(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公表特許公報(A)　　(11)公表番号
特表2022-520402
(P2022-520402A)
(43)公表日　令和4年3月30日(2022.3.30)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10	４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*15/13 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/13	ＺＮＡ　４Ｃ０８７
Ｃ１２Ｎ	*15/12 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/12	
Ｃ１２Ｎ	*15/62 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/62	Ｚ
Ｃ１２Ｎ	*5/0783(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0783	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全152頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-547225(P2021-547225)
(86)(22)出願日　令和2年2月14日(2020.2.14)
(85)翻訳文提出日　令和3年9月29日(2021.9.29)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/018443
(87)国際公開番号　WO2020/168300
(87)国際公開日　令和2年8月20日(2020.8.20)
(31)優先権主張番号　62/841,684
(32)優先日　令和1年5月1日(2019.5.1)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/841,066
(32)優先日　平成31年4月30日(2019.4.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/943,649
最終頁に続く

(71)出願人　517372508
エディタス・メディシン、インコーポレイテッド
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州　０２１４１、ケンブリッジ、ハーレー・ストリート　１１
(74)代理人　100095832
弁理士　細田 芳徳
(74)代理人　100187850
弁理士　細田 芳弘
(72)発明者　ウェルステッド，ゴードン，グラント
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４５９ ニュートン，デボン テラス １２
(72)発明者　ボルヘス，クリストファー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０１
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　免疫療法のための改変ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞

(57)【要約】
本開示は、例えば、発達的に成熟したＴ細胞などの細胞に由来する誘導万能性細胞からのＮＫ細胞（又はその他のリンパ球）の生成、及び免疫療法のためのその使用に関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ａ）内在性ＣＤ３、ＣＤ４、及び／又はＣＤ８を発現せず；
（ｂ）
（ｉ）ＣＤ５６（ＮＣＡＭ）、ＣＤ４９、及び／又はＣＤ４５；
（ｉｉ）ＮＫ細胞受容体免疫グロブリンγＦｃ領域受容体ＩＩＩ（ＦｃγＲＩＩＩ、分化抗原群１６（ＣＤ１６））；
（ｉｉｉ）ナチュラルキラーグループ２メンバーＤ（ＮＫＧ２Ｄ）；
（ｉｖ）ＣＤ６９；
（ｖ）天然細胞傷害性受容体；
又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせをコード化する少なくとも１つの内在性遺伝子を発現し、
さらに、
（１）
（ｉ）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）；
（ｉｉ）ＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）の非天然変異型；
（ｉｉｉ）インターロイキン１５（ＩＬ－１５）；
（ｉｖ）ＩＬ－１５受容体（ＩＬ－１５Ｒ）、若しくはその変異型；
（ｖ）インターロイキン１２（ＩＬ－１２）；
（ｖｉ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）、若しくはその変異型；
（ｖｉｉ）ヒト白血球抗原Ｇ（ＨＬＡ－Ｇ）；
（ｖｉｉｉ）ヒト白血球抗原Ｅ（ＨＬＡ－Ｅ）；
（ｉｘ）白血球表面抗原分化抗原群ＣＤ４７（ＣＤ４７）；
又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせをコード化する核酸配列を含んでなる少なくとも１つの外因性核酸発現コンストラクトを含んでなり、
及び／又は
（２）
（ｉ）形質転換成長因子β受容体２（ＴＧＦβＲ２）；
（ｉｉ）アデノシンＡ２ａ受容体（ＡＤＯＲＡ２Ａ）；
（ｉｉｉ）Ｉｇ及びＩＴＩＭドメインを備えたＴ細胞免疫受容体（ＴＩＧＩＴ）；
（ｉｖ）β－２ミクログロブリン（ｍｉｃｒｏｇｏｂｕｌｉｎ）（Ｂ２Ｍ）；
（ｖ）プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１）；
（ｖｉ）サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）；
（ｖｉｉ）クラスＩＩ、主要組織適合性複合体、トランス活性化剤（ＣＩＩＴＡ）；
（ｖｉｉｉ）ナチュラルキラー細胞受容体ＮＫＧ２Ａ（ナチュラルキラーグループ２Ａ）；
（ｉｘ）２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子、及び／又は２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子；
（ｘ）分化抗原群３２Ｂ（ＣＤ３２Ｂ、ＦＣＧＲ２Ｂ）；
（ｘｉ）Ｔ細胞受容体αコンスタント（ＴＲＡＣ）；
又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせ
の少なくとも１つの機能喪失を示す、改変リンパ球。
【請求項２】
前記リンパ球が、
（ｉ）ＴＧＦβＲ２、ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ、ＡＤＯＲＡ２Ａ、又はＮＫＧ２Ａ；
（ｉｉ）ＴＧＦβＲ２及びＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２及びＴＩＧＩＴ、ＴＧＦβＲ２及びＡＤＯＲＡ２Ａ、ＴＧＦβＲ２及びＮＫＧ２Ａ、ＣＩＳＨ及びＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ及びＡＤＯＲＡ２Ａ、ＣＩＳＨ及びＮＫＧ２Ａ、ＴＩＧＩＴ及びＡＤＯＲＡ２Ａ、ＴＩＧＩＴ及びＮＫＧ２Ａ、又はＡＤＯＲＡ２Ａ及びＮＫＧ２Ａ；又は
（ｉｉｉ）ＴＧＦβＲ２、ＣＩＳＨ及びＴＩＧＩＴ；ＴＧＦβＲ２、ＣＩＳＨ及びＡＤＯ

ＲＡ２Ａ；ＴＧＦβＲ２、ＣＩＳＨ及びＮＫＧ２Ａ；ＴＧＦβＲ２、ＴＩＧＩＴ及びＡＤＯＲＡ２Ａ；ＴＧＦβＲ２、ＴＩＧＩＴ及びＮＫＧ２Ａ；ＴＧＦβＲ２、ＡＤＯＲＡ２Ａ及びＮＫＧ２Ａ；ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ及びＡＤＯＲＡ２Ａ；ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ及びＮＫＧ２Ａ；ＣＩＳＨ、ＡＤＯＲＡ２Ａ及びＮＫＧ２Ａ；又はＴＩＧＩＴ、ＡＤＯＲＡ２Ａ及びＮＫＧ２Ａ
の機能喪失を示す、請求項１に記載の改変リンパ球。
【請求項３】
前記リンパ球が、再配列された内在性Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）遺伝子座を含んでなる、請求項１又は２に記載の改変リンパ球。
【請求項４】
前記再配列されたＴＣＲが、ＴＣＲαＶＪ及び／又はＴＣＲβＶ（Ｄ）Ｊセクションの再配列と完全なＶドメインエキソンとを含んでなる、請求項３に記載の改変リンパ球。
【請求項５】
前記天然細胞傷害性受容体が、ＮＫｐ３０、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ４６、及び／又はＣＤ１５８ｂである、請求項１、２、３又は４に記載の改変リンパ球。
【請求項６】
前記ＩＬ－１５Ｒ変異型が構成的に活性なＩＬ－１５Ｒ変異型であり、及び／又は前記ＩＬ１２－Ｒ変異型が構成的に活性なＩＬ１２－Ｒ変異型である、請求項１～５のいずれか一項に記載の改変リンパ球。
【請求項７】
前記構成的に活性なＩＬ－１５Ｒ変異型が、ＩＬ－１５ＲとＩＬ－１５Ｒ作動薬（ＩＬ－１５ＲＡ）との融合体であり、及び／又は前記構成的に活性なＩＬ－１２Ｒ変異型が、ＩＬ－１２ＲとＩＬ－１２Ｒ作動薬（ＩＬ－１２ＲＡ）との融合体である、請求項６に記載の改変リンパ球。
【請求項８】
前記ＩＬ－１５Ｒ作動薬が、ＩＬ－１５又はそのＩＬ－１５Ｒ結合変異型であり；及び／又は前記ＩＬ－１２Ｒ作動薬が、ＩＬ－１２又はそのＩＬ－１２Ｒ結合変異型である、請求項７に記載の改変リンパ球。
【請求項９】
ＴＧＦβＲ２の喪失が、ＴＧＦβ受容体ＩＩのドミナントネガティブ変異型（ＤＮ－ＴＧＦβＲ２）の外因性発現と関連している、請求項１～８のいずれか一項に記載の改変リンパ球。
【請求項１０】
前記ＣＡＲが、メソテリン、ＥＧＦＲ、ＨＥＲ２、ＭＩＣＡ／Ｂ、ＢＣＭＡ、ＣＤ１９、ＣＤ２２、ＣＤ２０、ＣＤ３３、ＣＤ１２３、アンドロゲン受容体、ＰＳＭＡ、ＰＳＣＡ、Ｍｕｃ１、ＨＰＶウイルスペプチド（すなわち、Ｅ７）、ＥＢＶウイルスペプチド、ＣＤ７０、ＷＴ１、ＣＥＡ、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ＩＬ１３Ｒα２、及びＧＤ２、ＣＡ１２５、ＣＤ７、ＥｐＣＡＭ、Ｍｕｃ１６、又はＣＤ３０に結合できる、請求項１に記載の改変リンパ球。
【請求項１１】
前記リンパ球が、万能性又は多能性幹細胞に由来する、請求項１～１０のいずれか一項に記載の改変リンパ球。
【請求項１２】
前記多能性幹細胞が造血幹細胞（ＨＳＣ）である、請求項１１に記載の改変リンパ球。
【請求項１３】
前記万能性幹細胞が誘導万能性幹細胞（ｉＰＳＣ）である、請求項１１に記載の改変リンパ球。
【請求項１４】
前記万能性幹細胞が胚性幹細胞（ＥＳＣ）である、請求項１１に記載の改変リンパ球。
【請求項１５】

前記リンパ球が、（１）（ｉ）～（１）（ｘｉ）のいずれか、若しくはそれらの任意の組み合わせをコード化する少なくとも１つ若しくは複数の外因性核酸コンストラクト；及び／又はリンパ球における（２）（ｉ）～（２）（ｘｉ）のいずれか、若しくはそれらの任意の組み合わせの機能喪失をもたらす、少なくとも１つのゲノム改変を含んでなる、万能性又は多能性幹細胞に由来する、請求項１～１１のいずれか一項に記載の改変リンパ球。

【請求項１６】

前記リンパ球が、前記リンパ球における（２）（ｉ）～（２）（ｘｉ）のいずれか、又はそれらの任意の組み合わせの機能喪失をもたらす、少なくとも１つのゲノム改変を含んでなる、万能性又は多能性幹細胞に由来する、請求項１５に記載の改変リンパ球。

【請求項１７】

前記リンパ球における１つ又は複数の（２）（ｉ）～（２）（ｘｉ）の機能喪失をもたらす、少なくとも１つのゲノム改変が、外因性の核酸コンストラクトの挿入を含んでなる、請求項１５又は請求項１６に記載の改変リンパ球。

【請求項１８】

前記外因性核酸コンストラクトが、（１）（ｉ）～（１）（ｉｘ）のいずれか又はそれらの任意の組み合わせをコード化する、請求項１７に記載の改変リンパ球。

【請求項１９】

前記リンパ球が、（２）に列挙される２つ以上の前記遺伝子／タンパク質の機能喪失を示す、請求項１～１８のいずれか一項に記載の改変リンパ球。

【請求項２０】

前記リンパ球が、（２）の遺伝子を保有するか又はタンパク質をコード化する、ゲノム遺伝子座内への外因性ヌクレオチドコンストラクトのインデル又は挿入を含んでなる、請求項１～１９のいずれか一項に記載の改変リンパ球。

【請求項２１】

前記リンパ球が、（２）の遺伝子を保有するか又はタンパク質をコード化する、２つ以上のゲノム遺伝子座内への外因性ヌクレオチドコンストラクトのインデル又は挿入を含んでなる、請求項１～２０のいずれか一項に記載の改変リンパ球。

【請求項２２】

前記リンパ球が、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼでゲノム遺伝子座を編集することによって得られる、請求項１～２１のいずれか一項に記載の改変リンパ球。

【請求項２３】

前記ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼがＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓヌクレアーゼである、請求項２２に記載の改変リンパ球。

【請求項２４】

前記ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼが、ＳｐＣａｓ９、ＳａＣａｓ９、（ＫＫＨ）ＳａＣａｓ９、ＡｓＣｐｆ１（ＡｓＣａｓ１２ａ）、ＬｂＣｐｆ１、（ＬｂＣａｓ１２ａ）、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ、Ｃａｓ１２ｈ１、Ｃａｓ１２ｉ１、Ｃａｓ１２ｃ１、Ｃａｓ１２ｃ２、ｅＳｐＣａｓ９、Ｃａｓ９－ＨＦ１、ＨｙｐａＣａｓ９、ｄＣａｓ９－ＦｏｋＩ、Ｓｎｉｐｅｒ－Ｃａｓ９、ｘＣａｓ９、ＡａＣａｓ１２ｂ、ｅｖｏＣａｓ９、ＳｐＣａｓ９－ＮＧ、ＶＲＱＲ、ＶＲＥＲ、ＮｍｅＣａｓ９、ＣｊＣａｓ９、ＢｈＣａｓ１２ｂ、及びＢｈＣａｓ１２ｂ　Ｖ４からなる群から選択される、請求項２２に記載の改変リンパ球。

【請求項２５】

前記リンパ球が、（２）の前記タンパク質のいずれかをコード化する遺伝子を保有する２つ以上のゲノム遺伝子座を編集することによって得られる、請求項１～２４のいずれか一項に記載の改変リンパ球。

【請求項２６】

（２）の前記タンパク質のいずれかをコード化する遺伝子を保有する前記２つ以上のゲノム遺伝子座の少なくとも２つが、異なるＲＮＡ誘導ヌクレアーゼによって編集される、請求項２５に記載の改変リンパ球。

【請求項２７】

（２）の前記タンパク質のいずれかをコード化する遺伝子を保有する前記２つ以上のゲノム遺伝子座の少なくとも１つがＣａｓ９によって編集されており、前記遺伝子座の少なくとも１つがＣｐｆ１によって編集されている、請求項２５に記載の改変リンパ球。
【請求項２８】
前記改変リンパ球が、内在性ＣＤ５６、ＣＤ４９、及びＣＤ４５を発現する、請求項１～２７のいずれか一項に記載の改変リンパ球。
【請求項２９】
前記リンパ球がナチュラルキラー（ＮＫ）細胞である、請求項１～２８のいずれか一項に記載の改変リンパ球。
【請求項３０】
（１）
（ｉ）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）；
（ｉｉ）ＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）の非天然変異型；
（ｉｉｉ）インターロイキン１５（ＩＬ－１５）；
（ｉｖ）ＩＬ－１５受容体（ＩＬ－１５Ｒ）、若しくはその変異型；
（ｖ）インターロイキン１２（ＩＬ－１２）；
（ｖｉ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）、若しくはその変異型；
（ｖｉｉ）ヒト白血球抗原Ｇ（ＨＬＡ－Ｇ）；
（ｖｉｉｉ）ヒト白血球抗原Ｅ（ＨＬＡ－Ｅ）；
（ｉｘ）白血球表面抗原分化抗原群ＣＤ４７（ＣＤ４７）；
又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせをコード化する核酸配列を含んでなる少なくとも１つの外因性核酸発現コンストラクトを含んでなり、
及び／又は
（２）
（ｉ）形質転換成長因子β受容体２（ＴＧＦβＲ２）；
（ｉｉ）アデノシンＡ２ａ受容体（ＡＤＯＲＡ２Ａ）；
（ｉｉｉ）Ｉｇ及びＩＴＩＭドメインを備えたＴ細胞免疫受容体（ＴＩＧＩＴ）；
（ｉｖ）β－２ミクログロブリン（ｍｉｃｒｏｇｏｂｕｌｉｎ）（Ｂ２Ｍ）；
（ｖ）プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１）；
（ｖｉ）サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）；
（ｖｉｉ）クラスＩＩ、主要組織適合性複合体、トランス活性化剤（ＣＩＩＴＡ）；
（ｖｉｉｉ）ナチュラルキラー細胞受容体ＮＫＧ２Ａ（ナチュラルキラーグループ２Ａ）；
（ｉｘ）２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子、及び／又は２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子；
（ｘ）分化抗原群３２Ｂ（ＣＤ３２Ｂ、ＦＣＧＲ２Ｂ）；
（ｘｉ）Ｔ細胞受容体αコンスタント（ＴＲＡＣ）；
又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせの少なくとも１つの機能喪失を示す、改変細胞。
【請求項３１】
前記改変細胞が、
（ｉ）ＴＧＦβＲ２、ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ、ＡＤＯＲＡ２Ａ、又はＮＫＧ２Ａ；
（ｉｉ）ＴＧＦβＲ２及びＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２及びＴＩＧＩＴ、ＴＧＦβＲ２及びＡＤＯＲＡ２Ａ、ＴＧＦβＲ２及びＮＫＧ２Ａ、ＣＩＳＨ及びＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ及びＡＤＯＲＡ２Ａ、ＣＩＳＨ及びＮＫＧ２Ａ、ＴＩＧＩＴ及びＡＤＯＲＡ２Ａ、ＴＩＧＩＴ及びＮＫＧ２Ａ、又はＡＤＯＲＡ２Ａ及びＮＫＧ２Ａ；又は
（ｉｉｉ）ＴＧＦβＲ２、ＣＩＳＨ及びＴＩＧＩＴ；ＴＧＦβＲ２、ＣＩＳＨ及びＡＤＯＲＡ２Ａ；ＴＧＦβＲ２、ＣＩＳＨ及びＮＫＧ２Ａ；ＴＧＦβＲ２、ＴＩＧＩＴ及びＡＤＯＲＡ２Ａ；ＴＧＦβＲ２、ＴＩＧＩＴ及びＮＫＧ２Ａ；ＴＧＦβＲ２、ＡＤＯＲＡ２Ａ及びＮＫＧ２Ａ；ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ及びＡＤＯＲＡ２Ａ；ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ及び

ＮＫＧ２Ａ；ＣＩＳＨ、ＡＤＯＲＡ２Ａ及びＮＫＧ２Ａ；又はＴＩＧＩＴ、ＡＤＯＲＡ２Ａ及びＮＫＧ２Ａの機能喪失を示す、請求項３０に記載の改変細胞。
【請求項３２】
前記改変細胞が免疫細胞である、請求項３０又は３１に記載の改変細胞。
【請求項３３】
前記免疫細胞がリンパ球である、請求項３２に記載の改変細胞。
【請求項３４】
前記リンパ球がＮＫ細胞である、請求項３３に記載の改変細胞。
【請求項３５】
前記細胞が万能性幹細胞、又はそれに由来する分化した娘細胞である、請求項３０に記載の改変細胞。
【請求項３６】
前記改変細胞が内在性Ｔ細胞共受容体を発現しない、請求項３４又は請求項３５に記載の改変細胞。
【請求項３７】
前記リンパ球がＴ細胞である、請求項３３に記載の改変細胞。
【請求項３８】
前記細胞が再配列された内在性ＴＣＲ遺伝子座を含んでなり、前記再配列されたＴＣＲがＴＣＲαＶＪ及び／又はＴＣＲβＶ（Ｄ）Ｊセクションの再配列と完全なＶドメインエクソンとを含んでなる、請求項３０に記載の改変細胞。
【請求項３９】
前記改変細胞が、
（ｉ）ＣＤ５６（ＮＣＡＭ）、ＣＤ４９、及び／又はＣＤ４５；
（ｉｉ）ＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）；
（ｉｉｉ）ナチュラルキラーグループ２メンバーＤ（ＮＫＧ２Ｄ）；
（ｉｖ）ＣＤ６９；
（ｖ）天然細胞傷害性受容体；
又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせ
をコード化する内在性遺伝子の少なくとも１つを発現する、請求項３０～３８のいずれか一項に記載の改変細胞。
【請求項４０】
前記天然細胞傷害性受容体が、ＮＫｐ３０、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ４６、及び／又はＣＤ１５８ｂである、請求項３９に記載の改変細胞。
【請求項４１】
前記細胞が少なくとも１つのＮＫ細胞バイオマーカーを発現する、請求項３０～４０のいずれか一項に記載の改変細胞。
【請求項４２】
前記ＮＫ細胞バイオマーカーが、ＣＤ５６、ＣＤ４９、及び／又はＣＤ４５である、請求項４１に記載の改変細胞。
【請求項４３】
請求項１～２８のいずれか一項に記載の改変リンパ球、又は請求項３０～４２のいずれか一項に記載の改変細胞を含んでなる細胞集団。
【請求項４４】
請求項４３に記載の細胞集団を含んでなる、医薬組成物。
【請求項４５】
少なくとも1×10^{3}、少なくとも1×10^{4}、少なくとも1×10^{5}、少なくとも2×10^{5}、少なくとも3×10^{5}、少なくとも4×10^{5}、少なくとも5×10^{5}、少なくとも1×10^{6}、少なくとも2×10^{6}、少なくとも3×10^{6}、少なくとも4×10^{6}、少なくとも5×10^{6}、少なくとも1×10^{7}、少なくとも1×10^{7}、少なくとも2×10^{7}、少なくとも3×10^{7}、少なくとも4×10^{7}、少なくとも5×10^{7}、少なくとも１

×１０^{8}、少なくとも２×１０^{8}、少なくとも３×１０^{8}、少なくとも４×１０^{8}、少なくとも５×１０^{8}、少なくとも１×１０^{9}、少なくとも１×１０^{9}、少なくとも２×１０^{9}、少なくとも３×１０^{9}、少なくとも４×１０^{9}、少なくとも５×１０^{9}、少なくとも１×１０^{10}、少なくとも２×１０^{10}、少なくとも３×１０^{10}、少なくとも４×１０^{10}、少なくとも５×１０^{10}、少なくとも１×１０^{11}、又は少なくとも１×１０^{12}個の細胞を含んでなり、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．９％、少なくとも９９．９９％、少なくとも９９．９９９％、又は実質的に１００％のリンパ球が、

（ａ）再配列されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）遺伝子座を含んでなり；

（ｂ）内在性ＣＤ３を発現せず；

（ｃ）内在性ＣＤ５６（ＮＣＡＭ）、ＣＤ４９、及び／又はＣＤ４５を発現し；

（ｄ）

（ｉ）ＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）；

（ｉｉ）ナチュラルキラーグループ２メンバーＤ（ＮＫＧ２Ｄ）；

（ｉｉｉ）ＣＤ６９；

（ｉｖ）天然細胞傷害性受容体；

又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせ

をコード化する少なくとも１つの内在性遺伝子を発現する集団中にある、リンパ球の単離集団であって、前記改変リンパ球が、さらに、

（１）

（ｉ）キメラ抗原受容体（ＣＲ）；

（ｉｉ）免疫グロブリンγＦｃ領域受容体ＩＩＩ（ＦｃγＲＩＩＩ、ＣＤ１６）の非天然変異型；

（ｉｉｉ）インターロイキン１５（ＩＬ－１５）；

（ｉｖ）ＩＬ－１５受容体（ＩＬ－１５Ｒ）、若しくはその変異型；

（ｖ）インターロイキン１２（ＩＬ－１２）；

（ｖｉ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）、若しくはその変異型；

（ｖｉｉ）ヒト白血球抗原Ｇ（ＨＬＡ－Ｇ）；

（ｖｉｉｉ）ヒト白血球抗原Ｅ（ＨＬＡ－Ｅ）；

（ｉｘ）白血球表面抗原分化抗原群ＣＤ４７（ＣＤ４７）；

又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせをコード化する核酸配列を含んでなる少なくとも１つの外因性核酸発現コンストラクトを含んでなり、

及び／又は

（２）

（ｉ）形質転換成長因子β受容体２（ＴＧＦβＲ２）；

（ｉｉ）アデノシンＡ２ａ受容体（ＡＤＯＲＡ２Ａ）；

（ｉｉｉ）Ｉｇ及びＩＴＩＭドメインを備えたＴ細胞免疫受容体（ＴＩＧＩＴ）；

（ｉｖ）β－２ミクログロブリン（ｍｉｃｒｏｇｏｂｕｌｉｎ）（Ｂ２Ｍ）；

（ｖ）プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１）；

（ｖｉ）サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）；

（ｖｉｉ）クラスＩＩ、主要組織適合性複合体、トランス活性化剤（ＣＩＩＴＡ）；

（ｖｉｉｉ）ナチュラルキラー細胞受容体ＮＫＧ２Ａ（ナチュラルキラーグループ２Ａ）；

（ｉｘ）２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子、及び／又は２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子；

（ｘ）分化抗原群３２Ｂ（ＣＤ３２Ｂ、ＦＣＧＲ２Ｂ）；

（ｘｉ）Ｔ細胞受容体αコンスタント（ＴＲＡＣ）；

又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせの少なくとも１つの機能喪失を示す、リンパ球の単離集団。

【請求項４６】
前記改変リンパ球が、
（ｉ）ＴＧＦβＲ２、ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ、ＡＤＯＲＡ２Ａ、又はＮＫＧ２Ａ；
（ｉｉ）ＴＧＦβＲ２及びＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２及びＴＩＧＩＴ、ＴＧＦβＲ２及びＡＤＯＲＡ２Ａ、ＴＧＦβＲ２及びＮＫＧ２Ａ、ＣＩＳＨ及びＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ及びＡＤＯＲＡ２Ａ、ＣＩＳＨ及びＮＫＧ２Ａ、ＴＩＧＩＴ及びＡＤＯＲＡ２Ａ、ＴＩＧＩＴ及びＮＫＧ２Ａ、又はＡＤＯＲＡ２Ａ及びＮＫＧ２Ａ；又は
（ｉｉｉ）ＴＧＦβＲ２、ＣＩＳＨ及びＴＩＧＩＴ；ＴＧＦβＲ２、ＣＩＳＨ及びＡＤＯＲＡ２Ａ；ＴＧＦβＲ２、ＣＩＳＨ及びＮＫＧ２Ａ；ＴＧＦβＲ２、ＴＩＧＩＴ及びＡＤＯＲＡ２Ａ；ＴＧＦβＲ２、ＴＩＧＩＴ及びＮＫＧ２Ａ；ＴＧＦβＲ２、ＡＤＯＲＡ２Ａ及びＮＫＧ２Ａ；ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ及びＡＤＯＲＡ２Ａ；ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ及びＮＫＧ２Ａ；ＣＩＳＨ、ＡＤＯＲＡ２Ａ及びＮＫＧ２Ａ；又はＴＩＧＩＴ、ＡＤＯＲＡ２Ａ及びＮＫＧ２Ａの機能喪失を示す、請求項４５に記載のリンパ球の単離集団。
【請求項４７】
前記再配列されたＴＣＲ遺伝子座が、ＴＣＲαＶＪ及び／又はＴＣＲβＶ（Ｄ）Ｊセクションの再配列と完全なＶドメインエキソンとを含んでなる、請求項４５又は４６に記載のリンパ球の単離集団。
【請求項４８】
前記再配列された内在性ＴＣＲ遺伝子座が、２つ以下の再配列された対立遺伝子からなる、請求項４７に記載のリンパ球の単離生体外集団。
【請求項４９】
前記天然細胞傷害性受容体が、ＮＫｐ３０、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ４６、及び／又はＣＤ１５８ｂである、請求項４５に記載の単離リンパ球の生体外集団。
【請求項５０】
前記集団が、１％を超える、０．１％を超える、０．００１％を超える、０．０００１％を超える、０．００００１％を超える、０．０００００１％を超える、０．００００００１％を超える、０．０００００００１％を超える、０．００００００００１％を超える、０．０００００００００１％を超える、又は０．００００００００００１％を超えるを超える（ｍｏｒｅ　ｔｈａｎ　ｍｏｒｅ　ｔｈａｎ）外因性核酸コンストラクトからの再プログラム化因子を発現する細胞を含まない、請求項４５～４９のいずれか一項に記載の単離リンパ球の生体外集団。
【請求項５１】
前記集団が、外因性核酸コンストラクトからの再プログラミング因子を発現する細胞を含まない、請求項５０に記載の単離リンパ球の生体外集団。
【請求項５２】
前記再プログラム化因子が、Ｏｃｔ－４及び／又はＳｏｘ－２である、請求項５０又は請求項５１に記載の単離リンパ球の生体外集団。
【請求項５３】
前記集団が、再プログラム化因子をコード化する、エピソーム発現コンストラクトを保有する細胞を含まない、請求項４５に記載の単離リンパ球の生体外集団。
【請求項５４】
前記細胞集団内の各細胞が、（１）と（２）の同じ組み合わせを含んでなる、請求項４５～５３のいずれか一項に記載の単離リンパ球の生体外集団。
【請求項５５】
前記細胞集団が、０．００１％未満、０．００２％未満、０．００３％未満、０．００４％未満、０．００５％未満、０．００６％未満、０．００７％未満、０．００８％未満、０．００９％未満、０．０１％未満、０．０２％未満、０．０３％未満、０．０４％未満、０．０５％未満、０．０６％未満、０．０７％未満、０．０８％未満、０．０９％未満、０．１％未満、０．２％未満、０．３％未満、０．４％未満、０．５％未満、０．６％未満、０．７％未満、０．８％未満、０．９％未満、１％未満、２％未満、３％未満、４

％未満、５％未満、６％未満、７％未満、８％未満、９％未満、又は１０％未満の染色体転座保有細胞を含んでなる、請求項４５～５４のいずれか一項に記載の単離リンパ球の生体外集団。
【請求項５６】
請求項１～２９のいずれか一項に記載のリンパ球、請求項３０～４２のいずれか一項に記載の改変細胞、請求項４１に記載の細胞集団、請求項４４に記載の医薬組成物、又は請求項４５～５５のいずれか一項に記載の単離リンパ球の生体外集団をそれを必要とする対象に投与するステップを含んでなる、対象を治療する方法。
【請求項５７】
前記対象が、増殖性疾患を有するか、又は増殖性疾患と診断されている、請求項５６に記載の方法。
【請求項５８】
前記増殖性疾患ががんである、請求項５７に記載の方法。
【請求項５９】
前記がんが、乳がん、結腸直腸がん、胃がん、腎細胞がん腫（ＲＣＣ）、又は非小細胞肺がん（ＮＳＣＬＣ）、固形腫瘍、膀胱がん、肝細胞がん、前立腺がん、卵巣／子宮がん、膵臓がん、中皮腫、黒色腫、神経膠芽腫、頸部及びＨＰＶ＋頭頸部がんなどのＨＰＶ関連及び／又はＨＰＶ陽性がん、口腔がん、咽頭がん、甲状腺がん、胆嚢がん、軟部組織肉腫、及びＡＬＬ、ＣＬＬ、ＮＨＬ、ＤＬＢＣＬ、ＡＭＬ、ＣＭＬ、多発性骨髄腫（ＭＭ）の様な血液学的がんである、請求項５８に記載の方法。
【請求項６０】
（ａ）誘導万能性幹細胞（ｉＰＳＣ）を得るステップと；
（ｂ）前記ｉＰＳＣ、又はその未分化の若しくは分化した娘細胞を改変し、（１）の少なくとも１つの外因性核酸発現コンストラクトを発現させるステップを含め、及び／又は（２）の少なくとも１つの遺伝子の機能喪失を含めるステップと、
（ｃ）前記ｉＰＳＣの分化を造血系細胞に方向づけるステップと
を含んでなり、前記造血系細胞が、前記ｉＰＳＣに含まれる編集された遺伝子座を保持する、請求項１～２９のいずれか一項に記載のリンパ球、請求項３０～４２のいずれか一項に記載の改変細胞、請求項４３の細胞集団、又は請求項４４～５４のいずれか一項に記載の単離リンパ球の生体外集団を生成する方法。
【請求項６１】
分化を方向づけるステップが、
（ｉ）ｉＰＳＣを、ＢＭＰ経路活性化剤と任意選択的にｂＦＧＦとを含む組成物に接触させて、中胚葉細胞を得るステップと；
（ｉｉ）前記中胚葉細胞と、ＢＭＰ経路活性化剤、ｂＦＧＦ、及びＷＮＴ経路活性化剤を含んでなる組成物とを接触させて、決定的な造血性内皮（ＨＥ）分化能を有する中胚葉細胞を得るステップとを含んでなり、決定的な造血性内皮（ＨＥ）分化能を有する前記中胚葉細胞は、造血系細胞を提供でき；
中胚葉細胞及び決定的なＨＥ分化能を有する中胚葉細胞が、胚様体を形成するステップなしで、ステップ（ｉ）及び（ｉｉ）において得られ；
前記造血系細胞が、決定的な造血内皮細胞、造血幹及び前駆細胞（ＨＳＣ）、造血性多能性前駆細胞（ＭＰＰ）、前Ｔ細胞前駆細胞、前ＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞、ＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、又はＢ細胞を含んでなる、請求項６０に記載の方法。
【請求項６２】
ｉＰＳＣの分化を造血系細胞に方向づけるステップが、決定的なＨＥ分化能を有する前記中胚葉細胞と、ｂＦＧＦ及びＲＯＣＫ阻害剤を含んでなる組成物とを接触させて、決定的なＨＥ細胞を得るステップをさらに含んでなる、請求項６１に記載の方法。
【請求項６３】
前記決定的なＨＥ細胞と、ＢＭＰ活性化剤、及び任意選択的にＲＯＣＫ阻害剤、及びＴＰ

Ｏ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、Ｆｌｔ３Ｌ、及びＩＬ１１からなる群から選択される１つ又は複数の増殖因子及びサイトカインを含んでなる組成物とを接触させて、造血系多能性前駆細胞（ＭＰＰ）を得るステップをさらに含んでなる、請求項６０、請求項６１、又は請求項６２に記載の方法。

【請求項６４】

前記決定的なＨＥ細胞と、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、及びＩＬ７からなる群から選択される１つ又は複数の増殖因子及びサイトカイン、及び任意選択的にＢＭＰ活性化剤、ＲＯＣＫ阻害剤、ＴＰＯ、ＶＥＧＦ、及びｂＦＧＦの１つ又は複数を含んでなる組成物とを接触させ、プレＴ細胞前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞、及び／又はＴ細胞を得るステップをさらに含んでなる、請求項６０～６３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６５】

前記決定的なＨＥ細胞と、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、ＩＬ７、及びＩＬ１５からなる群から選択される１つ又は複数の増殖因子及びサイトカイン、及び任意選択的にＢＭＰ活性化剤、ＲＯＣＫ阻害剤、ＶＥＧＦ、及びｂＦＧＦの１つ又は複数を含んでなる組成物とを接触させ、プレＮＫ細胞前駆細胞、ＮＫ細胞前駆細胞、及び／又はＮＫ細胞を得るステップをさらに含んでなる、請求項６０～６３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６６】

ステップｃ）の前に、前記万能性幹細胞と、ＭＥＫ阻害剤、ＧＳＫ３阻害剤、及びＲＯＣＫ阻害剤を含んでなる組成物とを接触させて、前記細胞を播種及び増殖させるステップをさらに含んでなる、請求項６０～６５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６７】

前記造血系細胞中で再配列されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）遺伝子座を検出するステップをさらに含んでなる、請求項６０～６５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６８】

目的の抗原に結合する前記再配列されたＴＣＲ遺伝子座によってコード化される前記ＴＣＲに基づいて、前記再配列されたＴＣＲ遺伝子座を含んでなる、前記造血系細胞を選択するステップをさらに含んでなる、請求項６７に記載の方法。

【請求項６９】

前記目的の抗原が腫瘍抗原である、請求項６８に記載の方法。

【請求項７０】

ドナー細胞を万能性状態に再プログラム化するステップと；
前記ドナー細胞ゲノム中の標的遺伝子座を編集するステップと；
前記再プログラム化されたドナー細胞をリンパ球に分化させるステップと
を含んでなる方法。

【請求項７１】

前記編集が、前記ドナー細胞を万能性状態に再プログラム化するステップの前又は最中に実施される、請求項７０に記載の方法。

【請求項７２】

前記ドナー細胞が、線維芽細胞、末梢性血液細胞、リンパ球、又はＴ細胞である、請求項７０又は７１に記載の方法。

【請求項７３】

（１）
（ｉ）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコード化する核酸配列；
（ｉｉ）ＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）の非天然変異型をコード化する核酸配列；
（ｉｉｉ）インターロイキン１５（ＩＬ－１５）をコード化する核酸配列；
（ｉｖ）インターロイキン１５受容体（ＩＬ－１５Ｒ）若しくはその変異型をコード化する核酸配列；
（ｖ）インターロイキン１２（ＩＬ１２）をコード化する核酸配列；
（ｖｉ）インターロイキン１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）若しくはその変異型をコード化する核酸配列；

（ｖｉｉ）ヒト白血球抗原Ｇ（ＨＬＡ－Ｇ）をコード化する核酸配列；
（ｖｉｉｉ）ヒト白血球抗原Ｅ（ＨＬＡ－Ｅ）をコード化する核酸配列；
（ｉｘ）白血球表面抗原分化抗原群ＣＤ４７（ＣＤ４７）をコード化する核酸配列；
又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせを含んでなる外因性核酸発現コンストラクト、
（２）
（ｉ）形質転換成長因子β受容体２（ＴＧＦβＲ２）；
（ｉｉ）アデノシンＡ２ａ受容体（ＡＤＯＲＡ２Ａ）；
（ｉｉｉ）Ｉｇ及びＩＴＩＭドメインを備えたＴ細胞免疫受容体（ＴＩＧＩＴ）；
（ｉｖ）β－２ミクログロブリン（ｍｉｃｒｏｇｏｂｕｌｉｎ）（Ｂ２Ｍ）；
（ｖ）プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１、ＰＤ－２７９）；
（ｖｉ）サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）；
（ｖｉｉ）クラスＩＩ、主要組織適合性複合体、トランス活性化剤（ＣＩＩＴＡ）；
（ｖｉｉｉ）ナチュラルキラー細胞受容体ＮＫＧ２Ａ（ナチュラルキラーグループ２Ａ）；
（ｉｘ）２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子、及び／又は２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子；
（ｘ）分化抗原群３２Ｂ（ＣＤ３２Ｂ、ＦＣＧＲ２Ｂ）；
（ｘｉ）Ｔ細胞受容体αコンスタント（ＴＲＡＣ）；
又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせ
の遺伝子座の１つ又は複数中の外因性核酸のインデル又は挿入を含んでなり、
前記インデル又は挿入が、それぞれの遺伝子座によってコード化される遺伝子産物の機能喪失をもたらす、遺伝子改変万能性幹細胞をリンパ球に分化させるステップを含んでなる方法。

【請求項７４】
外因性核酸のインデル又は挿入が、
（ｉ）ＴＧＦβＲ２、ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ、ＡＤＯＲＡ２Ａ、又はＮＫＧ２Ａ；
（ｉｉ）ＴＧＦβＲ２及びＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２及びＴＩＧＩＴ、ＴＧＦβＲ２及びＡＤＯＲＡ２Ａ、ＴＧＦβＲ２及びＮＫＧ２Ａ、ＣＩＳＨ及びＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ及びＡＤＯＲＡ２Ａ、ＣＩＳＨ及びＮＫＧ２Ａ、ＴＩＧＩＴ及びＡＤＯＲＡ２Ａ、ＴＩＧＩＴ及びＮＫＧ２Ａ、又はＡＤＯＲＡ２Ａ及びＮＫＧ２Ａ；又は
（ｉｉｉ）ＴＧＦβＲ２、ＣＩＳＨ及びＴＩＧＩＴ；ＴＧＦβＲ２、ＣＩＳＨ及びＡＤＯＲＡ２Ａ；ＴＧＦβＲ２、ＣＩＳＨ及びＮＫＧ２Ａ；ＴＧＦβＲ２、ＴＩＧＩＴ及びＡＤＯＲＡ２Ａ；ＴＧＦβＲ２、ＴＩＧＩＴ及びＮＫＧ２Ａ；ＴＧＦβＲ２、ＡＤＯＲＡ２Ａ及びＮＫＧ２Ａ；ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ及びＡＤＯＲＡ２Ａ；ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ及びＮＫＧ２Ａ；ＣＩＳＨ、ＡＤＯＲＡ２Ａ及びＮＫＧ２Ａ；又はＴＩＧＩＴ、ＡＤＯＲＡ２Ａ及びＮＫＧ２Ａ
の遺伝子座にあり、前記インデル又は挿入が、それぞれの遺伝子座によってコード化される遺伝子産物の機能喪失をもたらす、請求項７３に記載の方法。

【請求項７５】
（２）の外因性核酸が（１）の外因性核酸である、請求項７３又は請求項７４に記載の方法。

【請求項７６】
前記万能性幹細胞がｉＰＳ細胞である、請求項７３又は請求項７５に記載の方法。

【請求項７７】
前記分化させるステップが、前記万能性幹細胞と、分化培地又は一連の分化培地とを接触させるステップを含んでなる、請求項７３又は請求項７５に記載の方法。

【請求項７８】
前記２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子が、ＨＬＡ－ＤＱＡ１、ＨＬＡ－ＤＲＡ、ＨＬＡ－ＤＰＡ１、ＨＬＡ－ＤＭＡ、ＨＬＡ－ＤＱＡ２、及びＨＬＡ－ＤＯＡから選択される、請求項１～２９のいずれか一項に記載の改変リンパ球。

【請求項７９】
前記２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子が、ＨＬＡ－ＤＭＢ、ＨＬＡ－ＤＯＢ、ＨＬＡ－ＤＰＢ１、ＨＬＡ－ＤＱＢ１、ＨＬＡ－ＤＱＢ３、ＨＬＡ－ＤＱＢ２、ＨＬＡ－ＤＲＢ１、ＨＬＡ－ＤＲＢ３、ＨＬＡ－ＤＲＢ４、及びＨＬＡ－ＤＲＢ５から選択される、請求項１～２９のいずれか一項に記載の改変リンパ球。
【請求項８０】
前記外因性核酸発現コンストラクトが、異種プロモーターの制御下で（１）に列挙されるコード化核酸配列を含んでなる、請求項１～２９及び７８～７９のいずれか一項に記載の改変リンパ球、請求項３０～４２のいずれか一項に記載の改変細胞、請求項４３に記載の細胞集団、請求項４４に記載の医薬組成物、請求項４５～５５のいずれか一項に記載の単離リンパ球の生体外集団、又は請求項５６～７７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８１】
前記異種プロモーターがＮＫ細胞特異的プロモーターである、請求項８０に記載の改変リンパ球、改変細胞、細胞集団、医薬組成物、単離リンパ球の生体外集団、又は方法。
【請求項８２】
前記ＮＫ細胞特異的プロモーターが、ＮＫ細胞で特異的に発現することが知られている遺伝子のプロモーター又はその変異型である、請求項８０に記載の改変リンパ球、改変細胞、細胞集団、医薬組成物、リンパ球の単離生体外集団、又は方法。
【請求項８３】
前記ＮＫ細胞特異的プロモーターが、ＣＤ５６（ＮＣＡＭ）、ＣＤ４９、又はＣＤ４５プロモーター、又はその変異型である、請求項８０に記載の改変リンパ球、改変細胞、細胞集団、医薬組成物、リンパ球の単離生体外集団、又は方法。
【請求項８４】
前記ＮＫ細胞特異的プロモーターが、ＦｃγＲＩＩＩプロモーター、ＮＫＧ２Ｄプロモーター、ＣＤ６９プロモーター、若しくは天然細胞傷害性受容体プロモーター、又はその変異型である、請求項８０に記載の改変リンパ球、改変細胞、細胞集団、医薬組成物、リンパ球の単離生体外集団、又は方法。
【請求項８５】
請求項１～８４のいずれか一項に記載の改変リンパ球、改変細胞、又は細胞集団をそれを必要とする対象に投与するステップを含んでなる、方法。
【請求項８６】
前記対象が、増殖性疾患を有するか、又は増殖性疾患と診断されている、請求項８５に記載の方法。
【請求項８７】
前記増殖性疾患ががんである、請求項８６に記載の方法。
【請求項８８】
前記がんが、乳がん、結腸直腸がん、胃がん、腎細胞がん腫（ＲＣＣ）、又は非小細胞肺がん（ＮＳＣＬＣ）、固形腫瘍、膀胱がん、肝細胞がん、前立腺がん、卵巣／子宮がん、膵臓がん、中皮腫、黒色腫、神経膠芽腫、頸部及びＨＰＶ＋頭頸部がんなどのＨＰＶ関連及び／又はＨＰＶ陽性がん、口腔がん、咽頭がん、甲状腺がん、胆嚢がん、軟部組織肉腫、及びＡＬＬ、ＣＬＬ、ＮＨＬ、ＤＬＢＣＬ、ＡＭＬ、ＣＭＬ、多発性骨髄腫（ＭＭ）の様な血液学的がんである、請求項８７に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本出願は、そのそれぞれの全内容が参照により本明細書に明示的に援用される、２０１９年２月１５日に出願された米国仮特許出願第６２／８０６，４５７号明細書；２０１９年４月３０日に出願された米国仮特許出願第６２／８４１，０６６号明細書；２０１９年５月１日に出願された米国仮特許出願第６２／８４１，６８４号明細書；及び２０１９年１

２月４日に出願された米国仮特許出願第６２／９４３，６４９号明細書の優先権を主張する。

【背景技術】

【０００２】

ＮＫ細胞は、例えば免疫腫瘍学の文脈における免疫療法アプローチに有用である。ＮＫ細胞は、細胞障害性の自然リンパ球の一種である。ＮＫ細胞は腫瘍免疫において重要な役割を果たし、ＮＫ細胞の細胞障害活性は活性化及び阻害経路のネットワークによって厳密に制御される（例えば、参照によりその全体が本明細書に援用される、Ｇｒａｓ Ｎａｖａｒｒｏ Ａ，Ｂｊｏｒｋｌｕｎｄ ＡＴ ａｎｄ Ｃｈｅｋｅｎｙａ Ｍ（２０１５）Ｆｒｏｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．６：２０２を参照されたい）。

【０００３】

例えば、自系又は同種異系ＮＫ細胞移入を介した、免疫療法のアプローチにおける天然由来又は改変ＮＫ細胞の使用が報告されており、いくらかの成功が達成されている一方で、このようなアプローチは典型的には、次善のＮＫ細胞応答を特徴とする。免疫腫瘍学の文脈では、この次善の応答は、少なくとも部分的には腫瘍に対するもので、ＮＫ細胞阻害経路を利用して、細胞傷害性ＮＫ細胞活性を抑制し、ＮＫ細胞の浸潤を制限し、及び／又はＮＫ細胞の増殖と生存を阻害すると考えられている。したがって、固形腫瘍の治療におけるＮＫ細胞の適用は限られた成功しか得られていない。

【０００４】

例えば、ＮＫ細胞を腫瘍細胞に標的化するキメラ抗原受容体をＮＫ細胞中で発現させることによって、又は、活性化又は抑制性のＮＫ細胞経路を調節して、より強力な及び／又はより持続的なＮＫ細胞応答を達成することによって、ＮＫ細胞応答を特定の細胞に集中させるための初期研究が行われている。例えば、それらの全体が参照により本明細書に援用される、Ｊｉｎｇ Ｙ，ｅｔ ａｌ．（２０１５）ＰＬｏＳ ＯＮＥ １０（３）：ｅ０１２１７８８；及びＯｂｅｒｓｃｈｍｉｄｔ Ｏ，Ｋｌｏｅｓｓ Ｓ ａｎｄ Ｋｏｅｈｌ Ｕ（２０１７）Ｆｒｏｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．８：６５４を参照されたい。

【０００５】

治療用抗体と組み合わせて使用され得る既製の同種異系ＮＫ細胞療法を追求するために、その中で細胞がＣＤ１６の強化バージョン（ｈｎＣＤ１６）を発現する誘導万能性幹細胞株が開発されており、ＮＫ細胞はこのｉＰＳＣ株に由来する。例えば、参照によりその全体が本明細書に援用される、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ．２０１８ Ａｕｇ ２；２３（２）：１８１－１９２．ｅ５を参照されたい。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００６】

しかし、これまでのところ、これらのアプローチは全て限られた成功しか得られていない。したがって、免疫療法のためのより良い治療アプローチの開発に対する必要性が、依然として存在する。

【課題を解決するための手段】

【０００７】

本開示のいくつかの態様は、例えば、免疫腫瘍学的治療アプローチなどの免疫療法的アプローチの文脈において有用な、組成物、細胞、細胞集団、方法、ストラテジー、及び治療法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、例えば、免疫療法アプローチなどの文脈において、ＮＫ細胞療法において有用な改変ＮＫ細胞（又はその他のリンパ球）を提供する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される細胞及び細胞集団は、免疫療法アプローチにおけるそれらの効力を増強する、１つ又は複数の修飾によって特徴付けられる。例えば、いくつかの実施形態では、治療の文脈におけるＮＫ細胞機能の阻害に関連する、遺伝子又はタンパク質の機能喪失をもたらす、１つ又は複数の修飾、及び／又は治療の文脈における増強されたＮＫ細胞機能に関連する外因性核酸又はタンパク質の発現をもたらす、１つ又は複数の修飾を含んでなる、ＮＫ細胞が提供される。いくつかの実施形態

では、本開示は、誘導万能性細胞（ｉＰＳＣ）に由来する改変ＮＫ細胞を提供する。ＩＰＳＣ由来のＮＫ細胞は、本明細書ではｉＮＫ細胞とも称される。いくつかの実施形態では、例えば、限定されることなく、線維芽細胞、末梢血細胞、又は発達的に成熟したＴ細胞（胸腺選択を受けたＴ細胞）などの体細胞に由来する改変ｉＮＫ細胞が提供される。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるＮＫ又はｉＮＫ細胞は、例えば、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼでゲノム遺伝子座を切断することから生じる、外因性核酸コンストラクトのインデル又は挿入などの、１つ又は複数のゲノム編集を含んでなる。改変されたＮＫ及びｉＮＫ細胞の生成の文脈におけるＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ技術の使用は、臨床応用に関連する増強された特性を備えた複雑な改変の操作を可能にする。

【０００８】

本開示のいくつかの態様は、複雑な編集ストラテジー、及びその結果としての複雑なゲノム改変を有するＮＫ細胞を提供し、それは例えば、免疫腫瘍学的治療アプローチなどの臨床応用のための高度なＮＫ細胞製品の生成を可能にする。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される改変ＮＫ細胞は、例えば、がんなどの過剰増殖性疾患を有するか、又は過剰増殖性疾患と診断された患者のための既製の臨床的解決策の役割を果たし得る。いくつかの実施形態では、改変ＮＫ細胞は、非改変ＮＫ細胞と比較して、増強された生存、増殖、ＮＫ細胞応答レベル、ＮＫ細胞応答持続時間、ＮＫ細胞枯渇に対する耐性、及び／又は標的認識を示す。例えば、本明細書で提供される改変ＮＫ細胞は、改変ＮＫ細胞における、例えば、メソテリン、ＥＧＦＲ、ＨＥＲ２及び／又はＭＩＣＡ／Ｂを標的化するＣＡＲなどの目的のキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）の発現；例えば、ｈｎＣＤ１６などの天然に存在しないＣＤ１６変異型などのＣＤ１６変異型の発現（例えば、その内容が参照によりその全体が本明細書に援用される、Ｚｈｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ　２０１７，１３０：４４５２を参照されたい）；ＩＬ１５／ＩＬ１５ＲＡ融合体の発現；ＴＧＦβ受容体２（ＴＧＦβＲ２）の機能喪失；及び／又はＴＧＦβＲ２のドミナントネガティブ変異型の発現；ＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失；Ｂ２Ｍの機能喪失；ＨＬＡ－Ｇの発現；ＣＩＩＴＡの機能喪失；ＰＤ１の機能喪失；ＴＩＧＩＴの機能喪失；及び／又はＣＩＳＨの機能喪失；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせをもたらすゲノム編集を含んでなってもよい。一実施形態では、改変ＮＫ細胞は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失及びＣＩＳＨの機能喪失をもたらすゲノム編集を含んでなる。一実施形態では、改変ＮＫ細胞は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失及びＴＩＧＩＴの機能喪失をもたらすゲノム編集を含んでなる。一実施形態では、改変ＮＫ細胞は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失及びＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集を含んでなる。一実施形態では、改変ＮＫ細胞は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失及びＮＫＧ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集を含んでなる。一実施形態では、改変ＮＫ細胞は、ＣＩＳＨの機能喪失及びＴＩＧＩＴの機能喪失をもたらすゲノム編集を含んでなる。一実施形態では、改変ＮＫ細胞は、ＣＩＳＨの機能喪失及びＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集を含んでなる。一実施形態では、改変ＮＫ細胞は、ＣＩＳＨの機能喪失及びＮＫＧ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集を含んでなる。一実施形態では、改変ＮＫ細胞は、ＴＩＧＩＴの機能喪失及びＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集を含んでなる。一実施形態では、改変ＮＫ細胞は、ＴＩＧＩＴの機能喪失及びＮＫＧ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集を含んでなる。一実施形態では、改変ＮＫ細胞は、ＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失及びＮＫＧ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集を含んでなる。一実施形態では、改変ＮＫ細胞は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、ＣＩＳＨの機能喪失、及びＴＩＧＩＴの機能喪失をもたらすゲノム編集を含んでなる。一実施形態では、改変ＮＫ細胞は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、ＣＩＳＨの機能喪失、及びＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集を含んでなる。一実施形態では、改変ＮＫ細胞は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、ＣＩＳＨの機能喪失、及びＮＫＧ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集を含んでなる。一実施形態では、改変ＮＫ細胞は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、ＴＩＧＩＴの機能喪失、及びＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集を含んでなる。一実施形態では、改変ＮＫ細胞は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、ＴＩＧＩＴの機能喪失、及びＮＫＧ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集を含んでなる。一実施形態では、改変ＮＫ細胞は、ＴＧＦβ

