(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-543137
(P2023-543137A)
(43)公表日　令和5年10月13日(2023.10.13)

| (51)国際特許分類 | | FI | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| *Ｃ１２Ｎ* | *15/63 (2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 15/63 | Ｚ | ４Ｂ０６５ |
| *Ｃ１２Ｎ* | *5/10 (2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 5/10 | ＺＮＡ | ４Ｃ０８４ |
| *Ｃ１２Ｎ* | *15/12 (2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 15/12 | | ４Ｃ０８７ |
| *Ｃ１２Ｎ* | *15/11 (2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 15/11 | Ｚ | |
| *Ｃ１２Ｎ* | *15/113 (2010.01)* | Ｃ１２Ｎ | 15/113 | Ｚ | |

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全95頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-514105(P2023-514105)
(86)(22)出願日　令和3年8月27日(2021.8.27)
(85)翻訳文提出日　令和5年4月21日(2023.4.21)
(86)国際出願番号　PCT/US2021/048066
(87)国際公開番号　WO2022/047237
(87)国際公開日　令和4年3月3日(2022.3.3)
(31)優先権主張番号　63/072,080
(32)優先日　令和2年8月28日(2020.8.28)
(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,
最終頁に続く

(71)出願人　523069854
アーセナル バイオサイエンシズ インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 ９４０８０ カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ オイスター ポイント ブールバード ３２９
(74)代理人　100102978
弁理士　清水 初志
(74)代理人　100160923
弁理士　山口 裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部 俊
(74)代理人　100142929
弁理士　井上 隆一
(74)代理人　100148699
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　プライミング受容体で操作された免疫細胞

(57)【要約】
非ウイルス編集法を使用して、大きなＤＮＡテンプレートによって細胞を遺伝的に編集する方法が、本明細書に提供される。細胞のゲノムの標的領域に非ウイルス的に挿入される少なくとも１つの大きなＤＮＡテンプレートを含む細胞もまた、本明細書に提供される。
【選択図】図１

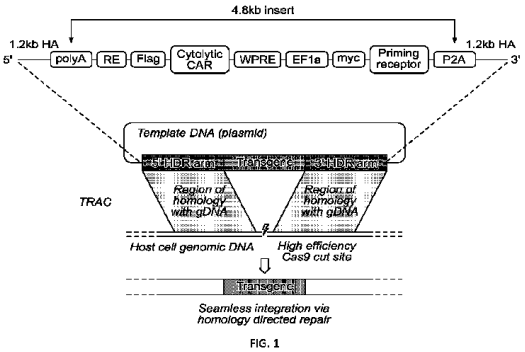


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
細胞のゲノムの標的領域に非ウイルス的に挿入される少なくとも１つのＤＮＡテンプレートを含む初代免疫細胞であって、前記ＤＮＡテンプレートのサイズが、約５キロ塩基対（ｋｂ）以上である、前記初代免疫細胞。
【請求項２】
前記ＤＮＡテンプレートを前記初代免疫細胞に導入するためのウイルスベクターを含まない、請求項１に記載の細胞。
【請求項３】
前記ＤＮＡテンプレートの前記サイズが、約５．０ｋｂ、５．１ｋｂ、５．２ｋｂ、５．３ｋｂ、５．４ｋｂ、５．５ｋｂ、５．６ｋｂ、５．７ｋｂ、５．８ｋｂ、５．９ｋｂ、６．０ｋｂ、６．１ｋｂ、６．２ｋｂ、６．３ｋｂ、６．４ｋｂ、６．５ｋｂ、６．６ｋｂ、６．７ｋｂ、６．８ｋｂ、６．９ｋｂ、７．０ｋｂ、７．１ｋｂ、７．２ｋｂ、７．３ｋｂ、７．４ｋｂ、７．５ｋｂ、７．６ｋｂ、７．７ｋｂ、７．８ｋｂ、７．９ｋｂ、８．０ｋｂ、８．１ｋｂ、８．２ｋｂ、８．３ｋｂ、８．４ｋｂ、８．５ｋｂ、８．６ｋｂ、８．７ｋｂ、８．８ｋｂ、８．９ｋｂ、９．０ｋｂ、９．１ｋｂ、９．２ｋｂ、９．３ｋｂ、９．４ｋｂ、９．５ｋｂ、９．６ｋｂ、９．７ｋｂ、９．８ｋｂ、９．９ｋｂ、１０．０ｋｂ以上、またはこれらのサイズの間の任意のＤＮＡテンプレートサイズである、請求項１または２に記載の細胞。
【請求項４】
前記ＤＮＡテンプレートの前記サイズが、約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約５ｋｂ～約９ｋｂ、約５ｋｂ～約８ｋｂ、約５ｋｂ～約７ｋｂ、約５ｋｂ～約６ｋｂ、約６ｋｂ～約１０ｋｂ、約６ｋｂ～約９ｋｂ、約６ｋｂ～約８ｋｂ、約６ｋｂ～約７ｋｂ、約７ｋｂ～約１０ｋｂ、約７ｋｂ～約９ｋｂ、約７ｋｂ～約８ｋｂ、約８ｋｂ～約１０ｋｂ、約８ｋｂ～約９ｋｂ、または約９ｋｂ～約１０ｋｂである、請求項１～３のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項５】
前記ＤＮＡテンプレートが、二本鎖ＤＮＡテンプレートまたは一本鎖ＤＮＡテンプレートである、請求項１～４のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項６】
前記ＤＮＡテンプレートが、直鎖ＤＮＡテンプレートまたは環状ＤＮＡテンプレートであり、任意選択で、前記環状ＤＮＡテンプレートが、プラスミドである、請求項１～５のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項７】
前記ＤＮＡテンプレートの５’及び３’末端が、前記初代細胞の前記ゲノム内の挿入部位に隣接するゲノム配列と相同であるヌクレオチド配列を含む、請求項１～６のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項８】
前記細胞の前記ゲノムの前記標的領域が、Ｔ細胞受容体アルファ定常（ＴＲＡＣ）遺伝子座またはゲノムセーフハーバー（ＧＳＨ）である、請求項１～７のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項９】
前記ＤＮＡテンプレートが、異種配列を含む、請求項１～８のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項１０】
前記ＤＮＡテンプレートが、遺伝子を含む、請求項１～９のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項１１】
前記ＤＮＡテンプレートが、転写因子を含むプライミング受容体を含む、請求項１～１０のいずれか１項に記載の細胞。

【請求項１２】
前記ＤＮＡテンプレートが、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含む、請求項１～１１のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項１３】
前記ＤＮＡテンプレートが、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）と、転写因子を含むプライミング受容体とを含む、請求項１～１２のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項１４】
前記ＤＮＡテンプレートが、前記キメラ抗原受容体に作動可能に連結された誘導性プロモーターを含む、請求項１～１３のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項１５】
前記ＤＮＡテンプレートが、前記プライミング受容体に作動可能に連結された構成的プロモーターを更に含む、請求項１～１４のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項１６】
前記ＤＮＡテンプレートが、前記キメラ抗原受容体に作動可能に連結された誘導性プロモーター、及び前記プライミング受容体に作動可能に連結された構成的プロモーターを更に含む、請求項１～１５のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項１７】
前記ＤＮＡテンプレートが、５’から３’の方向に、
ａ．前記誘導性プロモーター、
ｂ．前記キメラ抗原受容体、
ｃ．前記構成的プロモーター、及び
ｄ．前記プライミング受容体
を含む、請求項１～１６のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項１８】
前記ＤＮＡテンプレートが、５’から３’の方向に、
ａ．前記構成的プロモーター、
ｂ．前記プライミング受容体、
ｃ．前記誘導性プロモーター、及び
ｄ．前記キメラ抗原受容体
を含む、請求項１～１６のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項１９】
前記ＤＮＡテンプレートが、自己切断２Ａペプチド（Ｐ２Ａ）を更に含む、請求項１～２４のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項２０】
前記Ｐ２Ａの核酸が、前記ＤＮＡテンプレートの３’末端にある、請求項１～２３のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項２１】
前記ＤＮＡテンプレートが、ウッドチャック肝炎ウイルス翻訳後調節エレメント（ＷＰＲＥ）を更に含む、請求項１～２０のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項２２】
前記ＷＰＲＥが、前記ＣＡＲをコードする核酸の３’末端にあり、かつ前記プライミング受容体をコードする核酸の５’末端にある、または前記ＷＰＲＥが、前記プライミング受容体をコードする核酸の３’末端にあり、かつ前記ＣＡＲをコードする核酸の５’末端にある、請求項２１に記載の細胞。
【請求項２３】
前記プライミング受容体が、Ｎ末端からＣ末端の方向に、
ａ．抗原に対する結合親和性を有する細胞外抗原結合ドメイン、
ｂ．１つ以上のリガンド誘導性タンパク質分解切断部位を含む、膜貫通ドメイン、及び
ｃ．ヒトまたはヒト化転写エフェクターを含む細胞内ドメインであって、
前記細胞外抗原結合ドメインへの抗原の結合が、前記リガンド誘導性タンパク質分解

切断部位での切断をもたらし、それによって前記細胞内ドメインを放出する、
前記細胞内ドメイン
を含む、請求項１～２２のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項２４】
前記プライミング受容体が、前記膜貫通ドメインと前記細胞内ドメインとの間に位置付けられた膜近傍ドメイン（ＪＭＤ）を更に含む、請求項２３に記載の細胞。
【請求項２５】
前記転写因子が、前記誘導性プロモーターに結合し、かつ前記ＣＡＲの発現を誘導する、請求項１～２４のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項２６】
前記ＣＡＲが、Ｎ末端からＣ末端へと、
ａ．抗原に対する結合親和性を有する細胞外抗原結合ドメイン、
ｂ．膜貫通ドメイン、
ｃ．細胞内共刺激ドメイン、及び
ｄ．細胞内活性化ドメイン
を含む、請求項１～２５のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項２７】
前記プライミング受容体と前記ＣＡＲが、異なる抗原に結合する、請求項１～２６のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項２８】
前記プライミング受容体と前記ＣＡＲが、同じ抗原に結合する、請求項１～２６のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項２９】
前記免疫細胞が、初代ヒト免疫細胞である、請求項１～２８のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項３０】
自己免疫細胞である、請求項１～２９のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項３１】
ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、Ｔ細胞、ＣＤ８＋Ｔ細胞、ＣＤ４＋Ｔ細胞、初代Ｔ細胞、またはＴ細胞前駆細胞である、請求項１～３０のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項３２】
初代Ｔ細胞である、請求項１～３１のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項３３】
初代ヒトＴ細胞である、請求項１～３２のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項３４】
ウイルスフリーである、請求項１～３３のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項３５】
複数の、請求項１～３４のいずれか１項に記載の初代免疫細胞
を含む、細胞の集団。
【請求項３６】
初代免疫細胞のゲノムの標的領域に挿入される少なくとも１つのＤＮＡテンプレートを含む初代免疫細胞であって、前記ＤＮＡテンプレートのサイズが、５キロ塩基対以上であり、かつ前記初代免疫細胞が、前記ＤＮＡテンプレートを前記初代免疫細胞に導入するためのウイルスベクターを含まない、前記初代免疫細胞。
【請求項３７】
初代免疫細胞のゲノムの標的領域に挿入される、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）と、転写因子を含むプライミング受容体とを含む、少なくとも１つのＤＮＡテンプレート
を含む、初代免疫細胞であって、前記ＤＮＡテンプレートのサイズが、５キロ塩基対以上であり、かつ前記初代免疫細胞が、前記ＤＮＡテンプレートを前記初代免疫細胞に導入するためのウイルスベクターを含まない、前記初代免疫細胞。

【請求項３８】
リボ核タンパク質複合体（ＲＮＰ）－ＤＮＡテンプレート複合体を含む生存可能なウイルスフリーの初代細胞であって、前記ＲＮＰが、ヌクレアーゼドメイン及びガイドＲＮＡを含み、前記ＤＮＡテンプレートのサイズが、５キロベースヌクレオチド以上のサイズであり、かつ前記ＤＮＡテンプレートの５’及び３’末端が、前記初代細胞のゲノム内の挿入部位に隣接するゲノム配列と相同であるヌクレオチド配列を含む、前記初代細胞。
【請求項３９】
リボ核タンパク質複合体（ＲＮＰ）－ＤＮＡテンプレート複合体を含む生存可能なウイルスフリーの初代細胞であって、前記ＲＮＰが、ヌクレアーゼドメイン及びガイドＲＮＡを含み、前記ＤＮＡテンプレートのサイズが、５キロベースヌクレオチド以上のサイズであり、前記ＤＮＡテンプレートが、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）と、転写因子を含むプライミング受容体とを含み、かつ前記ＤＮＡテンプレートの５’及び３’末端が、前記初代細胞のゲノム内の挿入部位に隣接するゲノム配列と相同であるヌクレオチド配列を含む、前記初代細胞。
【請求項４０】
請求項１～３９のいずれか１項に記載の初代免疫細胞を対象に投与することを含む、対象における疾患を治療する方法。
【請求項４１】
前記疾患が、がんである、請求項４０に記載の方法。
【請求項４２】
ＤＮＡテンプレートを含む非ウイルスベクターであって、前記ＤＮＡテンプレートが、５キロベースヌクレオチド以上のサイズであり、かつ前記ＤＮＡテンプレートの５’及び３’末端が、初代細胞のゲノム内の挿入部位に隣接するゲノム配列と相同であるヌクレオチド配列を含む、前記非ウイルスベクター。
【請求項４３】
前記ＤＮＡテンプレートの前記サイズが、約５．０ｋｂ、５．１ｋｂ、５．２ｋｂ、５．３ｋｂ、５．４ｋｂ、５．５ｋｂ、５．６ｋｂ、５．７ｋｂ、５．８ｋｂ、５．９ｋｂ、６．０ｋｂ、６．１ｋｂ、６．２ｋｂ、６．３ｋｂ、６．４ｋｂ、６．５ｋｂ、６．６ｋｂ、６．７ｋｂ、６．８ｋｂ、６．９ｋｂ、７．０ｋｂ、７．１ｋｂ、７．２ｋｂ、７．３ｋｂ、７．４ｋｂ、７．５ｋｂ、７．６ｋｂ、７．７ｋｂ、７．８ｋｂ、７．９ｋｂ、８．０ｋｂ、８．１ｋｂ、８．２ｋｂ、８．３ｋｂ、８．４ｋｂ、８．５ｋｂ、８．６ｋｂ、８．７ｋｂ、８．８ｋｂ、８．９ｋｂ、９．０ｋｂ、９．１ｋｂ、９．２ｋｂ、９．３ｋｂ、９．４ｋｂ、９．５ｋｂ、９．６ｋｂ、９．７ｋｂ、９．８ｋｂ、９．９ｋｂ、１０．０ｋｂ以上、またはこれらのサイズの間の任意のＤＮＡテンプレートサイズである、請求項４２に記載の非ウイルスベクター。
【請求項４４】
前記ＤＮＡテンプレートの前記サイズが、約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約５ｋｂ～約９ｋｂ、約５ｋｂ～約８ｋｂ、約５ｋｂ～約７ｋｂ、約５ｋｂ～約６ｋｂ、約６ｋｂ～約１０ｋｂ、約６ｋｂ～約９ｋｂ、約６ｋｂ～約８ｋｂ、約６ｋｂ～約７ｋｂ、約７ｋｂ～約１０ｋｂ、約７ｋｂ～約９ｋｂ、約７ｋｂ～約８ｋｂ、約８ｋｂ～約１０ｋｂ、約８ｋｂ～約９ｋｂ、または約９ｋｂ～約１０ｋｂである、請求項４２または４３に記載の非ウイルスベクター。
【請求項４５】
前記細胞の前記ゲノムの標的領域が、Ｔ細胞受容体アルファ定常（ＴＲＡＣ）遺伝子座またはゲノムセーフハーバー（ＧＳＨ）である、請求項４２～４４のいずれか１項に記載の非ウイルスベクター。
【請求項４６】
前記ＤＮＡテンプレートが、異種配列を含む、請求項４２～４４のいずれか１項に記載の非ウイルスベクター。
【請求項４７】

前記ＤＮＡテンプレートが、遺伝子を含む、請求項４２～４４のいずれか１項に記載の非ウイルスベクター。
【請求項４８】
前記ＤＮＡテンプレートが、転写因子を含むプライミング受容体を含む、請求項４２～４７のいずれか１項に記載の非ウイルスベクター。
【請求項４９】
前記ＤＮＡテンプレートが、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含む、請求項４２～４８のいずれか１項に記載の非ウイルスベクター。
【請求項５０】
前記ＤＮＡテンプレートが、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）と、転写因子を含むプライミング受容体とを含む、請求項４２～４９のいずれか１項に記載の非ウイルスベクター。
【請求項５１】
前記ＤＮＡテンプレートが、前記キメラ抗原受容体に作動可能に連結された誘導性プロモーターを含む、請求項４２～５０のいずれか１項に記載の非ウイルスベクター。
【請求項５２】
前記ＤＮＡテンプレートが、前記プライミング受容体に作動可能に連結された構成的プロモーターを更に含む、請求項４２～５１のいずれか１項に記載の非ウイルスベクター。
【請求項５３】
前記ＤＮＡテンプレートが、前記キメラ抗原受容体に作動可能に連結された誘導性プロモーター、及び前記プライミング受容体に作動可能に連結された構成的プロモーターを更に含む、請求項４２～５２のいずれか１項に記載の非ウイルスベクター。
【請求項５４】
前記ＤＮＡテンプレートが、５’から３’の方向に、
ａ．前記誘導性プロモーター、
ｂ．前記キメラ抗原受容体、
ｃ．前記構成的プロモーター、及び
ｄ．前記プライミング受容体
を含む、請求項４２～５２のいずれか１項に記載の非ウイルスベクター。
【請求項５５】
前記ＤＮＡテンプレートが、５’から３’の方向に、
ａ．前記構成的プロモーター、
ｂ．前記プライミング受容体、
ｃ．前記誘導性プロモーター、及び
ｄ．前記キメラ抗原受容体
を含む、請求項４２～５２のいずれか１項に記載の非ウイルスベクター。
【請求項５６】
前記ＤＮＡテンプレートが、自己切断２Ａペプチド（Ｐ２Ａ）を更に含む、請求項４２～６０のいずれか１項に記載の非ウイルスベクター。
【請求項５７】
前記Ｐ２Ａが、前記ＤＮＡテンプレートの３’末端にある、請求項４２～５６のいずれか１項に記載の非ウイルスベクター。
【請求項５８】
前記ＤＮＡテンプレートが、ウッドチャック肝炎ウイルス翻訳後調節エレメント（ＷＰＲＥ）を更に含む、請求項４２～５７のいずれか１項に記載の非ウイルスベクター。
【請求項５９】
前記プライミング受容体が、Ｎ末端からＣ末端の方向に、
ａ．抗原に対する結合親和性を有する細胞外抗原結合ドメイン、
ｂ．１つ以上のリガンド誘導性タンパク質分解切断部位を含む、膜貫通ドメイン、及び
ｃ．ヒトまたはヒト化転写エフェクターを含む細胞内ドメインであって、
前記細胞外抗原結合ドメインへの抗原の結合が、前記リガンド誘導性タンパク質分解

切断部位での切断をもたらし、それによって前記細胞内ドメインを放出する、
前記細胞内ドメイン
を含む、請求項４２～５３のいずれか１項に記載の非ウイルスベクター。
【請求項６０】
前記プライミング受容体が、前記膜貫通ドメインと前記細胞内ドメインとの間に位置付けられた膜近傍ドメイン（ＪＭＤ）を更に含む、請求項５９に記載の非ウイルスベクター。
【請求項６１】
前記転写因子が、前記誘導性プロモーターに結合し、かつ前記ＣＡＲの発現を誘導する、請求項４２～５８のいずれか１項に記載の非ウイルスベクター。
【請求項６２】
前記ＣＡＲが、Ｎ末端からＣ末端へと、
ａ．抗原に対する結合親和性を有する細胞外抗原結合ドメイン、
ｂ．膜貫通ドメイン、
ｃ．細胞内共刺激ドメイン、及び
ｄ．細胞内活性化ドメイン
を含む、請求項４２～５８のいずれか１項に記載の非ウイルスベクター。
【請求項６３】
前記プライミング受容体と前記ＣＡＲが、異なる抗原に結合する、請求項４２～５８のいずれか１項に記載の非ウイルスベクター。
【請求項６４】
前記プライミング受容体と前記ＣＡＲが、同じ抗原に結合する、請求項４２～５８のいずれか１項に記載の非ウイルスベクター。
【請求項６５】
初代免疫細胞を編集する方法であって、以下：
ａ．リボ核タンパク質複合体（ＲＮＰ）－ＤＮＡテンプレート複合体を提供することであって、前記ＲＮＰが、ヌクレアーゼドメイン及びガイドＲＮＡを含み、前記ＤＮＡテンプレートのサイズが、５キロベースヌクレオチド以上のサイズであり、かつ前記ＤＮＡテンプレートの５’及び３’末端が、前記初代免疫細胞のゲノム内の挿入部位に隣接するゲノム配列と相同であるヌクレオチド配列を含む、前記提供することと、
ｂ．前記ＲＮＰ－ＤＮＡテンプレート複合体を前記初代免疫細胞に非ウイルス的に導入することであって、前記ガイドＲＮＡが、前記初代免疫細胞の前記ゲノムの標的領域に特異的にハイブリダイズし、かつ前記ヌクレアーゼドメインが、前記標的領域を切断して、前記初代免疫細胞の前記ゲノム内に前記挿入部位を作製する、前記非ウイルス的に導入することと、
ｃ．前記ＤＮＡテンプレートを前記初代免疫細胞の前記ゲノム内の前記挿入部位に挿入することを介して前記初代免疫細胞を編集することと
を含む、前記方法。
【請求項６６】
非ウイルス的に導入することが、エレクトロポレーションを含む、請求項６５に記載の方法。
【請求項６７】
前記ヌクレアーゼドメインが、ＣＲＩＳＰＲ関連エンドヌクレアーゼ（Ｃａｓ）、任意選択でＣａｓ９ヌクレアーゼを含む、請求項６５または６６に記載の方法。
【請求項６８】
前記ＤＮＡテンプレートの前記サイズが、約５．０ｋｂ、５．１ｋｂ、５．２ｋｂ、５．３ｋｂ、５．４ｋｂ、５．５ｋｂ、５．６ｋｂ、５．７ｋｂ、５．８ｋｂ、５．９ｋｂ、６．０ｋｂ、６．１ｋｂ、６．２ｋｂ、６．３ｋｂ、６．４ｋｂ、６．５ｋｂ、６．６ｋｂ、６．７ｋｂ、６．８ｋｂ、６．９ｋｂ、７．０ｋｂ、７．１ｋｂ、７．２ｋｂ、７．３ｋｂ、７．４ｋｂ、７．５ｋｂ、７．６ｋｂ、７．７ｋｂ、７．８ｋｂ、７．９ｋｂ

、８．０ｋｂ、８．１ｋｂ、８．２ｋｂ、８．３ｋｂ、８．４ｋｂ、８．５ｋｂ、８．６ｋｂ、８．７ｋｂ、８．８ｋｂ、８．９ｋｂ、９．０ｋｂ、９．１ｋｂ、９．２ｋｂ、９．３ｋｂ、９．４ｋｂ、９．５ｋｂ、９．６ｋｂ、９．７ｋｂ、９．８ｋｂ、９．９ｋｂ、１０．０ｋｂ以上、またはこれらのサイズの間の任意のＤＮＡテンプレートサイズである、請求項６５～６７のいずれか１項に記載の方法。

【請求項６９】

前記ＤＮＡテンプレートの前記サイズが、約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約５ｋｂ～約９ｋｂ、約５ｋｂ～約８ｋｂ、約５ｋｂ～約７ｋｂ、約５ｋｂ～約６ｋｂ、約６ｋｂ～約１０ｋｂ、約６ｋｂ～約９ｋｂ、約６ｋｂ～約８ｋｂ、約６ｋｂ～約７ｋｂ、約７ｋｂ～約１０ｋｂ、約７ｋｂ～約９ｋｂ、約７ｋｂ～約８ｋｂ、約８ｋｂ～約１０ｋｂ、約８ｋｂ～約９ｋｂ、または約９ｋｂ～約１０ｋｂである、請求項６５～６８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７０】

前記細胞の前記ゲノムの前記標的領域が、Ｔ細胞受容体アルファ定常（ＴＲＡＣ）遺伝子座またはゲノムセーフハーバー（ＧＳＨ）である、請求項６５～６９のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７１】

前記ＤＮＡテンプレートが、二本鎖ＤＮＡテンプレートまたは一本鎖ＤＮＡテンプレートである、請求項６５～７０のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７２】

前記ＤＮＡテンプレートが、直鎖ＤＮＡテンプレートまたは環状ＤＮＡテンプレートであり、任意選択で、前記環状ＤＮＡテンプレートが、プラスミドである、請求項６５～７１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７３】

前記ＤＮＡテンプレートが、異種配列を含む、請求項６５～７２のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７４】

前記ＤＮＡテンプレートが、遺伝子を含む、請求項６５～７３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７５】

前記ＤＮＡテンプレートが、転写因子を含むプライミング受容体を含む、請求項６５～７４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７６】

前記ＤＮＡテンプレートが、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含む、請求項６５～７５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７７】

前記ＤＮＡテンプレートが、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）と、転写因子を含むプライミング受容体とを含む、請求項６５～７６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７８】

前記ＤＮＡテンプレートが、前記キメラ抗原受容体に作動可能に連結された誘導性プロモーターを含む、請求項６５～７７のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７９】

前記ＤＮＡテンプレートが、前記プライミング受容体に作動可能に連結された構成的プロモーターを更に含む、請求項６５～７８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項８０】

前記ＤＮＡテンプレートが、前記キメラ抗原受容体に作動可能に連結された誘導性プロモーター、及び前記プライミング受容体に作動可能に連結された構成的プロモーターを更に含む、請求項６５～７９のいずれか１項に記載の方法。

【請求項８１】

前記ＤＮＡテンプレートが、５’から３’の方向に、

ａ．前記誘導性プロモーター、
ｂ．前記キメラ抗原受容体、
ｃ．前記構成的プロモーター、及び
ｄ．前記プライミング受容体
を含む、請求項６５～８０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８２】
前記ＤＮＡテンプレートが、５’から３’の方向に、
ａ．前記構成的プロモーター、
ｂ．前記プライミング受容体、
ｃ．前記誘導性プロモーター、及び
ｄ．前記キメラ抗原受容体
を含む、請求項６５～８０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８３】
前記ＤＮＡテンプレートが、自己切断２Ａペプチド（Ｐ２Ａ）を更に含む、請求項６５～８２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８４】
前記Ｐ２Ａの核酸が、前記ＤＮＡテンプレートの３’末端にある、請求項８３に記載の方法。
【請求項８５】
前記ＤＮＡテンプレートが、ウッドチャック肝炎ウイルス翻訳後調節エレメント（ＷＰＲＥ）を更に含む、請求項６５～８４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８６】
前記ＷＰＲＥが、前記ＣＡＲをコードする核酸の３’末端にあり、かつ前記プライミング受容体をコードする核酸の５’末端にある、または前記ＷＰＲＥが、前記プライミング受容体をコードする核酸の３’末端にあり、かつ前記ＣＡＲをコードする核酸の５’末端にある、請求項８５に記載の方法。
【請求項８７】
前記プライミング受容体が、Ｎ末端からＣ末端の方向に、
ａ．抗原に対する結合親和性を有する細胞外抗原結合ドメイン、
ｂ．１つ以上のリガンド誘導性タンパク質分解切断部位を含む、膜貫通ドメイン、及び
ｃ．ヒトまたはヒト化転写エフェクターを含む細胞内ドメインであって、
前記細胞外抗原結合ドメインへの抗原の結合が、前記リガンド誘導性タンパク質分解切断部位での切断をもたらし、それによって前記細胞内ドメインを放出する、
前記細胞内ドメイン
を含む、請求項６５～８６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８８】
前記プライミング受容体が、前記膜貫通ドメインと前記細胞内ドメインとの間に位置付けられた膜近傍ドメイン（ＪＭＤ）を更に含む、請求項８７に記載の方法。
【請求項８９】
前記転写因子が、前記誘導性プロモーターに結合し、かつ前記ＣＡＲの発現を誘導する、請求項６５～８８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９０】
前記ＣＡＲが、Ｎ末端からＣ末端へと、
ａ．抗原に対する結合親和性を有する細胞外抗原結合ドメイン、
ｂ．膜貫通ドメイン、
ｃ．細胞内共刺激ドメイン、及び
ｄ．細胞内活性化ドメイン
を含む、請求項６５～８９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９１】
前記プライミング受容体と前記ＣＡＲが、異なる抗原に結合する、請求項６５～９０の

いずれか１項に記載の方法。
【請求項９２】
前記プライミング受容体と前記ＣＡＲが、同じ抗原に結合する、請求項６５～９０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９３】
前記免疫細胞が、初代ヒト免疫細胞である、請求項６５～９２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９４】
前記初代免疫細胞が、自己免疫細胞である、請求項６５～９３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９５】
前記初代免疫細胞が、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、Ｔ細胞、ＣＤ８＋Ｔ細胞、ＣＤ４＋Ｔ細胞、初代Ｔ細胞、またはＴ細胞前駆細胞である、請求項６５～９４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９６】
前記初代免疫細胞が、初代Ｔ細胞である、請求項６５～９５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９７】
前記初代免疫細胞が、初代ヒトＴ細胞である、請求項６５～９６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９８】
前記初代免疫細胞が、ウイルスフリーである、請求項６５～９７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９９】
患者から前記免疫細胞を得ることと、前記プラスミドをインビトロで導入することとを更に含む、請求項６５～９８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１００】
初代免疫細胞を編集する方法であって、以下：
ａ．リボ核タンパク質複合体（ＲＮＰ）－ＤＮＡテンプレート複合体を提供することであって、前記ＲＮＰが、ヌクレアーゼドメイン及びガイドＲＮＡを含み、前記ＤＮＡテンプレートのサイズが、５キロベースヌクレオチド以上のサイズであり、前記ＤＮＡテンプレートが、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）と、転写因子を含むプライミング受容体とを含み、かつ前記ＤＮＡテンプレートの５’及び３’末端が、前記初代免疫細胞のゲノム内の挿入部位に隣接するゲノム配列と相同であるヌクレオチド配列を含む、前記提供することと、
ｂ．前記ＲＮＰ－ＤＮＡテンプレート複合体を前記初代免疫細胞に非ウイルス的に導入することであって、前記ガイドＲＮＡが、前記初代免疫細胞の前記ゲノムの標的領域に特異的にハイブリダイズし、かつ前記ヌクレアーゼドメインが、前記標的領域を切断して、前記初代免疫細胞の前記ゲノム内に前記挿入部位を作製する、前記非ウイルス的に導入することと、
ｃ．前記ＤＮＡテンプレートを前記初代免疫細胞の前記ゲノム内の前記挿入部位に挿入することを介して前記初代免疫細胞を編集することと
を含む、前記方法。
【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、２０２０年８月２８日に出願された米国仮出願第６３／０７２，０８０号の利益を主張するものであり、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【０００２】
配列表

本出願は、ＥＦＳ－Ｗｅｂを介して提出され、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる配列表を含む。当該ＡＳＣＩＩコピーは、２０ＸＸ年ＸＸ月に作成され、ＸＸＸＸＸＵＳ＿ｓｅｑｕｅｎｃｅｌｉｓｔｉｎｇ．ｔｘｔという名前で、Ｘ，ＸＸＸ，ＸＸＸバイトのサイズである。

【背景技術】

【０００３】

背景

がんは、細胞の制御不能な増殖を特徴とする疾患である。薬物及び放射線療法を含む、がんを治療するための多くのアプローチが試みられてきた。最近のがん治療では、身体自体の免疫細胞を使用してがん細胞を攻撃しようとしている。有望なアプローチの１つは、患者から採取されたＴ細胞であって、特定のタンパク質を標的とする新しい能力をＴ細胞に与える、キメラ抗原受容体すなわちＣＡＲである、受容体タンパク質を産生するように遺伝子操作されたＴ細胞を使用する。これらの受容体は、抗原結合及びＴ細胞活性化機能を単一の受容体に組み合わせるため、キメラである。

【０００４】

それらのＣＡＲ－Ｔ細胞を使用する免疫療法は、修飾Ｔ細胞が、がん細胞をより効果的に標的として破壊するために、がん細胞を認識する可能性を有するため、有望である。

【０００５】

Ｔ細胞をＣＡＲで操作した後、得られたＣＡＲ－Ｔ細胞を患者に導入して腫瘍細胞を攻撃する。ＣＡＲ－Ｔ細胞は、患者自身の血液中のＴ細胞に由来する（自己）か、または別の健康なドナーのＴ細胞に由来する（同種異系）かのいずれかであり得る。

【０００６】

ＣＡＲ－Ｔ細胞が患者に注入されると、それらは細胞上の標的抗原と接触する。ＣＡＲ－Ｔ細胞は抗原に結合し、活性化される。抗原係合時に、ＣＡＲ　Ｔ細胞は、指数関数的に増殖し、抗腫瘍サイトカイン産生を開始し、腫瘍細胞殺傷を標的とすることができる。しかしながら、ＣＡＲ－Ｔ細胞ベースの免疫療法にはいくつかの懸念及び限界が残っている。いくつかのＣＡＲ　Ｔ細胞は、低レベルの標的抗原を発現する正常細胞と係合し得、オフターゲット毒性をもたらす。

【０００７】

更に、免疫細胞工学における既知のボトルネックであるウイルスベクターを使用する、特定の遺伝子標的への大規模な遺伝子コンストラクトの挿入は困難である。

【発明の概要】

【０００８】

概要

一態様において、細胞のゲノムの標的領域に非ウイルス的に挿入される少なくとも１つのＤＮＡテンプレートを含む初代免疫細胞であって、ＤＮＡテンプレートのサイズが、約５キロ塩基対（ｋｂ）以上である、初代免疫細胞が本明細書に提供される。

【０００９】

いくつかの実施形態において、初代免疫細胞は、ＤＮＡテンプレートを初代免疫細胞に導入するためのウイルスベクターを含まない。

【００１０】

いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートのサイズは、約５．０ｋｂ、５．１ｋｂ、５．２ｋｂ、５．３ｋｂ、５．４ｋｂ、５．５ｋｂ、５．６ｋｂ、５．７ｋｂ、５．８ｋｂ、５．９ｋｂ、６．０ｋｂ、６．１ｋｂ、６．２ｋｂ、６．３ｋｂ、６．４ｋｂ、６．５ｋｂ、６．６ｋｂ、６．７ｋｂ、６．８ｋｂ、６．９ｋｂ、７．０ｋｂ、７．１ｋｂ、７．２ｋｂ、７．３ｋｂ、７．４ｋｂ、７．５ｋｂ、７．６ｋｂ、７．７ｋｂ、７．８ｋｂ、７．９ｋｂ、８．０ｋｂ、８．１ｋｂ、８．２ｋｂ、８．３ｋｂ、８．４ｋｂ、８．５ｋｂ、８．６ｋｂ、８．７ｋｂ、８．８ｋｂ、８．９ｋｂ、９．０ｋｂ、９．１ｋｂ、９．２ｋｂ、９．３ｋｂ、９．４ｋｂ、９．５ｋｂ、９．６ｋｂ、９．７ｋｂ、９．８ｋｂ、９．９ｋｂ、１０．０ｋｂ以上、またはこれらのサイズの間の任意のＤＮＡテ

ンプレートサイズである。
【００１１】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートのサイズは、約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約５ｋｂ～約９ｋｂ、約５ｋｂ～約８ｋｂ、約５ｋｂ～約７ｋｂ、約５ｋｂ～約６ｋｂ、約６ｋｂ～約１０ｋｂ、約６ｋｂ～約９ｋｂ、約６ｋｂ～約８ｋｂ、約６ｋｂ～約７ｋｂ、約７ｋｂ～約１０ｋｂ、約７ｋｂ～約９ｋｂ、約７ｋｂ～約８ｋｂ、約８ｋｂ～約１０ｋｂ、約８ｋｂ～約９ｋｂ、または約９ｋｂ～約１０ｋｂである。
【００１２】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、二本鎖ＤＮＡテンプレートまたは一本鎖ＤＮＡテンプレートである。
【００１３】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、直鎖ＤＮＡテンプレートまたは環状ＤＮＡテンプレートであり、任意選択で、環状ＤＮＡテンプレートは、プラスミドである。
【００１４】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートの５’及び３’末端は、初代細胞のゲノム内の挿入部位に隣接するゲノム配列と相同であるヌクレオチド配列を含む。
【００１５】
いくつかの実施形態において、細胞のゲノムの標的領域は、Ｔ細胞受容体アルファ定常（ＴＲＡＣ）遺伝子座またはゲノムセーフハーバー（ＧＳＨ）である。
【００１６】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、異種配列を含む。
【００１７】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、遺伝子を含む。
【００１８】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、転写因子を含むプライミング受容体を含む。
【００１９】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含む。
【００２０】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）と、転写因子を含むプライミング受容体とを含む。
【００２１】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、キメラ抗原受容体に作動可能に連結された誘導性プロモーターを含む。
【００２２】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、プライミング受容体に作動可能に連結された構成的プロモーターを更に含む。
【００２３】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、キメラ抗原受容体に作動可能に連結された誘導性プロモーター、及びプライミング受容体に作動可能に連結された構成的プロモーターを更に含む。
【００２４】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、５’から３’の方向に、誘導性プロモーター、キメラ抗原受容体、構成的プロモーター、及びプライミング受容体を含む。
【００２５】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、５’から３’の方向に、構成的プロモーター、プライミング受容体、誘導性プロモーター、及びキメラ抗原受容体を含む。
【００２６】

いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、自己切断２Ａペプチド（Ｐ２Ａ）を更に含む。

【００２７】

いくつかの実施形態において、Ｐ２Ａ核酸は、ＤＮＡテンプレートの３’末端にある。

【００２８】

いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、ウッドチャック肝炎ウイルス翻訳後調節エレメント（ＷＰＲＥ）を更に含む。

【００２９】

いくつかの実施形態において、ＷＰＲＥは、ＣＡＲをコードする核酸の３’末端にあり、プライミング受容体をコードする核酸の５’末端にあるか、またはＷＰＲＥは、プライミング受容体をコードする核酸の３’末端にあり、ＣＡＲをコードする核酸の５’末端にある。

【００３０】

いくつかの実施形態において、プライミング受容体は、Ｎ末端からＣ末端方向に、抗原に対する結合親和性を有する細胞外抗原結合ドメイン、１つ以上のリガンド誘導性タンパク質分解切断部位を含む膜貫通ドメイン、及びヒトまたはヒト化転写エフェクターを含む細胞内ドメインを含み、細胞外抗原結合ドメインへの抗原の結合は、リガンド誘導性タンパク質分解切断部位での切断をもたらし、それによって細胞内ドメインを放出する。

【００３１】

いくつかの実施形態において、プライミング受容体は、膜貫通ドメインと細胞内ドメインとの間に位置付けられた膜近傍ドメイン（ＪＭＤ）を更に含む。

【００３２】

いくつかの実施形態において、転写因子は、誘導性プロモーターに結合し、かつＣＡＲの発現を誘導する。

【００３３】

いくつかの実施形態において、ＣＡＲは、Ｎ末端からＣ末端へと、抗原に対する結合親和性を有する細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内共刺激ドメイン、及び細胞内活性化ドメインを含む。

【００３４】

いくつかの実施形態において、プライミング受容体とＣＡＲは、異なる抗原に結合する。

【００３５】

いくつかの実施形態において、プライミング受容体とＣＡＲは、同じ抗原に結合する。

【００３６】

いくつかの実施形態において、免疫細胞は、初代ヒト免疫細胞である。

【００３７】

いくつかの実施形態において、初代免疫細胞は、自己免疫細胞である。

【００３８】

いくつかの実施形態において、初代免疫細胞は、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、Ｔ細胞、ＣＤ８＋Ｔ細胞、ＣＤ４＋Ｔ細胞、初代Ｔ細胞、またはＴ細胞前駆細胞である。

【００３９】

いくつかの実施形態において、初代免疫細胞は、初代Ｔ細胞である。

【００４０】

いくつかの実施形態において、初代免疫細胞は、初代ヒトＴ細胞である。

【００４１】

いくつかの実施形態において、初代免疫細胞は、ウイルスフリーである。

【００４２】

別の態様では、本明細書に開示される複数の初代免疫細胞を含む細胞の集団が、本明細書に提供される。

【００４３】

別の態様において、初代免疫細胞のゲノムの標的領域に挿入される少なくとも１つのＤＮＡテンプレートを含む初代免疫細胞であって、ＤＮＡテンプレートのサイズが、５キロ塩基対以上であり、初代免疫細胞が、ＤＮＡテンプレートを初代免疫細胞に導入するためのウイルスベクターを含まない、初代免疫細胞が本明細書に提供される。

【００４４】

別の態様において、初代免疫細胞のゲノムの標的領域に挿入される、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）と、転写因子を含むプライミング受容体とを含む、少なくとも１つのＤＮＡテンプレートを含む、初代免疫細胞であって、ＤＮＡテンプレートのサイズが、５キロ塩基対以上であり、初代免疫細胞が、ＤＮＡテンプレートを初代免疫細胞に導入するためのウイルスベクターを含まない、初代免疫細胞が本明細書に提供される。

【００４５】

別の態様において、リボ核タンパク質複合体（ＲＮＰ）－ＤＮＡテンプレート複合体を含む生存可能なウイルスフリーの初代細胞であって、ＲＮＰが、ヌクレアーゼドメイン及びガイドＲＮＡを含み、ＤＮＡテンプレートのサイズが、５キロベースヌクレオチド以上のサイズであり、ＤＮＡテンプレートの５’及び３’末端が、初代細胞のゲノム内の挿入部位に隣接するゲノム配列と相同であるヌクレオチド配列を含む、生存可能なウイルスフリーの初代細胞が本明細書に提供される。

【００４６】

別の態様において、リボ核タンパク質複合体（ＲＮＰ）－ＤＮＡテンプレート複合体を含む生存可能なウイルスフリーの初代細胞であって、ＲＮＰが、ヌクレアーゼドメイン及びガイドＲＮＡを含み、ＤＮＡテンプレートのサイズが、５キロベースヌクレオチド以上のサイズであり、ＤＮＡテンプレートが、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）と、転写因子を含むプライミング受容体とを含み、ＤＮＡテンプレートの５’及び３’末端が、初代細胞のゲノム内の挿入部位に隣接するゲノム配列と相同であるヌクレオチド配列を含む、生存可能なウイルスフリーの初代細胞が本明細書に提供される。

【００４７】

別の態様において、対象における疾患を治療する方法であって、初代免疫細胞を対象に投与することを含む、方法が本明細書に提供される。

【００４８】

いくつかの実施形態において、疾患は、がんである。

【００４９】

別の態様において、ＤＮＡテンプレートを含む非ウイルスベクターであって、ＤＮＡテンプレートが、５キロベースヌクレオチド以上のサイズであり、ＤＮＡテンプレートの５’及び３’末端が、初代細胞のゲノム内の挿入部位に隣接するゲノム配列と相同であるヌクレオチド配列を含む、非ウイルスベクターが本明細書に提供される。

【００５０】

いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートのサイズは、約５．０ｋｂ、５．１ｋｂ、５．２ｋｂ、５．３ｋｂ、５．４ｋｂ、５．５ｋｂ、５．６ｋｂ、５．７ｋｂ、５．８ｋｂ、５．９ｋｂ、６．０ｋｂ、６．１ｋｂ、６．２ｋｂ、６．３ｋｂ、６．４ｋｂ、６．５ｋｂ、６．６ｋｂ、６．７ｋｂ、６．８ｋｂ、６．９ｋｂ、７．０ｋｂ、７．１ｋｂ、７．２ｋｂ、７．３ｋｂ、７．４ｋｂ、７．５ｋｂ、７．６ｋｂ、７．７ｋｂ、７．８ｋｂ、７．９ｋｂ、８．０ｋｂ、８．１ｋｂ、８．２ｋｂ、８．３ｋｂ、８．４ｋｂ、８．５ｋｂ、８．６ｋｂ、８．７ｋｂ、８．８ｋｂ、８．９ｋｂ、９．０ｋｂ、９．１ｋｂ、９．２ｋｂ、９．３ｋｂ、９．４ｋｂ、９．５ｋｂ、９．６ｋｂ、９．７ｋｂ、９．８ｋｂ、９．９ｋｂ、１０．０ｋｂ以上、またはこれらのサイズの間の任意のＤＮＡテンプレートサイズである。

