-sgHBG3 | 13bp欠失, CCAATボックス, T --> C |
| pBS-ABEmax-sgHBG4 | -198 T --> C |
| pBS-AncBE4max-sgR5-1 | 対照 |

【図１５１】

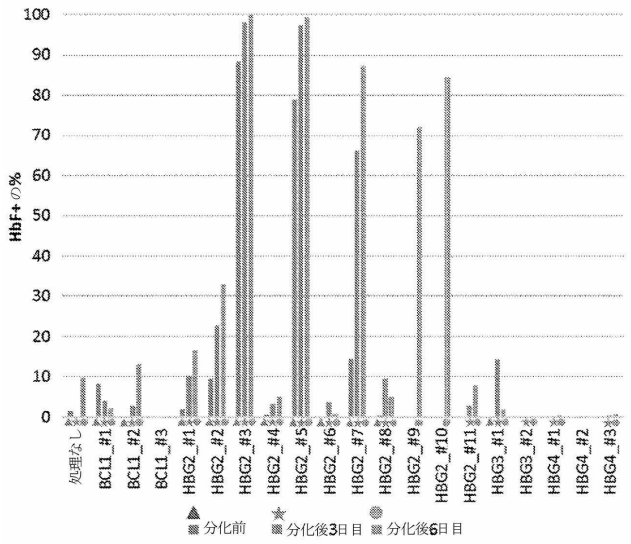
| 日付 | 正式名称 | 力価 | 注記 |
|---|---|---|---|
| 101918-3 | HDAd5/35++_BE4max-sgBCL11Ae1-FI-mgmtGFP | 0.5 x 10e12 | |
| → 041619-2 | HDAd5/35++_BE4max-sgHBG1-FI-mgmtGFP | 非常に低い(0.05x10e12として使用) | |
| → 032819-1 | HDAd5/35++_ABEopti-sgHBG2-FI-mgmtGFP | 2.8 x 10e12 | |
| → 041819-1 | HDAd5/35++_ABEopti-sgHBG4-FI-mgmtGFP | 1.52 x 10e12 | |
| → 041619-3 | HDAd5/35++_BE4max-二重1-FI-mgmtGFP | 非常に低い(0.05x10e12として使用) | sgBcl1 + sgHBG1 |
| 041619-1 | HDAd5/35++_ABEopti-二重-スキップ-FI-mgmtGFP | 2.5 x 10e12 | sgHBG2 + sgHBB-停止非 |
| 041819-2 | HDAd5/35++_BE4max-sgR5-1-FI-mgmtGFP | 0.9 x 10e12 | 標的指向性対照 |