Ｒ２の機能喪失、ＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失、及びＮＫＧ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集を含んでなる。一実施形態では、改変ＮＫ細胞は、ＣＩＳＨの機能喪失、ＴＩＧＩＴの機能喪失、及びＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集を含んでなる。一実施形態では、改変ＮＫ細胞は、ＣＩＳＨの機能喪失、ＴＩＧＩＴの機能喪失、及びＮＫＧ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集を含んでなる。一実施形態では、改変ＮＫ細胞は、ＣＩＳＨの機能喪失、ＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失、及びＮＫＧ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集を含んでなる。一実施形態では、改変ＮＫ細胞は、ＴＩＧＩＴの機能喪失、ＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失、及びＮＫＧ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集を含んでなる。

【０００９】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される改変ＮＫ細胞は、例えば、ｈｎＣＤ１６などの外因性ＣＤ１６変異型の発現、ＩＬ１５／ＩＬ１５ＲＡ融合体の発現、外因性ＨＬＡ－Ｇの発現、外因性ＤＮ－ＴＧＦβＲ２の発現、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、Ｂ２Ｍの機能喪失、ＰＤ１の機能喪失、ＴＩＧＩＴの機能喪失、及び／又はＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集を含んでなってもよい。

【００１０】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される改変ＮＫ細胞は、例えば、ｈｎＣＤ１６などの外因性ＣＤ１６変異型の発現、ＩＬ１５／ＩＬ１５ＲＡ融合体の発現、外因性ＨＬＡ－Ｇの発現、外因性ＤＮ－ＴＧＦβＲ２の発現、可溶性ＭＩＣＡ及び／又はＭＩＣＢの発現、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、Ｂ２Ｍの機能喪失、ＰＤ１の機能喪失、ＴＩＧＩＴの機能喪失、及び／又はＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集を含んでなってもよい。

【００１１】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される改変ＮＫ細胞は、例えば、ｈｎＣＤ１６などの外因性ＣＤ１６変異型の発現、外因性ＩＬ１５／ＩＬ１５ＲＡ融合体の発現、外因性ＨＬＡ－Ｇの発現、外因性ＤＮ－ＴＧＦβＲ２の発現、可溶性ＭＩＣＡ及び／又はＭＩＣＢの発現、外因性ＩＬ－１２の発現、外因性ＩＬ－１８の発現、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、Ｂ２Ｍの機能喪失、ＰＤ１の機能喪失、ＴＩＧＩＴの機能喪失、及び／又はＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集を含んでなってもよい。

【００１２】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される改変ＮＫ細胞は、例えば、ｈｎＣＤ１６などの外因性ＣＤ１６変異型の発現、ＩＬ１５／ＩＬ１５ＲＡ融合体の発現、外因性ＨＬＡ－Ｇの発現、外因性ＤＮ－ＴＧＦβＲ２の発現、外因性ＩＬ－１２の発現、外因性ＩＬ－１８の発現、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、Ｂ２Ｍの機能喪失、ＰＤ１の機能喪失、ＴＩＧＩＴの機能喪失、及び／又はＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集を含んでなってもよい。

【００１３】

一態様では、本開示は、改変リンパ球を特徴とし、改変リンパ球は、内在性ＣＤ３、ＣＤ４、及び／又はＣＤ８を発現せず；及び（ｉ）ＣＤ５６（ＮＣＡＭ）、ＣＤ４９、及び／又はＣＤ４５；（ｉｉ）ＮＫ細胞受容体（分化抗原群１６（ＣＤ１６））；（ｉｉｉ）ナチュラルキラーグループ２メンバーＤ（ＮＫＧ２Ｄ）；（ｉｖ）ＣＤ６９；（ｖ）天然細胞傷害性受容体；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせをコード化する少なくとも１つの内在性遺伝子を発現し、改変リンパ球は、さらに、（１）（ｉ）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）；（ｉｉ）免疫グロブリンγＦｃ領域受容体ＩＩＩ（ＦｃγＲＩＩＩ、ＣＤ１６）の非天然変異型；（ｉｉｉ）インターロイキン１５（ＩＬ－１５）；（ｉｖ）ＩＬ－１５受容体（ＩＬ－１５Ｒ）、若しくはその変異型；（ｖ）インターロイキン１２（ＩＬ－１２）；（ｖｉ）インターロイキン１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）、若しくはその変異型；（ｖｉｉ）ヒト白血球抗原Ｇ（ＨＬＡ－Ｇ）；（ｖｉｉｉ）ヒト白血球抗原Ｅ（ＨＬＡ－Ｅ）；（ｉｘ）をコード化する核酸配列白血球表面抗原分化抗原群ＣＤ４７（ＣＤ４７）；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせをコード化する少なくとも１つの外因性核酸

コンストラクトを含んでなり、及び／又は（２）（ｉ）形質転換成長因子β受容体２（ＴＧＦβＲ２）；（ｉｉ）アデノシンＡ２ａ受容体（ＡＤＯＲＡ２Ａ）；（ｉｉｉ）Ｉｇ及びＩＴＩＭドメインを備えたＴ細胞免疫受容体（ＴＩＧＩＴ）；（ｉｖ）β－２ミクログロブリン（ｍｉｃｒｏｇｏｂｕｌｉｎ）（Ｂ２Ｍ）；（ｖ）プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１）；（ｖｉ）サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）；（ｖｉｉ）クラスＩＩ、主要組織適合性複合体、トランス活性化剤（ＣＩＩＴＡ）；（ｖｉｉｉ）ナチュラルキラー細胞受容体ＮＫＧ２Ａ（ナチュラルキラーグループ２Ａ）；（ｉｘ）２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子、及び／又は２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子；（ｘ）分化抗原群３２Ｂ（ＣＤ３２Ｂ、ＦＣＧＲ２Ｂ）；（ｘｉ）Ｔ細胞受容体αコンスタント（ＴＲＡＣ）；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせの少なくとも１つの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失及びＣＩＳＨの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失及びＴＩＧＩＴの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失及びＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失及びＮＫＧ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＣＩＳＨの機能喪失及びＴＩＧＩＴの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＣＩＳＨの機能喪失及びＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＣＩＳＨの機能喪失及びＮＫＧ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＴＩＧＩＴの機能喪失及びＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＴＩＧＩＴの機能喪失及びＮＫＧ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失及びＮＫＧ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、ＣＩＳＨの機能喪失、及びＴＩＧＩＴの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、ＣＩＳＨの機能喪失、及びＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、ＣＩＳＨの機能喪失、及びＮＫＧ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、ＴＩＧＩＴの機能喪失、及びＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、ＴＩＧＩＴの機能喪失、及びＮＫＧ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、ＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失、及びＮＫＧ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＣＩＳＨの機能喪失、ＴＩＧＩＴの機能喪失、及びＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＣＩＳＨの機能喪失、ＴＩＧＩＴの機能喪失、及びＮＫＧ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＣＩＳＨの機能喪失、ＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失、及びＮＫＧ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＴＩＧＩＴの機能喪失、ＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失、及びＮＫＧ２Ａの機能喪失を示す。

【００１４】

一実施形態では、改変リンパ球は、内在性ＣＤ３、ＣＤ４、及び／又はＣＤ８を発現せず；及び（ｉ）ＣＤ５６（ＮＣＡＭ）、ＣＤ４９、及び／又はＣＤ４５；（ｉｉ）ＮＫ細胞受容体（分化抗原群１６（ＣＤ１６））；（ｉｉｉ）ナチュラルキラーグループ２構成員Ｄ（ＮＫＧ２Ｄ）；（ｉｖ）ＣＤ６９；（ｖ）天然細胞傷害性受容体；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせをコード化する少なくとも１つの内在性遺伝子を発現し、改変リンパ球は、さらに、（１）（ｉ）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）；（ｉｉ）免疫グロブリンγＦｃ領域受容体ＩＩＩ（ＦｃγＲＩＩＩ、ＣＤ１６）の非天然変異型；（ｉｉｉ）インターロイキン１５（ＩＬ－１５）；（ｉｖ）ＩＬ－１５受容体（ＩＬ－１５Ｒ）、若しくはその変異型；（ｖ）インターロイキン１２（ＩＬ－１２）；（ｖｉ）インターロイキン－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）、若しくはその変異型；（ｖｉｉ）ヒト白血球抗原Ｇ（ＨＬＡ－Ｇ）；（ｖｉｉｉ）ヒト白血球抗原Ｅ（ＨＬＡ－Ｅ）；（ｉｘ）をコード化する核酸配列白血球表面抗原分化抗原群ＣＤ４７（ＣＤ４７）；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせをコード化する少なくとも１つの外因性核酸コンストラクトを含んでなり、及

び／又は（２）形質転換成長因子β受容体２（ＴＧＦβＲ２）、サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）、又はそれらの組み合わせの機能喪失を示す。

【００１５】

いくつかの実施形態では、核酸コンストラクトは、例えば、本明細書で提供される改変ＮＫ細胞などの改変リンパ球中などの標的細胞中の核酸配列の発現を駆動するプロモーターに作動可能に連結された、（１）（ｉ）～（１）（ｉｘ）に列挙される遺伝子産物をコード化する核酸配列、又はそれらの任意の組み合わせを含んでなる発現コンストラクトである。いくつかの実施形態では、プロモーターは標的細胞中で特異的に発現され、例えば、プロモーターはリンパ球又はＮＫ細胞特異的プロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターはＣＤ５６（ＮＣＡＭ）プロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターはＣＤ４９プロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターはＣＤ４５プロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターはＦｃγＲＩＩＩプロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターはＮＫＧ２Ｄプロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターはＣＤ６９プロモーターである。

【００１６】

いくつかの実施形態では、（１）に列挙された遺伝子産物をコード化する外因性核酸コンストラクトは、（２）に列挙された遺伝子産物をコード化するゲノム遺伝子座にノックインされ、（２）に列挙される遺伝子産物の機能喪失、及び異種プロモーターによって駆動されるか、又は外因性核酸コンストラクトがその中にノックインされるゲノム遺伝子座の内在性プロモーターによって駆動される、外因性核酸コンストラクトによってコード化される遺伝子産物の発現をもたらす。

【００１７】

いくつかの実施形態では、（１）に列挙される遺伝子産物をコード化する外因性核酸コンストラクトは、例えば、ＲＯＳＡ２６遺伝子座、コラーゲン遺伝子座、又はＡＡＶＳＩゲノム遺伝子座などの「セーフハーバー」遺伝子座にノックインされる。

【００１８】

いくつかの実施形態では、２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子は、ＨＬＡ－ＤＱＡ１、ＨＬＡ－ＤＲＡ、ＨＬＡ－ＤＰＡ１、ＨＬＡ－ＤＭＡ、ＨＬＡ－ＤＱＡ２、及びＨＬＡ－ＤＯＡから選択される。いくつかの実施形態では、２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子は、ＨＬＡ－ＤＭＢ、ＨＬＡ－ＤＯＢ、ＨＬＡ－ＤＰＢ１、ＨＬＡ－ＤＱＢ１、ＨＬＡ－ＤＱＢ３、ＨＬＡ－ＤＱＢ２、ＨＬＡ－ＤＲＢ１、ＨＬＡ－ＤＲＢ３、ＨＬＡ－ＤＲＢ４、及びＨＬＡ－ＤＲＢ５から選択される。

【００１９】

いくつかの実施形態では、改変リンパ球は、再配列された内在性Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）遺伝子座を含んでなる。いくつかの実施形態では、再配列されたＴＣＲは、ＴＣＲαＶＪ及び／又はＴＣＲβＶ（Ｄ）Ｊセクションの再配列と、完全なＶドメインエクソンとを含んでなる。

【００２０】

いくつかの実施形態では、天然細胞傷害性受容体は、ＮＫｐ３０、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ４６、及び／又はＣＤ１５８ｂである。

【００２１】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒ変異型は、構成的に活性なＩＬ－１５Ｒ変異型である。いくつかの実施形態では、構成的に活性なＩＬ－１５Ｒ変異型は、例えば、ＩＬ－１５タンパク質又はＩＬ－１５Ｒ－その結合断片などのＩＬ－１５Ｒ及びＩＬ－１５Ｒ作動薬の間の融合体である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒ作動薬は、ＩＬ－１５、又はそのＩＬ－１５Ｒ結合変異型である。例示的な適切なＩＬ－１５Ｒ変異型としては、限定されることなく、例えば、そのそれぞれの全内容が参照により本明細書に援用される、Ｍｏｒｔｉｅｒ Ｅ ｅｔ ａｌ，２００６；Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２００６ ２８１：１６１２－１６１９；又はＢｅｓｓａｒｄ－Ａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒ．２００９ Ｓｅ

ｐ；８（９）：２７３６－４５に記載されるものが挙げられる。追加的な適切な変異型は、本開示及び当該技術分野の知識に基づいて当業者には明らかであろう。本開示は、この点において限定されるものではない。

【００２２】

いくつかの実施形態では、ＴＧＦβＲ２は、ＴＧＦβ受容体ＩＩ（ＤＮ－ＴＧＦβＲ２）のドミナントネガティブ変異型である。

【００２３】

いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、メソテリン、ＥＧＦＲ、ＨＥＲ２、ＭＩＣＡ／Ｂ、ＢＣＭＡ、ＣＤ１９、ＣＤ２２、ＣＤ２０、ＣＤ３３、ＣＤ１２３、アンドロゲン受容体、ＰＳＭＡ、ＰＳＣＡ、Ｍｕｃ１、ＨＰＶウイルスペプチド（ｉｅ．Ｅ７）、ＥＢＶウイルスペプチド、ＣＤ７０、ＷＴ１、ＣＥＡ、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ＩＬ１３Ｒα２、ＧＤ２、ＣＡ１２５、ＣＤ７、ＥｐＣＡＭ、Ｍｕｃ１６、及び／又はＣＤ３０との結合ができる。

【００２４】

いくつかの実施形態では、改変リンパ球は万能性又は多能性幹細胞に由来する。いくつかの実施形態では、多能性幹細胞は造血幹細胞（ＨＳＣ）である。いくつかの実施形態では、万能性幹細胞は誘導万能性幹細胞（ｉＰＳＣ）である。いくつかの実施形態では、万能性幹細胞は胚性幹細胞（ＥＳＣ）である。

【００２５】

いくつかの実施形態では、改変リンパ球は、（１）（ｉ）～（１）（ｉｘ）のいずれか、又はそれらの任意の組み合わせをコード化する少なくとも１つ又は複数の外因性核酸コンストラクト；及び／又はリンパ球における（２）（ｉ）～（２）（ｘｉ）のいずれか、又はそれらの任意の組み合わせの機能喪失をもたらす、少なくとも１つのゲノム改変を含んでなる、万能性又は多能性幹細胞に由来する。

【００２６】

いくつかの実施形態では、改変リンパ球は、リンパ球における（２）（ｉ）～（２）（ｘｉ）のいずれか、又はそれらの任意の組み合わせの機能喪失をもたらす、少なくとも１つのゲノム改変を含んでなる、万能性又は多能性幹細胞に由来する。

【００２７】

いくつかの実施形態では、リンパ球における１つ又は複数の（２）（ｉ）～（２）（ｘｉ）機能喪失をもたらす、少なくとも１つのゲノム改変は、外因性核酸コンストラクトの挿入を含んでなる。

【００２８】

いくつかの実施形態では、外因性核酸コンストラクトは、（１）（ｉ）～（１）（ｉｘ）のいずれか、又はそれらの任意の組み合わせをコード化する。

【００２９】

いくつかの実施形態では、改変リンパ球は、（２）に列挙される２つ以上の遺伝子／タンパク質の機能喪失を示す。

【００３０】

いくつかの実施形態では、改変リンパ球は、（２）の遺伝子を保有するか又はタンパク質をコード化するゲノム遺伝子座への外因性ヌクレオチドコンストラクトのインデル又は挿入を含んでなる。

【００３１】

いくつかの実施形態では、改変リンパ球は、２つ以上の（２）の遺伝子を保有するか又はタンパク質をコード化するゲノム遺伝子座への外因性ヌクレオチドコンストラクトのインデル又は挿入を含んでなる。

【００３２】

いくつかの実施形態では、改変リンパ球は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼでゲノム遺伝子座を編集することによって得られた。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレア

ーゼは、ＳｐＣａｓ９、ＳａＣａｓ９、（ＫＫＨ）ＳａＣａｓ９、ＡｓＣｐｆ１（ＡｓＣａｓ１２ａ）、ＬｂＣｐｆ１、（ＬｂＣａｓ１２ａ）、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ、Ｃａｓ１２ｈ１、Ｃａｓ１２ｉ１、Ｃａｓ１２ｃ１、Ｃａｓ１２ｃ２、ｅＳｐＣａｓ９、Ｃａｓ９－ＨＦ１、ＨｙｐａＣａｓ９、ｄＣａｓ９－Ｆｏｋｌ、Ｓｎｉｐｅｒ－Ｃａｓ９、ｘＣａｓ９、ＡａＣａｓ１２ｂ、ｅｖｏＣａｓ９、ＳｐＣａｓ９－ＮＧ、ＶＲＱＲ、ＶＲＥＲ、ＮｍｅＣａｓ９、ＣｊＣａｓ９、ＢｈＣａｓ１２ｂ、及びＢｈＣａｓ１２ｂ　Ｖ４からなる群から選択される。

【００３３】

いくつかの実施形態では、改変リンパ球は、（２）のタンパク質のいずれかをコード化する遺伝子を保有する２つ以上のゲノム遺伝子座を編集することによって得られる。いくつかの実施形態では、（２）のタンパク質のいずれかをコード化する遺伝子を保有する２つ以上のゲノム遺伝子座の少なくとも２つは、異なるＲＮＡ誘導ヌクレアーゼによって編集されている。いくつかの実施形態では（２）のタンパク質のいずれかをコード化する遺伝子を保有する２つ以上のゲノム遺伝子座の少なくとも１つが、Ｃａｓ９によって編集されており、遺伝子座の少なくとも１つがＣｐｆ１によって編集されている。

【００３４】

いくつかの実施形態では、改変リンパ球は、内在性ＣＤ５６、ＣＤ４９、及びＣＤ４５を発現する。

【００３５】

いくつかの実施形態では、改変リンパ球はナチュラルキラー（ＮＫ）細胞である。

【００３６】

別の態様では、本開示は、改変細胞を特徴とし、改変細胞は、（１）（ｉ）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）；（ｉｉ）疫グロブリンγＦｃ領域受容体ＩＩＩ（ＦｃγＲＩＩＩ、分化抗原群１６（（ＣＤ１６））の非天然由来の変異型；（ｉｉｉ）インターロイキン１５（ＩＬ－１５）；（ｉｖ）ＩＬ－１５受容体（ＩＬ－１５Ｒ）、若しくはその変異型；（ｖ）インターロイキン１２（ＩＬ－１２）；（ｖｉ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）、若しくはその変異型；（ｖｉｉ）ヒト白血球抗原Ｇ（ＨＬＡ－Ｇ）；（ｖｉｉｉ）ヒト白血球抗原Ｅ（ＨＬＡ－Ｅ）；（ｉｘ）白血球表面抗原分化抗原群ＣＤ４７（ＣＤ４７）；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせをコード化する少なくとも１つの外因性核酸コンストラクトを含んでなり、及び／又は（２）（ｉ）形質転換成長因子β受容体２（ＴＧＦβＲ２）；（ｉｉ）アデノシンＡ２ａ受容体（ＡＤＯＲＡ２Ａ）；（ｉｉｉ）Ｉｇ及びＩＴＩＭドメインを備えたＴ細胞免疫受容体（ＴＩＧＩＴ）；（ｉｖ）β－２ミクログロブリン（ｍｉｃｒｏｇｏｂｕｌｉｎ）（Ｂ２Ｍ）；（ｖ）プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１）；（ｖｉ）サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）；（ｖｉｉ）クラスＩＩ、主要組織適合性複合体、トランス活性化剤（ＣＩＩＴＡ）；（ｖｉｉｉ）ナチュラルキラー細胞受容体ＮＫＧ２Ａ（ナチュラルキラーグループ２Ａ）；（ｉｘ）２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子、及び／又は２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子；（ｘ）分化抗原群３２Ｂ（ＣＤ３２Ｂ、ＦＣＧＲ２Ｂ）；（ｘｉ）Ｔ細胞受容体αコンスタント（ＴＲＡＣ）；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせの少なくとも１つの機能喪失を示す。一実施形態では、改変細胞は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失及びＣＩＳＨの機能喪失を示す。一実施形態では、改変細胞は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失及びＴＩＧＩＴの機能喪失を示す。一実施形態では、改変細胞は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失及びＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変細胞は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失及びＮＫＧ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変細胞は、ＣＩＳＨの機能喪失及びＴＩＧＩＴの機能喪失を示す。一実施形態では、改変細胞は、ＣＩＳＨの機能喪失及びＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変細胞は、ＣＩＳＨの機能喪失及びＮＫＧ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変細胞は、ＴＩＧＩＴの機能喪失及びＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変細胞は、ＴＩＧＩＴの機能喪失及びＮＫＧ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変細胞は、ＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失及びＮＫＧ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改

変細胞は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、ＣＩＳＨの機能喪失、及びＴＩＧＩＴの機能喪失を示す。一実施形態では、改変細胞は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、ＣＩＳＨの機能喪失、及びＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変細胞は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、ＣＩＳＨの機能喪失、及びＮＫＧ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変細胞は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、ＴＩＧＩＴの機能喪失、及びＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変細胞は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、ＴＩＧＩＴの機能喪失、及びＮＫＧ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変細胞は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、ＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失、及びＮＫＧ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変細胞は、ＣＩＳＨの機能喪失、ＴＩＧＩＴの機能喪失、及びＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変細胞は、ＣＩＳＨの機能喪失、ＴＩＧＩＴの機能喪失、及びＮＫＧ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変細胞は、ＣＩＳＨの機能喪失、ＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失、及びＮＫＧ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変細胞は、ＴＩＧＩＴの機能喪失、ＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失、及びＮＫＧ２Ａの機能喪失を示す。

【００３７】

一実施形態では、改変細胞は、（１）（ｉ）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）；（ｉｉ）疫グロブリンγＦｃ領域受容体ＩＩＩ（ＦｃγＲＩＩＩ、分化抗原群１６（（ＣＤ１６））の非天然由来の変異型；（ｉｉｉ）インターロイキン１５（ＩＬ－１５）；（ｉｖ）ＩＬ－１５受容体（ＩＬ－１５Ｒ）、若しくはその変異型；（ｖ）インターロイキン１２（ＩＬ－１２）；（ｖｉ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）、若しくはその変異型；（ｖｉｉ）ヒト白血球抗原Ｇ（ＨＬＡ－Ｇ）；（ｖｉｉｉ）ヒト白血球抗原Ｅ（ＨＬＡ－Ｅ）；（ｉｘ）白血球表面抗原分化抗原群ＣＤ４７（ＣＤ４７）；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせをコード化する少なくとも１つの外因性核酸コンストラクトを含んでなり、及び／又は（２）形質転換成長因子β受容体２（ＴＧＦβＲ２）、サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）、又はそれらの組み合わせの機能喪失を示す。

【００３８】

いくつかの改変細胞の実施形態では、例えば、本明細書で提供される改変リンパ球などの外因性核酸コンストラクトを含んでなる外因性核酸コンストラクトは、例えば、本明細書で提供される改変ＮＫ細胞などの改変リンパ球中などの標的細胞中の核酸配列の発現を駆動するプロモーターに作動可能に連結された、（１）（ｉ）～（１）（ｘ）に列挙される遺伝子産物をコード化する核酸配列を含んでなる発現コンストラクト、又はそれらの任意の組み合わせである。いくつかの実施形態では、プロモーターは標的細胞中で特異的に発現され、例えば、プロモーターはリンパ球又はＮＫ細胞特異的プロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターはＣＤ５６（ＮＣＡＭ）プロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターはＣＤ４９プロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターはＣＤ４５プロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターはＦｃγＲＩＩＩプロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターはＮＫＧ２Ｄプロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターはＣＤ６９プロモーターである。

【００３９】

例えば、本明細書で提供される改変リンパ球などの改変細胞のいくつかの実施形態では、（１）に列挙される遺伝子産物をコード化する外因性核酸コンストラクトは、（２）に列挙される遺伝子産物をコード化するゲノム遺伝子座にノックインされ、（２）に列挙される遺伝子産物の機能喪失と、異種プロモーターによって駆動されるか、又はその中に外因性核酸コンストラクトがノックインされるゲノム遺伝子座の内在性プロモーターによって駆動される、外因性核酸コンストラクトによってコード化される遺伝子産物の発現とをもたらす。

【００４０】

いくつかの実施形態では、例えば、本明細書で提供される改変リンパ球などの改変細胞は、ＨＬＡ－ＤＱＡ１、ＨＬＡ－ＤＲＡ、ＨＬＡ－ＤＰＡ１、ＨＬＡ－ＤＭＡ、ＨＬＡ－Ｄ

ＱＡ２、及びＨＬＡ－ＤＯＡから選択される、２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子、及び／又は２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子、２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子中に機能喪失を含んでなる。いくつかの実施形態では、２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子は、ＨＬＡ－ＤＭＢ、ＨＬＡ－ＤＯＢ、ＨＬＡ－ＤＰＢ１、ＨＬＡ－ＤＱＢ１、ＨＬＡ－ＤＱＢ３、ＨＬＡ－ＤＱＢ２、ＨＬＡ－ＤＲＢ１、ＨＬＡ－ＤＲＢ３、ＨＬＡ－ＤＲＢ４、及びＨＬＡ－ＤＲＢ５から選択される。

【００４１】

いくつかの実施形態では、改変細胞は免疫細胞である。いくつかの実施形態では、免疫細胞はリンパ球である。いくつかの実施形態では、リンパ球はＮＫ細胞である。いくつかの実施形態では、リンパ球はｉＮＫ細胞である。

【００４２】

いくつかの実施形態では、改変細胞は例えば、ｉＰＳ細胞、又は造血幹細胞などの多能性又は万能性幹細胞、又は例えば、ｉＮＫ細胞などのこのような多能性又は万能性幹細胞に由来する分化細胞である。

【００４３】

いくつかの実施形態では、改変細胞は内在性Ｔ細胞共受容体を発現しない。

【００４４】

いくつかの実施形態では、リンパ球はＴ細胞である。

【００４５】

いくつかの実施形態では、改変細胞は、再配列された内在性ＴＣＲ遺伝子座を含んでなり、再配列されたＴＣＲは、ＴＣＲαＶＪ及び／又はＴＣＲβＶ（Ｄ）Ｊセクションの再配列及び全てＶ－ドメインエクソンを含んでなる。

【００４６】

いくつかの実施形態では、改変細胞は、（ｉ）ＣＤ５６（ＮＣＡＭ）、ＣＤ４９、及び／又はＣＤ４５；（ｉｉ）ＮＫ細胞受容体（分化抗原群１６（ＣＤ１６））；（ｉｉｉ）ナチュラルキラーグループ２構成員Ｄ（ＮＫＧ２Ｄ）；（ｉｖ）ＣＤ６９；（ｖ）天然細胞傷害性受容体；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせをコード化する少なくとも１つの内在性遺伝子を発現する。

【００４７】

いくつかの実施形態では、天然細胞傷害性受容体は、ＮＫｐ３０、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ４６、及び／又はＣＤ１５８ｂである。

【００４８】

いくつかの実施形態では、改変細胞は、少なくとも１つのＮＫ細胞バイオマーカーを発現する。いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞バイオマーカーは、ＣＤ５６、ＣＤ４９、及び／又はＣＤ４５である。

【００４９】

一態様では、本明細書で開示されるのは、本明細書に記載の改変リンパ球、又は本明細書に記載の改変細胞を含んでなる、細胞集団である。

【００５０】

一態様では、本明細書で開示されるのは、本明細書で開示される細胞集団を含んでなる医薬組成物である。

【００５１】

別の態様では、本開示は、リンパ球の単離集団を提供し、集団は、少なくとも1×10^{3}、少なくとも1×10^{4}、少なくとも1×10^{5}、少なくとも2×10^{5}、少なくとも3×10^{5}、少なくとも4×10^{5}、少なくとも5×10^{5}、少なくとも1×10^{6}、少なくとも2×10^{6}、少なくとも3×10^{6}、少なくとも4×10^{6}、少なくとも5×10^{6}、少なくとも1×10^{7}、少なくとも1×10^{7}、少なくとも2×10^{7}、少なくとも3×10^{7}、少なくとも4×10^{7}、少なくとも5×10^{7}、少なくとも1×10^{8}、少なくとも2×10^{8}、少なくとも3×10^{8}、少なくとも4×10^{8}、少なくとも5×10^{8}、少

なくとも１×１０^{9}、少なくとも１×１０^{9}、少なくとも２×１０^{9}、少なくとも３×１０^{9}、少なくとも４×１０^{9}、少なくとも５×１０^{9}、少なくとも１×１０^{10}、少なくとも２×１０^{10}、少なくとも３×１０^{10}、少なくとも４×１０^{10}、少なくとも５×１０^{10}、少なくとも１×１０^{11}、又は少なくとも１×１０^{12}個の細胞を含んでなり、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．９％、少なくとも９９．９９％、少なくとも９９．９９９％、又は実質的に１００％のリンパ球が、（ａ）再配列されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）遺伝子座を含んでなり；（ｂ）内在性ＣＤ３を発現せず；（ｃ）内在性ＣＤ５６（ＮＣＡＭ）、ＣＤ４９、及び／又はＣＤ４５を発現し；（ｄ）（ｉ）ＮＫ細胞受容体（分化抗原群１６（ＣＤ１６））；（ｉｉ）ナチュラルキラーグループ２メンバーＤ（ＮＫＧ２Ｄ）；（ｉｉｉ）ＣＤ６９；（ｉｖ）天然細胞傷害性受容体；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせをコード化する少なくとも１つの内在性遺伝子を発現する集団中にあり、改変リンパ球は、さらに、（１）（ｉ）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）；（ｉｉ）免疫グロブリンγＦｃ領域受容体ＩＩＩ（ＦｃγＲＩＩＩ、ＣＤ１６）の非天然変異型；（ｉｉｉ）インターロイキン１５（ＩＬ－１５）；（ｉｖ）ＩＬ－１５受容体（ＩＬ－１５Ｒ）、若しくはその変異型；（ｖ）インターロイキン１２（ＩＬ－１２）；（ｖｉ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）、若しくはその変異型；（ｖｉｉ）ヒト白血球抗原Ｇ（ＨＬＡ－Ｇ）；（ｖｉｉｉ）ヒト白血球抗原Ｅ（ＨＬＡ－Ｅ）；（ｉｘ）白血球表面抗原分化抗原群ＣＤ４７（ＣＤ４７）；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせをコード化する少なくとも１つの外因性核酸コンストラクトを含んでなり、及び／又は（２）（ｉ）形質転換成長因子β受容体２（ＴＧＦβＲ２）；（ｉｉ）アデノシンＡ２ａ受容体（ＡＤＯＲＡ２Ａ）；（ｉｉｉ）Ｉｇ及びＩＴＩＭドメインを備えたＴ細胞免疫受容体（ＴＩＧＩＴ）；（ｉｖ）β－２ミクログロブリン（ｍｉｃｒｏｇｏｂｕｌｉｎ）（Ｂ２Ｍ）；（ｖ）プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１）；（ｖｉ）サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）；（ｖｉｉ）クラスＩＩ、主要組織適合性複合体、トランス活性化剤（ＣＩＩＴＡ）；（ｖｉｉｉ）ナチュラルキラー細胞受容体ＮＫＧ２Ａ（ナチュラルキラーグループ２Ａ）；（ｉｘ）２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子、及び／又は２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子；（ｘ）分化抗原群３２Ｂ（ＣＤ３２Ｂ、ＦＣＧＲ２Ｂ）；（ｘｉ）Ｔ細胞受容体αコンスタント（ＴＲＡＣ）；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせの少なくとも１つの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失及びＣＩＳＨの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失及びＴＩＧＩＴの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失及びＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失及びＮＫＧ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＣＩＳＨの機能喪失及びＴＩＧＩＴの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＣＩＳＨの機能喪失及びＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＣＩＳＨの機能喪失及びＮＫＧ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＴＩＧＩＴの機能喪失及びＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＴＩＧＩＴの機能喪失及びＮＫＧ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失及びＮＫＧ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、ＣＩＳＨの機能喪失、及びＴＩＧＩＴの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、ＣＩＳＨの機能喪失、及びＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、ＣＩＳＨの機能喪失、及びＮＫＧ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、ＴＩＧＩＴの機能喪失、及びＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、ＴＩＧＩＴの機能喪失、及びＮＫＧ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、ＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失、及びＮＫＧ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＣＩＳＨの機能喪失

、ＴＩＧＩＴの機能喪失、及びＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＣＩＳＨの機能喪失、ＴＩＧＩＴの機能喪失、及びＮＫＧ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＣＩＳＨの機能喪失、ＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失、及びＮＫＧ２Ａの機能喪失を示す。一実施形態では、改変リンパ球は、ＴＩＧＩＴの機能喪失、ＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失、及びＮＫＧ２Ａの機能喪失を示す。

【００５２】

一実施形態では、筋細胞の単離集団は、少なくとも1×10^{3}、少なくとも1×10^{4}、少なくとも1×10^{5}、少なくとも2×10^{5}、少なくとも3×10^{5}、少なくとも4×10^{5}、少なくとも5×10^{5}、少なくとも1×10^{6}、少なくとも2×10^{6}、少なくとも3×10^{6}、少なくとも4×10^{6}、少なくとも5×10^{6}、少なくとも1×10^{7}、少なくとも1×10^{7}、少なくとも2×10^{7}、少なくとも3×10^{7}、少なくとも4×10^{7}、少なくとも5×10^{7}、少なくとも1×10^{8}、少なくとも2×10^{8}、少なくとも3×10^{8}、少なくとも4×10^{8}、少なくとも5×10^{8}、少なくとも1×10^{9}、少なくとも1×10^{9}、少なくとも2×10^{9}、少なくとも3×10^{9}、少なくとも4×10^{9}、少なくとも5×10^{9}、少なくとも1×10^{10}、少なくとも2×10^{10}、少なくとも3×10^{10}、少なくとも4×10^{10}、少なくとも5×10^{10}、少なくとも1×10^{11}、又は少なくとも1×10^{12}個の細胞を含んでなり、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．９％、少なくとも９９．９９％、少なくとも９９．９９９％、又は実質的に１００％のリンパ球が、（ａ）再配列されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）遺伝子座を含んでなり；（ｂ）内在性ＣＤ３を発現せず；（ｃ）内在性ＣＤ５６（ＮＣＡＭ）、ＣＤ４９、及び／又はＣＤ４５を発現し；（ｄ）（ｉ）ＮＫ細胞受容体（分化抗原群１６（ＣＤ１６））；（ｉｉ）ナチュラルキラーグループ２メンバーＤ（ＮＫＧ２Ｄ）；（ｉｉｉ）ＣＤ６９；（ｉｖ）天然細胞傷害性受容体；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせをコード化する少なくとも１つの内在性遺伝子を発現する集団中にあり、改変リンパ球は、さらに、（１）（ｉ）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）；（ｉｉ）免疫グロブリンγＦｃ領域受容体ＩＩＩ（ＦｃγＲＩＩＩ、ＣＤ１６）の非天然変異型；（ｉｉｉ）インターロイキン１５（ＩＬ－１５）；（ｉｖ）ＩＬ－１５受容体（ＩＬ－１５Ｒ）、若しくはその変異型；（ｖ）インターロイキン１２（ＩＬ－１２）；（ｖｉ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）、若しくはその変異型；（ｖｉｉ）ヒト白血球抗原Ｇ（ＨＬＡ－Ｇ）；（ｖｉｉｉ）ヒト白血球抗原Ｅ（ＨＬＡ－Ｅ）；（ｉｘ）白血球表面抗原分化抗原群ＣＤ４７（ＣＤ４７）；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせをコード化する少なくとも１つの外因性核酸コンストラクトを含んでなり、及び／又は（２）形質転換成長因子β受容体２（ＴＧＦβＲ２）、サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）、又はそれらの組み合わせの機能喪失を示す。

【００５３】

いくつかの実施形態では、再配列されたＴＣＲ遺伝子座は、ＴＣＲαＶＪ及び／又はＴＣＲβＶ（Ｄ）Ｊセクションの再配列と、完全なＶドメインエクソンとを含んでなる。いくつかの実施形態では、再配列された内在性ＴＣＲ遺伝子座は、２つ以下の再配列された対立遺伝子からなる。

【００５４】

いくつかの実施形態では、天然細胞傷害性受容体は、ＮＫｐ３０、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ４６、及び／又はＣＤ１５８ｂである。

【００５５】

いくつかの実施形態では、リンパ球の生体外集団は、１％を超える、０．１％を超える、０．００１％を超える、０．０００１％を超える、０．００００１％を超える、０．０００００１％を超える、０．００００００１％を超える、０．０００００００１％を超える、０．００００００００１％を超える、０．０００００００００１％を超える、又は０．０００００００００００１％を超えるを超える（ｍｏｒｅ　ｔｈａｎ　ｍｏｒｅ　ｔｈａｎ）外因性核酸コンストラクトからの再プログラム化因子を発現する細胞を含まない。

【００５６】
いくつかの実施形態では、リンパ球の生体外集団は、外因性核酸コンストラクトからの再プログラム化因子を発現する細胞を含まない。いくつかの実施形態では、再プログラム化因子は、Ｏｃｔ－４及び／又はＳｏｘ－２である。
【００５７】
いくつかの実施形態では、リンパ球の生体外集団は、再プログラム化因子をコード化するエピソーム発現コンストラクトを保有する細胞を含まない。
【００５８】
いくつかの実施形態では、リンパ球の生体外集団中の各細胞は、（１）に列挙される外因性核酸コンストラクトと、（２）に列挙される機能喪失との同じ組み合わせを含んでなる。
【００５９】
いくつかの実施形態では、リンパ球の生体外集団は、０．００１％未満、０．００２％未満、０．００３％未満、０．００４％未満、０．００５％未満、０．００６％未満、０．００７％未満、０．００８％未満、０．００９％未満、０．０１％未満、０．０２％未満、０．０３％未満、０．０４％未満、０．０５％未満、０．０６％未満、０．０７％未満、０．０８％未満、０．０９％未満、０．１％未満、０．２％未満、０．３％未満、０．４％未満、０．５％未満、０．６％未満、０．７％未満、０．８％未満、０．９％未満、１％未満、２％未満、３％未満、４％未満、５％未満、６％未満、７％未満、８％未満、９％未満、又は１０％未満の染色体転座保有細胞を含んでなる。
【００６０】
別の態様では、本開示は、本開示に記載されるような任意の改変リンパ球、任意の改変細胞、任意の医薬組成物、又は単離生体外細胞集団をそれを必要とする対象に投与するステップを含んでなる、対象を治療する方法を提供する。いくつかの実施形態では、対象は、増殖性疾患を有するか、又は増殖性疾患と診断されている。いくつかの実施形態では、増殖性疾患はがんである。いくつかの実施形態では、がんは、乳がん、結腸直腸がん、胃がん、腎細胞がん腫（ＲＣＣ）、又は非小細胞肺がん（ＮＳＣＬＣ）、固形腫瘍、膀胱がん、肝細胞がん、前立腺がん、卵巣／子宮がん、膵臓がん、中皮腫、黒色腫、神経膠芽腫、頸部及びＨＰＶ＋頭頸部がんなどのＨＰＶ関連及び／又はＨＰＶ陽性がん、口腔がん、咽頭がん、甲状腺がん、胆嚢がん、軟部組織肉腫、及びＡＬＬ、ＣＬＬ、ＮＨＬ、ＤＬＢＣＬ、ＡＭＬ、ＣＭＬ、多発性骨髄腫（ＭＭ）の様な血液学的がんである。
【００６１】
いくつかの実施形態では、本開示の改変リンパ球、改変細胞、細胞集団、又はリンパ球の単離生体外集団を生成する方法は、（ａ）誘導万能性幹細胞（ｉＰＳＣ）を得るステップと；（ｂ）ｉＰＳＣ、又はその未分化の又は分化した娘細胞を改変し、（１）の少なくとも１つの外因性遺伝子を発現させるステップを含め、及び／又は（２）の少なくとも１つの遺伝子の機能喪失を含めるステップと、（ｃ）ｉＰＳＣの分化を造血系細胞に方向づけるステップとを含んでなり、造血系細胞は、ｉＰＳＣに含まれる編集された遺伝子座を保持する。
【００６２】
いくつかの実施形態では、分化を方向づけるステップは、（ｉ）ｉＰＳＣを、ＢＭＰ経路活性化剤と任意選択的にｂＦＧＦとを含む組成物に接触させて、中胚葉細胞を得るステップと；（ｉｉ）中胚葉細胞と、ＢＭＰ経路活性化剤、ｂＦＧＦ、及びＷＮＴ経路活性化剤を含んでなる組成物とを接触させて、決定的な造血性内皮（ＨＥ）分化能を有する中胚葉細胞を得るステップとを含んでなり、決定的な造血性内皮（ＨＥ）分化能を有する中胚葉細胞は、造血系細胞を提供でき；中胚葉細胞及び決定的なＨＥ分化能を有する中胚葉細胞が、胚様体を形成するステップなしで、ステップ（ｉ）及び（ｉｉ）において得られ；造血系細胞は、決定的な造血内皮細胞、造血幹及び前駆細胞（ＨＳＣ）、造血性多能性前駆細胞（ＭＰＰ）、プレＴ細胞前駆細胞、プレＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞、ＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、又はＢ細胞を含んでなる。

【００６３】
いくつかの実施形態では、ｉＰＳＣの分化を造血系細胞に方向づけるステップは、決定的なＨＥ分化能を有する中胚葉細胞と、ｂＦＧＦ及びＲＯＣＫ阻害剤を含んでなる組成物とを接触させて、決定的なＨＥ細胞を得るステップをさらに含んでなる。
【００６４】
いくつかの実施形態では、分化を方向づけるステップは、決定的なＨＥ細胞と、ＢＭＰ活性化剤、及び任意選択的にＲＯＣＫ阻害剤、及びＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、Ｆｌｔ３Ｌ、及びＩＬ１１からなる群から選択される１つ又は複数の増殖因子及びサイトカインを含んでなる組成物とを接触させ、造血系多能性前駆細胞（ＭＰＰ）を得るステップをさらに含んでなる。
【００６５】
いくつかの実施形態では、分化を方向づけるステップは、決定的なＨＥ細胞と、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、及びＩＬ７からなる群から選択される１つ又は複数の増殖因子及びサイトカイン、及び任意選択的にＢＭＰ活性化剤、ＲＯＣＫ阻害剤、ＴＰＯ、ＶＥＧＦ、及びｂＦＧＦの１つ又は複数を含んでなる組成物とを接触させ、プレＴ細胞前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞、及び／又はＴ細胞を得るステップをさらに含んでなる。
【００６６】
いくつかの実施形態では、分化を方向づけるステップは、決定的なＨＥ細胞と、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、ＩＬ７、及びＩＬ１５からなる群から選択される１つ又は複数の増殖因子及びサイトカイン、及び任意選択的にＢＭＰ活性化剤、ＲＯＣＫ阻害剤、ＶＥＧＦ、及びｂＦＧＦの１つ又は複数を含んでなる組成物とを接触させ、プレＴ細胞前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞、及び／又はＴ細胞を得るステップをさらに含んでなる。
【００６７】
いくつかの実施形態では、本開示の改変リンパ球、改変細胞、細胞集団、又はリンパ球の単離生体外集団を生成する方法は、ステップｃ）の前に、万能性幹細胞と、ＭＥＫ阻害剤、ＧＳＫ３阻害剤、及びＲＯＣＫ阻害剤を含んでなる組成物とを接触させて、細胞を播種し増殖させるステップをさらに含んでなる。
【００６８】
いくつかの実施形態では、本開示の改変リンパ球、改変細胞、細胞集団、又はリンパ球の単離生体外集団を生成する方法は、造血系細胞中で再配列されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）遺伝子座を検出するステップをさらに含んでなる。いくつかの実施形態では、方法は、目的の抗原に結合する再配列されたＴＣＲ遺伝子座によってコード化されるＴＣＲに基づいて、再配列されたＴＣＲ遺伝子座を含んでなる造血系統細胞を選択するステップをさらに含んでなる。いくつかの実施形態では、目的の抗原は腫瘍抗原である。
【００６９】
別の態様では、本開示は、ドナー細胞を万能性状態に再プログラム化するステップと；ドナー細胞ゲノム中の標的遺伝子座を編集するステップと；再プログラム化されたドナー細胞をリンパ球に分化させるステップとを含んでなる方法を提供する。いくつかの実施形態では、編集は、ドナー細胞を万能性状態に再プログラム化するステップの前又は最中に実施される。いくつかの実施形態では、ドナー細胞は、線維芽細胞、末梢血細胞、リンパ球、又はＴ細胞である。
【００７０】
別の態様では、本開示は、遺伝子改変万能性幹細胞をリンパ球に分化させるステップを含んでなる方法を提供し、遺伝子改変万能性幹細胞は、（１）（ｉ）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコード化する核酸；（ｉｉ）免疫グロブリンγＦｃ領域受容体ＩＩＩ（ＦｃγＲＩＩＩ、ＣＤ１６）の非天然変異型をコード化する核酸；（ｉｉｉ）インターロイキン１５（ＩＬ－１５）をコード化する核酸；（ｉｖ）ＩＬ－１５Ｒをコード化する核酸、若しくはその変異型；（ｖ）インターロイキン１２（ＩＬ－１２）をコード化する核酸；（ｖｉ）ＩＬ－１２Ｒをコード化する核酸、若しくはその変異型；（ｖｉｉ）ヒト白血球抗原Ｇ（ＨＬＡ－Ｇ）をコード化する核酸；（ｖｉｉｉ）ヒト白血球抗原Ｅ（ＨＬＡ－Ｅ）；

（ｉｘ）白血球表面抗原分化抗原群ＣＤ４７（ＣＤ４７）；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせを含んでなる外因性核酸、及び（２）（ｉ）形質転換成長因子β受容体２（ＴＧＦβＲ２）；（ｉｉ）アデノシンＡ２ａ受容体（ＡＤＯＲＡ２Ａ）；（ｉｉｉ）Ｉｇ及びＩＴＩＭドメインを備えたＴ細胞免疫受容体（ＴＩＧＩＴ）；（ｉｖ）β－２ミクログロブリン（ｍｉｃｒｏｇｏｂｕｌｉｎ）（Ｂ２Ｍ）；（ｖ）プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－２７９）；（ｖｉ）サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）；（ｖｉｉ）クラスＩＩ、主要組織適合性複合体、トランス活性化剤（ＣＩＩＴＡ）；（ｖｉｉｉ）ナチュラルキラー細胞受容体ＮＫＧ２Ａ（ナチュラルキラーグループ２Ａ）；（ｉｘ）２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子、及び／又は２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子；（ｘ）分化抗原群３２Ｂ（ＣＤ３２Ｂ、ＦＣＧＲ２Ｂ）；（ｘｉ）Ｔ細胞受容体αコンスタント（ＴＲＡＣ）；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせの遺伝子座の１つ又は複数中の外因性核酸のインデル又は挿入を含んでなり、インデル又は挿入は、それぞれの遺伝子座によってコード化される遺伝子産物の機能喪失をもたらす。一実施形態では、方法は、遺伝子改変万能性幹細胞をリンパ球に分化させるステップを含んでなり、遺伝子改変万能性幹細胞は、ＴＧＦβＲ２及びＣＩＳＨ中の外因性核酸のインデル、又は挿入を含んでなり、インデル又は挿入は、ＴＧＦβＲ２及び／又はＣＩＳＨによってコード化される遺伝子産物の機能喪失をもたらす。一実施形態では、方法は、遺伝子改変万能性幹細胞をリンパ球に分化させるステップを含んでなり、遺伝子改変万能性幹細胞は、ＴＧＦβＲ２及びＴＩＧＩＴ中の外因性核酸のインデル、又は挿入を含んでなり、インデル又は挿入は、ＴＧＦβＲ２及び／又はＴＩＧＩＴによってコード化される遺伝子産物の機能喪失をもたらす。一実施形態では、方法は、遺伝子改変万能性幹細胞をリンパ球に分化させるステップを含んでなり、遺伝子改変万能性幹細胞は、ＴＧＦβＲ２及びＡＤＯＲＡ２Ａ中の外因性核酸のインデル、又は挿入を含んでなり、インデル又は挿入は、ＴＧＦβＲ２及び／又はＡＤＯＲＡ２Ａによってコード化される遺伝子産物の機能喪失をもたらす。一実施形態では、方法は、遺伝子改変万能性幹細胞をリンパ球に分化させるステップを含んでなり、遺伝子改変万能性幹細胞は、ＴＧＦβＲ２及びＮＫＧ２Ａ中の外因性核酸のインデル、又は挿入を含んでなり、インデル又は挿入は、ＴＧＦβＲ２及び／又はＮＫＧ２Ａによってコード化される遺伝子産物の機能喪失をもたらす。一実施形態では、方法は、遺伝子改変万能性幹細胞をリンパ球に分化させるステップを含んでなり、遺伝子改変万能性幹細胞は、ＣＩＳＨ及びＴＩＧＩＴ中の外因性核酸のインデル、又は挿入を含んでなり、インデル又は挿入は、ＣＩＳＨ及び／又はＴＩＧＩＴによってコード化される遺伝子産物の機能喪失をもたらす。一実施形態では、方法は、遺伝子改変万能性幹細胞をリンパ球に分化させるステップを含んでなり、遺伝子改変万能性幹細胞は、ＣＩＳＨ及びＡＤＯＲＡ２Ａ中の外因性核酸のインデル、又は挿入を含んでなり、インデル又は挿入は、ＣＩＳＨ及び／又はＡＤＯＲＡ２Ａによってコード化される遺伝子産物の機能喪失をもたらす。一実施形態では、方法は、遺伝子改変万能性幹細胞をリンパ球に分化させるステップを含んでなり、遺伝子改変万能性幹細胞は、ＣＩＳＨ及びＮＫＧ２Ａ中の外因性核酸のインデル、又は挿入を含んでなり、インデル又は挿入は、ＣＩＳＨ及び／又はＮＫＧ２Ａによってコード化される遺伝子産物の機能喪失をもたらす。一実施形態では、方法は、遺伝子改変万能性幹細胞をリンパ球に分化させるステップを含んでなり、遺伝子改変万能性幹細胞は、ＴＩＧＩＴ及びＡＤＯＲＡ２Ａ中の外因性核酸のインデル、又は挿入を含んでなり、インデル又は挿入は、ＴＩＧＩＴ及び／又はＡＤＯＲＡ２Ａによってコード化される遺伝子産物の機能喪失をもたらす。一実施形態では、方法は、遺伝子改変万能性幹細胞をリンパ球に分化させるステップを含んでなり、遺伝子改変万能性幹細胞は、ＴＩＧＩＴ及びＮＫＧ２Ａ中の外因性核酸のインデル、又は挿入を含んでなり、インデル又は挿入は、ＴＩＧＩＴ及び／又はＮＫＧ２Ａによってコード化される遺伝子産物の機能喪失をもたらす。一実施形態では、方法は、遺伝子改変万能性幹細胞をリンパ球に分化させるステップを含んでなり、遺伝子改変万能性幹細胞は、ＡＤＯＲＡ２Ａ及びＮＫＧ２Ａ中の外因性核酸のインデル、又は挿入を含んでなり、インデル又は挿入は、ＡＤＯＲＡ２Ａ及び／又はＮＫＧ２Ａによってコード化される遺伝子産物の機能喪