【００５１】

いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートのサイズは、約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約５ｋｂ～約９ｋｂ、約５ｋｂ～約８ｋｂ、約５ｋｂ～約７ｋｂ、約５ｋｂ～約６ｋｂ、約６ｋｂ～約１０ｋｂ、約６ｋｂ～約９ｋｂ、約６ｋｂ～約８ｋｂ、約６ｋｂ～約７ｋ

ｂ、約７ｋｂ～約１０ｋｂ、約７ｋｂ～約９ｋｂ、約７ｋｂ～約８ｋｂ、約８ｋｂ～約１０ｋｂ、約８ｋｂ～約９ｋｂ、または約９ｋｂ～約１０ｋｂである。

【００５２】

いくつかの実施形態において、細胞のゲノムの標的領域は、Ｔ細胞受容体アルファ定常（ＴＲＡＣ）遺伝子座またはゲノムセーフハーバー（ＧＳＨ）である。

【００５３】

いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、異種配列を含む。

【００５４】

いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、遺伝子を含む。

【００５５】

いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、転写因子を含むプライミング受容体を含む。

【００５６】

いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含む。

【００５７】

いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）と、転写因子を含むプライミング受容体とを含む。

【００５８】

いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、キメラ抗原受容体に作動可能に連結された誘導性プロモーターを含む。

【００５９】

いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、プライミング受容体に作動可能に連結された構成的プロモーターを更に含む。

【００６０】

いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、キメラ抗原受容体に作動可能に連結された誘導性プロモーター、及びプライミング受容体に作動可能に連結された構成的プロモーターを更に含む。

【００６１】

いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、５’から３’の方向に、誘導性プロモーター、キメラ抗原受容体、構成的プロモーター、及びプライミング受容体を含む。

【００６２】

いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、５’から３’の方向に、構成的プロモーター、プライミング受容体、誘導性プロモーター、及びキメラ抗原受容体を含む。

【００６３】

いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、自己切断２Ａペプチド（Ｐ２Ａ）を更に含む。

【００６４】

いくつかの実施形態において、Ｐ２Ａは、ＤＮＡテンプレートの３’末端にある。

【００６５】

いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、ウッドチャック肝炎ウイルス翻訳後調節エレメント（ＷＰＲＥ）を更に含む。

【００６６】

いくつかの実施形態において、プライミング受容体は、Ｎ末端からＣ末端方向に、抗原に対する結合親和性を有する細胞外抗原結合ドメイン、１つ以上のリガンド誘導性タンパク質分解切断部位を含む膜貫通ドメイン、及びヒトまたはヒト化転写エフェクターを含む細胞内ドメインを含み、細胞外抗原結合ドメインへの抗原の結合は、リガンド誘導性タンパク質分解切断部位での切断をもたらし、それによって細胞内ドメインを放出する。

【００６７】

いくつかの実施形態において、プライミング受容体は、膜貫通ドメインと細胞内ドメイ

ンとの間に位置付けられた膜近傍ドメイン（ＪＭＤ）を更に含む。
【００６８】
いくつかの実施形態において、転写因子は、誘導性プロモーターに結合し、かつＣＡＲの発現を誘導する。
【００６９】
いくつかの実施形態において、ＣＡＲは、Ｎ末端からＣ末端へと、抗原に対する結合親和性を有する細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内共刺激ドメイン、及び細胞内活性化ドメインを含む。
【００７０】
いくつかの実施形態において、プライミング受容体とＣＡＲは、異なる抗原に結合する。
【００７１】
いくつかの実施形態において、プライミング受容体とＣＡＲは、同じ抗原に結合する。
【００７２】
別の態様において、初代免疫細胞を編集する方法であって、リボヌクレオタンパク質複合体（ＲＮＰ）－ＤＮＡテンプレート複合体を提供することであって、ＲＮＰが、ヌクレアーゼドメイン及びガイドＲＮＡを含み、ＤＮＡテンプレートのサイズが、５キロベースヌクレオチド以上のサイズであり、ＤＮＡテンプレートの５’及び３’末端が、初代免疫細胞のゲノム内の挿入部位に隣接するゲノム配列と相同であるヌクレオチド配列を含む、提供することと、ＲＮＰ－ＤＮＡテンプレート複合体を初代免疫細胞内に非ウイルス的に導入することであって、ガイドＲＮＡが、初代免疫細胞のゲノム内の標的領域に特異的にハイブリダイズし、ヌクレアーゼドメインが、標的領域を切断して、初代免疫細胞のゲノム内の挿入部位を作製する、非ウイルス的に導入することと、初代免疫細胞のゲノムにおける挿入部位へのＤＮＡテンプレートの挿入を介して、初代免疫細胞を編集することと、を含む、方法が本明細書に提供される。
【００７３】
いくつかの実施形態において、非ウイルス的に導入することは、エレクトロポレーションを含む。
【００７４】
いくつかの実施形態において、ヌクレアーゼドメインは、ＣＲＩＳＰＲ関連エンドヌクレアーゼ（Ｃａｓ）、任意にＣａｓ９ヌクレアーゼを含む。
【００７５】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートのサイズは、約５．０ｋｂ、５．１ｋｂ、５．２ｋｂ、５．３ｋｂ、５．４ｋｂ、５．５ｋｂ、５．６ｋｂ、５．７ｋｂ、５．８ｋｂ、５．９ｋｂ、６．０ｋｂ、６．１ｋｂ、６．２ｋｂ、６．３ｋｂ、６．４ｋｂ、６．５ｋｂ、６．６ｋｂ、６．７ｋｂ、６．８ｋｂ、６．９ｋｂ、７．０ｋｂ、７．１ｋｂ、７．２ｋｂ、７．３ｋｂ、７．４ｋｂ、７．５ｋｂ、７．６ｋｂ、７．７ｋｂ、７．８ｋｂ、７．９ｋｂ、８．０ｋｂ、８．１ｋｂ、８．２ｋｂ、８．３ｋｂ、８．４ｋｂ、８．５ｋｂ、８．６ｋｂ、８．７ｋｂ、８．８ｋｂ、８．９ｋｂ、９．０ｋｂ、９．１ｋｂ、９．２ｋｂ、９．３ｋｂ、９．４ｋｂ、９．５ｋｂ、９．６ｋｂ、９．７ｋｂ、９．８ｋｂ、９．９ｋｂ、１０．０ｋｂ以上、またはこれらのサイズの間の任意のＤＮＡテンプレートサイズである。
【００７６】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートのサイズは、約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約５ｋｂ～約９ｋｂ、約５ｋｂ～約８ｋｂ、約５ｋｂ～約７ｋｂ、約５ｋｂ～約６ｋｂ、約６ｋｂ～約１０ｋｂ、約６ｋｂ～約９ｋｂ、約６ｋｂ～約８ｋｂ、約６ｋｂ～約７ｋｂ、約７ｋｂ～約１０ｋｂ、約７ｋｂ～約９ｋｂ、約７ｋｂ～約８ｋｂ、約８ｋｂ～約１０ｋｂ、約８ｋｂ～約９ｋｂ、または約９ｋｂ～約１０ｋｂである。
【００７７】
いくつかの実施形態において、細胞のゲノムの標的領域は、Ｔ細胞受容体アルファ定常

（ＴＲＡＣ）遺伝子座またはゲノムセーフハーバー（ＧＳＨ）である。
【００７８】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、二本鎖ＤＮＡテンプレートまたは一本鎖ＤＮＡテンプレートである。
【００７９】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、直鎖ＤＮＡテンプレートまたは環状ＤＮＡテンプレートであり、任意選択で、環状ＤＮＡテンプレートは、プラスミドである。
【００８０】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、異種配列を含む。
【００８１】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、遺伝子を含む。
【００８２】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、転写因子を含むプライミング受容体を含む。
【００８３】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含む。
【００８４】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）と、転写因子を含むプライミング受容体とを含む。
【００８５】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、キメラ抗原受容体に作動可能に連結された誘導性プロモーターを含む。
【００８６】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、プライミング受容体に作動可能に連結された構成的プロモーターを更に含む。
【００８７】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、キメラ抗原受容体に作動可能に連結された誘導性プロモーター、及びプライミング受容体に作動可能に連結された構成的プロモーターを更に含む。
【００８８】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、５’から３’の方向に、誘導性プロモーター、キメラ抗原受容体、構成的プロモーター、及びプライミング受容体を含む。
【００８９】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、５’から３’の方向に、構成的プロモーター、プライミング受容体、誘導性プロモーター、及びキメラ抗原受容体を含む。
【００９０】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、自己切断２Ａペプチド（Ｐ２Ａ）を更に含む。
【００９１】
いくつかの実施形態において、Ｐ２Ａ核酸は、ＤＮＡテンプレートの３’末端にある。
【００９２】
いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、ウッドチャック肝炎ウイルス翻訳後調節エレメント（ＷＰＲＥ）を更に含む。
【００９３】
いくつかの実施形態において、ＷＰＲＥは、ＣＡＲをコードする核酸の３’末端にあり、プライミング受容体をコードする核酸の５’末端にあるか、またはＷＰＲＥは、プライミング受容体をコードする核酸の３’末端にあり、ＣＡＲをコードする核酸の５’末端にある。

【００９４】
いくつかの実施形態において、プライミング受容体は、Ｎ末端からＣ末端方向に、抗原に対する結合親和性を有する細胞外抗原結合ドメイン、１つ以上のリガンド誘導性タンパク質分解切断部位を含む膜貫通ドメイン、及びヒトまたはヒト化転写エフェクターを含む細胞内ドメインを含み、細胞外抗原結合ドメインへの抗原の結合は、リガンド誘導性タンパク質分解切断部位での切断をもたらし、それによって細胞内ドメインを放出する。
【００９５】
いくつかの実施形態において、プライミング受容体は、膜貫通ドメインと細胞内ドメインとの間に位置付けられた膜近傍ドメイン（ＪＭＤ）を更に含む。
【００９６】
いくつかの実施形態において、転写因子は、誘導性プロモーターに結合し、かつＣＡＲの発現を誘導する。
【００９７】
いくつかの実施形態において、ＣＡＲは、Ｎ末端からＣ末端へと、抗原に対する結合親和性を有する細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内共刺激ドメイン、及び細胞内活性化ドメインを含む。
【００９８】
いくつかの実施形態において、プライミング受容体とＣＡＲは、異なる抗原に結合する。
【００９９】
いくつかの実施形態において、プライミング受容体とＣＡＲは、同じ抗原に結合する。
【０１００】
いくつかの実施形態において、免疫細胞は、初代ヒト免疫細胞である。
【０１０１】
いくつかの実施形態において、初代免疫細胞は、自己免疫細胞である。
【０１０２】
いくつかの実施形態において、初代免疫細胞は、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、Ｔ細胞、ＣＤ８＋Ｔ細胞、ＣＤ４＋Ｔ細胞、初代Ｔ細胞、またはＴ細胞前駆細胞である。
【０１０３】
いくつかの実施形態において、初代免疫細胞は、初代Ｔ細胞である。
【０１０４】
いくつかの実施形態において、初代免疫細胞は、初代ヒトＴ細胞である。
【０１０５】
いくつかの実施形態において、初代免疫細胞は、ウイルスフリーである。
【０１０６】
いくつかの実施形態において、方法は、患者から免疫細胞を得ることと、プラスミドをインビトロで導入することとを更に含む。
【０１０７】
別の態様において、初代免疫細胞を編集する方法であって、リボヌクレオタンパク質複合体（ＲＮＰ）－ＤＮＡテンプレート複合体を提供することであって、ＲＮＰが、ヌクレアーゼドメイン及びガイドＲＮＡを含み、ＤＮＡテンプレートのサイズが、５キロベースヌクレオチド以上のサイズであり、ＤＮＡテンプレートが、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）と、転写因子を含むプライミング受容体とを含み、ＤＮＡテンプレートの５’及び３’末端が、初代免疫細胞のゲノム内の挿入部位に隣接するゲノム配列と相同であるヌクレオチド配列を含む、提供することと、ＲＮＰ－ＤＮＡテンプレート複合体を初代免疫細胞内に非ウイルス的に導入することであって、ガイドＲＮＡが、初代免疫細胞のゲノム内の標的領域に特異的にハイブリダイズし、ヌクレアーゼドメインが、標的領域を切断して、初代免疫細胞のゲノム内の挿入部位を作製する、非ウイルス的に導入することと、初代免疫細胞のゲノムにおける挿入部位へのＤＮＡテンプレートの挿入を介して、初代免疫細胞を編集することと、を含む、方法が本明細書に提供される。

【図面の簡単な説明】
【０１０８】
本開示のこれら及び他の特徴、態様、及び利点は、以下の説明及び添付の図面に関してよりよく理解されるようになる。
【０１０９】
【図１】本発明の例示的なプラスミドを示す。
【０１１０】
【図２】操作された免疫細胞を産生する例示的な方法を示す。
【０１１１】
【図３】実験プロトコルの概略図を示す。
【０１１２】
【図４】所望の受容体発現及び対照を示す実験結果を提供する。
【０１１３】
【図５】実験プロトコルの概略図を示す。
【０１１４】
【図６】不要なＣＡＲ発現の量が少ないことを示す実験結果を提供する。
【０１１５】
【図７】染色体１１上のＧＳ９４組込み部位を示す概略図を示す。
【０１１６】
【図８Ａ】Ｋ５６２－ＰｒｉｍｅＲ細胞との共培養の４８時間後の操作されたＴ細胞のＣＡＲ誘導及びｐｒｉｍｅＲ発現を示すプロットを含む。
【図８Ｂ】Ｋ５６２－ｐｒｉｍｅＲ／ＣＡＲ細胞と４８時間共培養した操作されたＴ細胞の細胞毒性及びサイトカイン分泌レベルを示すプロットを含む。
【０１１７】
【図９】Ａは、細胞毒性に対する組込み部位の効果を評価するための実験概要を示す概略図を含む。Ｂは、Ｋ５６２－ｐｒｉｍｅＲ／ＣＡＲまたはＫ５６２－ＣＡＲ細胞と４８時間共培養した操作されたＴ細胞の測定された細胞毒性を示すプロットを含む。
【０１１８】
【図１０】Ａは、サイトカイン分泌に対する組込み部位の効果を評価するための実験概要を示す概略図を含む。Ｂは、Ｋ５６２－ｐｒｉｍｅＲ／ＣＡＲ細胞と４８時間共培養した操作されたＴ細胞の測定されたサイトカインレベルを示すプロットを含む。
【０１１９】
【図１１】ＰｒｉｍｅＲ非依存性ＣＡＲ発現に対する組込み部位の影響を決定するために行われたインビトロ実験を示す概略図を含む。「フロー」は、フローサイトメトリーを指し、「ｒｅｓｔｉｍ」は、操作されたＴ細胞の反復的なＣＤ３／ＣＤ２８刺激を指す。「ＥＰ」は、エレクトロポレーションを指す。
【０１２０】
【図１２Ａ】示される組込み部位を使用するときの経時的なＰｒｉｍｅＲ発現の安定性を示すプロットを含む。「フロー」は、フローサイトメトリーを指し、「ｒｅｓｔｉｍ」は、操作されたＴ細胞の反復的なＣＤ３／ＣＤ２８刺激を指す。「ＥＰ」は、エレクトロポレーションを指す。
【図１２Ｂ】示される組込み部位を使用するときの経時的なＰｒｉｍｅＲ発現の安定性を示すプロットを含む。「フロー」は、フローサイトメトリーを指し、「ｒｅｓｔｉｍ」は、操作されたＴ細胞の反復的なＣＤ３／ＣＤ２８刺激を指す。「ＥＰ」は、エレクトロポレーションを指す。図１２Ｂにおいて、ＰｒｉｍｅＲ発現は、ＴＲＡＣ組込み部位を使用することからの発現に対して正規化される。
【０１２１】
【図１３Ａ】ｉＧｕｉｄｅ－Ｓｅｑアッセイ技法を示す概略図を含む。
【図１３Ｂ】指示された組込み部位について、ｉＧｕｉｄｅ　Ｓｅｑアッセイを使用する、オンターゲット効率を示すプロットを含む。

【図１３Ｃ】ＧＳ９４が２つのドナーにわたって再現可能な推定オフターゲットを有しなかったことを示す、ｉＧｕｉｄｅ－Ｓｅｑ分析からの概略図を含む。
【０１２２】
【図１４】ｉＧｕｉｄｅ－Ｓｅｑワークフロー及びデータを示す概略図を含む。
【０１２３】
【図１５】ｉＧＵＩＤＥ－ｓｅｑ及び上昇予測によって識別される推定オフターゲット部位のｒｈＡｍｐ－ｓｅｑ分析を示すプロットを含む。
【０１２４】
【図１６】ＰｒｉｍｅＲ／ＣＡＲ回路のＧＳ９４、ＧＳ１０２及びＴＲＡＣノックインを用いた細胞のＲＮＡ－ｓｅｑ分析を示すプロットを含む。２人のドナーにおけるＴＲＡＣまたはＧＳ１０２遺伝子座（ｘ軸）のいずれかに組込みを有する細胞との対比における、ＧＳ９４遺伝子座（ｙ軸）に組込みを有する細胞における遺伝子発現の散布図。薄灰色のドットは、ＥＴＳ１及びＦＬＩ１に対応する。濃灰色は、ｅｄｇｅＲを使用して差異的に発現されることが見出された遺伝子である（変化倍率＞０、ＦＤＲ補正ｐ値＜０．０１、比較された条件にわたる百万当たりの平均カウント少なくとも２）。
【０１２５】
【図１７】ＧＳ９４にｐｒｉｍｅＲ／ＣＡＲ回路ノックインを有する細胞におけるサイトカイン非依存的増殖の非存在を示すプロットを含む。
【０１２６】
【図１８】Ｋ５６２細胞における、ｐｒｉｍｅＲ及びＣＡＲを含む８．３ｋｂの導入遺伝子回路の発現を示す。
【０１２７】
【図１９】Ａは、ＧＳ９４セーフハーバー遺伝子座に挿入された４．６ｋｂのカセットの図を示す。Ｂは、ＧＳ９４セーフハーバー遺伝子座に挿入された８．３ｋｂカセットの図を示す。
【発明を実施するための形態】
【０１２８】
詳細な説明
本発明は、新規の操作された免疫細胞、及びそのような細胞を作製し、使用するための方法を提供する。操作された免疫細胞は、操作されたプライミング受容体及びキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）の遺伝子をコードする、免疫細胞のゲノムに挿入された導入遺伝子を含む。最初に、操作された免疫細胞は、細胞の表面にプラスミドによってコードされるプライミング受容体を発現するが、ＣＡＲを発現しない。プライミング受容体は、切断可能な転写因子を含む。本発明の免疫細胞が標的細胞に遭遇すると、プライミング受容体は、標的細胞上の同族リガンドに結合する。これにより、プライミング受容体は切断可能な転写因子を放出する。転写因子の放出は、操作された免疫細胞に、細胞の表面上の組込み導入遺伝子によってコードされるＣＡＲを発現させる。
【０１２９】
免疫細胞の表面上で発現される場合、ＣＡＲは、標的細胞上の同族リガンドに結合するために利用可能である。ＣＡＲの標的リガンドへの結合は、操作された免疫細胞による細胞毒性応答を引き起こし、これが標的細胞を殺傷する。
【０１３０】
本発明の操作された免疫細胞は、以前の操作された免疫細胞よりもいくつかの利点を有する。以下に記載される実施形態は、標的指向非ウイルス送達を使用して合成回路をＴ細胞ゲノムに送達することができ、ゲノム組込み後に回路忠実度を維持することができることを実証する。これは、ＴＲＡＣプロモーターへの標的組込みが、レンチウイルス遺伝子送達を介して発生するように、ゲノムへのオフターゲット遺伝子挿入のリスクを低減するため、安全性プロファイルを高め、細胞の治療ウィンドウを広げる。追加として、この回路は、追加の安全機能を提供する。例えば、細胞毒性ＣＡＲは、プライミング受容体の同族リガンドと標的細胞に遭遇するまで発現されないため、活性化のために利用することが

できない。更に、ＣＡＲが最初に発現されないため、細胞は疲労、分化、緊張シグナル伝達、及び活性化誘導性免疫細胞死を示す可能性が低く、同時に高い増殖及び持続性の可能性を示す。

【０１３１】

定義

特許請求の範囲及び明細書で使用される用語は、特に明記しない限り、以下に示されるように定義される。

【０１３２】

本明細書で使用される場合、「遺伝子」という用語は、特定のタンパク質またはタンパク質のセグメントをコードする染色体に沿って配置されたＤＮＡのセグメントからなる、遺伝の基本単位を指す。遺伝子は、典型的には、プロモーター、５’非翻訳領域、１つ以上のコード配列（エクソン）、任意選択でイントロン、及び３’非翻訳領域を含む。遺伝子は、ターミネーター、エンハンサー及び／またはサイレンサーを更に含んでもよい。

【０１３３】

本明細書で使用される場合、「遺伝子座」という用語は、遺伝子または遺伝子マーカーが位置する染色体上の特定の固定された物理的位置を指す。

【０１３４】

「セーフハーバー遺伝子座」という用語は、隣接する遺伝子の発現または調節を中断することなく、遺伝子または遺伝子エレメントが組み込まれ得る遺伝子座を指す。これらのセーフハーバー遺伝子座は、セーフハーバー部位（ＳＨＳ）とも称される。本明細書で使用される場合、セーフハーバー遺伝子座は、本明細書で定義される導入遺伝子をコードする配列が挿入され得る「組込み部位」または「ノックイン部位」を指す。いくつかの実施形態において、挿入は、組込み部位に位置する配列の置換によって生じる。いくつかの実施形態において、挿入は、組込み部位での配列の置換なしに生じる。企図される組込み部位の例を表１に提供する。

【０１３５】

本明細書で使用される場合、「挿入」という用語は、標的遺伝子座またはセーフハーバー部位に組み込まれた（挿入された）ヌクレオチド配列を指す。挿入物は、例えば、相同性指向修復（ＨＤＲ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ゲノム編集または当業者に既知のゲノム領域にヌクレオチド配列を挿入するための他の方法を使用して、標的遺伝子座またはセーフハーバー部位に組み込まれる遺伝子または遺伝子エレメントを指すために使用することができる。

【０１３６】

「ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ」系は、外来核酸に対する防御のための広範なクラスの細菌系を指す。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、幅広い真菌及び古細菌生物に見出される。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系には、Ｉ型、ＩＩ型、及びＩＩＩ型サブタイプが含まれる。野生型ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、外来核酸を認識及び切断するために、ガイド及び活性化ＲＮＡとの複合体中のＲＮＡ媒介ヌクレアーゼ、Ｃａｓ９を利用する。ガイドＲＮＡ及び活性化ＲＮＡの両方の活性を有するガイドＲＮＡもまた、当該技術分野で知られている。いくつかの場合において、そのような二重活性ガイドＲＮＡは、小ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）と称される。

【０１３７】

Ｃａｓ９相同体は、以下の分類群の細菌を含むがこれらに限定されない、多種多様な真菌に見出される：Ａｃｔｉｎｏｂａｃｔｅｒｉａ、Ａｑｕｉｆｉｃａｅ、Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｔｅｓ－Ｃｈｌｏｒｏｂｉ、Ｃｈｌａｍｙｄｉａｅ－Ｖｅｒｒｕｃｏｍｉｃｒｏｂｉａ、Ｃｈｌｒｏｆｌｅｘｉ、Ｃｙａｎｏｂａｃｔｅｒｉａ、Ｆｉｒｍｉｃｕｔｅｓ、Ｐｒｏｔｅｏｂａｃｔｅｒｉａ、Ｓｐｉｒｏｃｈａｅｔｅｓ、及びＴｈｅｒｍｏｔｏｇａｅ。例示的なＣａｓ９タンパク質は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９タンパク質である。追加のＣａｓ９タンパク質及びその相同体は、例えば、Ｃｈｙｌｉｎｋｓｉ，ｅｔ ａｌ．，ＲＮＡ Ｂｉｏｌ．２０１３ Ｍａｙ １；１０（５）：

７２６－７３７、Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．２０１１ Ｊｕｎｅ；９（６）：４６７－４７７、Ｈｏｕ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２０１３ Ｓｅｐ ２４；１１０（３９）：１５６４４－９、Ｓａｍｐｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ．２０１３ Ｍａｙ ９；４９７（７４４８）：２５４－７、及びＪｉｎｅｋ，ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ．２０１２ Ａｕｇ １７；３３７（６０９６）：８１６－２１に記載されている。Ｃａｓ９ヌクレアーゼドメインは、宿主細胞における効率的な活性または強化された安定性のために最適化することができる。

【０１３８】

本明細書で使用される場合、「Ｃａｓ９」という用語は、ＲＮＡ媒介性ヌクレアーゼ（例えば、細菌もしくは古細菌起源の、またはそれに由来する）を指す。例示的なＲＮＡ媒介ヌクレアーゼには、前述のＣａｓ９タンパク質及びその相同体が含まれ、ＣＰＦ１が含まれるが、これに限定されない（例えば、Ｚｅｔｓｃｈｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ，Ｖｏｌｕｍｅ １６３，Ｉｓｓｕｅ ３，ｐ７５９－７７１，２２ Ｏｃｔｏｂｅｒ ２０１５を参照されたい）。同様に、本明細書で使用される場合、「Ｃａｓ９リボ核タンパク質」複合体等という用語は、Ｃａｓ９タンパク質とｃｒＲＮＡ（例えば、ガイドＲＮＡまたは小ガイドＲＮＡ）、Ｃａｓ９タンパク質とトランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）、Ｃａｓ９タンパク質と小ガイドＲＮＡとの間の複合体、またはそれらの組み合わせ（例えば、Ｃａｓ９タンパク質、ｔｒａｃｒＲＮＡ、及びｃｒＲＮＡガイドＲＮＡを含有する複合体）を指す。

【０１３９】

本明細書で使用される場合、「Ｔリンパ球」及び「Ｔ細胞」という用語は、交換可能に使用され、胸腺での成熟を完了し、体内のある特定の外来抗原を同定した細胞を指す。これらの用語はまた、他の免疫細胞の活性化及び不活性化を含む、免疫系において様々な役割を有する主要な白血球型を指す。Ｔ細胞は、培養Ｔ細胞、例えば、初代Ｔ細胞、または培養Ｔ細胞株由来のＴ細胞、例えば、Ｊｕｒｋａｔ、ＳｕｐＴ１等、または哺乳類由来のＴ細胞などの任意のＴ細胞であり得る。Ｔ細胞としては、ナイーブＴ細胞、刺激Ｔ細胞、初代Ｔ細胞（例えば、培養されていない）、培養Ｔ細胞、不死化Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、細胞毒性Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、調節Ｔ細胞、ナチュラルキラーＴ細胞、それらの組み合わせ、またはそれらの亜集団が挙げられるが、これらに限定されない。Ｔ細胞は、ＣＤ３＋細胞であり得る。Ｔ細胞は、ＣＤ４$^+$、ＣＤ８$^+$、またはＣＤ４$^+$及びＣＤ８$^+$であり得る。Ｔ細胞は、任意のタイプのＴ細胞、ＣＤ４＋／ＣＤ８＋二重陽性Ｔ細胞、ＣＤ４＋ヘルパーＴ細胞（例えば、Ｔｈ１及びＴｈ２細胞）、ＣＤ８＋Ｔ細胞（例えば、細胞毒性Ｔ細胞）、末梢性であり得、血液単核細胞（ＰＢＭＣ）、末梢血白血球（ＰＢＬ）、腫瘍浸潤性リンパ球（ＴＩＬ）、メモリーＴ細胞、ナイーブＴ細胞、制御性Ｔ細胞、γδＴ細胞等を含むが、これらに限定されない。それは、発達の任意の段階において、任意のＴ細胞であり得る。追加のタイプのヘルパーＴ細胞には、Ｔｈ３（Ｔｒｅｇ）細胞、Ｔｈ１７細胞、Ｔｈ９細胞、またはＴｆｈ細胞が含まれる。追加のタイプのメモリーＴ細胞には、セントラルメモリーＴ細胞（Ｔｃｍ細胞）、エフェクターメモリーＴ細胞（Ｔｅｍ細胞及びＴＥＭＲＡ細胞）などの細胞が含まれる。Ｔ細胞はまた、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）またはキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を発現するように修飾されたＴ細胞などの遺伝子修飾Ｔ細胞を指し得る。Ｔ細胞は、幹細胞または前駆細胞から分化することもできる。

【０１４０】

「ＣＤ４＋Ｔ細胞」は、表面上でＣＤ４を発現し、細胞免疫応答に関連するＴ細胞のサブセットを指す。ＣＤ４＋Ｔ細胞は、ＩＦＮ－γ、ＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＬ－４及びＩＬ－１０などのサイトカインの分泌を含むことができる、刺激後分泌プロファイルを特徴とする。「ＣＤ４」は、本来Ｔリンパ球上の分化抗原として定義される５５ｋＤ糖タンパク質であるが、単球／マクロファージを含む他の細胞上にも見出された。ＣＤ４抗原は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、ＭＨＣ（主要組織適合性複合体）クラスＩＩ制限免疫応答における連想認識エレメントとして示唆されている。Ｔリンパ球上で、ＣＤ４抗原は、ヘルパー／誘導因子サブセットを定義する。

【０１４１】
「ＣＤ８＋Ｔ細胞」は、それらの表面上でＣＤ８を発現し、ＭＨＣクラスＩ制限され、細胞毒性Ｔ細胞として機能するＴ細胞のサブセットを指す。「ＣＤ８」分子は、胸腺細胞上、ならびに細胞毒性及び抑制性Ｔリンパ球上に存在する分化抗原である。ＣＤ８抗原は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、主要な組織適合性複合体クラスＩ制限相互作用における連想認識エレメントである。
【０１４２】
本明細書で使用される場合、「造血幹細胞」という語句は、血液細胞を生じさせることができる幹細胞のタイプを指す。造血幹細胞は、骨髄系もしくはリンパ系の細胞、またはそれらの組み合わせを生じさせることができる。造血幹細胞は主に骨髄に見出されるが、それらは末梢血、またはその画分から単離され得る。様々な細胞表面マーカーを使用して、造血幹細胞を同定、選別、または精製することができる。いくつかの場合において、造血幹細胞は、ｃ－ｋｉｔ$^{+}$及びｌｉｎ$^{-}$として同定される。いくつかの場合において、ヒト造血幹細胞は、ＣＤ３４$^{+}$、ＣＤ５９$^{+}$、Ｔｈｙ１／ＣＤ９０$^{+}$、ＣＤ３８$^{lo}$／$^{-}$、Ｃ－ｋｉｔ／ＣＤ１１７$^{+}$、ｌｉｎ$^{-}$として同定される。いくつかの場合において、ヒト造血幹細胞は、ＣＤ３４$^{-}$、ＣＤ５９$^{+}$、Ｔｈｙ１／ＣＤ９０$^{+}$、ＣＤ３８$^{lo}$／$^{-}$、Ｃ－ｋｉｔ／ＣＤ１１７$^{+}$、ｌｉｎ$^{-}$として同定される。いくつかの場合において、ヒト造血幹細胞は、ＣＤ１３３$^{+}$、ＣＤ５９$^{+}$、Ｔｈｙ１／ＣＤ９０$^{+}$、ＣＤ３８$^{lo}$／$^{-}$、Ｃ－ｋｉｔ／ＣＤ１１７$^{+}$、ｌｉｎ$^{-}$として同定される。いくつかの場合において、マウス造血幹細胞は、ＣＤ３４$^{lo}$／$^{-}$、ＳＣＡ－１$^{+}$、Ｔｈｙ１$^{+}$／$^{lo}$、ＣＤ３８$^{+}$、Ｃ－ｋｉｔ$^{+}$、ｌｉｎ$^{-}$として同定される。いくつかの場合において、造血幹細胞は、ＣＤ１５０$^{+}$ＣＤ４８$^{-}$ＣＤ２４４$^{-}$である。
【０１４３】
本明細書で使用される場合、「造血細胞」という語句は、造血幹細胞に由来する細胞を指す。造血細胞は、生物、系、器官、または組織（例えば、血液、またはその画分）からの単離によって得られるか、または提供され得る。あるいは、造血幹細胞を単離し、幹細胞を分化させることによって造血細胞を得るか、または提供することができる。造血細胞は、更なる細胞型に分化する可能性が限定された細胞を含む。そのような造血細胞には、多能性前駆細胞、系統制限前駆細胞、一般的な骨髄系前駆細胞、顆粒球－マクロファージ前駆細胞、または巨核球－赤血球系前駆細胞が含まれるが、これらに限定されない。造血細胞には、リンパ球、赤血球、顆粒球、単球、及び血小板などのリンパ系及び骨髄系の細胞が含まれる。
【０１４４】
本明細書で使用される場合、「免疫細胞」という語句は、造血細胞、多能性幹細胞、及び誘導多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）を含む、免疫細胞を生じさせる全ての細胞型を含む。いくつかの実施形態において、免疫細胞は、Ｂ細胞、マクロファージ、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、誘導多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）、ヒト多能性幹細胞（ＨＳＰＣ）、Ｔ細胞またはＴ細胞前駆細胞もしくは樹状細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は、先天性免疫細胞である。
【０１４５】
本明細書で使用される場合、初代細胞または初代幹細胞の文脈における「初代」という用語は、形質転換または不死化されていない細胞を指す。そのような初代細胞は、限られた回数で培養、継代培養、または継代する（例えば、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０回培養する）ことができる。いくつかの場合において、初代細胞は、インビトロ培養条件に適合される。いくつかの場合において、初代細胞は、生物、系、器官、または組織から単離され、任意選択で選別され、例えば、培養または継代培養なしに直接利用される。いくつかの場合において、初代細胞は、刺激され、活性化され、または分化される。例えば、初代Ｔ細胞は、ＣＤ３、ＣＤ２８アゴニスト、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、またはそれらの組み合わせとの接触（例えば、その存在下で培養すること）によって活性化することができ

る。
【０１４６】
本明細書で使用される場合、「エクスビボ」という用語は、一般に、生体組織内または生体組織上で、好ましくは生物外の人工環境内で行われた実験または測定を含み、好ましくは自然条件との差異が最小限である。
【０１４７】
本明細書で使用される場合、「コンストラクト」という用語は、巨大分子またはポリヌクレオチドを含む分子の複合体を指す。
【０１４８】
本明細書で使用される場合、「組込み」という用語は、コンストラクトの１つ以上のヌクレオチドを細胞ゲノムに安定して挿入する、すなわち、細胞の染色体ＤＮＡ内の核酸配列に共有結合するプロセスを指す。それはまた、組込みの部位におけるヌクレオチド欠失を指し得る。挿入部位に欠失がある場合、「組込み」は、１つ以上の挿入されたヌクレオチドで欠失された内因性配列またはヌクレオチドの置換を更に含み得る。
【０１４９】
本明細書で使用される場合、「外因性」という用語は、宿主細胞に導入され、その細胞に天然ではない分子または活性を指す。この分子は、例えば、コード核酸の宿主遺伝物質への導入によって、例えば、宿主染色体への組込みによって、またはプラスミドなどの非染色体遺伝物質として導入することができる。したがって、コード核酸の発現に関連して使用される場合、この用語は、コード核酸を発現可能な形態で細胞に導入することを指す。「内在性」という用語は、天然の編集されていない条件下で宿主細胞に存在する分子または活性を指す。同様に、この用語は、コード核酸の発現と関連して使用される場合、細胞内に含まれ、外因的に導入されないコード核酸の発現を指す。
【０１５０】
「異種」という用語は、隣接配列に天然ではない核酸またはポリペプチド配列またはドメインを指し、例えば、異種配列は、一方または両方の末端に生じる核酸またはポリペプチド配列にカップリングされた状態で自然界には見出されない。
【０１５１】
「相同」という用語は、隣接配列に天然である核酸またはポリペプチド配列またはドメインを指し、例えば、相同配列は、一方または両方の末端に生じる核酸またはポリペプチド配列にカップリングされた状態で自然界に見出される。
【０１５２】
本明細書で使用される場合、「ポリヌクレオチドドナーコンストラクト」は、遺伝子的にポリヌクレオチドに挿入され、そのポリヌクレオチドに対して外因性であるヌクレオチド配列（例えば、ＤＮＡ配列）を指す。ポリヌクレオチドドナーコンストラクトは、ＲＮＡに転写され、任意選択でポリペプチドに翻訳される。ポリヌクレオチドドナーコンストラクトは、原核配列、真核ｍＲＮＡ由来のｃＤＮＡ、真核（例えば、哺乳類）ＤＮＡ由来のゲノムＤＮＡ配列、及び合成ＤＮＡ配列を含むことができる。例えば、ポリヌクレオチドドナーコンストラクトは、ｍｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、天然ポリペプチド（すなわち、天然に存在するポリペプチド）もしくはその断片、またはバリアントポリペプチド（例えば、天然ポリペプチドと１００％未満の配列同一性を有する天然ポリペプチド）もしくはその断片であり得る。
【０１５３】
本明細書で使用される場合、「相補的」または「相補性」という用語は、ヌクレオチドまたは核酸間の特異的塩基対合を指す。相補的ヌクレオチドは、一般に、Ａ及びＴ（またはＡ及びＵ）、ならびにＧ及びＣである。本明細書に記載のガイドＲＮＡは、配列、例えば、細胞内のゲノム配列に完全に相補的または実質的に相補的である（例えば、１～４個のミスマッチを有する）ＤＮＡ標的配列を含むことができる。
【０１５４】
本明細書で使用される場合、「導入遺伝子」という用語は、ある生物から別の生物へ自

然に、またはいくつかの遺伝子操作技法のいずれかによって移行されたポリヌクレオチドを指す。それは、任意選択でポリペプチドに翻訳される。それは、任意選択で組換えタンパク質に翻訳される。「組換えタンパク質」は、遺伝子（組換えＤＮＡ）によってコードされるタンパク質であり、遺伝子の発現及びメッセンジャーＲＮＡの翻訳をサポートする系においてクローニングされている（発現系を参照されたい）。組換えタンパク質は、治療剤、例えば、本明細書に開示される疾患または障害を治療するタンパク質であり得る。使用される場合、導入遺伝子は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを指すことができる。導入遺伝子はまた、限定されないが、ｓｈＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、及びｍｉＲなどの非コード配列を指すことができる。

【０１５５】

「タンパク質」、「ポリペプチド」、及び「ペプチド」は、本明細書において互換的に使用される。

【０１５６】

本明細書で使用される場合、「作動可能に連結された」または「操作可能に連結された」という用語は、一方の機能が他方の機能によって影響を受けるように、核酸配列が単一の核酸断片に結合することを指す。例えば、プロモーターが、コード配列または機能性ＲＮＡの発現に影響を及ぼすことができる（すなわち、コード配列または機能性ＲＮＡがプロモーターによる転写制御下にある）場合、プロモーターは、それに作動可能に連結される。コード配列は、センス配向及びアンチセンス配向の両方で対照配列に作動可能に連結され得る。

【０１５７】

本明細書で使用される場合、「発達細胞状態」という用語は、例えば、細胞が不活性であるとき、能動的に発現するとき、分化するとき、老化するとき等を指す。発達細胞状態はまた、前駆細胞状態（例えば、Ｔ細胞前駆細胞）の細胞を指し得る。

【０１５８】

使用される場合、「コードすること」という用語は、目的のタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸の配列を指す。核酸配列は、ＤＮＡまたはＲＮＡの分子のいずれかであり得る。好ましい実施形態において、分子は、ＤＮＡ分子である。他の好ましい実施形態において、分子は、ＲＮＡ分子である。ＲＮＡ分子として存在する場合、それは、宿主細胞のリボソームに翻訳を開始するように指示する配列（例えば、開始コドン、ＡＴＧ）、及びリボソームに翻訳を終了するように指示する配列（例えば、終止コドン）を含む。開始コドンと終止コドンとの間には、オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）がある。そのような用語は、当業者に既知である。

【０１５９】

「挿入」という用語は、非天然配列を導入するためのヌクレオチド配列の操作を指す。これは、例えば、制限酵素及びリガーゼを使用することによって行われ、それによって、通常は目的の遺伝子をコードする目的のＤＮＡ配列は、互換性のあるオーバーラップを作製するために両方の分子を適切な制限酵素で消化し、次いでリガーゼを使用して分子を一緒に結合させることによって、別の核酸分子に組み込まれ得る。当業者は、そのような操作に非常に精通しており、例は、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．（Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｆｒｉｔｓｃｈ，＆　Ｍａｎｉａｔｉｓ，“Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ“，２ｎｄ　ｅｄ．，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，１９８９）に見出すことができ、これは、参照により任意の図、図面及び表を含むその全体が本明細書に組み込まれる。

【０１６０】

本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、哺乳類対象を指す。例示的な対象としては、ヒト、サル、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウシ、ウマ、ラクダ、ヤギ、ウサギ、ブタ及びヒツジが挙げられる。ある特定の実施形態において、対象は、ヒトである。いくつかの実施形態において、対象は、本明細書に提供される操作された細胞またはその集団で治療することができる疾患または状態を有する。いくつかの態様において、疾患ま

たは状態は、がんである。
【０１６１】
本明細書で使用される場合、「プロモーター」という用語は、コード配列または機能性ＲＮＡの発現を制御することができるヌクレオチド配列（例えば、ＤＮＡ配列）を指す。プロモーター配列は、近位及びより遠位の上流エレメントからなり、後者のエレメントは、しばしばエンハンサーと称される。プロモーターは、その全体が天然遺伝子に由来することができ、自然界に見出される異なるプロモーターからの異なるエレメントで構成され得、及び／または合成ＤＮＡセグメントを含み得る。プロモーターは、本明細書で企図されるように、目的の細胞に対して内在性であり得るか、または目的の細胞に対して外因性であり得る。異なるプロモーターが、異なる組織もしくは細胞型において、または異なる発達段階において、または異なる環境条件に応答して、遺伝子発現を誘導することができることは、当業者によって理解される。当該技術分野で既知であるように、プロモーターは、プロモーターの強度及び／またはプロモーターが活性である条件、例えば、構成的プロモーター、強力なプロモーター、弱いプロモーター、誘導性／抑制可能なプロモーター、組織特異的または発達的に調節されたプロモーター、細胞周期依存性プロモーター等に従って選択することができる。
【０１６２】
プロモーターは、誘導性プロモーター（例えば、熱ショックプロモーター、テトラサイクリン調節プロモーター、ステロイド調節プロモーター、金属調節プロモーター、エストロゲン受容体調節プロモーター等）であり得る。プロモーターは、構成的プロモーター（例えば、ＣＭＶプロモーター、ＵＢＣプロモーター）であり得る。いくつかの実施形態において、プロモーターは、空間的に制限された及び／または時間的に制限されたプロモーター（例えば、組織特異的プロモーター、細胞型特異的プロモーター等）であり得る。例えば、米国公開第２０１８０１２７７８６号を（その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照されたい。
【０１６３】
本明細書で企図されるように、遺伝子編集は、遺伝子（またはヌクレオチド配列）のノックインまたはノックアウトを伴い得る。本明細書で使用される場合、「ノックイン」という用語は、ゲノムへのＤＮＡ配列またはその断片の付加を指す。ノックインされるかかるＤＮＡ配列は、全遺伝子または複数の遺伝子を含んでもよく、遺伝子または前述のいずれかの部分もしくは断片と関連する調節配列を含んでもよい。例えば、組換えタンパク質をコードするポリヌクレオチドドナーコンストラクトは、変異体遺伝子を保有する細胞のゲノムに挿入され得る。いくつかの実施形態において、ノックイン戦略は、提供された配列による既存の配列の置換、例えば、野生型コピーによる変異体対立遺伝子の置換を伴う。他方では、「ノックアウト」という用語は、遺伝子または遺伝子の発現の除去を指す。例えば、遺伝子は、リーディングフレームの破壊につながるヌクレオチド配列の欠失または付加のいずれかによってノックアウトすることができる。別の例として、遺伝子の一部を無関係の（例えば、非コード）配列で置き換えることによって、遺伝子をノックアウトしてもよい。
【０１６４】
本明細書で使用される場合、「非相同末端結合」またはＮＨＥＪという用語は、相同テンプレート核酸を必要とせずにＤＮＡ鎖の切断末端またはニック末端が直接ライゲーションされる細胞プロセスを指す。ＮＨＥＪは、修復部位での１つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換、またはそれらの組み合わせをもたらすことができる。
【０１６５】
本明細書で使用される場合、「相同性指向修復」またはＨＤＲは、相同テンプレート核酸からの重合によってＤＮＡ鎖の切断末端またはニック末端が修復される細胞プロセスを指す。したがって、元の配列は、テンプレートの配列と置き換えられる。相同テンプレート核酸は、ゲノムの他の場所にある相同配列（姉妹染色分体、相同染色体、または同じもしくは異なる染色体上の反復領域）によって提供され得る。あるいは、外因性テンプレー