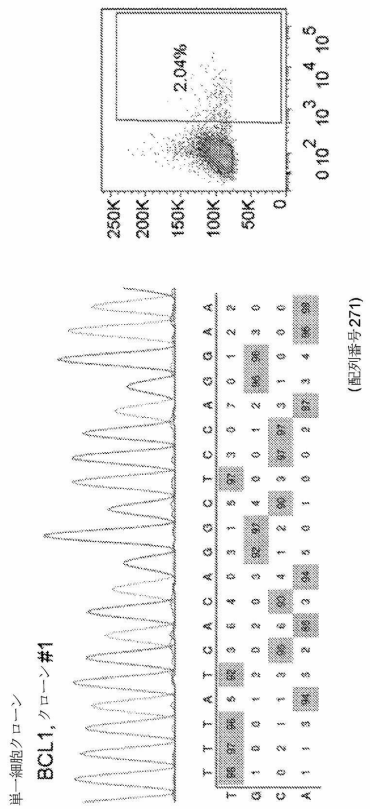

【図１５２】



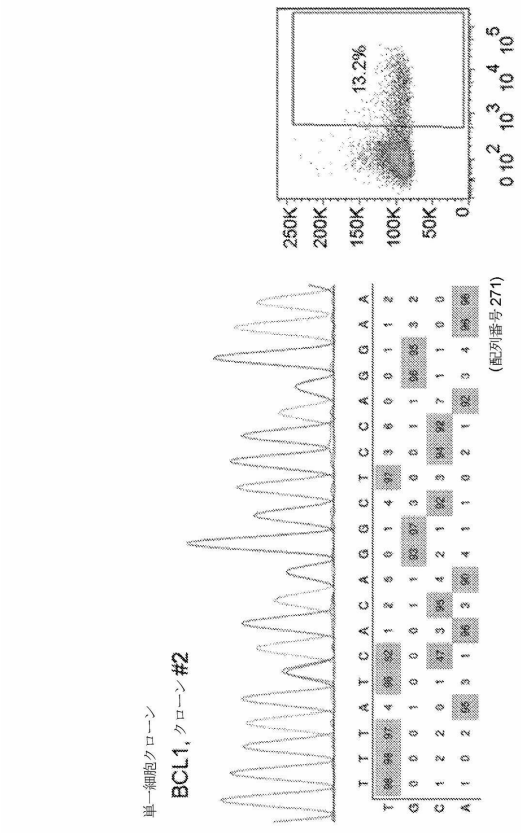

【図１５３】



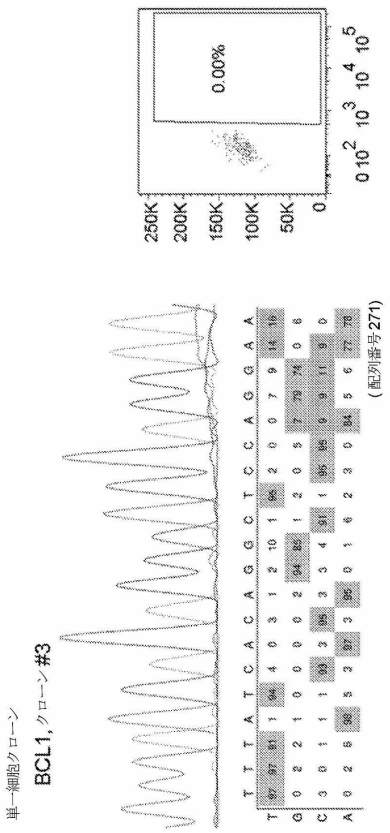

【図１５４Ａ】



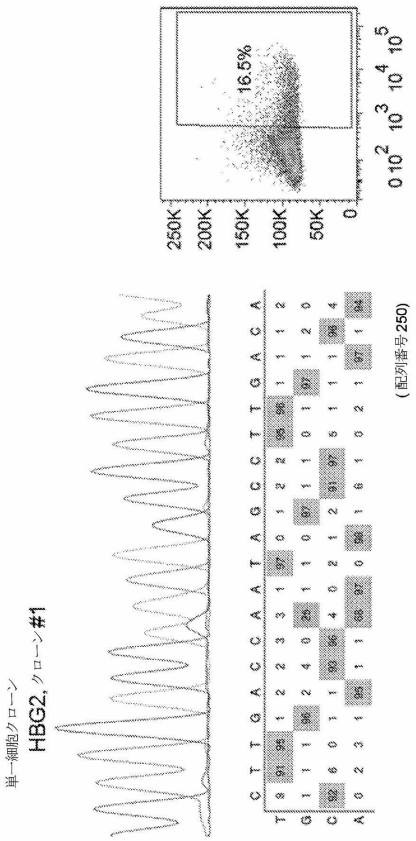
【図１５４Ｂ】



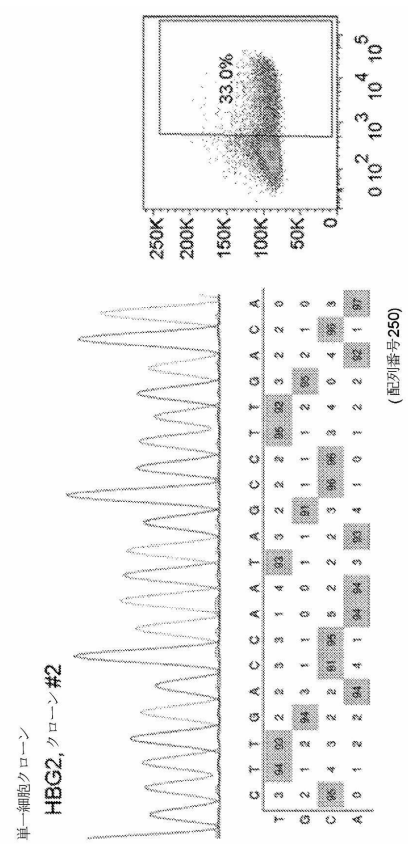

【図１５４Ｃ】



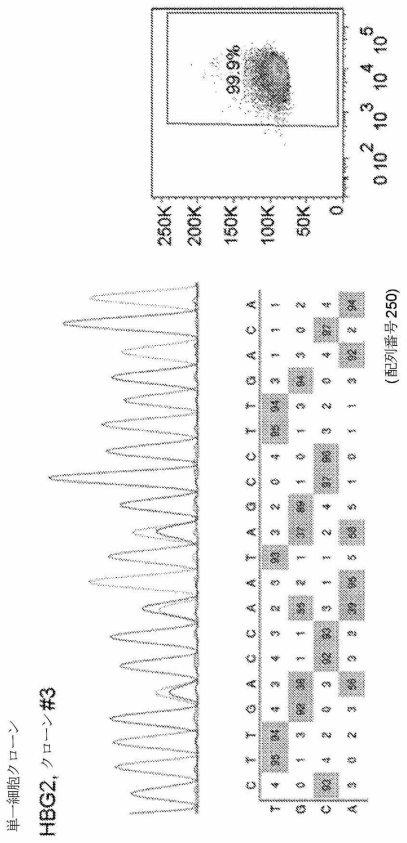

【図１５４Ｄ】



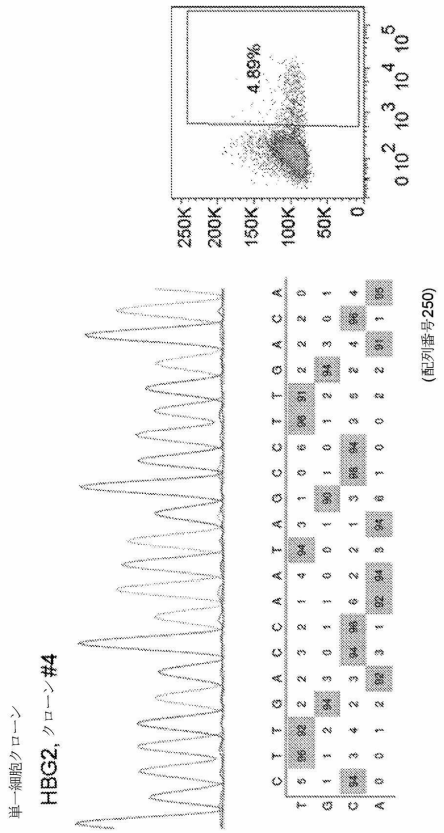

【図１５４Ｅ】



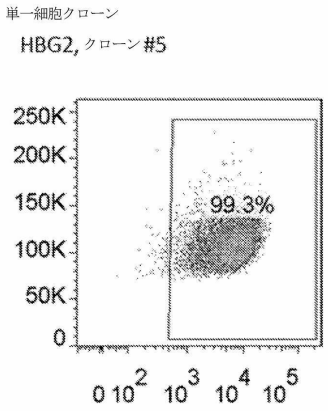
【図１５４Ｆ】



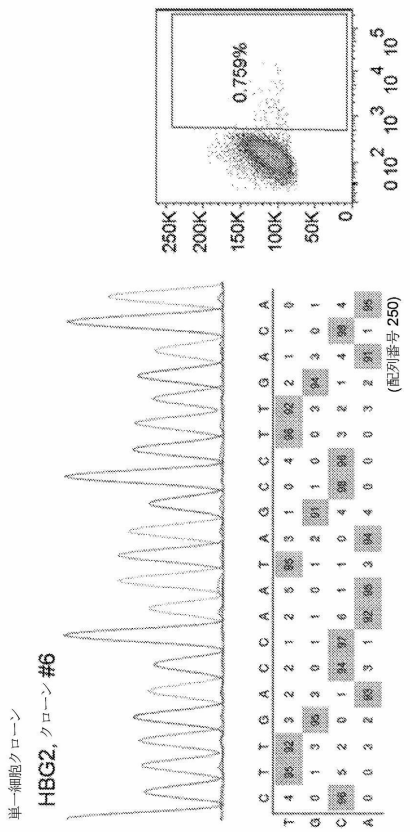

【図１５４Ｇ】



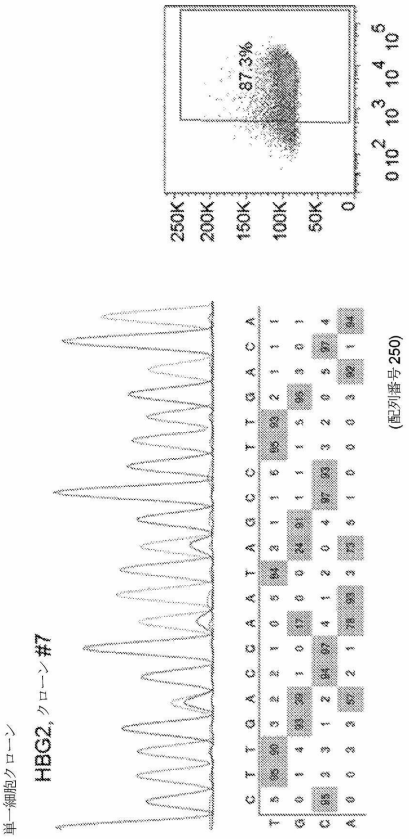

【図１５４Ｈ】



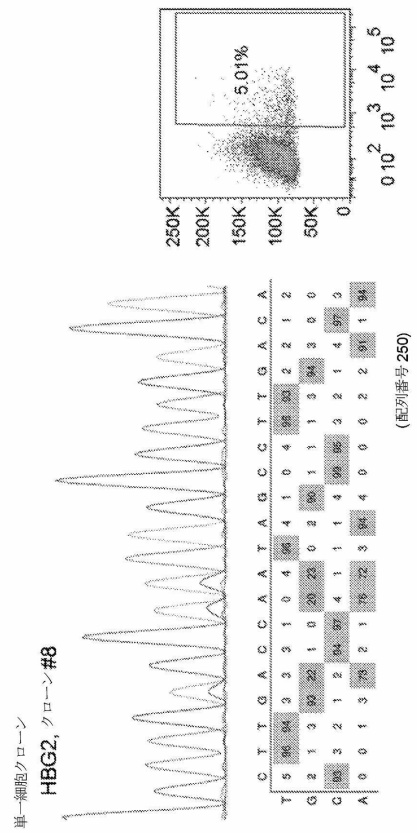