失をもたらす。一実施形態では、方法は、遺伝子改変万能性幹細胞をリンパ球に分化させるステップを含んでなり、遺伝子改変万能性幹細胞は、ＴＧＦβＲ２、ＣＩＳＨ、及びＴＩＧＩＴ中の外因性核酸のインデル、又は挿入を含んでなり、インデル又は挿入は、ＴＧＦβＲ２、ＣＩＳＨ及び／又はＴＩＧＩＴによってコード化される遺伝子産物の機能喪失をもたらす。一実施形態では、方法は、遺伝子改変万能性幹細胞をリンパ球に分化させるステップを含んでなり、遺伝子改変万能性幹細胞は、ＴＧＦβＲ２、ＣＩＳＨ、及びＡＤＯＲＡ２Ａ中の外因性核酸のインデル、又は挿入を含んでなり、インデル又は挿入は、ＴＧＦβＲ２、ＣＩＳＨ及び／又はＡＤＯＲＡ２Ａによってコード化される遺伝子産物の機能喪失をもたらす。一実施形態では、方法は、遺伝子改変万能性幹細胞をリンパ球に分化させるステップを含んでなり、遺伝子改変万能性幹細胞は、ＴＧＦβＲ２、ＣＩＳＨ、及びＮＫＧ２Ａ中の外因性核酸のインデル、又は挿入を含んでなり、インデル又は挿入は、ＴＧＦβＲ２、ＣＩＳＨ及び／又はＮＫＧ２Ａによってコード化される遺伝子産物の機能喪失をもたらす。一実施形態では、方法は、遺伝子改変万能性幹細胞をリンパ球に分化させるステップを含んでなり、遺伝子改変万能性幹細胞は、ＴＧＦβＲ２、ＴＩＧＩＴ、及びＡＤＯＲＡ２Ａ中の外因性核酸のインデル、又は挿入を含んでなり、インデル又は挿入は、ＴＧＦβＲ２、ＴＩＧＩＴ及び／又はＡＤＯＲＡ２Ａによってコード化される遺伝子産物の機能喪失をもたらす。一実施形態では、方法は、遺伝子改変万能性幹細胞をリンパ球に分化させるステップを含んでなり、遺伝子改変万能性幹細胞は、ＴＧＦβＲ２、ＴＩＧＩＴ、及びＮＫＧ２Ａ中の外因性核酸のインデル、又は挿入を含んでなり、インデル又は挿入は、ＴＧＦβＲ２、ＴＩＧＩＴ及び／又はＮＫＧ２Ａによってコード化される遺伝子産物の機能喪失をもたらす。一実施形態では、方法は、遺伝子改変万能性幹細胞をリンパ球に分化させるステップを含んでなり、遺伝子改変万能性幹細胞は、ＴＧＦβＲ２、ＡＤＯＲＡ２Ａ、及びＮＫＧ２Ａ中の外因性核酸のインデル、又は挿入を含んでなり、インデル又は挿入は、ＴＧＦβＲ２、ＡＤＯＲＡ２Ａ及び／又はＮＫＧ２Ａによってコード化される遺伝子産物の機能喪失をもたらす。一実施形態では、方法は、遺伝子改変万能性幹細胞をリンパ球に分化させるステップを含んでなり、遺伝子改変万能性幹細胞は、ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ、及びＡＤＯＲＡ２Ａ中の外因性核酸のインデル、又は挿入を含んでなり、インデル又は挿入は、ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ及び／又はＡＤＯＲＡ２Ａによってコード化される遺伝子産物の機能喪失をもたらす。一実施形態では、方法は、遺伝子改変万能性幹細胞をリンパ球に分化させるステップを含んでなり、遺伝子改変万能性幹細胞は、ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ、及びＮＫＧ２Ａ中の外因性核酸のインデル、又は挿入を含んでなり、インデル又は挿入は、ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ及び／又はＮＫＧ２Ａによってコード化される遺伝子産物の機能喪失をもたらす。一実施形態では、方法は、遺伝子改変万能性幹細胞をリンパ球に分化させるステップを含んでなり、遺伝子改変万能性幹細胞は、ＣＩＳＨ、ＡＤＯＲＡ２Ａ、及びＮＫＧ２Ａ中の外因性核酸のインデル、又は挿入を含んでなり、インデル又は挿入は、ＣＩＳＨ、ＡＤＯＲＡ２Ａ及び／又はＮＫＧ２Ａによってコード化される遺伝子産物の機能喪失をもたらす。一実施形態では、方法は、遺伝子改変万能性幹細胞をリンパ球に分化させるステップを含んでなり、遺伝子改変万能性幹細胞は、ＴＩＧＩＴ、ＡＤＯＲＡ２Ａ、及びＮＫＧ２Ａ中の外因性核酸のインデル、又は挿入を含んでなり、インデル又は挿入は、ＴＩＧＩＴ、ＡＤＯＲＡ２Ａ及び／又はＮＫＧ２Ａによってコード化される遺伝子産物の機能喪失をもたらす。

【００７１】

いくつかの実施形態では、（２）の外因性核酸は（１）の外因性核酸である。いくつかの実施形態では、万能性幹細胞はｉＰＳ細胞である。いくつかの実施形態では、分化させるステップは、万能性幹細胞を分化培地又は一連の分化培地と接触させるステップを含んでなる。

【図面の簡単な説明】

【００７２】

【図１Ａ－１Ｂ】ＴＧＦＢＲ２及びＣＩＳＨの堅牢な単一及び二重遺伝子編集が、ＮＫ細胞で達成されたことを示す。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃｐｆ１を用いてＮＫ細胞にＴＧＦＢＲ２及

びＣＩＳＨを単独で、又は同時に標的化すると、８０％以上のＮＫ細胞で双方のターゲットにｉｎ／ｄｅｌが生じ、編集後７２時間の時点で９０％以上のＮＫ細胞が生存していた。

【図２Ａ－２Ｂ】３人のユニークなドナーと５回の独立した実験で解析されたように、回転楕円曲線の正規化が、非正規化データで観察されたものと同じ有効性パターンを維持することを示す。単一ノックアウト（ＳＫＯ）ＮＫの各グループは、対照ＮＫよりもＳＫ－ＯＶ－３回転楕円サイズの縮小効率が有意に高く、二重ノックアウト（ＤＫＯ）ＮＫのグループは、ＳＫＯ　ＮＫグループよりもＳＫ－ＯＶ－３回転楕円サイズの縮小効率が有意に高かった。図２Ａは、１０ｎｇ／ｍＬのＴＧＦβを用いた１０：１のＥ：ＴでのＳＫ－ＯＶ－３回転楕円（ｓｐｈｅｒｉｏｄ）解析を示す（３人のドナー、５回の独立実験）。図２Ｂは、ＳＥＭである誤差棒を有する。統計的有意性は、二元ＡＮＯＶＡ解析の結果である。二元ＡＮＯＶＡ解析では、一部の実験で時点が欠落していることから、１０４時間を超える時点は除外される。混合モデル解析では、全ての時点を考慮した場合、グループ間で同じ又は改善された統計的有意性が得られる。

【図３Ａ－３Ｂ】ＮＫエフェクター細胞と標的細胞（Ｅ：Ｔ）の比率が低い場合でも、ＳＫ－ＯＶ－３回転楕円アッセイにおいて、ＣＩＳＨ／ＴＧＦＢＲ２二重ノックアウトＮＫ細胞が、単一ノックアウトＮＫ細胞又は対照ＮＫ細胞よりも優れたエフェクター機能を示すことを示す。図３Ａは、３人のユニークなドナーと５回の独立した実験で解析されたように、１０ｎｇ／ｍＬのＴＧＦ－βを用いた２０：１のＥ：ＴでのＳＫ－ＯＶ－３回転楕円解析を示す。図３Ｂは、４人のユニークなドナーと７回の独立した実験で解析されたように、１０ｎｇ／ｍＬのＴＧＦ－βを用いた１０：１のＥ：ＴでのＳＫ－ＯＶ－３回転楕円解析を示す。全ての条件での異なるＥ：Ｔ比間のこれらのわずかな違いは、エフェクター細胞の表現型が、ＮＫ細胞と標的の比ではなくノックアウトによって駆動されることを示唆する。

【図４Ａ－４Ｂ】ＮＫエフェクター細胞と標的細胞（Ｅ：Ｔ）の比率が低い場合でも、ＰＣ－３回転楕円アッセイにおいて、ＣＩＳＨ／ＴＧＦＢＲ２二重ノックアウトＮＫ細胞が、単一ノックアウトＮＫ細胞又は対照ＮＫ細胞よりも優れたエフェクター機能を示すことを示す。図４Ａは、３人のユニークなドナーと５回の独立した実験で解析されたように、１０ｎｇ／ｍＬのＴＧＦ－βを用いた２０：１のＥ：ＴでのＰＣ－３回転楕円解析を示す。図４Ｂは、４人のユニークなドナーと７回の独立した実験で解析されたように、１０ｎｇ／ｍＬのＴＧＦ－βを用いた１０：１のＥ：ＴでのＰＣ－３回転楕円解析を示す。全ての条件での異なるＥ：Ｔ比間のこれらのわずかな違いは、エフェクター細胞の表現型が、ＮＫ細胞と標的の比ではなくノックアウトによって駆動されることを示唆する。

【図５Ａ－５Ｂ】ＣＩＳＨ／ＴＧＦＢＲ２二重ノックアウトＮＫ細胞が、外因性サイトカインの非存在下で、ＳＫ－ＯＶ－３及びＰＣ－３回転楕円アッセイにおいて、単一ノックアウトＮＫ細胞又は対照ＮＫ細胞よりも優れたエフェクター機能を示すことを示す。図５Ａは、４人のユニークなドナーと７回の独立した実験で解析されたように、外因性サイトカインの非存在下における１０：１のＥ：ＴでのＳＫ－ＯＶ－３回転楕円解析を示す。図５Ｂは、４人のユニークなドナーと７回の独立した実験で解析されたように、外因性サイトカインの非存在下における１０：１のＥ：ＴでのＰＣ－３回転楕円解析を示す。

【図６Ａ】ＩＦＮ－γ濃度が、回転楕円アッセイにおけるＮＫ細胞の有効性と相関することを示す。ＳＫ－ＯＶ－３回転楕円解析は、１０ｎｇ／ｍＬのＴＧＦ－βと５ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１５を用いて、様々なＥ：Ｔで実施された。５：１及び１０：１のＥ：Ｔの解析は、４人のユニークなドナーと７回の独立した実験で実施された。２０：１のＥ：Ｔの解析は、３人のユニークなドナーと５回の独立した実験で実施された。

【図６Ｂ】ＴＮＦ－αの濃度が回転楕円アッセイにおけるＮＫ細胞の有効性と相関することを示す。ＳＫ－ＯＶ－３回転楕円解析は、１０ｎｇ／ｍＬのＴＧＦ－βと５ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１５を用いて、様々なＥ：Ｔで実施された。５：１及び１０：１のＥ：Ｔの解析は、４人のユニークなドナーと７回の独立した実験で実施された。２０：１のＥ：Ｔの解析は、３人のユニークなドナーと５回の独立した実験で実施された。

【図６Ｃ】ＣＩＳＨ／ＴＧＦＢＲ２二重ノックアウト（ＤＫＯ）ＮＫ細胞中のマーカー発現を示す。対照（非編集）及び二重ノックアウトＮＫ細胞は、編集後７２時間目に染色のために採取された。ＮＫ活性化マーカーＣＤ２５及びＣＤ６９の発現を定量化した。二重ＫＯ　ＮＫ細胞は、対照ＮＫ細胞と比較して、有意に高いレベルの活性化マーカーＣＤ２５及びＣＤ６９を発現した。

【図６Ｄ】生体内モデルで測定された、ＮＫ細胞の抗腫瘍活性を示す。ＮＳＧマウスは、ルシフェラーゼで標識された５０万個のＳＫＯＶ３腫瘍細胞の腹腔内注射を投与された。腫瘍移植の７日後に、１，０００万個の編集された（ＣＩＳＨ／ＴＧＦＢＲ２二重ノックアウト）又は未編集（対照）ＮＫ細胞が、腫瘍保有マウスの腹腔内に注射された。腫瘍量は、ルシフェリンのＩＰ投与とＩＶＩＳイメージングによって毎週モニターされた。３４日目に二元配置分散分析を実施して、対照群とＤＫＯ　ＮＫ細胞群の間の統計的有意性を判定した（****、Ｐ＜０．０００１）

【図７Ａ】２回の独立した実験及び３人のユニークなドナーにわたって、ＮＫ細胞中で達成されたＴＩＧＩＴの堅牢な単一遺伝子編集を示す。

【図７Ｂ】２回の独立した実験及び３人のユニークなドナーにわたって、ＮＫ細胞中で達成されたＮＫＧ２Ａの堅牢な単一遺伝子編集を示す。

【図７Ｃ】３回の独立した実験及び３人のユニークなドナーにわたって、ＮＫ細胞中で達成されたＡＤＯＲＡ２Ａの堅牢な単一遺伝子編集を示す。

【図８Ａ－８Ｂ】ＴＩＧＩＴ単一ノックアウトＮＫ細胞が、異なるエフェクター細胞対標的細胞（Ｅ：Ｔ）比で、生体外回転楕円アッセイにおいて、未編集対照ＮＫ細胞よりも優れたエフェクター機能を示すことを示す。図８Ａは、２人のユニークなドナーと２回の独立した実験にわたって解析されたように、２０：１のＥ：Ｔでの腫瘍回転楕円解析を示す。赤色オブジェクトの強度は、Ｉｎｃｕｃｙｔｅイメージングシステムで６日間にわたり２時間毎に測定された。図８Ｂは、２人のユニークなドナーと２回の独立した実験にわたって解析されたように、１．２５：１、２．５：１、５：１、１０：１、及び２０：１のエフェクター対標的比での腫瘍回転楕円解析を示す。ＮＫ細胞を添加してから１００時間後の赤色オブジェクトの強度が示される。

【図９Ａ－９Ｂ】ＮＫＧ２Ａ単一ノックアウトＮＫ細胞が、異なるエフェクター細胞対標的細胞（Ｅ：Ｔ）比で、生体外回転楕円アッセイにおいて、未編集対照ＮＫ細胞よりも優れたエフェクター機能を示すことを示す。図９Ａは、２人のユニークなドナーと２回の独立した実験にわたって解析されたように、２０：１のＥ：Ｔでの腫瘍回転楕円解析を示す。赤色オブジェクトの強度は、Ｉｎｃｕｃｙｔｅイメージングシステムで６日間にわたり２時間毎に測定された。図９Ｂは、２人のユニークなドナーと２回の独立した実験にわたって解析されたように、１．２５：１、２．５：１、５：１、１０：１、及び２０：１のＥ：Ｔ比での腫瘍回転楕円解析を示す。ＮＫ細胞を添加してから１００時間後の赤色オブジェクトの強度が示される。

【図１０Ａ－１０Ｂ】ＡＤＯＲＡ２Ａ単一ノックアウトＮＫ細胞が、異なるエフェクター細胞対標的細胞（Ｅ：Ｔ）比で、生体外回転楕円アッセイにおいて、未編集対照ＮＫ細胞よりも優れたエフェクター機能を示すことを示す。図１０Ａは、２人のユニークなドナーと２回の独立した実験にわたって解析されたように、２０：１のＥ：Ｔでの腫瘍回転楕円解析を示す。赤色オブジェクトの強度は、Ｉｎｃｕｃｙｔｅイメージングシステムで６日間にわたり２時間毎に測定された。図１０Ｂは、２人のユニークなドナーと２回の独立した実験にわたって解析されたように、１．２５：１、２．５：１、５：１、１０：１、及び２０：１のＥ：Ｔ比での腫瘍回転楕円解析を示す。ＮＫ細胞を添加してから１００時間後の赤色オブジェクトの強度が示される。

【図１１】ＮＫ細胞中で達成された、ＴＧＦｂＲ２／ＣＩＳＨ／ＴＩＧＩＴの三重遺伝子編集を示す。

【図１２Ａ－１２Ｂ】ＴＧＦｂＲ２／ＣＩＳＨ／ＴＩＧＩＴ三重ノックアウトＮＫ細胞が、異なるエフェクター細胞対標的細胞（Ｅ：Ｔ）比で、生体外回転楕円アッセイにおいて、未編集対照ＮＫ細胞よりも優れたエフェクター機能を示すことを示す。図１２Ａは、２

０：１のＥ：Ｔでの腫瘍回転楕円解析を示す。赤色オブジェクトの強度は、Ｉｎｃｕｃｙｔｅイメージングシステムで６日間にわたり２時間毎に測定された。図１２Ｂは、５：１、１０：１、及び２０：１のＥ：Ｔでの腫瘍回転楕円解析を示す。ＮＫ細胞を添加してから１００時間後の赤色オブジェクトの強度が示される。

【発明を実施するための形態】

【００７３】

本開示のいくつかの態様は、臨床応用で使用され得る「既製の」同種異系細胞を操作するのに有用なストラテジー、組成物、及び方法を提供する。本開示のいくつかの態様は、万能性又は多能性幹細胞（例えば、ｉＮＫ細胞などの改変リンパ球などの分化した娘細胞を誘導するために使用され得る誘導万能性幹細胞（ｉＰＳＣ）又は造血幹細胞（ＨＳＣ）を操作するのに有用なストラテジー、組成物、及び方法を提供する。移植片対宿主及び宿主対移植片の双方の免疫反応性は、同種異系細胞の臨床応用にとって主要な課題である。本開示のいくつかの態様は、同種異系環境において非改変細胞移植片が典型的に遭遇する免疫反応性の様々な態様に対処する細胞を操作するためのストラテジー、組成物、及び方法を提供する。

【００７４】

本開示のいくつかの態様は、例えば、同種異系臨床応用のために標的細胞中のＭＨＣクラスＩ及びＩＩ機能を除去することによって、「非自己」宿主対移植片免疫反応性を克服するのに有用なストラテジー、組成物、及び方法を提供する。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書の他の箇所でより詳細に記載されるように、ＭＨＣクラスＩ及びＩＩの機能性は、Ｂ２Ｍ（クラスＩ）及びＣＩＩＴＡ（クラスＩＩ）及び／又は２つ以上のＭＨＣクラスＩＩα及び／又はβ鎖の機能喪失をもたらすことによって達成される。

【００７５】

本開示のいくつかの態様は、例えば、同種異系臨床応用のために、ＮＫ阻害様式をコード化する核酸配列を含んでなる外因性発現コンストラクトを標的細胞に導入することによって、「自己喪失」宿主対移植片の免疫反応性を克服するのに有用なストラテジー、組成物、及び方法を提供する。例えば、いくつかの実施形態では、このような「自己喪失」免疫反応性は、同種異系臨床応用のための標的細胞中で、ＨＬＡ－Ｇ、ＨＬＡ－Ｅ、及び／又はＣＤ４７の遺伝子組換え発現をもたらすことによって対処される。

【００７６】

本開示のいくつかの態様は、内在性ＴＣＲ機能を除去することによって、移植片対宿主Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）同種異系反応性を克服するのに有用なストラテジー、組成物、及び方法を提供する。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書に記載の免疫調節修飾を含んでなるように幹細胞を操作するステップと、次に免疫療法のために、幹細胞をそれを必要とする患者に投与するための、例えば、ｉＮＫ細胞などのリンパ球などの細胞型に分化させるステップとを含む、多能性又は万能性幹細胞からの同種異系臨床応用のための改変細胞の生成に有用なストラテジー、組成物、及び方法が本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、万能性又は多能性幹細胞は、ＴＣＲを発現するか、又は再配列されたＴＣＲ遺伝子座を含んでなる、例えば、Ｔ細胞などの細胞に由来し、いくつかのこのような実施形態では、このような操作された幹細胞に由来する分化したリンパ球は、ＴＣＲを発現し、ＴＣＲ同種異系反応性の標的となってもよい。いくつかのこのような実施形態では、内在性ＴＣＲ発現産物の機能喪失をもたらすことが有利であり、本開示は、例えば、本明細書の他の箇所でより詳細に記載されるように、ＴＲＡＣの機能喪失をもたらすことによって、それぞれの細胞においてこのような機能喪失を達成するのに有用なストラテジー、組成物、及び方法を提供する。

【００７７】

本開示のいくつかの態様は、例えば、免疫腫瘍学の文脈において、治療薬として有用である改変ＮＫ細胞（又は他のリンパ球）の生成に関する。例えば、本明細書で提供される改変ＮＫ細胞の少なくとも一部は、非改変ＮＫ細胞と比較して、例えば、増強された標的認識、増強されたＮＫ細胞応答レベル及び／又は持続時間、改善されたＮＫ細胞生存、遅延

性のＮＫ細胞枯渇、増強された標的認識、及び／又は非改変ＮＫ細胞によって典型的には認識されない標的の認識などの増強されたＮＫ細胞応答特性を示す。

【００７８】

本開示のいくつかの態様は、改変ＮＫ細胞を生成するための組成物、方法、及びストラテジーを提供する。いくつかの実施形態では、このような改変ＮＫ細胞は、成熟ＮＫ細胞のゲノムを編集することによって生成される。いくつかの実施形態では、改変ＮＫ細胞は、生体外又は生体内のいずれかで、ＮＫ細胞がそれに由来する細胞のゲノムを編集することによって生成される。いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞がそれに由来する細胞は、例えば、造血幹細胞（ＨＳＣ）などの幹細胞、又は例えば、胚性幹細胞（ＥＳ細胞）又は誘導万能性幹細胞（ｉＰＳ細胞）などの万能性幹細胞である。例えば、いくつかの実施形態では、ＥＳ細胞、ｉＰＳ細胞、又は造血幹細胞のゲノムが編集され、引き続いて、編集された幹細胞をＮＫ細胞に分化させることで、改変ＮＫ細胞が生成される。改変ＮＫ細胞の生成がｉＰＳ細胞からの改変ＮＫ細胞の分化を伴う、いくつかの実施形態では、ゲノムの編集は、ｉＰＳ細胞の生成、維持、又は分化中の任意の適切な時点で行われてもよい。例えば、ドナー細胞がｉＰＳ細胞に再プログラム化される場合、例えば、線維芽細胞又はＴリンパ球などの体細胞などのドナー細胞は、ｉＰＳ細胞に再プログラム化する前、再プログラム化手順中、又はドナー細胞がｉＰＳ細胞に再プログラム化された後に、本明細書に記載の遺伝子編集アプローチに供されてもよい。

【００７９】

ｉＰＳ細胞に由来するＮＫ細胞は、本明細書ではｉＮＫ細胞とも称される。いくつかの実施形態では、本開示は、例えば、線維芽細胞又は末梢血細胞などの体細胞とも称される、発達的に成熟した細胞に由来する、ｉＮＫ細胞を生成するための組成物、方法、及びストラテジーを提供する。

【００８０】

いくつかの実施形態では、本開示は、発達的に成熟したＴ細胞（胸腺選択を受けたＴ細胞）に由来するｉＮＫ細胞を生成するための組成物、方法、及びストラテジーを提供する。発達的に成熟したＴ細胞の特徴の１つは、再配列されたＴ細胞受容体遺伝子座である。Ｔ細胞の成熟中にＴＣＲ遺伝子座はＶ（Ｄ）Ｊ再配列を被り、完全なＶドメインエクソンを生成する。これらの再配列は、Ｔ細胞の誘導万能性幹（ｉＰＳ）細胞への再プログラム化全体を通じて、及び得られたｉＰＳ細胞の体細胞への分化全体を通じて保持される。

【００８１】

ｉＰＳ細胞の生成にＴ細胞を使用することの１つの利点は、例えば、ＣＲＩＳＰＲベースの方法又はその他の遺伝子編集方法によって、Ｔ細胞が比較的容易に編集され得ることである。

【００８２】

ｉＰＳ細胞の生成にＴ細胞を使用することのもう１つの利点は、再配列されたＴＣＲ遺伝子座が、個々の細胞及びその娘細胞の遺伝的追跡を可能にすることである。ＮＫ細胞の生成に関与する再プログラム化、増殖、培養、及び／又は分化ストラテジーが単一細胞のクローン増殖である場合、再配列されたＴＣＲ遺伝子座は、細胞及びその娘細胞を明確に識別する遺伝子マーカーとして使用され得る。これにより、細胞集団を真性クローンとしての特徴付け、又は混合集団の同定、又はクローン集団内の混入細胞の同定が可能になる。

【００８３】

複数の編集を有するｉＮＫ細胞を生成するのに、Ｔ細胞を使用する第３の利点は、染色体転座に関連する特定の核型異常が、Ｔ細胞培養に対して選択されることである。このような異常は、ＣＲＩＳＰＲ技術によって細胞を編集する場合、特に複数の編集を有する細胞を生成する場合に、懸念を引き起す。

【００８４】

治療用リンパ球を誘導するための出発点として、Ｔ細胞由来のｉＰＳ細胞を使用することの第４の利点は、例えば、腫瘍抗原などの特異的抗原に対する結合活性についてＴ細胞を選択するステップと、選択されたＴ細胞をｉＰＳ細胞に再プログラミングするステップと

、次にＴＣＲを発現するこれらのｉＰＳ細胞（例えば、Ｔ細胞）からリンパ球を誘導するステップとを介して、リンパ球中で予備スクリーニングされたＴＣＲの発現を可能にすることである。このストラテジーはまた、例えば、遺伝的な又はエピジェネティックなストラテジーによって、その他の細胞型においてＴＣＲを活性化することを可能にするであろう。

【００８５】

Ｔ細胞由来のｉＰＳ細胞をｉＮＫ分化の出発点として使用することの第５の利点は、Ｔ細胞が、再プログラム化プロセス全体を通じて「エピジェネティックな記憶」の少なくとも一部が保持され、したがってｉＮＫ誘導の出発点として線維芽細胞などの無関係な細胞を使用するアプローチと比較して、ｉＮＫ細胞などの同じ又は密接に関連した細胞型の引き続く分化が、より効率的になり、及び／又はより高品質の細胞集団がもたらされることである。

【００８６】

定義及び略語

別段の指定がない限り、以下の各用語は、このセクションに記載した意味を有する。

【００８７】

不定冠詞「ａ」及び「ａｎ」は、関連した名詞の少なくとも１つを指し、「少なくとも１つ」及び「１つ又は複数」という用語と互換的に使用される。例えば、「１つのモジュール（ａ　ｍｏｄｕｌｅ）」は少なくとも１つのモジュール、又は１つ又は複数のモジュールを意味する。

【００８８】

接続詞「又は」及び「及び／又は」は、非排他的選言肢として同義的に使用される。

【００８９】

「対象」とは、ヒト又は非ヒト動物を意味する。ヒト対象は、任意の年齢（例えば、幼児、小児、若年成人、又は成人）であり得て、疾患に罹患していてもよく、又は遺伝子又は特定遺伝子の組み合わせの変更を必要としていてもよい。代案としては、対象は動物であってもよく、この用語には哺乳類、より具体的には、非ヒト霊長類、齧歯類（例えば、マウス、ラット、ハムスターなど）、ウサギ、モルモット、犬、猫などが含まれるが、これらに限定されるものではない。本開示の特定の実施形態では、対象は、例えば、ウシ、ウマ、ヒツジ、又はヤギなどの家畜である。特定の実施形態では、対象は家禽である。

【００９０】

「治療」、「治療する」、及び「治療すること」という用語は、本明細書に記載されるように、疾患又は障害、又はその１つ又は複数の症状の逆転、緩和、発症の遅延、進行の抑制、及び／又は再発の予防又は遅延を目指した臨床的介入を指す。例えば、本明細書に記載されるような改変ＮＫ細胞又は改変ＮＫ細胞集団の形態での治療は、１つ又は複数の症状が発現した後、及び／又は疾患が診断された後に対象に投与されてもよい。治療は症状の非存在下で投与され、例えば、症状の発症が予防又は遅延され、又は疾患の発症又は進行が抑制されてもよい。例えば、治療は、症状の発症前に（例えば、遺伝的又はその他の感受性因子に照らして）感受性のある個人に投与されてもよい。治療はまた、例えば、再発を予防又は遅延させるために、症状が解消した後に継続されてもよい。

【００９１】

「予防する」、「予防すること」、及び「予防」は、（ａ）疾病を回避又は排除すること；（ｂ）疾病に対する素因に影響を及ぼすこと；又は（ｃ）疾病の少なくとも１つの症状の発症を予防又は遅延させることをはじめとする、例えばヒトなどの哺乳類における疾病の予防を指す。

【００９２】

「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド配列」、「核酸」、「核酸分子」、「核酸配列」、及び「オリゴヌクレオチド」という用語は、ＤＮＡ及びＲＮＡ中の一連のヌクレオチド塩基（「ヌクレオチド」とも称される）を指し、２つ又はそれ以上のヌクレオチドの任意の鎖を意味する。ポリヌクレオチド、ヌクレオチド配列、核酸などは、一本鎖又は二本鎖

のキメラ混合物又はそれらの誘導体又は修飾型であり得る組成物を指す。これらはまた、例えば、塩基部分、糖部分、又はリン酸骨格において修飾され、分子の安定性、そのハイブリダイゼーションパラメータなどを改善し得る。ヌクレオチド配列は、典型的には、タンパク質及び酵素を製造するために細胞機構によって使用される情報をはじめとするが、これに限定されるものではない、遺伝情報を保有する。これらの用語は、二本鎖又は一本鎖のゲノムＤＮＡ、ＲＮＡ、任意の合成及び遺伝子操作ポリヌクレオチド、並びにセンス及びアンチセンスポリヌクレオチドの双方を含む。これらの用語はまた、修飾塩基を含有する核酸も含む。

【００９３】

下記の表１に示されるように、慣用的なＩＵＰＡＣ表記法が、本明細書で提示されるヌクレオチド配列において使用される（参照により本明細書に援用されるＣｏｒｎｉｓｈ－Ｂｏｗｄｅｎ Ａ，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１９８５ Ｍａｙ １０；１３（９）：３０２１－３０もまた参照されたい）。しかし、配列がＤＮＡ又はＲＮＡのどちらかによって、例えばｇＲＮＡ標的化ドメインにおいてコードされてもよい場合、「Ｔ」は「チミン又はウラシル」を示すことに留意すべきである。

【００９４】

【表１】

表 1:IUPAC 核酸表記法

文字	塩基
A	アデニン
T	チミン又はウラシル
G	グアニン
C	シトシン
U	ウラシル
K	G 又は T/U
M	A 又は C
R	A 又は G
Y	C 又は T/U
S	C 又は G
W	A 又は T/U
B	C、G 又は T/U
V	A、C 又は G
H	A、C 又は T/U
D	A、G 又は T/U
N	A、C、G 又は T/U

【００９５】

「タンパク質」、「ペプチド」、及び「ポリペプチド」という用語は同義的に使用され、ペプチド結合を介して共に連結するアミノ酸の連続鎖を指す。この用語は、個々のタンパク質、共に結合するタンパク質の群又は複合体、並びにそのようなタンパク質の断片又は部分、変異型、誘導体、及び類似体を含む。ペプチド配列は、左側のアミノ又はＮ末端から開始して、右側のカルボキシル又はＣ末端に進む、慣用的な表記法を用いて本明細書に提示される。標準的な一文字又は三文字略語が使用され得る。

【００９６】

「変異型」とは、参照実体との著しい構造的同一性を示すが、参照実体と比較して、１つ又は複数の化学部分の存在又はレベルが参照実体と構造的に異なる、ポリペプチド、ポリヌクレオチド又は小分子などの実体を指す。多くの実施形態において、変異型はまた、そ

の参照実体と機能的に異なる。一般に、特定の実体が参照の「変異型」であると適切に見なされるかどうかは、その参照実体との構造的同一性の程度に基づく。

【００９７】

核酸（例えば、遺伝子、タンパク質をコード化するゲノム領域、プロモーター）の文脈において、本明細書で使用される「内在性」という用語は、例えば、細胞のゲノム内などのその自然な位置にある、天然の核酸又はタンパク質を指す。対照的に、例えば、発現コンストラクト、ｃＤＮＡ、インデル、及び核酸ベクターのなどの核酸の文脈において本明細書で使用される「外因性」という用語は、例えば、ＣＲＩＳＰＲベースの編集技術などの遺伝子編集又は遺伝子操作技術を用いて、細胞のゲノムに人為的に導入された核酸を指す。

【００９８】

「ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ」及び「ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ分子」という用語は、本明細書では同義的に（ｉｎｔｅｒｅｘｃｈａｎｇａｂｌｙ）使用される。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、ＲＮＡ誘導ＤＮＡエンドヌクレアーゼ酵素である。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼはＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼである。ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼの非限定的例は下の表２に列挙され、本明細書で開示される方法及び組成物は、本明細書で開示されているか、又は当業者に知られている、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼの任意の組み合わせを使用し得る。当業者は、本開示の文脈における使用に適した追加的なヌクレアーゼ及びヌクレアーゼ変異型を承知しており、本開示はこの点において限定されるものではないことが理解されるであろう。

【００９９】

【表２】

表 2. RNA 誘導ヌクレアーゼ

ヌクレアーゼ	長さ (アミノ酸)	PAM	参考文献
SpCas9	1368	NGG	Cong *et al.*, Science. 2013;339(6121):819-23
SaCas9	1053	NNGRRT	Ran *et al.*, Nature. 2015;520(7546):186-91.
(KKH) SaCas9	1067	NNNRRT	Kleinstiver *et al.*, Nat Biotechnol. 2015;33(12):1293-1298
AsCpf1 (AsCas12a)	1353	TTTV	Zetsche *et al.*, Nat Biotechnol. 2017;35(1):31-34.
LbCpf1 (LbCas12a)	1274	TTTV	Zetsche *et al.*, Cell. 2015;163(3):759-71.
CasX	980	TTC	Burstein *et al.*, Nature. 2017;542(7640):237-241.
CasY	1200	TA	Burstein *et al.*, Nature. 2017;542(7640):237-241.
Cas12h1	870	RTR	Yan *et al.*, Science. 2019;363(6422):88-91.
Cas12i1	1093	TTN	Yan *et al.*, Science. 2019;363(6422):88-91.
Cas12c1	不明	TG	Yan *et al.*, Science. 2019;363(6422):88-91.
Cas12c2	不明	TN	Yan *et al.*, Science. 2019;363(6422):88-91.
eSpCas9	1423	NGG	Chen *et al.*, Nature. 2017;550(7676):407-410.
Cas9-HF1	1367	NGG	Chen *et al.*, Nature. 2017;550(7676):407-410.
HypaCas9	1404	NGG	Chen *et al.*, Nature. 2017;550(7676):407-410.
dCas9-Fokl	1623	NGG	米国特許第9,322,037号明細書
Sniper-Cas9	1389	NGG	Lee *et al.*, Nat Commun. 2018;9(1):3048.
xCas9	1786	NGG, NG, GAA, GAT	Wang *et al.*, Plant Biotechnol J. 2018; pbi.13053.
AaCas12b	1129	TTN	Teng *et al.* Cell Discov. 2018;4:63.
evoCas9	1423	NGG	Casini *et al.*, Nat Biotechnol. 2018;36(3):265-271.
SpCas9-NG	1423	NG	Nishimasu *et al.*, Science. 2018;361(6408):1259-1262.
VRQR	1368	NGA	Li *et al.*, The CRISPR Journal, 2018; 01:01
VRER	1372	NGCG	Kleinstiver *et al.*, Nature. 2016;529(7587):490-5.
NmeCas9	1082	NNNNGATT	Amrani *et al.*, Genome Biol. 2018;19(1):214.
CjCas9	984	NNNNRYAC	Kim *et al.*, Nat Commun. 2017;8:14500.
BhCas12b	1108	ATTN	Strecker *et al.*, Nat Commun. 2019 Jan 22;10(1):212.
BhCas12b V4	1108	ATTN	Strecker *et al.*, Nat Commun. 2019 Jan 22;10(1):212.

【０１００】

例えば、Ｃａｓ９及びＣａｓ１２ヌクレアーゼなどの追加的な適切なＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、本開示に鑑みて当業者には明らかであり、本開示は、本明細書で提供される例示的な適切なヌクレアーゼによって限定されない。いくつかの実施形態では、適切なヌクレアーゼは、Ｃａｓ９又はＣｐｆ１（Ｃａｓ１２ａ）ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、本開示はまた、例えば、Ｃａｓ９又はＣｐｆ１ヌクレアーゼ変異型などのヌクレアーゼ変異型を包含する。ヌクレアーゼ変異型は、ヌクレアーゼの野生型アミノ酸配列と比較して、１つ又は複数のアミノ酸の置換、欠失、又は付加によって特徴付けられるアミノ酸配列を含んでなるヌクレアーゼを指す。適切なヌクレアーゼ及びヌクレアーゼ変異

型は、精製タグ（例えば、ポリヒスチジンタグ）と、例えば、核局在化シグナル配列を含んでなるか又はそれからなるシグナル伝達ペプチドもまた含んでもよい。適切なヌクレアーゼ及びヌクレアーゼ変異型のいくつかの非限定的例は、本明細書の他の箇所でより詳細に記載されており、またその内容全体が参照により本明細書に援用される、“Ｓｙｓｔｅｍｓ ａｎｄ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅｍｏｇｌｏｂｉｎｏｐａｔｈｉｅｓ”と題された、２０１９年３月１４日に出願されたＰＣＴ出願ＰＣＴ／ＵＳ２０１９／２２３７４号明細書に記載されているものも含まれる。

【０１０１】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、アシダミノコッカス属（Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ）種Ｃｐｆ１変異型（ＡｓＣｐｆ１変異型）である。適切なＡｓＣｐｆ１変異型をはじめとする適切なＣｐｆ１ヌクレアーゼ変異型は、本開示に基づいて当業者に知られているか又は明らかであり、本明細書で開示されているか又はさもなければ当該技術分野で公知のＣｐｆ１変異型が挙げられるが、これらに限定されるものではない。例えば、いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、アシダミノコッカス属（Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ）種Ｃｐｆ１ＲＲ変異型（ＡｓＣｐｆ１－ＲＲ）である。別の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、Ｃｐｆ１ＲＶＲ変異型である。例えば、適切なＣｐｆ１変異型としては、Ｍ５３７Ｒ置換、Ｈ８００Ａ置換、及び／又はＦ８７０Ｌ置換、又はそれらの任意の組み合わせを有するものが挙げられる（番号付けスキームはＡｓＣｐｆ１野生型配列に準拠する）。

【０１０２】

「造血幹細胞」又は「決定的な造血幹細胞」という用語は、本明細書の用法では、Ｔ細胞、ナチュラルキラー細胞、及びＢ細胞をはじめとする、成熟骨髄系細胞型とリンパ系細胞型との双方を生じさせることができるＣＤ３４＋幹細胞を指す。

【０１０３】

本明細書の用法では、「再プログラム化」又は「脱分化」又は「細胞分化能の増加」又は「発生能の増加」という用語は、細胞の分化能を高めるか、又は細胞をより低分化の状態に脱分化させる方法を指す。例えば、細胞分化能が増加した細胞は、再プログラム化されていない状態の同じ細胞と比較して、より多くの発達可塑性を有する（すなわち、より多くの細胞型に分化し得る）。換言すれば、再プログラム化された細胞は、再プログラム化されていない状態の同じ細胞よりも分化度の低い状態にある。いくつかの実施形態では、「再プログラム化」という用語は、体細胞又は多能性幹細胞を誘導万能性幹細胞又はｉＰＳ細胞とも称される万能性幹細胞に脱分化させることを指す。体細胞又は多能性幹細胞からｉＰＳ細胞を生成するための適切な方法は、当業者に周知である。

【０１０４】

本明細書の用法では、「分化」という用語は、特殊化されていない（「分化増殖能未獲得」）又はあまり特殊化されていない細胞が、例えば、血液細胞又は筋肉細胞などの特殊化細胞の特徴を獲得するプロセスである。分化した又は分化誘導された細胞は、細胞の系統内でより特殊化された（「分化増殖能獲得」）地位についた細胞である。例えば、ｉＰＳ細胞は、細胞培養培地中で適切な分化因子で処理されると、例えば、神経又は造血幹細胞、リンパ球、心筋細胞、及びその他の細胞型などの様々なより分化した細胞型に分化し得る。多能性及び多能性細胞型をより分化した細胞型に分化させるための適切な方法、分化因子、及び細胞培養培地は、当業者に周知である。「分化増殖能獲得」という用語は、分化のプロセスに適用される場合、分化経路をある点まで進んだ細胞を指し、正常な状況下では、それは特定の細胞型又は細胞型のサブセットに分化し続け、正常な状況下では、それは異なる細胞型に分化したり、又は分化度の低い細胞型に戻ったりできない。

【０１０５】

本明細書の用法では、「分化マーカー」、「分化マーカー遺伝子」、又は「分化遺伝子」という用語は、その発現が万能性細胞などの細胞内で起こる、細胞分化を示す遺伝子又はタンパク質を指す。分化マーカー遺伝子としては、以下の遺伝子が挙げられるが、これらに限定されるものではない：ＣＤ３４、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ３、ＣＤ５６（ＮＣＡＭ）

、ＣＤ４９、ＣＤ４５；ＮＫ細胞受容体（分化抗原群１６（ＣＤ１６））、ナチュラルキラーグループ２メンバーＤ（ＮＫＧ２Ｄ）、ＣＤ６９、ＮＫｐ３０、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ４６、ＣＤ１５８ｂ、ＦＯＸＡ２、ＦＧＦ５、ＳＯＸ１７、ＸＩＳＴ、ＮＯＤＡＬ、ＣＯＬ３Ａ１、ＯＴＸ２、ＤＵＳＰ６、ＥＯＭＥＳ、ＮＲ２Ｆ２、ＮＲ０Ｂ１、ＣＸＣＲ４、ＣＹＰ２Ｂ６、ＧＡＴＡ３、ＧＡＴＡ４、ＥＲＢＢ４、ＧＡＴＡ６、ＨＯＸＣ６、ＩＮＨＡ、ＳＭＡＤ６、ＲＯＲＡ、ＮＩＰＢＬ、ＴＮＦＳＦ１１、ＣＤＨ１１、ＺＩＣ４、ＧＡＬ、ＳＯＸ３、ＰＩＴＸ２、ＡＰＯＡ２、ＣＸＣＬ５、ＣＥＲ１、ＦＯＸＱ１、ＭＬＬ５、ＤＰＰ１０、ＧＳＣ、ＰＣＤＨ１０、ＣＴＣＦＬ、ＰＣＤＨ２０、ＴＳＨＺ１、ＭＥＧＦ１０、ＭＹＣ、ＤＫＫ１、ＢＭＰ２、ＬＥＦＴＹ２、ＨＥＳ１、ＣＤＸ２、ＧＮＡＳ、ＥＧＲ１、ＣＯＬ３Ａ１、ＴＣＦ４、ＨＥＰＨ、ＫＤＲ、ＴＯＸ、ＦＯＸＡ１、ＬＣＫ、ＰＣＤＨ７、ＣＤ１ＤＦＯＸＧ１、ＬＥＦＴＹ１、ＴＵＪ１、Ｔｇｅｎｅ（Ｂｒａｃｈｙｕｒｙ）、ＺＩＣ１、ＧＡＴＡ１、ＧＡＴＡ２、ＨＤＡＣ４、ＨＤＡＣ５、ＨＤＡＣ７、ＨＤＡＣ９、ＮＯＴＣＨ１、ＮＯＴＣＨ２、ＮＯＴＣＨ４、ＰＡＸ５、ＲＢＰＪ、ＲＵＮＸ１、ＳＴＡＴ１、及びＳＴＡＴ３。

【０１０６】

本明細書の用法では、「分化マーカー遺伝子プロファイル」又は「分化遺伝子プロファイル」、「分化遺伝子発現プロファイル」、「分化遺伝子発現シグネチャ」、「分化遺伝子発現パネル」、「分化遺伝子パネル」、又は「分化遺伝子シグネチャ」という用語は、複数の分化マーカー遺伝子の発現又は発現レベルを指す。

【０１０７】

細胞の発生能の文脈において本明細書で使用される場合、「分化能」又は「発生能」という用語は、細胞がアクセス可能な全ての発達性選択肢（すなわち、発生能）の合計を指す。細胞分化能の連続としては、全能性細胞、万能性細胞、多能性細胞、少能性細胞、単能性細胞、及び最終分化細胞が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【０１０８】

本明細書の用法では、「万能性」という用語は、体又は体細胞の全ての系統（すなわち、適切な胚）を形成する細胞の能力を指す。例えば、胚性幹細胞は、外胚葉、中胚葉、及び内胚葉の３つの胚葉のそれぞれから細胞を形成できる、万能性幹細胞の一種である。万能性とは、完全な生物を生み出せない不完全又は部分的な万能性細胞（例えば、エピブラスト幹細胞又はＥｐｉＳＣ）から、完全な生物を生み出せるより原始的な万能性細胞（例えば、胚性幹細胞又は誘導万能性幹細胞）に至る連続した発生能力である。

【０１０９】

本明細書では、「誘導万能性幹細胞」又は「ｉＰＳ細胞」という用語は、例えば、成人細胞、新生児細胞、又は胎児細胞などの分化した体細胞から、中胚葉、内胚葉、及び外胚葉の３つの胚葉又は真皮層の組織に分化できる細胞に再プログラム化するプロセスによって得られる幹細胞を指す。ＩＰＳ細胞は、自然界では見られない。

【０１１０】

本明細書の用法では、「胚性幹細胞」という用語は、胚の胚盤胞の内部細胞塊に由来する万能性幹細胞を指す。胚性幹細胞は万能性であり、発生過程で外胚葉、内胚葉、及び中胚葉の３つの一次胚葉の全ての派生物を生じる。それらは胚体外膜又は胎盤に寄与せず、すなわち、全能性ではない。

【０１１１】

本明細書の用法では、「多能性幹細胞」という用語は、１つ又は複数の胚葉（外胚葉、中胚葉、及び内胚葉）細胞に分化するが、３つ全てには分化しない発生能を有する細胞を指す。したがって、多能性細胞は「部分的分化細胞」とも称され得る。多能性細胞は当該技術分野で周知であり、多能性細胞の例としては、例えば、造血幹細胞及び神経幹細胞などの成体幹細胞が挙げられる。「多能性」は、細胞が所与の系統で多くの種類の細胞を形成してもよいが、その他の系統の細胞は形成しなくてもよいことを示す。例えば、多能性造血細胞は、多くの異なる種類の血液細胞（赤、白、血小板など）を形成し得るが、神経細胞を形成することはできない。したがって、「多能性」という用語は、全能性及び万能性

よりも低い発生能の程度を有する細胞の状態を指す。
【０１１２】
万能性は、細胞の万能性特性を評価することによって、ある程度判定され得る。万能性の特徴としては、以下が挙げられるが、これらに限定されるものではない：（ｉ）万能性幹細胞の形態；（ｉｉ）無制限の自己再生の可能性；（ｉｉｉ）ＳＳＥＡ１（マウスのみ）、ＳＳＥＡ３／４、ＳＳＥＡ５、ＴＲＡ１－６０／８１、ＴＲＡｌ－８５、ＴＲＡ２－５４、ＧＣＴＭ－２、ＴＧ３４３、ＴＧ３０、ＣＤ９、ＣＤ２９、ＣＤ１３３／ｐｒｏｍｉｎ、ＣＤ１４０ａ、ＣＤ５６、ＣＤ７３、ＣＤ９０、ＣＤ１０５、ＯＣＴ４、ＮＡＮＯＧ、ＳＯＸ２、ＣＤ３０及び／又はＣＤ５０をはじめとするが、これらに限定されるものではない、万能性幹細胞マーカーの発現；（ｉｖ）３つの体細胞系統（外胚葉、中胚葉、及び内胚葉）全てに分化する能力；（ｖ）３つの体細胞系統からなる奇形腫の形成；及び（ｖｉ）３つの体細胞系統からの細胞からなる胚様体の形成。
【０１１３】
本明細書の用法では、「万能性幹細胞形態」という用語は、胚性幹細胞の古典的な形態学的特徴を指す。正常な胚性幹細胞の形態は、丸くて形が小さく、核対細胞質比が高く、核小体が顕著に存在し、典型的な細胞間間隔があることで特徴付けられる。
【０１１４】
ゲノム編集システム
本開示は、例えば、そのゲノムが改変されているか、又は例えば、ゲノムが改変されているＨＳＣ、ＥＳ細胞、又はｉＰＳ細胞などの多能性又は万能性幹細胞に由来する、ＮＫ細胞などの改変ＮＫ細胞の生成に関する。本明細書で提供されるＮＫ細胞及び幹細胞は、例えば、ＣＲＩＳＰＲなどのゲノム編集システムを使用することを含む、当業者に知られている任意の遺伝子編集技術を使用して、改変され得る。
【０１１５】
「ゲノム編集システム」という用語は、ＲＮＡ誘導ＤＮＡ編集活性を有する任意のシステムを指す。本開示のゲノム編集システムは、天然に存在するＣＲＩＳＰＲシステムから適合された、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）及びＲＮＡ誘導ヌクレアーゼの少なくとも２つの構成要素を含む。これらの２つの構成要素は、特定の核酸配列と結合して、例えば、１つ又は複数の一本鎖切断（ＳＳＢ又はニック）、二重鎖切断及び／又は点変異を生成することによって、核酸配列中又はその周囲のＤＮＡを編集できる複合体を形成する。
【０１１６】
天然に存在するＣＲＩＳＰＲシステムは、進化的に２つのクラスと５つの型に組織化され（Ｍａｋａｒｏｖａ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．２０１１ Ｊｕｎ；９（６）：４６７－４７７（Ｍａｋａｒｏｖａ）、参照により本明細書に援用される）、本開示のゲノム編集システムは、任意の型又はクラスの天然に存在するＣＲＩＳＰＲシステムの構成要素を適合させてもよい一方で、本明細書に提示される実施形態は、一般にクラス２、及びＩＩ型又はＶ型のＣＲＩＳＰＲシステムから適合される。ＩＩ型及びＶ型を包含するクラス２システムは、相対的に大型の多ドメインＲＮＡ誘導ヌクレアーゼタンパク質（例えば、Ｃａｓ９又はＣｐｆ１）と、１つ又は複数のガイドＲＮＡ（例えばｃｒＲＮＡ、任意選択的にｔｒａｃｒＲＮＡ）とによって特徴付けられ、それは、ｃｒＲＮＡの標的（又はスペーサー）配列に相補的な特定の遺伝子座と会合（標的化）して切断する、リボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体を形成する。本開示によるゲノム編集システムは、細胞ＤＮＡ配列を同様に標的化して編集するが、天然に存在するＣＲＩＳＰＲシステムとは著しく異なる。例えば、本明細書に記載の単分子ガイドＲＮＡは自然界に存在せず、そして本開示によるガイドＲＮＡ及びＲＮＡ誘導ヌクレアーゼはどちらも、天然に存在しない任意の数の修飾を組み込んでもよい。
【０１１７】
ゲノム編集システムは、様々な方法で実装され得て（例えば、細胞又は対象に投与又は送達され得る）、異なる実装が異なる用途に適してもよい。例えば、ゲノム編集システムは、特定の実施形態では、タンパク質／ＲＮＡ複合体（リボ核タンパク質、又はＲＮＰ）と

して実装され、それは、脂質又はポリマーの微粒子又はナノ粒子、ミセル、リポソームなどの薬学的に許容可能な担体及び／又は封入剤を任意選択的に含む医薬組成物に含まれ得る。特定の実施形態では、ゲノム編集システムは、上述したＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及びガイドＲＮＡ構成要素をコードする１つ又は複数の核酸として（任意選択的に、１つ又は複数の追加的な構成要素と共に）実装され；特定の実施形態では、ゲノム編集システムは、このような核酸を含んでなる１つ又は複数のベクター、例えばアデノ随伴ウイルスなどのウイルスベクターとして実装され；特定の実施形態では、ゲノム編集システムは、前述のいずれかの組み合わせとして実装される。本明細書に記載の原理に従って動作する追加的な又は修正された実装は、当業者に明らかであり、本開示の範囲内である。

【０１１８】

本開示のゲノム編集システムは、単一の特定のヌクレオチド配列を標的化し得て、又は標的化してもよく、２つ以上のガイドＲＮＡの使用によって、２つ以上の特定のヌクレオチド配列を並行して編集できることに留意すべきである。複数のｇＲＮＡの使用は、本開示を通して「多重化」と称され、関心のある複数の無関係の標的配列を標的化するため、又は単一の標的ドメイン内に複数のＳＳＢ若しくはＤＳＢを形成するため、場合によってはこのような標的ドメイン内で特定の編集をするために用いられ得る。例えば、参照により本明細書に援用される、Ｍａｅｄｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（Ｍａｅｄｅｒ）による国際公開第２０１５／１３８５１０号パンフレットは、潜在的なスプライス部位の生成をもたらし、その結果として遺伝子の機能を低下させ又は排除する、ヒトＣＥＰ２９０遺伝子における点変異を修正する（Ｃ．２９９１＋１６５５ＡからＧへ）ためのゲノム編集システムを記載する。Ｍａｅｄｅｒのゲノム編集システムは、点変異の両側の（すなわちそれを挟む）配列を標的化する２つのガイドＲＮＡを利用して、変異側面に位置するＤＳＢを形成する。これは次に、変異を含む介在配列の欠失を促進し、それによって潜在的スプライス部位を除去し正常な遺伝子機能を回復させる。