ト核酸を導入して、標的部位での配列の特定のＨＤＲ誘導変化を得ることができる。このようにして、特定の変異が切断部位に導入され得る。

【０１６６】

本明細書で使用される場合、一本鎖ＤＮＡテンプレートまたは二本鎖ＤＮＡテンプレートは、ＨＤＲのテンプレートとして細胞によって使用され得るＤＮＡオリゴヌクレオチドを指す。一般に、一本鎖ＤＮＡテンプレートまたは二本鎖ＤＮＡテンプレートは、標的部位に対する相同性のある少なくとも１つの領域を有する。いくつかの場合において、一本鎖ＤＮＡテンプレートまたは二本鎖ＤＮＡテンプレートは、標的切断部位に挿入される異種配列を含有する領域に隣接する２つの相同領域を有する。

【０１６７】

「ベクター」及び「プラスミド」という用語は、互換的に使用され、本明細書で使用される場合、遺伝物質を細胞に導入するのに有用なポリヌクレオチドビヒクルを指す。ベクターは、線形または円形であり得る。ベクターは、宿主細胞の標的ゲノムに組み込むか、または宿主細胞内で独立して複製することができる。ベクターは、例えば、複製起点、マルチクローニング部位、及び／または選択可能マーカーを含むことができる。発現ベクターは、典型的には、発現カセットを含む。ベクター及びプラスミドには、組み込みベクター、原核プラスミド、真核プラスミド、植物合成染色体、エピソーム、コスミド、及び人工染色体が含まれるが、これらに限定されない。

【０１６８】

本明細書で使用される場合、核酸または核酸を含む複合体、例えば、ＲＮＰ－ＤＮＡテンプレート複合体を導入する文脈における「導入する」という語句は、核酸配列またはＲＮＰ－ＤＮＡテンプレート複合体の細胞外から細胞内への転座を指す。いくつかの場合において、導入することは、核酸または複合体の細胞外から細胞の核内への転座を指す。そのような転座の様々な方法が企図され、これには、エレクトロポレーション、ナノワイヤまたはナノチューブとの接触、受容体媒介内在化、細胞透過性ペプチドを介した転座、リポソーム媒介転座等が含まれるが、これらに限定されない。

【０１６９】

本明細書で使用される場合、「発現カセット」という用語は、宿主細胞における選択されたポリヌクレオチドの発現を容易にするために、選択されたポリヌクレオチドに作動可能に連結された調節配列を含む、組換えまたは合成的に生成されたポリヌクレオチドコンストラクトである。例えば、調節配列は、宿主細胞内での選択されたポリヌクレオチドの転写、または宿主細胞内での選択されたポリヌクレオチドの転写及び翻訳を容易にすることができる。発現カセットは、例えば、宿主細胞のゲノム中に組み込まれるか、または発現ベクター中に存在することができる。

【０１７０】

本明細書で使用される場合、「それを必要とする対象」という語句は、本明細書に記載の疾患または障害の１つ以上の症状または徴候を呈する、及び／またはそれらと診断される対象を指す。

【０１７１】

「化学療法剤」は、がんの治療に有用な化学的化合物を指す。化学療法剤としては、がんの増殖を促進することができるホルモンの効果を調節、低減、遮断、または阻害するように作用する「抗ホルモン剤」または「内分泌療法剤」が挙げられる。

【０１７２】

「組成物」という用語は、例えば、本明細書で企図される操作された細胞またはタンパク質を含有する混合物を指す。いくつかの実施形態において、組成物は、アジュバント、安定剤、賦形剤等の追加の成分を含有し得る。「組成物」または「薬学的組成物」という用語は、その中に含まれる活性成分の生物学的活性が対象の治療に有効であることを可能にするような形態であり、薬学的組成物中に提供される量で対象に許容できないほど毒性のある追加の成分を含まない調製物を指す。

【０１７３】

「改善する」という用語は、疾患状態、例えば、がん疾患状態の治療における任意の治療上有益な結果を指し、その予防、重症度または進行の低下、寛解、または治癒を含む。

【０１７４】

「インサイチュ」という用語は、生体から分離して成長する、例えば、組織培養物中で成長する生細胞内で生じるプロセスを指す。

【０１７５】

「インビボ」という用語は、生体内で生じるプロセスを指す。

【０１７６】

本明細書で使用される「哺乳動物」という用語は、ヒト及び非ヒトの両方を含み、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、マウス、ウシ、ウマ、及びブタを含むが、これらに限定されない。

【０１７７】

「同一性」パーセントという用語は、２つ以上の核酸配列またはポリペプチド配列の文脈において、以下に記載される配列比較アルゴリズム（例えば、ＢＬＡＳＴＰ及びＢＬＡＳＴＮまたは当業者に利用可能な他のアルゴリズム）のうちの１つを使用して、または目視検査によって測定される、最大一致について比較及び整列させたときに同じ特定のパーセンテージのヌクレオチドまたはアミノ酸残基を有する２つ以上の配列または部分配列を指す。用途に応じて、「同一性」パーセントは、比較されている配列の領域にわたって、例えば、機能ドメインにわたって存在することができるか、または代替的に、比較される２つの配列の全長にわたって存在することができる。

【０１７８】

配列比較のために、典型的には、１つの配列が、試験配列が比較される参照配列として機能する。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験及び参照配列をコンピューターに入力し、必要に応じて部分配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメーターを指定する。次いで、配列比較アルゴリズムは、指定されたプログラムパラメーターに基づいて、参照配列に対する試験配列（複数可）のパーセント配列同一性を計算する。

【０１７９】

比較のための配列の最適な整列は、例えば、Ｓｍｉｔｈ＆Ｗａｔｅｒｍａｎ，Ａｄｖ．Ａｐｐｌ．Ｍａｔｈ．２：４８２（１９８１）の局所的相同性アルゴリズムによって、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ＆Ｗｕｎｓｃｈ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４３（１９７０）の相同性アルゴリズムによって、Ｐｅａｒｓｏｎ＆Ｌｉｐｍａｎ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８５：２４４４（１９８８）の類似法の検索によって、これらのアルゴリズムのコンピューターによる実装によって（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ　Ｐａｃｋａｇｅ（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｃｏｍｐｕｔｅｒ　Ｇｒｏｕｐ，５７５　Ｓｃｉｅｎｃｅ　Ｄｒ．，Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓ．）におけるＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＦＡＳＴＡ、及びＴＦＡＳＴＡ）、または目視検査によって実施することができる（一般に、以下のＡｕｓｕｂｅｌ　ｅｔ　ａｌ．を参照されたい）。

【０１８０】

配列同一性及び配列類似性のパーセントを決定するのに好適なアルゴリズムの一例は、ＢＬＡＳＴアルゴリズムであり、これはＡｌｔｓｃｈｕｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０（１９９０）に記載されている。ＢＬＡＳＴ分析を実施するためのソフトウェアは、国立生物工学情報センター（ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／）を通じて公開されている。

【０１８１】

「十分な量」という用語は、所望の効果をもたらすのに十分な量、例えば、細胞内のタンパク質凝集を調節するのに十分な量を意味する。

【０１８２】

「治療有効量」という用語は、疾患の症状を改善するのに有効な量である。治療有効量は、予防が治療法とみなされ得るため、「予防有効量」であり得る。

【０１８３】

本明細書で使用される場合、「有効量」という用語は、有益なまたは所望の結果をもたらすのに十分な量の化合物（例えば、本明細書に記載の組成物、本明細書に記載の細胞）を指す。有効量は、１つ以上の投与、適用または投与量で投与することができ、特定の製剤または投与経路に限定されることを意図するものではない。本明細書で使用される場合、「治療すること」という用語は、状態、疾患、障害等の改善をもたらすか、またはその症状を改善する任意の効果、例えば、緩和、低減、調節、改善または除去を含む。

【０１８４】

「調節する」及び「調節」という用語は、列挙された変数を低減もしくは阻害するか、または代替的に、活性化もしくは増加させることを指す。

【０１８５】

「増加する」及び「活性化する」という用語は、列挙された変数における、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、１００％、２倍、３倍、４倍、５倍、１０倍、２０倍、５０倍、１００倍、またはそれ以上の増加を指す。

【０１８６】

「低減する」及び「阻害する」という用語は、列挙された変数における、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、２倍、３倍、４倍、５倍、１０倍、２０倍、５０倍、１００倍、またはそれ以上の減少を指す。

【０１８７】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形の「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」及び「その（ｔｈｅ）」は、文脈上そうでないとする明確な指示がない限り、複数の指示対象を含むことに留意されたい。

【０１８８】

組換え核酸及びベクター

いくつかの実施形態において、本開示は、１つ以上の導入遺伝子を含む組換え核酸挿入物を企図する。導入遺伝子は、治療用タンパク質、抗体、ペプチド、自殺遺伝子、アポトーシス遺伝子または目的の任意の他の遺伝子をコードすることができる。いくつかの実施形態において、導入遺伝子は、プライミング受容体をコードする。いくつかの実施形態において、導入遺伝子は、キメラ抗原受容体をコードする。いくつかの実施形態において、挿入物は、プライミング受容体導入遺伝子及びキメラ抗原受容体導入遺伝子を含む。

【０１８９】

挿入物はまた、自己切断ペプチドを含むことができる。自己切断ペプチドの例としては、自己切断ウイルス２Ａペプチド、例えば、ブタテシオウイルス－１（Ｐ２Ａ）ペプチド、Ｔｈｏｓｅａ ａｓｉｇｎａウイルス（Ｔ２Ａ）ペプチド、ウマ鼻炎Ａウイルス（Ｅ２Ａ）ペプチド、または口蹄疫ウイルス（Ｆ２Ａ）ペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。自己切断２Ａペプチドは、単一のコンストラクトからの複数の遺伝子産物の発現を可能にする。（例えば、Ｃｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．“Ｃｌｅａｖａｇｅ ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ２Ａ ｐｅｐｔｉｄｅｓ ｆｏｒ ｈｉｇｈ ｌｅｖｅｌ ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｉｎ ＣＨＯ ｃｅｌｌｓ，”ＭＡｂｓ ７（２）：４０３－４１２（２０１５）を参照されたい）。

【０１９０】

挿入物はまた、ＷＰＲＥエレメントを含むことができる。ＷＰＲＥエレメントは、一般に、Ｈｉｇａｓｈｉｍｏｔｏ，Ｔ．，ｅｔ ａｌ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ １４，１２９８－１３０４（２００７）、及びＺｕｆｆｅｒｅｙ，Ｒ．，ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｖｉｒｏｌ．１９９９ Ａｐｒ；７３（４）：２８８６－９２に記載されており、これらは両方とも参照により本明細書に組み込まれる。

【０１９１】

プライミング受容体

本開示のある特定の態様において、プライミング受容体は、Ｎｏｔｃｈタンパク質に基

づく合成回路受容体である。タンパク質のデルタファミリーからのものなどの同族リガンドへの天然Ｎｏｔｃｈ受容体の結合は、Ｎｏｔｃｈタンパク質の細胞内断片を切断する膜内タンパク質分解を引き起こす。この細胞内断片は、Ｎｏｔｃｈから切断されたときにのみ機能する転写調節因子である。切断は、ＡＤＡＭメタロプロテアーゼ及びガンマ－セクレターゼ複合体による連続的なタンパク質分解によって起こり得る。この細胞内断片は、細胞の核に入り、細胞－細胞シグナル伝達遺伝子を活性化する。天然のＮｏｔｃｈタンパク質とは対照的に、ｓｙｎＮｏｔｃｈプライミング受容体は、天然のＮｏｔｃｈ細胞内断片を、ＣＡＲをコードする遺伝子をプライミング受容体からの放出時に活性化させるものに置き換える。

【０１９２】

Ｎｏｔｃｈ受容体は、モジュラードメイン組織を有する。Ｎｏｔｃｈ受容体の外部ドメインは、リガンド結合の原因となる一連のＮ末端上皮成長因子（ＥＧＦ）様反復からなる。合成Ｎｏｔｃｈ受容体またはプライミング受容体において、Ｎｏｔｃｈリガンド結合ドメインは、選択された標的リガンドまたは抗原に結合するリガンド結合ドメインと置き換えられる。ＥＧＦ反復に続いて、３つのＬＩＮ－１２／Ｎｏｔｃｈ反復（ＬＮＲ）モジュールが続き、これはＮｏｔｃｈ受容体に特有であり、早期受容体活性化の防止に関与すると広く報告されている。Ｎｏｔｃｈ１のヘテロ二量体化（ＨＤ）ドメインは、フリン切断によって分割され、それによりＮ末端部分が細胞外サブユニットを終結させ、そのＣ末端半分が膜貫通サブユニットの始まりを構成する。細胞外領域に続いて、受容体は、膜貫通セグメントと、転写調節因子を含む細胞内ドメイン（ＩＣＤ）とを有する。

【０１９３】

複数形態のプライミング受容体を、本明細書に記載の方法、細胞、及び核酸に使用することができる。本明細書における方法及び細胞における使用が企図されるプライミング受容体の１つのタイプは、異種細胞外リガンド結合ドメイン、ＮＲＲ、ＴＭＤ、及びＩＣＤを含むＮｏｔｃｈ受容体と実質的な配列同一性を有する連結ポリペプチドを含む。「ＦｎＮｏｔｃｈ」受容体は、異種細胞外リガンド結合ドメイン、Ｒｏｂｏ受容体（哺乳類Ｒｏｂｏ１、Ｒｏｂｏ２、Ｒｏｂｏ３、またはＲｏｂｏ４など）との実質的な配列同一性を有する連結ポリペプチド、続いて１、２、または３つのフィブロネクチン反復（「Ｆｎ」）、ＴＭＤ、及びＩＣＤを含む。「ミニＮｏｔｃｈ」受容体は、異種細胞外リガンド結合ドメイン、Ｎｏｔｃｈ受容体（ＮＲＲを欠く）、ＴＭＤ、及びＩＣＤと実質的な配列同一性を有する連結ポリペプチドを含む。「最小Ｔｉｎｋｅｒ　Ｎｏｔｃｈ」受容体は、異種細胞外リガンド結合ドメイン、Ｎｏｔｃｈ受容体と実質的な配列同一性を欠く連結ポリペプチド（例えば、合成（ＧＧＳ）ｎポリペプチド配列）、ＴＭＤ、及びＩＣＤを含む。「ヒンジＮｏｔｃｈ」受容体は、異種細胞外リガンド結合ドメイン、オリゴマー化ドメイン（すなわち、合成受容体及び／または既存の宿主受容体との二量体化、三量体化、またはより高次の多量体化を促進するドメイン）、ＴＭＤ、及びＩＣＤを含むヒンジ配列を含む。これらの受容体クラスの全ては、合成、組換えであり、自然界には生じない。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される非天然に存在する受容体は、受容体のタンパク質分解切断を誘発し、細胞内のカスタム転写プログラムを調節する転写調節因子の放出を誘発する、標的細胞表面に示されるリガンドに結合する。いくつかの実施形態において、プライミング受容体は、Ｎｏｔｃｈ受容体のＬＩＮ－１２－Ｎｏｔｃｈ反復（ＬＮＲ）及び／またはヘテロ二量体化ドメイン（ＨＤ）を含まない。

【０１９４】

プライミング受容体細胞外ドメイン

プライミング受容体は、細胞外ドメインを含む。いくつかの実施形態において、細胞外ドメインは、受容体のリガンド結合部分を含む。いくつかの実施形態では、細胞外ドメインは、１つ以上の標的抗原に結合する抗原結合部分を含む。いくつかの実施形態において、抗原結合部分は、抗体またはその機能的抗原結合断片の１つ以上の抗原結合決定基を含む。いくつかの実施形態において、抗原結合部分は、抗体、ナノボディ、ダイアボディ、トリアボディ、またはミニボディ、Ｆ（ａｂ’）２断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（

ｓｃＦｖ）、及び単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）、またはその機能的断片からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、抗原結合部分は、ｓｃＦｖを含む。抗原結合部分は、天然に存在するアミノ酸配列を含み得るか、または所望の特性及び／または改善された特性、例えば、増加した結合親和性を提供するように操作、設計、または修飾することができる。抗原に「選択的に結合する」抗体は、抗原に高い親和性で結合し、他の無関係の抗原と有意に結合しない抗原結合部分である。いくつかの実施形態において、細胞外抗原結合ドメインは、アルカリホスファターゼ生殖細胞型（ＡＬＰＧ）に結合する。追加の抗原は、ＷＯ２０１０６１８７２に記載されている。

【０１９５】

膜貫通ドメイン

上述のように、本開示のキメラポリペプチドは、１つ以上のリガンド誘導性タンパク質分解切断部位を含むＴＭＤを含む。

【０１９６】

一般に、本明細書に開示されるキメラ受容体に好適なＴＭＤは、少なくとも１つのガンマ－セクレターゼ切断部位を含む、１型膜貫通受容体の任意の膜貫通ドメインであり得る。アミロイド前駆体タンパク質（ＡＰＰ）及びＮｏｔｃｈを含む、ガンマ－セクレターゼ複合体及びその基質タンパク質の構造及び機能の詳細な説明は、例えば、Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ，Ｆｒｏｎｔｉｅｒｓ Ｃｅｌｌ Ｎｅｕｒｏｓｃｉ（２０１４）による最近のレビューにおいて見出すことができる。１型膜貫通受容体由来の非限定の好適なＴＭＤには、ＣＬＳＴＮ１、ＣＬＳＴＮ２、ＡＰＬＰ１、ＡＰＬＰ２、ＬＲＰ８、ＡＰＰ、ＢＴＣ、ＴＧＢＲ３、ＳＰＮ、ＣＤ４４、ＣＳＦ１Ｒ、ＣＸＣＬ１６、ＣＸ３ＣＬ１、ＤＣＣ、ＤＬＬ１、ＤＳＧ２、ＤＡＧ１、ＣＤＨ１、ＥＰＣＡＭ、ＥＰＨＡ４、ＥＰＨＢ２、ＥＦＮＢ１、ＥＦＮＢ２、ＥｒｂＢ４、ＧＨＲ、ＨＬＡ－Ａ、及びＩＦＮＡＲ２由来のものが含まれ、ＴＭＤは、少なくとも１つのガンマセクレターゼ切断部位を含む。本明細書に記載の組成物及び方法に好適な追加のＴＭＤには、１型膜貫通受容体ＩＬ１Ｒ１、ＩＬ１Ｒ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＮＳＲ、ＥＲＮ１、ＥＲＮ２、ＪＡＧ２、ＫＣＮＥ１、ＫＣＮＥ２、ＫＣＮＥ３、ＫＣＮＥ４、ＫＬ、ＣＨＬ１、ＰＴＰＲＦ、ＳＣＮ１Ｂ、ＳＣＮ３Ｂ、ＮＰＲ３、ＮＧＦＲ、ＰＬＸＤＣ２、ＰＡＭ、ＡＧＥＲ、ＲＯＢＯｌ、ＳＯＲＣＳ３、ＳＯＲＣＳ１、ＳＯＲＬ１、ＳＤＣ１、ＳＤＣ２、ＳＰＮ、ＴＹＲ、ＴＹＲＰ１、ＤＣＴ、ＹＡＳＮ、ＦＬＴ１、ＣＤＨ５、ＰＫＨＤ１、ＮＥＣＴＩＮｌ、ＰＣＤＨＧＣ３、ＮＲＧ１、ＬＲＰ１Ｂ、ＣＤＨ２、ＮＲＧ２、ＰＴＰＲＫ、ＳＣＮ２Ｂ、Ｎｒａｄｄ、及びＰＴＰＲＭからの膜貫通ドメインが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、本開示のキメラポリペプチドまたはＮｏｔｃｈ受容体のＴＭＤは、アルカデインアルファ及びアルカデインガンマなどのカルシンテニンファミリーのメンバーのＴＭＤに由来するＴＭＤである。いくつかの実施形態において、本開示のキメラポリペプチドまたはＮｏｔｃｈ受容体のＴＭＤは、Ｎｏｔｃｈ受容体に関して既知のＴＭＤである。いくつかの実施形態において、本開示のキメラポリペプチドまたはＮｏｔｃｈ受容体のＴＭＤは、異なるＮｏｔｃｈ受容体に由来するＴＭＤである。例えば、ヒトＮｏｔｃｈ１に基づくミニＮｏｔｃｈにおいて、Ｎｏｔｃｈ１　ＴＭＤは、Ｎｏｔｃｈ２　ＴＭＤ、Ｎｏｔｃｈ３　ＴＭＤ、Ｎｏｔｃｈ４　ＴＭＤ、またはＤａｎｉｏ ｒｅｒｉｏ、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ、Ｘｅｎｏｐｕｓ ｌａｅｖｉｓ、またはＧａｌｌｕｓ ｇａｌｌｕｓなどの非ヒト動物由来のＮｏｔｃｈ　ＴＭＤで置換され得る。

【０１９７】

いくつかの実施形態において、プライミング受容体は、Ｓ２またはＳ３などのＮｏｔｃｈ切断部位を含む。本明細書に開示される組成物及び方法に好適な追加のタンパク質分解切断部位には、コラゲナーゼ－１、－２、及び－３（ＭＭＰ－１、－８、及び－１３）、ゼラチナーゼＡ及びＢ（ＭＭＰ－２及び－９）、ストロメリシン１、２、及び３（ＭＭＰ－３、－１０、及び－１１）、マトリリシン（ＭＭＰ－７）、及び膜メタロプロテアーゼ（ＭＴ１－ＭＭＰ及びＭＴ２－ＭＭＰ）から選択されるＭＭＰのメタロプロテイナーゼ切断部位が含まれるが、これらに限定されない。好適なプロテアーゼ切断部位の別の例は、

プラスミノーゲン活性化因子切断部位、例えば、ウロキナーゼプラスミノーゲン活性化因子（ｕＰＡ）または組織プラスミノーゲン活性化因子（ｔＰＡ）切断部位である。好適なプロテアーゼ切断部位の別の例は、プロラクチン切断部位である。ｕＰＡ及びｔＰＡの切断配列の具体例としては、Ｙａｌ－Ｇｌｙ－Ａｒｇを含む配列が挙げられる。タンパク質分解的に切断可能なリンカーに含まれ得るプロテアーゼ切断部位の別の例は、タバコエッチウイルス（ＴＥＶ）プロテアーゼ切断部位、例えば、Ｇｌｕ－Ａｓｎ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｇｌｎ－Ｓｅｒであり、ここで、プロテアーゼは、グルタミンとセリンとの間で切断する。タンパク質分解的に切断可能なリンカーに含まれ得るプロテアーゼ切断部位の別の例は、エンテロキナーゼ切断部位、例えば、Ａｓｐ－Ａｓｐ－Ａｓｐ－Ａｓｐ－Ｌｙｓであり、ここで、切断は、リジン残基の後に生じる。タンパク質分解的に切断可能なリンカーに含まれ得るプロテアーゼ切断部位の別の例は、トロンビン切断部位、例えば、Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｐｒｏ－Ａｒｇである。プロテアーゼ切断部位を含む追加の好適なリンカーとしては、以下のプロテアーゼによって切断可能な配列が挙げられる：ＰｒｅＳｃｉｓｓｉｏｎ（商標）プロテアーゼ（ヒトライノウイルス３Ｃプロテアーゼ及びグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼを含む融合タンパク質）、トロンビン、カテプシンＢ、エプスタイン－バーウイルスプロテアーゼ、ＭＭＰ－３（ストロメリシン）、ＭＭＰ－７（マトリリシン）、ＭＭＰ－９；サーモリシン様ＭＭＰ、マトリックスメタロプロテアーゼ２（ＭＭＰ－２）、カテプシンＬ；カテプシンＤ、マトリックスメタロプロテアーゼ１（ＭＭＰ－１）、ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子、膜１型マトリックスメタロプロテアーゼ（ＭＴ－ＭＭＰ）、ストロメリシン３（またはＭＭＰ－１１）、サーモリシン、線維芽細胞コラゲナーゼ及びストロメリシン－１、マトリックスメタロプロテアーゼ１３（コラゲナーゼ－３）、組織型プラスミノーゲン活性化因子（ｔＰＡ）、ヒト前立腺特異的抗原、カリクレイン（ｈＫ３）、好中球エラスターゼ、及びカルパイン（カルシウム活性化中性プロテアーゼ）。受容体が発現される宿主細胞に天然ではないプロテアーゼ（例えば、ＴＥＶ）を更なる調節機構として使用することができ、プロテアーゼが発現されるか、または他の方法で提供されるまで、受容体の活性化が低減する。追加として、プロテアーゼは、腫瘍関連または疾患関連（正常組織よりも有意に高い程度に発現される）であり得、独立した調節機構として機能する。例えば、いくつかのマトリックスメタロプロテアーゼは、ある特定のがんタイプにおいて高度に発現される。

【０１９８】

いくつかの実施形態において、ＴＭＤ内のアミノ酸置換（複数可）は、ＴＭＤの「ＧＶ」モチーフ内の１つ以上の置換を含む。いくつかの実施形態において、そのような置換（複数可）のうちの少なくとも１つは、アラニンへの置換を含む。追加の配列及び置換は、ＷＯ２０２１０６１８７２（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０１９９】

細胞内ドメイン

いくつかの実施形態において、プライミング受容体は、転写調節因子からの、またはそれに由来する１つ以上の細胞内ドメインを含む。転写調節因子は、同族プロモーターからの転写を活性化または抑制する。転写活性化因子は、典型的には、近くの転写プロモーターに結合し、ＲＮＡポリメラーゼを動員して転写を直接開始する。転写抑制因子は、転写プロモーターに結合し、ＲＮＡポリメラーゼによる転写開始を立体的に阻害する。他の転写調節因子は、それが結合する場所及び細胞条件に応じて、活性化因子または抑制因子のいずれかとして機能する。したがって、本明細書で使用される場合、「転写活性化ドメイン」は、１つ以上の遺伝子の転写を増加及び／または活性化するために、転写制御エレメント及び／または転写調節タンパク質（すなわち、転写因子、ＲＮＡポリメラーゼ等）と相互作用する転写因子のドメインを指す。転写活性化ドメインの非限定的な例としては、単純ヘルペスウイルスＶＰ１６活性化ドメイン、ＶＰ６４（ＶＰ１６の四量体誘導体である）、ＨＩＶ　ＴＡＴ、ＮＦｋＢ　ｐ６５活性化ドメイン、ｐ５３活性化ドメイン１及び２、ＣＲＥＢ（ｃＡＭＰ応答エレメント結合タンパク質）活性化ドメイン、Ｅ２Ａ活性化

ドメイン、ＮＦＡＴ（活性化Ｔ細胞の核因子）活性化ドメイン、酵母Ｇａｌ４、酵母ＧＣＮ４、酵母ＨＡＰ１、ＭＬＬ、ＲＴＧ３、ＧＬＮ３、ＯＡＦ１、ＰＩＰ２、ＰＤＲ１、ＰＤＲ３、ＰＨＯ４、ＬＥＵ３グルココルチコイド受容体転写活性化ドメイン、Ｂ－細胞ＰＯＵホメオドメインタンパク質Ｏｃｔ２、植物Ａｐ２、または当業者に既知の任意の他のものが挙げられる。いくつかの実施形態において、転写調節因子は、Ｇａｌ４－ＶＰ１６、Ｇａｌ４－ＶＰ６４、ｔｅｔＲ－ＶＰ６４、ＺＦＨＤ１－ＹＰ６４、Ｇａｌ４－ＫＲＡＢ、及びＨＡＰ１－ＶＰ１６から選択される。いくつかの実施形態において、転写調節因子は、Ｇａｌ４－ＶＰ６４である。転写活性化ドメインは、野生型もしくは天然に存在する配列を含むことができるか、または１つ以上の遺伝子の転写を増加及び／または活性化する所望の能力を有する、元の転写活性化ドメインの修飾、変異、または誘導体バージョンであり得る。いくつかの実施形態において、転写調節因子は、核局在化シグナルを更に含み得る。

【０２００】

ＤＮＡ結合ドメイン

本明細書に記載の態様のいくつかの実施形態において、合成タンパク質は、１つ以上の細胞内「ＤＮＡ結合ドメイン」（または「ＤＢドメイン」）を含む。そのような「ＤＮＡ結合ドメイン」は、特定のＤＮＡ配列エレメントに結合する配列特異的ＤＮＡ結合ドメインを指す。したがって、本明細書で使用される場合、「配列特異的ＤＮＡ結合ドメイン」は、特定の所定の配列を有するＤＮＡに選択的に結合する能力を有するタンパク質ドメイン部分を指す。配列特異的ＤＮＡ結合ドメインは、野生型もしくは天然に存在する配列を含むことができるか、または所望の配列に結合する所望の能力を有する元のドメインの修飾、変異体、もしくは誘導体バージョンであり得る。いくつかの実施形態において、配列特異的ＤＮＡ結合ドメインは、所望の配列に結合するように操作される。本明細書に記載の合成タンパク質において使用され得る配列特異的ＤＮＡ結合ドメインを有するタンパク質の非限定例としては、ＨＮＦ１ａ、Ｇａｌ４、ＧＣＮ４、逆テトラサイクリン受容体、ＴＨＹ１、ＳＹＮ１、ＮＳＥ／ＲＵ５’、ＡＧＲＰ、ＣＡＬＢ２、ＣＡＭＫ２Ａ、ＣＣＫ、ＣＨＡＴ、ＤＬＸ６Ａ、ＥＭＸ１、それらのジンクフィンガータンパク質またはドメイン、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓタンパク質、例えば、Ｃａｓ９、Ｃａｓ３、Ｃａｓ４、Ｃａｓ５、Ｃａｓ５ｅ（もしくはＣａｓＤ）、Ｃａｓｈ、Ｃａｓ６ｅ、Ｃａｓ６ｆ、Ｃａｓ７、Ｃａｓ８ａ１、Ｃａｓ８ａ２、Ｃａｓ８ｂ、Ｃａｓ８ｃ、Ｃａｓ１０、Ｃａｓ１０ｄ、ＣａｓＦ、ＣａｓＧ、ＣａｓＨ、Ｃｓｙ１、Ｃｓｙ２、Ｃｓｙ３、Ｃｓｅ１（もしくはＣａｓＡ）、Ｃｓｅ２（もしくはＣａｓＢ）、Ｃｓｅ３（もしくはＣａｓＥ）、Ｃｓｅ４（もしくはＣａｓＣ）、Ｃｓｃ１、Ｃｓｃ２、Ｃｓａ５、Ｃｓｎ２、Ｃｓｍ２、Ｃｓｍ３、Ｃｓｍ４、Ｃｓｍ５、Ｃｓｍ６、Ｃｍｒ１、Ｃｍｒ３、Ｃｍｒ４、Ｃｍｒ５、Ｃｍｒ６、Ｃｓｂ１、Ｃｓｂ２、Ｃｓｂ３、Ｃｓｘ１７、Ｃｓｘ１４、Ｃｓｘ１０、Ｃｓｘ１６、ＣｓａＸ、Ｃｓｘ３、Ｃｓｚ１、Ｃｓｘ１５、Ｃｓｆ１、Ｃｓｆ２、Ｃｓｆ３、Ｃｓｆ４、及びＣｕ１９６、ならびにＴＡＬＥＳが挙げられる。

【０２０１】

ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ様タンパク質が使用される実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ様タンパク質は、野生型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓタンパク質、修飾ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓタンパク質、または野生型もしくは修飾ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓタンパク質の断片であり得る。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ様タンパク質は、核酸結合親和性及び／または特異性を増加させ、酵素活性を改変し、及び／またはタンパク質の別の特性を変化させるように修飾され得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ様タンパク質のヌクレアーゼ（すなわち、ＤＮａｓｅ、ＲＮａｓｅ）ドメインは、修飾、欠失、または不活性化され得る。あるいは、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ様タンパク質は、本明細書に記載のシステムの機能に必須ではないドメインを除去するために切断することができる。例えば、ＤＮＡ結合タンパク質またはそのドメインとして使用されるＣＲＩＳＰＲ酵素は、変異したＣＲＩＳＰＲまたはそのドメインが、ＤＮＡ結合ドメイン標的部位を含む核酸配列を切断する能力を欠くように、対応する野生型酵素に関して変異させることができる。例えば、Ｄ１０Ａ変異は、Ｈ８４０Ａ、

Ｎ８５４Ａ、またはＮ８６３Ａ変異のうちの１つ以上と組み合わせて、実質的に全てのＤＮＡ切断活性を欠くＣａｓ９酵素を産生することができる。

【０２０２】

膜近傍ドメイン

ＥＣＤ及びＴＭＤ、またはＴＭＤ及びＩＣＤは、膜近傍ドメインなどの連結ポリペプチドと互いに連結され得る。「ＳｙｎＮｏｔｃｈ」受容体は、異種細胞外リガンド結合ドメイン、Ｎｏｔｃｈ受容体ＪＭＤ（ＮＲＲを含む）、ＴＭＤ、及びＩＣＤと実質的な配列同一性を有する連結ポリペプチドを含む。「Ｆｎ　Ｎｏｔｃｈ」受容体は、異種細胞外リガンド結合ドメイン、Ｒｏｂｏ受容体（哺乳類Ｒｏｂｏ１、Ｒｏｂｏ２、Ｒｏｂｏ３、またはＲｏｂｏ４など）との実質的な配列同一性を有する連結ポリペプチド、続いて１、２、または３つのフィブロネクチン反復（「Ｆｎ」）、ＴＭＤ、及びＩＣＤを含む。「ミニＮｏｔｃｈ」受容体は、異種細胞外リガンド結合ドメイン、Ｎｏｔｃｈ受容体ＪＭＤと実質的な配列同一性を有するが、ＮＲＲ（ＬＩＮ－１２－Ｎｏｔｃｈ反復（ＬＮＲ）モジュール、及びヘテロ二量体化ドメイン）、ＴＭＤ、及びＩＣＤを欠く連結ポリペプチドを含む。「最小リンカーＮｏｔｃｈ」受容体は、異種細胞外リガンド結合ドメイン、Ｎｏｔｃｈ受容体との実質的な配列同一性を欠く連結ポリペプチド（例えば、限定されないが、合成（ＧＧＳ）$_n$ポリペプチド配列を有する）、ＴＭＤ、及びＩＣＤを含む。「ヒンジＮｏｔｃｈ」受容体は、異種細胞外リガンド結合ドメイン、オリゴマー化ドメイン（すなわち、合成受容体及び／または既存の宿主受容体との二量体化、三量体化、またはより高次の多量体化を促進するドメイン）、ＴＭＤ、及びＩＣＤを含むヒンジ配列を含む。

【０２０３】

いくつかの実施形態において、プライミング受容体は、細胞外ドメインと膜貫通ドメインとの間に膜近傍ドメイン（ＪＭＤ）ペプチドを含む。いくつかの実施形態において、プライミング受容体は、膜貫通ドメインと細胞内ドメインとの間に膜近傍ドメイン（ＪＭＤ）ペプチドを含む。いくつかの実施形態において、ＪＭＤペプチドは、ＬＷＦモチーフを含む。受容体コンストラクトにおけるＬＷＦモチーフの使用は、米国特許第１０，８５８，４４３号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。いくつかの実施形態において、ＪＭＤペプチドは、Ｎｏｔｃｈ１、Ｎｏｔｃｈ２、Ｎｏｔｃｈ３、及び／またはＮｏｔｃｈ４のＪＭＤに対して実質的な配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、ＪＭＤペプチドは、Ｎｏｔｃｈ１、Ｎｏｔｃｈ２、Ｎｏｔｃｈ３、及び／またはＮｏｔｃｈ４　ＪＭＤに対して実質的な配列同一性を有するが、Ｎｏｔｃｈ受容体のＬＩＮ－１２－Ｎｏｔｃｈ反復（ＬＮＲ）及び／またはヘテロ二量化ドメイン（ＨＤ）を含まない。いくつかの実施形態において、ＪＭＤペプチドは、Ｎｏｔｃｈ１、Ｎｏｔｃｈ２、Ｎｏｔｃｈ３、及び／またはＮｏｔｃｈ４　ＪＭＤに対して実質的な配列同一性を有しない。いくつかの実施形態において、ＪＭＤペプチドは、受容体の二量体、三量体、またはより高次の集合体の形成を促進するオリゴマー化ドメインを含む。そのようなＪＭＤペプチドは、ＷＯ２０２１０６１８７２に記載されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０２０４】

ミニＮｏｔｃｈ受容体において、連結ポリペプチドは、ＮＲＲ及びＨＤドメインの欠失後のＮｏｔｃｈ　ＪＭＤ配列に由来する。Ｎｏｔｃｈ　ＪＭＤ配列は、Ｎｏｔｃｈ１、Ｎｏｔｃｈ２、Ｎｏｔｃｈ３、またはＮｏｔｃｈ４からの配列であってもよく、ショウジョウバエ属、ヤケイ属、ダニオ属等からのものなどの非ヒト相同体に由来し得る。残りのＮｏｔｃｈ配列の４～５０個のアミノ酸残基をポリペプチドリンカーとして使用することができる。いくつかの実施形態において、リンカーポリペプチド配列の長さ及びアミノ酸組成は、ＥＣＤ及びＴＭＤの互いに対する配向及び／または近接性を改変して、リガンド誘導時またはリガンドの非存在下でのシグナル形質導入レベルなどのキメラポリペプチドの所望の活性を達成するように変化する。

【０２０５】

最小リンカーＮｏｔｃｈ受容体において、連結ポリペプチドは、Ｎｏｔｃｈ　ＪＭＤ配

列（Ｎｏｔｃｈ１、Ｎｏｔｃｈ２、Ｎｏｔｃｈ３、もしくはＮｏｔｃｈ４、またはそれらの非ヒト相同体からのＮｏｔｃｈ　ＪＭＤ配列を含む）に対する実質的な配列同一性を有しない。４～５０個のアミノ酸残基をポリペプチドリンカーとして使用することができる。いくつかの実施形態において、リンカーポリペプチド配列の長さ及びアミノ酸組成は、ＥＣＤ及びＴＭＤの互いに対する配向及び／または近接性を改変して、本開示のキメラポリペプチドの所望の活性を達成するように変化する。最小リンカー配列は、プロテアーゼ切断部位を含むか、または省略するように設計することができ、グリコシル化部位もしくは他のタイプの翻訳後修飾のための複数の部位を含むか、または省略することができる。いくつかの実施形態において、最小リンカーリンカーは、プロテアーゼ切断部位またはグリコシル化部位を含まない。

【０２０６】

いくつかの実施形態において、プライミング受容体は、ヒンジを更に含む。プライミング受容体において使用され得るヒンジリンカーは、分子間ジスルフィド結合を介してキメラポリペプチドのオリゴマー形成を促進する１つ以上のポリペプチドモチーフを含有するオリゴマー化ドメイン（例えば、ヒンジドメイン）を含み得る。これらの事例では、本明細書に開示されるキメラ受容体内で、ヒンジドメインは、一般に、ＥＣＤとＴＭＤとの間に配置される可撓性ポリペプチドコネクター領域を含む。したがって、ヒンジドメインは、ＥＣＤとＴＭＤとの間の柔軟性を提供し、また、２つ以上のキメラポリペプチドモノマー間の分子間ジスルフィド結合のための部位を提供して、オリゴマー複合体を形成する。いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、本明細書に開示されるキメラポリペプチドの二量体形成を促進するモチーフを含む。いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、本明細書に開示されるキメラポリペプチド（例えば、ＯＸ４０由来のヒンジドメイン）の三量体形成を促進するモチーフを含む。本開示の組成物及び方法に好適なヒンジポリペプチド配列は、天然に存在するヒンジポリペプチド配列（例えば、天然に存在する免疫グロブリン由来のもの）であり得るか、または所望の及び／または改善された特性、例えば、転写を調節する特性を提供するように操作、設計、または修飾され得る。好適なヒンジポリペプチド配列には、ＩｇＡ、ＩｇＤ、及びＩｇＧ１ヒンジドメイン、ＩｇＧ２ヒンジドメイン、ＩｇＧ３ヒンジドメイン、及びＩｇＧ４ヒンジドメインなどのＩｇＧサブクラス、またはそれらの機能的バリアントに由来するものが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、ヒンジポリペプチド配列は、１つ以上のＣＸＸＣモチーフを含有する。いくつかの実施形態において、ヒンジポリペプチド配列は、１つ以上のＣＰＰＣモチーフを含有する。

【０２０７】

ヒンジポリペプチド配列はまた、ＣＤ８αヒンジドメイン、ＣＤ２８ヒンジドメイン、ＣＤ１５２ヒンジドメイン、ＰＤ－１ヒンジドメイン、ＣＴＬＡ４ヒンジドメイン、ＯＸ４０ヒンジドメイン、及びそれらの機能的バリアントに由来し得る。いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、ＣＤ８αヒンジドメインまたはその機能的バリアントに由来するヒンジポリペプチド配列を含む。いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、ＣＤ２８ヒンジドメインまたはその機能的バリアントに由来するヒンジポリペプチド配列を含む。いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、ＯＸ４０ヒンジドメインまたはその機能的バリアントに由来するヒンジポリペプチド配列を含む。いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、ＩｇＧ４ヒンジドメインまたはその機能的バリアントに由来するヒンジポリペプチド配列を含む。

【０２０８】

Ｆｎ　Ｎｏｔｃｈ連結ポリペプチドは、Ｆｎ反復とＴＭＤとの間に短いポリペプチド配列を有する、フィブロネクチン反復（Ｆｎ）ドメインを含有するＲｏｂｏ１　ＪＭＤに由来する。Ｆｎ　Ｎｏｔｃｈ連結ポリペプチドは、Ｎｏｔｃｈ陰性調節領域（ＮＲＲ）またはＮｏｔｃｈ　ＨＤドメインを含有しない。Ｆｎ連結ポリペプチドは、１、２、３、４、または５個のＦｎ反復を含有し得る。いくつかの実施形態において、キメラ受容体は、約１～約５個のＦｎ反復、約１～約３個のＦｎ反復、または約２～約３個のＦｎ反復を有す

るＦｎ連結ポリペプチドを含む。Ｆｎ反復とＴＭＤとの間の短いポリペプチド配列は、約２～約３０アミノ酸残基であり得る。いくつかの実施形態において、短いポリペプチド配列は、任意の配列の約５～約２０個のアミノ酸であり得る。いくつかの実施形態において、短いポリペプチド配列は、任意の配列の約５～約２０個の天然に存在するアミノ酸であり得る。いくつかの実施形態において、短いポリペプチド配列は、任意の配列の約５～約２０個のアミノ酸であり得るが、１つ以下のプロリンを有する。いくつかの実施形態において、短いポリペプチド配列は、約５～約２０個のアミノ酸であり得、アミノ酸の約５０％以上がグリシンである。いくつかの実施形態において、短いポリペプチド配列は、約５～約２０個のアミノ酸であり得、アミノ酸は、グリシン、セリン、トレオニン、及びアラニンから選択される。いくつかの実施形態において、Ｆｎ連結ポリペプチド配列の長さ及びアミノ酸組成は、ＥＣＤ及びＴＭＤの互いに対する配向及び／または近接性を改変して、本開示のキメラポリペプチドの所望の活性を達成するように変化する。