【図１５４Ｉ】



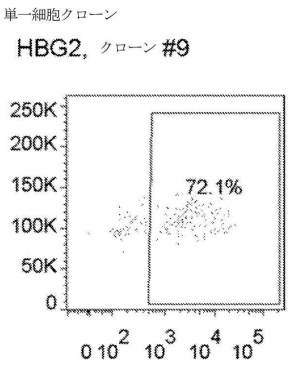
【図１５４Ｊ】



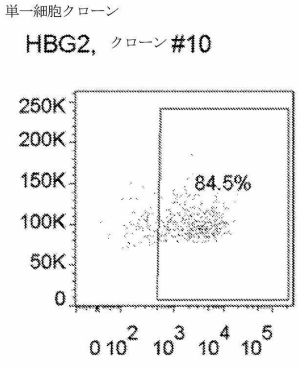

【図１５４Ｋ】



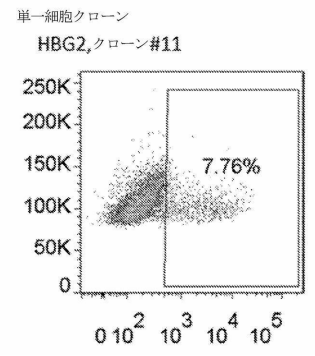

【図１５４Ｌ】



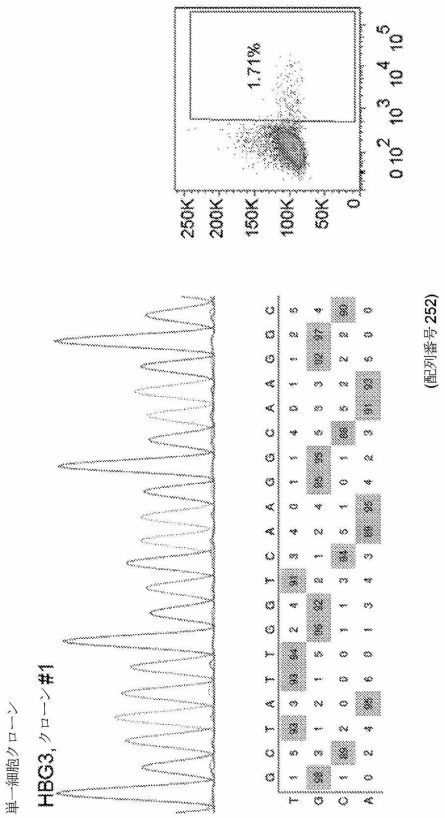

【図１５４Ｍ】



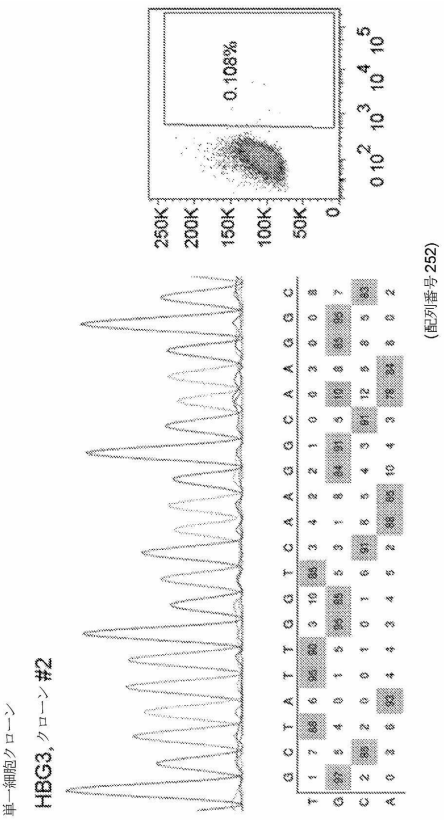
【図１５４Ｎ】



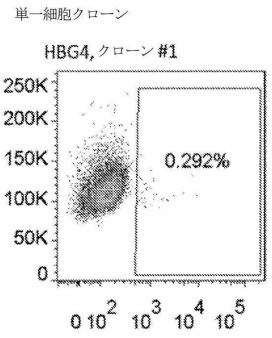

【図１５４Ｏ】



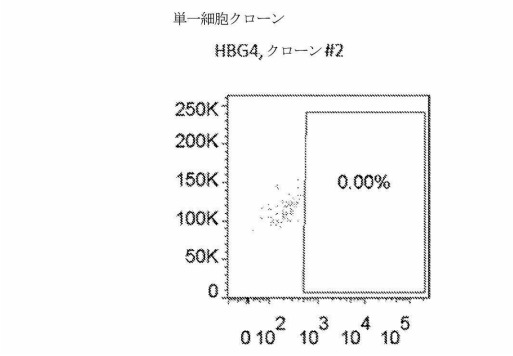

【図１５４Ｐ】



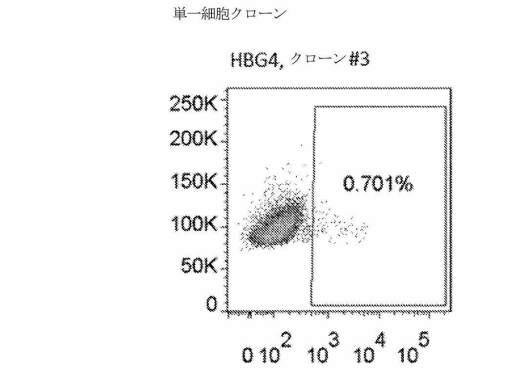

【図１５４Ｑ】



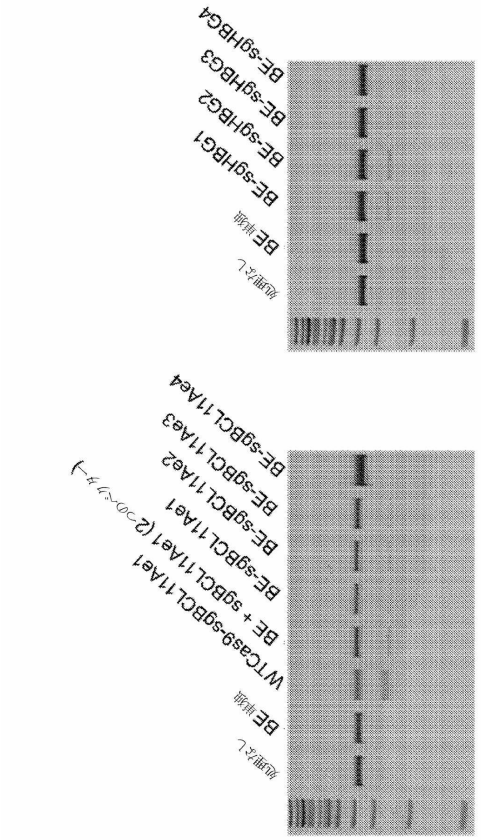
【図１５４Ｒ】



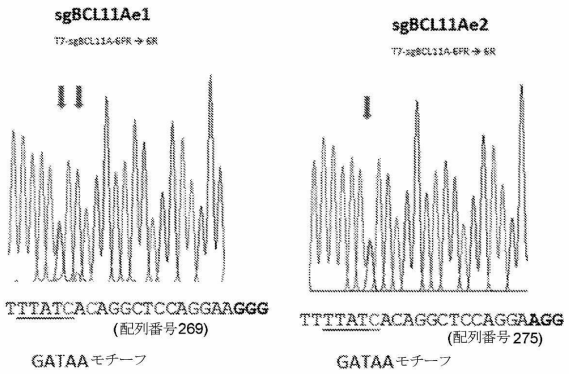

【図１５４Ｓ】