【０１１９】

別の例とし、参照により本明細書に援用される、Ｃｏｔｔａ－Ｒａｍｕｓｉｎｏら（「Ｃｏｔｔａ－Ｒａｍｕｓｉｎｏ」）による国際公開第２０１６／０７３９９０号パンフレットは、「二重ニッカーゼシステム」と称される配置である、Ｃａｓ９ニッカーゼ（Ｓ．ピオゲネス（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）Ｄ１０Ａなどの一本鎖ニックを生じるＣａｓ９）と組み合わせて、２つのｇＲＮＡを利用するゲノム編集システムを記載する。Ｃｏｔｔａ－Ｒａｍｕｓｉｎｏの二重ニッカーゼシステムは、１つ又は複数のヌクレオチドでオフセットされている目的の配列の逆ストランドに、２つのニックを生じるように構成され、上記ニックが組み合わされて、オーバーハングを有する二本鎖切断を作り出す（Ｃｏｔｔａ－Ｒａｍｕｓｉｎｏの場合には５’であるが３’オーバーハングもまた可能である）。オーバーハングは、次に、いくつかの状況において相同指向修復事象を促進し得る。そして別の例として、Ｐａｌｅｓｔｒａｎｔらによる国際公開第２０１５／０７００８３号パンフレット（「Ｐａｌｅｓｔｒａｎｔ」、参照により本明細書に援用される）は、Ｃａｓ９をコードするヌクレオチド配列を標的化するｇＲＮＡ（「支配ＲＮＡ」と称される）を記載し、それは、例えば、いくつかのウイルス形質導入細胞において、さもなければ構成的に発現され得るＣａｓ９の一過性発現を可能にするために、１つ又は複数の追加的なｇＲＮＡを含んでなるゲノム編集システムに含まれ得る。これらの多重化用途は限定的ではなく、むしろ例示的であること意図しており、当業者は、その他の多重化用途が一般に、本明細書に記載のゲノム編集システムと適合性があることを理解するであろう。

【０１２０】

ゲノム編集システムは、場合によっては、ＮＨＥＪ又はＨＤＲなどの細胞ＤＮＡ二本鎖切機序断によって修復される二本鎖切断を形成し得る。これらの機序は、例えば、Ｄａｖｉｓ　＆　Ｍａｉｚｅｌｓ，ＰＮＡＳ，１１１（１０）：Ｅ９２４－９３２，Ｍａｒｃｈ １１，２０１４（Ｄａｖｉｓ）（Ａｌｔ－ＨＤＲについて記載する）；Ｆｒｉｔ　ｅｔ　ａｌ．ＤＮＡ　Ｒｅｐａｉｒ　１７（２０１４）８１－９７（Ｆｒｉｔ）（Ａｌｔ－ＮＨＥＪについて記載する）；及びＩｙａｍａ　ａｎｄ　Ｗｉｌｓｏｎ　ＩＩＩ，ＤＮＡ　Ｒ

ｅｐａｉｒ（Ａｍｓｔ．）２０１３－Ａｕｇ；１２（８）：６２０－６３６（Ｉｙａｍａ）（標準ＨＤＲ及びＮＨＥＪ経路について一般的に記載する）などの文献にわたり記載されている。

【０１２１】

ゲノム編集システムがＤＳＢを形成することによって機能する場合、このようなシステムは任意選択的に、特定の様式の二本鎖切断修復又は特定の修復結果を促進し又は容易にする、１つ又は複数の構成要素を含む。例えば、Ｃｏｔｔａ－Ｒａｍｕｓｉｎｏは、その中に一本鎖オリゴヌクレオチド「ドナー鋳型」が付加されているゲノム編集システムも記載しており；ドナー鋳型は、ゲノム編集システムによって切断される細胞ＤＮＡの標的領域に組み込まれ、標的配列の変化をもたらし得る。

【０１２２】

特定の実施形態では、ゲノム編集システムは、一本鎖又は二本鎖の切断を引き起こすことなく、標的配列を改変し、又は標的配列中又はその付近の遺伝子の発現を改変する。例えば、ゲノム編集システムは、ＤＮＡに作用する機能ドメインに融合したＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを含んでもよく、それによって標的配列又はその発現を改変する。一例として、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、シチジンデアミナーゼ機能ドメインに結合（例えば融合）し得て、標的化されたＣからＡへの置換を生成することによって機能してもよい。例示的なヌクレアーゼ／デアミナーゼ融合体は、参照により援用される、Ｋｏｍｏｒ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　５３３，４２０－４２４（１９　Ｍａｙ　２０１６）（「Ｋｏｍｏｒ」）に記載される。代案としては、ゲノム編集システムは、デッドＣａｓ９（ｄＣａｓ９）などの切断不活性化（すなわち「デッド」）ヌクレアーゼを利用してもよく、細胞ＤＮＡの１つ又は複数の標的化領域上に安定な複合体を形成し、それによって、限定されるものではないが、ｍＲＮＡ転写、クロマチンリモデリングなどをはじめとする、標的領域が関与する機能を妨害することによって、機能してもよい。

【０１２３】

ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）分子

「ガイドＲＮＡ」及び「ｇＲＮＡ」という用語は、細胞内のゲノム又はエピソーム配列などの標的配列に対する、Ｃａｓ９又はＣｐｆ１などのＲＮＡ誘導ヌクレアーゼの特定の結合（又は「標的化」）を促進する、任意の核酸を指す。ｇＲＮＡは、単分子（単一のＲＮＡ分子を含んでなり、あるいはキメラとも称される）、又はモジュール型（例えば二重化によって通常互いに結合する、ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡなどの２つ以上、典型的には２つの別々のＲＮＡ分子を含んでなる）であり得る。ｇＲＮＡ及びそれらの構成部分は、例えば、Ｂｒｉｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｅｌｌ５６（２），３３３－３３９，Ｏｃｔｏｂｅｒ　２３，２０１４（Ｂｒｉｎｅｒ）、参照により援用される）、及びＣｏｔｔａ－Ｒａｍｕｓｉｎｏなどの文献にわたり記載される。

【０１２４】

細菌及び古細菌では、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲシステムは一般に、Ｃａｓ９などのＲＮＡ誘導ヌクレアーゼタンパク質；外来配列に相補的な５’領域を含むＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）；及びｃｒＲＮＡの３’領域に相補的でありそれと二重鎖を形成する、５’領域を含むトランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）を含んでなる。いかなる理論にも拘束されることは意図されないが、この二重鎖はＣａｓ９／ｇＲＮＡ複合体の形成を促進し、その活性に必要であると考えられる。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲシステムを遺伝子編集における使用に適合させる間に、１つの非限定的な例において、ｃｒＲＮＡ（その３’末端）及びｔｒａｃｒＲＮＡ（その５’末端）の相補的領域を架橋する、４ヌクレオチド（例えばＧＡＡＡ）「テトラループ」又は「リンカー」配列によって、ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡが単一の単分子又はキメラガイドＲＮＡに連結され得ることが発見された。（それらの全てが参照により本明細書に援用される、Ｍａｌｉ　ｅｔ　ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ．２０１３　Ｆｅｂ　１５；３３９（６１２１）：８２３－８２６（「Ｍａｌｉ」）；Ｊｉａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１３　Ｍａｒ；３１（３）：２３３－２３９（「Ｊｉａｎｇ」）；及びＪｉｎｅｋ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２　Ｓｃ

ｉｅｎｃｅ Ａｕｇ．１７；３３７（６０９６）：８１６－８２１（「Ｊｉｎｅｋ」））。

【０１２５】

ガイドＲＮＡは、単分又はモジュラー型を問わず、編集が望まれる細胞のゲノム中のＤＮＡ配列などの標的配列中の標的ドメインに完全に又は部分的に相補的な「標的化ドメイン」を含む。標的化ドメインは、限定されるものではないが、「ガイド配列」（Ｈｓｕ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１３ Ｓｅｐ；３１（９）：８２７－８３２，（「Ｈｓｕ」）、参照により本明細書に援用される）、「相補的領域」（Ｃｏｔｔａ－Ｒａｍｕｓｉｎｏ）、「スペーサー」（Ｂｒｉｎｅｒ）及び包括的に「ｃｒＲＮＡ」（Ｊｉａｎｇ）をはじめとする文献において、様々な名称で呼ばれている。それらに与えられた名称とはかかわりなく、標的化ドメインは、典型的には１０～３０ヌクレオチド長であり、特定の実施形態では１６～２４ヌクレオチド長（例えば、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３又は２４ヌクレオチド長）であり、Ｃａｓ９ ｇＲＮＡの場合には５’末端又はその付近にあり、Ｃｐｆ１ ｇＲＮＡの場合には３’末端又はその付近にある。

【０１２６】

標的化ドメインに加えて、ｇＲＮＡは、典型的には（例えば以下で考察されるように、必ずしもそうとは限らないが）、ｇＲＮＡ／Ｃａｓ９複合体の形成又は活性に影響を及ぼしてもよい複数のドメインを含む。例えば、上記のように、ｇＲＮＡの第１及び第２の相補的ドメイン（リピート：アンチリピート二重鎖とも称される）によって形成される二重鎖構造は、Ｃａｓ９の認識（ＲＥＣ）ローブと相互作用して、Ｃａｓ９／ｇＲＮＡ複合体の形成を媒介し得る。（Ｎｉｓｈｉｍａｓｕ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ １５６，９３５－９４９，Ｆｅｂｒｕａｒｙ ２７、２０１４（Ｎｉｓｈｉｍａｓｕ ２０１４）及びＮｉｓｈｉｍａｓｕ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ １６２，１１１３－１１２６，Ａｕｇｕｓｔ ２７，２０１５（Ｎｉｓｈｉｍａｓｕ ２０１５）、どちらも参照により本明細書に援用される）。第１及び／又は第２の相補的ドメインは、ＲＮＡポリメラーゼによって終結シグナルとして認識され得る、１つ又は複数のポリＡ鎖を含有してもよいことに留意すべきである。そのため、第１及び第２の相補的ドメインの配列は、例えば、Ｂｒｉｎｅｒに記載されるようなＡ－Ｇスワップの使用、あるいはＡ－Ｕスワップの使用を通じて任意選択的に修飾され、これらの区域が除去されてＲＮＡの完全な生体外転写が促進される。第１及び第２の相補的ドメインに対するこれらの及びその他の類似の改変は、本開示の範囲内である。

【０１２７】

第１及び第２の相補的ドメインと共に、Ｃａｓ９ｇ ＲＮＡは典型的には、生体内でヌクレアーゼ活性に関与するが、生体外では必ずしも関与しない、２つ以上の追加的な二重鎖領域を含む。（Ｎｉｓｈｉｍａｓｕ ２０１５）。第二の相補的ドメインの３’部分の付近にある第１のステムループ１は、「近位ドメイン」（Ｃｏｔｔａ－Ｒａｍｕｓｉｎｏ）、「ステムループ１」（Ｎｉｓｈｉｍａｓｕ ２０１４及び２０１５）、及び「ｎｅｘｕｓ」（Ｂｒｉｎｅｒ）など様々に呼ばれる。１つ又は複数の追加的なステムループ構造は、一般に、ｇＲＮＡの３’末端の付近に存在し、数は種によって異なり、ｓ．ピオゲネス（ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）ｇＲＮＡが典型的に２つの３’ステムループ（リピート：アンチリピート二重鎖を含む合計４つのステムループ構造：アンチリピート二重鎖）を含む一方で、ｓ．アウレウス（ｓ．ａｕｒｅｕｓ）及びその他の種は、単に１つのみ有する（合計３つのステムループ構造）。種毎にまとめられた、保存的ステムループ構造（及びより一般的にはｇＲＮＡ構造）の説明は、Ｂｒｉｎｅｒに提供されている。

【０１２８】

前述の説明は、Ｃａｓ９と共に使用するためのｇＲＮＡに焦点を当ててきたが、ここまでに記載されたものといくつかの点で異なるｇＲＮＡを利用する、その他のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼが発見され又は発明されている（又は将来的に発見される可能性がある）ことを理解されたい。例えば、Ｃｐｆ１（「Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ａｎｄ Ｆｒａｎｃｉｓｃｅｌｌａ １」由来のＣＲＩＳＰＲ）は最近発見されたＲＮＡ誘導ヌクレアーゼであり、

機能するためにｔｒａｃｒＲＮＡを必要としない。（Ｚｅｔｓｃｈｅ　ｅｔ　ａｌ．，２０１５，Ｃｅｌｌ　１６３，７５９－７７１　Ｏｃｔｏｂｅｒ　２２，２０１５（Ｚｅｔｓｃｈｅ　Ｉ）、参照により本明細書に援用される）。Ｃｐｆ１ゲノム編集システムにおいて使用するためのｇＲＮＡは、一般に、標的化ドメイン及び相補的ドメイン（交互に「ハンドル」と称される）を含む。Ｃｐｆ１と共に使用するためのｇＲＮＡにおいて、標的化ドメインは通常、Ｃａｓ９　ｇＲＮＡに関して上述したように、５’末端ではなくむしろ３’末端又はその付近に存在する（ハンドルはＣｐｆ１　ｇＲＮＡの５’末端又はその付近にある）ことにも留意すべきである。

【０１２９】

当業者は、異なる原核生物種由来のｇＲＮＡ間に、又はＣｐｆ１とＣａｓ９のｇＲＮＡ間に構造上の相違が存在してもよいが、ｇＲＮＡが作用する原理は概して一貫していることを理解するであろう。この動作の一貫性のために、ｇＲＮＡは、広い意味で、それらの標的化ドメイン配列によって定義され得て、当業者は、所与の標的化ドメイン配列が、単分子若しくはキメラｇＲＮＡ、又は１つ若しくは複数の化学修飾及び／若しくは配列修飾（置換、追加のヌクレオチド、切断など）を含むｇＲＮＡをはじめとする、任意の適切なｇＲＮＡに組み込まれ得ることを理解するであろう。したがって、本開示における提示の経済性のために、ｇＲＮＡはそれらの標的化ドメイン配列の観点のみから記載されてもよい。

【０１３０】

より一般的には、当業者は、本開示のいくつかの態様が、複数のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを使用して実装され得るシステム、方法、及び組成物に関することを理解するであろう。この理由から、別段の指定がない限り、ｇＲＮＡという用語は、Ｃａｓ９又はＣｐｆ１の特定の種と適合性のｇＲＮＡだけでなく、任意のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと共に使用され得る任意の適切なｇＲＮＡを包含するものと理解されるべきである。例として、ｇＲＮＡという用語は、特定の実施形態では、ＩＩ型又はＶ型などのクラス２　ＣＲＩＳＰＲシステム又はＣＲＩＳＰＲシステムに存在する任意のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと共に、又はそれに由来するか、又はそれから適合化されたＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと共に、使用するためのｇＲＮＡを含み得る。

【０１３１】

いくつかの実施形態では、使用されるガイドＲＮＡは、標準的なｇＲＮＡスキャフォールドと比較して改変を含んでなる。このような修飾は、例えば、核酸塩基又は主鎖部分などのｇＲＮＡの一部の化学修飾を含んでなってもよい。いくつかの実施形態では、このような修飾は、ｇＲＮＡ内の、例えば、標的化ドメイン内又は外のＤＮＡヌクレオチドの存在もまた含んでもよい。いくつかの実施形態では、修飾は、例えば、標的化ドメインの遠位末端への、例えば、ガイドＲＮＡの３’又は５’末端への、ＲＮＡ及び／又はＤＮＡヌクレオチドを含む１～１００個のヌクレオチドの付加による、ｇＲＮＡスキャフォールドの伸長を含んでもよい。

【０１３２】

一般に、ｇＲＮＡは、酸素を有する５員環の糖類であるリボースを含む。代表的な修飾ｇＲＮＡとしては、限定されるものではないが、リボース中の酸素の置換（例えば、イオウ（Ｓ）、セレン（Ｓｅ）、又は例えば、メチレン又はエチレンなどのアルキレンによる）；二重結合の付加（例えば、リボースをシクロペンテニル又はシクロヘキセニルで置換する）；リボース環縮小（例えば、シクロブタン又はオキセタンの４員環を形成する）；リボース環拡大（例えば、アンヒドロヘキシトール、アルトリトール、マンニトール、シクロヘキサニル、シクロヘキセニル、及びホスホロアミダート骨格もまた有するモルホリノなどの追加的な炭素又はヘテロ原子を有する６又は７員環を形成する）が挙げられる。糖類似体改変の大部分は２’位に局在するが、４’位をはじめとするその他の部位も修飾を受け入れやすい。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、４’－Ｓ、４’－Ｓｅ又は４’－Ｃ－アミノメチル－２’－Ｏ－Ｍｅ修飾を含んでなる。

【０１３３】

特定の実施形態では、例えば７－デアザ－アデノシンなどのデアザヌクレオチドが、ｇＲＮＡに組み込まれ得る。特定の実施形態では、例えばＮ６－メチルアデノシンなどのＯ－及びＮ－アルキル化ヌクレオチドが、ｇＲＮＡに組み込まれ得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡ中の１つ又は複数の又は全てのヌクレオチドが、デオキシリボヌクレオチドである。

【０１３４】

特定の実施形態では、本明細書の用法では、ｇＲＮＡは修飾又は未修飾ｇＲＮＡであってもよい。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、１つ又は複数の修飾を含んでもよい。特定の実施形態では、１つ又は複数の修飾は、ホスホロチオエート結合修飾、ホスホロジチオエート（ＰＳ２）結合修飾、２’－Ｏ－メチル修飾、又はそれらの組み合わせを含んでもよい。特定の実施形態では、１つ又は複数の修飾は、ｇＲＮＡの５’末端、ｇＲＮＡの３’末端、又はそれらの組み合わせにあってもよい。

【０１３５】

特定の実施形態では、ｇＲＮＡ修飾は、１つ又は複数のホスホロジチオエート（ＰＳ２）結合修飾を含んでなってもよい。

【０１３６】

いくつかの実施形態では、本明細書で使用されるｇＲＮＡは、本明細書で「ＤＮＡ伸長」とも称される、１つ又は複数の又は一続きのデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）塩基を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で使用されるｇＲＮＡは、ｇＲＮＡの５’末端、ｇＲＮＡの３’末端、又はそれらの組み合わせにＤＮＡ伸長を含む。特定の実施形態では、ＤＮＡ延長は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、又は１００ＤＮＡ塩基長であってもよい。例えば、特定の実施形態では、ＤＮＡ伸長は１、２、３、４、５、１０、１５、２０、又は２５ＤＮＡ塩基長であってもよい。特定の実施形態では、ＤＮＡ伸長は、アデニン（Ａ）、グアニン（Ｇ）、シトシン（Ｃ）、又はチミン（Ｔ）から選択される、１つ又は複数のＤＮＡ塩基を含んでもよい。特定の実施形態では、ＤＮＡ伸長は同じＤＮＡ塩基を含む。例えば、ＤＮＡ伸長は、一続きのアデニン（Ａ）塩基を含んでもよい。特定の実施形態では、ＤＮＡ伸長は、一続きのチミン（Ｔ）塩基を含んでもよい。特定の実施形態では、ＤＮＡ伸長は、異なるＤＮＡ塩基の組み合わせを含む。特定の実施形態では、ＤＮＡ伸長は、表３に記載される配列を含んでなってもよい。特定の実施形態では、本明細書で使用されるｇＲＮＡは、ＤＮＡ伸長、並びに１つ又は複数のホスホロチオエート結合修飾、１つ又は複数のホスホロジチオエート（ＰＳ２）結合修飾、１つ又は複数の２’－Ｏ－メチル修飾、又はそれらの組み合わせを含む。特定の実施形態では、１つ又は複数の修飾は、ｇＲＮＡの５’末端、ｇＲＮＡの３’末端、又はそれらの組み合わせにあってもよい。特定の実施形態では、ＤＮＡ伸長を含むｇＲＮＡは、ＤＮＡ伸長を含む表３に記載される配列を含んでなってもよい。理論による拘束は望まないが、ｇＲＮＡによって標的化される標的核酸とハイブリッド形成せず、またこのようなＤＮＡ伸長を含まないｇＲＮＡと比較して、標的核酸部位での編集の増加を示す限り、任意のＤＮＡ伸長が、本明細書で使用されてもよいことが想定される。

【０１３７】

いくつかの実施形態では、本明細書で使用されるｇＲＮＡは、本明細書で「ＲＮＡ伸長」とも称される、１つ又は複数の又は一続きのリボ核酸（ＲＮＡ）塩基を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で使用されるｇＲＮＡは、ｇＲＮＡの５’末端、ｇＲＮＡの３’末端、又はそれらの組み合わせにＲＮＡ伸長を含む。特定の実施形態では、ＲＮＡ伸長は、

１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、又は１００ＲＮＡ塩基長であってもよい。例えば、特定の実施形態では、ＲＮＡ伸長は１、２、３、４、５、１０、１５、２０、又は２５ＲＮＡ塩基長であってもよい。特定の実施形態では、ＲＮＡ伸長は、アデニン（ｒＡ）、グアニン（ｒＧ）、シトシン（ｒＣ）、又はウラシル（ｒＵ）から選択される、１つ又は複数のＲＮＡ塩基を含んでもよく、「ｒ」は、ＲＮＡ、２’－ヒドロキシを表す。特定の実施形態では、ＲＮＡ伸長は、同じＲＮＡ塩基を含む。例えば、ＲＮＡ伸長は、一続きのアデニン（ｒＡ）塩基を含んでもよい。特定の実施形態では、ＲＮＡ伸長は、異なるＲＮＡ塩基の組み合わせを含む。特定の実施形態では、ＲＮＡ伸長は、表３に記載される配列を含んでなってもよい。特定の実施形態では、本明細書で使用されるｇＲＮＡは、ＲＮＡ伸長、並びに１つ又は複数のホスホロチオエート結合修飾、１つ又は複数のホスホロジチオエート（ＰＳ２）結合修飾、１つ又は複数の２’－Ｏ－メチル修飾、又はそれらの組み合わせを含む。特定の実施形態では、１つ又は複数の修飾は、ｇＲＮＡの５’末端、ｇＲＮＡの３’末端、又はそれらの組み合わせにあってもよい。特定の実施形態では、ＲＮＡ伸長を含むｇＲＮＡは、ＲＮＡ伸長を含む表３に示される配列を含んでなってもよい。ｇＲＮＡの５’末端にＲＮＡ伸長を含むｇＲＮＡは、本明細書で開示される配列を含んでなってもよい。ｇＲＮＡの３’末端にＲＮＡ伸長を含むｇＲＮＡは、本明細書で開示される配列を含んでなってもよい。

【０１３８】

本明細書で使用されるｇＲＮＡはまた、ＲＮＡ伸長及びＤＮＡ伸長を含んでもよいことが想定される。特定の実施形態では、ＲＮＡ伸長及びＤＮＡ伸長は、どちらもｇＲＮＡの５’末端、ｇＲＮＡの３’末端、又はそれらの組み合わせにあってもよい。特定の実施形態では、ＲＮＡ伸長はｇＲＮＡの５’末端にあり、ＤＮＡ伸長はｇＲＮＡの３’末端にある。特定の実施形態では、ＲＮＡ伸長はｇＲＮＡの３’末端にあり、ＤＮＡ伸長はｇＲＮＡの５’末端にある。

【０１３９】

いくつかの実施形態では、例えば、５’末端のＤＮＡ伸長などの修飾を含むｇＲＮＡは、例えば、ＡｓＣｐｆ１ヌクレアーゼなどのＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと複合体を形成してＲＮＰを形成し、それは次に例えば、ＮＫ細胞などの標的細胞を編集するのに用いられる。

【０１４０】

Ｃｐｆ１ガイドＲＮＡの適切な５’伸長の例を以下の表に示す。

【０１４１】

【表３】

表3:gRNA 5’ 伸長

5’ 伸長 配列番号	5’ 伸長配列	5’修飾
	rCrUrUrUrU	+5 RNA
	rArArGrArCrCrUrUrUrU	+10 RNA
	rArUrGrUrGrUrUrUrUrUrGrUrCrArArArArGrArCrCrUrUrUrU	+25 RNA
	rArGrGrCrCrArGrCrUrUrGrCrCrGrGrUrUrUrUrUrUrArGrUrCrGrUrGrCrUrGrCrUrUrCrArUrGrUrGrUrUrUrUrUrGrUrCrArArArArGrArCrCrUrUrUrU	+60 RNA
	CTTTT	+5 DNA
	AAGACCTTTT	+10 DNA
	ATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+25 DNA
	AGGCCAGCTTGCCGGTTTTTTAGTCGTGCTGCTTCATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+60 DNA
	TTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+20 DNA
	GCTTCATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+30 DNA
	GCCGGTTTTTTAGTCGTGCTGCTTCATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+50 DNA
	TAGTCGTGCTGCTTCATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+40 DNA
	C*C*GAAGTTTTCTTCGGTTTT	+20 DNA + 2xPS
	T*T*TTTCCGAAGTTTTCTTCGGTTTT	+25 DNA + 2xPS
	A*A*CGCTTTTTCCGAAGTTTTCTTCGGTTTT	+30 DNA + 2xPS
	G*C*GTTGTTTTCAACGCTTTTTCCGAAGTTTTCTTCGGTTTT	+41 DNA + 2xPS
	G*G*CTTCTTTTGAAGCCTTTTTGCGTTGTTTTCAACGCTTTTTCCGAAGTTTTCTTCGGTTTT	+62 DNA + 2xPS
	A*T*GTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+25 DNA + 2xPS
	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	+25 A
	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	+25 T
	mA*mU*rGrUrGrUrUrUrUrUrGrUrCrArArArArGrArCrCrUrUrUrU	+25 RNA + 2xPS
	mA*mA*rArArArArArArArArArArArArArArArArArArArArArArArA	ポリA RNA + 2xPS
	mU*mU*rUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrU	ポリU RNA + 2xPS

全ての塩基は大文字
小文字「r」はRNA、2’-ヒドロキシを表す;「r」によって修飾されていない塩基はDNAである
特に記載されている場合を除き、全ての塩基は標準的なリン酸ジエステル 結合を介して連結される:
「*」はホスホロチオエート修飾を表す
「PS」はホスホロチオエート修飾を表す

【０１４２】

追加的な適切なｇＲＮＡ修飾は、本開示に基づいて当業者には明らかであろう。適切なｇＲＮＡ修飾としては、例えば、そのそれぞれの全内容が参照により本明細書に援用される、“ＭＯＤＩＦＩＥＤ　ＣＰＦ１ＧＵＩＤＥＲＮＡ”と題された２０１８年１０月２日に出願されたＰＣＴ出願ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０５４０２７号明細書；“ＧＵＩＤＥ　ＲＮＡ　ＷＩＴＨ　ＣＨＥＭＩＣＡＬＭＯＤＩＦＩＣＡＴＩ”と題された２０１５年１２月３日に出願されたＰＣＴ出願ＰＣＴ／ＵＳ２０１５／０００１４３号明細書；“ＣＨＥＭＩＣＡＬＬＹ　ＭＯＤＩＦＩＥＤ　ＧＵＩＤＥ　ＲＮＡＳ　ＦＯＲ　ＣＲＩＳＰＲ／ＣＡＳ－ＭＥＤＩＡＴＥＤ　ＧＥＮＥ　ＲＥＧＵＬＡＴＩＯＮ”と題された２０１６年４月５日

に出願されたＰＣＴ出願ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０２６０２８号明細書；及び“ＮＵＣＬＥＡＳＥ－ＭＥＤＩＡＴＥＤ ＧＥＮＯＭＥ ＥＤＩＴＩＮＧ ＯＦ ＰＲＩＭＡＲＹ ＣＥＬＬＳ ＡＮＤ ＥＮＲＩＣＨＭＥＮＴ ＴＨＥＲＥＯＦ”と題された２０１６年９月２３日に出願されたＰＣＴ出願ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０５３３４４号明細書に記載されるものが挙げられる。

【０１４３】

ｇＲＮＡ設計

標的配列の選択及び検証、並びにオフターゲット分析の方法は、例えば、Ｍａｌｉ；Ｈｓｕ；Ｆｕ ｅｔ ａｌ．，２０１４ Ｎａｔ ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ３２（３）：２７９－８４，Ｈｅｉｇｗｅｒ ｅｔ ａｌ．，２０１４ Ｎａｔ ｍｅｔｈｏｄｓ １１（２）：１２２－３；Ｂａｅ ｅｔ ａｌ．（２０１４）Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ３０（１０）：１４７３－５；及びＸｉａｏ Ａ ｅｔ ａｌ．（２０１４）Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ３０（８）：１１８０－１１８２に記載される。これらの参考文献のそれぞれは、参照により本明細書に援用される。非限定的な例として、ｇＲＮＡ設計は、例えば、ゲノム全体の総オフターゲット活性を最小限に抑えるなど、ユーザーの標的配列に対応する潜在的標的配列の選択を最適化するためのソフトウェアツールの使用を伴ってもよい。オフターゲット活性は切断に限定されないが、各オフターゲット配列での切断効率は、例えば、実験的に導出された重み付けスキームを使用して予測され得る。これら及びその他のガイドの選択方法については、Ｍａｅｄｅｒ ａｎｄ Ｃｏｔｔａ－Ｒａｍｕｓｉｎｏで詳述される。

【０１４４】

特定の実施形態では、ｇＲＮＡ中の１つ又は複数又は全てのヌクレオチドが修飾されている。ｇＲＮＡを改変するためのストラテジーは、その内容が明示的に参照により本明細書に援用される、２０１９年８月８日に公開された国際公開第２０１９／１５２５１９号パンフレットに記載される。

【０１４５】

本開示に包含される特定の実施形態に適したガイドＲＮＡの非限定的な例は、本明細書において例えば、以下の表に提供される。当業者は、ＤＮＡ又はＲＮＡ配列ノいずれかとしての標的化ドメイン配列の開示から、例えば、Ｃａｓ９又はＣｐｆ－１ヌクレアーゼなどの特定の（ｓｐｅｃｉｆｃ）ヌクレアーゼのための適切なガイドＲＮＡ配列を予見できるであろう。例えば、ＲＮＡヌクレオチドからなる標的配列を含むガイドＲＮＡは、ＤＮＡ配列として提供される標的ドメイン配列に対応するＲＮＡ配列を含み、これは、チミジンヌクレオチドの代わりにウラシルを含む。例えば、ガイドＲＮＡは、ＲＮＡヌクレオチドからなる標的化ドメイン配列を含んでなり、ＤＮＡ配列ＴＣＴＧＣＡＧＡＡＡＴＧＴＴＣＣＣＣＧＴ（配列番号＿＿）によって表され、対応するＲＮＡ配列ＵＣＵＧＣＡＧＡＡＡＵＧＵＵＣＣＣＣＧＵ（配列番号＿＿）の標的化ドメインを有する。当業者には明らかであるように、このような標的化配列は、例えば、ｃｒＲＮＡスキャフォールド配列又はキメラｃｒＲＮＡ／トレーサーＲＮＡスキャフォールド配列などの適切なガイドＲＮＡスキャフォールドに連結されるであろう。適切なｇＲＮＡスキャフォールド配列は、当業者に知られている。ＡｓＣｐｆ１では、例えば、適切なスキャフォールド配列は、配列ＵＡＡＵＵＵＣＵＡＣＵＣＵＵＧＵＡＧＡＵ（配列番号＿＿）を含んでなり、標的化ドメインの５’末端に付加される。上の例では、これは配列ＵＡＡＵＵＵＣＵＡＣＵＣＵＵＧＵＡＧＡＵＵＣＵＧＣＡＧＡＡＡＵＧＵＵＣＣＣＣＧＵ（配列番号＿＿）のＣｐｆ１ガイドＲＮＡをもたらすであろう。当業者は、例えば、ＤＮＡ伸長を付加することによって、このようなガイドＲＮＡを改変する方法をさらに理解するであろう（例えば、上記の例では、本明細書に記載されるような２５量体のＤＮＡ伸長を付加することは、例えば、

【化１】

ATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArU

rUrCrUrGrCrArGrArArArUrGrUrUrCrCrCrCrGrU (配列番号:__)

配列のガイドＲＮＡをもたらすであろう。本明細書で提供される例示的な標的化配列は限定的なものではなく、例えば、本明細書で開示される特異的配列の変異型などの追加的な適切な配列は、当該技術分野の一般的な知識に鑑みて、本開示に基づいて当業者には明らかであろう。

【０１４６】

いくつかの実施形態では、本開示で使用するためのｇＲＮＡは、ＴＩＧＩＴを標的化するｇＲＮＡ（ＴＩＧＩＴ　ｇＲＮＡ）である。いくつかの実施形態では、ＴＩＧＩＴを標的化するｇＲＮＡは、表４に記載されるｇＲＮＡの１つ又は複数である。

【０１４７】

【表４】

表4:TIGIT gRNA

名称	gRNA標的化ドメイン配列 (DNA)	長さ	酵素
TIGIT4170	TCTGCAGAAATGTTCCCCGT	20	AsCpf1
TIGIT4171	TGCAGAGAAAGGTGGCTCTA	20	AsCpf1
TIGIT4172	TAATGCTGACTTGGGGTGGC	20	AsCpf1
TIGIT4173	TAGGACCTCCAGGAAGATTC	20	AsCpf1

【０１４８】

【表５】

TIGIT4174	TAGTCAACGCGACCACCACG	20	AsCpf1
TIGIT4175	TCCTGAGGTCACCTTCCACA	20	AsCpf1
TIGIT4176	TATTGTGCCTGTCATCATTC	20	AsCpf1
TIGIT4177	TGACAGGCACAATAGAAACAA	21	SauCas9
TIGIT4178	GACAGGCACAATAGAAACAAC	21	SauCas9
TIGIT4179	AAACAACGGGGAACATTTCTG	21	SauCas9
TIGIT4180	ACAACGGGGAACATTTCTGCA	21	SauCas9
TIGIT4181	TGATAGAGCCACCTTTCTCTG	21	SauCas9
TIGIT4182	GGGTCACTTGTGCCGTGGTGG	21	SauCas9
TIGIT4183	GGCACAAGTGACCCAGGTCAA	21	SauCas9
TIGIT4184	GTCCTGCTGCTCCCAGTTGAC	21	SauCas9
TIGIT4185	TGGCCATTTGTAATGCTGACT	21	SauCas9
TIGIT4186	TGGCACATCTCCCCATCCTTC	21	SauCas9
TIGIT4187	CATCTCCCCATCCTTCAAGGA	21	SauCas9
TIGIT4188	CCACTCGATCCTTGAAGGATG	21	SauCas9
TIGIT4189	GGCCACTCGATCCTTGAAGGA	21	SauCas9
TIGIT4190	CCTGGGGCCACTCGATCCTTG	21	SauCas9
TIGIT4191	GACTGGAGGGTGAGGCCCAGG	21	SauCas9
TIGIT4192	ATCGTTCACGGTCAGCGACTG	21	SauCas9
TIGIT4193	GTCGCTGACCGTGAACGATAC	21	SauCas9
TIGIT4194	CGCTGACCGTGAACGATACAG	21	SauCas9
TIGIT4195	GCATCTATCACACCTACCCTG	21	SauCas9
TIGIT4196	CCTACCCTGATGGGACGTACA	21	SauCas9
TIGIT4197	TACCCTGATGGGACGTACACT	21	SauCas9
TIGIT4198	CCCTGATGGGACGTACACTGG	21	SauCas9
TIGIT4199	TTCTCCCAGTGTACGTCCCAT	21	SauCas9
TIGIT4200	GGAGAATCTTCCTGGAGGTCC	21	SauCas9

【０１４９】

【表６】

TIGIT4201	CATGGCTCCAAGCAATGGAAT	21	SauCas9
TIGIT4202	CGCGGCCATGGCTCCAAGCAA	21	SauCas9
TIGIT4203	TCGCGGCCATGGCTCCAAGCA	21	SauCas9
TIGIT4204	CATCGTGGTGGTCGCGTTGAC	21	SauCas9
TIGIT4205	AAAGCCCTCAGAATCCATTCT	21	SauCas9
TIGIT4206	CATTCTGTGGAAGGTGACCTC	21	SauCas9
TIGIT4207	TTCTGTGGAAGGTGACCTCAG	21	SauCas9
TIGIT4208	CCTGAGGTCACCTTCCACAGA	21	SauCas9
TIGIT4209	TTCTCCTGAGGTCACCTTCCA	21	SauCas9
TIGIT4210	AGGAGAAAATCAGCTGGACAG	21	SauCas9
TIGIT4211	GGAGAAAATCAGCTGGACAGG	21	SauCas9
TIGIT4212	GCCCCAGTGCTCCCTCACCCC	21	SauCas9
TIGIT4213	TGGACACAGCTTCCTGGGGGT	21	SauCas9
TIGIT4214	TCTGCCTGGACACAGCTTCCT	21	SauCas9
TIGIT4215	AGCTGCACCTGCTGGGCTCTG	21	SauCas9
TIGIT4216	GCTGGGCTCTGTGGAGAGCAG	21	SauCas9
TIGIT4217	TGGGCTCTGTGGAGAGCAGCG	21	SauCas9
TIGIT4218	CTGCATGACTACTTCAATGTC	21	SauCas9
TIGIT4219	AATGTCCTGAGTTACAGAAGC	21	SauCas9
TIGIT4220	TGGGTAACTGCAGCTTCTTCA	21	SauCas9
TIGIT4221	GACAGGCACAATAGAAACAA	20	SpyCas9
TIGIT4222	ACAGGCACAATAGAAACAAC	20	SpyCas9
TIGIT4223	CAGGCACAATAGAAACAACG	20	SpyCas9
TIGIT4224	GGGAACATTTCTGCAGAGAA	20	SpyCas9
TIGIT4225	AACATTTCTGCAGAGAAAGG	20	SpyCas9
TIGIT4226	ATGTCACCTCTCCTCCACCA	20	SpyCas9
TIGIT4227	CTTGTGCCGTGGTGGAGGAG	20	SpyCas9

【０１５０】

【表７】

TIGIT4228	GGTCACTTGTGCCGTGGTGG	20	SpyCas9
TIGIT4229	CACCACGGCACAAGTGACCC	20	SpyCas9
TIGIT4230	CTGGGTCACTTGTGCCGTGG	20	SpyCas9
TIGIT4231	GACCTGGGTCACTTGTGCCG	20	SpyCas9
TIGIT4232	CACAAGTGACCCAGGTCAAC	20	SpyCas9
TIGIT4233	ACAAGTGACCCAGGTCAACT	20	SpyCas9
TIGIT4234	CCAGGTCAACTGGGAGCAGC	20	SpyCas9
TIGIT4235	CTGCTGCTCCCAGTTGACCT	20	SpyCas9
TIGIT4236	CCTGCTGCTCCCAGTTGACC	20	SpyCas9
TIGIT4237	GGAGCAGCAGGACCAGCTTC	20	SpyCas9
TIGIT4238	CATTACAAATGGCCAGAAGC	20	SpyCas9
TIGIT4239	GGCCATTTGTAATGCTGACT	20	SpyCas9
TIGIT4240	GCCATTTGTAATGCTGACTT	20	SpyCas9
TIGIT4241	CCATTTGTAATGCTGACTTG	20	SpyCas9
TIGIT4242	TTTGTAATGCTGACTTGGGG	20	SpyCas9
TIGIT4243	CCCCAAGTCAGCATTACAAA	20	SpyCas9
TIGIT4244	GCACATCTCCCCATCCTTCA	20	SpyCas9
TIGIT4245	CCCATCCTTCAAGGATCGAG	20	SpyCas9
TIGIT4246	CACTCGATCCTTGAAGGATG	20	SpyCas9
TIGIT4247	CCACTCGATCCTTGAAGGAT	20	SpyCas9
TIGIT4248	GCCACTCGATCCTTGAAGGA	20	SpyCas9
TIGIT4249	TTCAAGGATCGAGTGGCCCC	20	SpyCas9
TIGIT4250	TGGGGCCACTCGATCCTTGA	20	SpyCas9
TIGIT4251	GATCGAGTGGCCCCAGGTCC	20	SpyCas9
TIGIT4252	AGTGGCCCCAGGTCCCGGCC	20	SpyCas9
TIGIT4253	GTGGCCCCAGGTCCCGGCCT	20	SpyCas9
TIGIT4254	GAGGCCCAGGCCGGGACCTG	20	SpyCas9

【０１５１】

【表８】

TIGIT4255	TGAGGCCCAGGCCGGGACCT	20	SpyCas9
TIGIT4256	GTGAGGCCCAGGCCGGGACC	20	SpyCas9
TIGIT4257	TGGAGGGTGAGGCCCAGGCC	20	SpyCas9
TIGIT4258	CTGGAGGGTGAGGCCCAGGC	20	SpyCas9
TIGIT4259	GCGACTGGAGGGTGAGGCCC	20	SpyCas9
TIGIT4260	CGGTCAGCGACTGGAGGGTG	20	SpyCas9
TIGIT4261	GTTCACGGTCAGCGACTGGA	20	SpyCas9
TIGIT4262	CGTTCACGGTCAGCGACTGG	20	SpyCas9
TIGIT4263	TATCGTTCACGGTCAGCGAC	20	SpyCas9
TIGIT4264	TCGCTGACCGTGAACGATAC	20	SpyCas9
TIGIT4265	CGCTGACCGTGAACGATACA	20	SpyCas9
TIGIT4266	GCTGACCGTGAACGATACAG	20	SpyCas9
TIGIT4267	GTACTCCCCTGTATCGTTCA	20	SpyCas9
TIGIT4268	ATCTATCACACCTACCCTGA	20	SpyCas9
TIGIT4269	TCTATCACACCTACCCTGAT	20	SpyCas9
TIGIT4270	TACCCTGATGGGACGTACAC	20	SpyCas9
TIGIT4271	ACCCTGATGGGACGTACACT	20	SpyCas9
TIGIT4272	AGTGTACGTCCCATCAGGGT	20	SpyCas9
TIGIT4273	TCCCAGTGTACGTCCCATCA	20	SpyCas9
TIGIT4274	CTCCCAGTGTACGTCCCATC	20	SpyCas9
TIGIT4275	GTACACTGGGAGAATCTTCC	20	SpyCas9
TIGIT4276	CACTGGGAGAATCTTCCTGG	20	SpyCas9
TIGIT4277	CTGAGCTTTCTAGGACCTCC	20	SpyCas9
TIGIT4278	AGGTTCCAGATTCCATTGCT	20	SpyCas9
TIGIT4279	AAGCAATGGAATCTGGAACC	20	SpyCas9
TIGIT4280	GATTCCATTGCTTGGAGCCA	20	SpyCas9
TIGIT4281	TGGCTCCAAGCAATGGAATC	20	SpyCas9

【０１５２】

【表９】

TIGIT4282	GCGGCCATGGCTCCAAGCAA	20	SpyCas9
TIGIT4283	TGGAGCCATGGCCGCGACGC	20	SpyCas9
TIGIT4284	AGCCATGGCCGCGACGCTGG	20	SpyCas9
TIGIT4285	GACCACCAGCGTCGCGGCCA	20	SpyCas9
TIGIT4286	GCAGATGACCACCAGCGTCG	20	SpyCas9
TIGIT4287	CATCTGCACAGCAGTCATCG	20	SpyCas9
TIGIT4288	CTGCACAGCAGTCATCGTGG	20	SpyCas9
TIGIT4289	AGCCCTCAGAATCCATTCTG	20	SpyCas9
TIGIT4290	CTCAGAATCCATTCTGTGGA	20	SpyCas9
TIGIT4291	TTCCACAGAATGGATTCTGA	20	SpyCas9
TIGIT4292	CTTCCACAGAATGGATTCTG	20	SpyCas9
TIGIT4293	ATTCTGTGGAAGGTGACCTC	20	SpyCas9
TIGIT4294	TGAGGTCACCTTCCACAGAA	20	SpyCas9
TIGIT4295	GACCTCAGGAGAAAATCAGC	20	SpyCas9
TIGIT4296	CAGGAGAAAATCAGCTGGAC	20	SpyCas9
TIGIT4297	GTCCAGCTGATTTTCTCCTG	20	SpyCas9
TIGIT4298	GAGAAAATCAGCTGGACAGG	20	SpyCas9
TIGIT4299	AATCAGCTGGACAGGAGGAA	20	SpyCas9
TIGIT4300	CCCAGTGCTCCCTCACCCCC	20	SpyCas9
TIGIT4301	CTGGGGGTGAGGGAGCACTG	20	SpyCas9
TIGIT4302	CCTGGGGGTGAGGGAGCACT	20	SpyCas9
TIGIT4303	TCCTGGGGGTGAGGGAGCAC	20	SpyCas9
TIGIT4304	ACACAGCTTCCTGGGGGTGA	20	SpyCas9
TIGIT4305	GACACAGCTTCCTGGGGGTG	20	SpyCas9
TIGIT4306	ACCCCCAGGAAGCTGTGTCC	20	SpyCas9
TIGIT4307	GCCTGGACACAGCTTCCTGG	20	SpyCas9
TIGIT4308	TGCCTGGACACAGCTTCCTG	20	SpyCas9

【０１５３】

【表１０】

TIGIT4309	CTGCCTGGACACAGCTTCCT	20	SpyCas9
TIGIT4310	TCTGCCTGGACACAGCTTCC	20	SpyCas9
TIGIT4311	CAGGCAGAAGCTGCACCTGC	20	SpyCas9
TIGIT4312	AGGCAGAAGCTGCACCTGCT	20	SpyCas9
TIGIT4313	CAGCAGGTGCAGCTTCTGCC	20	SpyCas9
TIGIT4314	GCTGCACCTGCTGGGCTCTG	20	SpyCas9
TIGIT4315	TGCTCTCCACAGAGCCCAGC	20	SpyCas9
TIGIT4316	CTGGGCTCTGTGGAGAGCAG	20	SpyCas9
TIGIT4317	TGGGCTCTGTGGAGAGCAGC	20	SpyCas9
TIGIT4318	GGGCTCTGTGGAGAGCAGCG	20	SpyCas9
TIGIT4319	CTGTGGAGAGCAGCGGGGAG	20	SpyCas9
TIGIT4320	ATTGAAGTAGTCATGCAGCT	20	SpyCas9
TIGIT4321	TGTCCTGAGTTACAGAAGCC	20	SpyCas9
TIGIT4322	GTCCTGAGTTACAGAAGCCT	20	SpyCas9
TIGIT4323	TACCCAGGCTTCTGTAACTC	20	SpyCas9
TIGIT4324	TGAAGAAGCTGCAGTTACCC	20	SpyCas9
TIGIT4325	TGCAGCTTCTTCACAGAGAC	20	SpyCas9
TIGIT5053	GTTGTTTCTATTGTGCCTGT	20	AsCpf1 RR
TIGIT5054	CGTTGTTTCTATTGTGCCTG	20	AsCpf1 RR
TIGIT5055	CCGTTGTTTCTATTGTGCCT	20	AsCpf1 RR
TIGIT5056	CCACGGCACAAGTGACCCAG	20	AsCpf1 RR
TIGIT5057	AGTTGACCTGGGTCACTTGT	20	AsCpf1 RR
TIGIT5058	AAGTCAGCATTACAAATGGC	20	AsCpf1 RR
TIGIT5059	CATCCTTCAAGGATCGAGTG	20	AsCpf1 RR
TIGIT5060	ATCCTTCAAGGATCGAGTGG	20	AsCpf1 RR
TIGIT5061	AGGATCGAGTGGCCCCAGGT	20	AsCpf1 RR
TIGIT5062	AGGTCCCGGCCTGGGCCTCA	20	AsCpf1 RR

【０１５４】

【表１１】

TIGIT5063	GGCCTGGGCCTCACCCTCCA	20	AsCpf1 RR
TIGIT5064	CGGTCAGCGACTGGAGGGTG	20	AsCpf1 RR
TIGIT5065	GTCGCTGACCGTGAACGATA	20	AsCpf1 RR
TIGIT5066	TGTATCGTTCACGGTCAGCG	20	AsCpf1 RR
TIGIT5067	CTGTATCGTTCACGGTCAGC	20	AsCpf1 RR
TIGIT5068	ATCAGGGTAGGTGTGATAGA	20	AsCpf1 RR
TIGIT5069	AGTGTACGTCCCATCAGGGT	20	AsCpf1 RR
TIGIT5070	GGAAGATTCTCCCAGTGTAC	20	AsCpf1 RR
TIGIT5071	TGGAGGTCCTAGAAAGCTCA	20	AsCpf1 RR
TIGIT5072	AGCAATGGAATCTGGAACCT	20	AsCpf1 RR
TIGIT5073	AGATTCCATTGCTTGGAGCC	20	AsCpf1 RR
TIGIT5074	GATTCCATTGCTTGGAGCCA	20	AsCpf1 RR
TIGIT5075	ATTGCTTGGAGCCATGGCCG	20	AsCpf1 RR
TIGIT5076	TTGCTTGGAGCCATGGCCGC	20	AsCpf1 RR
TIGIT5077	CAGAATGGATTCTGAGGGCT	20	AsCpf1 RR
TIGIT5078	ACAGAATGGATTCTGAGGGC	20	AsCpf1 RR
TIGIT5079	TTCTGTGGAAGGTGACCTCA	20	AsCpf1 RR
TIGIT5080	GCTGATTTTCTCCTGAGGTC	20	AsCpf1 RR
TIGIT5081	TCCTGTCCAGCTGATTTTCT	20	AsCpf1 RR
TIGIT5082	TTCCTCCTGTCCAGCTGATT	20	AsCpf1 RR
TIGIT5083	TGGGGGTGAGGGAGCACTGG	20	AsCpf1 RR
TIGIT5084	AGTGCTCCCTCACCCCCAGG	20	AsCpf1 RR
TIGIT5085	TCACCCCCAGGAAGCTGTGT	20	AsCpf1 RR
TIGIT5086	CAGGAAGCTGTGTCCAGGCA	20	AsCpf1 RR
TIGIT5087	AGGAAGCTGTGTCCAGGCAG	20	AsCpf1 RR
TIGIT5088	GGCAGAAGCTGCACCTGCTG	20	AsCpf1 RR
TIGIT5089	CAGAGCCCAGCAGGTGCAGC	20	AsCpf1 RR

【０１５５】

【表１２】

TIGIT5090	GCTGCTCTCCACAGAGCCCA	20	AsCpf1 RR
TIGIT5091	CGCTGCTCTCCACAGAGCCC	20	AsCpf1 RR
TIGIT5092	ATGTCCTGAGTTACAGAAGC	20	AsCpf1 RR

【０１５６】
いくつかの実施形態では、本開示で使用するためのｇＲＮＡは、ＡＤＯＲＡ２ａを標的化するｇＲＮＡ（ＡＤＯＲＡ２ａ　ｇＲＮＡ）である。いくつかの実施形態では、ＡＤＯＲＡ２ａを標的化するｇＲＮＡは、表５に記載されるｇＲＮＡの１つ又は複数である。
【０１５７】
【表１３】

表5. ADORA2a gRNA

名称	gRNA標的化ドメイン配列 (DNA)	長さ	酵素
ADORA2A337	GAGCACACCCACTGCGATGT	20	SpyCas9
ADORA2A338	GATGGCCAGGAGACTGAAGA	20	SpyCas9
ADORA2A339	CTGCTCACCGGAGCGGGATG	20	SpyCas9
ADORA2A340	GTCTGTGGCCATGCCCATCA	20	SpyCas9
ADORA2A341	TCACCGGAGCGGGATGCGGA	20	SpyCas9
ADORA2A342	GTGGCAGGCAGCGCAGAACC	20	SpyCas9
ADORA2A343	AGCACACCAGCACATTGCCC	20	SpyCas9
ADORA2A344	CAGGTTGCTGTTGAGCCACA	20	SpyCas9
ADORA2A345	CTTCATTGCCTGCTTCGTCC	20	SpyCas9
ADORA2A346	GTACACCGAGGAGCCCATGA	20	SpyCas9
ADORA2A347	GATGGCAATGTAGCGGTCAA	20	SpyCas9
ADORA2A348	CTCCTCGGTGTACATCACGG	20	SpyCas9
ADORA2A349	CGAGGAGCCCATGATGGGCA	20	SpyCas9
ADORA2A350	GGGCTCCTCGGTGTACATCA	20	SpyCas9
ADORA2A351	CTTTGTGGTGTCACTGGCGG	20	SpyCas9
ADORA2A352	CCGCTCCGGTGAGCAGGGCC	20	SpyCas9
ADORA2A353	GGGTTCTGCGCTGCCTGCCA	20	SpyCas9
ADORA2A354	GGACGAAGCAGGCAATGAAG	20	SpyCas9
ADORA2A355	GTGCTGATGGTGATGGCAAA	20	SpyCas9
ADORA2A356	AGCGCAGAACCCGGTGCTGA	20	SpyCas9
ADORA2A357	GAGCTCCATCTTCAGTCTCC	20	SpyCas9
ADORA2A358	TGCTGATGGTGATGGCAAAG	20	SpyCas9
ADORA2A359	GGCGGCGGCCGACATCGCAG	20	SpyCas9
ADORA2A360	AATGAAGAGGCAGCCGTGGC	20	SpyCas9
ADORA2A361	GGGCAATGTGCTGGTGTGCT	20	SpyCas9
ADORA2A362	CATGCCCATCATGGGCTCCT	20	SpyCas9
ADORA2A363	AATGTAGCGGTCAATGGCGA	20	SpyCas9
ADORA2A364	AGTAGTTGGTGACGTTCTGC	20	SpyCas9
ADORA2A365	AGCGGTCAATGGCGATGGCC	20	SpyCas9
ADORA2A366	CGCATCCCGCTCCGGTGAGC	20	SpyCas9