【０２０９】

輸送停止配列

いくつかの実施形態において、プライミング受容体は、膜貫通ドメインと細胞内ドメインとの間に輸送停止配列（ＳＴＳ）を更に含む。ＳＴＳは、荷電した疎脂性配列を含む。いずれの理論にも拘束されることなく、ＳＴＳは、膜アンカーとして機能し、細胞内ドメインの形質膜への通過を防止すると考えられている。プライミング受容体におけるＳＴＳドメインの使用は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるＷＯ２０２１０６１８７２に記載されている。非限定の例示的なＳＴＳ配列としては、ＡＰＬＰ１、ＡＰＬＰ２、ＡＰＰ、ＴＧＢＲ３、ＣＳＦ１Ｒ、ＣＸＣＬ１６、ＣＸ３ＣＬ１、ＤＡＧ１、ＤＣＣ、ＤＮＥＲ、ＤＳＧ２、ＣＤＨ１、ＧＨＲ、ＨＬＡ－Ａ、ＩＦＮＡＲ２、ＩＧＦ１Ｒ、ＩＬ１Ｒ１、ＥＲＮ２、ＫＣＮＥ１、ＫＣＮＥ２、ＣＨＬ１、ＬＲＰｌ、ＬＲＰ２、ＬＲＰ１８、ＰＴＰＲＦ、ＳＣＮ１Ｂ、ＳＣＮ３Ｂ、ＮＰＲ３、ＮＧＦＲ、ＰＬＸＤＣ２、ＰＡＭ、ＡＧＥＲ、ＲＯＢＯｌ、ＳＯＲＣＳ３、ＳＯＲＣＳ１、ＳＯＲＬ１、ＳＤＣ１、ＳＤＣ２、ＳＰＮ、ＴＹＲ、ＴＹＲＰ１、ＤＣＴ、ＶＡＳＮ、ＦＬＴ１、ＣＤＨ５、ＰＫＴＦＤ１、ＮＥＣＴＩＮｌ、ＫＬ、ＩＬ６Ｒ、ＥＦＮＢ１、ＣＤ４４、ＣＬＳＴＮ１、ＬＲＰ８、ＰＣＤＨＧＣ３、ＮＲＧ１、ＬＲＰ１Ｂ、ＪＡＧ２、ＥＦＮＢ２、ＤＬＬ１、ＣＬＳＴＮ２、ＥＰＣＡＭ、ＥｒｂＢ４、ＫＣＮＥ３、ＣＤＨ２、ＮＲＧ２、ＰＴＰＲＫ、ＢＴＣ、ＥＰＨＡ４、ＩＬ１Ｒ２、ＫＣＮＥ４、ＳＣＮ２Ｂ、Ｎｒａｄｄ、ＰＴＰＲＭ、Ｎｏｔｃｈ１、Ｎｏｔｃｈ２、Ｎｏｔｃｈ３、及びＮｏｔｃｈ４　ＳＴＳ配列が挙げられる。いくつかの実施形態において、ＳＴＳは、膜貫通ドメインに対して異種である。いくつかの実施形態において、ＳＴＳは、膜貫通ドメインに対して相同である。ＳＴＳ配列は、ＷＯ２０２１０６１８７２（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０２１０】

キメラ抗原受容体

組換えＣＡＲは、完全なヒト配列、例えば、天然のヒト配列を含むヒトＣＡＲであってもよい。

【０２１１】

いくつかの実施形態では、ＣＡＲなどの組換え受容体、例えばその抗体部分は、免疫グロブリン定常領域またはそのバリアントもしくは修飾バージョン、例えばヒンジ領域、例えばＩｇＧ４ヒンジ領域、及び／またはＣＨ１／ＣＬ及び／またはＦｃ領域の少なくとも一部分であり得るか、またはそれらの少なくとも一部分を含み得るスペーサーを更に含む。いくつかの実施形態において、定常領域または部分は、ＩｇＧ４またはＩｇＧ１などのヒトＩｇＧのものである。いくつかの態様において、定常領域の一部分は、抗原認識成分、例えば、ｓｃＦｖと膜貫通ドメインとの間のスペーサー領域として機能する。スペーサーは、スペーサーの非存在下と比較して、抗原結合後の細胞の応答性の増加をもたらす長さであり得る。いくつかの例において、スペーサーは、約１２アミノ酸の長さであるか、または１２アミノ酸以下の長さである。例示的なスペーサーとしては、少なくとも約１０

～２２９アミノ酸、約１０～２００アミノ酸、約１０～１７５アミノ酸、約１０～１５０アミノ酸、約１０～１２５アミノ酸、約１０～１００アミノ酸、約１０～７５アミノ酸、約１０～５０アミノ酸、約１０～４０アミノ酸、約１０～３０アミノ酸、約１０～２０アミノ酸、または約１０～１５アミノ酸を有し、列挙された範囲のうちのいずれかの端点間の任意の整数を含むものが挙げられる。いくつかの実施形態において、スペーサー領域は、約１２アミノ酸以下、約１１９アミノ酸以下、または約２２９アミノ酸以下を有する。例示的なスペーサーとしては、ＩｇＧ４ヒンジ単独、ＣＨ２及びＣＨ３ドメインに連結されたＩｇＧ４ヒンジ、またはＣＨ３ドメインに連結されたＩｇＧ４ヒンジが挙げられる。例示的なスペーサーとしては、Ｈｕｄｅｃｅｋ ｅｔ ａｌ．（２０１３）Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，１９：３１５３または国際特許出願公開第ＷＯ２０１４０３１６８７号に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、定常領域または部分は、ＩｇＤのものである。

【０２１２】

ＣＡＲなどの受容体の抗原認識ドメインは、ＣＡＲの場合、抗原受容体複合体、例えばＴＣＲ複合体を介した活性化を模倣するシグナル伝達成分などの１つ以上の細胞内シグナル伝達成分、及び／または別の細胞表面受容体を介したシグナルに連結させることができる。したがって、いくつかの実施形態において、細胞外結合成分（例えば、リガンド結合または抗原結合ドメイン）は、１つ以上の膜貫通及び細胞内シグナル伝達ドメインに連結される。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメインは、細胞外ドメインに融合される。一実施形態において、受容体内のドメインのうちの１つ、例えば、ＣＡＲと天然に会合する膜貫通ドメインが使用される。いくつかの場合において、膜貫通ドメインは、同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインへのそのようなドメインの結合を回避し、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小限に抑えるために、アミノ酸置換によって選択または修飾される。

【０２１３】

いくつかの実施形態における膜貫通ドメインは、天然源または合成源のいずれかに由来する。ソースが天然である場合、いくつかの態様において、ドメインは、任意の膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質に由来する。膜貫通領域は、Ｔ細胞受容体、ＣＤ２８、ＣＤ３イプシロン、ＣＤ４５、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤＳ、ＣＤ９、ＣＤ１６、ＣＤ２２、ＣＤ３３、ＣＤ３７、ＣＤ６４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ１３４、ＣＤ１３７、及び／またはＣＤ１５４のアルファ、ベータまたはゼータ鎖に由来する（すなわち、少なくともその膜貫通領域（複数可）を含む）ものを含む。あるいは、いくつかの実施形態における膜貫通ドメインは、合成である。いくつかの態様において、合成膜貫通ドメインは、主にロイシン及びバリンなどの疎水性残基を含む。いくつかの態様において、フェニルアラニン、トリプトファン及びバリンのトリプレットは、合成膜貫通ドメインの各末端に見出される。いくつかの実施形態において、連結は、リンカー、スペーサー、及び／または膜貫通ドメイン（複数可）によるものである。

【０２１４】

細胞内シグナル伝達ドメインの中には、天然の抗原受容体を介したシグナル、共刺激受容体と組み合わせたそのような受容体を介したシグナル、及び／または共刺激受容体のみを介したシグナルを模倣または近似するものがある。いくつかの実施形態において、短いオリゴまたはポリペプチドリンカー、例えば、グリシン及びセリンを含有するもの、例えば、グリシンセリンダブレットなどの２～１０アミノ酸の長さのリンカーが存在し、膜貫通ドメインと受容体の細胞質シグナル伝達ドメインとの間に連結を形成する。

【０２１５】

受容体、例えば、ＣＡＲは、少なくとも１つの細胞内シグナル伝達成分（複数可）を含むことができる。いくつかの実施形態において、受容体は、Ｔ細胞活性化及び細胞毒性を媒介するＴＣＲ ＣＤ３鎖、例えばＣＤ３ゼータ鎖などのＴＣＲ複合体の細胞内成分を含む。したがって、いくつかの態様において、細胞外ドメインは、１つ以上の細胞シグナル伝達モジュールに連結される。いくつかの実施形態において、細胞シグナル伝達モジュー

ルは、ＣＤ３膜貫通ドメイン、ＣＤ３細胞内シグナル伝達ドメイン、及び／または他のＣＤ膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、受容体、例えば、ＣＡＲは、Ｆｃ受容体ガンマ、ＣＤ８、ＣＤ４、ＣＤ２５、またはＣＤ１６などの１つ以上の追加の分子の一部分を更に含む。例えば、ある態様において、ＣＡＲは、ＣＤ３－ゼータまたはＦｃ受容体－ガンマと、ＣＤ８、ＣＤ４、ＣＤ２５またはＣＤ１６との間のキメラ分子を含む。

【０２１６】

いくつかの実施形態において、ＣＡＲのライゲーション時に、受容体の細胞質ドメインまたは細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫細胞、例えば、受容体を発現するように操作されたＴ細胞の正常なエフェクター機能または応答のうちの少なくとも１つを活性化する。例えば、いくつかの文脈において、受容体は、サイトカインまたは他の因子の分泌などの、細胞溶解活性またはＴヘルパー活性などのＴ細胞の機能を誘導する。いくつかの実施形態において、抗原受容体成分または共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメインの切断部分は、例えば、それがエフェクター機能シグナルを形質導入する場合、無傷の免疫刺激鎖の代わりに使用される。いくつかの実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインまたは複数のドメインは、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）の細胞質配列、ならびにいくつかの態様において、天然の文脈において、そのような受容体と協調して作用して、抗原受容体係合後のシグナル伝達、及び／またはそのような分子の任意の誘導体もしくはバリアント、及び／または同じ機能能力を有する任意の合成配列を含む。

【０２１７】

天然のＴＣＲの文脈において、完全な活性化は、一般に、ＴＣＲを介したシグナル伝達だけでなく、共刺激シグナルも必要とする。したがって、いくつかの実施形態において、完全な活性化を促進するために、二次または共刺激シグナルを生成するための成分も受容体に含まれる。他の実施形態において、受容体は、共刺激シグナルを生成するための成分を含まない。いくつかの態様において、追加の受容体は、同じ細胞内で発現され、二次または共刺激シグナルを生成するための成分を提供する。

【０２１８】

Ｔ細胞活性化は、いくつかの態様において、２つのクラスの細胞質シグナル伝達配列、すなわち、ＴＣＲ（一次細胞質シグナル伝達配列）を介して抗原依存的一次活性化を開始するもの、及び二次または共刺激シグナル（二次細胞質シグナル伝達配列）を提供するために抗原非依存的に作用するものによって媒介されるものとして記載される。いくつかの態様において、受容体は、そのようなシグナル伝達成分の一方または両方を含む。

【０２１９】

いくつかの態様において、受容体は、ＴＣＲ複合体の一次活性化を調節する一次細胞質シグナル伝達配列を含む。刺激的に作用する一次細胞質シグナル伝達配列は、免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフまたはＩＴＡＭとして知られるシグナル伝達モチーフを含有し得る。一次細胞質シグナル伝達配列を含有するＩＴＡＭの例としては、ＴＣＲまたはＣＤ３ゼータ、ＦｃＲガンマ、ＦｃＲベータ、ＣＤ３ガンマ、ＣＤ３デルタ、ＣＤ３イプシロン、ＣＤＳ、ＣＤ２２、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、及びＣＤ６６ｄに由来するものが挙げられる。いくつかの実施形態において、ＣＡＲ中の細胞質シグナル伝達分子（複数可）は、ＣＤ３ゼータに由来する細胞質シグナル伝達ドメイン、その一部分、または配列を含有する。

【０２２０】

いくつかの実施形態において、受容体は、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、ＯＸ４０、ＤＡＰ１０、及びＩＣＯＳなどの共刺激受容体のシグナル伝達ドメイン及び／または膜貫通部分を含む。いくつかの態様において、同じ受容体は、活性化成分及び共刺激成分の両方を含む。

【０２２１】

ある特定の実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ３（例えば、ＣＤ３－ゼータ）細胞内ドメインに連結されたＣＤ２８膜貫通及びシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ３ゼータ細胞内

ドメインに連結されたキメラＣＤ２８及びＣＤ１３７（４－１ＢＢ、ＴＮＦＲＳＦ９）共刺激ドメインを含む。

【０２２２】

いくつかの実施形態において、受容体は、細胞質部分に、１つ以上、例えば、２つ以上の共刺激ドメイン及び活性化ドメイン、例えば、一次活性化ドメインを包含する。例示的な受容体としては、ＣＤ３－ゼータ、ＣＤ２８、及び４－１ＢＢの細胞内成分が挙げられる。

【０２２３】

いくつかの実施形態において、ＣＡＲまたは他の抗原受容体は、細胞表面マーカーなどのマーカーを更に含み、これを使用して、切断ＥＧＦＲ（ｔＥＧＦＲ）などの細胞表面受容体の切断バージョンなどの受容体を発現するための細胞の形質導入または操作を確認することができる。いくつかの態様において、マーカーは、ＣＤ３４、神経成長因子受容体（ＮＧＦＲ）、または上皮成長因子受容体（例えば、ｔＥＧＦＲ）の全部または一部（例えば、切断形態）を含む。いくつかの実施形態において、マーカーをコードする核酸は、リンカー配列、例えば、切断可能なリンカー配列またはリボソームスキップ配列、例えば、Ｔ２Ａをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結される。ＷＯ２０１４０３１６８７を参照されたい。いくつかの実施形態において、Ｔ２Ａリボソームスイッチによって分離されたＣＡＲ及びＥＧＦＲｔをコードするコンストラクトの導入は、ＥＧＦＲｔがそのようなコンストラクトを発現する細胞を検出するマーカーとして使用できるように、同じコンストラクト由来の２つのタンパク質を発現することができる。いくつかの実施形態において、マーカー、及び任意選択でリンカー配列は、公開された特許出願第ＷＯ２０１４０３１６８７号に開示されているように、任意のものであり得る。例えば、マーカーは、任意選択で、Ｔ２Ａリボソームスキップ配列などのリンカー配列に連結された切断ＥＧＦＲ（ｔＥＧＦＲ）であり得る。

【０２２４】

いくつかの実施形態において、マーカーは、Ｔ細胞上に天然に見出されない、またはＴ細胞の表面上に天然に見出されない分子、例えば、細胞表面タンパク質、またはその一部分である。

【０２２５】

いくつかの実施形態において、分子は、非自己分子、例えば、非自己タンパク質、すなわち、細胞が養子移入される宿主の免疫系によって「自己」として認識されない分子である。

【０２２６】

いくつかの実施形態において、マーカーは、治療機能を果たさない、及び／または遺伝子操作のため、例えば、成功裏に操作された細胞を選択するためのマーカーとして使用される以外の効果を生じない。他の実施形態において、マーカーは、治療用分子、または他の方法でいくらかの所望の効果を発揮する分子、例えば、インビボで遭遇される細胞のためのリガンド、例えば、養子移入時及びリガンドとの遭遇時に細胞の応答を増強及び／または減衰させるための共刺激または免疫チェックポイント分子であってもよい。

【０２２７】

ＣＡＲは、１つ以上の天然に存在するアミノ酸の代わりに、１つまたは修飾された合成アミノ酸を含んでもよい。例示的な修飾アミノ酸としては、アミノシクロヘキサンカルボン酸、ノルロイシン、α－アミノｎ－デカン酸、ホモセリン、Ｓ－アセチルアミノメチルシステイン、トランス－３－及びトランス－４－ヒドロキシプロリン、４－アミノフェニルアラニン、４－ニトロフェニルアラニン、４－クロロフェニルアラニン、４－カルボキシフェニルアラニン、（３－フェニルセリン（３－ヒドロキシフェニルアラニン、フェニルグリシン、α－ナフチルアラニン、シクロヘキシルアラニン、シクロヘキシルグリシン、インドリン－２－カルボン酸、１，２，３，４－テトラヒドロイソキノリン－３－カルボン酸、アミノマロン酸、アミノマロン酸モノアミド、Ｎ’－ベンジル－Ｎ’－メチル－リジン、Ｎ’，Ｎ’－ジベンジル－リジン、６－ヒドロキシリジン、オルニチン、α－アミノ

シクロペンタンカルボン酸、α－アミノシクロヘキサンカルボン酸、α－アミノシクロヘプタンカルボン酸、α－（２－アミノ－２－ノルボルナン）－カルボン酸、α，γ－ジアミノ酪酸、α，γ－ジアミノプロピオン酸、ホモフェニルアラニン、及びα－ｔｅｒｔブチルグリシンが挙げられるが、これらに限定されない。

【０２２８】

いくつかの場合において、ＣＡＲは、第１、第２、及び／または第３世代ＣＡＲと称される。いくつかの態様において、第１世代ＣＡＲは、単に抗原結合時にＣＤ３鎖誘導シグナルを提供するものであり、いくつかの態様において、第２世代ＣＡＲは、ＣＤ２８またはＣＤ１３７などの共刺激受容体からの細胞内シグナル伝達ドメインを含むものなどの、そのようなシグナル及び共刺激シグナルを提供するものであり、いくつかの態様において、第３世代ＣＡＲは、いくつかの態様において、異なる共刺激受容体の複数の共刺激ドメインを含むものである。

【０２２９】

いくつかの実施形態において、キメラ抗原受容体は、本明細書に記載の抗体または断片を含有する細胞外部分を含む。いくつかの態様において、キメラ抗原受容体は、本明細書に記載の抗体または断片を含有する細胞外部分、及び細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態において、抗体または断片は、ｓｃＦｖまたは単一ドメインＶＨ抗体を含み、細胞内ドメインは、ＩＴＡＭを含有する。いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、ＣＤ３－ゼータ（ＣＤ３）鎖のゼータ鎖のシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態において、キメラ抗原受容体は、細胞外ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインとを連結する膜貫通ドメインを含む。

【０２３０】

いくつかの態様において、膜貫通ドメインは、ＣＤ２８の膜貫通部分を含有する。細胞外ドメイン及び膜貫通は、直接的または間接的に連結され得る。いくつかの実施形態において、細胞外ドメイン及び膜貫通は、本明細書に記載される任意のものなどのスペーサーによって連結される。いくつかの実施形態において、キメラ抗原受容体は、例えば、膜貫通ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインとの間にＴ細胞共刺激分子の細胞内ドメインを含有する。いくつかの態様において、Ｔ細胞共刺激分子は、ＣＤ２８または４１ＢＢである。

【０２３１】

いくつかの実施形態において、ＣＡＲは、抗体、例えば、抗体断片、ＣＤ２８の膜貫通部分またはその機能的バリアントであるか、またはそれを含有する膜貫通ドメイン、ならびにＣＤ２８のシグナル伝達部分またはその機能的バリアント及びＣＤ３ゼータまたはその機能的バリアントのシグナル伝達部分を含有する細胞内シグナル伝達ドメインを含有する。いくつかの実施形態において、ＣＡＲは、抗体、例えば、抗体断片、ＣＤ２８の膜貫通部分またはその機能的バリアントであるか、またはそれを含有する膜貫通ドメイン、ならびに４－１ＢＢのシグナル伝達部分またはその機能的バリアント及びＣＤ３ゼータまたはその機能的バリアントのシグナル伝達部分を含有する細胞内シグナル伝達ドメインを含有する。いくつかのそのような実施形態において、受容体は、ヒトＩｇ分子などのＩｇ分子の一部分を含有するスペーサー、例えば、Ｉｇヒンジ、例えば、ヒンジのみのスペーサーなどのＩｇＧ４ヒンジを更に含む。

【０２３２】

いくつかの実施形態において、受容体の膜貫通ドメイン、例えば、ＣＡＲは、ヒトＣＤ２８の膜貫通ドメインまたはそのバリアント、例えば、ヒトＣＤ２８（受託番号：Ｐ１０７４７．１）の２７アミノ酸膜貫通ドメインである。

【０２３３】

いくつかの実施形態において、キメラ抗原受容体は、Ｔ細胞共刺激分子の細胞内ドメインを含有する。いくつかの態様において、Ｔ細胞共刺激分子は、ＣＤ２８または４－１ＢＢである。

【０２３４】

いくつかの実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、ヒトＣＤ２８の細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン、またはその機能的バリアントもしくは一部分、例えば、その４１アミノ酸ドメイン及び／または天然ＣＤ２８タンパク質の１８６～１８７位にＬＬからＧＧへの置換を有するそのようなドメインを含む。いくつかの実施形態において、細胞内ドメインは、４１ＢＢの細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン、またはその機能的バリアントもしくは一部分、例えばヒト４－１ＢＢ（受託番号Ｑ０７０１１．１）の４２アミノ酸細胞質ドメイン、または機能的バリアントもしくはその一部分を含む。

【０２３５】

いくつかの実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、ヒトＣＤ３ゼータ刺激シグナル伝達ドメインまたはその機能的バリアント、例えば、ヒトＣＤ３．ゼータ（受託番号：Ｐ２０９６３．２）のアイソフォーム３の１１２　ＡＡ細胞質ドメインまたは米国特許第７，４４６，１９０号または米国特許第８，９１１，９９３号に記載のＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメインを含む。

【０２３６】

いくつかの態様において、スペーサーは、ＩｇＧのヒンジ領域のみ、例えば、ＩｇＧ４またはＩｇＧ１のヒンジのみを含む。他の実施形態において、スペーサーは、ＣＨ２及び／またはＣＨ３ドメインに連結されたＩｇヒンジ、例えば、ＩｇＧ４ヒンジである。いくつかの実施形態において、スペーサーは、ＣＨ２及びＣＨ３ドメインに連結されたＩｇヒンジ、例えば、ＩｇＧ４ヒンジである。いくつかの実施形態において、スペーサーは、ＣＨ３ドメインのみに連結されたＩｇヒンジ、例えば、ＩｇＧ４ヒンジである。いくつかの実施形態において、スペーサーは、グリシン－セリンリッチ配列または既知の可撓性リンカーなどの他の可撓性リンカーであるか、またはそれを含む。

【０２３７】

例えば、いくつかの実施形態において、ＣＡＲは、単鎖抗体（ｓｄＡｂ、例えば、ＶＨ領域のみを含有する）及び本明細書に記載のｓｃＦｖ、Ｉｇ－ヒンジ含有スペーサーのうちのいずれかなどのスペーサー、ＣＤ２８膜貫通ドメイン、ＣＤ２８細胞内シグナル伝達ドメイン、及びＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメイン、を含む、抗体またはその断片を含む。いくつかの実施形態において、ＣＡＲは、本明細書に記載のｓｄＡｂ及びｓｃＦｖを含む抗体または断片、Ｉｇ－ヒンジ含有スペーサーのうちのいずれかなどのスペーサー、ＣＤ２８膜貫通ドメイン、ＣＤ２８細胞内シグナル伝達ドメイン、及びＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメインを含む。

【０２３８】

キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）Ｔ細胞は、免疫療法で使用するための人工Ｔ細胞受容体を産生するように遺伝子操作されたＴ細胞である。キメラ抗原受容体は、特定のタンパク質を標的とする能力をＴ細胞に付与するように操作された受容体タンパク質である。例えば、ＣＡＲの組込みによるリンパ球（例えば、Ｔ細胞）の遺伝子修飾、及び操作された細胞の対象への投与は、「養子細胞療法」の一例である。本明細書で使用される場合、「養子細胞療法」という用語は、Ｔ細胞またはＢ細胞と称される、自己または同種異系リンパ球の輸血のための細胞ベースの免疫療法を指す。このＣＡＲ療法アプローチでは、輸血前に、細胞を拡大増殖させ、エクスビボで培養し、遺伝子修飾する。

【０２３９】

ＣＡＲの発現により、操作されたＴ細胞は、特定のタンパク質、例えば、腫瘍抗原を標的とし、結合することができる。ＣＡＲ療法では、Ｔ細胞は、対象から採取され、それらは、対象自身の血液からの、またはＣＡＲ療法を受けないドナーからの自己Ｔ細胞であり得る。一旦単離されると、Ｔ細胞をＣＡＲで遺伝子修飾し、エクスビボで拡大増殖させ、例えば、注入によって対象（すなわち、患者）に投与する。

【０２４０】

ＣＡＲは、例えば、部位特異的技法を使用して、Ｔ細胞に導入されてもよい。導入遺伝子（例えば、ＣＡＲ）の部位特異的組込みにより、導入遺伝子は、セーフハーバー遺伝子座またはＴＲＡＣを標的とし得る。セーフハーバー遺伝子座への組込みのための部位特異

的技法の例としては、限定されないが、ヌクレアーゼを使用する相同性依存的操作及びＣａｓ９を使用する相同性非依存的標的挿入が挙げられる。

【０２４１】

操作されたＣＡＲ　Ｔ細胞は、免疫腫瘍学への応用を有する。例えば、ＣＡＲは、特定の腫瘍抗原を標的とするように選択することができる。ＣＡＲ　Ｔ細胞を使用して効果的に標的とされ得るがんの例は、血液癌である。いくつかの実施形態において、ＣＡＲ　Ｔ細胞療法を使用して、固形腫瘍を治療することができる。

【０２４２】

組換え細胞

また、細胞のゲノムの標的領域に非ウイルス的に挿入される少なくとも１つのＤＮＡテンプレートを含む組換え初代免疫細胞が本明細書に提供され、ＤＮＡテンプレートのサイズは、約４．５または５キロ塩基対（ｋｂ）以上である。

【０２４３】

本開示に記載される標的遺伝子座またはセーフハーバー部位に挿入物を含む細胞は、操作された細胞と称され得る。いくつかの実施形態において、免疫細胞は、多能性免疫細胞を生じさせることができる任意の細胞である。いくつかの実施形態において、免疫細胞は、誘導多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）またはヒト多能性幹細胞（ＨＳＰＣ）であり得る。いくつかの実施形態において、免疫細胞は、初代造血細胞または初代造血幹細胞を含む。いくつかの実施形態において、その操作された細胞は、幹細胞、ヒト細胞、初代細胞、造血細胞、適応免疫細胞、自然免疫細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、Ｔ細胞、ＣＤ８＋細胞、ＣＤ４＋細胞、またはＴ細胞前駆細胞である。いくつかの実施形態において、免疫細胞は、Ｔ細胞である。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は、調節Ｔ細胞、エフェクターＴ細胞、またはナイーブＴ細胞である。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞である。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞である。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は、ＣＤ４$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞である。

【０２４４】

いくつかの実施形態において、操作された細胞は、幹細胞、ヒト細胞、初代細胞、造血細胞、適応免疫細胞、自然免疫細胞、Ｔ細胞、またはＴ細胞前駆細胞である。本開示で企図される免疫細胞の非限定的な例としては、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、ＮＫＴ／ｉＮＫＴ細胞、マクロファージ、骨髄細胞、及び樹状細胞が挙げられる。本開示で企図される幹細胞の非限定的な例としては、多能性幹細胞（ＰＳＣ）、胚性幹細胞（ＥＳＣ）、誘導多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）、核移植によって得られる胚由来胚幹細胞（ｎｔＥＳ；核移植ＥＳ）、雄生殖細胞（ＧＳ細胞）、胚生殖細胞（ＥＧ細胞）、造血幹細胞・前駆細胞（ＨＳＰＣ）、体細胞（成体幹細胞）、血管芽球、神経幹細胞、間葉性幹細胞、及び他の細胞（骨細胞、軟骨細胞、筋細胞、心筋細胞、ニューロン、腱細胞、脂肪細胞、膵細胞、肝細胞、腎細胞、及び濾胞細胞等を含む）の幹細胞が挙げられる。いくつかの実施形態において、操作された細胞は、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ｉＰＳＣ、及びＨＳＰＣである。いくつかの実施形態において、本開示で使用される操作された細胞は、インビトロで成長したヒト細胞株（例えば、意図的に不死化された細胞株、がん細胞株等）である。

【０２４５】

また、複数の初代免疫細胞を含む細胞の集団が、本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、細胞の少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、またはそれ以上のゲノムは、異種ＤＮＡテンプレートの標的挿入を含み、ここで、ＤＮＡテンプレートは、少なくとも約５ｋｂのサイズである。

【０２４６】

細胞を編集する方法

「遺伝子編集」または「ゲノム編集」という用語は、本明細書で使用される場合、ＤＮＡが、人工的に操作されたヌクレアーゼまたは「分子ハサミ」を使用してゲノムへ挿入、

ゲノムから置換、または除去される一種の遺伝子操作を指す。これは、配列特異的遺伝子もしくはタンパク質の機能及び効果を解明するか、または細胞挙動を改変するため（例えば、治療目的のため）の有用なツールである。

【０２４７】

現在利用可能なゲノム編集ツールとしては、セーフハーバー遺伝子座（例えば、アデノ随伴ウイルス組込み部位１（ＡＡＶＳ１）セーフハーバー遺伝子座）に遺伝子を組み込むための、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）及び転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）が挙げられる。ｐｈｉＣ３１インテグラーゼ及びＢｘｂ１インテグラーゼを利用するＤＩＣＥ（デュアルインテグラーゼカセット交換）システムは、標的組込みのためのツールである。追加として、クラスター化して規則的な配置の短い回文反復／Ｃａｓ９（ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９）技法を標的遺伝子挿入に使用することができる。

【０２４８】

部位特異的遺伝子編集アプローチには、相同性依存的機序または相同性非依存的機序が含まれ得る。

【０２４９】

遺伝子配列の標的挿入のための当該技術分野で既知の全ての方法は、遺伝子標的またはセーフハーバー遺伝子座にコンストラクトを挿入するために本明細書に記載の方法で企図される。

【０２５０】

ウイルスベクターの非存在下で、約５キロベースを超える長さのヌクレオチド配列を細胞のゲノムに挿入する方法が、本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、約５キロベースを超える長さのヌクレオチド配列は、ウイルスベクターの非存在下で、初代免疫細胞のゲノムに挿入され得る。

【０２５１】

大きい核酸、例えば５キロベースを超えるサイズの核酸の、細胞への組込みは、組込みの効率の低さ、オフターゲット効果及び／または細胞生存能の喪失によって制限され得る。ヌクレオチド配列、例えば、約５キロベースを超えるサイズのヌクレオチド配列の、細胞のゲノムへの組込みを達成するための方法及び組成物が、本明細書に記載されている。いくつかの方法では、組込みの効率が向上し、オフターゲット効果が低減し、及び／または細胞生存能の喪失が低減する。

【０２５２】

図１は、プライミング受容体及びＣＡＲをコードする例示的なプラスミド、ならびにその免疫細胞のゲノムへの組込みの概略図を示す。プラスミドは、ヌクレアーゼ、例えば、ＣＲＩＳＰＲ関連系（Ｃａｓ）を用いて免疫細胞に導入される。ヌクレアーゼは、免疫細胞のゲノム上の特定の部位を標的とするガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）によってリボ核タンパク質フォーマットで導入することができる。ヌクレアーゼは、この特定の部位でゲノムＤＮＡを切断する。特定の部位は、内因性免疫細胞受容体をコードするゲノムの一部分であり得る。したがって、この部位でゲノムを切断すると、免疫細胞は、もはや内因性免疫細胞受容体を発現しなくなる。

【０２５３】

図１に示されるように、プラスミドは、免疫細胞のゲノム上の特定の部位での配列に相補的な５’及び３’相同性指向修復アームを含んでもよい。相補配列は、ヌクレアーゼによって切断された部位のいずれかの側にあり、これにより、プラスミドは、免疫細胞のゲノム上の指定された挿入部位に組み込まれることが可能になる。プラスミドが組み込まれると、細胞はプライミング受容体を発現する。しかしながら、説明されるように、導入遺伝子カセットの設計は、プライミング受容体がその同族リガンドに結合し、切断可能な転写因子を放出するまで、非ウイルス送達回路受容体がＣＡＲを発現しないことを確実にする。

【０２５４】

図２は、本開示の操作された免疫細胞を産生する例示的な方法の概略図を示す。最初に、Ｔ細胞を活性化する。Ｔ細胞は、患者から得ることができる。したがって、本開示は、Ｔ細胞などの免疫細胞が患者から採取される方法を提供する。次いで、ＣＡＲ及びプライミング受容体をコードするプラスミドをＴ細胞に導入する。有利には、本開示のプラスミドは、エレクトロポレーションを使用して導入することができる。エレクトロポレーションを介してプラスミドを導入する場合、ヌクレアーゼを導入することもできる。エレクトロポレーションを使用することによって、本開示の方法は、免疫細胞操作における既知のボトルネックである、導入遺伝子を導入するためのウイルスベクターの使用を回避する。次いで、Ｔ細胞を増殖させ、共培養して、治療処置として使用するのに十分な量の操作された免疫細胞を作製する。

【０２５５】

細胞のゲノムを編集するための方法は、ａ）（ｉ）ＲＮＰ（ＲＮＰは、Ｃａｓ９ヌクレアーゼドメイン及びガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、細胞のゲノムの標的領域に特異的にハイブリダイズし、Ｃａｓ９ヌクレアーゼドメインは、標的領域を切断して、細胞のゲノムにおける挿入部位を作製する）、及び（ｉｉ）二本鎖または一本鎖ＤＮＡテンプレート（ＤＮＡテンプレートのサイズは、約２００ヌクレオチド超であり、ＤＮＡテンプレートの５’及び３’末端は、挿入部位に隣接するゲノム配列に相同であるヌクレオチド配列を含み、複合体におけるＲＮＰ対ＤＮＡテンプレートのモル比は、約３：１～約１００：１である）を含む、Ｃａｓ９リボ核タンパク質複合体（ＲＮＰ）－ＤＮＡテンプレート複合体を提供することと、ｂ）ＲＮＰ－ＤＮＡテンプレート複合体を細胞に導入することと、を含み得る。

【０２５６】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の方法は、少なくとも約２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７．５％、９９％、９９．５％、９９％、またはそれ以上のＲＮＰ－ＤＮＡテンプレート複合体の送達の効率を提供する。いくつかの場合において、効率は、ＲＮＰ－ＤＮＡテンプレートを細胞内に導入した後に生存可能である細胞に関して決定される。いくつかの場合において、効率は、ＲＮＰ－ＤＮＡテンプレートが細胞内に導入される細胞の総数（生存可能または非生存可能）に関して決定される。

【０２５７】

別の例として、送達の効率は、（導入ステップ後に得られた全細胞または全生存細胞と比較して）細胞集団内のゲノム編集細胞の数を定量化することによって決定することができる。ゲノム編集を定量化するための様々な方法を利用することができる。これらの方法には、Ｔ７エンドヌクレアーゼＩなどのミスマッチ特異的ヌクレアーゼの使用、１つ以上の標的遺伝子座の配列決定（例えば、クローニングされた標的遺伝子座増幅断片のサンガー配列決定による）、及びハイスループット大規模配列決定が含まれるが、これらに限定されない。

【０２５８】

いくつかの実施形態において、細胞生存率の喪失は、裸のＤＮＡを細胞に導入した後、またはウイルスベクターを使用してＤＮＡを細胞に導入した後の細胞生存率の喪失と比較して低減される。低減は、少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、またはこれらのパーセンテージの間の任意のパーセンテージの低減であり得る。いくつかの実施形態において、組込みのオフターゲット効果は、裸のＤＮＡを細胞に導入した後、またはウイルスベクターを使用してＤＮＡを細胞に導入した後、オフターゲット組込みと比較して低減される。低減は、少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、またはこれらのパーセンテージの間の任意のパーセンテージの低減であり得る。

【０２５９】

いくつかの場合において、本明細書に記載の方法は、ＲＮＰ－ＤＮＡテンプレートが導入された細胞の高い細胞生存率を提供する。いくつかの場合において、ＲＮＰ－ＤＮＡテ

ンプレートが導入された細胞の生存率は、少なくとも約２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７．５％、９９％、９９．５％、９９％、またはそれ以上である。いくつかの場合において、ＲＮＰ－ＤＮＡテンプレートが導入された細胞の生存率は、約２０％～約９９％、約３０％～約９０％、約３５％～約８５％または９０％以上、約４０％～約８５％または９０％以上、約５０％～約８５％または９０％以上、約５０％～約８５％または９０％以上、約６０％～約８５％または９０％以上、または約７０％～約８５％または９０％以上である。

【０２６０】

本明細書に提供される方法では、ＲＮＰ対ＤＮＡテンプレートのモル比は、約３：１～約１００：１であり得る。例えば、モル比は、約５：１～１０：１、約５：１～約１５：１、５：１～約２０：１、５：１～約２５：１、約８：１～約１２：１、約８：１～約１５：１、約８：１～約２０：１、または約８：１～約２５：１であり得る。

【０２６１】

いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、約２．５ｐＭ～約２５ｐＭの濃度である。例えば、ＤＮＡテンプレートの濃度は、約２．５、３、３．５、４、４．５、５、５．５、６、６．５、７、７．５、８、８．５、９、９．５、１０、１０．５、１１、１１．５、１２、１２．５、１３、１３．５、１４、１４．５、１５、１５．５、１６、１６．５、１７、１７．５、１８、１８．５、１９、１９．５、２０、２０．５、２１、２１．５、２２、２２．５、２３、２３．５、２４、２４．５、２５ｐＭ、またはこれらの濃度の間の任意の濃度であり得る。

【０２６２】

いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートのサイズまたは長さは、約４．５ｋｂ、５．０ｋｂ、５．１ｋｂ、５．２ｋｂ、５．３ｋｂ、５．４ｋｂ、５．５ｋｂ、５．６ｋｂ、５．７ｋｂ、５．８ｋｂ、５．９ｋｂ、６．０ｋｂ、６．１ｋｂ、６．２ｋｂ、６．３ｋｂ、６．４ｋｂ、６．５ｋｂ、６．６ｋｂ、６．７ｋｂ、６．８ｋｂ、６．９ｋｂ、７．０ｋｂ、７．１ｋｂ、７．２ｋｂ、７．３ｋｂ、７．４ｋｂ、７．５ｋｂ、７．６ｋｂ、７．７ｋｂ、７．８ｋｂ、７．９ｋｂ、８．０ｋｂ、８．１ｋｂ、８．２ｋｂ、８．３ｋｂ、８．４ｋｂ、８．５ｋｂ、８．６ｋｂ、８．７ｋｂ、８．８ｋｂ、８．９ｋｂ、９．０ｋｂ、９．１ｋｂ、９．２ｋｂ、９．３ｋｂ、９．４ｋｂ、９．５ｋｂ、９．６ｋｂ、９．７ｋｂ、９．８ｋｂ、９．９ｋｂ、もしくは１０ｋｂ超、またはこれらのサイズの間の任意のＤＮＡテンプレートサイズである。例えば、ＤＮＡテンプレートのサイズは、約４．５ｋｂ～約１０ｋｂ、約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約５ｋｂ～約９ｋｂ、約５ｋｂ～約８ｋｂ、約５ｋｂ～約７ｋｂ、約５ｋｂ～約６ｋｂ、約６ｋｂ～約１０ｋｂ、約６ｋｂ～約９ｋｂ、約６ｋｂ～約８ｋｂ、約６ｋｂ～約７ｋｂ、約７ｋｂ～約１０ｋｂ、約７ｋｂ～約９ｋｂ、約７ｋｂ～約８ｋｂ、約８ｋｂ～約１０ｋｂ、約８ｋｂ～約９ｋｂ、または約９ｋｂ～約１０ｋｂであり得る。

【０２６３】

いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートの量は、約１μｇ～約１０μｇである。例えば、ＤＮＡテンプレートの量は、約１μｇ～約２μｇ、約１μｇ～約３μｇ、約１μｇ～約４μｇ、約１μｇ～約５μｇ、約１μｇ～約６μｇ、約１μｇ～約７μｇ、約１μｇ～約８μｇ、約１μｇ～約９μｇ、約１μｇ～約１０μｇであり得る。いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートの量は、約２μｇ～約３μｇ、約２μｇ～約４μｇ、約２μｇ～約５μｇ、約２μｇ～約６μｇ、約２μｇ～約７μｇ、約２μｇ～約８μｇ、約２μｇ～約９μｇ、または２μｇ～約１０μｇである。いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートの量は、約３μｇ～約４μｇ、約３μｇ～約５μｇ、約３μｇ～約６μｇ、約３μｇ～約７μｇ、約３μｇ～約８μｇ、約３μｇ～約９μｇ、または約３μｇ～約１０μｇである。いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートの量は、約４μｇ～約５μｇ、約４μｇ～約６μｇ、約４μｇ～約７μｇ、約４μｇ～約８μｇ、約４μｇ～約９μｇ、または約４μｇ～約１０μｇである。いくつかの実施形態において、

ＤＮＡテンプレートの量は、約５μｇ～約６μｇ、約５μｇ～約７μｇ、約５μｇ～約８μｇ、約５μｇ～約９μｇ、または約５μｇ～約１０μｇである。いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートの量は、約６μｇ～約７μｇ、約６μｇ～約８μｇ、約６μｇ～約９μｇ、または約６μｇ～約１０μｇである。いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートの量は、約７μｇ～約８μｇ、約７μｇ～約９μｇ、または約７μｇ～約１０μｇである。いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートの量は、約８μｇ～約９μｇ、または約８μｇ～約１０μｇである。いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートの量は、約９μｇ～約１０μｇである。

【０２６４】

いくつかの場合において、ＤＮＡテンプレートのサイズは、裸のＤＮＡとして致死的であるのに十分に大きくかつ十分な量である。いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、異種タンパク質またはその断片をコードする。いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、少なくとも１つの遺伝子をコードする。いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、少なくとも２つの遺伝子をコードする。いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０個、またはそれ以上の遺伝子をコードする。

【０２６５】

いくつかの実施形態において、ＤＮＡテンプレートは、細胞のゲノムへの挿入後に異種タンパク質またはその断片の発現を調節するための調節配列、例えばプロモーター配列及び／またはエンハンサー配列を含む。

【０２６６】

いくつかの場合において、ＤＮＡテンプレートは、直鎖ＤＮＡテンプレートである。いくつかの場合において、ＤＮＡテンプレートは、一本鎖ＤＮＡテンプレートである。いくつかの場合において、一本鎖ＤＮＡテンプレートは、純粋な一本鎖ＤＮＡテンプレートである。本明細書で使用される場合、「純粋な一本鎖ＤＮＡ」とは、ＤＮＡの他の鎖または反対の鎖を実質的に欠く一本鎖ＤＮＡを意味する。「実質的に欠く」とは、純粋な一本鎖ＤＮＡが、１つのＤＮＡ鎖を別のＤＮＡ鎖よりも少なくとも１００倍多く欠くことを意味する。

【０２６７】

いくつかの場合において、ＲＮＰ－ＤＮＡテンプレート複合体は、ＲＮＰをＤＮＡテンプレートとともに約２０℃～約２５℃の温度で約１分未満～約３０分間インキュベートすることによって形成される。例えば、ＲＮＰは、ＤＮＡテンプレートとともに約２０℃、２１℃、２２℃、２３℃、２４℃、または２５℃の温度で約５秒、１０秒、１５秒、２０秒、２５秒、３０秒、３５秒、４０秒、４５秒、５０秒、５５秒、１分、２分、３分、４分、５分、６分、７分、８分、９分、１０分、１１分、１２分、１３分、１４分、１５分、１６分、１７分、１８分、１９分、２０分、２１分、２２分、２３分、２４分、２５分、２６分、２７分、２８分、２９分、３０分、またはこれらの時間の間の任意の量の時間にわたってインキュベートすることができる。別の例において、ＲＮＰは、ＤＮＡテンプレートとともに約２０℃～約２５℃の温度で約１分未満～約１分、約１分未満～約５分、約１分未満～約１０分、約５分～１０分、約５分～１５分、約１０～約１５分、約１０分～約２０分、または約１０分～約３０分間インキュベートすることができる。いくつかの実施形態において、ＲＮＰ－ＤＮＡテンプレート複合体及び細胞は、ＲＮＰ－ＤＮＡテンプレート複合体を細胞に導入する前に混合される。

【０２６８】

いくつかの実施形態において、ＲＮＰ－ＤＮＡテンプレート複合体を導入することは、エレクトロポレーションを含む。細胞をエレクトロポレーションしてＲＮＰ－ＤＮＡテンプレート複合体を導入するための方法、組成物、及びデバイスは、本明細書の実施例に記載されるものを含むことができる。細胞をエレクトロポレーションしてＲＮＰ－ＤＮＡテンプレート複合体を導入するための追加または代替の方法、組成物、及びデバイスは、ＷＯ／２００６／００１６１４またはＫｉｍ，Ｊ．Ａ．ｅｔ　ａｌ．Ｂｉｏｓｅｎｓ．Ｂｉ

ｏｅｌｅｃｔｒｏｎ．２３，１３５３－１３６０（２００８）に記載されるものを含むことができる。細胞をエレクトロポレーションしてＲＮＰ－ＤＮＡテンプレート複合体を導入するための追加または代替の方法、組成物、及びデバイスは、米国特許出願公開第２００６／００９４０９５号、同第２００５／００６４５９６号、または同第２００６／００８７５２２号に記載されるものを含むことができる。細胞をエレクトロポレーションしてＲＮＰ－ＤＮＡテンプレート複合体を導入するための追加または代替の方法、組成物、及びデバイスは、Ｌｉ，Ｌ．Ｈ．ｅｔ　ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．Ｔｒｅａｔ．１，３４１－３５０（２００２）、米国特許第６，７７３，６６９号、同第７，１８６，５５９号、同第７，７７１，９８４号、同第７，９９１，５５９号、同第６４８５９６１号、同第７０２９９１６号、及び米国特許出願公開第２０１４／００１７２１３号、及び同第２０１２／００８８８４２号（これらの全ては、参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものを含むことができる。細胞をエレクトロポレーションしてＲＮＰ－ＤＮＡテンプレート複合体を導入するための追加または代替の方法、組成物、及びデバイスは、Ｇｅｎｇ，Ｔ．ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｏｎｔｒｏｌ　Ｒｅｌｅａｓｅ　１４４，９１－１００（２０１０）、及びＷａｎｇ，Ｊ．，ｅｔ　ａｌ．Ｌａｂ．Ｃｈｉｐ　１０，２０５７－２０６１（２０１０）（これらの全ては、参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものを含むことができる。