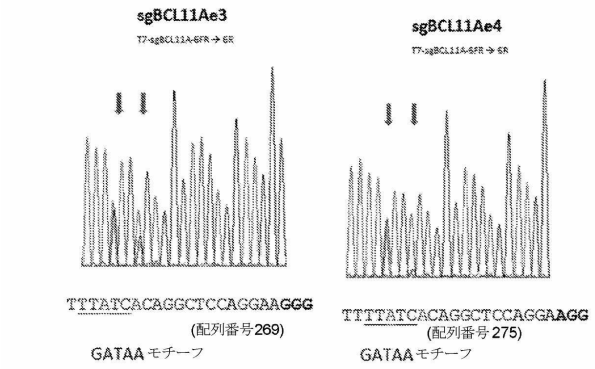

【図１５５】



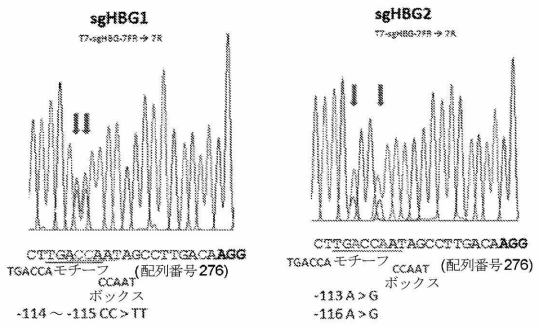

【図１５６Ａ】



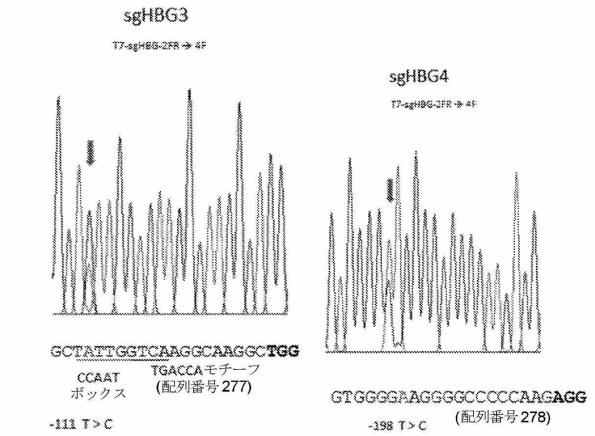
【図１５６Ｂ】



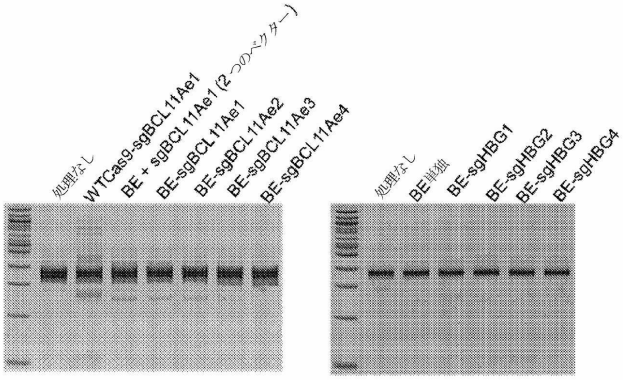

【図１５６Ｃ】



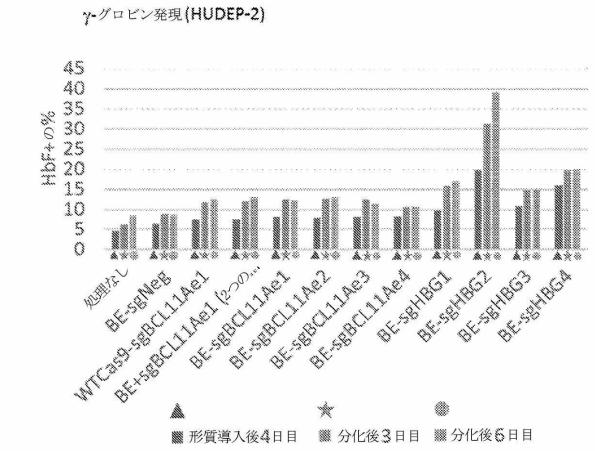

【図１５６Ｄ】



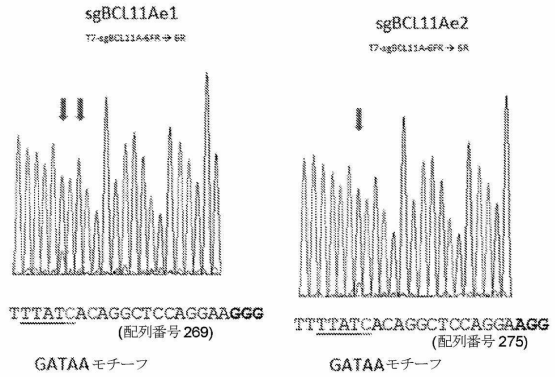

【図１５７】



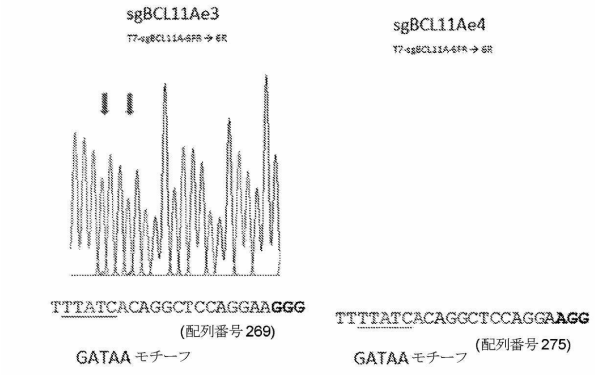

【図１５８】



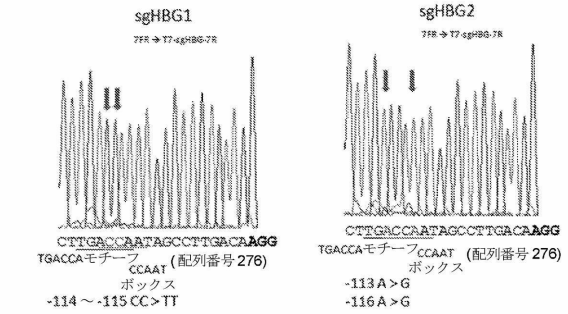

【図１５９Ａ】



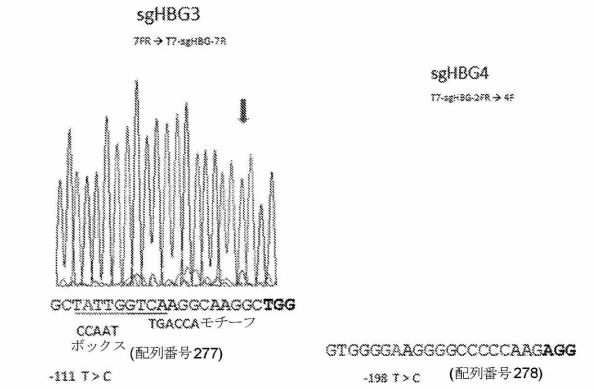
【図１５９Ｂ】




【図１５９Ｃ】




【図１５９Ｄ】

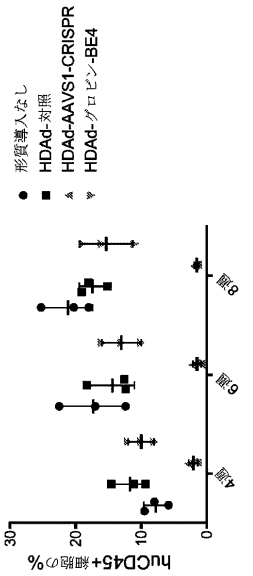



【図１６０】

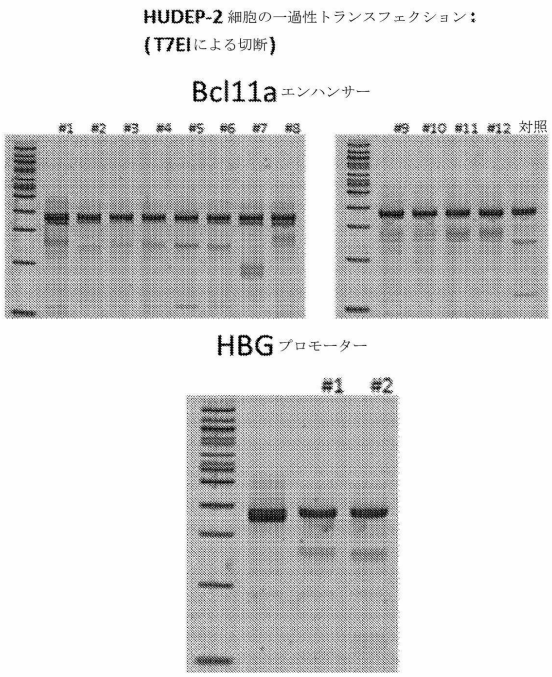