【０１５８】

【表１４】

ADORA2A367	GCATCCCGCTCCGGTGAGCA	20	SpyCas9
ADORA2A368	TGGGCAATGTGCTGGTGTGC	20	SpyCas9
ADORA2A369	CAACTACTTTGTGGTGTCAC	20	SpyCas9
ADORA2A370	CGCTCCGGTGAGCAGGGCCG	20	SpyCas9
ADORA2A371	GATGGTGATGGCAAAGGGGA	20	SpyCas9
ADORA2A372	GGTGTACATCACGGTGGAGC	20	SpyCas9
ADORA2A373	GAACGTCACCAACTACTTTG	20	SpyCas9
ADORA2A374	CAGTGACACCACAAAGTAGT	20	SpyCas9
ADORA2A375	GGCCATCCTGGGCAATGTGC	20	SpyCas9
ADORA2A376	CCCGGCCCTGCTCACCGGAG	20	SpyCas9
ADORA2A377	CACCAGCACATTGCCCAGGA	20	SpyCas9
ADORA2A378	TTTGCCATCACCATCAGCAC	20	SpyCas9
ADORA2A379	CTCCACCGTGATGTACACCG	20	SpyCas9
ADORA2A380	GGAGCTGGCCATTGCTGTGC	20	SpyCas9
ADORA2A381	CAGGATGGCCAGCACAGCAA	20	SpyCas9
ADORA2A382	GAACCCGGTGCTGATGGTGA	20	SpyCas9
ADORA2A383	TGGAGCTCTGCGTGAGGACC	20	SpyCas9
ADORA2A384	CCCGCTCCGGTGAGCAGGGC	20	SpyCas9
ADORA2A385	AGGCAATGAAGAGGCAGCCG	20	SpyCas9
ADORA2A386	CCGGCCCTGCTCACCGGAGC	20	SpyCas9
ADORA2A387	GCGGCGGCCGACATCGCAGT	20	SpyCas9
ADORA2A388	GGTGCTGATGGTGATGGCAA	20	SpyCas9
ADORA2A389	CTACTTTGTGGTGTCACTGG	20	SpyCas9
ADORA2A390	TACACCGAGGAGCCCATGAT	20	SpyCas9
ADORA2A391	TCTGTGGCCATGCCCATCAT	20	SpyCas9
ADORA2A392	ATTGCTGTGCTGGCCATCCT	20	SpyCas9
ADORA2A393	CGTGAGGACCAGGACGAAGC	20	SpyCas9
ADORA2A394	TTGCCATCACCATCAGCACC	20	SpyCas9
ADORA2A395	GGATGCGGATGGCAATGTAG	20	SpyCas9
ADORA2A396	TTGCCATCCGCATCCCGCTC	20	SpyCas9
ADORA2A397	TGAAGATGGAGCTCTGCGTG	20	SpyCas9
ADORA2A398	CATTGCTGTGCTGGCCATCC	20	SpyCas9
ADORA2A399	TGCTGGTGTGCTGGGCCGTG	20	SpyCas9
ADORA2A820	GGCTCCTCGGTGTACATCACG	21	SauCas9
ADORA2A821	GAGCTCTGCGTGAGGACCAGG	21	SauCas9
ADORA2A822	GATGGAGCTCTGCGTGAGGAC	21	SauCas9
ADORA2A823	CCAGCACACCAGCACATTGCC	21	SauCas9
ADORA2A824	AGGACCAGGACGAAGCAGGCA	21	SauCas9
ADORA2A825	TGCCATCCGCATCCCGCTCCG	21	SauCas9
ADORA2A826	GTGTGGCTCAACAGCAACCTG	21	SauCas9
ADORA2A827	AGCTCCACCGTGATGTACACC	21	SauCas9
ADORA2A828	GTAGCGGTCAATGGCGATGGC	21	SauCas9
ADORA2A829	CGGTGCTGATGGTGATGGCAA	21	SauCas9
ADORA2A830	CCCTGCTCACCGGAGCGGGAT	21	SauCas9
ADORA2A831	GTGACGTTCTGCAGGTTGCTG	21	SauCas9

【０１５９】

【表１５】

ADORA2A832	GCTCCACCGTGATGTACACCG	21	SauCas9
ADORA2A833	ACTGAAGATGGAGCTCTGCGT	21	SauCas9
ADORA2A834	CCAGCTCCACCGTGATGTACA	21	SauCas9
ADORA2A835	CCTTTGCCATCACCATCAGCA	21	SauCas9
ADORA2A836	CCGGTGCTGATGGTGATGGCA	21	SauCas9
ADORA2A837	CCTGGGCAATGTGCTGGTGTG	21	SauCas9
ADORA2A838	AGGCAGCCGTGGCAGGCAGCG	21	SauCas9
ADORA2A839	GCGATGGCCAGGAGACTGAAG	21	SauCas9
ADORA2A840	CGATGGCCAGGAGACTGAAGA	21	SauCas9
ADORA2A841	TCCCGCTCCGGTGAGCAGGGC	21	SauCas9
ADORA2A842	TGCTTCGTCCTGGTCCTCACG	21	SauCas9
ADORA2A843	ACCAGGACGAAGCAGGCAATG	21	SauCas9
ADORA2A844	ATGTACACCGAGGAGCCCATG	21	SauCas9
ADORA2A845	TCGTCTGTGGCCATGCCCATC	21	SauCas9
ADORA2A846	TCAATGGCGATGGCCAGGAGA	21	SauCas9
ADORA2A847	GGTGCTGATGGTGATGGCAAA	21	SauCas9
ADORA2A848	TAGCGGTCAATGGCGATGGCC	21	SauCas9
ADORA2A849	TCCGCATCCCGCTCCGGTGAG	21	SauCas9
ADORA2A850	CTGGCGGCGGCCGACATCGCA	21	SauCas9
ADORA2A851	GCCATTGCTGTGCTGGCCATC	21	SauCas9
ADORA2A852	ATCCCGCTCCGGTGAGCAGGG	21	SauCas9
ADORA2A853	AGACTGAAGATGGAGCTCTGC	21	SauCas9
ADORA2A854	CCCCGGCCCTGCTCACCGGAG	21	SauCas9
ADORA2A855	ATGGTGATGGCAAAGGGGATG	21	SauCas9
ADORA2A856	GCTCCTCGGTGTACATCACGG	21	SauCas9
ADORA2A248	TGTCGATGGCAATAGCCAAG	20	SpyCas9
ADORA2A249	AGAAGTTGGTGACGTTCTGC	20	SpyCas9
ADORA2A250	TTCGCCATCACCATCAGCAC	20	SpyCas9
ADORA2A251	GAAGAAGAGGCAGCCATGGC	20	SpyCas9
ADORA2A252	CACAAGCACGTTACCCAGGA	20	SpyCas9
ADORA2A253	CAACTTCTTCGTGGTATCTC	20	SpyCas9
ADORA2A254	CAGGATGGCCAGCACAGCAA	20	SpyCas9
ADORA2A255	AATTCCACTCCGGTGAGCCA	20	SpyCas9
ADORA2A256	AGCGCAGAAGCCAGTGCTGA	20	SpyCas9
ADORA2A257	GTGCTGATGGTGATGGCGAA	20	SpyCas9
ADORA2A258	GGAGCTGGCCATTGCTGTGC	20	SpyCas9
ADORA2A259	AATAGCCAAGAGGCTGAAGA	20	SpyCas9
ADORA2A260	CTCCTCGGTGTACATCATGG	20	SpyCas9
ADORA2A261	GGACAAAGCAGGCGAAGAAG	20	SpyCas9
ADORA2A262	TCTGGCGGCGGCTGACATCG	20	SpyCas9
ADORA2A263	TGGGTAACGTGCTTGTGTGC	20	SpyCas9
ADORA2A264	GATGTACACCGAGGAGCCCA	20	SpyCas9
ADORA2A265	TAACCCCTGGCTCACCGGAG	20	SpyCas9
ADORA2A266	TCACCGGAGTGGAATTCGGA	20	SpyCas9
ADORA2A267	GCGGCGGCTGACATCGCGGT	20	SpyCas9

【０１６０】

【表１６】

ADORA2A268	GATGGTGATGGCGAATGGGA	20	SpyCas9
ADORA2A269	GGCTTCTGCGCTGCCTGCCA	20	SpyCas9
ADORA2A270	ATTCCACTCCGGTGAGCCAG	20	SpyCas9
ADORA2A271	GGTGTACATCATGGTGGAGC	20	SpyCas9
ADORA2A272	ATTGCTGTGCTGGCCATCCT	20	SpyCas9
ADORA2A273	CTCCACCATGATGTACACCG	20	SpyCas9
ADORA2A274	GGCGGCGGCTGACATCGCGG	20	SpyCas9
ADORA2A275	TACACCGAGGAGCCCATGGC	20	SpyCas9
ADORA2A276	GGGTAACGTGCTTGTGTGCT	20	SpyCas9
ADORA2A277	CAGGTTGCTGTTGATCCACA	20	SpyCas9
ADORA2A278	TGAAGATGGAACTCTGCGTG	20	SpyCas9
ADORA2A279	GATGGCGATGTATCTGTCGA	20	SpyCas9
ADORA2A280	CTTCTTCGCCTGCTTTGTCC	20	SpyCas9
ADORA2A281	AGGCGAAGAAGAGGCAGCCA	20	SpyCas9
ADORA2A282	TGCTTGTGTGCTGGGCCGTG	20	SpyCas9
ADORA2A283	GAAGCCAGTGCTGATGGTGA	20	SpyCas9
ADORA2A284	CGTGAGGACCAGGACAAAGC	20	SpyCas9
ADORA2A285	TGGAACTCTGCGTGAGGACC	20	SpyCas9
ADORA2A286	CATTGCTGTGCTGGCCATCC	20	SpyCas9
ADORA2A287	TTCTCCCGCCATGGGCTCCT	20	SpyCas9
ADORA2A288	TGGCTCACCGGAGTGGAATT	20	SpyCas9
ADORA2A289	TGCTGATGGTGATGGCGAAT	20	SpyCas9
ADORA2A290	CTTCGTGGTATCTCTGGCGG	20	SpyCas9
ADORA2A291	AGCACACAAGCACGTTACCC	20	SpyCas9
ADORA2A292	GGGCTCCTCGGTGTACATCA	20	SpyCas9
ADORA2A293	GTACACCGAGGAGCCCATGG	20	SpyCas9
ADORA2A294	GAACGTCACCAACTTCTTCG	20	SpyCas9
ADORA2A295	TCGCCATCCGAATTCCACTC	20	SpyCas9
ADORA2A296	GAGTTCCATCTTCAGCCTCT	20	SpyCas9
ADORA2A297	GAATTCCACTCCGGTGAGCC	20	SpyCas9
ADORA2A298	CAGAGATACCACGAAGAAGT	20	SpyCas9
ADORA2A299	CTTCTTCGTGGTATCTCTGG	20	SpyCas9
ADORA2A695	CAGTGCTGATGGTGATGGCGA	21	SauCas9
ADORA2A696	CGAATTCCACTCCGGTGAGCC	21	SauCas9
ADORA2A697	CCGAATTCCACTCCGGTGAGC	21	SauCas9
ADORA2A698	GCTGAAGATGGAACTCTGCGT	21	SauCas9
ADORA2A699	CGTGCTTGTGTGCTGGGCCGT	21	SauCas9
ADORA2A700	GTGAGGACCAGGACAAAGCAG	21	SauCas9
ADORA2A701	TCGATGGCAATAGCCAAGAGG	21	SauCas9
ADORA2A702	CATCGACAGATACATCGCCAT	21	SauCas9
ADORA2A703	GTACACCGAGGAGCCCATGGC	21	SauCas9
ADORA2A704	GCTCCACCATGATGTACACCG	21	SauCas9
ADORA2A705	AAGCCAGTGCTGATGGTGATG	21	SauCas9
ADORA2A706	CACCGCGATGTCAGCCGCCGC	21	SauCas9
ADORA2A707	AGGCTGAAGATGGAACTCTGC	21	SauCas9

【０１６１】

【表１７】

ADORA2A708	GCCGCCGCCAGAGATACCACG	21	SauCas9
ADORA2A709	AGCTCCACCATGATGTACACC	21	SauCas9
ADORA2A710	AGGCAGCCATGGCAGGCAGCG	21	SauCas9
ADORA2A711	CCTGGCTCACCGGAGTGGAAT	21	SauCas9
ADORA2A712	CCAGCTCCACCATGATGTACA	21	SauCas9
ADORA2A713	ACCAGGACAAAGCAGGCGAAG	21	SauCas9
ADORA2A714	CCTGGGTAACGTGCTTGTGTG	21	SauCas9
ADORA2A715	AGGACCAGGACAAAGCAGGCG	21	SauCas9
ADORA2A716	TCAGCCGCCGCCAGAGATACC	21	SauCas9
ADORA2A717	GGCTCCTCGGTGTACATCATG	21	SauCas9
ADORA2A718	CTGGCGGCGGCTGACATCGCG	21	SauCas9
ADORA2A719	GATGGAACTCTGCGTGAGGAC	21	SauCas9
ADORA2A720	GCTCCTCGGTGTACATCATGG	21	SauCas9
ADORA2A721	TGTACACCGAGGAGCCCATGG	21	SauCas9
ADORA2A722	GCCATTGCTGTGCTGGCCATC	21	SauCas9
ADORA2A723	CAATAGCCAAGAGGCTGAAGA	21	SauCas9
ADORA2A724	ATGGTGATGGCGAATGGGATG	21	SauCas9
ADORA2A725	ATGTACACCGAGGAGCCCATG	21	SauCas9
ADORA2A726	GTGTGGATCAACAGCAACCTG	21	SauCas9
ADORA2A727	TGCTTTGTCCTGGTCCTCACG	21	SauCas9
ADORA2A728	GTAACCCCTGGCTCACCGGAG	21	SauCas9
ADORA2A729	CCAGCACACAAGCACGTTACC	21	SauCas9
ADORA2A730	TATCTGTCGATGGCAATAGCC	21	SauCas9
ADORA2A731	GCAATAGCCAAGAGGCTGAAG	21	SauCas9
ADORA2A732	AGTGCTGATGGTGATGGCGAA	21	SauCas9
ADORA2A733	ACACCGAGGAGCCCATGGCGG	21	SauCas9
ADORA2A734	CGCCATCCGAATTCCACTCCG	21	SauCas9
ADORA2A4111	TGGTGTCACTGGCGGCGGCC	20	AsCpf1
ADORA2A4112	CCATCACCATCAGCACCGGG	20	AsCpf1
ADORA2A4113	CCATCGGCCTGACTCCCATG	20	AsCpf1
ADORA2A4114	GCTGACCGCAGTTGTTCCAA	20	AsCpf1
ADORA2A4115	AGGATGTGGTCCCCATGAAC	20	AsCpf1
ADORA2A4116	CCTGTGTGCTGGTGCCCCTG	20	AsCpf1
ADORA2A4117	CGGATCTTCCTGGCGGCGCG	20	AsCpf1
ADORA2A4118	CCCTCTGCTGGCTGCCCCTA	20	AsCpf1
ADORA2A4119	TTCTGCCCCGACTGCAGCCA	20	AsCpf1
ADORA2A4120	AAGGCAGCTGGCACCAGTGC	20	AsCpf1
ADORA2A4121	TAAGGGCATCATTGCCATCTG	21	SauCas9
ADORA2A4122	CGGCCTGACTCCCATGCTAGG	21	SauCas9
ADORA2A4123	GCAGTTGTTCCAACCTAGCAT	21	SauCas9
ADORA2A4124	CCGCAGTTGTTCCAACCTAGC	21	SauCas9
ADORA2A4125	CAAGAACCACTCCCAGGGCTG	21	SauCas9
ADORA2A4126	CTTGGCCCTCCCCGCAGCCCT	21	SauCas9
ADORA2A4127	CACTTGGCCCTCCCCGCAGCC	21	SauCas9
ADORA2A4128	GGCCAAGTGGCCTGTCTCTTT	21	SauCas9

【０１６２】

【表１８】

ADORA2A4129	TTCATGGGGACCACATCCTCA	21	SauCas9
ADORA2A4130	TGAAGTACACCATGTAGTTCA	21	SauCas9
ADORA2A4131	CTGGTGCCCCTGCTGCTCATG	21	SauCas9
ADORA2A4132	GCTCATGCTGGGTGTCTATTT	21	SauCas9
ADORA2A4133	CTTCAGCTGTCGTCGCGCCGC	21	SauCas9
ADORA2A4134	CGCGACGACAGCTGAAGCAGA	21	SauCas9
ADORA2A4135	GATGGAGAGCCAGCCTCTGCC	21	SauCas9
ADORA2A4136	GCGTGGCTGCAGTCGGGGCAG	21	SauCas9
ADORA2A4137	ACGATGGCCAGGTACATGAGC	21	SauCas9
ADORA2A4138	CTCTCCCACACCAATTCGGTT	21	SauCas9
ADORA2A4139	GATTCACAACCGAATTGGTGT	21	SauCas9
ADORA2A4140	GGGATTCACAACCGAATTGGT	21	SauCas9
ADORA2A4141	CGTAGATGAAGGGATTCACAA	21	SauCas9
ADORA2A4142	GGATACGGTAGGCGTAGATGA	21	SauCas9
ADORA2A4143	TCATCTACGCCTACCGTATCC	21	SauCas9
ADORA2A4144	CGGATACGGTAGGCGTAGATG	21	SauCas9
ADORA2A4145	GCGGAAGGTCTGGCGGAACTC	21	SauCas9
ADORA2A4146	AATGATCTTGCGGAAGGTCTG	21	SauCas9
ADORA2A4147	GACGTGGCTGCGAATGATCTT	21	SauCas9
ADORA2A4148	TTGCTGCCTCAGGACGTGGCT	21	SauCas9
ADORA2A4149	CAAGGCAGCTGGCACCAGTGC	21	SauCas9
ADORA2A4150	CGGGCACTGGTGCCAGCTGCC	21	SauCas9
ADORA2A4151	CTTGGCAGCTCATGGCAGTGA	21	SauCas9
ADORA2A4152	CCGTCTCAACGGCCACCCGCC	21	SauCas9
ADORA2A4153	CACACTCCTGGCGGGTGGCCG	21	SauCas9
ADORA2A4154	TGCCGTTGGCCCACACTCCTG	21	SauCas9
ADORA2A4155	CCATTGGGCCTCCGCTCAGGG	21	SauCas9
ADORA2A4156	CATAGCCATTGGGCCTCCGCT	21	SauCas9
ADORA2A4157	AATGGCTATGCCCTGGGGCTG	21	SauCas9
ADORA2A4158	ATGCCCTGGGGCTGGTGAGTG	21	SauCas9
ADORA2A4159	GCCCTGGGGCTGGTGAGTGGA	21	SauCas9
ADORA2A4160	TGGTGAGTGGAGGGAGTGCCC	21	SauCas9
ADORA2A4161	GAGGGAGTGCCCAAGAGTCCC	21	SauCas9
ADORA2A4162	AGGGAGTGCCCAAGAGTCCCA	21	SauCas9
ADORA2A4163	GTCTGGGAGGCCCGTGTTCCC	21	SauCas9
ADORA2A4164	CATGGCTAAGGAGCTCCACGT	21	SauCas9
ADORA2A4165	GAGCTCCTTAGCCATGAGCTC	21	SauCas9
ADORA2A4166	GCTCCTTAGCCATGAGCTCAA	21	SauCas9
ADORA2A4167	GGCCTAGATGACCCCCTGGCC	21	SauCas9
ADORA2A4168	CCCCCTGGCCCAGGATGGAGC	21	SauCas9
ADORA2A4169	CTCCTGCTCCATCCTGGGCCA	21	SauCas9
ADORA2A4416	CCGTGATGTACACCGAGGAG	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4417	CTTTGCCATCACCATCAGCA	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4418	TTTGCCATCACCATCAGCAC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4419	TTGCCTGCTTCGTCCTGGTC	20	AsCpf1 RR

【０１６３】

【表１９】

ADORA2A4420	TCCTGGTCCTCACGCAGAGC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4421	TCTTCAGTCTCCTGGCCATC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4422	GTCTCCTGGCCATCGCCATT	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4423	ACCTAGCATGGGAGTCAGGC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4424	AACCTAGCATGGGAGTCAGG	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4425	ATGCTAGGTTGGAACAACTG	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4426	GCAGCCCTGGGAGTGGTTCT	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4427	CGCAGCCCTGGGAGTGGTTC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4428	AGGGCTGCGGGGAGGGCCAA	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4429	TGGGGACCACATCCTCAAAG	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4430	CATGAACTACATGGTGTACT	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4431	ATGAACTACATGGTGTACTT	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4432	ACTTCTTTGCCTGTGTGCTG	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4433	TGCTGCTCATGCTGGGTGTC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4434	CAAATAGACACCCAGCATGA	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4435	GCTGTCGTCGCGCCGCCAGG	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4436	TGGCGGCGCGACGACAGCTG	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4437	TCTGCTTCAGCTGTCGTCGC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4438	GGCAGAGGCTGGCTCTCCAT	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4439	CGGCAGAGGCTGGCTCTCCA	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4440	CCGGCAGAGGCTGGCTCTCC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4441	CACTGCAGAAGGAGGTCCAT	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4442	TGCTGCCAAGTCACTGGCCA	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4443	ACAATGATGGCCAGTGACTT	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4444	TACACATCATCAACTGCTTC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4445	CTTTCTTCTGCCCCGACTGC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4446	GACTGCAGCCACGCCCCTCT	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4447	TCTCTGGCTCATGTACCTGG	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4448	CAACCGAATTGGTGTGGGAG	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4449	ACACCAATTCGGTTGTGAAT	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4450	GTTGTGAATCCCTTCATCTA	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4451	TTCATCTACGCCTACCGTAT	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4452	TCTACGCCTACCGTATCCGC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4453	CGAGTTCCGCCAGACCTTCC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4454	GCCAGACCTTCCGCAAGATC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4455	CCAGACCTTCCGCAAGATCA	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4456	GCAAGATCATTCGCAGCCAC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4457	CAAGATCATTCGCAGCCACG	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4458	CAGCCACGTCCTGAGGCAGC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4459	AGGCAGCTGGCACCAGTGCC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4460	TCACTGCCATGAGCTGCCAA	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4461	TCTCAACGGCCACCCGCCAG	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4462	CTCAGGGTGGGGAGCACTGC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4463	CACCCTGAGCGGAGGCCCAA	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4464	ACCCTGAGCGGAGGCCCAAT	20	AsCpf1 RR

【０１６４】

【表２０】

ADORA2A4465	AGGGCATAGCCATTGGGCCT	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4466	CTCACCAGCCCCAGGGCATA	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4467	TCCACTCACCAGCCCCAGGG	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4468	TGGGACTCTTGGGCACTCCC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4469	CTGGGACTCTTGGGCACTCC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4470	CCTGGGACTCTTGGGCACTC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4471	AGGGGAACACGGGCCTCCCA	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4472	CGTCTGGGAGGCCCGTGTTC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4473	AGACGTGGAGCTCCTTAGCC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4474	TTGAGCTCATGGCTAAGGAG	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4475	CTGGCCTAGATGACCCCCTG	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4476	TGGCCTAGATGACCCCCTGG	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4477	TCCTGGGCCAGGGGGTCATC	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4478	CTGGCCCAGGATGGAGCAGG	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4479	TGGCCCAGGATGGAGCAGGA	20	AsCpf1 RR
ADORA2A4480	CGCGAGTTCCGCCAGACCTT	20	AsCpf1 RVR
ADORA2A4481	CCCTGGGGCTGGTGAGTGGA	20	AsCpf1 RVR

【０１６５】
いくつかの実施形態では、本開示で使用するためのｇＲＮＡは、ＴＧＦβＲ２を標的化するｇＲＮＡ（ＴＧＦｂｅｔａＲ２　ｇＲＮＡ）である。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβＲ２を標的化するｇＲＮＡは、表６に記載されるｇＲＮＡの１つ又は複数である。
【０１６６】

【表２１】

表6. TGFbetaR2 gRNA

名称	gRNA標的化ドメイン配列 (DNA)	長さ	酵素
TGFBR24326	CAGGACGATGTGCAGCGGCC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24327	ACCGCACGTTCAGAAGTCGG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24328	ACAACTGTGTAAATTTTGTG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24329	CAACTGTGTAAATTTTGTGA	20	AsCpf1 RR
TGFBR24330	ACCTGTGACAACCAGAAATC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24331	CCTGTGACAACCAGAAATCC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24332	TGTGGCTTCTCACAGATGGA	20	AsCpf1 RR
TGFBR24333	TCTGTGAGAAGCCACAGGAA	20	AsCpf1 RR
TGFBR24334	AAGCTCCCCTACCATGACTT	20	AsCpf1 RR
TGFBR24335	GAATAAAGTCATGGTAGGGG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24336	AGAATAAAGTCATGGTAGGG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24337	CTACCATGACTTTATTCTGG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24338	TACCATGACTTTATTCTGGA	20	AsCpf1 RR
TGFBR24339	TAATGCACTTTGGAGAAGCA	20	AsCpf1 RR
TGFBR24340	TTCATAATGCACTTTGGAGA	20	AsCpf1 RR
TGFBR24341	AAGTGCATTATGAAGGAAAA	20	AsCpf1 RR
TGFBR24342	TGTGTTCCTGTAGCTCTGAT	20	AsCpf1 RR
TGFBR24343	TGTAGCTCTGATGAGTGCAA	20	AsCpf1 RR

【０１６７】

【表２２】

TGFBR24344	AGTGACAGGCATCAGCCTCC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24345	AGTGGTGGCAGGAGGCTGAT	20	AsCpf1 RR
TGFBR24346	AGGTTGAACTCAGCTTCTGC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24347	CAGGTTGAACTCAGCTTCTG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24348	ACCTGGGAAACCGGCAAGAC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24349	CGTCTTGCCGGTTTCCCAGG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24350	GCGTCTTGCCGGTTTCCCAG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24351	TGAGCTTCCGCGTCTTGCCG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24352	GCGAGCACTGTGCCATCATC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24353	GGATGATGGCACAGTGCTCG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24354	AGGATGATGGCACAGTGCTC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24355	CGTGTGCCAACAACATCAAC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24356	GCTCAATGGGCAGCAGCTCT	20	AsCpf1 RR
TGFBR24357	ACCAGGGTGTCCAGCTCAAT	20	AsCpf1 RR
TGFBR24358	CACCAGGGTGTCCAGCTCAA	20	AsCpf1 RR
TGFBR24359	CCACCAGGGTGTCCAGCTCA	20	AsCpf1 RR
TGFBR24360	GCTTGGCCTTATAGACCTCA	20	AsCpf1 RR
TGFBR24361	GAGCAGTTTGAGACAGTGGC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24362	AGAGGCATACTCCTCATAGG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24363	CTATGAGGAGTATGCCTCTT	20	AsCpf1 RR
TGFBR24364	AAGAGGCATACTCCTCATAG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24365	TATGAGGAGTATGCCTCTTG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24366	GATTGATGTCTGAGAAGATG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24367	CTCCTCAGCCGTCAGGAACT	20	AsCpf1 RR
TGFBR24368	GTTCCTGACGGCTGAGGAGC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24369	GCTCCTCAGCCGTCAGGAAC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24370	TGACGGCTGAGGAGCGGAAG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24371	TCTTCCGCTCCTCAGCCGTC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24372	AACTCCGTCTTCCGCTCCTC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24373	CAACTCCGTCTTCCGCTCCT	20	AsCpf1 RR
TGFBR24374	CCAACTCCGTCTTCCGCTCC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24375	ACGCCAAGGGCAACCTACAG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24376	CGCCAAGGGCAACCTACAGG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24377	AGCTGATGACATGCCGCGTC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24378	GGGCGAGGGAGCTGCCCAGC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24379	CGGGCGAGGGAGCTGCCCAG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24380	CCGGGCGAGGGAGCTGCCCA	20	AsCpf1 RR
TGFBR24381	TCGCCCGGGGGATTGCTCAC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24382	ACATGGAGTGTGATCACTGT	20	AsCpf1 RR
TGFBR24383	CAGTGATCACACTCCATGTG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24384	TGTGGGAGGCCCAAGATGCC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24385	TGTGCACGATGGGCATCTTG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24386	CGAGGATATTGGAGCTCTTG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24387	ATATCCTCGTGAAGAACGAC	20	AsCpf1 RR
TGFBR24388	GACGCAGGGAAAGCCCAAAG	20	AsCpf1 RR

【０１６８】

【表２３】

TGFBR24389	CTGCGTCTGGACCCTACTCT	20	AsCpf1 RR
TGFBR24390	TGCGTCTGGACCCTACTCTG	20	AsCpf1 RR
TGFBR24391	CAGACAGAGTAGGGTCCAGA	20	AsCpf1 RR
TGFBR24392	GCCAGCACGATCCCACCGCA	20	AsCpf1 RVR
TGFBR24393	AAGGAAAAAAAAAAGCCTGG	20	AsCpf1 RVR
TGFBR24394	ACACCAGCAATCCTGACTTG	20	AsCpf1 RVR
TGFBR24395	ACTAGCAACAAGTCAGGATT	20	AsCpf1 RVR
TGFBR24396	GCAACTCCCAGTGGTGGCAG	20	AsCpf1 RVR
TGFBR24397	TGTCATCATCATCTTCTACT	20	AsCpf1 RVR
TGFBR24398	GACCTCAGCAAAGCGACCTT	20	AsCpf1 RVR
TGFBR24399	AGGCCAAGCTGAAGCAGAAC	20	AsCpf1 RVR
TGFBR24400	AGGAGTATGCCTCTTGGAAG	20	AsCpf1 RVR
TGFBR24401	CCTCTTGGAAGACAGAGAAG	20	AsCpf1 RVR
TGFBR24402	TTCTCATGCTTCAGATTGAT	20	AsCpf1 RVR
TGFBR24403	CTCGTGAAGAACGACCTAAC	20	AsCpf1 RVR
TGFbR2036	GGCCGCTGCACATCGTCCTG	20	SpyCas9
TGFbR2037	GCGGGGTCTGCCATGGGTCG	20	SpyCas9
TGFbR2038	AGTTGCTCATGCAGGATTTC	20	SpyCas9
TGFbR2039	CCAGAATAAAGTCATGGTAG	20	SpyCas9
TGFbR2040	CCCCTACCATGACTTTATTC	20	SpyCas9
TGFbR2041	AAGTCATGGTAGGGGAGCTT	20	SpyCas9
TGFbR2042	AGTCATGGTAGGGGAGCTTG	20	SpyCas9
TGFbR2043	ATTGCACTCATCAGAGCTAC	20	SpyCas9
TGFbR2044	CCTAGAGTGAAGAGATTCAT	20	SpyCas9
TGFbR2045	CCAATGAATCTCTTCACTCT	20	SpyCas9
TGFbR2046	AAAGTCATGGTAGGGGAGCT	20	SpyCas9
TGFbR2047	GTGAGCAATCCCCCGGGCGA	20	SpyCas9
TGFbR2048	GTCGTTCTTCACGAGGATAT	20	SpyCas9
TGFbR2049	GCCGCGTCAGGTACTCCTGT	20	SpyCas9
TGFbR2050	GACGCGGCATGTCATCAGCT	20	SpyCas9
TGFbR2051	GCTTCTGCTGCCGGTTAACG	20	SpyCas9
TGFbR2052	GTGGATGACCTGGCTAACAG	20	SpyCas9
TGFbR2053	GTGATCACACTCCATGTGGG	20	SpyCas9
TGFbR2054	GCCCATTGAGCTGGACACCC	20	SpyCas9
TGFbR2055	GCGGTCATCTTCCAGGATGA	20	SpyCas9
TGFbR2056	GGGAGCTGCCCAGCTTGCGC	20	SpyCas9
TGFbR2057	GTTGATGTTGTTGGCACACG	20	SpyCas9
TGFbR2058	GGCATCTTGGGCCTCCCACA	20	SpyCas9
TGFbR2059	GCGGCATGTCATCAGCTGGG	20	SpyCas9
TGFbR2060	GCTCCTCAGCCGTCAGGAAC	20	SpyCas9
TGFbR2061	GCTGGTGTTATATTCTGATG	20	SpyCas9
TGFbR2062	CCGACTTCTGAACGTGCGGT	20	SpyCas9
TGFbR2063	TGCTGGCGATACGCGTCCAC	20	SpyCas9
TGFbR2064	CCCGACTTCTGAACGTGCGG	20	SpyCas9
TGFbR2065	CCACCGCACGTTCAGAAGTC	20	SpyCas9

【０１６９】

【表２４】

TGFbR2066	TCACCCGACTTCTGAACGTG	20	SpyCas9
TGFbR2067	CCCACCGCACGTTCAGAAGT	20	SpyCas9
TGFbR2068	CGAGCAGCGGGGTCTGCCAT	20	SpyCas9
TGFbR2069	ACGAGCAGCGGGGTCTGCCA	20	SpyCas9
TGFbR2070	AGCGGGGTCTGCCATGGGTC	20	SpyCas9
TGFbR2071	CCTGAGCAGCCCCCGACCCA	20	SpyCas9
TGFbR2072	CCATGGGTCGGGGGCTGCTC	20	SpyCas9
TGFbR2073	AACGTGCGGTGGGATCGTGC	20	SpyCas9
TGFbR2074	GGACGATGTGCAGCGGCCAC	20	SpyCas9
TGFbR2075	GTCCACAGGACGATGTGCAG	20	SpyCas9
TGFbR2076	CATGGGTCGGGGGCTGCTCA	20	SpyCas9
TGFbR2077	CAGCGGGGTCTGCCATGGGT	20	SpyCas9
TGFbR2078	ATGGGTCGGGGGCTGCTCAG	20	SpyCas9
TGFbR2079	CGGGGTCTGCCATGGGTCGG	20	SpyCas9
TGFbR2080	AGGAAGTCTGTGTGGCTGTA	20	SpyCas9
TGFbR2081	CTCCATCTGTGAGAAGCCAC	20	SpyCas9
TGFbR2082	ATGATAGTCACTGACAACAA	20	SpyCas9
TGFbR2083	GATGCTGCAGTTGCTCATGC	20	SpyCas9
TGFbR2084	ACAGCCACACAGACTTCCTG	20	SpyCas9
TGFbR2085	GAAGCCACAGGAAGTCTGTG	20	SpyCas9
TGFbR2086	TTCCTGTGGCTTCTCACAGA	20	SpyCas9
TGFbR2087	CTGTGGCTTCTCACAGATGG	20	SpyCas9
TGFbR2088	TCACAAAATTTACACAGTTG	20	SpyCas9
TGFbR2089	GACAACATCATCTTCTCAGA	20	SpyCas9
TGFbR2090	TCCAGAATAAAGTCATGGTA	20	SpyCas9
TGFbR2091	GGTAGGGGAGCTTGGGGTCA	20	SpyCas9
TGFbR2092	TTCTCCAAAGTGCATTATGA	20	SpyCas9
TGFbR2093	CATCTTCCAGAATAAAGTCA	20	SpyCas9
TGFbR2094	CACATGAAGAAAGTCTCACC	20	SpyCas9
TGFbR2095	TTCCAGAATAAAGTCATGGT	20	SpyCas9
TGFbR2096	TTTTCCTTCATAATGCACTT	20	SpyCas9
TGFBR24024	CACAGTTGTGGAAACTTGAC	20	AsCpf1
TGFBR24039	CCCAACTCCGTCTTCCGCTC	20	AsCpf1
TGFBR24040	GGCTTTCCCTGCGTCTGGAC	20	AsCpf1
TGFBR24036	CTGAGGTCTATAAGGCCAAG	20	AsCpf1
TGFBR24026	TGATGTGAGATTTTCCACCT	20	AsCpf1
TGFBR24038	CCTATGAGGAGTATGCCTCT	20	AsCpf1
TGFBR24033	AAGTGACAGGCATCAGCCTC	20	AsCpf1
TGFBR24028	CCATGACCCCAAGCTCCCCT	20	AsCpf1
TGFBR24031	CTTCATAATGCACTTTGGAG	20	AsCpf1
TGFBR24032	TTCATGTGTTCCTGTAGCTC	20	AsCpf1
TGFBR24029	TTCTGGAAGATGCTGCTTCT	20	AsCpf1
TGFBR24035	CCCACCAGGGTGTCCAGCTC	20	AsCpf1
TGFBR24037	AGACAGTGGCAGTCAAGATC	20	AsCpf1
TGFBR24041	CCTGCGTCTGGACCCTACTC	20	AsCpf1

【０１７０】

【表２５】

TGFBR24025	CACAACTGTGTAAATTTTGT	20	AsCpf1
TGFBR24030	GAGAAGCAGCATCTTCCAGA	20	AsCpf1
TGFBR24027	TGGTTGTCACAGGTGGAAAA	20	AsCpf1
TGFBR24034	CCAGGTTGAACTCAGCTTCT	20	AsCpf1
TGFBR24043	ATCACAAAATTTACACAGTTG	21	SauCas9
TGFBR24065	GGCATCAGCCTCCTGCCACCA	21	SauCas9
TGFBR24110	GTTAGCCAGGTCATCCACAGA	21	SauCas9
TGFBR24099	GCTGGGCAGCTCCCTCGCCCG	21	SauCas9
TGFBR24064	CAGGAGGCTGATGCCTGTCAC	21	SauCas9
TGFBR24094	GAGGAGCGGAAGACGGAGTTG	21	SauCas9
TGFBR24108	CGTCTGGACCCTACTCTGTCT	21	SauCas9
TGFBR24058	TTTTTCCTTCATAATGCACTT	21	SauCas9
TGFBR24075	CCATTGAGCTGGACACCCTGG	21	SauCas9
TGFBR24057	CTTCTCCAAAGTGCATTATGA	21	SauCas9
TGFBR24103	GCCCAAGATGCCCATCGTGCA	21	SauCas9
TGFBR24060	TCATGTGTTCCTGTAGCTCTG	21	SauCas9
TGFBR24048	GTGATGCTGCAGTTGCTCATG	21	SauCas9
TGFBR24087	TCTCATGCTTCAGATTGATGT	21	SauCas9
TGFBR24081	TCCCTATGAGGAGTATGCCTC	21	SauCas9
TGFBR24044	CATCACAAAATTTACACAGTT	21	SauCas9
TGFBR24077	ATTGAGCTGGACACCCTGGTG	21	SauCas9
TGFBR24080	CAGTCAAGATCTTTCCCTATG	21	SauCas9
TGFBR24046	AGGATTTCTGGTTGTCACAGG	21	SauCas9
TGFBR24101	TCCACAGTGATCACACTCCAT	21	SauCas9
TGFBR24079	AGCAGAACACTTCAGAGCAGT	21	SauCas9
TGFBR24072	CCGGCAAGACGCGGAAGCTCA	21	SauCas9
TGFBR24074	GATGTCAGAGCGGTCATCTTC	21	SauCas9
TGFBR24062	TCATTGCACTCATCAGAGCTA	21	SauCas9
TGFBR24054	CTTCCAGAATAAAGTCATGGT	21	SauCas9
TGFBR24045	AGATTTTCCACCTGTGACAAC	21	SauCas9
TGFBR24049	ACTGCAGCATCACCTCCATCT	21	SauCas9
TGFBR24098	AGCTGGGCAGCTCCCTCGCCC	21	SauCas9
TGFBR24090	TGACGGCTGAGGAGCGGAAGA	21	SauCas9
TGFBR24076	CATTGAGCTGGACACCCTGGT	21	SauCas9
TGFBR24078	AGCAAAGCGACCTTTCCCCAC	21	SauCas9
TGFBR24067	CGCGTTAACCGGCAGCAGAAG	21	SauCas9
TGFBR24063	GAAATATGACTAGCAACAAGT	21	SauCas9
TGFBR24107	AGACAGAGTAGGGTCCAGACG	21	SauCas9
TGFBR24047	CAGGATTTCTGGTTGTCACAG	21	SauCas9
TGFBR24096	CTCCTGTAGGTTGCCCTTGGC	21	SauCas9
TGFBR24105	ACAGAGTAGGGTCCAGACGCA	21	SauCas9
TGFBR24056	GCTTCTCCAAAGTGCATTATG	21	SauCas9
TGFBR24068	GCAGCAGAAGCTGAGTTCAAC	21	SauCas9
TGFBR24093	TGAGGAGCGGAAGACGGAGTT	21	SauCas9
TGFBR24055	CTTTGGAGAAGCAGCATCTTC	21	SauCas9

【０１７１】

【表２６】

TGFBR24053	CTCCCCTACCATGACTTTATT	21	SauCas9
TGFBR24106	GACAGAGTAGGGTCCAGACGC	21	SauCas9
TGFBR24092	CTGAGGAGCGGAAGACGGAGT	21	SauCas9
TGFBR24102	GGGCATCTTGGGCCTCCCACA	21	SauCas9
TGFBR24082	CCAAGAGGCATACTCCTCATA	21	SauCas9
TGFBR24051	AGAATGACGAGAACATAACAC	21	SauCas9
TGFBR24097	CCTGACGCGGCATGTCATCAG	21	SauCas9
TGFBR24073	AGCGAGCACTGTGCCATCATC	21	SauCas9
TGFBR24104	GCAGGTTAGGTCGTTCTTCAC	21	SauCas9
TGFBR24050	ACCTCCATCTGTGAGAAGCCA	21	SauCas9
TGFBR24052	TAAAGTCATGGTAGGGGAGCT	21	SauCas9
TGFBR24061	TCAGAGCTACAGGAACACATG	21	SauCas9
TGFBR24086	TCTCAGACATCAATCTGAAGC	21	SauCas9
TGFBR24066	CATCAGCCTCCTGCCACCACT	21	SauCas9
TGFBR24089	CGCTCCTCAGCCGTCAGGAAC	21	SauCas9
TGFBR24071	AACCTGGGAAACCGGCAAGAC	21	SauCas9
TGFBR24095	TCCACGCCAAGGGCAACCTAC	21	SauCas9
TGFBR24100	GAGGTGAGCAATCCCCCGGGC	21	SauCas9
TGFBR24069	CAGCAGAAGCTGAGTTCAACC	21	SauCas9
TGFBR24083	TCCAAGAGGCATACTCCTCAT	21	SauCas9
TGFBR24070	AGCAGAAGCTGAGTTCAACCT	21	SauCas9
TGFBR24088	CCAGTTCCTGACGGCTGAGGA	21	SauCas9
TGFBR24085	AGGAGTATGCCTCTTGGAAGA	21	SauCas9
TGFBR24084	TTCCAAGAGGCATACTCCTCA	21	SauCas9
TGFBR24042	CAACTGTGTAAATTTTGTGAT	21	SauCas9
TGFBR24059	TGAAGGAAAAAAAAAAGCCTG	21	SauCas9
TGFBR24091	CGTCTTCCGCTCCTCAGCCGT	21	SauCas9
TGFBR24109	CCAGGTCATCCACAGACAGAG	21	SauCas9
TGFBR2736	GCCTAGAGTGAAGAGATTCAT	21	SpyCas9
TGFBR2737	GTTCTCCAAAGTGCATTATGA	21	SpyCas9
TGFBR2738	GCATCTTCCAGAATAAAGTCA	21	SpyCas9

【０１７２】

いくつかの実施形態では、本開示で使用するためのｇＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的化するｇＲＮＡ（ＣＩＳＨ　ｇＲＮＡ）である。いくつかの実施形態では、ＣＩＳＨを標的化するｇＲＮＡは、表７に記載されるｇＲＮＡの１つ又は複数である。

【０１７３】

【表２７】

表7. CISH gRNA

名称	gRNA標的化ドメイン配列 (DNA)	長さ	酵素
CISH0873	CAACCGTCTGGTGGCCGACG	20	SpyCas9
CISH0874	CAGGATCGGGGCTGTCGCTT	20	SpyCas9
CISH0875	TCGGGCCTCGCTGGCCGTAA	20	SpyCas9
CISH0876	GAGGTAGTCGGCCATGCGCC	20	SpyCas9

【０１７４】
【表２８】

CISH0877	CAGGTGTTGTCGGGCCTCGC	20	SpyCas9
CISH0878	GGAGGTAGTCGGCCATGCGC	20	SpyCas9
CISH0879	GGCATACTCAATGCGTACAT	20	SpyCas9
CISH0880	CCGCCTTGTCATCAACCGTC	20	SpyCas9
CISH0881	AGGATCGGGGCTGTCGCTTC	20	SpyCas9
CISH0882	CCTTGTCATCAACCGTCTGG	20	SpyCas9
CISH0883	TACTCAATGCGTACATTGGT	20	SpyCas9
CISH0884	GGGTTCCATTACGGCCAGCG	20	SpyCas9
CISH0885	GGCACTGCTTCTGCGTACAA	20	SpyCas9
CISH0886	GGTTGATGACAAGGCGGCAC	20	SpyCas9
CISH0887	TGCTGGGGCCTTCCTCGAGG	20	SpyCas9
CISH0888	TTGCTGGCTGTGGAGCGGAC	20	SpyCas9
CISH0889	TTCTCCTACCTTCGGGAATC	20	SpyCas9
CISH0890	GACTGGCTTGGGCAGTTCCA	20	SpyCas9
CISH0891	CATGCAGCCCTTGCCTGCTG	20	SpyCas9
CISH0892	AGCAAAGGACGAGGTCTAGA	20	SpyCas9
CISH0893	GCCTGCTGGGGCCTTCCTCG	20	SpyCas9
CISH0894	CAGACTCACCAGATTCCCGA	20	SpyCas9
CISH0895	ACCTCGTCCTTTGCTGGCTG	20	SpyCas9
CISH0896	CTCACCAGATTCCCGAAGGT	20	SpyCas9
CISH7048	TACGCAGAAGCAGTGCCCGC	20	AsCpf1
CISH7049	AGGTGTACAGCAGTGGCTGG	20	AsCpf1
CISH7050	GGTGTACAGCAGTGGCTGGT	20	AsCpf1
CISH7051	CGGATGTGGTCAGCCTTGTG	20	AsCpf1
CISH7052	CACTGACAGCGTGAACAGGT	20	AsCpf1
CISH7053	ACTGACAGCGTGAACAGGTA	20	AsCpf1
CISH7054	GCTCACTCTCTGTCTGGGCT	20	AsCpf1
CISH7055	CTGGCTGTGGAGCGGACTGG	20	AsCpf1
CISH7056	GCTCTGACTGTACGGGGCAA	20	AsCpf1 RR
CISH7057	AGCTCTGACTGTACGGGGCA	20	AsCpf1 RR
CISH7058	ACAGTACCCCTTCCAGCTCT	20	AsCpf1 RR
CISH7059	CGTCGGCCACCAGACGGTTG	20	AsCpf1 RR
CISH7060	CCAGCCACTGCTGTACACCT	20	AsCpf1 RR
CISH7061	ACCCCGGCCCTGCCTATGCC	20	AsCpf1 RR
CISH7062	GGTATCAGCAGTGCAGGAGG	20	AsCpf1 RR
CISH7063	GATGTGGTCAGCCTTGTGCA	20	AsCpf1 RR
CISH7064	GGATGTGGTCAGCCTTGTGC	20	AsCpf1 RR
CISH7065	GGCCACGCATCCTGGCCTTT	20	AsCpf1 RR
CISH7066	GAAAGGCCAGGATGCGTGGC	20	AsCpf1 RR
CISH7067	ACTGCTTGTCCAGGCCACGC	20	AsCpf1 RR
CISH7068	TCTGGACTCCAACTGCTTGT	20	AsCpf1 RR
CISH7069	GTCTGGACTCCAACTGCTTG	20	AsCpf1 RR
CISH7070	GCTTCCGTCTGGACTCCAAC	20	AsCpf1 RR
CISH7071	GACGGAAGCTGGAGTCGGCA	20	AsCpf1 RR
CISH7072	CGCTGTCAGTGAAAACCACT	20	AsCpf1 RR

【０１７５】

【表２９】

CISH7073	CTGACAGCGTGAACAGGTAG	20	AsCpf1 RR
CISH7074	TTACGGCCAGCGAGGCCCGA	20	AsCpf1 RR
CISH7075	ATTACGGCCAGCGAGGCCCG	20	AsCpf1 RR
CISH7076	GGAATCTGGTGAGTCTGAGG	20	AsCpf1 RR
CISH7077	CCCTCAGACTCACCAGATTC	20	AsCpf1 RR
CISH7078	CGAAGGTAGGAGAAGGTCTT	20	AsCpf1 RR
CISH7079	GAAGGTAGGAGAAGGTCTTG	20	AsCpf1 RR
CISH7080	GCACCTTTGGCTCACTCTCT	20	AsCpf1 RR
CISH7081	TCGAGGAGGTGGCAGAGGGT	20	AsCpf1 RR
CISH7082	TGGAACTGCCCAAGCCAGTC	20	AsCpf1 RR
CISH7083	AGGGACGGGGCCCACAGGGG	20	AsCpf1 RR
CISH7084	GGGACGGGGCCCACAGGGGC	20	AsCpf1 RR
CISH7085	CTCCACAGCCAGCAAAGGAC	20	AsCpf1 RR
CISH7086	CAGCCAGCAAAGGACGAGGT	20	AsCpf1 RR
CISH7087	CTGCCTTCTAGACCTCGTCC	20	AsCpf1 RR
CISH7088	CCTAAGGAGGATGCGCCTAG	20	AsCpf1 RVR
CISH7089	TGGCCTCCTGCACTGCTGAT	20	AsCpf1 RVR
CISH7090	AGCAGTGCAGGAGGCCACAT	20	AsCpf1 RVR
CISH7091	CCGACTCCAGCTTCCGTCTG	20	AsCpf1 RVR
CISH7092	GGGGTTCCATTACGGCCAGC	20	AsCpf1 RVR
CISH7093	CACAGCAGATCCTCCTCTGG	20	AsCpf1 RVR
CISH7094	ATTGCCCCGTACAGTCAGAG	21	SauCas9
CISH7095	CCCGTACAGTCAGAGCTGGA	21	SauCas9
CISH7096	TGGTGGAGGAGCAGGCAGTG	21	SauCas9
CISH7097	TCCTTAGGCATAGGCAGGGC	21	SauCas9
CISH7098	CGGCCCTGCCTATGCCTAAG	21	SauCas9
CISH7099	TAGGCATAGGCAGGGCCGGG	21	SauCas9
CISH7100	AGGCAGGGCCGGGGTGGGAG	21	SauCas9
CISH7101	GCAGGATCGGGGCTGTCGCT	21	SauCas9
CISH7102	CTGCACAAGGCTGACCACAT	21	SauCas9
CISH7103	TGCACAAGGCTGACCACATC	21	SauCas9
CISH7104	CTGACCACATCCGGAAAGGC	21	SauCas9
CISH7105	GGCCACGCATCCTGGCCTTT	21	SauCas9
CISH7106	GCGTGGCCTGGACAAGCAGT	21	SauCas9
CISH7107	GACAAGCAGTTGGAGTCCAG	21	SauCas9
CISH7108	GTTGGAGTCCAGACGGAAGC	21	SauCas9
CISH7109	ATGCGTACATTGGTGGGGCC	21	SauCas9
CISH7110	TGGCCCCACCAATGTACGCA	21	SauCas9
CISH7111	GCTACCTGTTCACGCTGTCA	21	SauCas9
CISH7112	TGACAGCGTGAACAGGTAGC	21	SauCas9
CISH7113	GTCGGGCCTCGCTGGCCGTA	21	SauCas9
CISH7114	GCACTTGCCTAGGCTGGTAT	21	SauCas9
CISH7115	GGGAATCTGGTGAGTCTGAG	21	SauCas9
CISH7116	CTCACCAGATTCCCGAAGGT	21	SauCas9
CISH7117	CTCCTACCTTCGGGAATCTG	21	SauCas9