【０２６９】

いくつかの実施形態において、Ｃａｓ９タンパク質は、ガイドＲＮＡを有する複合体またはＤＮＡテンプレートを有する複合体の一部として標的核酸に結合したときに、二本鎖切断が標的核酸に導入されるように、活性エンドヌクレアーゼ形態であり得る。二本鎖切断は、ＮＨＥＪによって修復されてランダム変異を導入することができるか、またはＨＤＲによって特定の変異を導入することができる。様々なＣａｓ９ヌクレアーゼは、本明細書に記載の方法において利用することができる。例えば、ガイドＲＮＡによって標的とされる領域の３’直前にＮＧＧプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）を必要とするＣａｓ９ヌクレアーゼを利用することができる。そのようなＣａｓ９ヌクレアーゼは、ＮＧＧ配列を含有するゲノムの任意の領域を標的とすることができる。別の例として、直交ＰＡＭモチーフ要件を有するＣａｓ９タンパク質を利用して、隣接ＮＧＧ　ＰＡＭ配列を有しない配列を標的とすることができる。直交ＰＡＭ配列特異性を有する例示的なＣａｓ９タンパク質としては、ＣＦＰ１、Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　１０，１１１６－１１２１（２０１３）に記載されるもの、及びＺｅｔｓｃｈｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ，Ｖｏｌｕｍｅ　１６３，Ｉｓｓｕｅ　３，ｐ７５９－７７１，２２　Ｏｃｔｏｂｅｒ　２０１５に記載されるものが挙げられるが、それらに限定されない（両方とも参照により本明細書に組み込まれる）。

【０２７０】

いくつかの場合において、Ｃａｓ９タンパク質は、ガイドＲＮＡとの複合体の一部として標的核酸に結合したときに、一本鎖切断またはニックが標的核酸に導入されるように、ニッカーゼである。各々が構造的に異なるガイドＲＮＡに結合した一対のＣａｓ９ニッカーゼは、標的ゲノム領域の２つの近位部位を標的とすることができ、したがって、一対の近位一本鎖切断を標的ゲノム領域に導入することができる。ニッカーゼ対は、オフターゲット効果が単一のニックをもたらす可能性が高いため、特異性を高めることができ、これは一般に、塩基切除修復機構によって病変なしで修復される。例示的なＣａｓ９ニッカーゼとしては、Ｄ１０ＡまたはＨ８４０Ａ変異を有するＣａｓ９ヌクレアーゼが挙げられる。

【０２７１】

いくつかの実施形態において、ＲＮＰは、Ｃａｓ９ヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態において、ＲＮＰは、Ｃａｓ９ニッカーゼを含む。いくつかの実施形態において、ＲＮＰ－ＤＮＡテンプレート複合体は、少なくとも２つの構造的に異なるＲＮＰ複合体を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも２つの構造的に異なるＲＮＰ複合体は、構造的に異なるＣａｓ９ヌクレアーゼドメインを含有する。いくつかの実施形態において

、少なくとも２つの構造的に異なるＲＮＰ複合体は、構造的に異なるガイドＲＮＡを含有する。少なくとも２つの構造的に異なるＲＮＰ複合体が構造的に異なるガイドＲＮＡを含有するいくつかの実施形態において、構造的に異なるＲＮＰ複合体の各々は、Ｃａｓ９ニッカーゼを含み、構造的に異なるガイドＲＮＡは、標的領域の反対側の鎖にハイブリダイズする。

【０２７２】

いくつかの場合において、構造的に異なるリボ核タンパク質複合体を含む複数のＲＮＰ－ＤＮＡテンプレートが細胞に導入される。例えば、Ｃａｓ９タンパク質は、複数の構造的に異なる標的ゲノム領域におけるＤＮＡテンプレートの挿入を標的とするために、複数（例えば、２、３、４、５、またはそれよりも多い、例えば、２～１０、５～１００、２０～１００個）の構造的に異なるガイドＲＮＡと複合体化することができる。

【０２７３】

本明細書に提供される方法及び組成物において、細胞には、真核細胞、原核細胞、動物細胞、植物細胞、真菌細胞等が含まれるが、これらに限定されない。任意選択で、細胞は、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞である。細胞は、インビトロ、エクスビボ、またはインビボであり得る。細胞はまた、初代細胞、生殖細胞、幹細胞または前駆細胞であり得る。前駆細胞は、例えば、多能性幹細胞または造血幹細胞であり得る。いくつかの実施形態において、細胞は、初代造血細胞または初代造血幹細胞である。いくつかの実施形態において、初代造血細胞は、免疫細胞である。いくつかの実施形態において、免疫細胞は、Ｔ細胞である。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、調節Ｔ細胞、エフェクターＴ細胞、またはナイーブＴ細胞である。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、$CD4^+$Ｔ細胞である。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、$CD8^+$Ｔ細胞である。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、$CD4^+CD8^+$Ｔ細胞である。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、$CD4^-CD8^-$Ｔ細胞である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかによって修飾された細胞のうちのいずれかの集団もまた提供される。いくつかの実施形態において、方法は、修飾細胞の集団を拡大増殖させることを更に含む。

【０２７４】

いくつかの場合において、細胞は、対象から除去され、本明細書に記載の方法のうちのいずれかを使用して修飾され、患者に投与される。他の場合において、本明細書に記載のコンストラクトのうちのいずれかは、インビボで患者に送達される。例えば、米国特許第９７３７６０４号及びＺｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．“Ｌｉｐｉｄ ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ ｆｏｒ ｔｕｍｏｒ ｔｈｅｒａｐｙ，”ＮＰＧ Ａｓｉａ Ｍａｔｅｒｉａｌｓ Ｖｏｌｕｍｅ ９，ｐａｇｅ ｅ４４１（２０１７）（両方とも参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【０２７５】

いくつかの実施形態において、ＲＮＰ－ＤＮＡテンプレート複合体は、約$1\times10^5$～約$2\times10^6$細胞に導入される。例えば、ＲＮＰ－ＤＮＡテンプレート複合体は、約$1\times10^5$～約$5\times10^5$細胞、約$1\times10^5$～約$1\times10^6$、$1\times10^5$～約$1.5\times10^6$、$1\times10^5$～約$2\times10^6$、約$1\times10^6$～約$1.5\times10^6$細胞、または約$1\times10^6$～約$2\times10^6$に導入することができる。

【０２７６】

いくつかの場合において、本明細書に記載の方法及び組成物は、キメラ抗原受容体Ｔ細胞（ＣＡＲ　Ｔ細胞）などの組換えＴ細胞の生成、修飾、使用、または制御のために使用することができる。そのようなＣＡＲ　Ｔ細胞を使用して、対象におけるがん、感染性疾患、または自己免疫疾患を治療または予防することができる。例えば、いくつかの実施形態において、１つ以上の遺伝子産物がＴ細胞に挿入またはノックインされ、異種タンパク質（例えば、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）またはプライミング受容体）を発現する。

【０２７７】

挿入部位

Ｔ細胞のゲノムを編集するための方法は、具体的に、ヒトＴ細胞におけるＴＣＲ－αサブユニット（ＴＲＡＣ）のエクソン１における標的領域に核酸配列またはコンストラクトを挿入することを含む、ヒトＴ細胞のゲノムを編集する方法を含む。いくつかの実施形態において、標的領域は、ＴＲＡＣ遺伝子の定常ドメインのエクソン１にある。他の実施形態において、標的領域は、ＴＣＲ－α膜貫通ドメインをコードする配列の開始前に、エクソン１、エクソン２またはエクソン３にある。

【０２７８】

Ｔ細胞のゲノムを編集するための方法はまた、ヒトＴ細胞におけるＴＣＲ－βサブユニット（ＴＲＢＣ）のエクソン１における標的領域に核酸配列またはコンストラクトを挿入することを含む、ヒトＴ細胞のゲノムを編集する方法を含む。いくつかの実施形態において、標的領域は、ＴＲＢＣ１またはＴＲＢＣ２遺伝子のエクソン１にある。

【０２７９】

Ｔ細胞のゲノムを編集するための方法は、具体的には、ゲノムセーフハーバー（ＧＳＨ）の標的領域に核酸配列またはコンストラクトを挿入することを含む、ヒトＴ細胞のゲノムを編集する方法を含む。

【０２８０】

遺伝子編集療法には、例えば、ベクター組込み及び部位特異的組込みが含まれる。部位特異的組込みは、挿入変異誘発または挿入発がんのリスクを軽減するため、ウイルスベクターのランダムな組込みに代わる有望な代替物である（Ｋｏｌｂ ｅｔ ａｌ．Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００５ ２３：３９９－４０６、Ｐｏｒｔｅｕｓ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００５ ２３：９６７－９７３、Ｐａｑｕｅｓ ｅｔ ａｌ．Ｃｕｒｒ Ｇｅｎ Ｔｈｅｒ．２００７ ７：４９－６６）。しかしながら、部位特異的組込みは、低いノックイン効率、挿入発がんのリスク、隣接した遺伝子または導入遺伝子の不安定及び／または異常な発現、低いアクセス性（例えば、隣接した遺伝子の２０ｋＢ以内）などの課題に直面し続けている。これらの課題は、部分的には、隣接した遺伝子の発現または調節を中断することなく遺伝子または遺伝子エレメントを組み込むことができる部位である、セーフハーバー遺伝子座またはセーフハーバー部位（ＳＨＳ）の同定及び使用によって対処することができる。

【０２８１】

推定ヒトセーフハーバー部位の中で最も広く使用されているのは、１９ｑ染色体上のＡＡＶＳ１部位であり、これは当初、再発性アデノ随伴ウイルス挿入のための部位として同定された。他の潜在的なＳＨＳは、他の種（において最初に同定された部位との相同性に基づいて同定されており（例えば、許容性マウスＲｏｓａ２６遺伝子座のヒト相同性）、またはいくつかの状況下で非本質的に見えるますます多くのヒト遺伝子中で同定されている。このタイプの推定ＳＨＳの１つは、ＣＣＲ５ケモカイン受容体遺伝子であり、破壊されると、ヒト免疫不全ウイルス感染に対する耐性を付与する。追加の潜在的なゲノムＳＨＳは、元のマウスＲｏｓａ２６遺伝子座と同様に、ウイルス組込み部位マッピングまたは遺伝子トラップ分析に基づいて、ヒト及び他の細胞型で同定されている。上位３つのＳＨＳ、ＡＡＶＳ１、ＣＣＲ５、及びＲｏｓａ２６は、多くのタンパク質コード遺伝子及び調節要素に近接している。（Ｓａｄｅｌａｉｎ，Ｍ．，ｅｔ ａｌ．（２０１２）．Ｓａｆｅ ｈａｒｂｏｕｒｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ｉｎｔｅｇｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｎｅｗ ＤＮＡ ｉｎ ｔｈｅ ｈｕｍａｎ ｇｅｎｏｍｅ．Ｎａｔｕｒｅ ｒｅｖｉｅｗｓ Ｃａｎｃｅｒ，１２（１），５１－５８（この関連開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照されたい）。

【０２８２】

ヒト染色体１９上のＡＡＶＳ１（ＰＰＰ１Ｒ１２Ｃ遺伝子座としても知られる）は、期待される機能を有する導入遺伝子（例えば、ＤＮＡ導入遺伝子）をホストするための既知のＳＨＳである。それは、１９ｑ１３．４２位にある。それは、オープンクロマチン構造を有し、転写能がある。ＡＡＶＳ１の正準ＳＨＳ遺伝子座は、ｃｈｒ１９：５５，６２５，２４１～５５，６２９，３５１である。Ｐｅｌｌｅｎｚ ｅｔ ａｌ．“Ｎｅｗ Ｈｕ

man Chromosomal Sites with“Safe Harbor”Potential for Targeted Transgene Insertion.”Human gene therapy vol.30,7(2019):814-828（この関連開示は、参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。例示的なAAVS1標的gRNA及び標的配列を以下に提供する。

●AAVS1-gRNA配列：ggggccactagggacaggatGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTT

●AAVS1標的配列：ggggccactagggacaggat

【0283】

3p21.31位の染色体3上に位置するCCR5は、HIV-1の主要な共受容体をコードする。CCR5遺伝子におけるこの部位の破壊は、HIV/AIDS治療において有益であり、その第3のエクソンを標的とするジンクフィンガーヌクレアーゼの発達を促した。CCR5の正準SHS遺伝子座は、chr3：46,414,443～46,414,942である。Pellenz et al.“New Human Chromosomal Sites with“Safe Harbor”Potential for Targeted Transgene Insertion.”Human gene therapy vol.30,7(2019):814-828（この関連開示は、参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【0284】

マウスRosa26遺伝子座は、高い効率で標的とされ得、試験した大部分の細胞型において発現されるため、遺伝子修飾に特に有用である。Irion et al.2007（“Identification and targeting of the ROSA26 locus in human embryonic stem cells.”Nature biotechnology 25.12(2007):1477-1482（その関連する開示は、参照により本明細書に組み込まれる）は、染色体3（3p25.3位）においてヒトホモログであるヒトROSA26を同定した。ヒトRosa26（hRosa26）の正準SHS遺伝子座は、chr3：9,415,082～9,414,043である。Pellenz et al.“New Human Chromosomal Sites with“Safe Harbor”Potential for Targeted Transgene Insertion.”Human gene therapy vol.30,7(2019):814-828（この関連開示は、参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【0285】

セーフハーバー部位の追加の例は、Pellenz et al.“New Human Chromosomal Sites with“Safe Harbor”Potential for Targeted Transgene Insertion.”Human gene therapy vol.30,7(2019):814-828（この関連開示は、参照により本明細書に組み込まれる）に提供されている。追加の組込み部位の例を表1に提供する。

【0286】

いくつかの実施形態において、セーフハーバー部位は、高導入遺伝子発現（導入遺伝子機能性または目的の疾患の治療を可能にするのに十分な）及び導入遺伝子の数日、数週間または数ヶ月にわたる安定した発現を可能にする。いくつかの実施形態において、セーフハーバー遺伝子座における遺伝子のノックアウトは、細胞の機能に利益を与えるか、またはセーフハーバー遺伝子座における遺伝子は、細胞内で既知の機能を有しない。いくつかの実施形態において、セーフハーバー遺伝子座は、CD3/CD28刺激の有無にかかわらず、インビトロでの安定した導入遺伝子発現、iGuide-SeqまたはCRISPR-Seqによって検出された無視できるオフターゲット切断、iGuide-SeqまたはCRISPR-Seqによって検出された他の遺伝子座と比較してより少ないオフタ

ーゲット切断、無視できる導入遺伝子非依存的細胞毒性、無視できる導入遺伝子非依存的サイトカイン発現、無視できる導入遺伝子非依存的キメラ抗原受容体発現、無視できる近くの遺伝子の制御解除またはサイレンシングをもたらし、がん関連遺伝子の外側に位置付けられる。

【０２８７】

使用される場合、「近傍遺伝子」は、セーフハーバー遺伝子座（組込み部位）から約１００ｋＢ、約１２５ｋＢ、約１５０ｋＢ、約１７５ｋＢ、約２００ｋＢ、約２２５ｋＢ、約２５０ｋＢ、約２７５ｋＢ、約３００ｋＢ、約３２５ｋＢ、約３５０ｋＢ、約３７５ｋＢ、約４００ｋＢ、約４２５ｋＢ、約４５０ｋＢ、約４７５ｋＢ、約５００ｋＢ、約５２５ｋＢ、約５５０ｋＢ以内にある遺伝子を指すことができる。

【０２８８】

いくつかの実施形態において、本開示は、１つ以上の導入遺伝子を含む挿入物を企図する。導入遺伝子は、治療用タンパク質、抗体、ペプチド、自殺遺伝子、アポトーシス遺伝子または目的の任意の他の遺伝子をコードすることができる。導入遺伝子組込みは、例えば、治療特性の向上をもたらし得る。これらの強化された治療特性は、本明細書で使用される場合、同じ正常細胞型の典型的な免疫細胞と比較して、強化された細胞の治療特性を指す。例えば、「強化された治療特性」を有するＮＫ細胞は、典型的な、非修飾及び／または天然に存在するＮＫ細胞と比較して、強化された、改善された、及び／または増加した治療転帰を有する。免疫細胞の治療特性には、細胞移植、輸送、ホーミング、生存率、自己再生、持続性、免疫応答制御及び調節、生存、ならびに細胞毒性が含まれ得るが、これらに限定されない。免疫細胞の治療特性はまた、抗原標的指向受容体の発現、ＨＬＡの提示またはその欠如、腫瘍内微小環境への耐性、バイスタンダー免疫細胞の誘導及び免疫調節、還元による改善された標的特異性、化学療法などの治療への耐性によっても明らかにされる。

【０２８９】

本明細書で使用される場合、「挿入物サイズ」は、標的遺伝子座またはセーフハーバー部位に組み込まれる（挿入される）ヌクレオチド配列の長さを指す。いくつかの実施形態において、挿入物サイズは、少なくとも約４．５キロ塩基対（ｋｂ）～約１０キロ塩基対（ｋｂ）を含む。いくつかの実施形態において、挿入物サイズは、約５０００ヌクレオチド以上の塩基対を含む。いくつかの実施形態において、挿入物サイズは、最大で４．５、４．８、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０ｋｂｐ（キロ塩基対）またはそれらの間のサイズを含む。いくつかの実施形態において、挿入物サイズは、４．５、４．８、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０ｋｂｐまたはそれらの間のサイズよりも大きい。いくつかの実施形態において、挿入物サイズは、４．５～１５ｋｂｐの範囲内であるか、またはその範囲内の任意の数である。いくつかの実施形態において、挿入物サイズは、４．８～８．３ｋｂｐの範囲内であるか、またはその範囲内の任意の数である。いくつかの実施形態において、挿入物サイズは、５～８．３ｋｂｐの範囲内であるか、またはその範囲内の任意の数である。いくつかの実施形態において、挿入物サイズは、５～１５ｋｂｐの範囲内であるか、またはその範囲内の任意の数である。いくつかの実施形態において、挿入物サイズは、４．５～２０ｋｂｐの範囲内であるか、またはその範囲内の任意の数である。いくつかの実施形態において、挿入物サイズは、５～１０ｋｂｐである。いくつかの実施形態において、挿入物サイズは、４．５～１０、５～１０、６～１０、７～１０、８～１０、９～１０ｋｂｐである。いくつかの実施形態において、挿入物サイズは、４．５～１１、６～１１、７～１１、８～１１、９～１１、または１０～１１ｋｂｐである。いくつかの実施形態において、挿入物サイズは、４．５～１２、６～１２、７～１２、８～１２、９～１２、１０～１２、または１１～１２ｋｂｐである。いくつかの実施形態では、挿入物サイズは、４．５～１３、６～１３、７～１３、８～１３、９～１３、１０～１３、１１～１３、または１２～１３ｋｂｐである。いくつかの実施形態において、挿入物サイズは、４．５～１４、６～１４、７～１４、８～１４、９～１４、１

０～１４、１１～１４、１２～１４、または１３～１４ｋｂｐである。いくつかの実施形態では、挿入物サイズは、４．５～１５、６～１５、７～１５、８～１５、９～１５、１０～１５、１１～１５、１２～１５、１３～１５、または１４～１５ｋｂｐである。いくつかの実施形態において、挿入物サイズは、４．５～１６、６～１６、７～１６、８～１６、９～１６、１０～１６、１１～１６、１２～１６、１３～１６、１４～１６、または１５～１６ｋｂｐである。いくつかの実施形態では、挿入物サイズは、４．５～１７、６～１７、７～１７、８～１７、９～１７、１０～１７、１１～１７、１２～１７、１３～１７、または１４～１７、１５～１７、または１６～１７ｋｂｐである。いくつかの実施形態において、挿入物サイズは、４．５～１８、６～１８、７～１８、８～１８、９～１８、１０～１８、１１～１８、１２～１８、１３～１８、１４～１８、１５～１８、１６～１８、または１７～１８ｋｂｐである。いくつかの実施形態において、挿入物サイズは、４．５～１９、６～１９、７～１９、８～１９、９～１９、１０～１９、１１～１９、１２～１９、１３～１９、１４～１９、１５～１９、１６～１９、１７～１９、または１８～１９ｋｂｐである。いくつかの実施形態では、挿入物サイズは、４．５～２０、６～２０、７～２０、８～２０、９～２０、１０～２０、１１～２０、１２～２０、１３～２０、１４～２０、１５～２０、１６～２０、１７～２０、１８～２０、または１９～２０ｋｂｐである。

【０２９０】

本開示の挿入物は、標的遺伝子座またはセーフハーバー部位に挿入される核酸分子またはポリヌクレオチドを指す。いくつかの実施形態において、ヌクレオチド配列は、ＤＮＡ分子、例えば、ゲノムＤＮＡであるか、またはデオキシリボヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、挿入物は、プラスミド、フォスミド、コスミド、細菌人工染色体（ＢＡＣ）、酵母人工染色体（ＹＡＣ）、及び／またはＤＮＡの任意の他のサブゲノムセグメントの形態で単離されたプラスチドＤＮＡ、ミトコンドリアＤＮＡ、またはＤＮＡなどのＤＮＡのより小さな断片を含む。いくつかの実施形態において、挿入物は、ＲＮＡ分子であるか、またはリボヌクレオチドを含む。挿入物中のヌクレオチドは、天然に存在するヌクレオチド、非天然に存在するヌクレオチド、及び修飾ヌクレオチドとして企図される。ヌクレオチドは、当業者に容易に理解されるように、化学的または生化学的に修飾されてもよく、または非天然または誘導体化ヌクレオチド塩基を含有してもよい。かかる修飾には、例えば、標識、メチル化、天然に存在するヌクレオチドのうちの１つ以上の、類似体との置換、ヌクレオチド間修飾が含まれる。ポリヌクレオチドは、当該技術分野で企図される一本鎖、二本鎖、部分的に二重鎖、三重鎖、ヘアピン、円形コンフォメーション、及び他の三次元コンフォメーションを含む、任意のトポロジカルコンフォメーションであり得る。

【０２９１】

挿入物は、コード領域及び／または非コード領域を有することができる。挿入物は、非コード配列（例えば、制御エレメント、例えば、プロモーター配列）を含むことができる。いくつかの実施形態において、挿入物は、転写因子をコードする。いくつかの実施形態において、挿入物は、単一受容体、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）、プライミング受容体、ＣＡＲ、ｍＡｂ等の抗原結合受容体をコードする。いくつかの実施形態において、挿入物は、ＲＮＡｉ分子であり、ｍｉＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ等を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、挿入物は、ヒト配列である。いくつかの実施形態において、挿入物は、キメラである。いくつかの実施形態において、挿入物は、多遺伝子／多モジュール治療用カセットである。多遺伝子／多モジュール治療カセットは、１つ以上の受容体（例えば、合成受容体）、他の外因性タンパク質コード配列、非コードＲＮＡ、転写調節エレメント、及び／または絶縁体配列等を有する挿入物またはカセットを指す。

【０２９２】

いくつかの実施形態において、核酸配列は、非ウイルス送達を介してＴ細胞のゲノムに挿入される。非ウイルス送達方法において、核酸は、裸のＤＮＡであり得るか、または非

ウイルスプラスミドもしくはベクター中にあり得る。非ウイルス送達技法は、本明細書に記載されるか、または当業者に知られている部位特異的な組込み技法であり得る。セーフハーバー遺伝子座への組込みのための部位特異的技法の例としては、限定されないが、ヌクレアーゼを使用する相同性依存的操作及びＣａｓ９または他のＣＲＩＳＰＲエンドヌクレアーゼを使用する相同性非依存的標的挿入が挙げられる。

【０２９３】

いくつかの実施形態において、挿入物は、操作された細胞に（ａ）セーフハーバー部位の標的領域を切断して挿入部位を作製する標的ヌクレアーゼ、及び（ｂ）核酸配列（挿入物）を導入することによってセーフハーバー部位に組み込まれ、挿入物は、例えば、ＨＤＲによって挿入部位に組み込まれる。本開示の方法で使用することができる非ウイルス送達技法の例は、米国出願第１６／５６８，１１６号及び同第１６／６２２，８４３号に提供されており、これらの関連する開示は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

【０２９４】

ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ編集

遺伝子編集の１つの有効な例は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓアプローチ（例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９）である。このアプローチは、ガイドポリヌクレオチド（例えば、ガイドリボ核酸またはｇＲＮＡ）及びｃａｓエンドヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼ）の使用を組み込む。

【０２９５】

本明細書で使用される場合、「Ｃａｓエンドヌクレアーゼ」と称されるまたは「Ｃａｓエンドヌクレアーゼ活性」を有するポリペプチドは、Ｃａｓ遺伝子によってコードされるＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）ポリペプチドを指し、Ｃａｓポリペプチドは、１つ以上のガイドポリヌクレオチドに作動可能に連結されたときに切断され得る標的ＤＮＡ配列である（例えば、米国特許第８，６９７，３５９号を参照されたい）。この定義には、ガイドポリヌクレオチド依存性エンドヌクレアーゼ活性を保持するＣａｓエンドヌクレアーゼのバリアントも含まれる。本明細書に詳述されるドナーＤＮＡ挿入方法で使用されるＣａｓエンドヌクレアーゼは、標的部位（例えば、標的遺伝子座内またはセーフハーバー部位）でＤＮＡに二本鎖切断を導入するエンドヌクレアーゼである。

【０２９６】

本明細書で使用される場合、「ガイドポリヌクレオチド」という用語は、Ｃａｓエンドヌクレアーゼと複合体化することができ、ＣａｓエンドヌクレアーゼがＤＮＡ標的部位を認識及び切断することを可能にすることができるポリヌクレオチド配列に関する。ガイドポリヌクレオチドは、単一分子または二重分子であり得る。ガイドポリヌクレオチド配列は、ＲＮＡ配列、ＤＮＡ配列、またはそれらの組み合わせ（ＲＮＡ－ＤＮＡ組み合わせ配列）であり得る。リボ核酸のみを含むガイドポリヌクレオチドは、「ガイドＲＮＡ」とも称される。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドドナーコンストラクトは、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）をｃａｓエンドヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼ）と組み合わせて使用して、セーフハーバー遺伝子座に挿入される。

【０２９７】

ガイドポリヌクレオチドは、標的ＤＮＡにおけるヌクレオチド配列に相補的である第１のヌクレオチド配列ドメイン（可変ターゲティングドメインまたはＶＴドメインとも称される）と、Ｃａｓエンドヌクレアーゼポリペプチドと相互作用する第２のヌクレオチドとを含む。配列ドメイン（Ｃａｓエンドヌクレアーゼ認識ドメインまたはＣＥＲドメインと称される）を含む二重分子（二本鎖ガイドポリヌクレオチドとも称される）であり得る。この二重分子ガイドポリヌクレオチドのＣＥＲドメインは、相補領域に沿ってハイブリダイズする２つの別個の分子を含む。２つの別個の分子は、ＲＮＡ配列、ＤＮＡ配列及び／またはＲＮＡ－ＤＮＡ組み合わせ配列であり得る。

【０２９８】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓアプローチを使用するゲノム編集は、ＲＮＡ誘導Ｃａｓエンドヌ

クレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼ）によって誘導される部位特異的ＤＮＡ二本鎖切断（ＤＳＢ）の修復に依存する。これらのＤＳＢの相同性指向修復（ＨＤＲ）は、塩基置換、配列挿入、及び欠失を含む定義されたゲノム変化を導入することによって、ゲノムの正確な編集を可能にする。従来のＨＤＲベースのＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ゲノム編集は、目的の遺伝子座と一致する相同アームを含有するＣａｓ９、ｇＲＮＡ及びドナーＤＮＡで細胞をトランスフェクションすることを伴う。

【０２９９】

ＨＩＴＩ（相同性非依存的標的挿入）は、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）ベースの相同性非依存的戦略を使用し、この方法は、ＨＤＲよりも効率的であり得る。ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）は、挿入部位を標的とする。ＨＩＴＩについては、ドナープラスミドは相同性アームを欠き、ＤＳＢ修復は、ＨＤＲ経路を介しては起こらない。ドナーポリヌクレオチドコンストラクトは、挿入される遺伝子または配列に隣接するＣａｓ９切断部位（複数可）を含むように操作することができる。これにより、ドナープラスミド及びゲノム標的配列の両方でＣａｓ９切断がもたらされる。標的及びドナーの両方が平滑末端を有し、直鎖化ドナーＤＮＡプラスミドは、ゲノムＤＳＢ部位への組込みをもたらすＮＨＥＪ経路によって使用される。（例えば、Ｓｕｚｕｋｉ，Ｋ．，ｅｔ ａｌ．（２０１６）．Ｉｎ ｖｉｖｏ ｇｅｎｏｍｅ ｅｄｉｔｉｎｇ ｖｉａ ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ ｍｅｄｉａｔｅｄ ｈｏｍｏｌｏｇｙ－ｉｎｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｔａｒｇｅｔｅｄ ｉｎｔｅｇｒａｔｉｏｎ．Ｎａｔｕｒｅ，５４０（７６３１），１４４－１４９（この関連開示は、その全体が本明細書に組み込まれる）を参照されたい）。

【０３００】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓアプローチを使用して遺伝子編集を行うための方法は、当業者に知られている。（例えば、米国出願第ＵＳ１６／３１２，６７６号、ＵＳ１５／３０３，７２２、及びＵＳ１５／６２８，５３３を参照されたい）。追加として、導入遺伝子をセーフハーバー遺伝子座に挿入するためのエンドヌクレアーゼの使用は、例えば、米国出願第１３／０３６，３４３号（この開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０３０１】

エンドヌクレアーゼをコードするガイドＲＮＡ及び／またはｍＲＮＡ（もしくはＤＮＡ）は、オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布、または細胞取り込みを強化する１つ以上の部分またはコンジュゲートに化学的に連結され得る。そのような部分の非限定的な例としては、コレステロール部分、コール酸、チオエーテル、チオコレステロール、脂肪族鎖（例えば、ドデカンジオールもしくはウンデシル残基）、リン脂質、例えば、ジヘキサデシル－ｒａｃ－グリセロールまたはトリエチルアンモニウム１，２－ジ－Ｏ－ヘキサデシル－ｒａｃ－グリセロ－３－Ｈ－ホスホネート、ポリアミンまたはポリエチレングリコール鎖、アダマンタン酢酸、パルミチル部分、及びオクタデシルアミンまたはヘキシルアミノ－カルボニル－ｔオキシコレステロール部分などの脂質部分が挙げられる。例えば、米国特許公開第２０１８０１２７７８６号（この開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【０３０２】

治療用途

治療用途のために、操作された細胞、その集団、またはその組成物は、対象、一般に哺乳動物、一般にヒトに有効量で投与される。

【０３０３】

操作された細胞は、注入（例えば、一定期間にわたる連続注入）または当業者に知られている他の投与様式によって対象に投与され得る。

【０３０４】

本明細書に提供される操作された細胞は、遺伝子療法における使用だけでなく、例えば、動物モデルの産生及び目的のタンパク質を発現する組換え細胞株の産生などの非薬学的使用も見出される。

【０３０５】
本開示の操作された細胞は、任意の細胞、一般に哺乳動物細胞、一般に、本明細書に記載のセーフハーバー遺伝子座に導入遺伝子を組み込むことによって修飾されたヒト細胞であり得る。いくつかの実施形態において、操作された細胞は、免疫細胞である。いくつかの実施形態において、操作された細胞は、リンパ球である。いくつかの実施形態において、操作された細胞は、Ｔ細胞またはＴ細胞前駆細胞である。
【０３０６】
本開示の操作された細胞、組成物、及び方法は、ＣＡＲ　Ｔ細胞療法及びＴＣＲ　Ｔ細胞療法などの治療用途に有用である。いくつかの実施形態において、セーフハーバー遺伝子座内の導入遺伝子をコードする配列の挿入は、挿入がない場合の例に対してＴＣＲ発現を維持し、ＴＣＲ機能を維持しながら導入遺伝子発現を可能にする。
【０３０７】
いくつかの実施形態において、本開示は、本明細書に記載の操作された細胞のうちのいずれかを含む組成物を対象に投与することによって、治療を必要とする対象を治療する方法を提供する。使用される場合、「治療する」、「治療」等という用語は、概して、所望の薬理学的効果及び／または生理学的効果を得ることを指す。この効果は、疾患の完全もしくは部分的予防という点では予防的であり、及び／または疾患及び／または疾患から生じる有害作用の部分的もしくは完全な治癒という点では治療的である。本明細書で使用される「治療」という用語は、対象（例えば、哺乳動物、例えば、ヒト）における疾患の任意の治療を包含する。治療はまた、疾患の発生を防止すること、疾患の進行を阻害すること、または疾患を低減すること（すなわち、疾患の退行を引き起こすこと）を含む、疾患の影響を受けやすいが、まだそれに罹患していると診断されていない対象への本明細書に提供される操作された細胞の投与を指し得る。更に、治療は、対象（例えば、患者）における望ましくない臨床症状を安定化または低減し得る。本明細書に提供されるその細胞集団、またはその組成物は、疾患または傷害の発生前、発生中、または発生後に投与され得る。
【０３０８】
ある特定の実施形態において、対象は、細胞療法によって治療及び／または改善され得る疾患、状態、及び／または傷害を有する。いくつかの実施形態において、細胞療法を必要とする対象は、傷害、疾患、または状態を有する対象であり、それによって細胞療法（例えば、細胞物質が対象に投与される療法）を引き起こす。しかしながら、傷害、疾患または状態に関連する少なくとも１つの症状の重症度を治療、改善、及び／または低減することが可能であることが企図される。ある特定の実施形態において、細胞療法を必要とする対象には、骨髄移植または幹細胞移植の候補、化学療法または放射線療法を受けた対象、過剰増殖性疾患またはがん（例えば、造血系）、過剰増殖性疾患またはがんを有するか、または発症するリスクがある対象、腫瘍（例えば、固形腫瘍）、ウイルス感染症またはウイルスを有するか、または発症するリスクがある対象が含まれるが、これらに限定されない。また、感染症に関連する疾患に罹患しているか、またはそれに罹患するリスクのある対象を包含することが意図される。
【０３０９】
いくつかの実施形態において、本開示は、使用説明書とともに、本開示の組成物を提供する。使用説明書は、添付文書としてキットに存在し得るか、キットもしくはその構成要素の容器のラベルに存在し得るか、またはデジタル形式であり得る（例えば、ＣＤ－ＲＯＭ上で、インターネット上のリンクを介して）。キットは、ゲノムターゲティング核酸、ゲノムターゲティング核酸をコードするポリヌクレオチド、部位特異的ポリペプチド、及び／または部位特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのうちの１つ以上を含み得る。キット内の追加の成分、例えば、緩衝液（再構築緩衝液、安定化緩衝液、希釈緩衝液など）、及び／または１つ以上の制御ベクターも企図される。
【０３１０】
薬学的組成物

本明細書に提供される操作された組換え細胞は、薬学的組成物の一部として投与することができる。これらの組成物は、組換え細胞のうちの１つ以上に加えて、薬学的に許容される賦形剤、担体、緩衝液、安定剤、または当業者に周知の他の材料を含むことができる。そのような材料は無毒であるべきであり、有効成分の有効性を干渉するべきではない。担体または他の材料の正確な性質は、投与経路、例えば、経口、静脈内、皮膚または皮下、鼻、筋肉内、腹腔内経路に依存し得る。薬学的組成物は、１つ以上の薬学的賦形剤を含み得る。任意の好適な薬学的賦形剤が使用されてもよく、当業者は、好適な薬学的賦形剤を選択することができる。したがって、以下に提供される薬学的賦形剤は、例示であり、限定するものではないことが意図される。追加の薬学的賦形剤には、例えば、Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｅｘｃｉｐｉｅｎｔｓ，Ｒｏｗｅ ｅｔ ａｌ．（Ｅｄｓ．）６ｔｈ Ｅｄ．（２００９）（参照によりその全体が組み込まれる）に記載されるものが含まれる。

【０３１１】

追加の治療剤を投与する様々な様式が、本明細書で企図される。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、任意の好適な投与様式によって投与される。一般に、投与様式としては、限定されないが、硝子体内、網膜下、脈絡膜上、動脈内、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、鼻、非経口、局所、肺、及び皮下経路が挙げられる。

【０３１２】

経口投与のための薬学的組成物は、錠剤、カプセル、粉末または液体形態であり得る。錠剤は、ゼラチンまたはアジュバントなどの固体担体を含むことができる。液体薬学的組成物は、一般に、水、石油、動物油もしくは植物油、鉱油または合成油などの液体担体を含む。生理食塩水、デキストロースまたは他の糖溶液、またはエチレングリコール、プロピレングリコール、もしくはポリエチレングリコールなどのグリコールを含めることができる。

【０３１３】

静脈内、皮膚もしくは皮下注射、または苦痛の部位での注射の場合、有効成分は、パイロジェンフリーであり、好適なｐＨ、等張性及び安定性を有する非経口的に許容される水溶液の形態である。当業者は、例えば、塩化ナトリウム注射液、リンガー注射液、乳酸リンガー注射液などの等張ビヒクルを使用して、好適な溶液を十分に調製することができる。必要に応じて、防腐剤、安定剤、緩衝剤、酸化防止剤及び／または他の添加剤を含むことができる。

【０３１４】

それがポリペプチド、細胞、もしくは核酸であるか、または個体に与えられる本開示による他の薬学的に有用な化合物であるかにかかわらず、投与は、好ましくは、「治療有効量」または「予防有効量」（場合によっては、予防は治療法とみなすことができるが）であり、これは、個体に対する利益を示すのに十分である。投与される実際の量、及び投与の速度及び時間経過は、治療されるタンパク質凝集疾患の性質及び重症度に依存することになる。治療の処方、例えば、投与量等の決定は、一般開業医及び他の医師の責任の範囲内であり、典型的には、治療される障害、個々の患者の状態、送達部位、投与方法、及び開業医に知られている他の要因を考慮に入れている。上記の技法及びプロトコルの例は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１６ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｏｓｏｌ，Ａ．（ｅｄ），１９８０に見出すことができる。

【０３１５】

組成物は、単独で、または他の治療と組み合わせて、治療される状態に応じて同時にまたは順次に投与することができる。

【実施例】

【０３１６】

以下は、本開示を実行するための特定の実施形態の例である。実施例は、例示的な目的のためにのみ提供され、いかなる方法でも本開示の範囲を限定することを意図するものではない。使用される数値（例えば、量、温度等）に関して精度を保証するように努力がな

されてはいるが、当然のことながら、いくらかの実験誤差及び偏差が許容されるべきである。

【０３１７】

本開示の実践には、別段の指示がない限り、当該技術分野の技能の範囲内で、タンパク質化学、生化学、組換えＤＮＡ技法及び薬理学の従来の方法が用いられる。そのような技法は、文献で十分に説明されている。例えば、Ｔ．Ｅ．Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ（Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ，１９９３）、Ａ．Ｌ．Ｌｅｈｎｉｎｇｅｒ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（Ｗｏｒｔｈ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｉｎｃ．，ｃｕｒｒｅｎｔ ａｄｄｉｔｉｏｎ）、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，１９８９）、Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（Ｓ．Ｃｏｌｏｗｉｃｋ ａｎｄ Ｎ．Ｋａｐｌａｎ ｅｄｓ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．）、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１８ｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ（Ｅａｓｔｏｎ，Ｐｅｎｎｓｙｌｖａｎｉａ：Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，１９９０）、Ｃａｒｅｙ ａｎｄ Ｓｕｎｄｂｅｒｇ Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３ｒｄ Ｅｄ．（Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ）Ｖｏｌｓ Ａ ａｎｄ Ｂ（１９９２）を参照されたい。

【０３１８】

実施例１：大きなＤＮＡ挿入物による免疫細胞の非ウイルス編集

遺伝子回路またはシステムのウイルス送達は、ｉ）発現カセットのサイズ制限、ｉｉ）ウイルスベクター生物学との矛盾による導入遺伝子レイアウト制限、及びｉｉｉ）ランダム組込み部位における導入遺伝子の不良かつ予測不可能な性能のために困難である。以下の実施例は、予測可能な高性能を有する、利用可能なウイルスベクターでは不可能であろう大きなカセットの、定義された挿入部位への送達を示す。

【０３１９】

コンストラクト生成

ノックインのためのプラスミドコンストラクトを生成するために、合成ＤＮＡをＴｗｉｓｔ、ＩＤＴ及びＧＥＮＥＷＩＺから注文し、Ｇｉｂｓｏｎ Ａｓｓｅｍｂｌｙ及びＧｏｌｄｅｎ Ｇａｔｅ Ａｓｓｅｍｂｌｙを介して組み立てた。プラスミドは、１．２ｋｂの長さのゲノム中のＣＲＩＳＰＲ標的部位に隣接する配列に相同な相同性アームを含有した。

【０３２０】

Ｔ細胞操作

Ｔ細胞を、正常ドナーのＬｅｕｋｏｐａｋ（ＳＴＥＭＣＥＬＬ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）から得た末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）から、Ｌｙｍｐｈｏｐｒｅｐ（ＳＴＥＭＣＥＬＬ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）及びＥａｓｙＳｅｐヒトＴ細胞単離キット（ＳＴＥＭＣＥＬＬ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して濃縮した。続いて、Ｔ細胞を、３％ヒトＡＢ血清（Ｇｅｍｉｎｉ Ｂｉｏ）及び１２．５ｎｇ／ｍｌのヒトＩＬ－７及びＩＬ－１５（Ｍｉｌｔｅｎｙｉプレミアムグレード）を補充したＴｅｘＭＡＣＳ培地（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ １３０－１９７－１９６）中で、ＣＤ３／ＣＤ２８ダイナビーズ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、４０２０３Ｄ）で１：１のビーズ対細胞比で活性化し、３７℃、５％ＣＯ２で４８時間培養した後、エレクトロポレーションを行った。

【０３２１】

ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＰは、５：１：３：６の体積比で、ＤＮＡ配列ＧＴＣＡＧＧＧＴＴＣＴＧＧＡＴＡＴＣＴＧ（ＴＲＡＣ、配列番号７９）を標的とする１２０μＭのｓｇＲＮＡ（Ｓｙｎｔｈｅｇｏ）、６２．５μＭのｓＮＬＳ－ＳｐＣａｓ９－ｓＮＬＳ（Ａｌｄｅｖｒｏｎ）及びＰ３緩衝液（Ｌｏｎｚａ）を組み合わせることによって調製し、室温で１５分間インキュベートした。用量滴定実験によって決定された最適量のプラスミドＤＮＡ（０．５～３マイクログラムの範囲）を、３．５μｌのＲＮＰと混合した。Ｔ細胞をカウ

ントし、ビーズ除去し、９０×Ｇで１０分間遠心分離し、サプリメントを添加して１０＾６細胞／１４．５μｌのＰ３で再懸濁した（Ｌｏｎｚａ）。１４．５μｌのＴ細胞懸濁液をＤＮＡ／ＲＮＰ混合物に添加し、Ｌｏｎｚａ　１６ウェルキュベットストリップに移し、コードＥＨ－１１５のＬｏｎｚａ　４Ｄ　Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒシステムでパルス処理した。細胞を室温で１５分間休ませた後、１２．５ｎｇ／ｍｌのヒトＩＬ－７及びＩＬ－１５（Ｍｉｌｔｅｎｙｉプレミアムグレード）を補充したＴｅｘＭＡＣＳ培地中の９６ウェルプレート（Ｓａｒｓｔｅｄｔ）に移した。

【０３２２】

導入遺伝子発現を、抗Ｍｙｃ抗体（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙクローン９Ｂ１１）及び抗Ｆｌａｇ抗体（ＲｎＤ系、クローン１０４２Ｅ）で染色することによって検出し、Ａｔｔｕｎｅ　ＮｘＴフローサイトメーター上で分析した。使用した他の抗体は、ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ　Ｆｉｘａｂｌｅ　Ｎｅａｒ－ＩＲ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）、ＴＣＲアルファ／ベータ抗体（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄクローンＩＰ２６）、ＣＤ４抗体（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄクローンＲＰＡ－Ｔ４）、ＣＤ８抗体（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄクローンＳＫ１）であった。