HDAd ウイルス産生（最大調製下でのもの）のために選択したコンストラクト

| 構築ベクター： | | 対応 Ad コンストラクト： |
|---|---|---|
| pBS-AncBE4max-sgBCL11AE1 | +58 GATA モチーフ，G -> A | pHCA-BE4max-sgBCL11Ae1-FI-mgmt/GFP |
| pBS-AncBE4max-sgBCL11AE2 | +58 GATA モチーフ，G -> A | |
| pBS-ABEmax-sgBCL11AE3 | +58 GATA モチーフ，T -> C | |
| pBS-ABEmax-sgBCL11AE4 | +58 GATA モチーフ，T -> C | |
| pBS-AncBE4max-sgHBG1-1 | 13bp 欠失，CCAAT ボックス，CC -> TT | pHCA-ABEmax-sgHBG2-FI-mgmt/GFP |
| pBS-ABEmax-sgHBG1-2 | 13bp 欠失，CCAAT ボックス，A -> G | |
| pBS-ABEmax-sgHBG1-3 | 13bp 欠失，CCAAT ボックス，T -> C | pHCA-ABEmax-sgHBG4-FI-mgmt/GFP |
| pBS-ABEmax-sgHBG1-4 | -198 T -> C | |
| pBS-AncBE4max-sgRS-1 | 対照 | pHCA-BE4max-sgRS-1-FI-mgmt/GFP（対照） |

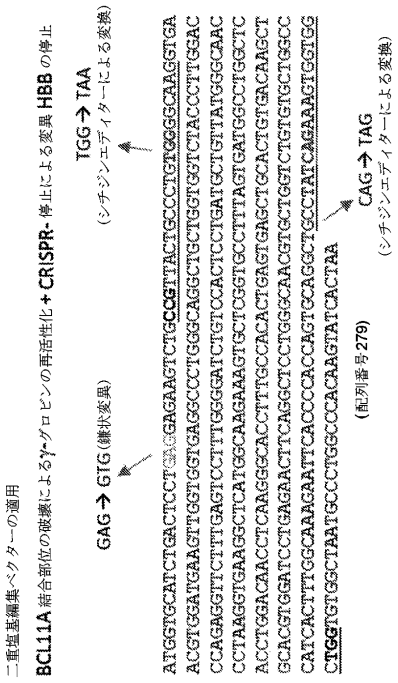
【図１６１】



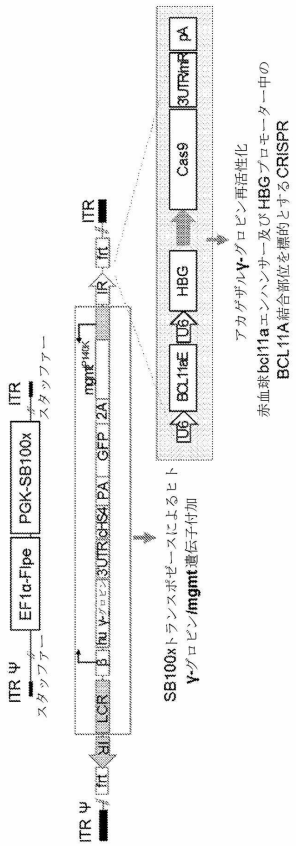

【図１６２】



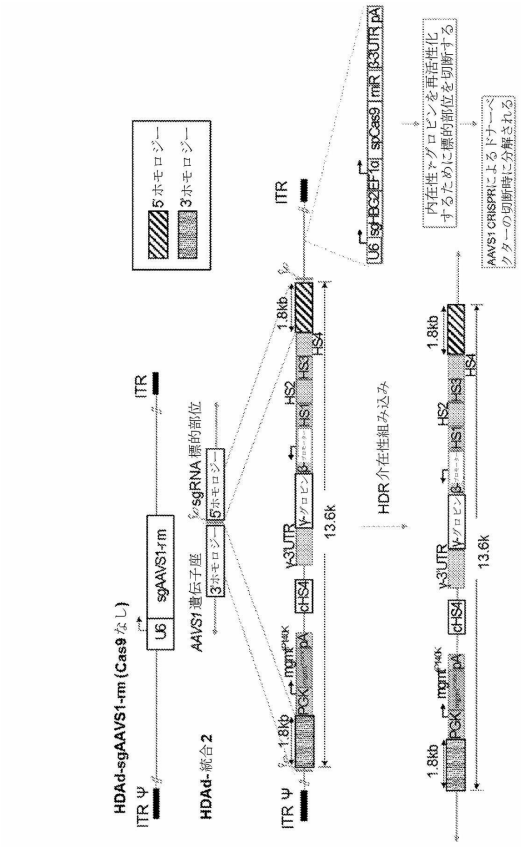

【図１６３】



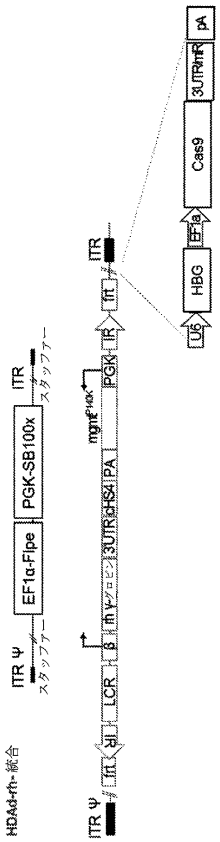

【図１６４】



【図１６５】




【図１６６】




【配列表】

<u>2022539248000001.app</u>

【国際調査報告】

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/040756

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/86 C12N15/90 C12N15/11 A61K48/00
ADD.