【０１７６】

【表３０】

CISH7118	CAAGACCTTCTCCTACCTTC	21	SauCas9
CISH7119	CCAAGACCTTCTCCTACCTT	21	SauCas9
CISH7120	GCCAAGACCTTCTCCTACCT	21	SauCas9
CISH7121	TATGCACAGCAGATCCTCCT	21	SauCas9
CISH7122	CAAAGGTGCTGGACCCAGAG	21	SauCas9
CISH7123	GGCTCACTCTCTGTCTGGGC	21	SauCas9
CISH7124	AGGGTACCCCAGCCCAGACA	21	SauCas9
CISH7125	AGAGGGTACCCCAGCCCAGA	21	SauCas9
CISH7126	GTACCCTCTGCCACCTCCTC	21	SauCas9
CISH7127	CCTTCCTCGAGGAGGTGGCA	21	SauCas9
CISH7128	ATGACTGGCTTGGGCAGTTC	21	SauCas9
CISH7129	GGCCCCTGTGGGCCCCGTCC	21	SauCas9
CISH7130	AGGACGAGGTCTAGAAGGCA	21	SauCas9

【０１７７】
いくつかの実施形態では、本開示で使用するためのｇＲＮＡは、Ｂ２Ｍを標的化するｇＲＮＡ（Ｂ２Ｍ　ｇＲＮＡ）である。いくつかの実施形態では、Ｂ２Ｍを標的化するｇＲＮＡは、表８に記載されるｇＲＮＡの１つ又は複数である。
【０１７８】

【表３１】

表8:B2M gRNA

gRNA名称	gRNA標的化ドメイン標的配列 (DNA)	長さ	酵素
B2M1	TATAAGTGGAGGCGTCGCGC	20	SpyCas9
B2M2	GGGCACGCGTTTAATATAAG	20	SpyCas9
B2M3	ACTCACGCTGGATAGCCTCC	20	SpyCas9
B2M4	GGCCGAGATGTCTCGCTCCG	20	SpyCas9
B2M5	CACGCGTTTAATATAAGTGG	20	SpyCas9
B2M6	AAGTGGAGGCGTCGCGCTGG	20	SpyCas9
B2M7	GAGTAGCGCGAGCACAGCTA	20	SpyCas9
B2M8	AGTGGAGGCGTCGCGCTGGC	20	SpyCas9
B2M9	GCCCGAATGCTGTCAGCTTC	20	SpyCas9
B2M10	CGCGAGCACAGCTAAGGCCA	20	SpyCas9
B2M11	CTCGCGCTACTCTCTCTTTC	20	SpyCas9
B2M12	GGCCACGGAGCGAGACATCT	20	SpyCas9
B2M13	CGTGAGTAAACCTGAATCTT	20	SpyCas9
B2M14	AGTCACATGGTTCACACGGC	20	SpyCas9
B2M15	AAGTCAACTTCAATGTCGGA	20	SpyCas9
B2M16	CAGTAAGTCAACTTCAATGT	20	SpyCas9
B2M17	ACCCAGACACATAGCAATTC	20	SpyCas9
B2M18	GCATACTCATCTTTTTCAGT	20	SpyCas9
B2M19	ACAGCCCAAGATAGTTAAGT	20	SpyCas9
B2M20	GGCATACTCATCTTTTTCAG	20	SpyCas9

【０１７９】

【表３２】

B2M21	TTCCTGAAGCTGACAGCATT	20	SpyCas9
B2M22	TCACGTCATCCAGCAGAGAA	20	SpyCas9
B2M23	CAGCCCAAGATAGTTAAGTG	20	SpyCas9
B2M-c1	AAUUCUCUCUCCAUUCUU	18	AsCpf1
B2M-c2	AAUUCUCUCUCCAUUCUUC	19	AsCpf1
B2M-c3	AAUUCUCUCUCCAUUCUUCA	20	AsCpf1
B2M-c4	AAUUCUCUCUCCAUUCUUCAG	21	AsCpf1
B2M-c5	AAUUCUCUCUCCAUUCUUCAGU	22	AsCpf1
B2M-c6	AAUUCUCUCUCCAUUCUUCAGUA	23	AsCpf1
B2M-c7	AAUUCUCUCUCCAUUCUUCAGUAA	24	AsCpf1
B2M-c8	ACUUUCCAUUCUCUGCUG	18	AsCpf1
B2M-c9	ACUUUCCAUUCUCUGCUGG	19	AsCpf1
B2M-c10	ACUUUCCAUUCUCUGCUGGA	20	AsCpf1
B2M-c11	ACUUUCCAUUCUCUGCUGGAU	21	AsCpf1
B2M-c12	ACUUUCCAUUCUCUGCUGGAUG	22	AsCpf1
B2M-c13	ACUUUCCAUUCUCUGCUGGAUGA	23	AsCpf1
B2M-c14	ACUUUCCAUUCUCUGCUGGAUGAC	24	AsCpf1
B2M-c15	AGCAAGGACUGGUCUUUC	18	AsCpf1
B2M-c16	AGCAAGGACUGGUCUUUCU	19	AsCpf1
B2M-c17	AGCAAGGACUGGUCUUUCUA	20	AsCpf1
B2M-c18	AGCAAGGACUGGUCUUUCUAU	21	AsCpf1
B2M-c19	AGCAAGGACUGGUCUUUCUAUC	22	AsCpf1
B2M-c20	AGCAAGGACUGGUCUUUCUAUCU	23	AsCpf1
B2M-c21	AGCAAGGACUGGUCUUUCUAUCUC	24	AsCpf1
B2M-c22	AGUGGGGGUGAAUUCAGU	18	AsCpf1
B2M-c23	AGUGGGGGUGAAUUCAGUG	19	AsCpf1
B2M-c24	AGUGGGGGUGAAUUCAGUGU	20	AsCpf1
B2M-c25	AGUGGGGGUGAAUUCAGUGUA	21	AsCpf1
B2M-c26	AGUGGGGGUGAAUUCAGUGUAG	22	AsCpf1
B2M-c27	AGUGGGGGUGAAUUCAGUGUAGU	23	AsCpf1
B2M-c28	AGUGGGGGUGAAUUCAGUGUAGUA	24	AsCpf1
B2M-c29	AUCCAUCCGACAUUGAAG	18	AsCpf1
B2M-c30	AUCCAUCCGACAUUGAAGU	19	AsCpf1
B2M-c31	AUCCAUCCGACAUUGAAGUU	20	AsCpf1
B2M-c32	AUCCAUCCGACAUUGAAGUUG	21	AsCpf1
B2M-c33	AUCCAUCCGACAUUGAAGUUGA	22	AsCpf1
B2M-c34	AUCCAUCCGACAUUGAAGUUGAC	23	AsCpf1
B2M-c35	AUCCAUCCGACAUUGAAGUUGACU	24	AsCpf1
B2M-c36	CAAUUCUCUCUCCAUUCU	18	AsCpf1
B2M-c37	CAAUUCUCUCUCCAUUCUU	19	AsCpf1
B2M-c38	CAAUUCUCUCUCCAUUCUUC	20	AsCpf1
B2M-c39	CAAUUCUCUCUCCAUUCUUCA	21	AsCpf1

【０１８０】

【表３３】

B2M-c40	CAAUUCUCUCUCCAUUCUUCAG	22	AsCpf1
B2M-c41	CAAUUCUCUCUCCAUUCUUCAGU	23	AsCpf1
B2M-c42	CAAUUCUCUCUCCAUUCUUCAGUA	24	AsCpf1
B2M-c43	CAGUGGGGGUGAAUUCAG	18	AsCpf1
B2M-c44	CAGUGGGGGUGAAUUCAGU	19	AsCpf1
B2M-c45	CAGUGGGGGUGAAUUCAGUG	20	AsCpf1
B2M-c46	CAGUGGGGGUGAAUUCAGUGU	21	AsCpf1
B2M-c47	CAGUGGGGGUGAAUUCAGUGUA	22	AsCpf1
B2M-c48	CAGUGGGGGUGAAUUCAGUGUAG	23	AsCpf1
B2M-c49	CAGUGGGGGUGAAUUCAGUGUAGU	24	AsCpf1
B2M-c50	CAUUCUCUGCUGGAUGAC	18	AsCpf1
B2M-c51	CAUUCUCUGCUGGAUGACG	19	AsCpf1
B2M-c52	CAUUCUCUGCUGGAUGACGU	20	AsCpf1
B2M-c53	CAUUCUCUGCUGGAUGACGUG	21	AsCpf1
B2M-c54	CAUUCUCUGCUGGAUGACGUGA	22	AsCpf1
B2M-c55	CAUUCUCUGCUGGAUGACGUGAG	23	AsCpf1
B2M-c56	CAUUCUCUGCUGGAUGACGUGAGU	24	AsCpf1
B2M-c57	CCCGAUAUUCCUCAGGUA	18	AsCpf1
B2M-c58	CCCGAUAUUCCUCAGGUAC	19	AsCpf1
B2M-c59	CCCGAUAUUCCUCAGGUACU	20	AsCpf1
B2M-c60	CCCGAUAUUCCUCAGGUACUC	21	AsCpf1
B2M-c61	CCCGAUAUUCCUCAGGUACUCC	22	AsCpf1
B2M-c62	CCCGAUAUUCCUCAGGUACUCCA	23	AsCpf1
B2M-c63	CCCGAUAUUCCUCAGGUACUCCAA	24	AsCpf1
B2M-c64	CCGAUAUUCCUCAGGUAC	18	AsCpf1
B2M-c65	CCGAUAUUCCUCAGGUACU	19	AsCpf1
B2M-c66	CCGAUAUUCCUCAGGUACUC	20	AsCpf1
B2M-c67	CCGAUAUUCCUCAGGUACUCC	21	AsCpf1
B2M-c68	CCGAUAUUCCUCAGGUACUCCA	22	AsCpf1
B2M-c69	CCGAUAUUCCUCAGGUACUCCAA	23	AsCpf1
B2M-c70	CCGAUAUUCCUCAGGUACUCCAAA	24	AsCpf1
B2M-c71	CUCACGUCAUCCAGCAGA	18	AsCpf1
B2M-c72	CUCACGUCAUCCAGCAGAG	19	AsCpf1
B2M-c73	CUCACGUCAUCCAGCAGAGA	20	AsCpf1
B2M-c74	CUCACGUCAUCCAGCAGAGAA	21	AsCpf1
B2M-c75	CUCACGUCAUCCAGCAGAGAAU	22	AsCpf1
B2M-c76	CUCACGUCAUCCAGCAGAGAAUG	23	AsCpf1
B2M-c77	CUCACGUCAUCCAGCAGAGAAUGG	24	AsCpf1
B2M-c78	CUGAAUUGCUAUGUGUCU	18	AsCpf1
B2M-c79	CUGAAUUGCUAUGUGUCUG	19	AsCpf1
B2M-c80	CUGAAUUGCUAUGUGUCUGG	20	AsCpf1
B2M-c81	CUGAAUUGCUAUGUGUCUGGG	21	AsCpf1

【０１８１】

【表３４】

B2M-c82	CUGAAUUGCUAUGUGUCUGGGU	22	AsCpf1
B2M-c83	CUGAAUUGCUAUGUGUCUGGGUU	23	AsCpf1
B2M-c84	CUGAAUUGCUAUGUGUCUGGGUUU	24	AsCpf1
B2M-c85	GAGUACCUGAGGAAUAUC	18	AsCpf1
B2M-c86	GAGUACCUGAGGAAUAUCG	19	AsCpf1
B2M-c87	GAGUACCUGAGGAAUAUCGG	20	AsCpf1
B2M-c88	GAGUACCUGAGGAAUAUCGGG	21	AsCpf1
B2M-c89	GAGUACCUGAGGAAUAUCGGGA	22	AsCpf1
B2M-c90	GAGUACCUGAGGAAUAUCGGGAA	23	AsCpf1
B2M-c91	GAGUACCUGAGGAAUAUCGGGAAA	24	AsCpf1
B2M-c92	UAUCUCUUGUACUACACU	18	AsCpf1
B2M-c93	UAUCUCUUGUACUACACUG	19	AsCpf1
B2M-c94	UAUCUCUUGUACUACACUGA	20	AsCpf1
B2M-c95	UAUCUCUUGUACUACACUGAA	21	AsCpf1
B2M-c96	UAUCUCUUGUACUACACUGAAU	22	AsCpf1
B2M-c97	UAUCUCUUGUACUACACUGAAUU	23	AsCpf1
B2M-c98	UAUCUCUUGUACUACACUGAAUUC	24	AsCpf1
B2M-c99	UCAAUUCUCUCUCCAUUC	18	AsCpf1
B2M-c100	UCAAUUCUCUCUCCAUUCU	19	AsCpf1
B2M-c101	UCAAUUCUCUCUCCAUUCUU	20	AsCpf1
B2M-c102	UCAAUUCUCUCUCCAUUCUUC	21	AsCpf1
B2M-c103	UCAAUUCUCUCUCCAUUCUUCA	22	AsCpf1
B2M-c104	UCAAUUCUCUCUCCAUUCUUCAG	23	AsCpf1
B2M-c105	UCAAUUCUCUCUCCAUUCUUCAGU	24	AsCpf1
B2M-c106	UCACAGCCCAAGAUAGUU	18	AsCpf1
B2M-c107	UCACAGCCCAAGAUAGUUA	19	AsCpf1
B2M-c108	UCACAGCCCAAGAUAGUUAA	20	AsCpf1
B2M-c109	UCACAGCCCAAGAUAGUUAAG	21	AsCpf1
B2M-c110	UCACAGCCCAAGAUAGUUAAGU	22	AsCpf1
B2M-c111	UCACAGCCCAAGAUAGUUAAGUG	23	AsCpf1
B2M-c112	UCACAGCCCAAGAUAGUUAAGUGG	24	AsCpf1
B2M-c113	UCAGUGGGGGUGAAUUCA	18	AsCpf1
B2M-c114	UCAGUGGGGGUGAAUUCAG	19	AsCpf1
B2M-c115	UCAGUGGGGGUGAAUUCAGU	20	AsCpf1
B2M-c116	UCAGUGGGGGUGAAUUCAGUG	21	AsCpf1
B2M-c117	UCAGUGGGGGUGAAUUCAGUGU	22	AsCpf1
B2M-c118	UCAGUGGGGGUGAAUUCAGUGUA	23	AsCpf1
B2M-c119	UCAGUGGGGGUGAAUUCAGUGUAG	24	AsCpf1
B2M-c120	UGGCCUGGAGGCUAUCCA	18	AsCpf1
B2M-c121	UGGCCUGGAGGCUAUCCAG	19	AsCpf1
B2M-c122	UGGCCUGGAGGCUAUCCAGC	20	AsCpf1
B2M-c123	UGGCCUGGAGGCUAUCCAGCG	21	AsCpf1

【０１８２】

【表３５】

B2M-c124	UGGCCUGGAGGCUAUCCAGCGU	22	AsCpf1
B2M-c125	UGGCCUGGAGGCUAUCCAGCGUG	23	AsCpf1
B2M-c126	UGGCCUGGAGGCUAUCCAGCGUGA	24	AsCpf1
B2M-c127	AUAGAUCGAGACAUGUAA	18	AsCpf1
B2M-c128	AUAGAUCGAGACAUGUAAG	19	AsCpf1
B2M-c129	AUAGAUCGAGACAUGUAAGC	20	AsCpf1
B2M-c130	AUAGAUCGAGACAUGUAAGCA	21	AsCpf1
B2M-c131	AUAGAUCGAGACAUGUAAGCAG	22	AsCpf1
B2M-c132	AUAGAUCGAGACAUGUAAGCAGC	23	AsCpf1
B2M-c133	AUAGAUCGAGACAUGUAAGCAGCA	24	AsCpf1
B2M-c134	CAUAGAUCGAGACAUGUA	18	AsCpf1
B2M-c135	CAUAGAUCGAGACAUGUAA	19	AsCpf1
B2M-c136	CAUAGAUCGAGACAUGUAAG	20	AsCpf1
B2M-c137	CAUAGAUCGAGACAUGUAAGC	21	AsCpf1
B2M-c138	CAUAGAUCGAGACAUGUAAGCA	22	AsCpf1
B2M-c139	CAUAGAUCGAGACAUGUAAGCAG	23	AsCpf1
B2M-c140	CAUAGAUCGAGACAUGUAAGCAGC	24	AsCpf1
B2M-c141	CUCCACUGUCUUUUUCAU	18	AsCpf1
B2M-c142	CUCCACUGUCUUUUUCAUA	19	AsCpf1
B2M-c143	CUCCACUGUCUUUUUCAUAG	20	AsCpf1
B2M-c144	CUCCACUGUCUUUUUCAUAGA	21	AsCpf1
B2M-c145	CUCCACUGUCUUUUUCAUAGAU	22	AsCpf1
B2M-c146	CUCCACUGUCUUUUUCAUAGAUC	23	AsCpf1
B2M-c147	CUCCACUGUCUUUUUCAUAGAUCG	24	AsCpf1
B2M-c148	UCAUAGAUCGAGACAUGU	18	AsCpf1
B2M-c149	UCAUAGAUCGAGACAUGUA	19	AsCpf1
B2M-c150	UCAUAGAUCGAGACAUGUAA	20	AsCpf1
B2M-c151	UCAUAGAUCGAGACAUGUAAG	21	AsCpf1
B2M-c152	UCAUAGAUCGAGACAUGUAAGC	22	AsCpf1
B2M-c153	UCAUAGAUCGAGACAUGUAAGCA	23	AsCpf1
B2M-c154	UCAUAGAUCGAGACAUGUAAGCAG	24	AsCpf1
B2M-c155	UCCACUGUCUUUUUCAUA	18	AsCpf1
B2M-c156	UCCACUGUCUUUUUCAUAG	19	AsCpf1
B2M-c157	UCCACUGUCUUUUUCAUAGA	20	AsCpf1
B2M-c158	UCCACUGUCUUUUUCAUAGAU	21	AsCpf1
B2M-c159	UCCACUGUCUUUUUCAUAGAUC	22	AsCpf1
B2M-c160	UCCACUGUCUUUUUCAUAGAUCG	23	AsCpf1
B2M-c161	UCCACUGUCUUUUUCAUAGAUCGA	24	AsCpf1
B2M-c162	UCUCCACUGUCUUUUUCA	18	AsCpf1
B2M-c163	UCUCCACUGUCUUUUUCAU	19	AsCpf1
B2M-c164	UCUCCACUGUCUUUUUCAUA	20	AsCpf1
B2M-c165	UCUCCACUGUCUUUUUCAUAG	21	AsCpf1

【０１８３】

【表３６】

B2M-c166	UCUCCACUGUCUUUUUCAUAGA	22	AsCpf1
B2M-c167	UCUCCACUGUCUUUUUCAUAGAU	23	AsCpf1
B2M-c168	UCUCCACUGUCUUUUUCAUAGAUC	24	AsCpf1
B2M-c169	UUCUCCACUGUCUUUUUC	18	AsCpf1
B2M-c170	UUCUCCACUGUCUUUUUCA	19	AsCpf1
B2M-c171	UUCUCCACUGUCUUUUUCAU	20	AsCpf1
B2M-c172	UUCUCCACUGUCUUUUUCAUA	21	AsCpf1
B2M-c173	UUCUCCACUGUCUUUUUCAUAG	22	AsCpf1
B2M-c174	UUCUCCACUGUCUUUUUCAUAGA	23	AsCpf1
B2M-c175	UUCUCCACUGUCUUUUUCAUAGAU	24	AsCpf1
B2M-c176	UUUCUCCACUGUCUUUUU	18	AsCpf1
B2M-c177	UUUCUCCACUGUCUUUUUC	19	AsCpf1
B2M-c178	UUUCUCCACUGUCUUUUUCA	20	AsCpf1
B2M-c179	UUUCUCCACUGUCUUUUUCAU	21	AsCpf1
B2M-c180	UUUCUCCACUGUCUUUUUCAUA	22	AsCpf1
B2M-c181	UUUCUCCACUGUCUUUUUCAUAG	23	AsCpf1
B2M-c182	UUUCUCCACUGUCUUUUUCAUAGA	24	AsCpf1
B2M-c183	UUUUCUCCACUGUCUUUU	18	AsCpf1
B2M-c184	UUUUCUCCACUGUCUUUUU	19	AsCpf1
B2M-c185	UUUUCUCCACUGUCUUUUUC	20	AsCpf1
B2M-c186	UUUUCUCCACUGUCUUUUUCA	21	AsCpf1
B2M-c187	UUUUCUCCACUGUCUUUUUCAU	22	AsCpf1
B2M-c188	UUUUCUCCACUGUCUUUUUCAUA	23	AsCpf1
B2M-c189	UUUUCUCCACUGUCUUUUUCAUAG	24	AsCpf1

【０１８４】
いくつかの実施形態では、本開示で使用するためのｇＲＮＡは、ＮＫＧ２Ａを標的化するｇＲＮＡ（ＮＫＧ２Ａ　ｇＲＮＡ）である。いくつかの実施形態では、ＮＫＧ２Ａを標的化するｇＲＮＡは、表９に記載されるｇＲＮＡの１つ又は複数である。
【０１８５】

【表３７】

表9:NKG2A gRNA

名称	gRNA標的化ドメイン配列 (DNA)	長さ	酵素
NKG2A55	GAGGTAAAGCGTTTGCATTTG	21	AsCpf1
NKG2A56	CCTCTAAAGCTTATGCTTACA	21	AsCpf1
NKG2A57	AGTCGATTTACTTGTAGCACT	21	AsCpf1
NKG2A58	CTTGTAGCACTGCACAGTTAA	21	AsCpf1
NKG2A59	TCCATTACAGGATAAAAGACT	21	AsCpf1
NKG2A60	CTCCATTACAGGATAAAAGAC	21	AsCpf1
NKG2A61	TCTCCATTACAGGATAAAAGA	21	AsCpf1
NKG2A62	ATCCTGTAATGGAGAAAAATC	21	AsCpf1
NKG2A63	TCCTGTAATGGAGAAAAATCC	21	AsCpf1

【０１８６】

【表３８】

NKG2A136	AAACATGAGTAAGTTGTTTTG	21	AsCpf1
NKG2A137	GCTTTCAAACATGAGTAAGTT	21	AsCpf1
NKG2A138	AAAGCCAAACCATTCATTGTC	21	AsCpf1
NKG2A139	GTAACAGCAGTCATCATCCAT	21	AsCpf1
NKG2A140	ACCATCCTCATGGATTGGTGT	21	AsCpf1
NKG2A141	TGTCCATCATTTCACCATCCT	21	AsCpf1
NKG2A142	GAAATTTCTGTCCATCATTTC	21	AsCpf1
NKG2A143	AGAAATTTCTGTCCATCATTT	21	AsCpf1
NKG2A144	TTTTAGAAATTTCTGTCCATC	21	AsCpf1
NKG2A145	CTTTTAGAAATTTCTGTCCAT	21	AsCpf1
NKG2A146	TTTTCTTTTAGAAATTTCTGT	21	AsCpf1
NKG2A147	TAAAAGAAAAGAAAGAATTTT	21	AsCpf1
NKG2A270	AAACATTTACATCTTACCATT	21	AsCpf1
NKG2A271	CATCTTACCATTTCTTCTTCA	21	AsCpf1
NKG2A272	TATAGATAATGAAGAAGAAAT	21	AsCpf1
NKG2A273	TTCTTCATTATCTATAGAAAG	21	AsCpf1
NKG2A274	CTGGCCTGTACTTCGAAGAAC	21	AsCpf1
NKG2A275	CTTACCAATGTAGTAACAACT	21	AsCpf1
NKG2A276	GCACGTCATTGTGGCCATTGT	21	AsCpf1
NKG2A277	TTTAGCACGTCATTGTGGCCA	21	AsCpf1
NKG2A414	CCATCAGCTCCAGAGAAGCTC	21	AsCpf1
NKG2A415	TCTCCCTGCAGATTTACCATC	21	AsCpf1
NKG2A437	AAATGCTTTACCTTTGCAGTG	21	AsCpf1
NKG2A438	AATGCTTTACCTTTGCAGTGA	21	AsCpf1
NKG2A439	CCTTTGCAGTGATAGGTTTTG	21	AsCpf1
NKG2A440	CAGTGATAGGTTTTGTCATTC	21	AsCpf1
NKG2A441	AAGGGAATGACAAAACCTATC	21	AsCpf1
NKG2A442	CAAGGGAATGACAAAACCTAT	21	AsCpf1
NKG2A443	GTCATTCCCTTGAAAATCCTG	21	AsCpf1
NKG2A444	TCATTCCCTTGAAAATCCTGA	21	AsCpf1
NKG2A445	TGAAGGTTTAATTCCGCATAG	21	AsCpf1
NKG2A446	GAAGGTTTAATTCCGCATAGG	21	AsCpf1
NKG2A447	AAGGTTTAATTCCGCATAGGT	21	AsCpf1
NKG2A448	ATTCCGCATAGGTTATTTCCT	21	AsCpf1
NKG2A449	GCAACTGAACAGGAAATAACC	21	AsCpf1
NKG2A450	AGCAACTGAACAGGAAATAAC	21	AsCpf1
NKG2A451	CTGTTCAGTTGCTAAAATGGA	21	AsCpf1
NKG2A452	TATTGCCTTTAGGTTTTCGTT	21	AsCpf1
NKG2A453	ATTGCCTTTAGGTTTTCGTTG	21	AsCpf1
NKG2A454	TTGCCTTTAGGTTTTCGTTGC	21	AsCpf1
NKG2A455	GGTTTTCGTTGCTGCCTCTTT	21	AsCpf1
NKG2A456	CGTTGCTGCCTCTTTGGGTTT	21	AsCpf1

【０１８７】

【表３９】

NKG2A457	GTTGCTGCCTCTTTGGGTTTG	21	AsCpf1
NKG2A458	GGTTTGGGGGCAGATTCAGGT	21	AsCpf1
NKG2A459	GGGGCAGATTCAGGTCTGAGT	21	AsCpf1

【０１８８】

いくつかの実施形態では、本開示で使用するためのｇＲＮＡは、ＰＤ１を標的化するｇＲ

ＮＡである。いくつかの実施形態では、本開示で使用するためのｇＲＮＡは、ＰＤ１を標的化するｇＲＮＡである。本開示で使用するためのＢ２Ｍ及びＰＤ１をガーネット化するｇＲＮＡは、どちらもその全体が参照により本明細書に援用される、Ｗｅｌｓｔｅａｄ ｅｔ ａｌ．による国際公開第２０１５１６１２７６号パンフレット及び国際公開第２０１７１５２０１５号パンフレット（「Ｗｅｌｓｔｅａｄ」）でさらに説明される。

【０１８９】

ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ

本開示によるＲＮＡ誘導ヌクレアーゼとしては、Ｃａｓ９及びＣｐｆ１などの天然クラス２ ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ、並びにそれに由来するか、又はそれから得られるその他のヌクレアーゼが挙げられるが、これに限定されるものではない。機能的には、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、（ａ）ｇＲＮＡと相互作し（例えば複合体形成し）；（ｂ）ｇＲＮＡと共に、（ｉ）ｇＲＮＡの標的化ドメインに相補的な配列と、任意選択的に（ｉｉ）以下でより詳細に説明される「プロトスペーサー隣接モチーフ」又は「ＰＡＭ」と称される追加的な配列とを含む、ＤＮＡの標的領域と結合し、任意選択的にそれを切断又は修飾するヌクレアーゼとして定義される。以下の実施例が例証するように、たとえ同一ＰＡＭ特異性又は切断活性を共有する個々のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ間に変動が存在し得るとしても、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、広い意味で、それらのＰＡＭ特異性及び切断活性によって定義され得る。当業者は、本開示のいくつかの態様が、特定のＰＡＭ特異性及び／又は切断活性を有する任意の適切なＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを使用して実装され得るシステム、方法、及び組成物に関することを理解するであろう。この理由から、別段の指定がない限り、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼという用語は総称として理解されるべきであり、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼのいかなる特定の型（例えば、Ｃａｓ９と対比したＣｐｆ１）、種（例えば、Ｓ．ピオゲネス（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）と対比したＳ．アウレウス（Ｓ．ａｕｒｅｕｓ））、又はバリエーション（例えば、完全長と対比した短縮型又は分割；天然ＰＡＭ特異性と対比した操作されたＰＡＭ特異性など）にも限定されない。

【０１９０】

ＰＡＭ配列は、ｇＲＮＡ標的化ドメイン（又は「スペーサー」）に相補的な「プロトスペーサー」配列とのその配列関係からその名称を取っている。プロトスペーサー配列と共に、ＰＡＭ配列は、特定のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ／ｇＲＮＡの組み合わせのための標的領域又は配列を規定する。

【０１９１】

様々なＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、ＰＡＭとプロトスペーサーの間に異なる連続関係を必要としてもよい。例えば、Ｃａｓ９ヌクレアーゼは、プロトスペーサーの３’側のＰＡＭ配列を認識しながら、

【０１９２】

他方、Ｃｐｆ１は、一般に、プロトスペーサーの５’側のＰＡＭ配列を認識する。

【０１９３】

ＰＡＭ及びプロトスペーサーの特定の配列の向きを認識することに加えて、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼはまた、特定のＰＡＭ配列を認識し得る。例えばＳ．アウレウス（Ｓ．ａｕｒｅｕｓ）Ｃａｓ９は、ＮＮＧＲＲＴ又はＮＮＧＲＲＶのＰＡＭ配列を認識し、その中ではＮ残基が、ｇＲＮＡ標的化ドメインによって認識される領域の３’に隣接する。Ｓ．ピオゲネス（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）Ｃａｓ９は、ＮＧＧ ＰＡＭ配列を認識する。そしてＦ．ノビシダ（Ｆ．ｎｏｖｉｃｉｄａ）Ｃｐｆ１は、ＴＴＮ ＰＡＭ配列を認識する。ＰＡＭ配列は様々なＲＮＡ誘導ヌクレアーゼについて同定されており、新規ＰＡＭ配列を同定するためのストラテジーは、Ｓｈｍａｋｏｖ ｅｔ ａｌ．，２０１５，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｅｌｌ ６０，３８５－３９７，Ｎｏｖｅｍｂｅｒ ５，２０１５によって記載されている。操作されたＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、参照分子のＰＡＭ特異性とは異なるＰＡＭ特異性を有し得ることにも留意すべきである（例えば、操作されたＲＮＡ誘導ヌクレアーゼの場合、参照分子はＲＮＡ誘導ヌクレアーゼがそれに由来する天然に存在する変異型であってもよく、又は操作されたＲＮＡ誘導ヌクレアーゼとの最大アミノ酸配列相同

性を有する天然に存在する変異型であってもよい）。
【０１９４】
それらのＰＡＭ特異性に加えて、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、それらのＤＮＡ切断活性によって特徴付けられ得て：天然ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、典型的には標的核酸中でＤＳＢを形成するが、ＳＳＢのみを生じ、又は全く切断しない、操作された変異型が生成されている（上で論じた）Ｒａｎ　＆　Ｈｓｕ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　１５４（６），１３８０－１３８９，Ｓｅｐｔｅｍｂｅｒ　１２，２０１３（Ｒａｎ）、参照により本明細書に援用される）。
【０１９５】
Ｃａｓ９
結晶構造は、単分子ガイドＲＮＡ及び標的ＤＮＡと複合体形成した、Ｓ．ピオゲネス（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）Ｃａｓ９（Ｊｉｎｅｋ２０１４）及びＳ．アウレウス（Ｓ．ａｕｒｅｕｓ）Ｃａｓ９について決定されている（Ｎｉｓｈｉｍａｓｕ　２０１４；Ａｎｄｅｒｓ　２０１４；及びＮｉｓｈｉｍａｓｕ　２０１５）。
【０１９６】
天然に存在するＣａｓ９タンパク質は、認識（ＲＥＣ）ローブ及びヌクレアーゼ（ＮＵＣ）ローブの２つのローブを含んでなり、そのそれぞれは特定の構造ドメイン及び／又は機能ドメインを含んでなる。ＲＥＣローブは、アルギニンに富む架橋らせん（ＢＨ）ドメイン、及び少なくとも１つのＲＥＣドメイン（例えば、ＲＥＣ１ドメイン、任意選択的にＲＥＣ２ドメイン）を含んでなる。ＲＥＣローブは、その他の既知のタンパク質と構造的類似性を共有せず、独特の機能ドメインであることが示唆される。いかなる理論による拘束も望まない一方で、変異解析は、ＢＨ及びＲＥＣドメインの特定の機能的役割を示唆し：ＢＨドメインがｇＲＮＡ：ＤＮＡ認識において役割を果たすようようである一方で、ＲＥＣドメインはｇＲＮＡのリピート：アンチリピート二重鎖と相互作用し、Ｃａｓ９／ｇＲＮＡ複合体の形成を媒介すると考えられている。
【０１９７】
ＮＵＣローブは、ＲｕｖＣドメイン、ＨＮＨドメイン、及びＰＡＭ相互作用（ＰＩ）ドメインを含んでなる。ＲｕｖＣドメインは、レトロウイルスインテグラーゼスーパーファミリーメンバーとの構造的類似性を共有し、標的核酸の非相補的（すなわち下部）鎖を切断する。それは、２つ以上の分割ＲｕｖＣモチーフ（ｓ．ピオゲネス（ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）及びｓ．アウレウス（ｓ．ａｕｒｅｕｓ）中のＲｕｖＣＩ、ＲｕｖＣＩＩ、及びＲｕｖＣＩＩＩなど）から形成されてもよい。その一方で、ＨＮＨドメインは、ＨＮＮエンドヌクレアーゼモチーフと構造的に類似しており、標的核酸の相補的（すなわち上部）鎖を切断する。その名前が示唆するように、ＰＩドメインはＰＡＭ特異性に寄与する。
【０１９８】
Ｃａｓ９の特定の機能は（それによって必ずしも完全に決定されるわけではないが）上記の特定のドメインにリンクされている一方で、これらのその及び他の機能は、その他のＣａｓ９ドメインによって、又はどちらかのローブ上の複数のドメインによって媒介又は影響されてもよい。例えば、Ｎｉｓｈｉｍａｓｕ　２０１４に記載されるように、Ｓ．ピオゲネス（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）Ｃａｓ９においては、ｇＲＮＡのリピート：アンチリピート二重鎖がＲＥＣとＮＵＣローブの間の溝に入り、二重鎖中のヌクレオチドが、ＢＨ、ＰＩ、及びＲＥＣドメイン中のアミノ酸と相互作用する。第２の及び第３のステムループ内のいくつかのヌクレオチド（ＲｕｖＣ及びＰＩドメイン）がそうであるように、第１のステムループ構造内のいくつかのヌクレオチドはまた、複数のドメイン（ＰＩ、ＢＨ、及びＲＥＣ１）内のアミノ酸と相互作用する。
【０１９９】
Ｃｐｆ１
ｃｒＲＮＡと、そしてＴＴＴＮ　ＰＡＭ配列などの二本鎖（ｄｓ）ＤＮＡ標的と複合体形成したアシダミノコッカス属（Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ）種Ｃｐｆ１の結晶構造が、Ｙａｍａｎｏ　ｅｔ　ａｌ．（Ｃｅｌｌ．２０１６　Ｍａｙ　５；１６５（４）：９

４９－９６２（Ｙａｍａｎｏ）、参照により本明細書に援用される）によって解析されている。Ｃａｓ９と同様に、Ｃｐｆ１には、ＲＥＣ（認識）ローブとＮＵＣ（ヌクレアーゼ）ローブの２つのローブがある。ＲＥＣローブはＲＥＣ１及びＲＥＣ２ドメインを含み、これらはいかなる既知のタンパク質構造とも類似性がない。その一方で、ＮＵＣローブは、３つのＲｕｖＣドメイン（ＲｕｖＣ－Ｉ、－ＩＩ、及び－ＩＩＩ）と１つのＢＨドメインとを含む。しかし、Ｃａｓ９とは対照的に、Ｃｐｆ１　ＲＥＣローブはＨＮＨドメインを欠いており、既知のタンパク質構造との類似性を欠くその他のドメイである、構造的にユニークなＰＩドメインと、３つのウェッジ（ＷＥＤ）ドメイン（ＷＥＤ－Ｉ、－ＩＩ、及び－ＩＩＩ）と、ヌクレアーゼ（Ｎｕｃ）ドメインとを含む。

【０２００】

Ｃａｓ９及びＣｐｆ１が構造及び機能において類似性を共有する一方で、特定のＣｐｆ１活性はいずれのＣａｓ９ドメインにも類似していない、構造ドメインによって媒介されることを理解すべきである。例えば、標的ＤＮＡの相補鎖の切断は、Ｃａｓ９のＨＮＨドメインとは配列的にかつ空間的に異なる、Ｎｕｃドメインによって媒介されるようである。さらに、Ｃｐｆ１　ｇＲＮＡの非標的化部分（ハンドル）は、Ｃａｓ９　ｇＲＮＡ中のリピート：アンチリピート二重鎖によって形成されるステムループ構造ではなく、むしろ偽結び目構造を取る。

【０２０１】

ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼの修飾

上述したＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、様々な用途に有用であり得る活性及び特性を有するが、当業者は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼもまた、場合によっては修飾されて、切断活性、ＰＡＭ特異性、又はその他の構造的若しくは機能的特徴が改変され得ることを認識するであろう。

【０２０２】

まず、切断活性を改変する修飾に目を向けると、ＮＵＣローブ内のドメインの活性を低減又は排除する変異が上に記載されている。ＲｕｖＣドメイン、Ｃａｓ９　ＨＮＨドメイン、又はＣｐｆ１　Ｎｕｃドメインに生成されてもよい例示的な変異は、Ｒａｎ　ａｎｄ　Ｙａｍａｎｏ、並びにＣｏｔｔａ－Ｒａｍｕｓｉｎｏに記載されている。一般に、２つのヌクレアーゼドメインの１つの活性を低減又は排除する変異は、ニッカーゼ活性を有するＲＮＡ誘導ヌクレアーゼをもたらすが、ニッカーゼ活性の種類は、いずれのドメインが不活性化されるかによって変化することに留意すべきである。一例として、ＲｕｖＣドメイン又はＣａｓ９ＨＮＨドメインの不活性化は、ニッカーゼをもたらす。

【０２０３】

天然に存在するＣａｓ９参照分子と比較したＰＡＭ特異性の修飾は、Ｋｌｅｉｎｓｔｉｖｅｒらによって、Ｓ．ピオゲネス（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）（Ｋｌｅｉｎｓｔｉｖｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ．２０１５　Ｊｕｌ　２３；５２３（７５６１）：４８１－５（Ｋｌｅｉｎｓｔｉｖｅｒ　Ｉ））、及びＳ．アウレウス（Ｓ．ａｕｒｅｕｓ）（Ｋｌｅｉｎｓｔｉｖｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１５　Ｄｅｃ；３３（１２）：１２９３－１２９８（Ｋｌｉｅｎｓｔｉｖｅｒ　ＩＩ））の双方について記載されている。Ｋｌｅｉｎｓｔｉｖｅｒらはまた、Ｃａｓ９の標的化忠実度を改善する修飾についても記載している（Ｎａｔｕｒｅ，２０１６　Ｊａｎｕａｒｙ　２８；５２９，４９０－４９５（Ｋｌｅｉｎｓｔｉｖｅｒ　ＩＩＩ））。これらの参考文献のそれぞれは、参照により本明細書に援用される。

【０２０４】

ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、Ｚｅｔｓｃｈｅ　ｅｔ　ａｌ．（Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１５Ｆｅｂ；３３（２）：１３９－４２（Ｚｅｔｓｃｈｅ　ＩＩ）、参照により援用される）、及びＦｉｎｅ　ｅｔ　ａｌ．（Ｓｃｉ　Ｒｅｐ．２０１５　Ｊｕｌ１；５：１０７７７（Ｆｉｎｅ）、参照により援用される）によって記載されるように、２つ又はそれ以上の部分に分割される。

【０２０５】

ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、特定の実施形態では、例えば、ｇＲＮＡ結合、標的及びＰＡＭ認識、並びに切断活性をなおも維持しながら、ヌクレアーゼのサイズを低下させる１つ又は複数の欠失を通じて、サイズ最適化又は短縮され得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、任意選択でリンカーによって、別のポリペプチド、ヌクレオチド、又はその他の構造に、共有結合的に又は非共有結合的に結合する。例示的な結合ヌクレアーゼ及びリンカーは、本明細書におけるあらゆる目的のために参照により援用される、Ｇｕｉｌｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ３２，５７７－５８２（２０１４）によって記載される。

【０２０６】

ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼはまた、任意選択的に、核局在化シグナルをはじめとするが、これに限定されるものではない標識を含んで、核内へのＲＮＡ誘導ヌクレアーゼタンパク質の移動を容易にする。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、Ｃ末端及び／又はＮ末端の核局在化シグナルを組み込み得る。核局在化配列は、当該技術分野で公知であり、Ｍａｅｄｅｒ及び他の箇所に記載される。

【０２０７】

前述の修飾のリストは、本質的に例示的であることを意図しており、当業者は、本開示に鑑みて、その他の修正が特定の用途において可能であり、又は望ましくあってもよいことを理解するであろう。したがって、簡潔さのために、本開示の例示的なシステム、方法、及び組成物は、特定のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを参照して提示されるが、使用されるＲＮＡ誘導ヌクレアーゼはそれらの動作原理を変えない様式で改変されてもよいものと理解されるべきである。このような改変は、本開示の範囲内である。

【０２０８】

例示的な適切なヌクレアーゼ変異型としては、Ｍ５３７Ｒ置換、Ｈ８００Ａ置換、及び／又はＦ８７０Ｌ置換、又はそれらの任意の組み合わせを含んでなる、ＡｓＣｐｆ１変異型が挙げられるが、これらに限定されるものではない（番号付けスキームはＡｓＣｐｆ１野生型配列に準拠する）。ＡｓＣｐｆ１アミノ酸配列のその他の適切な修飾は、当業者に知られている。野生型ＡｓＣｐｆ１及びＡｓＣｐｆ１変異型のいくつかの例示的な配列を以下に提供する。

【０２０９】

Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳＨ８００Ａアミノ酸配列（配列番号［ＸＸ］）

【化２】

MGHHHHHHGSTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKAR
NDHYKELKPIIDRIYKTYADQCLQLVQLDWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNA
IHDYFIGRTDNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTT
YFSGFYENRKNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSLREHFENVKKAI
GIFVSTSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDET
AHIIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALF
NELNSIDLTHIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKH
EDINLQEIISAAGKELSEAFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDSLLGL
YHLLDWFAVDESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFKLNFQMPT
LASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTEKTSEGFDKMYYDYFPDA
AKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTAYAKKT
GDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQR
IAEKEIMDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAEL
FYRPKSRMKRMAARLGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNV
ITKEVSHEIIKDRRFTSDKFFFHVPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGE
RNLIYITVIDSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLDNREKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLS
QVIHEIVDLMIHYQAVVVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEK
VGGVLNPYQLTDQFTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWKTIKNHESRKHF
LEGFDFLHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAGKR
IVPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIRS
VLQMRNSNAATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADANGAYHIALKGQLLLNHLKE
SKDLKLQNGISNQDWLAYIQELRNGSPKKKRKVGSPKKKRKV

【０２１０】

Ｃｐｆ１変異型１アミノ酸配列（配列番号［ＸＸ］）

【化３】

MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKPIIDRI
YKTYADQCLQLVQLDWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRTDNLTD
AINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENRKNVFS
AEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSLREHFENVKKAIGIFVSTSIEEVFSF
PFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETAHIIASLPHRFIPL
FKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFNELNSIDLTHIFIS
HKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEIISAAGK
ELSEAFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDSLLGLYHLLDWFAVDESNE
VDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFKLNFQRPTLASGWDVNKEKNNG
AILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTEKTSEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCSTQLKAV
TAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTAYAKKTGDQKGYREALCKWI
DFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEIMDAVETGK
LYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMKRMAHR
LGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEIIKDRR
FTSDKFLFHVPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVIDSTGK
ILEQRSLNTIQQFDYQKKLDNREKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQ
AVVVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQLTDQF
TSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWKTIKNHESRKHFLEGFDFLHYDVKTG
DFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAGKRIVPVIENHRFTGRY
RDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIRSVLQMRNSNAATGED
YINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNGISNQD
WLAYIQELRNGRSSDDEATADSQHAAPPKKKRKVGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSLEHH
HHHH

【０２１１】

Ｃｐｆ１変異型２アミノ酸配列（配列番号［ＸＸ］）
【化４】

MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKP
IIDRIYKTYADQCLQLVQLDWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRT
DNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENR
KNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSLREHFENVKKAIGIFVSTSIE
EVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETAHIIASLPH
RFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFNELNSIDLT
HIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEII
SAAGKELSEAFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDSLLGLYHLLDWFAV
DESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFKLNFQMPTLASGWDVNK
EKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTEKTSEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCST
QLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTAYAKKTGDQKGYREA
LCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEIMDA
VETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMK
RMAHRLGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEI
IKDRRFTSDKFFFHVPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVI
DSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLDNREKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDL
MIHYQAVVVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQ
LTDQFTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWKTIKNHESRKHFLEGFDFLHY
DVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAGKRIVPVIENHR
FTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIRSVLQMRNSNA
ATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNG
ISNQDWLAYIQELRNGRSSDDEATADSQHAAPPKKKRKVGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGG
SLEHHHHHH

【０２１２】
Ｃｐｆ１変異型３アミノ酸配列（配列番号１０９６）

【化５】

MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKP
IIDRIYKTYADQCLQLVQLDWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRT
DNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENR
KNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSLREHFENVKKAIGIFVSTSIE
EVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETAHIIASLPH
RFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFNELNSIDLT
HIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEII
SAAGKELSEAFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDSLLGLYHLLDWFAV
DESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFKLNFQRPTLASGWDVNK
EKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTEKTSEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCST
QLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTAYAKKTGDQKGYREA
LCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEIMDA
VETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMK
RMAARLGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEI
IKDRRFTSDKFLFHVPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVI
DSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLDNREKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDL
MIHYQAVVVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQ
LTDQFTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWKTIKNNHESRKHFLEGFDFLHY
DVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAGKRIVPVIENHR
FTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIRSVLQMRNSNA
ATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNG
ISNQDWLAYIQELRNGRSSDDEATADSQHAAPPKKKRKVGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGG
SLEHHHHHH

【０２１３】

Ｃｐｆ１変異型４アミノ酸配列（配列番号１０９７）

【化６】

MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKP
IIDRIYKTYADQCLQLVQLDWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRT
DNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENR
KNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSLREHFENVKKAIGIFVSTSIE
EVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETAHIIASLPH
RFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFNELNSIDLT
HIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEII
SAAGKELSEAFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDSLLGLYHLLDWFAV
DESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFKLNFQRPTLASGWDVNK
EKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTEKTSEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCST
QLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTAYAKKTGDQKGYREA
LCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEIMDA
VETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMK
RMAARLGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEI
IKDRRFTSDKFLFHVPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVI
DSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLDNREKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDL
MIHYQAVVVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQ
LTDQFTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWKTIKNNHESRKHFLEGFDFLHY
DVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAGKRIVPVIENHR
FTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIRSVLQMRNSNA
ATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNG
ISNQDWLAYIQELRNGRSSDDEATADSQHAAPPKKKRKV

【０２１４】
Ｃｐｆ１変異型５アミノ酸配列（配列番号１１０７）
【化７】

MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKP
IIDRIYKTYADQCLQLVQLDWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRT
DNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENR
KNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSLREHFENVKKAIGIFVSTSIE
EVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETAHIIASLPH
RFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFNELNSIDLT
HIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEII
SAAGKELSEAFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDSLLGLYHLLDWFAV
DESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFKLNFQRPTLASGWDVNK
EKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTEKTSEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCST
QLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTAYAKKTGDQKGYREA
LCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEIMDA
VETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMK
RMAHRLGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEI
IKDRRFTSDKFLFHVPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVI
DSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLDNREKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDL
MIHYQAVVVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQ
LTDQFTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWKTIKNHESRKHFLEGFDFLHY
DVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAGKRIVPVIENHR
FTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIRSVLQMRNSNA
ATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNG
ISNQDWLAYIQELRNGRSSDDEATADSQHAAPPKKKRKV

【０２１５】
Ｃｐｆ１変異型６アミノ酸配列（配列番号１１０８）

【化８】

MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKP
IIDRIYKTYADQCLQLVQLDWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRT
DNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENR
KNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSLREHFENVKKAIGIFVSTSIE
EVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETAHIIASLPH
RFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFNELNSIDLT
HIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEII
SAAGKELSEAFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDSLLGLYHLLDWFAV
DESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFKLNFQRPTLASGWDVNK
EKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTEKTSEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCST
QLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTAYAKKTGDQKGYREA
LCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEIMDA
VETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMK
RMAHRLGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEI
IKDRRFTSDKFLFHVPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVI
DSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLDNREKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDL
MIHYQAVVVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQ
LTDQFTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWKTIKNHESRKHFLEGFDFLHY
DVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAGKRIVPVIENHR
FTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIRSVLQMRNSNA
ATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNG
ISNQDWLAYIQELRNGRSSDDEATADSQHAAPPKKKRKVGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGG
SLEHHHHHH

【０２１６】

Ｃｐｆ１変異型７アミノ酸配列（配列番号［［ＸＸ］］）

【化９】

MGRDPGKPIPNPLLGLDSTAPKKKRKVGIHGVPAATQFEGFTNLYQVSKTLR
FELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKPIIDRIYKTYADQCLQLVQLDWENLSAAI
DSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRTDNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKV
LKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENRKNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKEN
CHIFTRLITAVPSLREHFENVKKAIGIFVSTSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGIS
REAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETAHIIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEE
VIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFNELNSIDLTHIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALY
ERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEIISAAGKELSEAFKQKTSEILSHAHAALDQ
PLPTTLKKQEEKEILKSQLDSLLGLYHLLDWFAVDESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFY
NKARNYATKKPYSVEKFKLNFQMPTLASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYK
ALSFEPTEKTSEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEI
TKEIYDLNNPEKEPKKFQTAYAKKTGDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRP
SSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEIMDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHT
LYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMKRMAHRLGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQ
ELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEIIKDRRFTSDKFFFHVPITLNYQAANSPS
KFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVIDSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLDNRE
KERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQAVVVLENLNFGFKSKRTGIAEKA
VYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQLTDQFTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSK
IDPLTGFVDPFVWKTIKNHESRKHFLEGFDFLHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMP
AWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAGKRIVPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDG
SNILPKLLENDDSHAIDTMVALIRSVLQMRNSNAATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEW
PMDADANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWLAYIQELRNPKKKRKVKLAAAL
EHHHHHH

【０２１７】

例示的なＡｓＣｐｆ１野生型アミノ酸配列（配列番号［［ＸＸ］］）：

【化１０】

MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKP
IIDRIYKTYADQCLQLVQLDWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRT
DNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENR
KNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSLREHFENVKKAIGIFVSTSIE
EVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETAHIIASLPH
RFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFNELNSIDLT
HIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEII
SAAGKELSEAFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDSLLGLYHLLDWFAV
DESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFKLNFQMPTLASGWDVNK
EKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTEKTSEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCST
QLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTAYAKKTGDQKGYREA
LCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEIMDA
VETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMK
RMAHRLGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEI
IKDRRFTSDKFFFHVPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVI
DSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLDNREKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDL
MIHYQAVVVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQ
LTDQFTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWKTIKNHESRKHFLEGFDFLHY
DVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAGKRIVPVIENHR
FTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIRSVLQMRNSNA
ATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNG
ISNQDWLAYIQELRN