【０３２３】

プライミング受容体誘導

導入遺伝子（すなわち、合成回路）の機能的活性を評価するために、編集されたＴ細胞を、プライミング抗原を発現する標的細胞株と１：１のＥ：Ｔ比で共培養し、２４時間インキュベートした。Ｔ細胞を採取し、抗Ｍｙｃ抗体及び抗Ｆｌａｇ抗体で染色して、プライム受容体及びＣＡＲ発現についてそれぞれ評価した。

【０３２４】

図３は、図１に示されるように調整された導入遺伝子カセット及び非ウイルス遺伝子編集技術を使用して、Ｔ細胞のＴＲＡＣ遺伝子座に導入される合成回路の忠実度を示すために使用される実験プロトコルの概要を提供する。Ｔ細胞は、ＣＡＲと共発現されるＦＬＡＧタグ、及びプライミング受容体（ｐｒｉｍｅＲ）と共発現されるｍｙｃタグを含む。ＴＲＡＣ遺伝子座に導入遺伝子挿入物を発現する操作された免疫細胞を調製し、最初にプライミング受容体を発現した。次いで、操作された免疫細胞を、１：１のＥ：Ｔ比でプライミング抗原を発現するＫ５６２標的細胞で２４時間インキュベートした。これらの標的細胞は、プライミング受容体に対する同種リガンドを発現する。Ｔ細胞を採取し、抗Ｍｙｃ抗体及び抗Ｆｌａｇ抗体で染色して、プライミング受容体及びＣＡＲ発現をそれぞれ評価した。編集されたＴ細胞上のＣＡＲ誘導は、プライミング抗原のみの存在下で予想される。したがって、標的細胞との十分なインキュベーションの後、操作された免疫細胞は、ＣＡＲを発現する。

【０３２５】

図４は実験結果を提供する。分析は、Ａｔｔｕｎｅ　ＮｘＴフローサイトメーター上で読み出した。示されるように、Ｔ細胞を単独で、またはプライミング受容体リガンドの非存在下で標的細胞Ｋ５６２とともにインキュベートしたとき、ＣＡＲ発現は非常に少なかったが、プライミング受容体発現は高レベルであった。これは、プライミング受容体が意図したとおりに特異的に発現され、活性化されることを示す。また、プライミング受容体リガンドの非存在下で、ＣＡＲを発現する細胞は非常に少ないことも示す。したがって、回路受容体は漏出性でない。Ｔ細胞を、プライミング受容体同種タンパク質（Ｋ５６２$^{ALPG}$）を有する標的細胞とともにインキュベートしたとき、多くのＴ細胞がＣＡＲの発現を示す。これは、プライミング受容体の活性化がＣＡＲの発現を誘導することを示す。また、転写因子も放出するガンマセクレターゼによる切断に起因するプライミング受容体の発現の対応する減少もある。したがって、ＣＡＲ誘導は、プライミング抗原の存在下でのみ観察され、プライミング受容体発現の喪失と相関した。得られた結果は、ＣＲＩＳＰＲ技術を使用した導入遺伝子の送達後に、回路の忠実度が維持されることを示す。

【０３２６】

図５は、図１に示されるように調整された導入遺伝子カセット及び非ウイルス遺伝子編

集技術を使用して、Ｔ細胞に導入される合成回路の忠実度を示すために使用される実験プロトコルの概要を提供する。Ｔ細胞は、ＣＡＲと共発現されるＦＬＡＧタグ、及びプライミング受容体（ｐｒｉｍｅＲ）と共発現されるｍｙｃタグを含む。操作された免疫細胞を調製し、最初にプライミング受容体を発現させた。次いで、操作された免疫細胞を、１：１のＥ：Ｔ比でプライミング抗原を発現する標的細胞で２４時間インキュベートした。これらの標的細胞は、プライミング受容体に対する同種リガンドを発現する。Ｔ細胞を採取し、抗Ｍｙｃ抗体及び抗Ｆｌａｇ抗体で染色して、プライミング受容体及びＣＡＲ発現をそれぞれ評価した。編集されたＴ細胞上のＣＡＲ誘導は、プライミング抗原のみの存在下で予想される。したがって、標的細胞との十分なインキュベーションの後、操作された免疫細胞は、ＣＡＲを発現する。

【０３２７】

図６は、プライミング受容体活性化の非存在下でＣＡＲを発現するＴ細胞の非常に小さい割合を示す、２人のドナーからの更なる定量的データを示す。ＣＲＩＳＰＲ技術を使用して、２人の健康なドナーに由来するＴ細胞に合成回路を送達した。編集されたＴ細胞を、１：１のＥ：Ｔ比で同種プライミングを発現するＫ５６２細胞株、陰性対照Ｋ５６２親細胞株、または陽性対照としてのＭｙｃビーズとともに共培養し、２４時間インキュベートした。Ｔ細胞を採取し、抗Ｍｙｃ抗体及び抗Ｆｌａｇ抗体で染色して、プライム受容体及びＣＡＲ発現についてそれぞれ評価した。分析は、Ａｔｔｕｎｅ　ＮｘＴフローサイトメーター上で読み出した。プライミング受容体陽性Ｔ細胞の３０％以上が、標的同族抗原またはｍｙｃビーズ対照の存在下でＣＡＲを発現した。最小限のＣＡＲ発現は、基底レベルで、またはＫ５６２親細胞株で培養したときに観察された。総合すると、結果は、ＴＲＡＣ遺伝子座への合成回路のノックインがその機能を損なわないことを実証する。これはまた、ＣＡＲをコードするＤＮＡカセットが漏出性でないことを示す。

【０３２８】

実施例２：非ウイルス挿入後の大回路発現及び機能の評価

ＧＳ９４は、染色体１１の遠位ｑアーム上に位置する候補組込み部位である。ＥＴＳ１及びＦＬＩ１（図７）のプロモーターから１８０～３５０ｋｂ以内であるが、組込みベクター遺伝子療法のリスクは低いと考えられる。ＧＳ９４遺伝子の回路発現及び機能電位を評価した。

【０３２９】

コンストラクト生成

ノックインのためのプラスミドコンストラクトを生成するために、合成ＤＮＡをＴｗｉｓｔ、ＩＤＴ及びＧＥＮＥＷＩＺから注文し、Ｇｉｂｓｏｎ　Ａｓｓｅｍｂｌｙ及びＧｏｌｄｅｎ　Ｇａｔｅ　Ａｓｓｅｍｂｌｙを介して組み立てた。プラスミドは、１．２ｋｂまたは４５０ｂｐの長さのゲノム中のＣＲＩＳＰＲ標的部位に隣接する配列に相同な相同性アームを含有した。回路カセットは、４５５８ｂｐの長さであった。カセットの図を図１９Ａに示す。

【０３３０】

Ｔ細胞は、ＧＳ７９（ＴＲＡＣ）組込み部位、ＧＳ９４組込み部位、及びＧＳ１０２組込み部位でＰｒｉｍｅＲと回路カセット組込みを行った。挿入のためのｓｇＲＮＡ配列を表１に示す。細胞をＫ５６２細胞と４８時間共培養し、次いで、ＰｒｉｍｅＲ誘導ＣＡＲ　ＭＦＩをＰｒｉｍｅＲ　ＭＦＩと比較した。

【０３３１】

ＣＤ３－ＣＤ２８　Ｄｙｎａｂｅａｄ活性化Ｔ細胞を、ＧＳ９４を標的とするｓｇＲＮＡ／Ｃａｓ９　ＲＮＰ、ならびに示された部位へのＨＤＲ媒介性組込みを指示する相同性アームを有するＨＤＲＴでエレクトロポレーションした。Ｔ細胞を、エレクトロポレーション後７日目に、ｐｒｉｍｅＲ標的を発現するＫ５６２細胞（Ｋ５６２単一発現細胞）と共培養した。次いで、細胞を、共培養の開始の４８時間後に抗ＦＬＡＧ抗体で染色し、Ａｔｔｕｎｅ　ＮｘＴフローサイトメーター上で分析した。結果は、ＧＳ９４が、Ｋ５６２細胞との４８時間の共培養後に、高いｐｒｉｍｅＲ発現を伴う優れたＣＡＲ誘導をもたら

すことを明らかにした。図８Ａを参照されたい。ＧＳ９４は、他のいくつかの候補の組込み部位ならびにＴＲＡＣ組込み部位における発現よりもおよそ２倍高い、プライム抗原依存性ＣＡＲ発現をもたらした。追加として、平均して、ＴＲＡＣ組込み部位を使用した場合、プライム受容体表面発現レベルは、発現レベルの５０％以上であった。

【０３３２】

細胞毒性及びサイトカイン分泌

細胞毒性及びサイトカイン分泌に対する候補組込み部位の効果を評価するために、ＧＳ７９（ＴＲＡＣ）組込み部位及びＧＳ９４組込み部位でＰｒｉｍｅＲと回路カセット組込みを行ったＴ細胞を、ｐｒｉｍｅＲ標的（Ｋ５６２単一発現細胞）を発現するＫ５６２細胞と４８時間共培養した。細胞を１：１のエフェクター：標的細胞比（１：１のＥ：Ｔ）で処理した。簡潔に述べると、上記のように生成されたＴ細胞を、エレクトロポレーション後７日目にｐｒｉｍｅＲ標的及びＣＡＲ標的（Ｋ５６２二重発現細胞）を二重発現するＫ５６２細胞と共培養した。共培養の開始から４８時間後、上清を収集し、Ｌｕｍｉｎｅｘを介してサイトカインレベルについて分析した。サイトカイン尺度は、ＩＬ－２、ＩＮＦｇ、及びＴＮＦであった。細胞毒性を、４８時間後に残りの標的細胞のルシフェラーゼ活性を測定することによって分析した。図８Ｂの各データポイントは、２つの複製を表し、線は、複製に対する細胞毒性の範囲を表す。図８Ｂに示すように、ＧＳ９４組込み部位は、Ｋ５６２二重発現細胞との４８時間の共培養後に、優れた細胞毒性能力及びサイトカイン分泌をもたらした。

【０３３３】

プライム非依存的細胞毒性

細胞毒性に対する候補組込み部位の効果をプライム非依存的細胞毒性と比較するために、ＧＳ７９（ＴＲＡＣ）組込み部位及びＧＳ９４組込み部位でＰｒｉｍｅＲと回路カセット組込みを行ったＴ細胞を、エレクトロポレーション後７日目にＫ５６２二重発現細胞（「Ｋ５６２　ｐｒｉｍｅＲ／ＣＡＲ」）またはＣＡＲ標的のみを発現するＫ５６２細胞（Ｋ５６２　ＣＡＲ）と４８時間共培養した。０．３、１．０、及び３．０　Ｅ：Ｔ細胞比を試験した。図９Ａ及び図９Ｂを参照されたい。共培養の開始後４８時間に、残りの標的細胞のルシフェラーゼ活性を測定することによって細胞毒性を分析した。図９Ｂに示すように、ＧＳ９４組込み部位は、ＴＲＡＣ組込み部位と同等の細胞毒性能をもたらし、プライム非依存的細胞毒性はなかった。

【０３３４】

プライム非依存的サイトカイン分泌

細胞毒性に対する候補組込み部位の効果をプライム非依存的細胞毒性と比較するために、上記のように生成されたＧＳ７９（ＴＲＡＣ）組込み部位及びＧＳ９４組込み部位でＰｒｉｍｅＲと回路カセット組込みを行ったＴ細胞を、Ｋ５６２二重発現細胞と共培養した。標的細胞のみを有する群（Ｅ：Ｔ＝０、標的のみ）を、Ｅ：Ｔ細胞比が１の群と比較した。Ｋ５６２二重発現細胞との４８時間共培養後、上清を収集し、Ｌｕｍｉｎｅｘを介してサイトカインレベルについて分析して、ＩＬ－２、ＩＮＦｇ及びＴＮＦサイトカインの分泌を測定した。図１０Ａ及び図１０Ｂを参照されたい。図１０Ｂに示すように、ＧＳ９４組込み部位は、ＴＲＡＣ組込み部位への同等のサイトカイン分泌をもたらし、ＩＬ－２、ＩＮＦｇまたはＴＮＦのプライム非依存的分泌はなかった。

【０３３５】

プライム非依存的ＣＡＲ発現

プライム非依存的ＣＡＲ発現に対する候補組込み部位の効果を評価するために、ＧＳ７９（ＴＲＡＣ）組込み部位、及びＧＳ９４組込み部位、及びＧＳ１０２組込み部位でＰｒｉｍｅＲと回路カセット組込みを行ったＴ細胞を、インビトロで３２日間培養した。実験の５、１２、１９及び２８日目に、細胞を反復的なＣＤ３／ＣＤ２８刺激で処理した。１６日目に、フローサイトメトリーアッセイを使用して、ＣＡＲ発現について細胞を評価した。図１１に示されるように、ＴＣＲによるＴ細胞活性化は、候補の組込み部位における回路カセット組込みからのｐｒｉｍｅＲ非依存的ＣＡＲ発現をもたらさなかった。

【０３３６】
上記のように生成したＴ細胞を９６ウェルプレート中で培養し、Ｔ細胞増殖培地を２日毎に交換した。５日目、１２日目、１９日目及び２８日目に、Ｔ細胞を１：１のＣＤ３／ＣＤ２８　Ｄｙｎａｂｅａｄｓで刺激した。細胞を、ｍｙｃエピトープタグ染色によるＰｒｉｍｅＲ発現、及び示される時点でのＦＬＡＧエピトープタグ染色によるＣＡＲ発現について分析した。フロー分析をＡｔｔｕｎｅ　ＮｘＴフローサイトメーター上で行った。
【０３３７】
実施例３：数週間にわたる大きな挿入物からのプライム受容体発現の安定性を評価する
ＰｒｉｍｅＲの安定した（持続的な）発現に対する候補組込み部位の効果を評価するために、図１２Ａに示される組込み部位でＰｒｉｍｅＲと回路カセット組込みを行ったＴ細胞を、インビトロで３２日間培養した。簡潔に述べると、上記のように生成したＴ細胞を９６ウェルプレート中で培養し、Ｔ細胞増殖培地を２日毎に交換した。５日目、１２日目、１９日目及び２８日目に、Ｔ細胞を１：１のＣＤ３／ＣＤ２８　Ｄｙｎａｂｅａｄｓ反復刺激で刺激した。フローサイトメトリーアッセイを、１６日目及び３２日目に、Ａｔｔｕｎｅ　ＮｘＴフローサイトメーターを使用して行った。細胞を、ｍｙｃエピトープタグ染色によってＰｒｉｍｅＲ発現について分析した。図１２Ａ及び１２Ｂに示されるように、ＧＳ９４組込み部位は、少なくとも４週間にわたって安定したＰｒｉｍｅＲ発現をもたらした。
【０３３８】
実施例４：非ウイルス挿入を使用したオンターゲット編集効率の評価
候補ノックイン部位のオンターゲット編集効率を評価するために、ｉＧＵＩＤＥ－Ｓｅｑアッセイを使用した。ｉＧＵＩＤＥ－Ｓｅｑアッセイを実施するために使用される方法は、図１３Ａに例示され、Ｎｏｂｌｅｓ　ｅｔ　ａｌ．Ｇｅｎｏｍｅ　Ｂｉｏｌｏｇｙ（２０１９）（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に提供される。図１３Ｂに示すように、ＧＳ９４組込み部位は、評価された候補組込み部位の中で最も高いオンターゲット編集効率を有していた。図１３Ｃに示すように、ＧＳ９４は、２人のドナーで観察されたと推定されるオフターゲット編集をもたらさなかった。
【０３３９】
実施例５：大きな挿入物による様々なＧＳＨ非ウイルスノックインの評価
方法
上昇予測：（ｇｓ９４）からの潜在的なオフターゲット部位の計算予測は、Ｅｌｅｖａｔｉｏｎ－ｓｅａｒｃｈ（Ｌｉｓｔｇａｒｔｅｎ　ｅｔ　ａｌ．２０１８．Ｐｒｅｄｉｃｔｉｏｎ　ｏｆ　ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ　ａｃｔｉｖｉｔｉｅｓ　ｆｏｒ　ｔｈｅ　ｅｎｄ－ｔｏ－ｅｎｄ　ｄｅｓｉｇｎ　ｏｆ　ＣＲＩＳＰＲ　ｇｕｉｄｅ　ＲＮＡｓ．Ｎａｔ　Ｂｉｏｍｅｄ　Ｅｎｇｒ　２，３７－４８、ｈｔｔｐｓ：／／ｇｉｔｈｕｂ．ｃｏｍ／Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ／Ｅｌｅｖａｔｉｏｎから得られるソフトウェア）を使用して実行した。Ｅｌｅｖａｔｉｏｎ－ｓｅａｒｃｈによって同定された全ての部位を、ｒｈＡｍｐ－ｓｅｑを使用して分析した。
【０３４０】
ｒｈＡｍｐＳｅｑ：ｉＧＵＩＤＥまたは上昇予測アルゴリズムによって同定されたＧＳ９４の４９の候補オフターゲット部位及びＧＳ９４標的部位を、ｒｈＡｍｐＳｅｑ（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．）によって特徴付けた。この標的化増幅により、多数の部位で同時に発生する編集のＮＧＳベースの定量化が可能になる。以下の７つのガイド：ＧＳ８４、ＧＳ９４、ＧＳ９５、ＧＳ９６、ＧＳ１０２、ＧＳ１０８、及びＧＳ１３８（表１）の各々で単独で治療した少なくとも２人のドナーからのＴ細胞からのゲノムＤＮＡを、ＧｅｎＦｉｎｄ　Ｖ３　ＤＮＡ精製システム（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）で単離した。２つの別個のｒｈＡｍｐＳｅｑ増幅プールを使用して、５０遺伝子座をカバーし、この手順を、各試料についてＩｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによって推奨されるように実施した。ｒｈＡｍｐＳｅｑライブラリーを、中間出力キット（３００サイクル）（Ｉｌｌｕｍｉｎａ）を有するＭ

ｉｎｉＳｅｑ上で配列決定した。ＣＲＩＳＰＲｅｓｓｏ２アルゴリズム（ｈｔｔｐｓ：／／ｇｉｔｈｕｂ．ｃｏｍ／ｐｉｎｅｌｌｏｌａｂ／ＣＲＩＳＰＲｅｓｓｏ２）を使用して、増幅された遺伝子座の各々における挿入及び欠失の割合を決定した。カイ二乗検定を使用した統計的有意性（ＦＤＲ調整したｐ値≦０．００１）は、ＧＳ９４部位でのみ観察された。

【０３４１】

ＲＮＡ－ｓｅｑ：転写レベルでのＧＳ９４組込みによって誘導される変化を評価するために、ｐｒｉｍｅＲ／ＣＡＲ回路をＧＳ７９（ＴＲＡＣ）、ＧＳ９４、及びＧＳ１０２組込み部位に組み込んだ。組込み後６日目に、導入遺伝子発現に基づいてＢＤ　ＦＡＣＳＡｒｉａを使用して１ｅ６編集細胞を選別した。ＲＮＡを、ＲＮｅａｓｙキット（Ｑｉａｇｅｎ）を用いて選別したＴ細胞から単離した。精製したＲＮＡを、ＴｒｕＳｅｑ　ＲＮＡライブラリー調製キットｖ２（Ｉｌｌｕｍｉｎａ）を使用してＮＧＳライブラリーに変換した。ライブラリーを、ＮｏｖａＳｅｑ　６０００またはＮｅｘｔＳｅｑ　５５０機器（Ｉｌｌｕｍｉｎａ）のいずれかで配列決定した。ＳＴＡＲ　２．７．３ａアライナー（Ｄｏｂｉｎ　Ａ．ｅｔ　ａｌ．Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ．２０１３．２９：１５－２１）を使用して、参照ヒトＧＲＣｈ３８トランスクリプトームに対するＲＮＡ－ｓｅｑデータを整列させ、遺伝子レベルの読取りカウントを得た。ｅｄｇｅＲ（ＲｏｂｉｎｓｏｎＭＤ　ｅｔ　ａｌ．Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ．２０１０．２６：１３９－１４０）を使用して、両方のドナーにわたるデータを組み合わせて差次的発現を計算した。ＧＳ９４部位の３００Ｋｂ内の唯一の遺伝子、ＥＴＳ１及びＦＬＩ１は、他の２つの遺伝子座のうちのいずれかでの組込みを有する細胞と比較して、ＧＳ９４組込み部位での組込みを有する細胞において差次的に発現されなかった。０．０１のＦＤＲ調整したｐ値カットオフでは、差次的に発現した遺伝子の数は最小限であった（ゲノム全体で１００遺伝子未満）。

【０３４２】

サイトカイン非依存的増殖アッセイ：ＧＳ９４遺伝子座ＫＩを有する初代Ｔ細胞の安全性を評価するために、サイトカイン非依存的増殖アッセイを実施して、発がん性形質転換の可能性を評価した。簡潔に述べると、ＧＳ９４遺伝子座でｐｒｉｍｅＲ／ＣＡＲ回路カセット組込みを受けた初代ヒトＴ細胞を解凍し、一晩回復させた。次いで、$1\times10^{6}$細胞を２４ウェル－ＧＲｅｘプレートの１つのウェルに播種し、サイトカインの有無にかかわらず培地中で５日間培養した。細胞数及び生存率を０日目、３日目及び５日目に記録した。陽性対照として、$1\times10^{6}$Ｊｕｒｋａｔ細胞を、サイトカインを含まない培地中で並行して培養した。図１７に示すように、ＧＳ９４　ＫＩ　Ｔ細胞は、サイトカインで培養したときに良好な生存率及び総細胞カウントを維持したが、ＧＳ９４　ＫＩ　Ｔ細胞の生存率は、サイトカインなしで培養したときに５日間にわたって劇的に減少し、５日目に生存細胞が残っていなかった。陽性対照Ｊｕｒｋａｔ細胞は、アッセイを通して、サイトカインなしで良好な生存率及び拡大増殖を維持した。総合すると、このデータは、ＧＳ９４編集された初代ヒトＴ細胞が依然として成長、生存及び拡大増殖のために外因性サイトカインに依存していることを示し、したがって、細胞形質転換の懸念はない。

【０３４３】

結果

ＧＳ９４を含む候補遺伝子座を標的とするＣＲＩＳＰＲ試薬（例えば、ｓｇＲＮＡと複合体化したＳｐＣａｓ９）の特異性を、ｉＧＵＩＤＥ－ｓｅｑによって評価した（図１４）。ＧＳ９４ターゲティングＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＰは、評価された全ての候補のｉＧＵＩＤＥ－ｓｅｑオリゴカセットトラッピングイベントの最も高い割合を示し、ｉＧＵＩＤＥ－ｓｅｑ論文からの対照ｓｇＲＮＡ配列は、元の刊行物で報告されたものと同様の特異性を示し、アッセイが予想どおりに実施されたことを示唆した。

【０３４４】

推定オフターゲット部位は、ｉＧＵＩＤＥ－ｓｅｑ出力から得られ、これは既に推定部位が偽であることを示唆した。追加の標的部位を計算アプローチ（Ｅｌｅｖａｔｉｏｎソ

フトウェアパッケージ）によって予測した。ｒｈＡｍｐ－ｓｅｑを使用して、推定オフターゲット部位の各々についてハイスループット配列決定ライブラリーを調製し、この方法を、候補標的部位を標的とするＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＰでエレクトロポレーションしたＴ細胞からのＤＮＡ試料に適用した。得られたＮＧＳデータをＣＲＩＳＰＲｅｓｓｏ２ソフトウェアで処理し、現場で一般的であるように、挿入及び欠失（インデル）の頻度をＣＲＩＳＰＲ切断活性の指標とした。ＧＳ９４ターゲティングＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＰでエレクトロポレーションしたＴ細胞は、他の部位を標的とするＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＰで処理したＴ細胞よりも、推定オフターゲット部位のセットにおけるインデルの頻度が高くないことを示し、これは結果的または検出可能なオフターゲット活性を有しないＧＳ９４ターゲティングＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＰと一致し、したがって評価されたセットのうち最も特異的である（図１５）。

【０３４５】

Ｔ細胞トランスクリプトームの調節に対するＧＳ９４部位における導入遺伝子組込みの潜在的な効果は、大きなカセットを部位にノックインし、Ｔ細胞を数日間増殖させ、カセット内で導入遺伝子を発現する細胞を選別し、次いで細胞からＲＮＡを収集することによって評価された。ＲＮＡ－ｓｅｑライブラリーを調製し、配列決定し、得られたＩｌｌｕｍｉｎａ配列決定データの分析により、ＴＲＡＣまたはＧＳ１０２部位での組込みを有する細胞と比較して、ＧＳ９４での組込みを有する細胞における、ＧＳ９４部位の３００ｋｂ以内の任意の遺伝子の発現において、生物学的または統計学的に有意な差は示されなかった（図１６）。更に、統計的有意性に達した他の遺伝子発現の違いは、数及び効果サイズにおいて最小限であり、比較におけるノイズであるものと一致していた。

【０３４６】

ＧＳ９４での導入遺伝子組込みが形質転換された表現型を付与することができるかどうかを評価するために、ＧＳ９４部位での組込みを有する細胞を、サイトカインとともに、またはサイトカインなしでインビトロで培養した。細胞は、サイトカイン付加により生存し、生存可能のままであったが、サイトカイン補給なしで死亡し、生存可能性を失った（図１７）。陽性対照のＪｕｒｋａｔ細胞は、依然として生存し、増殖した。全体として、これは、ＧＳ９４における導入遺伝子の組込みが、Ｔ細胞形質転換の特徴であるサイトカイン非依存的増殖のための能力を付与しないことを示す。

【０３４７】

実施例６：ＧＳ９４における大きな８．３ｋｂ発現カセットの非ウイルス挿入の評価

次に、実施例１で前述したような材料／方法を使用して、Ｔ細胞のＧＳ９４セーフハーバー遺伝子座に８．３ｋｂの挿入物を挿入した。挿入物の長さの増加は、カセット内の追加のタンパク質コード配列によるものであった。カセットの図を図１９Ｂに提供する。

【０３４８】

コンストラクト生成

ノックインのためのプラスミドコンストラクトを生成するために、合成ＤＮＡをＴｗｉｓｔ、ＩＤＴ及びＧＥＮＥＷＩＺから注文し、Ｇｉｂｓｏｎ　Ａｓｓｅｍｂｌｙ及びＧｏｌｄｅｎ　Ｇａｔｅ　Ａｓｓｅｍｂｌｙを介して組み立てた。プラスミドは、１．２ｋｂまたは４５０ｂｐの長さのゲノム中のＣＲＩＳＰＲ標的部位に隣接する配列に相同な相同性アームを含有した。

【０３４９】

Ｔ細胞操作

Ｔ細胞を、正常ドナーのＬｅｕｋｏｐａｋ（ＳＴＥＭＣＥＬＬ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）から得た末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）から、Ｌｙｍｐｈｏｐｒｅｐ（ＳＴＥＭＣＥＬＬ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）及びＥａｓｙＳｅｐヒトＴ細胞単離キット（ＳＴＥＭＣＥＬＬ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して濃縮した。続いて、Ｔ細胞を、３％ヒトＡＢ血清（Ｇｅｍｉｎｉ　Ｂｉｏ）及び１２．５ｎｇ／ｍｌのヒトＩＬ－７及びＩＬ－１５（Ｍｉｌｔｅｎｙｉプレミアムグレード）を補充したＴｅｘＭＡＣＳ培地（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　１３０－１９７－１９６）中で、ＣＤ３／ＣＤ２８ダイナビーズ（Ｔｈｅｒｍ

ｏＦｉｓｈｅｒ、４０２０３Ｄ）で１：１のビーズ対細胞比で活性化し、３７℃、５％ＣＯ２で４８時間培養した後、エレクトロポレーションを行った。

【０３５０】

ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＰは、５：１：３：６の体積比で、１２０μＭの、ＤＮＡ配列ＧＡＧＣＣＡＴＧＣＴＴＧＧＣＴＴＡＣＧＡ（ＧＳ９４、配列番号９４）を標的とするｓｇＲＮＡ（Ｓｙｎｔｈｅｇｏ）、６２．５μＭの ｓＮＬＳ－ＳｐＣａｓ９－ｓＮＬＳ（Ａｌｄｅｖｒｏｎ）及びＰ３緩衝液（Ｌｏｎｚａ）を組み合わせることによって調製し、室温で１５分間インキュベートした。用量滴定実験によって決定された最適量のプラスミドＤＮＡ（０．５～３マイクログラムの範囲）を、３．５μｌのＲＮＰと混合した。Ｔ細胞をカウントし、ビーズ除去し、９０×Ｇで１０分間遠心分離し、サプリメントを添加して１０＾６細胞／１４．５μｌのＰ３で再懸濁した（Ｌｏｎｚａ）。１４．５μｌのＴ細胞懸濁液をＤＮＡ／ＲＮＰ混合物に添加し、Ｌｏｎｚａ ３８４ウェルのＮｕｃｌｅｏｃｕｖｅｔｔｅプレートに移し、コードＥＨ－１１５のＬｏｎｚａ ＨＴ Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒシステムでパルス処理した。細胞を室温で１５分間休ませた後、１２．５ｎｇ／ｍｌのヒトＩＬ－７及びＩＬ－１５（Ｍｉｌｔｅｎｙｉプレミアムグレード）を補充したＴｅｘＭＡＣＳ培地中の９６ウェルプレート（Ｓａｒｓｔｅｄｔ）に移した。

【０３５１】

導入遺伝子発現を、抗Ｍｙｃ抗体（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙクローン９Ｂ１１）及び抗Ｆｌａｇ抗体（ＲｎＤ系、クローン１０４２Ｅ）で染色することによって検出し、Ａｔｔｕｎｅ ＮｘＴフローサイトメーター上で分析した。使用した他の抗体は、ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ Ｆｉｘａｂｌｅ Ｎｅａｒ－ＩＲ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）、ＴＣＲアルファ／ベータ抗体（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄクローンＩＰ２６）、ＣＤ４抗体（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄクローンＲＰＡ－Ｔ４）、ＣＤ８抗体（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄクローンＳＫ１）であった。

【０３５２】

プライミング受容体誘導

導入遺伝子（すなわち、合成回路）の機能的活性を評価するために、編集されたＴ細胞を、プライミング抗原を発現する標的細胞株と１：１のＥ：Ｔ比で共培養し、２４時間インキュベートした。Ｔ細胞を採取し、抗Ｍｙｃ抗体及び抗Ｆｌａｇ抗体で染色して、プライム受容体及びＣＡＲ発現についてそれぞれ評価した。

【０３５３】

ＧＳ９４での８．３ｋｂの導入遺伝子組込みが機能的ノックインをもたらしたかどうかを評価するために、細胞を、１：１のＥ：Ｔ細胞比で同種プライミング抗原を発現する親Ｋ５６２細胞及びＫ５６２細胞で培養した。細胞を、前述のように４８時間後にフローサイトメトリーによってアッセイした。プライミング抗原を有するＫ５６２細胞は、ＣＡＲ発現を誘導したが、対照親Ｋ５６２細胞は誘導しなかった（図１８）。全体として、これは、ＰｒｉｍｅＲが、８．３ｋｂの導入遺伝子回路の挿入後にＣＡＲ発現を誘導したことを示す。

【０３５４】

実施例７：ＣＡＲ発現カセットを含むＴ細胞のインビボ使用

腫瘍抗原を認識するＣＡＲを発現する導入遺伝子カセット、または腫瘍の解剖学的近傍で抗原を認識するプライミング受容体の制御下にある腫瘍抗原を認識するＣＡＲを有するＴ細胞のインビボ有効性を、ＣＡＲ抗原を発現するように、またはプライミング受容体及びＣＡＲの両方によって認識される抗原を発現するように操作されたＫ５６２などのヒト腫瘍細胞に対して評価する。腫瘍細胞（例えば、１ｅ６）を、ＮＳＧマウス（Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）の脇腹に皮下注射する。腫瘍増殖は、２～４日毎にキャリパーによる寸法測定によって評価される。腫瘍体積が約１００立方ｍｍに達すると、マウスに、５ｅ６の、ＣＲＩＳＰＲ媒介挿入によって特定の部位に組み込まれたＣＡＲまたはｐｒｉｍｅＲ－ＣＡＲ回路カセットを有するＴ細胞を、またはＣＲＩＳＰＲ ＲＮＰ単独で操作されたＴ細胞を、もしくは偽注射としてＰＢＳ単独で、静脈内注射する。腫瘍

増殖を監視し、腫瘍体積が２０００立方ｍｍに達すると、マウスを安楽死させる。末梢血は、後眼窩手順を介してマウスから採血され、フローサイトメトリー及び／またはｄｄＰＣＲを使用して、操作されたＴ細胞の経時的な拡大増殖を観察する。　　殺時に、脾臓、血液、腫瘍及び／または他の組織を、フローサイトメトリー、ｄｄＰＣＲ、及び／または免疫組織化学を介して、操作されたＴ細胞の存在について分析する。結果は、定義されたゲノム遺伝子座のうちの１つにおいてカセット組込みで操作されたＴ細胞を注射されたマウスにおいて、カセット組込みなしのＴ細胞と比較して、腫瘍退縮及びクリアランスをもたらし、操作されたＴ細胞が、注射されたマウスの末梢血及び組織において検出可能であることを実証する。

【０３５５】

（表１）ｓｇＲＮＡ配列

| sgRNA ID | sgRNA 配列 | sgRNA 開始 coor GRCH38 | sgRNA 標的 遺伝子座 | 組込み 部位 | 中央値 (%修飾)、2 ドナー、2 プライマーセットから要約 |
|---|---|---|---|---|---|
| sgRNA_1 | GCACCTGAATACCACGCCTG (配列番号 1) | chr16:88811818 | APRT | APRT | 79.28 |
| sgRNA_2 | CGCCTGCGATGTAGTCGATG (配列番号 2) | chr16:88811551 | APRT | APRT | 78.60 |
| sgRNA_3 | CAGGACGGGCGAGATGTCCC(配列番号 3) | chr16:88811640 | APRT | APRT | 85.25 |
| sgRNA_4 | CTGAATCTTTGGAGTACCTG(配列番号 4) | chr15:44715425 | B2M | B2M | 78.51 |
| sgRNA_5 | GGCCACGGAGCGAGACATCT(配列番号 5) | chr15:44711550 | B2M | B2M | 94.75 |
| sgRNA_6 | AAGTCAACTTCAATGTCGGA (配列番号 6) | chr15:44715515 | B2M | B2M | 70.97 |
| sgRNA_7 | GCTTGGAGGCCTGATCAGCG (配列番号 7) | chr19:36141111 | CAPNS1 | CAPNS1 | 89.34 |
| sgRNA_8 | CTTATCTCTTCGCAGCGAGG(配列番号 8) | chr19:36142301 | CAPNS1 | CAPNS1 | 91.09 |
| sgRNA_9 | CACACATTACTCCAACATTG (配列番号 9) | chr19:36142676 | CAPNS1 | CAPNS1 | 71.98 |
| sgRNA_10 | TTCCGCAAAATAGAGCCCCA (配列番号 10) | chr3:105746019 | CBLB | CBLB | 91.55 |
| sgRNA_11 | TGCACAGAACTATCGTACCA (配列番号 11) | chr3:105751622 | CBLB | CBLB | 91.43 |
| sgRNA_12 | GCAATAAGACTCTTTAAAGA (配列番号 12) | chr3:105853470 | CBLB | CBLB | 76.18 |
| sgRNA_13 | CAAAGAGATTACGAATGCCT (配列番号 13) | chr1:116754658 | CD2 | CD2 | 89.80 |
| sgRNA_14 | CAAGGCACCCCAGGTTTCCA (配列番号 14) | chr1:116754663 | CD2 | CD2 | 92.70 |
| sgRNA_15 | TTACGAATGCCTTGGAAACC (配列番号 15) | chr1:116754666 | CD2 | CD2 | 92.82 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| sgRNA_16 | CAGAGACGCATCTGACCCTC(配列番号 16) | chr11:118315540 | CD3E | CD3E | 90.96 |
| sgRNA_17 | CATGCAGTTCTCACACACTG(配列番号 17) | chr11:118313715 | CD3E | CD3E | 87.47 |
| sgRNA_18 | GTGTGAGAACTGCATGGAGA(配列番号 18) | chr11:118313715 | CD3E | CD3E | 86.65 |
| sgRNA_19 | TCTCATTTCAGGAAACCACT(配列番号 19) | chr11:118349748 | CD3G | CD3G | 87.24 |
| sgRNA_20 | AGTCATACACCTTAACCAAG(配列番号 20) | chr11:118349754 | CD3G | CD3G | 87.99 |
| sgRNA_21 | TTCAAGGAAACCAGTTGAGG(配列番号 21) | chr11:118352458 | CD3G | CD3G | 86.55 |
| sgRNA_22 | GAGCCTTGCCTGGAAATCTG(配列番号 22) | chr11:61118177 | CD5 | CD5 | 84.03 |
| sgRNA_23 | AAGCGTCAAAAGTCTGCCAG(配列番号 23) | chr11:61118324 | CD5 | CD5 | 89.19 |
| sgRNA_24 | CGTTCCAACTCGAAGTGCCA(配列番号 24) | chr11:61118121 | CD5 | CD5 | 83.11 |
| sgRNA_25 | GAGCGACTGGGACACGGTGA(配列番号 25) | chr9:136866246 | EDF1 | EDF1 | 88.84 |
| sgRNA_26 | GCTGCGCAAGAAGGGCCCTA(配列番号 26) | chr9:136866211 | EDF1 | EDF1 | 91.04 |
| sgRNA_27 | TTGTTCTGGCCAGCAGCCCC(配列番号 27) | chr9:136863433 | EDF1 | EDF1 | 85.98 |
| sgRNA_28 | CTTCCAGAGCCACATCATCG(配列番号 28) | chr19:48965791 | FTL | FTL | 93.10 |
| sgRNA_29 | GGGACTCACCAGAGAGAGGT(配列番号 29) | chr19:48965601 | FTL | FTL | 88.86 |
| sgRNA_30 | CGGTCGAAATAGAAGCCCTA(配列番号 30) | chr19:48965770 | FTL | FTL | 93.14 |
| sgRNA_31 | AAAAGGATATTGTGCAACTG(配列番号 31) | chr10:87933015 | PTEN | PTEN | 92.37 |
| sgRNA_32 | TGTGCATATTTATTACATCG(配列番号 32) | chr10:87933183 | PTEN | PTEN | 90.64 |
| sgRNA_33 | TTTGTGAAGATCTTGACCAA(配列番号 33) | chr10:87933087 | PTEN | PTEN | 85.36 |
| sgRNA_34 | TGTCATGCTGAACCGCATTG(配列番号 34) | chr18:12830972 | PTPN2 | PTPN2 | 87.94 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| sgRNA_35 | CCACTCTATGAGGATAGTCA (配列番号 35) | chr18:12859219 | PTPN2 | PTPN2 | 92.45 |
| sgRNA_36 | TTGACATAGAAGAGGCACAA (配列番号 36) | chr18:12836828 | PTPN2 | PTPN2 | 93.96 |
| sgRNA_37 | GAGTACTACACTCAGCAGCA (配列番号 37) | chr12:6952098 | PTPN6 | PTPN6 | 89.61 |
| sgRNA_38 | TCACGCACAAGAAACGTCCA (配列番号 38) | chr12:6954872 | PTPN6 | PTPN6 | 82.74 |
| sgRNA_39 | AGGTCTCGGTGAAACCACCT (配列番号 39) | chr12:6951610 | PTPN6 | PTPN6 | 91.27 |
| sgRNA_40 | AGCATTATCCAAAGAGTCCG (配列番号 40) | chr1:198696873 | PTPRC | PTPRC | 88.88 |
| sgRNA_41 | ATATTAATTCTTACCAGTGG (配列番号 41) | chr1:198692370 | PTPRC | PTPRC | 88.95 |
| sgRNA_42 | AGCTTTAAATCAAGGTTCAT (配列番号 42) | chr1:198756176 | PTPRC | PTPRC | 96.89 |
| sgRNA_43 | ATCCCGAGCCCTAAGGTGCA (配列番号 43) | chr11:67436325 | PTPRCAP | PTPRCAP | 84.08 |
| sgRNA_44 | GGCAGCGCGGAGGACAGCGT (配列番号 44) | chr11:67436285 | PTPRCAP | PTPRCAP | 97.74 |
| sgRNA_45 | CTCAGGGGGCTACTACCACC (配列番号 45) | chr11:67436170 | PTPRCAP | PTPRCAP | 91.50 |
| sgRNA_46 | GTCACCGACGAGACCAGAAG (配列番号 46) | chr5:82277810 | RPS23 | RPS23 | 79.40 |
| sgRNA_47 | GTCGTGGACTTCGTACTGCT (配列番号 47) | chr5:82277843 | RPS23 | RPS23 | 83.07 |
| sgRNA_48 | TAATTTTTAGGCAAGTGTCG (配列番号 48) | chr5:82277860 | RPS23 | RPS23 | 61.94 |
| sgRNA_49 | TTAGCTGTTAGACTTGAATA (配列番号 49) | chr14:51993810 | RTRAF | RTRAF | 85.50 |
| sgRNA_50 | CGAGAGCCGTCAACTTGCGT (配列番号 50) | chr14:51989652 | RTRAF | RTRAF | 85.64 |
| sgRNA_51 | CGGCTTCAACTGCAAAGGTG (配列番号 51) | chr14:51989700 | RTRAF | RTRAF | 88.77 |
| sgRNA_52 | TATGAAAAAGCAGAGCGACT (配列番号 52) | chr15:43793025 | SERF2 | SERF2 | 89.61 |
| sgRNA_53 | TCTGGCGGGCGAGCTCACGC (配列番号 53) | chr15:43792989 | SERF2 | SERF2 | 86.73 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| sgRNA_54 | CTCACGCTGGTTACCGCCTA(配列番号 54) | chr15:43792977 | SERF2 | SERF2 | 80.57 |
| sgRNA_55 | AAAGATTACGAACTTCCCTG(配列番号 55) | chr12:46207559 | SLC38A1 | SLC38A1 | 92.24 |
| sgRNA_56 | GTTAAAAACAGACATGCCTA(配列番号 56) | chr12:46229232 | SLC38A1 | SLC38A1 | 91.51 |
| sgRNA_57 | ATGCCTAAGGAGGTTGTACC(配列番号 57) | chr12:46229246 | SLC38A1 | SLC38A1 | 79.48 |
| sgRNA_58 | CTCCAGGTATCCCATCGAAA(配列番号 58) | chr18:47869418 | SMAD2 | SMAD2 | 79.53 |
| sgRNA_59 | CACCAAATACGATAGATCAG(配列番号 59) | chr18:47870532 | SMAD2 | SMAD2 | 86.61 |
| sgRNA_60 | TGGCGGCGTGAATGGCAAGA(配列番号 60) | chr18:47896729 | SMAD2 | SMAD2 | 82.91 |
| sgRNA_61 | TAGGATGGTAGCACACAACC(配列番号 61) | chr16:11255478 | SOCS1 | SOCS1 | 92.25 |
| sgRNA_62 | CAGCAGCAGAGCCCCGACGG(配列番号 62) | chr16:11255432 | SOCS1 | SOCS1 | 83.79 |
| sgRNA_63 | CGGCGTGCGAACGGAATGTG(配列番号 63) | chr16:11255296 | SOCS1 | SOCS1 | 84.24 |
| sgRNA_64 | TATAGACGCTGCCCGACGTC(配列番号 64) | chr15:40038895 | SRP14 | SRP14 | 95.12 |
| sgRNA_65 | TCCAAAGAAGGGTACTGTGG(配列番号 65) | chr15:40038368 | SRP14 | SRP14 | 92.14 |
| sgRNA_66 | ACAGTACCCTTCTTTGGAAT(配列番号 66) | chr15:40038358 | SRP14 | SRP14 | 65.82 |
| sgRNA_67 | GCGACGGGCGCATCTACGTG(配列番号 67) | chr12:120469572 | SRSF9 | SRSF9 | 83.68 |
| sgRNA_68 | CCCGACCTCCATAAGTCCTG(配列番号 68) | chr12:120465700 | SRSF9 | SRSF9 | 92.56 |
| sgRNA_69 | GGGGTCCTCGAAGCGCACGA(配列番号 69) | chr12:120469426 | SRSF9 | SRSF9 | 89.94 |
| sgRNA_70 | TGCTCTGTTTAGAAGATGAC(配列番号 70) | chr5:32591641 | SUB1 | SUB1 | 79.36 |
| sgRNA_71 | ATATTCTTTTCTAGTTAAAG(配列番号 71) | chr5:32591566 | SUB1 | SUB1 | 70.93 |
| sgRNA_72 | CCTGTAAAGAAACAAAAGAC(配列番号 72) | chr5:32591614 | SUB1 | SUB1 | 93.66 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| sgRNA_73 | TGGAGAAAGACGTAACTTCG(配列番号 73) | chr4:105234315 | TET2 | TET2 | 83.53 |
| sgRNA_74 | TCTGCCCTGAGGTATGCGAT(配列番号 74) | chr4:105234747 | TET2 | TET2 | 90.97 |
| sgRNA_75 | ATTCCGCTTGGTGAAAACGA(配列番号 75) | chr4:105235656 | TET2 | TET2 | 89.62 |
| sgRNA_76 | CAGGCACAATAGAAACAACG(配列番号 76) | chr3:114295571 | TIGIT | TIGIT | 92.65 |
| sgRNA_77 | CCATTTGTAATGCTGACTTG(配列番号 77) | chr3:114295700 | TIGIT | TIGIT | 60.75 |
| sgRNA_78 | CTGGGTCACTTGTGCCGTGG(配列番号 78) | chr3:114295634 | TIGIT | TIGIT | 87.99 |
| sgRNA_79 | GTCAGGGTTCTGGATATCTG(配列番号 79) | chr14:22547508 | TRAC | TRAC | 98.20 |
| sgRNA_80 | TGGATTTAGAGTCTCTCAGC(配列番号 80) | chr14:22547541 | TRAC | TRAC | 88.15 |
| sgRNA_81 | CTGCGGCTGTGGTCCAGCTG(配列番号 81) | chr14:22550661 | TRAC | TRAC | 94.77 |
| sgRNA_82 | ACAAAACTGTGCTAGACATG(配列番号 82) | chr14:22547658 | TRAC | TRAC | 87.86 |
| sgRNA_83 | TTCTTCCCCAGCCCAGGTAA(配列番号 83) | chr14:22547778 | TRAC | TRAC | 89.85 |
| sgRNA_84 | CGTCATGAGCAGATTAAACC(配列番号 84) | chr14:22550625 | TRAC | TRAC | 95.81 |
| sgRNA_85 | GAGAGCGCCTGCGACCCGAG(配列番号 85) | chr19:58544980 | TRIM28 | TRIM28 | 89.44 |
| sgRNA_86 | CCAGCGGGTGAAGTACACCA(配列番号 86) | chr19:58544869 | TRIM28 | TRIM28 | 94.79 |
| sgRNA_87 | GGAGCGCTTTTCGCCGCCAG(配列番号 87) | chr19:58544839 | TRIM28 | TRIM28 | 91.81 |
| sgRNA_88 | TGAGGCCTGGACCTTATGCA(配列番号 88) | chr10:33134193 | chr10:33130000-33140000 | desert_1(GS88) | 69.44 |
| sgRNA_89 | CCTGGTGGAGTGAACCATGA(配列番号 89) | chr10:33132917 | chr10:33130000-33140000 | desert_1(GS89) | 95.25 |
| sgRNA_90 | CAAGCACTTAGGTTCCCCTG(配列番号 90) | chr10:33134633 | chr10:33130000-33140000 | desert_1(GS90) | 91.13 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| sgRNA_91 | GGTCTCCCTACAATTCAGCG (配列番号 91) | chr10:72294568 | chr10:72290000-72300000 | desert_2 (GS91) | 92.02 |
| sgRNA_92 | CACAGCGCGTGACTGCAATG (配列番号 92) | chr10:72298268 | chr10:72290000-72300000 | desert_2 (GS92) | 90.22 |
| sgRNA_93 | TCTGGGGCACCAATTCTAGG (配列番号 93) | chr10:72292786 | chr10:72290000-72300000 | desert_2 (GS93) | 86.35 |
| sgRNA_94 | GAGCCATGCTTGGCTTACGA (配列番号 94) | chr11:128342576 | chr11:128340000-128350000 | desert_3 (GS94) | 91.24 |
| sgRNA_95 | GTACAAGTACTTATCTCATG(配列番号 95) | chr11:128343592 | chr11:128340000-128350000 | desert_3 (GS95) | 89.02 |
| sgRNA_96 | GAGATAACAACATAACAACA(配列番号 96) | chr11:128347170 | chr11:128340000-128350000 | desert_3 (GS96) | 96.47 |
| sgRNA_97 | CATATTCCATAGTCTTTGGG(配列番号 97) | chr11:65425000 | chr11:65425000-65427000(NEAT1) | desert_4 (GS97) | 88.54 |
| sgRNA_98 | CTGCCCCTTAGCAACTTAGG (配列番号 98) | chr11:65425507 | chr11:65425000-65427000(NEAT1) | desert_4 (GS98) | 92.76 |
| sgRNA_99 | TGTTTAAAAATATGTTGACA (配列番号 99) | chr11:65426264 | chr11:65425000-65427000(NEAT1) | desert_4 (GS99) | 90.76 |
| sgRNA_100 | CCAGGAATGGAAACTCACGC(配列番号 100) | chr15:92830315 | chr15:92830000-92840000 | desert_5 (GS100) | 87.84 |
| sgRNA_101 | GAGGCCGCTGAATTAACCCG (配列番号 101) | chr15:92831850 | chr15:92830000-92840000 | desert_5 (GS101) | 85.32 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| sgRNA_102 | ATACACGCACACTTGCAGAA (配列番号 102) | chr15:92831131 | chr15:92830000-92840000 | desert_5 (GS102) | 99.92 |
| sgRNA_103 | GAGCAGACAGAAACCCAGGG (配列番号 103) | chr16:11225670 | chr16:11220000-11230000 | desert_6 (GS103) | 87.92 |
| sgRNA_104 | TGAGTCTCCAAACAGAACAG (配列番号 104) | chr16:11226284 | chr16:11220000-11230000 | desert_6 (GS104) | 88.53 |
| sgRNA_105 | TAATATCACTGACTTCACGG (配列番号 105) | chr16:11225029 | chr16:11220000-11230000 | desert_6 (GS105) | 87.65 |
| sgRNA_106 | TACACACAATGTAAGCAGCA (配列番号 106) | chr2:87467461 | chr2:87460000-87470000 | desert_7 (GS106) | 71.79 |
| sgRNA_107 | GGGAGCTCAATTCGAAACCA (配列番号 107) | chr2:87468809 | chr2:87460000-87470000 | desert_7 (GS107) | 65.89 |
| sgRNA_108 | TTGGACAGGTGAGACAGTCG (配列番号 108) | chr2:87467001 | chr2:87460000-87470000 | desert_7 (GS108) | 72.64 |
| sgRNA_109 | AAGCTCACTCAGATAGTGTG (配列番号 109) | chr3:186511316 | chr3:186510000-186520000 | desert_8 (GS109) | 76.89 |
| sgRNA_110 | CAGGAGAACCACCTTACACG (配列番号 110) | chr3:186515260 | chr3:186510000-186520000 | desert_8 (GS110) | 86.31 |
| sgRNA_111 | GGACAGACCCTGATTCACAA (配列番号 111) | chr3:186519655 | chr3:186510000-186520000 | desert_8 (GS111) | 85.47 |
| sgRNA_112 | ACATGGCAGTCTATGAACAG (配列番号 112) | chr3:59451154 | chr3:59450000-59460000 | desert_9 (GS112) | 87.77 |
| sgRNA_113 | CCTATAGAGAGTACTACTTG (配列番号 113) | chr3:59456416 | chr3:59450000-59460000 | desert_9 (GS113) | 79.33 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| sgRNA_114 | CCAACCGGGTCTTCATTACG (配列番号 114) | chr3:59457029 | chr3:59450000-59460000 | desert_9 (GS114) | 92.21 |
| sgRNA_115 | TCAAGCGTAGAGTTCCGAGT (配列番号 115) | chr8:127993006 | chr8:127980000-128000000 | desert_10 (GS115) | 93.07 |
| sgRNA_116 | TCATGCAATTATGGACCCAG (配列番号 116) | chr8:127994663 | chr8:127980000-128000000 | desert_10 (GS116) | 89.40 |
| sgRNA_117 | CGGGAAAGTGACTGGCCATG(配列番号 117) | chr8:127996766 | chr8:127980000-128000000 | desert_10 (GS117) | 87.45 |
| sgRNA_118 | TGAGATTGAAATCAAATCGG (配列番号 118) | chr9:7974159 | chr9:7970000-7980000 | desert_11 (GS118) | 84.84 |
| sgRNA_119 | TATGCAATATTCATCACGCG (配列番号 119) | chr9:7977914 | chr9:7970000-7980000 | desert_11 (GS119) | 85.44 |
| sgRNA_120 | AATGTGTTAAATCAAATGCA (配列番号 120) | chr9:7976895 | chr9:7970000-7980000 | desert_11 (GS120) | 83.48 |