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)
C12N A61K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X | WO 2017/189901 A1 (BAYLOR COLLEGE MEDICINE [US]) 2 November 2017 (2017-11-02) | 1-6,11, 13,16, 20,28, 29,32, 44,45,47 |
| Y | claims; examples | 1-13, 15-35, 37-58 |

-----
-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] 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

"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 15 October 2020 | 15/12/2020 |

| Name and mailing address of the ISA/ | Authorized officer |
|---|---|
| European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016 | Sommer, Birgit |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/040756

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X | WANG H ET AL: "In vivo hematopoietic stem cell gene therapy ameliorates murine thalassemia intermedia", THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 129, no. 2, 18 December 2018 (2018-12-18), pages 598-615, XP055738229, GB ISSN: 0021-9738, DOI: 10.1172/JCI122836 abstract; page 599, left-hand column, paragraph 2-3; figures, results, discussion; ----- | 1-13, 15-35, 37-58 |
| Y | RICHTER M ET AL: "In Vivo Hematopoietic Stem Cell Transduction", HEMATOLOGY - ONCOLOGY CLINICS OF NORTH AMERICA, vol. 31, no. 5, 1 October 2017 (2017-10-01), pages 771-785, XP055738548, US ISSN: 0889-8588, DOI: 10.1016/j.hoc.2017.06.001 page 7 - page 10 ----- | 1-13, 15-35, 37-58 |
| Y | LI C ET AL: "Integrating HDAd5/35++ Vectors as a New Platform for HSC Gene Therapy of Hemoglobinopathies", MOLECULAR THERAPY - METHODS & CLINICAL DEVELOP, vol. 9, 1 June 2018 (2018-06-01), pages 142-152, XP055738248, GB ISSN: 2329-0501, DOI: 10.1016/j.omtm.2018.02.004 abstract, results, discussion, materials and methods, figure 1; ----- | 1-13, 15-35, 37-58 |
| Y,P | LI C ET AL: "Adenovirus vectors in hematopoietic stem cell genome editing", FEBS LETTERS, vol. 593, no. 24, 20 November 2019 (2019-11-20), pages 3623-3648, XP055738228, NL ISSN: 0014-5793, DOI: 10.1002/1873-3468.13668 abstract; figure 1; page 3625, right-hand column, paragraph 2 - page 3631, right-hand column, paragraph 3 ----- -/-- | 1-13, 15-35, 37-58 |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/040756

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| Y,P | Lieber A ET AL: "In vivo HSC gene therapy using HDAd5/35++ vectors", CGT Conference Booklet, 5th Conference on Cell & Gene Therapy for HIV Cure, August 22-23, 2019, Seattle, Washington, 22 August 2019 (2019-08-22), page 37, XP055740270, Retrieved from the Internet: URL:https://www.cgt4hivcure2019.org/wp-content/uploads/2020/06/CGT-Conference-Booklet-2019-082019-Print.pdf [retrieved on 2020-10-15] abstract<br>----- | 1-13, 15-35, 37-58 |
| Y,P | LIEBER A: "CGT4HIVCURE 2019: ANDRE LIEBER", , 28 November 2019 (2019-11-28), pages 1-4, XP054980998, Retrieved from the Internet: URL:https://www.youtube.com/watch?v=_2T_bwOUWhs [retrieved on 2020-10-13] the whole document<br>----- | 1-13, 15-35, 37-58 |
| Y | GAO W ET AL: "Human adenovirus type 35: nucleotide sequence and vector development", GENE THERAPY, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, GB, vol. 10, no. 23, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 1941-1949, XP008155597, ISSN: 0969-7128, DOI: 10.1038/SJ.GT.3302097 abstract, results, discussion, materials and methods;<br>----- | 1-13, 15-35, 37-58 |
| Y | WANG H ET AL: "In Vitro and In Vivo Properties of Adenovirus Vectors with Increased Affinity to CD46", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 82, no. 21, 1 November 2008 (2008-11-01), pages 10567-10579, XP055040580, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.01308-08 abstract, results, discussion, table 1;<br>----- | 11,12 |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2020/040756

**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.:
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:

see additional sheet

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 an 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.:

34(completely); 1-13, 15-33, 35, 37-58(partially)

**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.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (April 2005)

International Application No. PCT/ US2020/ 040756

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 34(completely); 1-13, 15-33, 35, 37-58(partially)

a recombinant Ad35 vector production system according to claim 1, wherein the heterologous expression product comprises a globin protein according to claim 13(a) and/or 13 (i) as well as subject-matter related thereto;

---

2. claims: 1-13, 16-33, 35, 37-58(all partially)

a recombinant Ad35 vector production system according to claim 1, wherein the heterologous expression product comprises an antibody or an immunoglobulin chain thereof according to claim 13(b) and/or 13(c), wherein the antibody is an anti-CD33 antibody, as well as subject-matter related thereto;

---

3. claims: 1-33, 35-58(all partially)

a recombinant Ad35 vector production system according to claim 1, wherein the heterologous expression product comprises a CRISPR-associated RNA-guided endonuclease and/or a guide RNA according to claim 13(d), as well as subject-matter related thereto;

---

4. claims: 1-14, 16-33, 35-58(all partially)

a recombinant Ad35 vector production system according to claim 1, wherein the heterologous expression product comprises a base-editor and/or a guide RNA according to claim 13(e), as well as subject-matter related thereto;