【０２１８】
ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼをコードする核酸
例えば、Ｃａｓ９、Ｃｐｆ１又はその機能性断片などのＲＮＡ誘導ヌクレアーゼをコードする核酸が、本明細書で提供される。ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼをコードする例示的な核酸が、以前記載されている（例えば、Ｃｏｎｇ　２０１３；Ｗａｎｇ　２０１３；Ｍａｌｉ　２０１３；Ｊｉｎｅｋ　２０１２を参照されたい）。
【０２１９】
場合によっては、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼをコードする核酸は、合成核酸配列であり得る。例えば、合成核酸分子は化学修飾され得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡは、以下の特性の１つ又は複数の（例えば全て）を有するであろう：それはキャップされ得て；ポリアデニル化され得て；５－メチルシチジン及び／又はプソイドウリジンで置換され得る。
【０２２０】
合成核酸配列もまたコドン最適化され得て、例えば、少なくとも１つの一般的でないコドン又はそれほど一般的でないコドンが、一般的なコドンによって置き換えられる。例えば、合成核酸は、例えば、本明細書に記載される哺乳類発現系内での発現のために最適化された、最適化メッセンジャーｍＲＮＡの合成を誘導し得る。コドン最適化されたＣａｓ９コード配列の例は、Ｃｏｔｔａ－Ｒａｍｕｓｉｎｏに提示されている。
【０２２１】
さらに、又は代案としては、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼをコードする核酸は、核局在化配列（ＮＬＳ）を含んでなってもよい。核局在化配列は、当該技術分野で公知である。
【０２２２】
候補分子の機能解析
候補ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ、ｇＲＮＡ、及びそれらの複合体は、当該技術分野で公知の標準法によって評価され得る。例えば、Ｃｏｔｔａ－Ｒａｍｕｓｉｎｏを参照されたい。ＲＮＰ複合体の安定性は、下述される示差走査型蛍光定量法によって評価されてもよい。
【０２２３】
示差走査型蛍光定量法（ＤＳＦ）
ｇＲＮＡ及びＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを含んでなるリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体の熱安定性は、ＤＳＦによって測定され得る。ＤＳＦ技術は、例えばｇＲＮＡなどの結合ＲＮＡ分子の添加などの好ましい条件下で増加し得る、タンパク質の熱安定性を測定する。
【０２２４】
ＤＳＦアッセイは、任意の適切なプロトコルに従って実施され得て、限定されるものではないが、（ａ）異なる条件（例えば、異なる化学量論比のｇＲＮＡ：ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼタンパク質、異なる緩衝液など）を試験して、ＲＮＰ形成のための最適条件を同定すること；及び（ｂ）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及び／又はｇＲＮＡの修飾（例えば、化学修飾、配列改変など）を試験して、ＲＮＰ形成又は安定性を改善する修飾を同定することをはじめとする、任意の適切な設定で使用され得る。ＤＳＦアッセイの１つの読み取りは、ＲＮＰ複合体の融解温度の変化であり；比較的高い変化は、ＲＮＰ複合体が、より低い変化によって特徴付けられる標準ＲＮＰ複合体と比較して、より安定している（したがってより大きな活性、又はより好ましい形成動態、分解動態、又は別の機能特性を有してもよい）ことを示唆する。ＤＳＦアッセイがスクリーニングツールとして展開される場合、閾値融解温度変化が特定されてもよく、それによって、結果は、閾値以上の融解温度変化を有する１つ又は複数のＲＮＰである。例えば、閾値は、５～１０°Ｃ（例えば、５℃°、６℃、７℃、８℃、９℃、１０℃）又はそれ以上であり得て、結果は、閾値以上の融解温度変化によって特徴付けられる１つ又は複数のＲＮＰであってもよい。
【０２２５】
ＤＳＦアッセイ条件の２つの非限定的例は、下記の通りである：
ＲＮＰ複合体を形成するための最良の溶液を判定するために、水中の固定濃度（例えば２μＭ）のＣａｓ９＋１０×ＳＹＰＲＯ　Ｏｒａｎｇｅ（登録商標）（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈ

ｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号Ｓ－６６５０）を３８４ウェルプレート内に分注する。次に、様々なｐＨ及び塩を有する溶液中に希釈された、等モル量のｇＲＮＡを添加する。室温で１０分間インキュベートし、短時間遠心分離してあらゆる気泡を除去した後、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　ＣＦＸマネージャーソフトウエアと共に、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　ＣＦＸ３８４（商標）リアルタイムシステムＣ１０００　Ｔｏｕｃｈ（商標）サーマルサイクラーを使用して、２０℃から９０℃まで、１０秒毎に１℃の増分で勾配を実行する。

【０２２６】

第２のアッセイは、様々な濃度のｇＲＮＡを、上記のアッセイ１からの最適緩衝液中の固定濃度（例えば２μＭ）のＣａｓ９ｉに混合し、３８４ウェルプレート内で（例えば室温で１０分間）インキュベートすることからなる。等容積の最適緩衝液＋１０×ＳＹＰＲＯ Ｏｒａｎｇｅ（登録商標）（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号Ｓ－６６５０）を添加し、プレートをＭｉｃｒｏｓｅａｌ（登録商標）Ｂ接着剤（ＭＳＢ－１００１）で密封する。短時間遠心分離してあらゆる気泡を除去した後、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　ＣＦＸマネージャーソフトウエアと共に、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　ＣＦＸ３８４（商標）リアルタイムシステムＣ１０００　Ｔｏｕｃｈ（商標）サーマルサイクラーを使用して、２０℃から９０℃まで、１０秒毎に１℃の増分で勾配を実行する。

【０２２７】

ゲノム編集ストラテジー

上述したゲノム編集システムを使用して、本開示の様々な実施形態において、細胞内で、又は細胞から得られたＤＮＡの標的領域内で編集する（すなわち改変する）。特定の編集をするための様々なストラテジーが本明細書に記載され、これらのストラテジーは、一般に所望の修復結果、個々の編集（例えば、ＳＳＢ又はＤＳＢ）の数と位置、及びこのような編集の標的部位によって記述される。

【０２２８】

ＳＳＢ又はＤＳＢの形成を伴うゲノム編集ストラテジーは、（ａ）標的領域の全部又は一部の欠失；（ｂ）標的領域の全部又は一部内への挿入又はその置換；又は（ｃ）標的領域の全部又は一部の中断をはじめとする修復結果によって特徴付けられる。このグループ分けは、任意の特定の理論又はモデルを制限することも又はそれに拘束されることも意図されず、提示の経済性のためだけに提供される。当業者は、列挙される結果が相互に排他的でなく、いくつかの修復がその他の結果をもたらしてもよいことを理解するであろう。特定の編集ストラテジー又は方法の説明は、別段の指定がない限り、特定の修復結果を必要とすると理解されるべきではない。

【０２２９】

標的領域の置換は、例えば、ＨＤＲ経路によって媒介される２つの修復結果である、遺伝子修正又は遺伝子変換を通じた、相同配列による、標的領域内に存在する配列の全部又は一部の置換を一般に伴う。ＨＤＲは、以下でより詳細に記載されるように、一本鎖又は二本鎖であり得るドナー鋳型の使用によって促進される。一本鎖又は二本鎖鋳型は外因性であり得て、その場合、それらは遺伝子修正を促進し、又はそれらは内因性（例えば、細胞ゲノム中の相同配列）であり得て、遺伝子変換を促進する。外因性鋳型は、例えば、Ｒｉｃｈａｒｄｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　３４，３３９－３４４（２０１６）、（Ｒｉｃｈａｒｄｓｏｎ）、参照により援用される）によって記載されるように、非対称オーバーハングを有することができる（すなわち、ＤＳＢの部位に相補的な鋳型の部分は、鋳型内の中心に位置するのではなく、むしろ３’又は５’方向にオフセットされていてもよい）。鋳型が一本鎖である場合、それは標的領域の相補的（上部）又は非相補的（下部）鎖のどちらかに対応し得る。

【０２３０】

遺伝子コンストラクト

いくつかの態様では、本開示は、複雑な編集ストラテジー、及びその結果としての複雑なゲノム改変を有する改変細胞を提供し、それは例えば、免疫腫瘍学的治療アプローチなどの臨床応用のための高度なＮＫ細胞製品の生成を可能にする。

【０２３１】
いくつかの実施形態では、ゲノム改変は、１つ又は複数のＨＤＲ発現コンストラクトの使用によって導入される。いくつかの実施形態では、ゲノム改変は、１つ又は複数のＨＤＲ発現コンストラクトの使用によって導入される。いくつかの実施形態では、１つ又は複数のＨＤＲ発現コンストラクトは、１つ又は複数のドナーＨＤＲ鋳型を含んでなる。いくつかの実施形態では、１つ又は複数のドナーＨＤＲ鋳型は、１つ又は複数のｃＤＮＡをコード化する１つ又は複数の発現カセットを含んでなる。いくつかの実施形態では、ドナーＨＤＲ鋳型は、１つの発現カセットを含んでなる。いくつかの実施形態では、ドナーＨＤＲ鋳型は、２つの発現カセットを含んでなる。いくつかの実施形態では、ドナーＨＤＲ鋳型は、３つの発現カセットを含んでなる。いくつかの実施形態では、ドナーＨＤＲ鋳型は、４つの発現カセットを含んでなる。いくつかの実施形態では、ドナーＨＤＲ鋳型は、５つの発現カセットを含んでなる。いくつかの実施形態では、ドナーＨＤＲ鋳型は、６つの発現カセットを含んでなる。いくつかの実施形態では、ドナーＨＤＲ鋳型は、７つの発現カセットを含んでなる。いくつかの実施形態では、ドナーＨＤＲ鋳型は、８つの発現カセットを含んでなる。いくつかの実施形態では、ドナーＨＤＲ鋳型は、９つの発現カセットを含んでなる。いくつかの実施形態では、ドナーＨＤＲ鋳型は、１０個の発現カセットを含んでなる。いくつかの実施形態では、１つ又は複数の発現カセットは、モノシストロン性である。いくつかの実施形態では、１つ又は複数の発現カセットは、バイシストロン性である。

【０２３２】
いくつかの実施形態では、１つ又は複数の発現カセットは、１つのｃＤＮＡを含んでなる。いくつかの実施形態では、１つ又は複数の発現カセットは、２つのｃＤＮＡを含んでなる。いくつかの実施形態では、１つ又は複数の発現カセットは、３つのｃＤＮＡを含んでなる。いくつかの実施形態では、１つ又は複数の発現カセットは、４つのｃＤＮＡを含んでなる。いくつかの実施形態では、１つ又は複数の発現カセットは、５つのｃＤＮＡを含んでなる。いくつかの実施形態では、１つ又は複数の発現カセットは、６つのｃＤＮＡを含んでなる。いくつかの実施形態では、１つ又は複数の発現カセットは、７つのｃＤＮＡを含んでなる。いくつかの実施形態では、１つ又は複数の発現カセットは、８つのｃＤＮＡを含んでなる。いくつかの実施形態では、１つ又は複数の発現カセットは、９つのｃＤＮＡを含んでなる。いくつかの実施形態では、１つ又は複数の発現カセットは、１０個のｃＤＮＡを含んでなる。いくつかの実施形態では、１つ又は複数の発現カセットは、２Ａ配列によって分離された１つ又は複数のｃＤＮＡを含んでなる。いくつかの実施形態では、１つ又は複数の発現カセットは、２Ａ配列によって分離された２つのｃＤＮＡを含んでなる。いくつかの実施形態では、１つ又は複数の発現カセットは、２Ａ配列によって分離された３つのｃＤＮＡを含んでなる。

【０２３３】
いくつかの実施形態では、ＨＤＲ発現コンストラクトは、異種プロモーターによって駆動される１つ又は複数のｃＤＮＡを含んでなる。

【０２３４】
いくつかの実施形態では、１つ又は複数の発現カセットは、表１０に列挙される１つ又は複数の遺伝子の発現のためのｃＤＮＡを含んでなる。

【０２３５】
いくつかの実施形態では、ＨＤＲ発現コンストラクトは、標的遺伝子に不活化変異を挿入するための１つ又は複数のドナー鋳型を含んでなり、遺伝子産物は、より少ないか、又は皆無である機能を有する（部分的に又は完全に不活化されている）。いくつかの実施形態では、ＨＤＲ発現コンストラクトは、標的遺伝子に不活化変異を挿入するための１つ又は複数のドナー鋳型を含んでなり、遺伝子産物は、皆無の機能を有する（完全に不活化されている）。

【０２３６】
いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞は、表１０に列挙される１つ又は複数の遺伝

子のｃＤＮＡをコード化する少なくとも１つの外因性核酸コンストラクトを含んでなる。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞、表１０に列挙される１つ又は複数の遺伝子のｃＤＮＡをコード化する２つ以上の外因性核酸コンストラクトの任意の組み合わせを含んでなる。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞、表１０に列挙される１つ又は複数の遺伝子のｃＤＮＡをコード化する３つ以上の外因性核酸コンストラクトの任意の組み合わせを含んでなる。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞、表１０に列挙される１つ又は複数の遺伝子のｃＤＮＡをコード化する４つ以上の外因性核酸コンストラクトの任意の組み合わせを含んでなる。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞、表１０に列挙される１つ又は複数の遺伝子のｃＤＮＡをコード化する５つ以上の外因性核酸コンストラクトの任意の組み合わせを含んでなる。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞、表１０に列挙される１つ又は複数の遺伝子のｃＤＮＡをコード化する６つ以上の外因性核酸コンストラクトの任意の組み合わせを含んでなる。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞、表１０に列挙される１つ又は複数の遺伝子のｃＤＮＡをコード化する７つ以上の外因性核酸コンストラクトの任意の組み合わせを含んでなる。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞、表１０に列挙される１つ又は複数の遺伝子のｃＤＮＡをコード化する８つ以上の外因性核酸コンストラクトの任意の組み合わせを含んでなる。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞、表１０に列挙される１つ又は複数の遺伝子のｃＤＮＡをコード化する９つ以上の外因性核酸コンストラクトの任意の組み合わせを含んでなる。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞、表１０に列挙される１つ又は複数の遺伝子のｃＤＮＡをコード化する１０個以上の外因性核酸コンストラクトの任意の組み合わせを含んでなる。

【０２３７】

いくつかの実施形態では、本開示の改変ＮＫ細胞は、表１０に列挙される１つ又は複数の遺伝子のｃＤＮＡをコード化する少なくとも１つの外因性核酸コンストラクトを含んでなる。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞、表１０に列挙される１つ又は複数の遺伝子のｃＤＮＡをコード化する２つ以上の外因性核酸コンストラクトの任意の組み合わせを含んでなる。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞、表１０に列挙される１つ又は複数の遺伝子のｃＤＮＡをコード化する３つ以上の外因性核酸コンストラクトの任意の組み合わせを含んでなる。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞、表１０に列挙される１つ又は複数の遺伝子のｃＤＮＡをコード化する４つ以上の外因性核酸コンストラクトの任意の組み合わせを含んでなる。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞、表１０に列挙される１つ又は複数の遺伝子のｃＤＮＡをコード化する５つ以上の外因性核酸コンストラクトの任意の組み合わせを含んでなる。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞、表１０に列挙される１つ又は複数の遺伝子のｃＤＮＡをコード化する６つ以上の外因性核酸コンストラクトの任意の組み合わせを含んでなる。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞、表１０に列挙される１つ又は複数の遺伝子のｃＤＮＡをコード化する７つ以上の外因性核酸コンストラクトの任意の組み合わせを含んでなる。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞、表１０に列挙される１つ又は複数の遺伝子のｃＤＮＡをコード化する８つ以上の外因性核酸コンストラクトの任意の組み合わせを含んでなる。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞、表１０に列挙される１つ又は複数の遺伝子のｃＤＮＡをコード化する９つ以上の外因性核酸コンストラクトの任意の組み合わせを含んでなる。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞、表１０に列挙される１つ又は複数の遺伝子のｃＤＮＡをコード化する１０個以上の外因性核酸コンストラクトの任意の組み合わせを含んでなる。

【０２３８】

いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞は、表１１に列挙される少なくとも１つ又は複数の遺伝子、又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせの機能喪失を示す。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞は、表１１に列挙される少なくとも２つ以上の遺伝子の機能喪失を示す。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞は、表１１に列挙される少なくとも３つ以上の遺伝子の機能喪失を示す。いくつかの実施形態では、本開示の改変細

胞は、表１１に列挙される少なくとも４つ以上の遺伝子の機能喪失を示す。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞は、表１１に列挙される少なくとも５つ以上の遺伝子の機能喪失を示す。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞は、表１１に列挙される少なくとも６つ以上の遺伝子の機能喪失を示す。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞は、表１１に列挙される少なくとも７つ以上の遺伝子の機能喪失を示す。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞は、表１１に列挙される少なくとも８つ以上の遺伝子の機能喪失を示す。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞は、表１１に列挙される少なくとも９つ以上の遺伝子の機能喪失を示す。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞は、表１１に列挙される少なくとも１０個以上の遺伝子の機能喪失を示す。

【０２３９】

いくつかの実施形態では、本開示の改変ＮＫ細胞は、表１１に列挙される少なくとも１つ又は複数の遺伝子、又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせの機能喪失を示す。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞は、表１１に列挙される少なくとも２つ以上の遺伝子の機能喪失を示す。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞は、表１１に列挙される少なくとも３つ以上の遺伝子の機能喪失を示す。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞は、表１１に列挙される少なくとも４つ以上の遺伝子の機能喪失を示す。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞は、表１１に列挙される少なくとも５つ以上の遺伝子の機能喪失を示す。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞は、表１１に列挙される少なくとも６つ以上の遺伝子の機能喪失を示す。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞は、表１１に列挙される少なくとも７つ以上の遺伝子の機能喪失を示す。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞は、表１１に列挙される少なくとも８つ以上の遺伝子の機能喪失を示す。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞は、表１１に列挙される少なくとも９つ以上の遺伝子の機能喪失を示す。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞は、表１１に列挙される少なくとも１０個以上の遺伝子の機能喪失を示す。

【０２４０】

いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞は、表１０に列挙される１つ又は複数の遺伝子のｃＤＮＡをコード化する少なくとも１つの外因性核酸コンストラクトを含んでなり、表１１に列挙される少なくとも１つの遺伝子の機能喪失を示す。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞は、表１０に列挙される１つ又は複数の遺伝子及び表１１に列挙される少なくとも１つの遺伝子のｃＤＮＡをコード化する、２つ以上の外因性核酸コンストラクトの任意の組み合わせを含んでなる。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞は、表１０に列挙される１つ又は複数の遺伝子のｃＤＮＡをコード化する少なくとも１つの外因性核酸コンストラクトを含んでなり、表１１に列挙される２つ以上の遺伝子の機能喪失を示す。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞は、表１０に列挙される１つ又は複数の遺伝子のｃＤＮＡをコード化する２つ以上の外因性核酸コンストラクトを含んでなり、表１１に列挙される２つ以上の遺伝子の機能喪失を示す。

【０２４１】

Ｒａｎ及びＣｏｔｔａ－Ｒａｍｕｓｉｎｏに記載されるように、遺伝子変換及び遺伝子修正は、場合によっては、標的領域内又はその周囲に、１つ又は複数のニックを形成することによって促進される。場合によっては、二重ニッカーゼストラテジーを使用して、２つのオフセットＳＳＢが形成され、次に、オーバーハング（例えば５’オーバーハング）を有する単一のＤＳＢが形成される。

【０２４２】

標的配列の全部又は一部の中断及び／又は欠失は、様々な修復結果によって達成され得る。一例として、ＬＣＡ１０変異についてＭａｅｄｅｒに記載されているように、標的領域を挟む２つ以上のＤＳＢを同時に生成することによって配列を欠失させ得て、次にそれはＤＳＢが修復される際に切除される。別の例として、配列は、一本鎖オーバーハングを有する二本鎖切断の形成と、それに続く修復前のオーバーハングのヌクレオチド末端加水分解プロセシングによって生成される欠失によって、中断され得る。

【０２４３】

標的配列中断の１つの特定のサブセットは、標的配列中のインデルの形成によって媒介され、その中では修復結果は典型的にはＮＨＥＪ経路（Ａｌｔ－ＮＨＥＪをはじめとする）によって媒介される。ＮＨＥＪは、そのインデル変異との関連のために「誤りがちな」修復経路と称される。しかし、場合によっては、ＤＳＢはその周囲の配列の改変なしにＮＨＥＪによって修復され（いわゆる「完璧」又は「無瘢痕」修復）；これは一般に、ＤＳＢの両端が完全にライゲートされることを必要とする。その一方で、インデルは、それらがライゲートされる前の遊離ＤＮＡ末端の酵素的プロセシングから生じると考えられ、それは、片方又は両方の遊離末端の片方又は両方の鎖にヌクレオチドを付加し及び／又はそれから除去する。

【０２４４】

遊離ＤＳＢ末端の酵素的プロセシングは、本質的に確率論的であり得るので、インデル変異は変動する傾向があり、分布に沿って発生し、特定の標的部位、使用される細胞型、使用されるゲノム編集ストラテジーをはじめとする、様々な要因によって影響され得る。それでもなお、インデル形成について限定的に一般化することは可能であり：単一のＤＳＢの修復によって形成される欠失は、最も一般的には１～５０ｂｐの範囲であるが、１００～２００ｂｐを超えることもあり得る。単一のＤＳＢの修復によって形成された挿入はより短くなる傾向があり、しばしば切断部位を直接取り囲む配列の短い重複を含む。しかし、大きな挿入を得ることが可能であり、これらの場合、挿入配列は、しばしば、ゲノムのその他の領域に、又は細胞内に存在するプラスミドＤＮＡに由来が突き止められている。

【０２４５】

インデル変異は、そしてインデルを生成するように構成されたゲノム編集システムは、例えば、特定の最終配列の生成が必要でない場合に、及び／又はフレームシフト変異が耐容される場合に、標的配列を中断するのに有用である。それらはまた、所望の特定の配列が所与の部位におけるＳＳＢ又はＤＳＢの修復から優先的に生じる傾向がある限りにおいて、特定の配列が好ましい状況で有用であり得る。インデル変異はまた、特定のゲノム編集システム及びそれらの構成要素の活性を評価又はスクリーニングするための有用なツールでもある。これらの及びその他の設定では、インデルは、（ａ）ゲノム編集システムと接触される細胞のゲノムにおけるそれらの相対的及び絶対的頻度、及び（ｂ）例えば、未編集の配列に対する±１、±２、±３などの数値的な差の分布によって特徴付けられ得る。一例として、リード発見設定では、複数のｇＲＮＡをスクリーニングして、制御された条件下でのインデル読み取りに基づいて、標的部位での切断を最も効率的に推進するｇＲＮＡが同定され得る。閾値頻度以上のインデルを生成するガイド、又はインデルの特定の分布を生成するガイドが、さらなる研究及び開発のために選択され得る。インデルの頻度及び分布はまた、例えば、ｇＲＮＡを一定に保ち、その他の特定の反応条件又は送達方法を変化させることによって、異なるゲノム編集システムの実装又は製剤化及び送達方法を評価するための読み取りとしても有用であり得る。

【０２４６】

多重ストラテジー

上記の例示的なストラテジーは、単一のＤＳＢによって媒介される修復結果に焦点を合わせている一方で、本開示によるゲノム編集システムを使用して、同一遺伝子座又は異なる遺伝子座のどちらかで２つ以上のＤＳＢが生成されてもよい。複数のＤＳＢ、又はＳＳＢの形成を含む編集ストラテジーは、例えばＣｏｔｔａ－Ｒａｍｕｓｉｎｏに記載される。ＮＫ細胞、又はＮＫ細胞がそれから由来する細胞のゲノムにおいて複数の編集が行われるいくつかの実施形態では、編集は、同時に又は時間的に近接して行われる。いくつかのこのような実施形態では、２つ以上のゲノム編集は、２つ以上の異なるＲＮＡ誘導ヌクレアーゼによってもたらされる。例えば、ゲノム編集の１つは、（それぞれのｓａＣａｓ９ガイドＲＮＡに関連して）ｓａＣａｓ９によってもたらされてもよく、異なるゲノム編集は、（それぞれのＣｐｆ１ガイドＲＮＡに関連して）Ｃｐｆ１によってもたらされてもよい。いくつかの実施形態では、異なる多重ゲノム編集アプローチの文脈でＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを使用することは、２つ以上の編集に同じＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを使用する場合

と比較して有利であり、例えば、オフターゲット切断、及びゲノム転座の発生などの望ましくない効果の可能性又は頻度を低減できるようになる。

【０２４７】

ドナー鋳型設計

ドナー鋳型設計は、例えばＣｏｔｔａ－Ｒａｍｕｓｉｎｏなどの文献に詳細に記載される。一本鎖（ｓｓＯＤＮ）又は二本鎖（ｄｓＯＤＮ）であり得るＤＮＡオリゴマードナー鋳型（オリゴデオキシヌクレオチド又はＯＤＮ）が、ＤＳＢのＨＤＲに基づく修復を容易にするために使用され得て、それは標的ＤＮＡ配列に改変を導入し、新しい配列を標的配列に挿入し、又は標的配列を完全に置換するのに特に有用である。

【０２４８】

一本鎖であるか又は二本鎖であるかにかかわらず、ドナー鋳型は、切断される標的配列中の又はその付近の（例えば、側方の又は隣接している）ＤＮＡ領域と相同的な領域を一般に含む。これらの相同領域は、本明細書「相同性アーム」と称され、下に概略的に示される。

［５’相同性アーム］－－［置換配列］－－［３’相同性アーム］

【０２４９】

相同性アームは任意の適切な長さ（１つの相同性アームのみが使用される場合は皆無のヌクレオチドを含む）を有し得て、３’及び５’相同性アームは、同じ長さを有し得るか又は長さが異なり得る。適切な相同性アーム長の選択は、Ａｌｕ反復配列又はその他の非常に一般的な要素などの特定の配列との相同性又はミクロ相同性を回避したいという願望などの様々な要因によって影響を受け得る。例えば、５’相同性アームが短縮されて配列反復要素が回避され得る。その他の実施形態では、３’相同性アームが短縮されて配列反復要素が回避され得る。いくつかの実施形態では、５’及び３’相同性アームの双方が短縮されて、特定の配列反復要素の包含が回避され得る。さらに、いくつかの相同性アームデザインは、編集効率を改善し又は所望の修復結果の頻度を増加させ得る。例えば、参照により援用されるＲｉｃｈａｒｄｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　３４，３３９－３４４（２０１６）（Ｒｉｃｈａｒｄｓｏｎ）は、一本鎖ドナー鋳型の３’及び５’相同性アームの相対的非対称性が、修復率及び／又は結果に影響を及ぼすことを見いだした。

【０２５０】

ドナー鋳型中の置換配列は、Ｃｏｔｔａ－Ｒａｍｕｓｉｎｏらをはじめとする他の箇所に記載されている。置換配列は、任意の適切な長さ（所望の修復結果が欠失である場合は皆無のヌクレオチドを含む）であり得て、典型的には、編集が所望される細胞内の天然配列に対して１、２、３個又はそれ以上の配列修飾を含む。１つの一般的な配列修飾は、処置が所望される疾患又は病状に関連する変異を修復するための天然配列の改変を伴う。別の一般的な配列修飾は、ＳＳＢ若しくはＤＳＢを生成するために使用される、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼのＰＡＭ配列又はｇＲＮＡの標的化ドメインに、相補的であり又はそれをコードする１つ又は複数の配列を改変し、置換配列が標的部位に組み込まれた後に標的部位の反復切断を低減又は排除することを伴う。

【０２５１】

直鎖ｓｓＯＤＮが使用される場合、それは（ｉ）標的核酸のニックの入った鎖にアニールされ、（ｉｉ）無傷の標的核酸鎖にアニールされ、（ｉｉｉ）標的核酸のプラス鎖にアニールされ、及び／又は（ｉｖ）標的核酸のマイナス鎖にアニールされるように構成され得る。ｓｓＯＤＮは、例えば、約、少なくとも、若しくは１５０～２００ヌクレオチド又はそれ以下（例えば、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、又は２００ヌクレオチド）などの任意の適切な長さを有してもよい。

【０２５２】

鋳型核酸はまた、例えばウイルスゲノムなどの核酸ベクター、又は例えばプラスミドなどの環状二本鎖ＤＮＡであり得ることに留意すべきである。ドナー鋳型を含んでなる核酸ベクターは、その他のコーディング又は非コード要素を含み得る。例えば、鋳型核酸は、特

定のゲノム骨格要素（例えば、ＡＡＶゲノムの場合には逆方向末端反復）を含み、任意選択的に、ｇＲＮＡ及び／又はＲＮＡ誘導ヌクレアーゼをコードする追加の配列を含む、ウイルスゲノムの一部として（例えばＡＡＶ又はレンチウイルスゲノム中で）送達され得る。特定の実施形態では、ドナー鋳型は、１つ又は複数のｇＲＮＡによって認識される標的部位に隣接し又はそれで挟まれ、ドナー鋳型の一端又は両端における遊離ＤＳＢの形成を容易にし得て、それは、同一ｇＲＮＡを使用して細胞ＤＮＡ中に形成された、対応するＳＳＢ又はＤＳＢの修復に関与し得る。ドナー鋳型として使用するのに適した例示的な核酸ベクターは、Ｃｏｔｔａ－Ｒａｍｕｓｉｎｏに記載される。

【０２５３】

どのような形態が使用されても、鋳型核酸は、望ましくない配列を回避するように設計され得る。特定の実施形態では、片方又は両方の相同性アームが短縮され、例えば、Ａｌｕ反復、ＬＩＮＥ要素などの特定の配列反復要素との重複が回避され得る。

【０２５４】

オンターゲット遺伝子編集の定量的測定

本開示のゲノム編集システムは、標的化組み込みをはじめとするオンターゲット遺伝子編集結果の検出及び定量的測定を可能にすることに留意すべきである。本明細書に記載の組成物及び方法は、５’相同性アーム、カーゴ、１つ又は複数のプライミング部位、３’相同性アーム、及び任意選択的にスタッファー配列を含んでなる、ドナー鋳型の使用に依存し得る。例えば、その内容全体が参照により本明細書に援用されるＲａｍｕｓｉｎｏ　ｅｔａｌ．による国際公開第２０１９／０１４５６４号パンフレット（Ｒａｍｕｓｉｎｏ）は、標的化ゲノムＤＮＡ遺伝子座（すなわち、標的核酸）に存在するプライミング部位と実質的に同一である、ドナー鋳型に１つ又は複数のプライマー結合部位（すなわち、プライミング部位）を埋め込むことによる、標的化された組み込みイベントをはじめとする、オンターゲット遺伝子編集の結果の定量分析を可能にする組成物及び方法を記載する。プライミング部位は、ドナー鋳型と標的核酸の相同組換えが起こった場合に、オンターゲット編集の結果を定量的に判定するために、少なくとも１つのアンプリコンが生成され得るように、ドナー鋳型の標的化組み込みの成功が、ドナー鋳型からのプライミング部位を標的核酸に組み込むようにドナー鋳型に埋め込まれる。

【０２５５】

いくつかの実施形態では、標的核酸は、第１のプライミング部位（Ｐ１）及び第２のプライミング部位（Ｐ２）；及びカーゴ配列、第１のプライミング部位（Ｐ１’）、及び第２のプライミング部位（Ｐ２’）を含んでなるドナー鋳型を含んでなり、Ｐ２’はカーゴ配列から５’に位置し、Ｐ１’はカーゴシーケンス（すなわち、Ａ１－－Ｐ２’－Ｎ－－Ｐ１’－Ａ２）から３’に位置し、Ｐ１’はＰ１と実質的に同一であり、Ｐ２’はＰ２と実質的に同一である。正確な相同性駆動型の標的化組み込み後、２つのオリゴヌクレオチドプライマーとの単一ＰＣＲ反応を使用して、３つのアンプリコンが生成される。第１のアンプリコンであるアンプリコンＸは、ゲノムＤＮＡに元来存在するプライマー結合部位（Ｐ１及びＰ２）から生成され、配列決定され、標的化組み込み（例えば、挿入、欠失、遺伝子変換）をもたらさないオンターゲット編集イベントが分析されてもよい。残りの２つのアンプリコンは、相同性駆動型の標的化組み込み後、５’及び３’ジャンクションにマッピングされる。２番目のアンプリコンであるアンプリコンＹは、標的核酸での標的化組み込みイベントに続く、Ｐ１とＰ２’の間の核酸配列の増幅から生じ、それによって５’接合部を増幅する。第３のアンプリコンであるアンプリコンＺは、標的核酸での標的化組み込みイベントに続く、Ｐ１’とＰ２’の間の核酸配列の増幅から生じ、それによって３’接合部を増幅する。これらのアンプリコンの配列決定は、標的化組み込みの忠実度に関する情報に加えて、標的核酸での標的化組み込みの定量的評価を提供する。アンプリコンのサイズに固有のあらゆるバイアスを回避するために、任意選択でスタッファー配列をドナー鋳型に含めて、予想される３つの全てのアンプリコンが同じ長さに保持されてもよい。

【０２５６】

ゲノム編集システムの実装：送達、配合、及び投与経路

上で考察されるように、本開示のゲノム編集システムは、任意の適切な方法で実装され得て、これは、限定されるものではないが、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ、ｇＲＮＡ、任意のドナー鋳型核酸をはじめとするシステムの構成要素が、ゲノム編集システムの形質導入、発現又は導入をもたらすような、及び／又は細胞、組織又は対象において所望の修復結果を引き起こすような、任意の適切な形態又は形態の組み合わせで、送達、配合、又は投与され得ることを意味する。本開示によるゲノム編集システムは、複数のｇＲＮＡ、複数のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ、及びタンパク質などのその他の構成要素を組み込み得て、本開示のシステムに示される原理に基づいて、様々な実装形態が当業者には明らかであろう。いくつかの実施形態では、本開示のゲノム編集システムは、リボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体として細胞に送達される。いくつかの実施形態では、１つ又は複数のＲＮＰ複合体は、任意の順序で連続的に、又は同時に細胞に送達される。

【０２５７】

本開示によるゲノム編集システムの様々な要素をコードする核酸は、当技術分野で公知の方法によって又は本明細書に記載されるようにして、対象に投与され又は細胞内に送達され得る。例えば、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼをコードするＤＮＡ及び／又はｇＲＮＡをコードするＤＮＡ、並びにドナー鋳型核酸は、例えば、ベクター（例えば、ウイルスベクター又は非ウイルスベクター）、非ベクターベースの方法（例えば、裸のＤＮＡ又はＤＮＡ複合体を使用する）、又はそれらの組み合わせによって送達され得る。いくつかの実施形態では、本開示のゲノム編集システムは、ＡＡＶによって送達される。

【０２５８】

ゲノム編集システムをコードする核酸又はその構成要素は、例えば、形質移入又は電気穿孔によって裸のＤＮＡ又はＲＮＡとして細胞に直接送達され得て、あるいは標的細胞（例えば、赤血球、ＨＳＣ）による取り込みを促進する分子（例えば、Ｎ－アセチルガラクトサミン）にコンジュゲートされ得る。いくつかの実施形態では、本開示のゲノム編集システムは、電気穿孔によって細胞中に送達される。

【０２５９】

細胞療法プロセスを改善するための有望な解決策の１つは、ヒト細胞への活性タンパク質の直接送達からなる。タンパク質送達剤であるＦｅｌｄａｎ　Ｓｈｕｔｔｌｅは、細胞治療のために設計されたタンパク質ベースの送達剤である（参照によりその全体が本明細書に援用される、Ｄｅｌ’Ｇｕｉｄｉｃｅ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ．２０１８　Ａｐｒ　４；１３（４）：ｅ０１９５５５８）。いくつかの実施形態では、本開示のゲノム編集システムは、Ｆｅｌｄａｎ　Ｓｈｕｔｔｌｅによって細胞中に送達される。

【０２６０】

本開示の改変細胞は、本出願を提出する時点で当業者（ｋｉｌｌ）に知られている、任意の既知の任意の投与経路によって投与され得る。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞は静脈内投与（ＩＶ）される。いくつかの実施形態では、本開示の改変ＮＫ細胞は静脈内投与（ＩＶ）される。

【０２６１】

本明細書の用法では、「用量」は、所与の時間で対象に投与するための特定の量の薬理学的に活性な物質を指す。特に明記されない限り、記載される用量は、臨床応用のための高度なＮＫ細胞産物の生成を可能にする、複雑なゲノム改変を有するＮＫ細胞を指す。いくつかの実施形態では、改変ＮＫ細胞の用量は、有効量の改変ＮＫ細胞を指す。例えば、いくつかの実施形態では、改変ＮＫ細胞の用量又は有効量は、１用量当たり、約1×10^9～5×10^9個の改変ＮＫ細胞、又は約2×10^9～5×10^9個の改変ＮＫ細胞を指す。いくつかの実施形態では、改変ＮＫ細胞の用量又は有効量は、１用量当たり、約3×10^9～5×10^9個の改変ＮＫ細胞、又は約4×10^9～5×10^9個の改変ＮＫ細胞を指す。

【０２６２】

改変ｉＮＫ細胞の生成

本開示のいくつかの態様は、幹細胞に由来する、例えば、ＨＳＣなどの多能性細胞に由来

する、又は、例えば、ＥＳ細胞又はｉＰＳ細胞などの万能性幹細胞に由来する、遺伝子改変ＮＫ細胞の生成に関する。遺伝子改変ｉＮＫ細胞がｉＰＳ細胞に由来するいくつかの実施形態では、ｉＰＳ細胞は、体細胞ドナー細胞に由来する。遺伝子改変ｉＮＫ細胞がｉＰＳ細胞に由来するいくつかの実施形態では、ｉＰＳ細胞は、例えば、ＨＳＣなどの多能性ドナー細胞に由来する。

【０２６３】

最終的ｉＮＫ細胞に存在するゲノム編集は、ｉＰＳ細胞状態の間に、及び／又は例えば、ｉＰＳ細胞由来のＨＳＣ状態中間状態、又は最終的ｉＮＫ細胞状態まで、又は最終的ｉＮＫ細胞状態などの、ｉＰＳ細胞をｉＮＫ状態に分化させるプロセスの任意の段階などの、ドナー細胞をｉＰＳ細胞状態に再プログラム化するプロセスの任意の段階で行われ得る。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される改変ｉＮＫ細胞に存在する１つ又は複数のゲノム編集は、ドナー細胞をｉＰＳ細胞状態に再プログラム化する前に行われる。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される改変ｉＮＫ細胞に存在する全ての編集は、同時に、時間的に近接して、及び／又は、例えば、ドナー細胞段階、再プログラム化プロセス中、ｉＰＳ細胞段階、又は分化プロセス中などの再プログラム化／分化プロセスの同じ細胞段階で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される改変ｉＮＫ細胞に存在する２つ以上の編集は、再プログラム化／分化プロセスの異なる時点及び／又は異なる細胞段階で行われる。例えば、いくつかの実施形態では、編集はドナー細胞段階で行われ、異なる編集はｉＰＳ細胞段階で行われ；いくつかの実施形態では、編集は再プログラム化段階で行われ、異なる編集はｉＰＳ細胞段階で行われる。これらの例は、本明細書で提供されるストラテジーのいくつかを説明するために提供され、制限を意図するものではない。

【０２６４】

改変ｉＮＫ細胞の誘導のために本明細書で提供される再プログラム化、分化、及びゲノム編集ストラテジーに供され得るドナー細胞として、様々な細胞型が使用され得る。本明細書で提供される再プログラム化、分化、及びゲノム編集ストラテジーに供されるは、任意の適切な細胞型であり得る。例えば、ドナー細胞は、例えば、線維芽細胞又はＴリンパ球などの体細胞などの万能性幹細胞又は分化細胞であり得る。

【０２６５】

いくつかの実施形態では、ドナー細胞はヒト細胞である。いくつかの実施形態では、ドナー細胞は非ヒト霊長類細胞である。いくつかの実施形態では、ドナー細胞は哺乳類細胞である。いくつかの実施形態では、ドナー細胞は体細胞である。いくつかの実施形態では、ドナー細胞は、幹細胞又は前駆細胞である。特定の実施形態では、ドナー細胞はヒト胚の一部ではなく、その誘導はヒト胚の破壊を伴わない。

【０２６６】

いくつかの実施形態では、１つ又は複数のゲノム変化を有するｉＮＫ細胞、及びこのようなｉＮＫ細胞を誘導する方法（例えば、免疫腫瘍学的治療アプローチに望ましくない遺伝子のノックアウト、及び／又は例えば免疫腫瘍学的治療法に望ましい遺伝子産物をコード化する発現コンストラクトなどの外因性核酸のノックイン）が、本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、ｉＮＫ細胞は、体性ドナー細胞に由来するｉＰＳ細胞に由来する。任意の適切な体細胞が、ｉＰＳ細胞の生成、次にｉＮＫ細胞の生成に使用され得る。様々な体細胞ドナー細胞型からｉＰＳ細胞を誘導するための適切なストラテジーが記載されており、当該技術分野で公知である。いくつかの実施形態では、体細胞ドナー細胞は線維芽細胞である。いくつかの実施形態では、体細胞ドナー細胞はＴ細胞である。

【０２６７】

例えば、いくつかの実施形態では、ｉＰＳ細胞、及び引き続いてｉＮＫ細胞が由来する体細胞ドナー細胞は、発達的に成熟したＴ細胞（胸腺選択を受けたＴ細胞）である。発達的に成熟したＴ細胞の特徴の１つは、再配列されたＴ細胞受容体遺伝子座である。Ｔ細胞の成熟中にＴＣＲ遺伝子座はＶ（Ｄ）Ｊ再配列を被り、完全なＶドメインエクソンを生成する。これらの再配列は、Ｔ細胞の誘導万能性幹（ｉＰＳ）細胞への再プログラム化全体を

通じて、及び得られたｉＰＳ細胞の体細胞への分化全体を通じて保持される。

【０２６８】

特定の実施形態では、体細胞ドナー細胞は、ＣＤ８＋Ｔ細胞、ＣＤ８＋ナイーブＴ細胞、ＣＤ４＋中央記憶Ｔ細胞、ＣＤ８＋中央記憶Ｔ細胞、ＣＤ４＋エフェクター記憶Ｔ細胞、ＣＤ４＋エフェクター記憶Ｔ細胞、ＣＤ４＋Ｔ細胞、ＣＤ４＋幹細胞記憶Ｔ細胞、ＣＤ８＋幹細胞記憶Ｔ細胞、ＣＤ４＋ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、細胞傷害性Ｔ細胞、ナチュラルキラーＴ細胞、ＣＤ４＋ナイーブＴ細胞、ＴＨ１７ＣＤ４＋Ｔ細胞、ＴＨ１ＣＤ４＋Ｔ細胞、ＴＨ２ＣＤ４＋Ｔ細胞、ＴＨ９ＣＤ４＋Ｔ細胞、ＣＤ４＋Ｆｏｘｐ３＋Ｔ細胞、ＣＤ４＋ＣＤ２５＋ＣＤ１２７－Ｔ細胞、又はＣＤ４＋ＣＤ２５＋ＣＤ１２７－Ｆｏｘｐ３＋Ｔ細胞である。

【０２６９】

ｉＰＳ細胞の生成にＴ細胞を使用することの１つの利点は、例えば、ＣＲＩＳＰＲベースの方法又はその他の遺伝子編集方法によって、Ｔ細胞が比較的容易に編集され得ることである。ｉＰＳ細胞の生成にＴ細胞を使用することのもう１つの利点は、再配列されたＴＣＲ遺伝子座が、個々の細胞及びその娘細胞の遺伝的追跡を可能にすることである。ＮＫ細胞の生成に関与する再プログラム化、増殖、培養、及び／又は分化ストラテジーが単一細胞のクローン増殖である場合、再配列されたＴＣＲ遺伝子座は、細胞及びその娘細胞を明確に識別する遺伝子マーカーとして使用され得る。これにより、細胞集団を真性クローンとしての特徴付け、又は混合集団の同定、又はクローン集団内の混入細胞の同定が可能になる。

【０２７０】

複数の編集を有するｉＮＫ細胞を生成するのに、Ｔ細胞を使用する第３の利点は、染色体転座に関連する特定の核型異常が、Ｔ細胞培養に対して選択されることである。このような異常は、ＣＲＩＳＰＲ技術によって細胞を編集する場合、特に複数の編集を有する細胞を生成する場合に、懸念を引き起す。

【０２７１】

治療用リンパ球を誘導するための出発点として、Ｔ細胞由来のｉＰＳ細胞を使用することの第４の利点は、例えば、腫瘍抗原などの特異的抗原に対する結合活性についてＴ細胞を選択するステップと、選択されたＴ細胞をｉＰＳ細胞に再プログラミングするステップと、次にＴＣＲを発現するこれらのｉＰＳ細胞（例えば、Ｔ細胞）からリンパ球を誘導するステップとを介して、リンパ球中で予備スクリーニングされたＴＣＲの発現を可能にすることである。このストラテジーはまた、例えば、遺伝的な又はエピジェネティックなストラテジーによって、その他の細胞型においてＴＣＲを活性化することを可能にするであろう。

【０２７２】

Ｔ細胞由来のｉＰＳ細胞をｉＮＫ分化の出発点として使用することの第５の利点は、Ｔ細胞が、再プログラム化プロセス全体を通じて「エピジェネティックな記憶」の少なくとも一部が保持され、したがってｉＮＫ誘導の出発点として線維芽細胞などの無関係な細胞を使用するアプローチと比較して、ｉＮＫ細胞などの同じ又は密接に関連した細胞型の引き続く分化が、より効率的になり、及び／又はより高品質の細胞集団がもたらされることである。

【０２７３】

特定の実施形態では、操作されているドナー細胞、例えば、再プログラム化された細胞及び／又はそのゲノムが編集されている細胞は、長期造血幹細胞、短期造血幹細胞、多能性前駆細胞、系統制限前駆細胞、リンパ系前駆細胞、骨髄系前駆細胞、共通骨髄系前駆細胞、赤血球前駆細胞、巨核球赤血球前駆細胞、網膜細胞、光受容体細胞、棒細胞、円錐細胞、網膜色素上皮細胞、小柱網細胞、蝸牛毛細胞、外有毛細胞、内有毛細胞、肺上皮細胞、気管支上皮細胞、肺胞上皮細胞、肺上皮前駆細胞、横紋筋細胞、心筋細胞、筋肉衛星細胞、神経細胞、神経細胞幹細胞、間葉系幹細胞、誘導万能性幹（ｉＰＳ）細胞、胚性幹細胞、線維芽細胞、単球由来マクロファージ又は樹状細胞、巨核球、好中球、好酸球、好塩基

球、肥満細胞、網状赤血球、Ｂ細胞（例えば、前駆細胞Ｂ細胞、プレＢ細胞、プロＢ細胞、記憶Ｂ細胞、血漿Ｂ細胞など）、胃腸上皮細胞、胆管上皮細胞、膵管上皮細胞、腸管幹細胞、肝実質細胞、肝臓星細胞、クッパー細胞、骨芽細胞、破骨細胞、脂肪細胞、前脂肪細胞、膵島細胞（例えば、β細胞、α細胞、δ細胞）、膵臓外分泌細胞、シュワン細胞、又は乏突起膠細胞である。

【０２７４】

特定の実施形態では、ドナー細胞は、例えば、細網細胞、巨核球赤血球前駆細胞（ＭＥＰ）細胞、骨髄系前駆細胞（ＣＭＰ／ＧＭＰ）、リンパ系前駆細胞（ＬＰ）細胞、造血幹／前駆細胞（ＨＳＣ）、又は内皮細胞（ＥＣ）などの循環血液細胞である。特定の実施形態では、ドナー細胞は、骨髄細胞（例えば、細網細胞、赤血球細胞（例えば、赤芽球）、ＭＥＰ細胞、骨髄系前駆細胞（ＣＭＰ／ＧＭＰ）、ＬＰ細胞、赤芽球前駆細胞（ＥＰ）、ＨＳＣ、多能性前駆細胞（ＭＰＰ）細胞、内皮細胞（ＥＣ）、造血性内皮（ＨＥ）細胞、又は間葉系幹細胞）である。特定の実施形態では、ドナー細胞は、骨髄系前駆細胞（例えば、共通骨髄系前駆細胞（ＣＭＰ）細胞又は顆粒球マクロファージ前駆細胞（ＧＭＰ）細胞）である。特定の実施形態では、ドナー細胞は、例えば、共通リンパ系前駆細胞（ＣＬＰ）などのリンパ系前駆細胞である。特定の実施形態では、ドナー細胞は、赤血球前駆細胞（例えば、ＭＥＰ細胞）である。特定の実施形態では、ドナー細胞は、造血幹／前駆細胞（例えば、長期ＨＳＣ（ＬＴ－ＨＳＣ）、短期ＨＳＣ（ＳＴ－ＨＳＣ）、ＭＰＰ細胞、又は系統制限前駆細胞（ＬＲＰ）細胞）である。特定の実施形態では、ドナー細胞は、ＣＤ３４$^{+}$細胞、ＣＤ３４$^{+}$ＣＤ９０$^{+}$細胞、ＣＤ３４$^{+}$ＣＤ３８$^{-}$細胞、ＣＤ３４$^{+}$ＣＤ９０$^{+}$ＣＤ４９ｆ$^{+}$ＣＤ３８$^{-}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$細胞、ＣＤ１０５$^{+}$細胞、ＣＤ３１$^{+}$、又はＣＤ１３３$^{+}$細胞、又はＣＤ３４$^{+}$ＣＤ９０$^{+}$ＣＤ１３３$^{+}$細胞である。特定の実施形態では、ドナー細胞は、臍帯血ＣＤ３４$^{+}$ＨＳＰＣ、臍帯静脈内皮細胞、臍帯動脈内皮細胞、羊水ＣＤ３４$^{+}$細胞、羊水内皮細胞、胎盤内皮細胞、又は胎盤造血ＣＤ３４$^{+}$細胞である。特定の実施形態では、ドナー細胞は、動員された末梢血造血ＣＤ３４$^{+}$細胞である（患者が例えば、Ｇ－ＣＳＦ又はプレリキサフォルなどの動員剤で治療された後）。特定の実施形態では、ドナー細胞は末梢血内皮細胞である。

【０２７５】

いくつかの実施形態では、ドナー細胞は分裂している細胞である。その他の実施形態では、ドナー細胞は非分裂細胞である。

【０２７６】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される再プログラム化、分化、及び編集の方法及びストラテジーから生じる改変ｉＮＫ細胞は、例えば、免疫腫瘍学的治療アプローチの文脈において、それを必要とする対象に投与される。いくつかの実施形態では、ドナー細胞、又は本明細書で提供される再プログラム化、分化、及び編集ストラテジーの任意の段階の任意の細胞は、例えば、特性評価又はそれを必要とする対象への投与のために、培養中で維持されるか、又は当該技術分野で公知の任意の適切な方法を使用して保存され得る（例えば、液体窒素中の凍結）。

【０２７７】

細胞再プログラム化

細胞分化能が増加した細胞は、再プログラム化されていない状態の同じ細胞と比較して、より多くの発達可塑性を有する（すなわち、より多くの細胞型に分化し得る）。換言すれば、再プログラム化された細胞は、再プログラム化されていない状態の同じ細胞よりも分化度の低い状態にある。

【０２７８】

本開示の細胞の再プログラム化は、いくつかの方法を利用することによって実施され得る。本開示の体細胞を再プログラム化するためのいくつかの方法の例は、それらの内容全体が参照により本明細書に援用されるがこれに限定されない、Ｖａｌａｍｅｈｒ　ｅｔ　ａｌ．の国際公開第２０１７／０７８８０７号パンフレット（「Ｖａｌａｍｅｈｒ」）及びＭｅｎｄｌｅｉｎ　ｅｔ　ａｌ．の国際公開第２０１０／１０８１２６号パンフレット（

「Ｍｅｎｄｌｅｉｎ」）に記載される。

【０２７９】

簡潔に述べると、万能性幹細胞を決定的な造血系細胞への分化に方向づけるための方法は、（ｉ）万性幹細胞と、ＢＭＰ活性化剤、及び任意選択的にｂＦＧＦを含んでなる組成物とを接触させて、万能性幹細胞からの中胚葉細胞の分化及び増殖を開始するステップと；（ｉｉ）中胚葉細胞と、ＢＭＰ活性化剤、ｂＦＧＦ、及びＧＳＫ３阻害剤を含んでなる組成物（組成物は、任意選択的にＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない）とを接触させて、中胚葉細胞から、決定的なＨＥ分化能を有する中胚葉細胞の分化及び増殖を開始するステップと；（ｉｉｉ）決定的なＨＥ分化能を有する中胚葉細胞と、ＲＯＣＫ阻害剤；ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＧＦ、ＥＰＯ、ＩＬ６、及びＩＬ１１からなる群から選択される１つ又は複数の増殖因子及びサイトカイン；及び任意選択的にＷｎｔ経路活性化剤を含んでなる組成物（組成物は、任意選択的にＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない）とを接触させて、決定的な造血性内皮細胞の分化能を有する万能性幹細胞由来の中胚葉細胞からの決定的な造血性内皮の分化及び増殖を開始するステップと；任意選択的に、万能性幹細胞、万能性幹細胞由来の中胚葉細胞、造血性内皮を有する中胚葉細胞、及び／又は決定的な造血性内皮細胞を約２％～約１０％の間の低酸素分圧に曝すステップとを含んでなってもよい。

【０２８０】

万能性幹細胞の造血系の細胞への分化を誘導するための方法のいくつかの実施形態では、方法は、万能性幹細胞と、ＭＥＫ阻害剤、ＧＳＫ３阻害剤、及びＲＯＣＫ阻害剤を含んでなる組成物（組成物は、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない）とを接触させて、万能性幹細胞を播種及び増殖させるステップをさらに含んでなる。いくつかの実施形態では、万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、ｉＰＳＣはナイーブｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、ｉＰＳＣは、１つ又は複数の遺伝子刷り込みを含んでなり、ｉＰＳＣに含まれる１つ又は複数の遺伝子刷り込みは、それから分化した万能性幹細胞由来の造血細胞中に保持される。