【０３５６】

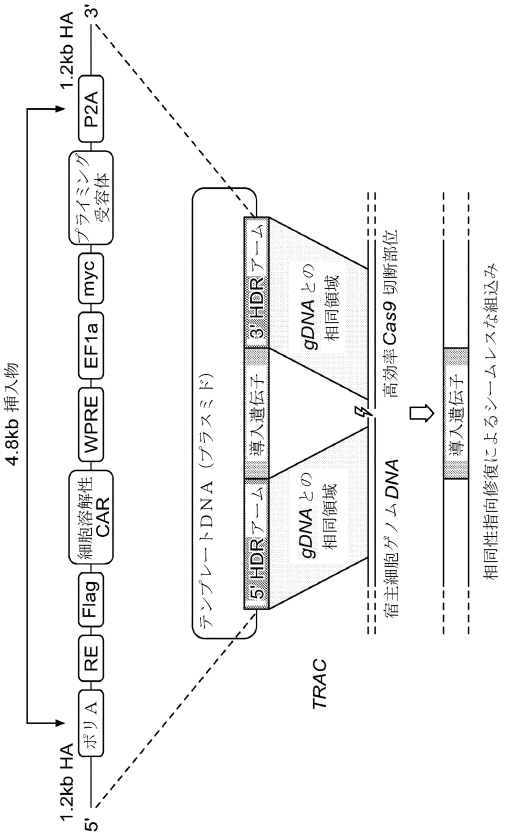
本発明は、好ましい実施形態及び様々な代替の実施形態を参照して特に示され、説明されてきたが、本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく、形態及び詳細の様々な変更を本発明の中で行うことができることは、当業者によって理解されるであろう。

【０３５７】

本明細書の本文内で引用される全ての参考文献、発行済み特許及び特許出願は、あらゆる目的のために、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

【図面】

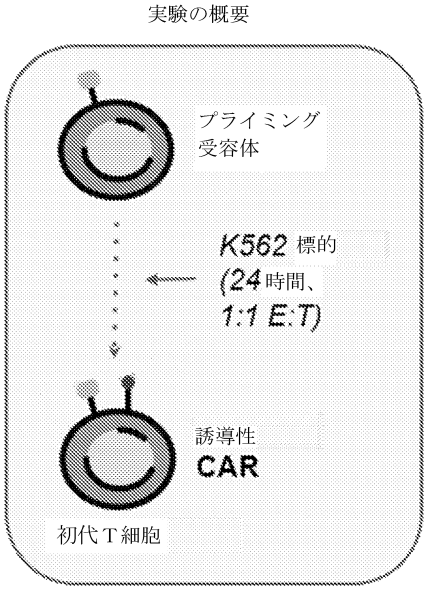
【図１】


4.8kb 挿入物
1.2kb HA
5'
ポリA
RE
Flag
細胞溶解性 CAR
WPRE
EF1a
myc
プライミング受容体
P2A
1.2kb HA
3'
テンプレートDNA（プラスミド）
5' HDR アーム
導入遺伝子
3' HDR アーム
gDNA との相同領域
gDNA との相同領域
TRAC
宿主細胞ゲノム DNA
高効率 Cas9 切断部位
導入遺伝子
相同性指向修復によるシームレスな組込み

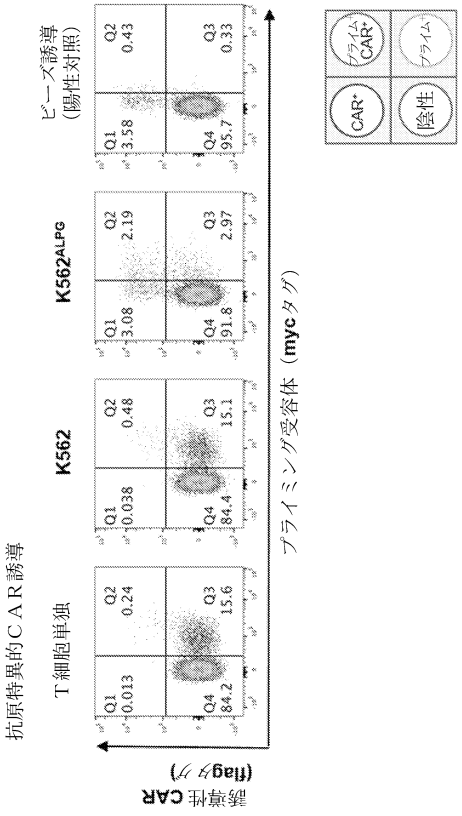
【図２】


プロセスの概要
T細胞活性化
（0日目）
エレクトロポレーション
（2日目）
拡張
（4日間）
共培養
（6日目）

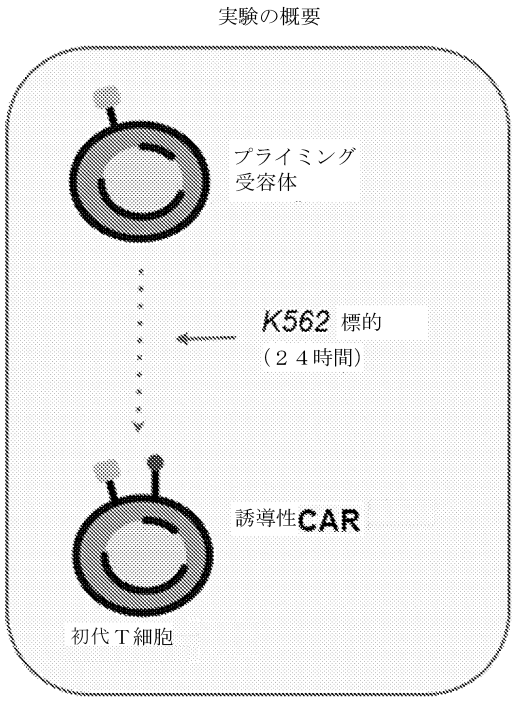
【図３】


実験の概要
プライミング受容体
K562 標的
(24 時間、
1:1 E:T)
誘導性
CAR
初代T細胞

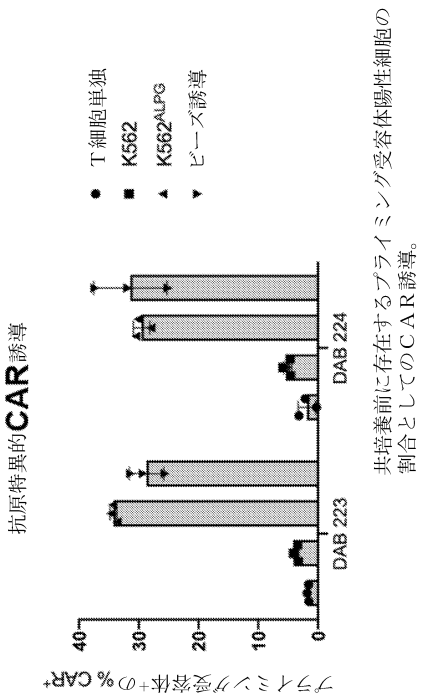
【図４】


抗原特異的CAR誘導
T細胞単独
K562
K562ALPG
ビーズ誘導
(陽性対照)
誘導性 CAR
(flagタグ)
プライミング受容体（mycタグ）
Q1 0.013
Q2 0.24
Q4 84.2
Q3 15.6
Q1 0.038
Q2 0.48
Q4 84.4
Q3 15.1
Q1 3.08
Q2 2.19
Q4 91.8
Q3 2.97
Q1 3.58
Q2 0.43
Q4 95.7
Q3 0.33
CAR+
プライム CAR+
陰性
プライム+

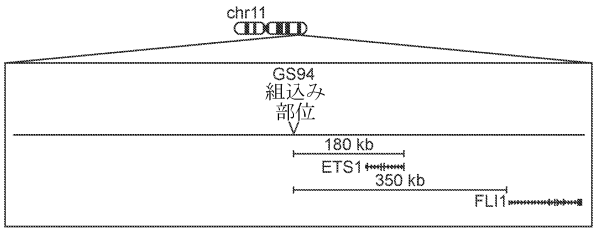
【図５】


実験の概要
プライミング
受容体
K562 標的
（２４時間）
誘導性CAR
初代Ｔ細胞

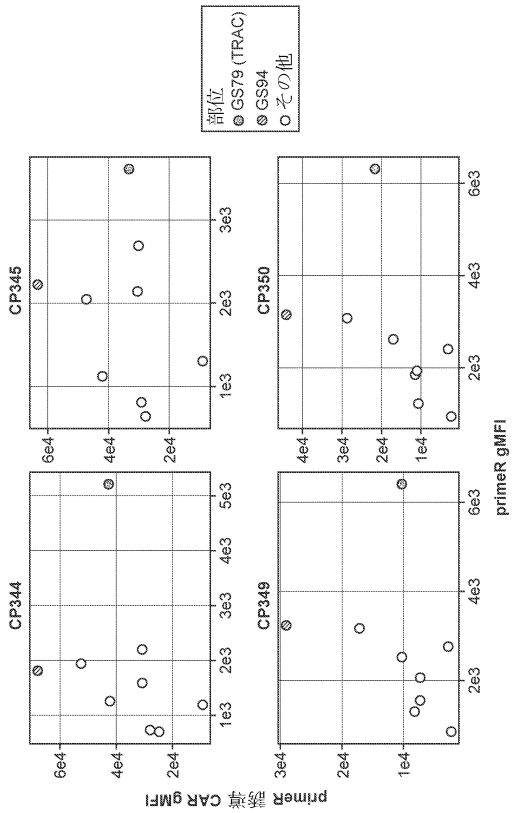
【図６】


抗原特異的CAR誘導
Ｔ細胞単独
K562
K562ALPG
ビーズ誘導
DAB 223
DAB 224
プライミング受容体+の% CAR+
0
10
20
30
40
共培養前に存在するプライミング受容体陽性細胞の
割合としてのＣＡＲ誘導。

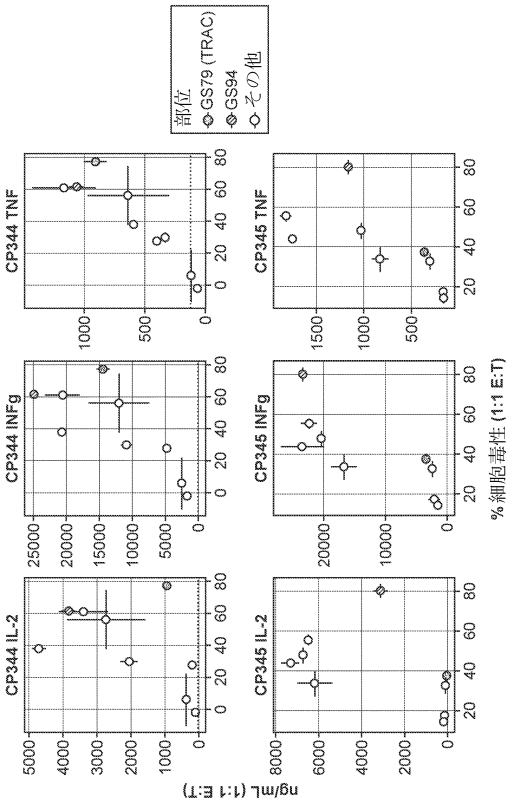
【図７】


chr11
GS94
組込み
部位
180 kb
ETS1
350 kb
FLI1

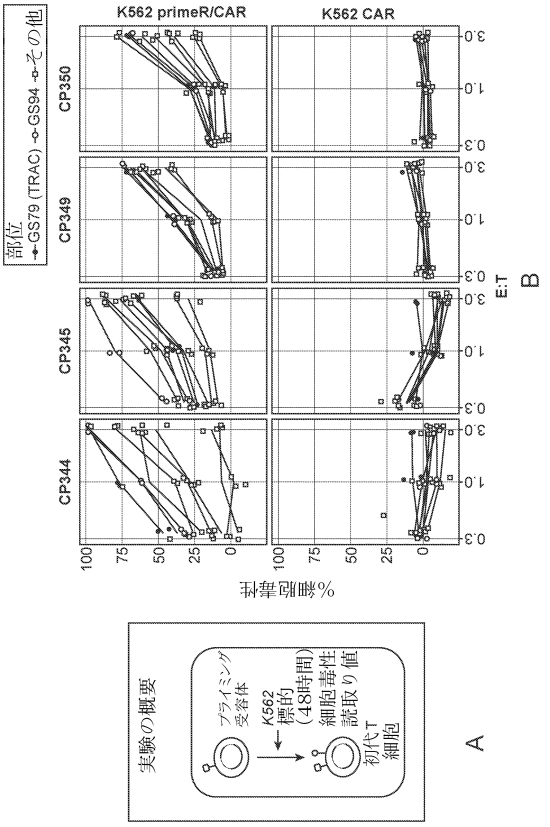
【図８Ａ】


部位
GS79 (TRAC)
GS94
その他
CP345
CP350
CP344
CP349
primeR 誘導 CAR gMFI
primeR gMFI

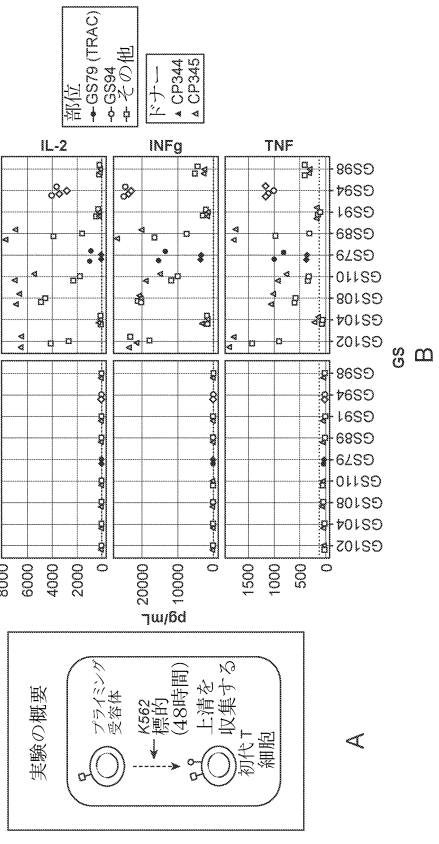
【図８Ｂ】



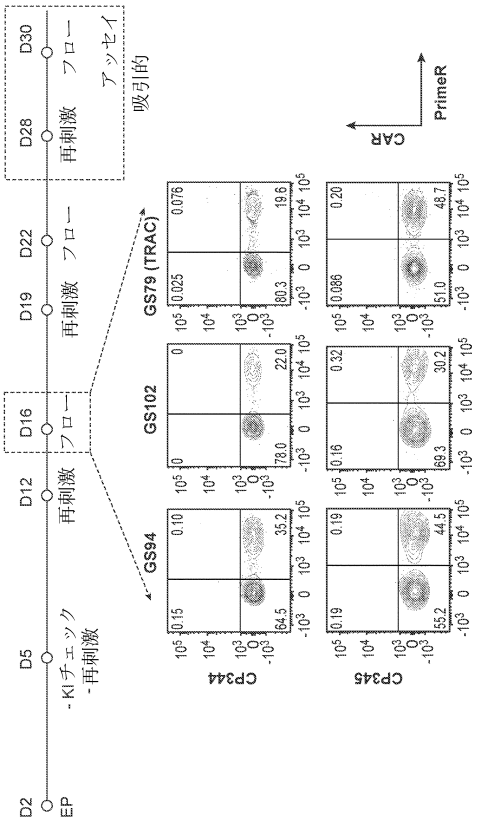

【図９】



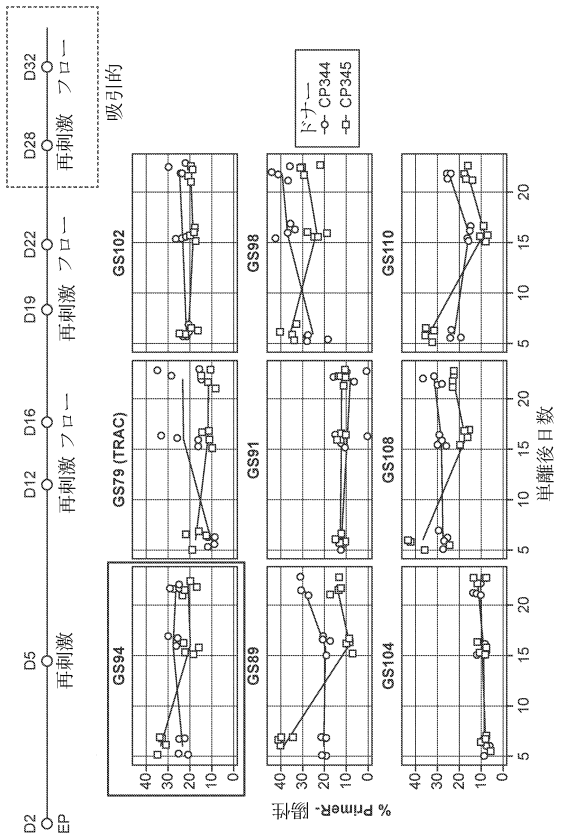

【図１０】



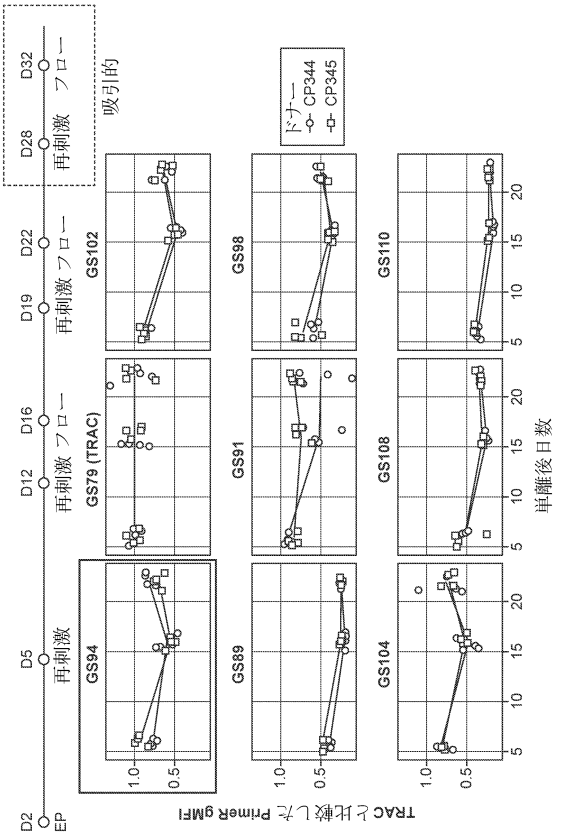

【図１１】



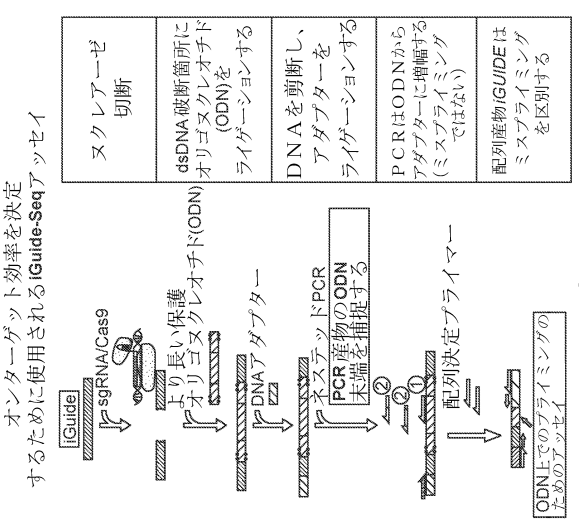
【図１２Ａ】



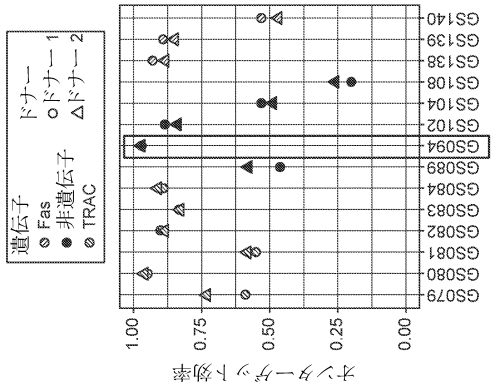

【図１２Ｂ】




【図１３Ａ】

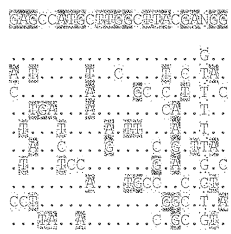



【図１３Ｂ】



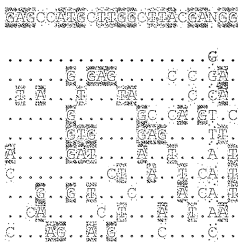
【図１３Ｃ】

iGUIDE-seq 20pm 96W sgRNA_94 (G)
標的 : sgRNA_94



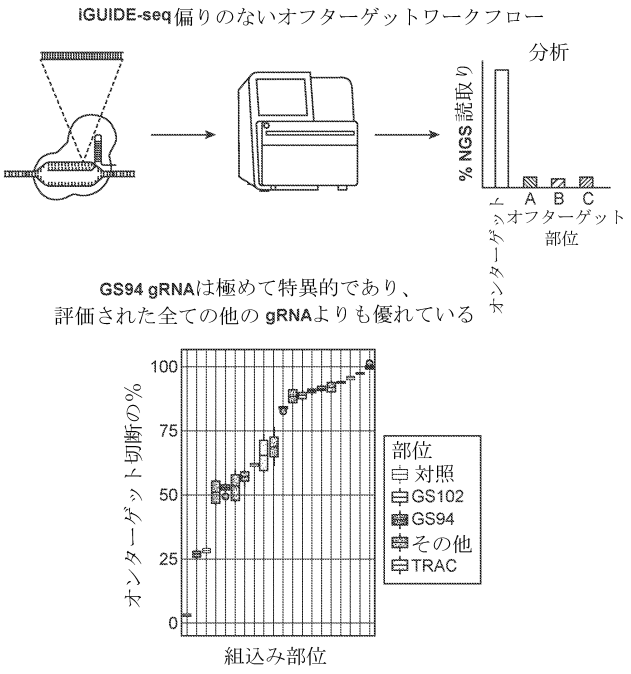
| ミスマッチ | 標的 | 存在量 | MESL | 遺伝子_ID |
|---|---|---|---|---|
| 0 | オン | 2,336 | 95.1 | ETS1~ |
| 6 | オフ | 7 | 23.9 | RNU6-259P |
| 6 | オフ | 5 | 32.3 | RN7SKP254 |
| 6 | オフ | 5 | 23.7 | CYCSP17 |
| 6 | オフ | 4 | 95.1 | RNU4-8P |
| 6 | オフ | 4 | 36.6 | TBC1D14* |
| 6 | オフ | 4 | 35.4 | MDFI* |
| 6 | オフ | 3 | 32.3 | L0C101928823* |
| 6 | オフ | 3 | 30.0 | MYBBP1A*~ |
| 6 | オフ | 3 | 29.4 | HSPD1P15 |

iGUIDE-seq 20pm 96W sgRNA_94 (ドナー2) (G)
標的 : sgRNA_94

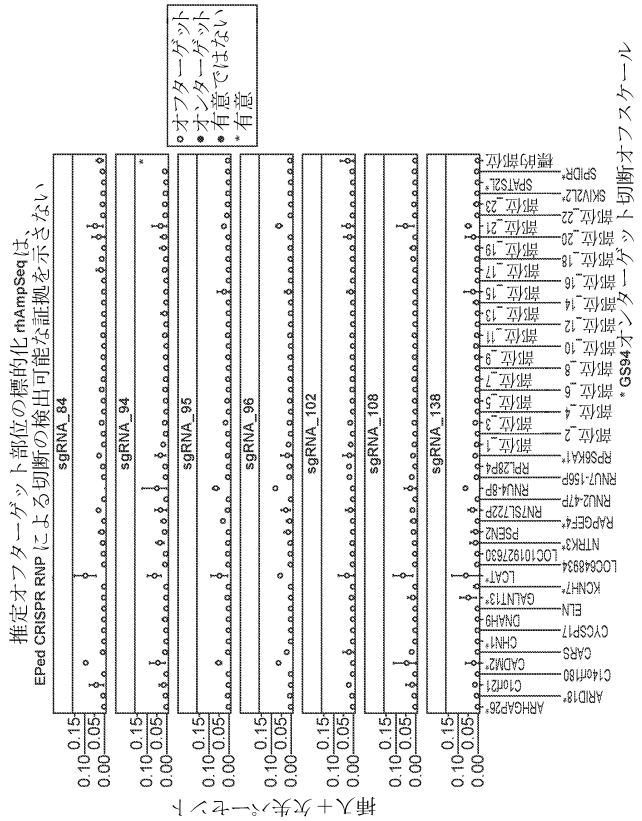


| ミスマッチ | 標的 | 存在量 | MESL | 遺伝子_ID |
|---|---|---|---|---|
| 0 | オン | 2,164 | 95.5 | ETS1~ |
| 6 | オフ | 4 | 37.3 | ZFPM1* |
| 6 | オフ | 2 | 27.3 | 0R6D1P |
| 6 | オフ | 2 | 25.2 | NPHP4* |
| 6 | オフ | 1 | 80.5 | ELN~ |
| 6 | オフ | 1 | 56.9 | RAPGEF4* |
| 6 | オフ | 1 | 43.2 | TMEM181* |
| 6 | オフ | 1 | 37.3 | LDHD |
| 6 | オフ | 1 | 37.3 | LINC01392 |
| 6 | オフ | 1 | 32.6 | C14orf180 |

【図１４】

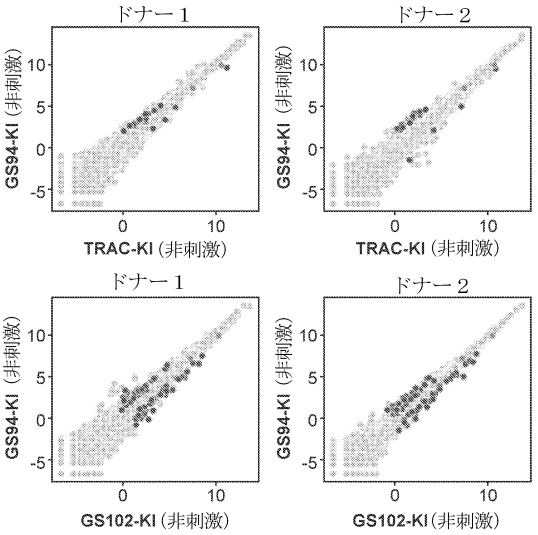



【図１５】



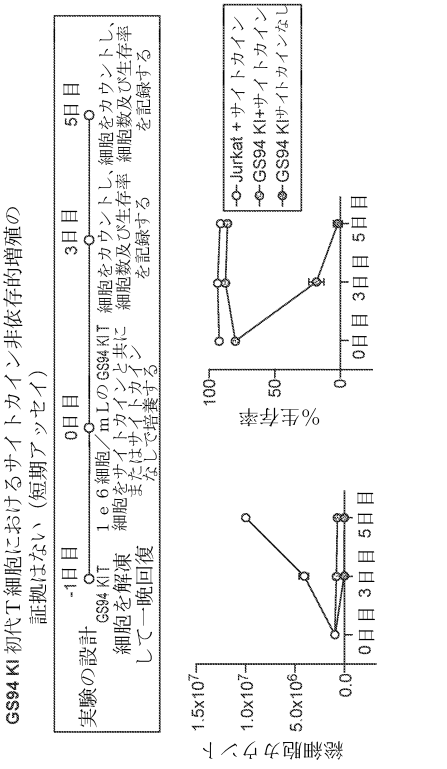

【図１６】

GS94の 300kb以内での *ETS1* 及び *FLI1* の差次的発現がなく、
他の遺伝子の差次的発現が最小限である

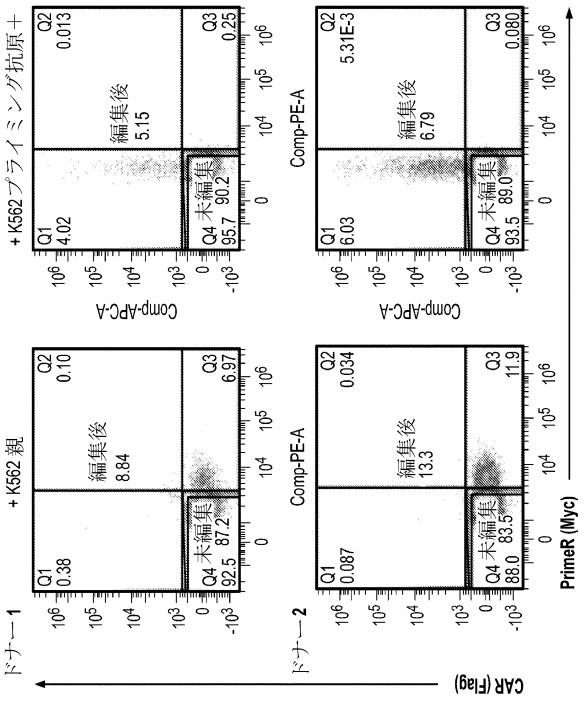



濃灰色の点：変化倍率＞2、-log10(Q値)＞2、CPM＞2

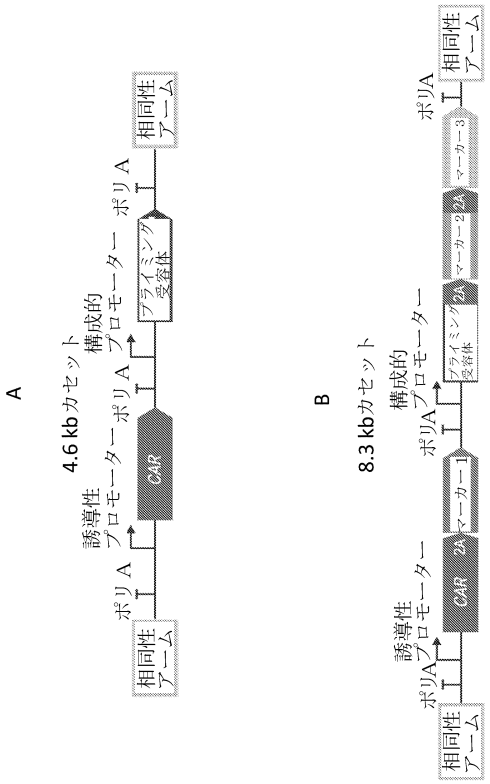
【図１７】


GS94 KI 初代T細胞におけるサイトカイン非依存的増殖の証拠はない（短期アッセイ）
実験の設計
-1日目
0日目
3日目
5日目
GS94 KIT
1e6細胞／mLのGS94 KIT細胞をサイトカインと共にまたはサイトカインなしで培養する
細胞をカウントし、細胞数及び生存率を記録する
細胞を解凍して一晩回復
細胞数及び生存率を記録する
Jurkat + サイトカイン
GS94 KI+サイトカイン
GS94 KIサイトカインなし
生存率
%
0日目 3日目 5日目
0日目 3日目 5日目
1.5x10^7
1.0x10^7
5.0x10^6
0.0
100
50
0

【図１８】


+ K562プライミング抗原+
+ K562 親
ドナー1
ドナー2
Comp-APC-A
Comp-PE-A
CAR (Flag)
PrimeR (Myc)
Q1 4.02
Q2 0.013
編集後 5.15
Q4 未編集 95.7 90.2
Q3 0.25
Q1 0.38
Q2 0.10
編集後 8.84
Q4 未編集 92.5 87.2
Q3 6.97
Q1 6.03
Q2 5.31E-3
編集後 6.79
Q4 未編集 93.5 89.0
Q3 0.080
Q1 0.087
Q2 0.034
編集後 13.3
Q4 未編集 88.0 83.5
Q3 11.9

【図１９】


A
4.6 kbカセット
誘導性プロモーター
ポリA
CAR
ポリA
構成的プロモーター
プライミング受容体
ポリA
相同性アーム
相同性アーム
B
8.3 kbカセット
誘導性プロモーター
ポリA
CAR
2A
マーカー1
ポリA
構成的プロモーター
プライミング受容体
2A
マーカー2
2A
マーカー3
ポリA
相同性アーム
相同性アーム

【手続補正書】
【提出日】令和5年6月28日(2023.6.28)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１０７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１０７】
別の態様において、初代免疫細胞を編集する方法であって、リボヌクレオタンパク質複合体（ＲＮＰ）－ＤＮＡテンプレート複合体を提供することであって、ＲＮＰが、ヌクレアーゼドメイン及びガイドＲＮＡを含み、ＤＮＡテンプレートのサイズが、５キロベースヌクレオチド以上のサイズであり、ＤＮＡテンプレートが、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）と、転写因子を含むプライミング受容体とを含み、ＤＮＡテンプレートの５’及び３’末端が、初代免疫細胞のゲノム内の挿入部位に隣接するゲノム配列と相同であるヌクレオチド配列を含む、提供することと、ＲＮＰ－ＤＮＡテンプレート複合体を初代免疫細胞内に非ウイルス的に導入することであって、ガイドＲＮＡが、初代免疫細胞のゲノム内の標的領域に特異的にハイブリダイズし、ヌクレアーゼドメインが、標的領域を切断して、初代免疫細胞のゲノム内の挿入部位を作製する、非ウイルス的に導入することと、初代免疫細胞のゲノムにおける挿入部位へのＤＮＡテンプレートの挿入を介して、初代免疫細胞を編集することと、を含む、方法が本明細書に提供される。
[本発明１００１]
細胞のゲノムの標的領域に非ウイルス的に挿入される少なくとも1つのＤＮＡテンプレートを含む初代免疫細胞であって、前記ＤＮＡテンプレートのサイズが、約5キロ塩基対（ｋｂ）以上である、前記初代免疫細胞。
[本発明１００２]
前記ＤＮＡテンプレートを前記初代免疫細胞に導入するためのウイルスベクターを含まない、本発明１００１の細胞。
[本発明１００３]
前記ＤＮＡテンプレートの前記サイズが、約５．０ｋｂ、５．１ｋｂ、５．２ｋｂ、５．３ｋｂ、５．４ｋｂ、５．５ｋｂ、５．６ｋｂ、５．７ｋｂ、５．８ｋｂ、５．９ｋｂ、６．０ｋｂ、６．１ｋｂ、６．２ｋｂ、６．３ｋｂ、６．４ｋｂ、６．５ｋｂ、６．６ｋｂ、６．７ｋｂ、６．８ｋｂ、６．９ｋｂ、７．０ｋｂ、７．１ｋｂ、７．２ｋｂ、７．３ｋｂ、７．４ｋｂ、７．５ｋｂ、７．６ｋｂ、７．７ｋｂ、７．８ｋｂ、７．９ｋｂ、８．０ｋｂ、８．１ｋｂ、８．２ｋｂ、８．３ｋｂ、８．４ｋｂ、８．５ｋｂ、８．６ｋｂ、８．７ｋｂ、８．８ｋｂ、８．９ｋｂ、９．０ｋｂ、９．１ｋｂ、９．２ｋｂ、９．３ｋｂ、９．４ｋｂ、９．５ｋｂ、９．６ｋｂ、９．７ｋｂ、９．８ｋｂ、９．９ｋｂ、１０．０ｋｂ以上、またはこれらのサイズの間の任意のＤＮＡテンプレートサイズである、本発明１００１または１００２の細胞。
[本発明１００４]
前記ＤＮＡテンプレートの前記サイズが、約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約５ｋｂ～約９ｋｂ、約５ｋｂ～約８ｋｂ、約５ｋｂ～約７ｋｂ、約５ｋｂ～約６ｋｂ、約６ｋｂ～約１０ｋｂ、約６ｋｂ～約９ｋｂ、約６ｋｂ～約８ｋｂ、約６ｋｂ～約７ｋｂ、約７ｋｂ～約１０ｋｂ、約７ｋｂ～約９ｋｂ、約７ｋｂ～約８ｋｂ、約８ｋｂ～約１０ｋｂ、約８ｋｂ～約９ｋｂ、または約９ｋｂ～約１０ｋｂである、本発明１００１～１００３のいずれかの細胞。
[本発明１００５]
前記ＤＮＡテンプレートが、二本鎖ＤＮＡテンプレートまたは一本鎖ＤＮＡテンプレートである、本発明１００１～１００４のいずれかの細胞。
[本発明１００６]
前記ＤＮＡテンプレートが、直鎖ＤＮＡテンプレートまたは環状ＤＮＡテンプレートであり、任意選択で、前記環状ＤＮＡテンプレートが、プラスミドである、本発明１００１～１００５のいずれかの細胞。