---

5. claims: 1-13, 16-33, 35, 37-58(all partially)

a recombinant Ad35 vector production system according to claim 1, wherein the heterologous expression product comprises a coagulation factor according to claim 13(f), as well as subject-matter related thereto;

---

6. claims: 1-13, 16-33, 35, 37-58(all partially)

a recombinant Ad35 vector production system according to claim 1, wherein the heterologous expression product comprises a protein that blocks or reduces viral infection according to claim 13(f), as well as subject-matter related thereto;

---

International Application No. PCT/ US2020/ 040756

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

7. claims: 1-13, 16-33, 35, 37-58(all partially)

a recombinant Ad35 vector production system according to claim 1, wherein the heterologous expression product comprises a checkpoint inhibitor according to claim 13(g), as well as subject-matter related thereto;

---

8. claims: 1-13, 16-33, 35, 37-58(all partially)

a recombinant Ad35 vector production system according to claim 1, wherein the heterologous expression product comprises a chimeric antigen receptor according to claim 13(h), as well as subject-matter related thereto;

---

9. claims: 1-13, 16-33, 35, 37-58(all partially)

a recombinant Ad35 vector production system according to claim 1, wherein the heterologous expression product comprises an engineered T cell receptor according to claim 13(h), as well as subject-matter related thereto;

---

10-111. claims: 1-13, 16-33, 35, 37-58(all partially)

a recombinant Ad35 vector production system according to claim 1, wherein the heterologous expression product comprises a protein according to claim 13(i) selected from gammaC, JAK3, IL7RA, RAG1, RAG2, DCLRE1C, PRKDC, LIG4, NHEJ1, CD3D, CD3E, CD3Z, CD3G, PTPRC, ZAP70, LCK, AK2, ADA, PNP, WHN, CHD7, ORAI1, STIM1, CORO1A, CIITA, RFXANK, RFX5, RFXAP, RMRP, DKC1, TERT, TINF2, DCLRE1B, SLC46A1, FancA, FancB, FancC, FancDI, FancD2, FancE, FancF, FancG, Fancl, FancJ, FancL, FancM, FancN, FancO, FancP, FancQ, FancR, FancS, FancT, FancU, FancV, FancW, soluble CD40, CTLA, Fas L, an antibody to PD-L1, an antibody to CD4, an antibody to CD5, an antibody to CD7, an antibody to CD52, an antibody to IL-1, an antibody to IL-2, an antibody to IL-4, an antibody to IL-6, an antibody to IL-10, an antibody to TNF, an antibody to a TCR specifically present on autoreactive T cells, WAS, phox, dystrophin, pyruvate kinase, CLN3, ABCD1, arylsulfatase A, SFTPB, SFTPC, NLX2.1, ABCA3, GATA1, a ribosomal protein gene, TERT, TERC, DKC1, TINF2, CFTR, LRRK2, PARK2, PARK7, PINK1, SNCA, PSEN1, PSEN2, APP, SOD1, TDP43, FUS, ubiquilin 2 or C90RF72, respectively, as well as subject-matter related thereto;

---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2020/040756

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---|---|
| WO 2017189901 A1 | 02-11-2017 | NONE | |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

| (51)国際特許分類 | | FI | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|
| *Ａ６１Ｐ* | *7/00 (2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 7/00 | |
| *Ａ６１Ｐ* | *7/06 (2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 7/06 | |
| *Ａ６１Ｐ* | *37/04 (2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 37/04 | |
| *Ａ６１Ｐ* | *7/04 (2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 7/04 | |
| *Ａ６１Ｋ* | *45/00 (2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 45/00 | |
| *Ａ６１Ｋ* | *31/573(2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 31/573 | |
| *Ａ６１Ｐ* | *43/00 (2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 43/00 | １２１ |
| *Ａ６１Ｐ* | *3/00 (2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 3/00 | |
| *Ａ６１Ｋ* | *31/4188(2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 31/4188 | |
| *Ａ６１Ｋ* | *31/17 (2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 31/17 | |
| *Ａ６１Ｋ* | *31/7088(2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 31/7088 | |
| *Ｃ１２Ｎ* | *15/13 (2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 15/13 | |
| *Ｃ１２Ｎ* | *15/09 (2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 15/09 | １１０ |
| *Ｃ１２Ｎ* | *15/12 (2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 15/09 | １００ |
| | | Ｃ１２Ｎ | 15/12 | |

(32)優先日　令和2年4月13日(2020.4.13)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,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,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

ｔｌｅ，　Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ　９８１０５　ＵＳ
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田　貴敏
(74)代理人　100181641
弁理士　石川　大輔
(74)代理人　230113332
弁護士　山本　健策
(72)発明者　キエム，　ハンス－ピーター
アメリカ合衆国　ワシントン　９８１０９，　シアトル，　フェアビュー　アベニュー　ノース　１１００
(72)発明者　リーバー，　アンドレ
アメリカ合衆国　ワシントン　９８１０５，　シアトル，　ルーズベルト　ウェイ　エヌイー　４５４５，　スイート　４００
(72)発明者　リー，　チャン
アメリカ合衆国　ワシントン　９８１０５，　シアトル，　ルーズベルト　ウェイ　エヌイー　４５４５，　スイート　４００
(72)発明者　ワン，　ホンジエ
アメリカ合衆国　ワシントン　９８１０５，　シアトル，　ルーズベルト　ウェイ　エヌイー　４５４５，　スイート　４００

Ｆターム（参考）　4B065　AA90Y AA95X AA95Y AB01 AC20 BA02 CA23 CA24 CA44
4C084　AA13 AA19 MA02 MA66 NA14 ZA51 ZA53 ZA55 ZB091 ZB26

Fターム（参考） ZC21 ZC751
4C086 AA01 AA02 CB05 DA10 EA16 MA02 MA04 MA66 NA05 ZA51
ZA53 ZA55 ZB08 ZB09 ZC21 ZC75
4C206 AA01 AA02 HA28 MA02 MA04 MA86 NA05 ZA51 ZA53 ZA55
ZB08 ZB09 ZC21 ZC75