[本発明１００７]
前記ＤＮＡテンプレートの５’及び３’末端が、前記初代細胞の前記ゲノム内の挿入部位に隣接するゲノム配列と相同であるヌクレオチド配列を含む、本発明１００１～１００６のいずれかの細胞。
[本発明１００８]
前記細胞の前記ゲノムの前記標的領域が、Ｔ細胞受容体アルファ定常（ＴＲＡＣ）遺伝子座またはゲノムセーフハーバー（ＧＳＨ）である、本発明１００１～１００７のいずれかの細胞。
[本発明１００９]
前記ＤＮＡテンプレートが、異種配列を含む、本発明１００１～１００８のいずれかの細胞。
[本発明１０１０]
前記ＤＮＡテンプレートが、遺伝子を含む、本発明１００１～１００９のいずれかの細胞。
[本発明１０１１]
前記ＤＮＡテンプレートが、転写因子を含むプライミング受容体を含む、本発明１００１～１０１０のいずれかの細胞。
[本発明１０１２]
前記ＤＮＡテンプレートが、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含む、本発明１００１～１０１１のいずれかの細胞。
[本発明１０１３]
前記ＤＮＡテンプレートが、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）と、転写因子を含むプライミング受容体とを含む、本発明１００１～１０１２のいずれかの細胞。
[本発明１０１４]
前記ＤＮＡテンプレートが、前記キメラ抗原受容体に作動可能に連結された誘導性プロモーターを含む、本発明１００１～１０１３のいずれかの細胞。
[本発明１０１５]
前記ＤＮＡテンプレートが、前記プライミング受容体に作動可能に連結された構成的プロモーターを更に含む、本発明１００１～１０１４のいずれかの細胞。
[本発明１０１６]
前記ＤＮＡテンプレートが、前記キメラ抗原受容体に作動可能に連結された誘導性プロモーター、及び前記プライミング受容体に作動可能に連結された構成的プロモーターを更に含む、本発明１００１～１０１５のいずれかの細胞。
[本発明１０１７]
前記ＤＮＡテンプレートが、５’から３’の方向に、
ａ．前記誘導性プロモーター、
ｂ．前記キメラ抗原受容体、
ｃ．前記構成的プロモーター、及び
ｄ．前記プライミング受容体
を含む、本発明１００１～１０１６のいずれかの細胞。
[本発明１０１８]
前記ＤＮＡテンプレートが、５’から３’の方向に、
ａ．前記構成的プロモーター、
ｂ．前記プライミング受容体、
ｃ．前記誘導性プロモーター、及び
ｄ．前記キメラ抗原受容体
を含む、本発明１００１～１０１６のいずれかの細胞。
[本発明１０１９]
前記ＤＮＡテンプレートが、自己切断２Ａペプチド（Ｐ２Ａ）を更に含む、本発明１００１～１０２４のいずれかの細胞。
[本発明１０２０]
前記Ｐ２Ａの核酸が、前記ＤＮＡテンプレートの３’末端にある、本発明１００１～１０２３

のいずれかの細胞。
[本発明1021]
前記ＤＮＡテンプレートが、ウッドチャック肝炎ウイルス翻訳後調節エレメント（ＷＰＲＥ）を更に含む、本発明1001～1020のいずれかの細胞。
[本発明1022]
前記ＷＰＲＥが、前記ＣＡＲをコードする核酸の3’末端にあり、かつ前記プライミング受容体をコードする核酸の5’末端にある、または前記ＷＰＲＥが、前記プライミング受容体をコードする核酸の3’末端にあり、かつ前記ＣＡＲをコードする核酸の5’末端にある、本発明1021の細胞。
[本発明1023]
前記プライミング受容体が、Ｎ末端からＣ末端の方向に、
ａ．抗原に対する結合親和性を有する細胞外抗原結合ドメイン、
ｂ．1つ以上のリガンド誘導性タンパク質分解切断部位を含む、膜貫通ドメイン、及び
ｃ．ヒトまたはヒト化転写エフェクターを含む細胞内ドメインであって、
前記細胞外抗原結合ドメインへの抗原の結合が、前記リガンド誘導性タンパク質分解切断部位での切断をもたらし、それによって前記細胞内ドメインを放出する、
前記細胞内ドメイン
を含む、本発明1001～1022のいずれかの細胞。
[本発明1024]
前記プライミング受容体が、前記膜貫通ドメインと前記細胞内ドメインとの間に位置付けられた膜近傍ドメイン（ＪＭＤ）を更に含む、本発明1023の細胞。
[本発明1025]
前記転写因子が、前記誘導性プロモーターに結合し、かつ前記ＣＡＲの発現を誘導する、本発明1001～1024のいずれかの細胞。
[本発明1026]
前記ＣＡＲが、Ｎ末端からＣ末端へと、
ａ．抗原に対する結合親和性を有する細胞外抗原結合ドメイン、
ｂ．膜貫通ドメイン、
ｃ．細胞内共刺激ドメイン、及び
ｄ．細胞内活性化ドメイン
を含む、本発明1001～1025のいずれかの細胞。
[本発明1027]
前記プライミング受容体と前記ＣＡＲが、異なる抗原に結合する、本発明1001～1026のいずれかの細胞。
[本発明1028]
前記プライミング受容体と前記ＣＡＲが、同じ抗原に結合する、本発明1001～1026のいずれかの細胞。
[本発明1029]
前記免疫細胞が、初代ヒト免疫細胞である、本発明1001～1028のいずれかの細胞。
[本発明1030]
自己免疫細胞である、本発明1001～1029のいずれかの細胞。
[本発明1031]
ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、Ｔ細胞、ＣＤ8＋Ｔ細胞、ＣＤ4＋Ｔ細胞、初代Ｔ細胞、またはＴ細胞前駆細胞である、本発明1001～1030のいずれかの細胞。
[本発明1032]
初代Ｔ細胞である、本発明1001～1031のいずれかの細胞。
[本発明1033]
初代ヒトＴ細胞である、本発明1001～1032のいずれかの細胞。
[本発明1034]
ウイルスフリーである、本発明1001～1033のいずれかの細胞。

[本発明１０３５]
複数の、本発明１００１～１０３４のいずれかの初代免疫細胞
を含む、細胞の集団。
[本発明１０３６]
初代免疫細胞のゲノムの標的領域に挿入される少なくとも1つのＤＮＡテンプレートを含む初代免疫細胞であって、前記ＤＮＡテンプレートのサイズが、5キロ塩基対以上であり、かつ前記初代免疫細胞が、前記ＤＮＡテンプレートを前記初代免疫細胞に導入するためのウイルスベクターを含まない、前記初代免疫細胞。
[本発明１０３７]
初代免疫細胞のゲノムの標的領域に挿入される、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）と、転写因子を含むプライミング受容体とを含む、少なくとも1つのＤＮＡテンプレート
を含む、初代免疫細胞であって、前記ＤＮＡテンプレートのサイズが、5キロ塩基対以上であり、かつ前記初代免疫細胞が、前記ＤＮＡテンプレートを前記初代免疫細胞に導入するためのウイルスベクターを含まない、前記初代免疫細胞。
[本発明１０３８]
リボ核タンパク質複合体（ＲＮＰ）－ＤＮＡテンプレート複合体を含む生存可能なウイルスフリーの初代細胞であって、前記ＲＮＰが、ヌクレアーゼドメイン及びガイドＲＮＡを含み、前記ＤＮＡテンプレートのサイズが、5キロベースヌクレオチド以上のサイズであり、かつ前記ＤＮＡテンプレートの5’及び3’末端が、前記初代細胞のゲノム内の挿入部位に隣接するゲノム配列と相同であるヌクレオチド配列を含む、前記初代細胞。
[本発明１０３９]
リボ核タンパク質複合体（ＲＮＰ）－ＤＮＡテンプレート複合体を含む生存可能なウイルスフリーの初代細胞であって、前記ＲＮＰが、ヌクレアーゼドメイン及びガイドＲＮＡを含み、前記ＤＮＡテンプレートのサイズが、5キロベースヌクレオチド以上のサイズであり、前記ＤＮＡテンプレートが、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）と、転写因子を含むプライミング受容体とを含み、かつ前記ＤＮＡテンプレートの5’及び3’末端が、前記初代細胞のゲノム内の挿入部位に隣接するゲノム配列と相同であるヌクレオチド配列を含む、前記初代細胞。
[本発明１０４０]
本発明１００１～１０３９のいずれかの初代免疫細胞を対象に投与することを含む、対象における疾患を治療する方法。
[本発明１０４１]
前記疾患が、がんである、本発明１０４０の方法。
[本発明１０４２]
ＤＮＡテンプレートを含む非ウイルスベクターであって、前記ＤＮＡテンプレートが、5キロベースヌクレオチド以上のサイズであり、かつ前記ＤＮＡテンプレートの5’及び3’末端が、初代細胞のゲノム内の挿入部位に隣接するゲノム配列と相同であるヌクレオチド配列を含む、前記非ウイルスベクター。
[本発明１０４３]
前記ＤＮＡテンプレートの前記サイズが、約５．０ｋｂ、５．１ｋｂ、５．２ｋｂ、５．３ｋｂ、５．４ｋｂ、５．５ｋｂ、５．６ｋｂ、５．７ｋｂ、５．８ｋｂ、５．９ｋｂ、６．０ｋｂ、６．１ｋｂ、６．２ｋｂ、６．３ｋｂ、６．４ｋｂ、６．５ｋｂ、６．６ｋｂ、６．７ｋｂ、６．８ｋｂ、６．９ｋｂ、７．０ｋｂ、７．１ｋｂ、７．２ｋｂ、７．３ｋｂ、７．４ｋｂ、７．５ｋｂ、７．６ｋｂ、７．７ｋｂ、７．８ｋｂ、７．９ｋｂ、８．０ｋｂ、８．１ｋｂ、８．２ｋｂ、８．３ｋｂ、８．４ｋｂ、８．５ｋｂ、８．６ｋｂ、８．７ｋｂ、８．８ｋｂ、８．９ｋｂ、９．０ｋｂ、９．１ｋｂ、９．２ｋｂ、９．３ｋｂ、９．４ｋｂ、９．５ｋｂ、９．６ｋｂ、９．７ｋｂ、９．８ｋｂ、９．９ｋｂ、１０．０ｋｂ以上、またはこれらのサイズの間の任意のＤＮＡテンプレートサイズである、本発明１０４２の非ウイルスベクター。
[本発明１０４４]
前記ＤＮＡテンプレートの前記サイズが、約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約５ｋｂ～約９ｋｂ、

約５ｋｂ～約８ｋｂ、約５ｋｂ～約７ｋｂ、約５ｋｂ～約６ｋｂ、約６ｋｂ～約１０ｋｂ、約６ｋｂ～約９ｋｂ、約６ｋｂ～約８ｋｂ、約６ｋｂ～約７ｋｂ、約７ｋｂ～約１０ｋｂ、約７ｋｂ～約９ｋｂ、約７ｋｂ～約８ｋｂ、約８ｋｂ～約１０ｋｂ、約８ｋｂ～約９ｋｂ、または約９ｋｂ～約１０ｋｂである、本発明１０４２または１０４３の非ウイルスベクター。

[本発明１０４５]

前記細胞の前記ゲノムの標的領域が、Ｔ細胞受容体アルファ定常（ＴＲＡＣ）遺伝子座またはゲノムセーフハーバー（ＧＳＨ）である、本発明１０４２～１０４４のいずれかの非ウイルスベクター。

[本発明１０４６]

前記ＤＮＡテンプレートが、異種配列を含む、本発明１０４２～１０４４のいずれかの非ウイルスベクター。

[本発明１０４７]

前記ＤＮＡテンプレートが、遺伝子を含む、本発明１０４２～１０４４のいずれかの非ウイルスベクター。

[本発明１０４８]

前記ＤＮＡテンプレートが、転写因子を含むプライミング受容体を含む、本発明１０４２～１０４７のいずれかの非ウイルスベクター。

[本発明１０４９]

前記ＤＮＡテンプレートが、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含む、本発明１０４２～１０４８のいずれかの非ウイルスベクター。

[本発明１０５０]

前記ＤＮＡテンプレートが、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）と、転写因子を含むプライミング受容体とを含む、本発明１０４２～１０４９のいずれかの非ウイルスベクター。

[本発明１０５１]

前記ＤＮＡテンプレートが、前記キメラ抗原受容体に作動可能に連結された誘導性プロモーターを含む、本発明１０４２～１０５０のいずれかの非ウイルスベクター。

[本発明１０５２]

前記ＤＮＡテンプレートが、前記プライミング受容体に作動可能に連結された構成的プロモーターを更に含む、本発明１０４２～１０５１のいずれかの非ウイルスベクター。

[本発明１０５３]

前記ＤＮＡテンプレートが、前記キメラ抗原受容体に作動可能に連結された誘導性プロモーター、及び前記プライミング受容体に作動可能に連結された構成的プロモーターを更に含む、本発明１０４２～１０５２のいずれかの非ウイルスベクター。

[本発明１０５４]

前記ＤＮＡテンプレートが、５’から３’の方向に、

ａ．前記誘導性プロモーター、

ｂ．前記キメラ抗原受容体、

ｃ．前記構成的プロモーター、及び

ｄ．前記プライミング受容体

を含む、本発明１０４２～１０５２のいずれかの非ウイルスベクター。

[本発明１０５５]

前記ＤＮＡテンプレートが、５’から３’の方向に、

ａ．前記構成的プロモーター、

ｂ．前記プライミング受容体、

ｃ．前記誘導性プロモーター、及び

ｄ．前記キメラ抗原受容体

を含む、本発明１０４２～１０５２のいずれかの非ウイルスベクター。

[本発明１０５６]

前記ＤＮＡテンプレートが、自己切断２Ａペプチド（Ｐ２Ａ）を更に含む、本発明１０４２～１０６０のいずれかの非ウイルスベクター。

[本発明１０５７]
前記Ｐ２Ａが、前記ＤＮＡテンプレートの３’末端にある、本発明１０４２～１０５６のいずれかの非ウイルスベクター。
[本発明１０５８]
前記ＤＮＡテンプレートが、ウッドチャック肝炎ウイルス翻訳後調節エレメント（ＷＰＲＥ）を更に含む、本発明１０４２～１０５７のいずれかの非ウイルスベクター。
[本発明１０５９]
前記プライミング受容体が、Ｎ末端からＣ末端の方向に、
ａ．抗原に対する結合親和性を有する細胞外抗原結合ドメイン、
ｂ．１つ以上のリガンド誘導性タンパク質分解切断部位を含む、膜貫通ドメイン、及び
ｃ．ヒトまたはヒト化転写エフェクターを含む細胞内ドメインであって、
前記細胞外抗原結合ドメインへの抗原の結合が、前記リガンド誘導性タンパク質分解切断部位での切断をもたらし、それによって前記細胞内ドメインを放出する、
前記細胞内ドメイン
を含む、本発明１０４２～１０５３のいずれかの非ウイルスベクター。
[本発明１０６０]
前記プライミング受容体が、前記膜貫通ドメインと前記細胞内ドメインとの間に位置付けられた膜近傍ドメイン（ＪＭＤ）を更に含む、本発明１０５９の非ウイルスベクター。
[本発明１０６１]
前記転写因子が、前記誘導性プロモーターに結合し、かつ前記ＣＡＲの発現を誘導する、本発明１０４２～１０５８のいずれかの非ウイルスベクター。
[本発明１０６２]
前記ＣＡＲが、Ｎ末端からＣ末端へと、
ａ．抗原に対する結合親和性を有する細胞外抗原結合ドメイン、
ｂ．膜貫通ドメイン、
ｃ．細胞内共刺激ドメイン、及び
ｄ．細胞内活性化ドメイン
を含む、本発明１０４２～１０５８のいずれかの非ウイルスベクター。
[本発明１０６３]
前記プライミング受容体と前記ＣＡＲが、異なる抗原に結合する、本発明１０４２～１０５８のいずれかの非ウイルスベクター。
[本発明１０６４]
前記プライミング受容体と前記ＣＡＲが、同じ抗原に結合する、本発明１０４２～１０５８のいずれかの非ウイルスベクター。
[本発明１０６５]
初代免疫細胞を編集する方法であって、以下：
ａ．リボ核タンパク質複合体（ＲＮＰ）－ＤＮＡテンプレート複合体を提供することであって、前記ＲＮＰが、ヌクレアーゼドメイン及びガイドＲＮＡを含み、前記ＤＮＡテンプレートのサイズが、５キロベースヌクレオチド以上のサイズであり、かつ前記ＤＮＡテンプレートの５’及び３’末端が、前記初代免疫細胞のゲノム内の挿入部位に隣接するゲノム配列と相同であるヌクレオチド配列を含む、前記提供することと、
ｂ．前記ＲＮＰ－ＤＮＡテンプレート複合体を前記初代免疫細胞に非ウイルス的に導入することであって、前記ガイドＲＮＡが、前記初代免疫細胞の前記ゲノムの標的領域に特異的にハイブリダイズし、かつ前記ヌクレアーゼドメインが、前記標的領域を切断して、前記初代免疫細胞の前記ゲノム内に前記挿入部位を作製する、前記非ウイルス的に導入することと、
ｃ．前記ＤＮＡテンプレートを前記初代免疫細胞の前記ゲノム内の前記挿入部位に挿入することを介して前記初代免疫細胞を編集することと
を含む、前記方法。
[本発明１０６６]

非ウイルス的に導入することが、エレクトロポレーションを含む、本発明1065の方法。

[本発明1067]

前記ヌクレアーゼドメインが、ＣＲＩＳＰＲ関連エンドヌクレアーゼ（Ｃａｓ）、任意選択でＣａｓ9ヌクレアーゼを含む、本発明1065または1066の方法。

[本発明1068]

前記ＤＮＡテンプレートの前記サイズが、約５．０ｋｂ、５．１ｋｂ、５．２ｋｂ、５．３ｋｂ、５．４ｋｂ、５．５ｋｂ、５．６ｋｂ、５．７ｋｂ、５．８ｋｂ、５．９ｋｂ、６．０ｋｂ、６．１ｋｂ、６．２ｋｂ、６．３ｋｂ、６．４ｋｂ、６．５ｋｂ、６．６ｋｂ、６．７ｋｂ、６．８ｋｂ、６．９ｋｂ、７．０ｋｂ、７．１ｋｂ、７．２ｋｂ、７．３ｋｂ、７．４ｋｂ、７．５ｋｂ、７．６ｋｂ、７．７ｋｂ、７．８ｋｂ、７．９ｋｂ、８．０ｋｂ、８．１ｋｂ、８．２ｋｂ、８．３ｋｂ、８．４ｋｂ、８．５ｋｂ、８．６ｋｂ、８．７ｋｂ、８．８ｋｂ、８．９ｋｂ、９．０ｋｂ、９．１ｋｂ、９．２ｋｂ、９．３ｋｂ、９．４ｋｂ、９．５ｋｂ、９．６ｋｂ、９．７ｋｂ、９．８ｋｂ、９．９ｋｂ、１０．０ｋｂ以上、またはこれらのサイズの間の任意のＤＮＡテンプレートサイズである、本発明1065～1067のいずれかの方法。

[本発明1069]

前記ＤＮＡテンプレートの前記サイズが、約５ｋｂ～約１０ｋｂ、約５ｋｂ～約９ｋｂ、約５ｋｂ～約８ｋｂ、約５ｋｂ～約７ｋｂ、約５ｋｂ～約６ｋｂ、約６ｋｂ～約１０ｋｂ、約６ｋｂ～約９ｋｂ、約６ｋｂ～約８ｋｂ、約６ｋｂ～約７ｋｂ、約７ｋｂ～約１０ｋｂ、約７ｋｂ～約９ｋｂ、約７ｋｂ～約８ｋｂ、約８ｋｂ～約１０ｋｂ、約８ｋｂ～約９ｋｂ、または約９ｋｂ～約１０ｋｂである、本発明1065～1068のいずれかの方法。

[本発明1070]

前記細胞の前記ゲノムの前記標的領域が、Ｔ細胞受容体アルファ定常（ＴＲＡＣ）遺伝子座またはゲノムセーフハーバー（ＧＳＨ）である、本発明1065～1069のいずれかの方法。

[本発明1071]

前記ＤＮＡテンプレートが、二本鎖ＤＮＡテンプレートまたは一本鎖ＤＮＡテンプレートである、本発明1065～1070のいずれかの方法。

[本発明1072]

前記ＤＮＡテンプレートが、直鎖ＤＮＡテンプレートまたは環状ＤＮＡテンプレートであり、任意選択で、前記環状ＤＮＡテンプレートが、プラスミドである、本発明1065～1071のいずれかの方法。

[本発明1073]

前記ＤＮＡテンプレートが、異種配列を含む、本発明1065～1072のいずれかの方法。

[本発明1074]

前記ＤＮＡテンプレートが、遺伝子を含む、本発明1065～1073のいずれかの方法。

[本発明1075]

前記ＤＮＡテンプレートが、転写因子を含むプライミング受容体を含む、本発明1065～1074のいずれかの方法。

[本発明1076]

前記ＤＮＡテンプレートが、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含む、本発明1065～1075のいずれかの方法。

[本発明1077]

前記ＤＮＡテンプレートが、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）と、転写因子を含むプライミング受容体とを含む、本発明1065～1076のいずれかの方法。

[本発明1078]

前記ＤＮＡテンプレートが、前記キメラ抗原受容体に作動可能に連結された誘導性プロモーターを含む、本発明1065～1077のいずれかの方法。

[本発明1079]

前記ＤＮＡテンプレートが、前記プライミング受容体に作動可能に連結された構成的プロモーターを更に含む、本発明1065～1078のいずれかの方法。

[本発明１０８０]
前記ＤＮＡテンプレートが、前記キメラ抗原受容体に作動可能に連結された誘導性プロモーター、及び前記プライミング受容体に作動可能に連結された構成的プロモーターを更に含む、本発明１０６５～１０７９のいずれかの方法。
[本発明１０８１]
前記ＤＮＡテンプレートが、５’から３’の方向に、
ａ．前記誘導性プロモーター、
ｂ．前記キメラ抗原受容体、
ｃ．前記構成的プロモーター、及び
ｄ．前記プライミング受容体
を含む、本発明１０６５～１０８０のいずれかの方法。
[本発明１０８２]
前記ＤＮＡテンプレートが、５’から３’の方向に、
ａ．前記構成的プロモーター、
ｂ．前記プライミング受容体、
ｃ．前記誘導性プロモーター、及び
ｄ．前記キメラ抗原受容体
を含む、本発明１０６５～１０８０のいずれかの方法。
[本発明１０８３]
前記ＤＮＡテンプレートが、自己切断２Ａペプチド（Ｐ２Ａ）を更に含む、本発明１０６５～１０８２のいずれかの方法。
[本発明１０８４]
前記Ｐ２Ａの核酸が、前記ＤＮＡテンプレートの３’末端にある、本発明１０８３の方法。
[本発明１０８５]
前記ＤＮＡテンプレートが、ウッドチャック肝炎ウイルス翻訳後調節エレメント（ＷＰＲＥ）を更に含む、本発明１０６５～１０８４のいずれかの方法。
[本発明１０８６]
前記ＷＰＲＥが、前記ＣＡＲをコードする核酸の３’末端にあり、かつ前記プライミング受容体をコードする核酸の５’末端にある、または前記ＷＰＲＥが、前記プライミング受容体をコードする核酸の３’末端にあり、かつ前記ＣＡＲをコードする核酸の５’末端にある、本発明１０８５の方法。
[本発明１０８７]
前記プライミング受容体が、Ｎ末端からＣ末端の方向に、
ａ．抗原に対する結合親和性を有する細胞外抗原結合ドメイン、
ｂ．１つ以上のリガンド誘導性タンパク質分解切断部位を含む、膜貫通ドメイン、及び
ｃ．ヒトまたはヒト化転写エフェクターを含む細胞内ドメインであって、
前記細胞外抗原結合ドメインへの抗原の結合が、前記リガンド誘導性タンパク質分解切断部位での切断をもたらし、それによって前記細胞内ドメインを放出する、
前記細胞内ドメイン
を含む、本発明１０６５～１０８６のいずれかの方法。
[本発明１０８８]
前記プライミング受容体が、前記膜貫通ドメインと前記細胞内ドメインとの間に位置付けられた膜近傍ドメイン（ＪＭＤ）を更に含む、本発明１０８７の方法。
[本発明１０８９]
前記転写因子が、前記誘導性プロモーターに結合し、かつ前記ＣＡＲの発現を誘導する、本発明１０６５～１０８８のいずれかの方法。
[本発明１０９０]
前記ＣＡＲが、Ｎ末端からＣ末端へと、
ａ．抗原に対する結合親和性を有する細胞外抗原結合ドメイン、
ｂ．膜貫通ドメイン、

ｃ．細胞内共刺激ドメイン、及び
ｄ．細胞内活性化ドメイン
を含む、本発明１０６５～１０８９のいずれかの方法。
[本発明１０９１]
前記プライミング受容体と前記ＣＡＲが、異なる抗原に結合する、本発明１０６５～１０９０のいずれかの方法。
[本発明１０９２]
前記プライミング受容体と前記ＣＡＲが、同じ抗原に結合する、本発明１０６５～１０９０のいずれかの方法。
[本発明１０９３]
前記免疫細胞が、初代ヒト免疫細胞である、本発明１０６５～１０９２のいずれかの方法。
[本発明１０９４]
前記初代免疫細胞が、自己免疫細胞である、本発明１０６５～１０９３のいずれかの方法。
[本発明１０９５]
前記初代免疫細胞が、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、Ｔ細胞、ＣＤ８＋Ｔ細胞、ＣＤ４＋Ｔ細胞、初代Ｔ細胞、またはＴ細胞前駆細胞である、本発明１０６５～１０９４のいずれかの方法。
[本発明１０９６]
前記初代免疫細胞が、初代Ｔ細胞である、本発明１０６５～１０９５のいずれかの方法。
[本発明１０９７]
前記初代免疫細胞が、初代ヒトＴ細胞である、本発明１０６５～１０９６のいずれかの方法。
[本発明１０９８]
前記初代免疫細胞が、ウイルスフリーである、本発明１０６５～１０９７のいずれかの方法。
[本発明１０９９]
患者から前記免疫細胞を得ることと、前記プラスミドをインビトロで導入することとを更に含む、本発明１０６５～１０９８のいずれかの方法。
[本発明１１００]
初代免疫細胞を編集する方法であって、以下：
ａ．リボ核タンパク質複合体（ＲＮＰ）－ＤＮＡテンプレート複合体を提供することであって、前記ＲＮＰが、ヌクレアーゼドメイン及びガイドＲＮＡを含み、前記ＤＮＡテンプレートのサイズが、5キロベースヌクレオチド以上のサイズであり、前記ＤＮＡテンプレートが、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）と、転写因子を含むプライミング受容体とを含み、かつ前記ＤＮＡテンプレートの5’及び3’末端が、前記初代免疫細胞のゲノム内の挿入部位に隣接するゲノム配列と相同であるヌクレオチド配列を含む、前記提供することと、
ｂ．前記ＲＮＰ－ＤＮＡテンプレート複合体を前記初代免疫細胞に非ウイルス的に導入することであって、前記ガイドＲＮＡが、前記初代免疫細胞の前記ゲノムの標的領域に特異的にハイブリダイズし、かつ前記ヌクレアーゼドメインが、前記標的領域を切断して、前記初代免疫細胞の前記ゲノム内に前記挿入部位を作製する、前記非ウイルス的に導入することと、
ｃ．前記ＤＮＡテンプレートを前記初代免疫細胞の前記ゲノム内の前記挿入部位に挿入することを介して前記初代免疫細胞を編集することと
を含む、前記方法。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１２１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１２１】
【図１３Ａ】ｉＧｕｉｄｅ－Ｓｅｑアッセイ技法を示す概略図を含む。
【図１３Ｂ】指示された組込み部位について、ｉＧｕｉｄｅ　Ｓｅｑアッセイを使用する

、オンターゲット効率を示すプロットを含む。
【図１３Ｃ】ＧＳ９４が２つのドナーにわたって再現可能な推定オフターゲットを有しなかったことを示す、ｉＧｕｉｄｅ－Ｓｅｑ分析からの概略図を含む。図は、掲載順に、配列番号１２７～１３７、１２７、１２８、および１３８～１４６をそれぞれ開示する。
【手続補正３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１９７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１９７】
いくつかの実施形態において、プライミング受容体は、Ｓ２またはＳ３などのＮｏｔｃｈ切断部位を含む。本明細書に開示される組成物及び方法に好適な追加のタンパク質分解切断部位には、コラゲナーゼ－１、－２、及び－３（ＭＭＰ－１、－８、及び－１３）、ゼラチナーゼＡ及びＢ（ＭＭＰ－２及び－９）、ストロメリシン１、２、及び３（ＭＭＰ－３、－１０、及び－１１）、マトリリシン（ＭＭＰ－７）、及び膜メタロプロテアーゼ（ＭＴ１－ＭＭＰ及びＭＴ２－ＭＭＰ）から選択されるＭＭＰのメタロプロテイナーゼ切断部位が含まれるが、これらに限定されない。好適なプロテアーゼ切断部位の別の例は、プラスミノーゲン活性化因子切断部位、例えば、ウロキナーゼプラスミノーゲン活性化因子（ｕＰＡ）または組織プラスミノーゲン活性化因子（ｔＰＡ）切断部位である。好適なプロテアーゼ切断部位の別の例は、プロラクチン切断部位である。ｕＰＡ及びｔＰＡの切断配列の具体例としては、Ｙａｌ－Ｇｌｙ－Ａｒｇを含む配列が挙げられる。タンパク質分解的に切断可能なリンカーに含まれ得るプロテアーゼ切断部位の別の例は、タバコエッチウイルス（ＴＥＶ）プロテアーゼ切断部位、例えば、Ｇｌｕ－Ａｓｎ－Ｌｅｕ－Ｔｙｒ－Ｔｈｒ－Ｇｌｎ－Ｓｅｒ（配列番号１２１）であり、ここで、プロテアーゼは、グルタミンとセリンとの間で切断する。タンパク質分解的に切断可能なリンカーに含まれ得るプロテアーゼ切断部位の別の例は、エンテロキナーゼ切断部位、例えば、Ａｓｐ－Ａｓｐ－Ａｓｐ－Ａｓｐ－Ｌｙｓ（配列番号１２２）であり、ここで、切断は、リジン残基の後に生じる。タンパク質分解的に切断可能なリンカーに含まれ得るプロテアーゼ切断部位の別の例は、トロンビン切断部位、例えば、Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ（配列番号１２３）である。プロテアーゼ切断部位を含む追加の好適なリンカーとしては、以下のプロテアーゼによって切断可能な配列が挙げられる：ＰｒｅＳｃｉｓｓｉｏｎ（商標）プロテアーゼ（ヒトライノウイルス３Ｃプロテアーゼ及びグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼを含む融合タンパク質）、トロンビン、カテプシンＢ、エプスタイン－バーウイルスプロテアーゼ、ＭＭＰ－３（ストロメリシン）、ＭＭＰ－７（マトリリシン）、ＭＭＰ－９；サーモリシン様ＭＭＰ、マトリックスメタロプロテアーゼ２（ＭＭＰ－２）、カテプシンＬ；カテプシンＤ、マトリックスメタロプロテアーゼ１（ＭＭＰ－１）、ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子、膜１型マトリックスメタロプロテアーゼ（ＭＴ－ＭＭＰ）、ストロメリシン３（またはＭＭＰ－１１）、サーモリシン、線維芽細胞コラゲナーゼ及びストロメリシン－１、マトリックスメタロプロテアーゼ１３（コラゲナーゼ－３）、組織型プラスミノーゲン活性化因子（ｔＰＡ）、ヒト前立腺特異的抗原、カリクレイン（ｈＫ３）、好中球エラスターゼ、及びカルパイン（カルシウム活性化中性プロテアーゼ）。受容体が発現される宿主細胞に天然ではないプロテアーゼ（例えば、ＴＥＶ）を更なる調節機構として使用することができ、プロテアーゼが発現されるか、または他の方法で提供されるまで、受容体の活性化が低減する。追加として、プロテアーゼは、腫瘍関連または疾患関連（正常組織よりも有意に高い程度に発現される）であり得、独立した調節機構として機能する。例えば、いくつかのマトリックスメタロプロテアーゼは、ある特定のがんタイプにおいて高度に発現される。
【手続補正４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２０６

【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２０６】
いくつかの実施形態において、プライミング受容体は、ヒンジを更に含む。プライミング受容体において使用され得るヒンジリンカーは、分子間ジスルフィド結合を介してキメラポリペプチドのオリゴマー形成を促進する１つ以上のポリペプチドモチーフを含有するオリゴマー化ドメイン（例えば、ヒンジドメイン）を含み得る。これらの事例では、本明細書に開示されるキメラ受容体内で、ヒンジドメインは、一般に、ＥＣＤとＴＭＤとの間に配置される可撓性ポリペプチドコネクター領域を含む。したがって、ヒンジドメインは、ＥＣＤとＴＭＤとの間の柔軟性を提供し、また、２つ以上のキメラポリペプチドモノマー間の分子間ジスルフィド結合のための部位を提供して、オリゴマー複合体を形成する。いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、本明細書に開示されるキメラポリペプチドの二量体形成を促進するモチーフを含む。いくつかの実施形態において、ヒンジドメインは、本明細書に開示されるキメラポリペプチド（例えば、ＯＸ４０由来のヒンジドメイン）の三量体形成を促進するモチーフを含む。本開示の組成物及び方法に好適なヒンジポリペプチド配列は、天然に存在するヒンジポリペプチド配列（例えば、天然に存在する免疫グロブリン由来のもの）であり得るか、または所望の及び／または改善された特性、例えば、転写を調節する特性を提供するように操作、設計、または修飾され得る。好適なヒンジポリペプチド配列には、ＩｇＡ、ＩｇＤ、及びＩｇＧ１ヒンジドメイン、ＩｇＧ２ヒンジドメイン、ＩｇＧ３ヒンジドメイン、及びＩｇＧ４ヒンジドメインなどのＩｇＧサブクラス、またはそれらの機能的バリアントに由来するものが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、ヒンジポリペプチド配列は、１つ以上のＣＸＸＣモチーフを含有する。いくつかの実施形態において、ヒンジポリペプチド配列は、１つ以上のＣＰＰＣモチーフ（配列番号１２４）を含有する。
【手続補正５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２８２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２８２】
ヒト染色体１９上のＡＡＶＳ１（ＰＰＰ１Ｒ１２Ｃ遺伝子座としても知られる）は、期待される機能を有する導入遺伝子（例えば、ＤＮＡ導入遺伝子）をホストするための既知のＳＨＳである。それは、１９ｑ１３．４２位にある。それは、オープンクロマチン構造を有し、転写能がある。ＡＡＶＳ１の正準ＳＨＳ遺伝子座は、ｃｈｒ１９：５５，６２５，２４１～５５，６２９，３５１である。Ｐｅｌｌｅｎｚ ｅｔ ａｌ．“Ｎｅｗ Ｈｕｍａｎ Ｃｈｒｏｍｏｓｏｍａｌ Ｓｉｔｅｓ ｗｉｔｈ“Ｓａｆｅ Ｈａｒｂｏｒ”Ｐｏｔｅｎｔｉａｌ ｆｏｒ Ｔａｒｇｅｔｅｄ Ｔｒａｎｓｇｅｎｅ Ｉｎｓｅｒｔｉｏｎ．”Ｈｕｍａｎ ｇｅｎｅ ｔｈｅｒａｐｙ ｖｏｌ．３０，７（２０１９）：８１４－８２８（この関連開示は、参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。例示的なＡＡＶＳ１標的ｇＲＮＡ及び標的配列を以下に提供する。
●ＡＡＶＳ１－ｇＲＮＡ配列：ｇｇｇｇｃｃａｃｔａｇｇｇａｃａｇｇａｔＧＴＴＴＴＡＧＡＧＣＴＡＧＡＡＡＴＡＧＣＡＡＧＴＴＡＡＡＡＴＡＡＧＧＣＴＡＧＴＣＣＧＴＴＡＴＣＡＡＣＴＴＧＡＡＡＡＡＧＴＧＧＣＡＣＣＧＡＧＴＣＧＧＴＧＣＴＴＴＴＴＴＴＴ（配列番号１２５）
●ＡＡＶＳ１標的配列：ｇｇｇｇｃｃａｃｔａｇｇｇａｃａｇｇａｔ（配列番号１２６）
【手続補正６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】追加

【補正の内容】
【配列表】
2023543137000001.app

【国際調査報告】

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/US 21/48066

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - C12N 15/90, C12N 9/22, C12N 15/63 (2021.01)
CPC - C12N 15/907, C12N 2310/20 , C12N 15/902, C12N 15/111, C12N 15/102

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X<br>--<br>Y | US 2020/0149070 A1 (LIGANDAL, INC.) 14 May 2020 (14.05.2020) abstract; para [0004]-[0005], [0176], [0209], [0214], [0217], [0264], [0397], [0402], [0407], [0409]-[0410], [0421], [0484], [0491], [0493] | 1-3, 36, 38, 42-44<br>--<br>37, 39 |
| Y | ROYBAL et al. Precision Tumor Recognition by T Cells With Combinatorial Antigen-Sensing Circuits. Cell. 11 February 2016, Vol. 164, No. 4, pg 770-779; especially pg 770, col 2, para 3 - pg 771, col 1, para 1 | 37, 39 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 03 January 2022 | FEB 04 2022 |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. 571-273-8300 | Authorized officer<br>Kari Rodriquez<br>Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300 |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/US 21/48066

**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.: 4-35, 40-41, 45-64 and 68-99
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:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I: Claims 1-3, 36-39 and 42-44, directed to primary immune cell comprising a DNA template (5 kb or greater) comprising a chimeric antigen receptor (CAR) and a priming receptor comprising a transcription factor inserted into a target region of the genome of the cell, the template having 5' and 3' ends that are homologous to genomic sequences flanking the target region, wherein the primary immune cell does not comprise a viral vector for introducing the DNA template the cell, wherein the cell further comprises a ribonucleoprotein complex (RNP) that comprises a nuclease domain and a guide RNA.

Continued on Supplemental Page

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-3, 36-39 and 42-44

**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.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/US 21/48066

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

Group II: Claims 65-67 and 100, directed to a method of editing a primary immune cell, comprising (a) providing a (5 kb or greater) DNA template the template having 5' and 3' ends that are homologous to genomic sequences flanking an insertion site in the genome, and a RNP complex comprising a nuclease domain and a guide RNA, (b) non-virally introducing the DNA template and RNP into the cell and (c) editing the genome of the primary immune cell.

The inventions listed as Groups I through II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

Group I requires an isolated composition comprising a primary immune cell, the cell comprising a DNA template encoding a CAR, and a RNP, not required by group II.

Group II requires a method of editing a primary immune cell, not required by group I.

Common Technical Features

The common technical feature shared by Groups I and II, is a non-virally produced primary immune cell comprising a DNA template, 5 kb or greater, encoding a RNP, a CAR, and a priming receptor comprising a transcription factor, the template having 5' and 3' ends that are homologous to genomic sequences flanking an insertion site in the genome of said cell, wherein the cell does not comprise a viral vector for introducing the DNA template. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is taught by US 2019/0376086 A1 to Pact Pharma Inc. (hereinafter 'Pact') in view of the publication entitled "Precision Tumor Recognition by T Cells With Combinatorial Antigen-Sensing Circuits" by Roybal et al. (hereinafter 'Roybal') (Cell, 11 February 2016, vol 164, no 4, pp 770-779).

Pact teaches editing primary cells without use of a viral vector (abstract "compositions are provided for nuclease-mediated gene editing of primary cells without the use of viral mediated delivery") wherein cells may be immune cells (para [0040] "In some embodiments, the modified cell comprises an immune cell. In some embodiments, the immune cell comprises a T cell ... In some embodiments, the immune cell is selected from the group consisting of: a B cell, a monocyte, a macrophage, a dendritic cell, and a natural killer T cell") the cell comprising a (e.g. exogenous) DNA template a RNP (nuclease and gRNA), the template being 5kb or greater further comprising 5' and 3' ends that are homologous to the target site (para [0222] "a modified cell can have an integrated polynucleotide encoding an exogenous sequence ... a modified cell can have a CRISPR/Cas9 RNP that targets an endogenous locus and a homology repair template (HRT) that encodes an exogenous sequence.", para [0287] Exogenous sequences can be ... between 1000-10,000 bases in length", para [0277] "sequences found at the 5' and 3' ends of the HR template (i.e., the nucleotide sequences identical to the first and the second regions of the endogenous genomic target locus), with respect to the exogenous sequence to be introduced, are generally referred to as arms (HR arms). HR arms can be identical to regions of the endogenous genomic target locus") and a CAR (para [0304] "cells can be modified such that they are genomically edited, or are capable of being genomically edited, to express any exogenous gene of interest. For example, an exogenous gene of interest ("at least a portion of a gene") can include a chimeric antigen receptor (CAR). Pact does not specifically disclose that the cell further comprises a priming receptor comprising a transcription factor, however, Roybal discloses use of priming receptors comprising a transcription factor for conditional expression of a CAR (pg 770, col 2, para 3 - pg 771, col 1, para 1 - "we have developed a new class of modular receptors called synthetic Notch (synNotch) receptors... SynNotch receptors use an extracellular recognition domain... to recognize a target antigen... ligand engagement leads to cleavage of the receptor and to release of a transcriptional activator domain, which can in turn enter the nucleus and drive expression of user specified target genes (Figure 1C). ... Here, we show that we can construct combinatorial antigen recognition T cell circuits in which a synNotch receptor for one antigen drives the inducible expression of a CAR for a second antigen (Figure 1D). ... These combinatorially gated T cells show a remarkable degree of therapeutic discrimination both in vitro and in vivo-sparing single antigen 'bystander' tumors while efficiently eradicating combinatorial antigen "disease" tumors."; Note, synthetic Notch receptors are indicated 'priming receptors' by the instant specification, see instant para [00191]-[00192]). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art to modify the cell comprising a CAR, as disclosed by Pact, to include a priming receptor, such as synNotch, as disclosed by Roybal, since this would allow conditional, inducible expression of the CAR, thereby reducing bystander effects, as specifically taught by Roybal, and therefore providing any improvement in clinical outcome when used to treat a subject.

As the technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Groups I and II therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Item 4, continued: claims 4-35, 40-41, 45-64 and 68-99 are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a) regarding multiply dependent claims.

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） |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *C12N* | *15/09* | *(2006.01)* | C12N | 15/09 | 110 | |
| *A61P* | *35/00* | *(2006.01)* | A61P | 35/00 | | |
| *A61K* | *48/00* | *(2006.01)* | A61K | 48/00 | | |
| *A61K* | *35/17* | *(2015.01)* | A61K | 35/17 | | |

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

弁理士　佐藤 利光
(74)代理人　100188433
弁理士　梅村 幸輔
(74)代理人　100128048
弁理士　新見 浩一
(74)代理人　100129506
弁理士　小林 智彦
(74)代理人　100205707
弁理士　小寺 秀紀
(74)代理人　100114340
弁理士　大関 雅人
(74)代理人　100214396
弁理士　塩田 真紀
(74)代理人　100121072
弁理士　川本 和弥
(72)発明者　クーパー アーロン
アメリカ合衆国 ９４０８０ カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ タワー プレイス ２ スイート ７００ アーセナル バイオサイエンシズ インコーポレイテッド内
(72)発明者　グエン ミシェル
アメリカ合衆国 ９４０８０ カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ タワー プレイス ２ スイート ７００ アーセナル バイオサイエンシズ インコーポレイテッド内
(72)発明者　ヤオ アンジー
アメリカ合衆国 ９４０８０ カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ タワー プレイス ２ スイート ７００ アーセナル バイオサイエンシズ インコーポレイテッド内
(72)発明者　サントロ スティーブン
アメリカ合衆国 ９４０８０ カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ タワー プレイス ２ スイート ７００ アーセナル バイオサイエンシズ インコーポレイテッド内

Ｆターム（参考）　4B065　AA93X AA94X AB01 BA02 BA03 CA44
4C084　AA13 MA52 MA55 MA56 MA58 MA59 MA63 MA65 MA66 NA14 ZB261 ZB262
4C087　AA01 AA02 BB43 BB65 NA14 ZB26