【０２８１】

万能性幹細胞を造血系細胞への分化に方向づけるための方法のいくつかの実施形態では、万能性幹細胞の造血系の細胞への分化は、胚様体の生成を欠き（ｖｏｉｄ　ｏｆ）、単層培養形態にある。

【０２８２】

上記方法のいくつかの実施形態では、得られた万能性幹細胞由来の決定的な血行性内皮細胞は、ＣＤ３４＋である。いくつかの実施形態では、得られた決定的な造血性内皮細胞は、ＣＤ３４＋ＣＤ４３－である。いくつかの実施形態では、決定的な造血性内皮細胞は、ＣＤ３４＋ＣＤ４３－ＣＸＣＲ４－ＣＤ７３－である。いくつかの実施形態では、決定的な造血性内皮細胞は、ＣＤ３４＋ＣＸＣＲ４－ＣＤ７３－である。いくつかの実施形態では、決定的な造血性内皮細胞は、ＣＤ３４＋ＣＤ４３－ＣＤ９３－である。いくつかの実施形態では、決定的な造血性内皮細胞は、ＣＤ３４＋ＣＤ９３－である。

【０２８３】

上記方法のいくつかの実施形態では、方法は、（ｉ）万能性幹細胞由来の決定的な造血性内皮と、ＲＯＣＫ阻害剤；ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、及びＩＬ７からなる群から選択される１つ又は複数の増殖因子及びサイトカイン；任意選択的に、ＢＭＰ活性化剤を含んでなる組成物とを接触させて、決定的な造血性内皮のプレＴ細胞前駆細胞への分化を開始するステップと；任意選択的に、（ｉｉ）プレＴ細胞前駆細胞と、１つ又は複数のＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、及びＩＬ７からなる群から選択される増殖因子及びサイトカインを含んでなるが、１つ又は複数ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＴＰＯ、ＢＭＰ活性化剤、及びＲＯＣＫ阻害剤を含まない組成物とを接触させて、プレＴ細胞前駆細胞からＴ細胞前駆細胞又はＴ細胞への分化を開始するステップとをさらに含んでなる。方法のいくつかの実施形態では、万能性幹細胞由来のＴ細胞前駆細胞は、ＣＤ３４＋ＣＤ４５＋ＣＤ７＋である。方法のいくつかの実施形態では、万能性幹細胞由来のＴ細胞前駆細胞は、ＣＤ

４５＋ＣＤ７＋である。

【０２８４】

万能性幹細胞を造血系細胞への分化に方向づけるための上記の方法のさらにいくつかの実施形態では、方法は、（ｉ）万能性幹細胞由来の決定的な造血性内皮と、ＲＯＣＫ阻害剤；ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＩＬ７、及びＩＬ１５からなる群から選択される１又は複数の増殖因子及びサイトカイン；任意選択的に、ＢＭＰ活性化剤を含んでなる組成物とを接触させて、決定的な造血性内皮のプレＮＫ細胞前駆細胞への分化を開始するステップと；任意選択的に、（ｉｉ）万能性幹細胞由来のプレＮＫ細胞前駆細胞と、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＩＬ３、ＩＬ７、及びＩＬ１５からなる群から選択される１つ又は複数の増殖因子及びサイトカインを含んでなる組成物とを接触させるステップとをさらに含んでなり、培地は、１つ又は複数のＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＴＰＯ、ＢＭＰ活性化剤、及びＲＯＣＫ阻害剤を含まず、プレＮＫ細胞前駆細胞のＮＫ細胞前駆細胞又はＮＫ細胞への分化を開始する。いくつかの実施形態では、万能性幹細胞由来のＮＫ前駆細胞は、ＣＤ３－ＣＤ４５＋ＣＤ５６＋ＣＤ７＋である。いくつかの実施形態では、万能性幹細胞由来のＮＫ細胞はＣＤ３－ＣＤ４５＋ＣＤ５６＋であり、任意選択的に、ＮＫｐ４６＋、ＣＤ５７＋、及びＣＤ１６＋よってさらに定義される。

【０２８５】

万能性幹細胞をＮＫ細胞への分化に方向づけるための上記の方法のさらにいくつかの実施形態では、方法は、万能性幹細胞中で遺伝子Ｎｒｇ１をノックアウトすることをさらに含んでなる。

【０２８６】

いくつかの実施形態では、本開示は、（ｉ）万性幹細胞と、ＢＭＰ活性化剤、及び任意選択的にｂＦＧＦを含んでなる組成物とを接触させて、万能性幹細胞からの中胚葉細胞の分化及び増殖を開始するステップと；（ｉｉ）中胚葉細胞と、ＢＭＰ活性化剤、ｂＦＧＦ、及びＧＳＫ３阻害剤を含んでなるが、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない組成物とを接触させて、中胚葉細胞から、決定的なＨＥ分化能を有する中胚葉細胞の分化及び増殖を開始するステップと；（ｉｉｉ）決定的なＨＥ分化能を有する中胚葉細胞と、ＲＯＣＫ阻害剤；ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＧＦ、ＥＰＯ、ＩＬ６、及びＩＬ１１からなる群から選択される１つ又は複数の増殖因子及びサイトカイン；任意選択的にＷｎｔ経路活性化剤を含んでなる組成物（組成物は、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない）とを接触させて、決定的なＨＥ分化能を有する中胚葉細胞からの決定的な造血性内皮の分化及び増殖を開始するステップと；（ｉｖ）ＲＯＣＫ阻害剤；ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、及びＩＬ７からなる群から選択される１つ又は複数の増殖因子及びサイトカイン；及び任意選択的にＢＭＰ活性化剤を含んでなる決定的な造血性内皮と組成物とを接触させて、決定的な造血内皮のプレＴ細胞前駆細胞への分化を開始するステップと；（ｖ）プレＴ細胞前駆細胞と、１つ又は複数のＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、及びＩＬ７からなる群から選択される増殖因子及びサイトカインを含んでなる組成物（組成物は、１つ又は複数ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＴＰＯ、ＢＭＰ活性化剤、及びＲＯＣＫ阻害剤を含まない）とを接触させて、プレＴ細胞前駆細胞からＴ細胞前駆細胞又はＴ細胞への分化を開始するステップと；任意選択的に、播種された万能性幹細胞、中胚葉細胞、決定的なＨＥ分化能を有する中胚葉細胞、及び／又は決定的な造血性内皮を約２％～約１０％の間の低酸素分圧に曝すステップとを含んでなる、万能性幹細胞由来のＴ系統細胞を生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、上記方法のグループＩＩは、ｉＰＳＣと、ＭＥＫ阻害剤、ＧＳＫ３阻害剤、及びＲＯＣＫ阻害剤を含んでなるが、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない組成物とを接触させて、万能性幹細胞を播種し増殖させるステップをさらに含んでなり、及び／又はここで万能性幹細胞。いくつかの実施形態では、万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、ｉＰＳＣはナイーブｉＰＳＣである。方法のいくつかの実施形態では、万能性幹細胞のＴ細胞系統への分化は、胚様体の生成を欠いており、単層培養形態にある。

【０２８７】

いくつかの実施形態では、本開示は、（ｉ）万性幹細胞と、ＢＭＰ活性化剤、及び任意選択的にｂＦＧＦを含んでなる組成物とを接触させて、万能性幹細胞からの中胚葉細胞の分化及び増殖を開始するステップと；（ｉｉ）中胚葉細胞と、ＢＭＰ活性化剤、ｂＦＧＦ、及びＧＳＫ３阻害剤を含んでなり、任意選択的にＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない組成物とを接触させて、中胚葉細胞から、決定的なＨＥ分化能を有する中胚葉細胞の分化及び増殖を開始するステップと；（ｉｉｉ）決定的なＨＥ分化能を有する中胚葉細胞と、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＧＦ、ＥＰＯ、ＩＬ６、及びＩＬ１１からなる群から選択される１つ又は複数の増殖因子及びサイトカイン；ＲＯＣＫ阻害剤；任意選択的にＷｎｔ経路活性化剤を含んでなり；任意選択的にＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない組成物とを接触させるステップと、決定的なＨＥ分化能を有する万能性幹細胞由来の中胚葉細胞からの万能性幹細胞由来の決定的な造血性内皮の分化及び増殖を開始するステップと；（ｉｖ）万能性幹細胞由来の決定的な造血性内皮と、ＲＯＣＫ阻害剤；ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＩＬ７、及びＩＬ１５からなる群から選択される１又は複数の増殖因子及びサイトカイン；任意選択的に、ＢＭＰ活性化剤を含んでなる組成物とを接触させて、万能性幹細胞由来の決定的な造血性内皮のプレＮＫ細胞前駆細胞への分化を開始するステップと；（ｖ）万能性幹細胞由来のプレＮＫ細胞前駆細胞と、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＩＬ３、ＩＬ７、及びＩＬ１５からなる群から選択される１つ又は複数の増殖因子及びサイトカインを含んでなるが、１つ又は複数のＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＴＰＯ、ＢＭＰ活性化剤及びＲＯＣＫ阻害剤を含まない組成物とを接触させて、万能性幹細胞由来のプレＮＫ細胞前駆細胞から万能性幹細胞由来のＮＫ細胞前駆細胞又はＮＫ細胞への分化を開始するステップと；任意選択的に、播種された万能性幹細胞、万能性幹細胞由来の中胚葉細胞、及び／又は決定的な造血性内皮を約２％～約１０％の低酸素分圧に曝すステップとを含んでなる、万能性幹細胞由来のＮＫ系統細胞を生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、グループＩＩの万能性幹細胞由来ＮＫ系統細胞を生成するための方法は、ｉＰＳＣと、ＭＥＫ阻害剤、ＧＳＫ３阻害剤、及びＲＯＣＫ阻害剤を含んでなるが、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない組成物とを接触させ、ｉＰＳ細胞を播種して増殖させるステップをさらに含んでなる。いくつかの実施形態では、ｉＰＳＣはナイーブｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、万能性幹細胞由来のＮＫ系統細胞を生成するための方法は、胚様体の生成を欠いており、単層培養形態にある。

【０２８８】

方法いくつかの実施形態では、本開示は、（ｉ）ｉＰＳ細胞と、ＢＭＰ活性化剤、及び任意選択的にｂＦＧＦを含んでなる組成物とを接触させて、万能性幹細胞からの万能性幹細胞由来の中胚葉細胞の分化及び増殖を開始するステップと；（ｉｉ）万能性幹細胞由来の中胚葉細胞と、ＢＭＰ活性化剤、ｂＦＧＦ、及びＧＳＫ３阻害剤を含んでなり、任意選択的にＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない組成物とを接触させて、万能性幹細胞由来の中胚葉細胞からの決定的なＨＥ分化能を有する万能性幹細胞由来の中胚葉細胞の分化及び増殖を開始するステップと；（ｉｉｉ）決定的なＨＥ分化能を有する万能性幹細胞由来の中胚葉細胞と、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＧＦ、ＥＰＯ、ＩＬ６、及びＩＬ１１からなる群から選択される１つ又は複数の増殖因子及びサイトカイン；ＲＯＣＫ阻害剤；任意選択的にＷｎｔ経路活性化剤を含んでなり；任意選択的にＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない組成物とを接触させるステップと、決定的なＨＥ分化能を有する万能性幹細胞由来の中胚葉細胞からの万能性幹細胞由来の決定的な造血性内皮の分化及び増殖を開始するステップと；任意選択的に、播種された万能性幹細胞、万能性幹細胞由来の中胚葉細胞、及び／又は決定的な造血性内皮を約２％～約１０％の低酸素分圧に曝すステップとを含んでなる万能性幹細胞由来の決定的な造血性内皮を生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、多能性幹細胞由来の決定的な造血性内皮を生成するための上記の方法は、ｉＰＳＣと、ＭＥＫ阻害剤、ＧＳＫ３阻害剤、及びＲＯＣＫ阻害剤を含んでなるが、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない組成物とを接触させ、ｉＰＳＣを播種及び増殖させるステップをさらに含んでなり；及び／又はｉＰＳＣはナイーブｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、ｉＰＳＣは、１つ又は複数の遺伝子刷り込みを含んでなり

、ｉＰＳＣに含まれる１つ又は複数の遺伝子刷り込みは、それから分化した万能性幹細胞由来の決定的な造血性内皮中に保持される。いくつかの実施形態では、ｉＰＳＣを決定的な造血性内皮の細胞に分化させる上記方法は、胚様体の生成を欠いており、単層培養形態にある。

【０２８９】

いくつかの実施形態では、本開示は、（ｉ）ｉＰＳ細胞と、ＢＭＰ活性化剤、及び任意選択的にｂＦＧＦを含んでなる組成物とを接触させて、ｉＰＳＣからの由来の中胚葉細胞の分化及び増殖を開始するステップと；（ｉｉ）万能性幹細胞由来の中胚葉細胞と、ＢＭＰ活性化剤、ｂＦＧＦ、及びＧＳＫ３阻害剤を含んでなるが、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない組成物とを接触させて、中胚葉細胞から、決定的なＨＥ分化能を有する中胚葉細胞の分化及び増殖を開始するステップと；（ｉｉｉ）決定的なＨＥ分化能を有する中胚葉細胞と、ＲＯＣＫ阻害剤；ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＧＦ、ＥＰＯ、ＩＬ６、及びＩＬ１１からなる群から選択される１つ又は複数の増殖因子及びサイトカイン；任意選択的に、Ｗｎｔ経路活性化剤を含んでなる組成物（組成物は、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない）とを接触させ、決定的なＨＥ分化能を有する中胚葉細胞からの決定的な造血性内皮の分化及び増殖を開始するステップと；（ｉｖ）決定的な造血性内皮と、ＢＭＰ活性化剤、ＲＯＣＫ阻害剤、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、Ｆｌｔ３Ｌ、及びＩＬ１１からなる群から選択される１つ又は複数の増殖因子及びサイトカインを含んでなる組成物とを接触させ、決定的な造血性内皮のプレＨＳＣへの分化を開始するステップと；（ｖ）プレＨＳＣと、ＢＭＰ活性化剤、ＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、及びＩＬ１１からなる群から選択される１つ又は複数の増殖因子及びサイトカインを含んでなるが、ＲＯＣＫ阻害剤を含まない組成物とを接触させて、プレＨＳＣの造血系多能性前駆細胞への分化を開始するステップと；任意選択的に、播種された万能性幹細胞、中胚葉細胞、及び／又は決定的な造血性内皮を約２％～約１０％の低酸素分圧に曝すステップとを含んでなる、万能性幹細胞由来の造血系多能性前駆細胞を生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、万能性幹細胞由来の造血多能性前駆細胞を生成するための上記方法は、万能性幹細胞と、ＭＥＫ阻害剤、ＧＳＫ３阻害剤、及びＲＯＣＫ阻害剤を含んでなるが、ＴＧＦβ受容体／ＡＬＫ阻害剤を含まない組成物とを接触させて、万能性幹細胞を播種して増殖させるステップをさらに含んでなる。いくつかの実施形態では、万能性幹細胞はｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、ｉＰＳＣはナイーブｉＰＳＣである。いくつかの実施形態では、ｉＰＳＣは、１つ又は複数の遺伝子刷り込みを含んでなり、ｉＰＳＣに含まれる１つ又は複数の遺伝子刷り込みは、それから分化した万能性幹細胞由来の造血多能性前駆細胞中に保持される。いくつかの実施形態では、上記方法を使用した万能性幹細胞の造血多能性前駆細胞への分化は、胚様体の生成を欠き、単層培養形態にある。

【０２９０】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書で開示された培養プラットフォームから生成された１つ又は複数の細胞集団を含んでなる組成物：万能性幹細胞由来の（ｉ）ＣＤ３４＋決定的な造血性内皮（ｉＣＤ３４）（ここでｉＣＤ３４細胞は、多能性前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞、ＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、及びＢ細胞に分化する能力を有し、ｉＣＤ３４細胞はＣＤ３４＋ＣＤ４３－である）；（ｉｉ）決定的な造血性内皮（ｉＨＥ）（ここでｉＨＥ細胞は、ＣＤ３４＋；及びＣＤ４３－、ＣＤ９３－、ＣＸＣＲ４－、ＣＤ７３－、及びＣＸＣＲ４－ＣＤ７３－の少なくとも１つである）；（ｉｉｉ）万能性幹細胞由来の決定的なＨＳＣ（ここでｉＨＳＣはＣＤ３４＋ＣＤ４５＋である）；（ｉｖ）造血系多能性前駆細胞（ここでｉＭＰＰ細胞はＣＤ３４＋ＣＤ４５＋である）；（ｖ）Ｔ細胞前駆細胞（ここでＴ細胞前駆細胞は、ＣＤ３４＋ＣＤ４５＋ＣＤ７＋又はＣＤ３４－ＣＤ４５＋ＣＤ７＋である）；（ｖｉ）Ｔ細胞（ここでＴ細胞は、ＣＤ４５＋ＣＤ３＋ＣＤ４＋又はＣＤ４５＋ＣＤ３＋ＣＤ８＋である）；（ｖｉｉ）ＮＫ細胞前駆細胞（ここでＮＫ細胞前駆細胞はＣＤ４５＋ＣＤ５６＋ＣＤ７＋である）；（ｖｉｉｉ）ＮＫ細胞（ここでＮＫ細胞はＣＤ３－ＣＤ４５＋ＣＤ５６＋であり、任意選択的に、Ｎ

Ｋｐ４６＋、ＣＤ５７＋、及びＣＤ１６＋によってさらに定義される）；（ｉｘ）ＮＫＴ細胞（ここでＮＫＴ細胞はＣＤ４５＋Ｖα２４Ｊα１８＋ＣＤ３＋である）；（ｘ）Ｂ細胞（ここでＢ細胞はＣＤ４５＋ＣＤ１９＋である）を提供する。

【０２９１】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書で開示された方法を使用して生成された１つ又は複数の細胞株、又はクローン細胞：万能性幹細胞由来の（ｉ）ＣＤ３４＋決定的な造血性内皮（ｉＣＤ３４）（ここでｉＣＤ３４細胞は、多能性前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞、ＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、及びＮＫＴ細胞に分化する能力を有し、ｉＣＤ３４細胞はＣＤ３４＋ＣＤ４３－である）；（ｉｉ）決定的な造血性内皮（ｉＨＥ）（ここでｉＨＥ細胞株又はクローン細胞はＣＤ３４＋；及びＣＤ４３－、ＣＤ９３－、ＣＸＣＲ４－、ＣＤ７３－、及びＣＸＣＲ４－ＣＤ７３－の少なくとも１つである）；（ｉｉｉ）決定的なＨＳＣ（ここでｉＨＳＣはＣＤ３４＋ＣＤ４５＋である）；（ｉｖ）造血系多能性前駆細胞（ｉＭＰＰ）（ここでｉＭＰＰ細胞はＣＤ３４＋ＣＤ４５＋である）；（ｖ）Ｔ細胞前駆細胞（ここでＴ細胞前駆細胞は、ＣＤ３４＋ＣＤ４５＋ＣＤ７＋又はＣＤ３４－ＣＤ４５＋ＣＤ７＋である）；（ｖｉ）Ｔ細胞（ここでＴ細胞は、ＣＤ４５＋ＣＤ３＋ＣＤ４＋又はＣＤ４５＋ＣＤ３＋ＣＤ８＋である）；（ｖｉｉ）ＮＫ細胞前駆細胞（ここでＮＫ細胞前駆細胞はＣＤ４５＋ＣＤ５６＋ＣＤ７＋である）；（ｖｉｉｉ）ＮＫ細胞（ここでＮＫ細胞はＣＤ３－ＣＤ４５＋ＣＤ５６＋であり、任意選択的に、ＮＫｐ４６＋、ＣＤ５７＋、及びＣＤ１６＋によってさらに定義される）；（ｉｘ）ＮＫＴ細胞（ここでＮＫＴ細胞はＣＤ４５＋Ｖα２４Ｊα１８＋ＣＤ３＋である）；（ｘ）Ｂ細胞（ここでＢ細胞はＣＤ４５＋ＣＤ１９＋である）を提供する。

【０２９２】

いくつかの実施形態では、本開示は、開示された方法を使用して生成された細胞集団、細胞株又はクローン細胞の１つ又は複数を使用して造血自己再生、再構成又は生着を促進する方法：多能性幹細胞由来の（ｉ）ＣＤ３４＋決定的な造血性内皮（ｉＣＤ３４）（ここでｉＣＤ３４細胞は、多能性前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞、ＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、及びＮＫＴ細胞に分化する能力を有し、ｉＣＤ３４細胞はＣＤ３４＋ＣＤ４３－である）；（ｉｉ）決定的な造血性内皮（ｉＨＥ）（ここでｉＨＥ細胞株又はクローン細胞はＣＤ３４＋；及びＣＤ４３－、ＣＤ９３－、ＣＸＣＲ４－、ＣＤ７３－、及びＣＸＣＲ４－ＣＤ７３－の少なくとも１つである）；（ｉｉｉ）決定的なＨＳＣ（ここでｉＨＳＣはＣＤ３４＋ＣＤ４５＋である）；（ｉｖ）造血系多能性前駆細胞（ここでｉＭＰＰ細胞はＣＤ３４＋ＣＤ４５＋である）；（ｖ）Ｔ細胞前駆細胞（ここでＴ細胞前駆細胞は、ＣＤ３４＋ＣＤ４５＋ＣＤ７＋又はＣＤ３４－ＣＤ４５＋ＣＤ７＋である）；（ｖｉ）Ｔ細胞（ここでＴ細胞は、ＣＤ４５＋ＣＤ３＋ＣＤ４＋又はＣＤ４５＋ＣＤ３＋ＣＤ８＋である）；（ｖｉｉ）ＮＫ細胞前駆細胞（ここでＮＫ細胞前駆細胞はＣＤ４５＋ＣＤ５６＋ＣＤ７＋である）；（ｖｉｉｉ）ＮＫ細胞（ここでＮＫ細胞はＣＤ３－ＣＤ４５＋ＣＤ５６＋であり、任意選択的に、ＮＫｐ４６＋、ＣＤ５７＋、及びＣＤ１６＋によってさらに定義される）；（ｉｘ）ＮＫＴ細胞（ここでＮＫＴ細胞はＣＤ４５＋Ｖα２４Ｊα１８＋ＣＤ３＋である）；（ｘ）Ｂ細胞（ここでＢ細胞はＣＤ４５＋ＣＤ１９＋である）を提供する。

【０２９３】

いくつかの実施形態では、本開示は、増強された治療特性を有する造血系細胞を生成する方法を提供し、方法は、１つ又は複数の遺伝子刷り込みを含んでなるｉＰＳＣを取得するステップと；ｉＰＳＣの分化を造血系細胞に方向づけるステップとを含んでなる。指向性分化させるステップは、（ｉ）万能性幹細胞と、ＢＭＰ経路活性化剤、及び任意選択的にｂＦＧＦを含んでなる組成物とを接触させて、中胚葉細胞を得るステップと；（ｉｉ）中胚葉細胞と、ＢＭＰ経路活性化剤、ｂＦＧＦ、及びＷＮＴ経路活性化剤を含んでなる組成物とを接触させて、決定的な造血性内皮（ＨＥ）分化能を有する中胚葉細胞を得るステップとをさらに含んでなり、決定的な造血性内皮（ＨＥ）分化能を有する中胚葉細胞は、造血系細胞を提供できる。好ましくは、中胚葉細胞及び決定的なＨＥ分化能を有する中胚葉

細胞が、胚様体を形成するステップなしで、ステップ（ｉ）及び（ｉｉ）において得られ、得られた造血系細胞は、決定的な造血内皮細胞、造血幹及び前駆細胞（ＨＳＣ）、造血性多能性前駆細胞（ＭＰＰ）、プレＴ細胞前駆細胞、プレＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞、ＮＫ細胞前駆細胞、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、又はＢ細胞を含んでなる。さらに、造血系細胞は、指向性分化のためにｉＰＳＣに含まれる遺伝子刷り込みを保持する。

【０２９４】

いくつかの実施形態では、上記方法の指向性分化させるステップは、（ｉ）決定的なＨＥ分化能を有する中胚葉細胞と、ｂＦＧＦ及びＲＯＣＫ阻害剤を含んでなる組成物とを接触させて、決定的なＨＥ細胞を得るステップと；（ｉｉ）決定的なＨＥ細胞と、ＢＭＰ活性化剤、及び任意選択的にＲＯＣＫ阻害剤、及びＴＰＯ、ＩＬ３、ＧＭＣＳＦ、ＥＰＯ、ｂＦＧＦ、ＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＩＬ６、Ｆｌｔ３Ｌ、及びＩＬ１１からなる群から選択される１つ又は複数の増殖因子及びサイトカインを含んでなる組成物とを接触させ、造血系多能性前駆細胞（ＭＰＰ）を得るステップと；（ｉｉｉ）決定的なＨＥ細胞と、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、及びＩＬ７からなる群から選択される１つ又は複数の増殖因子及びサイトカイン、及び任意選択的にＢＭＰ活性化剤、ＲＯＣＫ阻害剤、ＴＰＯ、ＶＥＧＦ、及びｂＦＧＦの１つ又は複数を含んでなる組成物とを接触させ、プレＴ細胞前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞、及び／又はＴ細胞を得るステップと；又は（ｉｖ）決定的なＨＥ細胞と、ＳＣＦ、Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＰＯ、ＩＬ７、及びＩＬ１５からなる群から選択される１つ又は複数の増殖因子及びサイトカイン、及び任意選択的にＢＭＰ活性化剤、ＲＯＣＫ阻害剤、ＶＥＧＦ、及びｂＦＧＦの１つ又は複数を含んでなる組成物とを接触させ、プレＴ細胞前駆細胞、Ｔ細胞前駆細胞、及び／又はＴ細胞を得るステップとをさらに含んでなる。

【０２９５】

簡潔に述べると、方法は、成熟起源Ｔ細胞又はＢ細胞を再プログラム化して、誘導多能性幹細胞を得るステップと；ｉＰＳＣ又はそれに由来する造血系細胞中で、ｉＰＳＣを生成するための成熟Ｔ細胞又はＢ細胞に含まれるものと同じ特定のＶ（Ｄ）Ｊ組換えの存在を検出するステップとを含んでなってもよい。いくつかの実施形態では、上記方法は、成熟Ｔ細胞又はＢ細胞のものと同じＶ（Ｄ）Ｊ組換えを含んでなる、ｉＰＳＣ又は造血系細胞を単離するステップをさらに含んでなる。いくつかの実施形態では、上記方法は、起源細胞を再プログラム化する前に、再プログラム化のために成熟起源Ｔ細胞又はＢ細胞を入手するステップと；成熟起源Ｔ細胞又はＢ細胞に特異的な免疫グロブリン（Ｉｇ）又はＴ細胞受容体（ＴＣＲ）に含まれるＶ（Ｄ）Ｊ組換えを判定するステップとを含んでなる。

【０２９６】

「万能性因子」又は「再プログラム化因子」は、単独で、又はその他の薬剤と組み合わせて、細胞の発生能を増加できる薬剤を指す。万能性因子としては、限定されることなく、細胞の発生能を増加できるポリヌクレオチド、ポリペプチド、及び小分子が挙げられる。例示的な多能性因子としては、例えば、転写因子及び小分子再プログラム化作用物質が挙げられる。

【０２９７】

３つの胚葉の全てからのいくつかの様々な細胞型が、肝臓及び胃（Ａｏｉ　ｅｔ　ａｌ．，２００８）；膵臓β細胞（Ｓｔａｄｔｆｅｌｄ　ｅｔ　ａｌ．，２００８）；成熟Ｂリンパ球（Ｈａｎｎａ　ｅｔ　ａｌ．，２００８）；ヒト皮膚線維芽細胞（Ｔａｋａｈａｓｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，２００７；Ｙｕ　ｅｔ　ａｌ．，２００７；Ｌｏｗｒｙ　ｅｔ　ａｌ．，２００８；Ａａｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００８）；髄膜細胞（Ｑｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００８）；神経幹細胞（ＤｉＳｔｅｆｆａｎｏ　ｅｔ　ａｌ．，２００８）；及び神経前駆細胞（Ｅｍｉｎｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，２００８）をはじめとするが、これらに限定されるものではない、体細胞の再プログラム化に適していることが示されている。したがって、本開示は、任意の細胞系から細胞を再プログラム及び／又はプログラムする方法を部分的に、考察する。

【０２９８】

本開示は、細胞と、１つ又は複数の抑制因子及び／又は活性化剤と接触させて、細胞分化能の決定又は影響に関連する細胞経路の構成要素のエピジェネティックな状態、クロマチン構造、転写、ｍＲＮＡスプライシング、転写後修飾、ｍＲＮＡ安定性及び／又は半減期、翻訳、翻訳後修飾、タンパク質安定性及び／又は半減期及び／又はタンパク質活性を調節することによって、細胞の分化能を変化させることを部分的に、考察する。

【０２９９】

したがって、様々な実施形態において、本開示は、本明細書の他の箇所で考察されるように生体外又は生体内での体細胞の再プログラム化又は脱分化及びプログラム化又は分化を可能にする、遺伝子発現のための予測可能で高度に制御された方法を使用する。しかし、上記のように、細胞の意図的な遺伝子操作は、細胞ゲノムを変化させ、遺伝的な又はエピジェネティックな異常を引き起こす可能性があるので、好ましくない。対照的に、本開示の組成物及び方法は、細胞の内在性発生能経路を模倣して細胞の再プログラム化及び／又はプログラム化を達成することによって、細胞の分化能を非遺伝的に変化させる抑制因子及び／又は活性化剤を提供する。

【０３００】

再プログラム化における小分子

体細胞の誘導多能性幹細胞への再プログラム化は、小分子と組み合わされた、定義された遺伝子（例えば、Ｏｃｔ－３／４、Ｓｏｘ－２、Ｋｌｆ－４、ｃ－Ｍｙｃ、及びＬｉｎ２８など）のレトロウイルス感染によっても達成されている。

【０３０１】

いくつかの実施形態では、本開示は、細胞と、１つ又は複数の抑制因子及び／又は活性化剤、又はそれを含んでなる組成物とを接触させるステップを含んでなる細胞の効力を変更する方法を提供し、ここで、前記１つ又は複数の抑制因子及び／又は活性化剤は、細胞の分化能に関連する細胞経路の少なくとも１つの構成要素を調節し、それによって細胞の分化能を変化させる。特定の実施形態では、１つ又は複数の抑制因子及び／又は活性化剤は、細胞の分化能に関連する細胞経路の１つ又は複数の構成要素を調節し、それによって細胞の分化能を変化させる。特定の実施形態では、１つ又は複数の抑制因子及び／又は活性化剤は、細胞の分化能に関連する１つ又は複数の細胞経路の１つ又は複数の構成要素を調節し、それによって細胞の分化能を変化させる。特定の関連実施形態では、構成要素の調節は相乗的であり、細胞の分化能を変化させる全体的有効性を高める。細胞の分化能は、基底の分化能状態と比較して、より高い分化能状態（例えば、分化細胞から多能性細胞、万能性細胞、又は全能性細胞へ）、又はより低い分化能状態（例えば、全能性細胞、万能性細胞、又は多能性細胞から分化体細胞へ）に変化させ得る。さらに別の実施形態では、細胞の分化能は２回以上変更されてもよい。例えば、細胞は、最初により高い分化能状態に再プログラム化され、次に特定の体細胞にプログラム化されてもよい。

【０３０２】

別の実施形態では、本開示の方法は、細胞の分化能の増加を提供し、その中で細胞は、全能性状態に再プログラム化又は脱分化され、細胞と、１つ又は複数の抑制因子及び／又は活性化剤を含んでなる組成物とを接触させるステップを含んでなり、ここで１つ又は複数の抑制因子及び／又は活性化剤は、細胞の全能性に関連する細胞経路の少なくとも１つの構成要素を調節し、それによって細胞の分化能を全能性状態に増加させる。

【０３０３】

特定の実施形態では、細胞の分化能を万能性状態に増加させる方法は、細胞と、１つ又は複数の抑制因子及び／又は活性化剤とを接触させることを含んでなり、ここで１つ又は複数の抑制因子及び／又は活性化剤は、細胞の分化能に関連する細胞経路の少なくとも１つの構成要素を調節し、それによって細胞の分化能を万能性状態に増加させる。

【０３０４】

別の特定の実施形態では、細胞の分化能を多能性状態に増加させる方法は、細胞と、１つ又は複数の抑制因子及び／又は活性化剤とを接触させることを含んでなり、ここで１つ又は複数の抑制因子及び／又は活性化剤は、細胞の分化能に関連する細胞経路の少なくとも

１つの構成要素を調節し、それによって細胞の分化能を多能性状態に増加させる。
【０３０５】
特定の実施形態では、細胞の分化能を増加させる方法は、全能性細胞、万能性細胞又は多能性細胞と、第２の組成物とを接触させるステップをさらに含んでなり、ここで、第２の組成物は、細胞の分化能経路の少なくとも１つの構成要素を調節して、細胞の全能性、万能性又は多能性を低下させて、細胞を成熟体細胞に分化させる。
【０３０６】
別の関連実施形態では、本開示は、細胞と、１つ又は複数の抑制因子及び／又は活性化剤を含んでなる組成物とを接触させるステップを含んでなる、細胞を再プログラム化する方法を提供し、ここで、１つ又は複数の抑制因子及び／又は活性化剤は、細胞経路の少なくとも１つの構成要素又は細胞の再プログラム化に関連する経路を調節し、それによって細胞を再プログラム化する。
【０３０７】
その他の実施形態では、本開示は、細胞を１つ又は複数の活性化剤を含んでなる組成物と接触させることを含んでなる、細胞をより高い分化能状態に脱分化させる方法を提供し、ここで、１つ又は複数の抑制因子及び／又は活性化剤は、細胞のより高い分化能状態への脱分化に関連する細胞経路の少なくとも１つの構成要素を調節し、それによって細胞を分化不能状態に脱分化させる。
【０３０８】
本開示の様々な実施形態によれば、抑制因子は、抗体又は抗体断片、イントラボディ、トランスボディ、ＤＮＡザイム、ｓｓＲＮＡ、ｄｓＲＮＡ、ｍＲＮＡ、アンチセンスＲＮＡ、リボザイム、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ｐｒｉ－ｍｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ａｎｔａｇｏｍｉｒ、アプタマー、ｓｉＲＮＡ、ｄｓＤＮＡ、ｓｓＤＮＡ；ポリペプチド又はその活性断片、ペプチド模倣体、ペプトイド、又は小型有機分子であり得る。ポリペプチドベースの抑制因子としては、融合ポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されるものではない。ポリペプチドベースの抑制因子としては、転写抑制因子もまた挙げられ、これは、本明細書の他の箇所に記載されるように、融合ポリペプチド及び／又は人工的に設計された転写抑制因子であり得る。
【０３０９】
その他の様々な実施形態によれば、活性化剤は、抗体又は抗体断片、ｍＲＮＡ、二機能性アンチセンスオリゴヌクレオチド、ｄｓＤＮＡ、ポリペプチド又はそれらの活性断片、ペプチド模倣体、ペプトイド、又は小型有機分子であり得る。
【０３１０】
いくつかの実施形態では、抑制因子は、ａ）少なくとも１つの構成要素を抑制するステップと；ｂ）少なくとも１つの構成要素の抑制因子を脱抑制するステップ；又はｃ）少なくとも１つの構成要素の活性化剤を抑制するステップとによって、細胞の分化能経路の少なくとも１つの構成要素を調節する。関連実施形態では、１つ又は複数の抑制因子は、ａ）少なくとも１つの構成要素を脱抑制するステップと；ｂ）少なくとも１つの構成要素の抑制因子を抑制するステップ；又はｃ）少なくとも１つの構成要素の活性化剤を脱抑制するステップとによって、細胞の分化能に関連する経路に少なくとも１つの構成要素を調節し得る。
【０３１１】
特定の実施形態では、１つ又は複数の抑制因子は、ａ）ヒストンメチルトランスフェラーゼを抑制し、又は少なくとも１つの構成要素のエピジェネティックな状態、クロマチン構造、転写、ｍＲＮＡスプライシング、転写後修飾、ｍＲＮＡ安定性及び／又は半減期、翻訳、翻訳後修飾、タンパク質安定性及び／又は半減期、及び／又はタンパク質活性を抑制するステップ；又はｂ）デメチラーゼを脱抑制し、又は少なくとも１つの構成要素のエピジェネティックな状態、クロマチン構造、転写、ｍＲＮＡスプライシング、転写後修飾、ｍＲＮＡ安定性及び／半減期、翻訳、翻訳後修飾、タンパク質安定性及び／半減期、及び／タンパク質活性を活性化するステップによって、細胞の分化能に関連する細胞経路の少

なくとも１つの構成要素を調節する。
【０３１２】
関連実施形態では、活性化剤は、ａ）少なくとも１つの構成要素を活性化するステップと；ｂ）少なくとも１つの構成要素の抑制因子の抑制因子（ａ　ｒｅｐｒｅｓｓｏｒ　ｏｆ　ａ　ｒｅｐｒｅｓｓｏｒ　ｏｆ）を活性化するステップと；又はｃ）少なくとも１つの構成要素の活性化剤を活性化するステップとによって、細胞の分化能に関連する細胞経路の少なくとも１つの構成要素を調節する。
【０３１３】
特定の実施形態では、１つ又は複数の活性化剤は、ａ）ヒストンデメチラーゼを活性化し、又は少なくとも１つの構成要素のエピジェネティックな状態、クロマチン構造、転写、ｍＲＮＡスプライシング、転写後修飾、ｍＲＮＡ安定性及び／又は半減期、翻訳、翻訳後修飾、タンパク質安定性及び／又は半減期、及び／又はタンパク質活性を活性化するステップ；又はｂ）ヒストンメチルトランスフェラーゼの抑制因子を活性化し、又は少なくとも１つの構成要素のエピジェネティックな状態、クロマチン構造、転写、ｍＲＮＡスプライシング、転写後修飾、ｍＲＮＡ安定性及び／又は半減期、翻訳、翻訳後修飾、タンパク質安定性及び／又は半減期及び／又はタンパク質活性の抑制因子を活性化するステップによって、少なくとも１つの構成要素を調節する。
【０３１４】
様々なその他の実施形態では、本開示は、細胞と１つ又は複数の抑制因子とを接触させるステップを含んでなる、細胞を再プログラミングする方法を部分的に、考察し、ここで、１つ又は複数の抑制因子は、細胞経路の少なくとも１つの構成要素又は細胞の再プログラム化に関連する経路を調節し、それによって細胞を再プログラム化する。
【０３１５】
様々なその他の実施形態では、本開示は、細胞と１つ又は複数の活性化剤を含んでなる組成物とを接触させるステップを含んでなる、細胞を再プログラミングする方法を部分的に、考察し、ここで、１つ又は複数の活性化剤は、細胞経路の少なくとも１つの構成要素又は細胞の再プログラム化に関連する経路を調節し、それによって細胞を再プログラム化する。
【０３１６】
再プログラム化／ＮＫ細胞分化のためのいくつかの例示的な方法が本明細書で提供される一方で、これらは例示的なものであり、本開示の範囲を限定することは意図されない。再プログラム化／ＮＫ細胞分化のための追加的な適切な方法は、当該技術分野の知識に鑑みて、本開示に基づいて当業者には明らかであろう。
【０３１７】
ＮＫ細胞をフィーダー層上で培養する方法又はフィーダー細胞と共に培養するための方法は、例えば、参照によりその全体が本明細書に援用される、Ｖａｌａｍｅｈｒ　ｅｔ　ａｌ．による欧州特許第３１８４１０９号明細書（「Ｖａｌａｍｅｈｒ」）で詳述される。
【０３１８】
一般に、あらゆるタイプのＮＫ細胞集団が、様々な方法及びデバイスを使用して培養され得る。培養器具の選択は通常、培養の規模と目的に基づく。細胞培養のスケールアップは、好ましくは、専用のデバイスの使用を伴う。大規模な臨床グレードのＮＫ細胞生産のための装置は、例えば、Ｓｐａｎｈｏｌｔｚ　ｅｔ　ａｌ．（ＰＬｏＳ　ＯＮＥ　２０１０；５：ｅ９２２１）及びＳｕｔｌｕ　ｅｔ　ａｌ．（Ｃｙｔｏｔｈｅｒａｐｙ　２０１０，Ｅａｒｌｙ　Ｏｎｌｉｎｅ　１－１２）で詳述される。
【０３１９】
生体外でＮＫ細胞集団を培養するための上記の方法は、とりわけ、ＮＫ細胞の培養集団をもたらすことができる。
【０３２０】
編集の種類
本開示のいくつかの態様は、複雑な編集ストラテジー、及びその結果としての複雑なゲノ

ム改変を有するＮＫ細胞を提供し、それは例えば、免疫腫瘍学的治療アプローチなどの臨床応用のための高度なＮＫ細胞製品の生成を可能にする。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される改変ＮＫ細胞は、例えば、がんなどの過剰増殖性疾患を有するか、又は過剰増殖性疾患と診断された患者のための既製の臨床的解決策の役割を果たし得る。いくつかの実施形態では、改変ＮＫ細胞は、非改変ＮＫ細胞と比較して、増強された生存、増殖、ＮＫ細胞応答レベル、ＮＫ細胞応答持続時間、ＮＫ細胞枯渇に対する耐性、及び／又は標的認識を示す。例えば、本明細書で提供される改変ＮＫ細胞は、改変ＮＫ細胞における、例えば、メソテリン、ＥＧＦＲ、ＨＥＲ２及び／又はＭＩＣＡ／Ｂを標的化するＣＡＲなどの目的のキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）の発現；例えば、ｈｎＣＤ１６などのＣＤ１６変異型を発現してもよい；ＩＬ１５／ＩＬ１５ＲＡ融合体の発現；ＴＧＦβ受容体２（ＴＧＦβＲ２）の機能喪失；及び／又はＴＧＦβＲ２のドミナントネガティブ変異型の発現；ＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失；Ｂ２Ｍの機能喪失；ＨＬＡ－Ｇの発現；ＣＩＩＴＡの機能喪失；ＰＤ１の機能喪失；ＴＩＧＩＴの機能喪失；及び／又はＣＩＳＨの機能喪失；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせをもたらすゲノム編集を含んでなってもよい。

【０３２１】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される改変ＮＫ細胞は、例えば、ｈｎＣＤ１６などの外因性ＣＤ１６変異型の発現、ＩＬ１５／ＩＬ１５ＲＡ融合体の発現、外因性ＨＬＡ－Ｇの発現、外因性ＤＮ－ＴＧＦβＲ２の発現、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、Ｂ２Ｍの機能喪失、ＰＤ１の機能喪失、ＴＩＧＩＴの機能喪失、及び／又はＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集を含んでなってもよい。

【０３２２】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される改変ＮＫ細胞は、例えば、ｈｎＣＤ１６などの外因性ＣＤ１６変異型の発現、ＩＬ１５／ＩＬ１５ＲＡ融合体の発現、外因性ＨＬＡ－Ｇの発現、外因性ＤＮ－ＴＧＦβＲ２の発現、可溶性ＭＩＣＡ及び／又はＭＩＣＢの発現、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、Ｂ２Ｍの機能喪失、ＰＤ１の機能喪失、ＴＩＧＩＴの機能喪失、及び／又はＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集を含んでなってもよい。

【０３２３】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される改変ＮＫ細胞は、例えば、ｈｎＣＤ１６などの外因性ＣＤ１６変異型の発現、ＩＬ１５／ＩＬ１５ＲＡ融合体の発現、外因性ＨＬＡ－Ｇの発現、外因性ＤＮ－ＴＧＦβＲ２の発現、可溶性ＭＩＣＡ及び／又はＭＩＣＢの発現、外因性ＩＬ－１２の発現、外因性ＩＬ－１８の発現、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、Ｂ２Ｍの機能喪失、ＰＤ１の機能喪失、ＴＩＧＩＴの機能喪失、及び／又はＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集を含んでなってもよい。

【０３２４】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される改変ＮＫ細胞は、例えば、ｈｎＣＤ１６などの外因性ＣＤ１６変異型の発現、ＩＬ１５／ＩＬ１５ＲＡ融合体の発現、外因性ＨＬＡ－Ｇの発現、外因性ＤＮ－ＴＧＦβＲ２の発現、外因性ＩＬ－１２の発現、外因性ＩＬ－１８の発現、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、Ｂ２Ｍの機能喪失、ＰＤ１の機能喪失、ＴＩＧＩＴの機能喪失、及び／又はＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集を含んでなってもよい。

【０３２５】

改変ＮＫ細胞は、標的遺伝子の機能喪失をもたらすゲノム中の１つ又は複数の編集、及び／又は改変ＮＫ細胞のゲノムに組み込まれるか、又は例えば、エピソーム性発現コンストラクトの形態で、染色体外様式で提供される、遺伝子産物をコード化するｃＤＮＡを含んでなる、例えば、発現コンストラクトなどの外因性核酸コンストラクトからの、例えば、タンパク質などの遺伝子産物の機能獲得又は過剰発現をもたらす１つ又は複数の修飾を示してもよい。

【０３２６】

標的遺伝子の機能喪失は、コード化される遺伝子産物の不活性化、又は発現又は機能の低

下をもたらす、例えば、標的遺伝子のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ媒介カットなどのゲノム修飾に基づく標的遺伝子の発現の減少によって特徴付けられる。

【０３２７】

遺伝子産物の機能獲得は、例えば、細胞中のタンパク質などの遺伝子産物の発現増加（本明細書で過剰発現とも称される）によって特徴付けられ、これは、例えば、遺伝子産物の発現レベルの増加、又は遺伝子産物を内因的に、例えば内在性遺伝子から発現しない細胞中の遺伝子産物の発現を含み得る。

【０３２８】

いくつかの実施形態では、遺伝子産物の発現の増加は、例えば、異種プロモーターの制御下で遺伝子産物をコード化するｃＤＮＡを含んでなる外因性核酸コンストラクトなどの、遺伝子産物をコード化する外因性核酸コンストラクトを細胞に導入するステップによってもたらされる。いくつかの実施形態では、外因性核酸コンストラクトは、本明細書のその他の箇所でより詳細に記載されるように、例えば、ＨＤＲ媒介遺伝子編集を介して、特定の遺伝子座に組み込まれる。機能喪失編集をもたらすための方法、並びに例えば、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ技術を介して遺伝子産物の発現を増加させるための方法は、当業者に周知である。

【０３２９】

本開示のいくつかの実施形態で提供される改変ＮＫ細胞中でその１つ又は複数が過剰発現されてもよい、いくつかの例示的な遺伝子産物が、以下の表１０に記載される。

【０３３０】

【表４０】

表 10:

CAR キメラ 抗原受容体(*例えば*, Her2、EGFR、α 葉酸受容体、CEA、cMET、MUC1、メソテリン、ROR1、又はその他の標的への結合)
CD16 又は CD16 変異型(*例えば*, hnCD16)
IL-15/IL-15R/IL-15RA
IL-12/IL-12R/IL-12RA
IL-2/IL-2R/IL-2RA
HLA-G
HLA-E
CD47
CXCR1
CX3CR1
mTRAIL
TOSO

【０３３１】

その１つ又は複数が改変されて、本開示のいくつかの実施形態で提供される改変ＮＫ細胞中で機能喪失を示す、いくつかの例示的な標的遺伝子が、以下の表１１に記載される。

【０３３２】

【表４１】

表 11:

TGFβR2
ADORA2A
TIGIT
B2M
PD-1
CISH
CIITA
HLA クラス II 組織適合性抗原 α 鎖遺伝子、例えば、HLA-DQA1、HLA-DRA、HLA-DPA1、HLA-DMA、HLA-DQA2、及び/又は HLA-DOA
HLA クラス II 組織適合性抗原 β 鎖遺伝子、例えば、HLA-DMB、HLA-DOB、HLA-DPB1、HLA-DQB1、HLA-DQB2、HLA-DQB3、HLA-DRB1、HLA-DRB3、HLA-DRB4、及び/又は HLA-DRB5
CD32B (FCGR2B)
CTLA4
NKG2A
BIM
CBLB
CCR5
CCR7
CD96
CDK8
CXCR3
EP4 (PGE2 受容体)
Fas
GITR
IL1R8
KIRDL1
KIR2DL1-3
LAG3
SOCS 遺伝子
ソルチリン
TIM3
TRAC
NLRC5

【０３３３】

本開示は、表７及び表８に列挙される遺伝子産物の編集及び／又は発現の増加のいずれか、並びにこれらの表に列挙される遺伝子産物のこのような編集及び／又は発現の増加の任意の組み合わせを示す、改変ＮＫ細胞を包含する。例えば、本開示は、その中で、例えば、ＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失、又はＢ２Ｍの機能喪失、又はＨＬＡ－Ｇの発現の増加など、表１０又は表１１に列挙される単一の編集を含んでなる、改変ＮＫ細胞が提供される、実施形態を包含することが理解されるべきである。本開示は、その中で、例えば、ＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失又はＢ２Ｍの機能喪失；及びＨＬＡ－Ｇの発現の増加など、表１１に列挙される単一の編集と、表１０に列挙される遺伝子産物の発現の増加とを含んでなる、

改変ＮＫ細胞が提供される、実施形態を包含することが理解されるべきである。本開示は、表１１に列挙される２つ以上の編集、及び表１０に列挙される単一の遺伝子産物の発現の増加を含んでなる、改変ＮＫ細胞が提供される、実施形態を包含することがさらに理解されるべきである。本開示は、表１１に列挙される単一の編集、及び表１０に列挙される２つ以上の遺伝子産物の発現の増加を含んでなる、改変ＮＫ細胞が提供される、実施形態を包含することがさらに理解されるべきである。本開示は、表１１に列挙される２つ以上の編集、及び表１０に列挙される２つ以上の遺伝子産物の発現の増加を含んでなる、改変ＮＫ細胞が提供される、実施形態を包含することがさらに理解されるべきである。

【０３３４】

本開示に包含される改変ＮＫ細胞の構成のいくつかを説明するために、いくつかの例示的な非限定的な実施形態が、以下及び本明細書の他の箇所で提供される。いくつかの実施形態では、ＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失を示す改変ＮＫ細胞が提供される。いくつかの実施形態では、Ｂ２Ｍの機能喪失を示す改変ＮＫ細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ＴＧＦｂＲＩＩの機能喪失を示す改変ＮＫ細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ＡＤＯＲＡ２Ａ及びＢ２Ｍの機能喪失を示す改変ＮＫ細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ｈｎＣＤ１６の機能獲得を示す改変ＮＫ細胞が提供される。いくつかの実施形態では、例えば、ＣＡＲ結合Ｈｅｒ２、ＥＧＦＲ、α葉酸受容体、ＣＥＡ、ｃＭＥＴ、ＭＵＣ１、メソテリン、ＲＯＲ１、又は例えば、本明細書で開示されるような又はさもなければ当該技術分野で公知の異なる標的など、ＣＡＲの機能獲得を示す改変ＮＫ細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ＨＬＡ－Ｇの機能獲得を示す改変ＮＫ細胞が提供される。いくつかの実施形態では、一本鎖ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒ融合タンパク質の機能獲得を示す改変ＮＫ細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ＡＤＯＲＡ２Ａ及びＢ２Ｍの機能喪失、並びにｈｎＣＤ１６の機能獲得を示す改変ＮＫ細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ＡＤＯＲＡ２ＡとＢ２Ｍの機能喪失、及び例えば、ＣＡＲ結合Ｈｅｒ２、ＥＧＦＲ、α葉酸受容体、ＣＥＡ、ｃＭＥＴ、ＭＵＣ１、メソテリン、ＲＯＲ１、又は例えば、本明細書で開示されるような又はさもなければ当該技術分野で公知の異なる標的など、ＣＡＲの機能獲得を示す改変ＮＫ細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ＡＤＯＲＡ２Ａ及びＢ２Ｍの機能喪失、並びにＨＬＡ－Ｇの機能獲得を示す改変ＮＫ細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ＡＤＯＲＡ２Ａ及びＢ２Ｍの機能喪失、並びに一本鎖ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒ融合タンパク質の機能獲得を示す改変ＮＫ細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ＡＤＯＲＡ２Ａ及びＢ２Ｍの機能喪失、並びにｈｎＣＤ１６及びドミナントネガティブＴＧＦｂＲＩＩ変異型の機能獲得を示す改変ＮＫ細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ＡＤＯＲＡ２ＡとＢ２Ｍの機能喪失、及び例えば、ＣＡＲ結合Ｈｅｒ２、ＥＧＦＲ、α葉酸受容体、ＣＥＡ、ｃＭＥＴ、ＭＵＣ１、メソテリン、ＲＯＲ１、又は例えば、本明細書で開示されるような又はさもなければ当該技術分野で公知の異なる標的、及びドミナントネガティブＴＧＦｂＲＩＩ変異型など、ＣＡＲの機能獲得を示す改変ＮＫ細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ＡＤＯＲＡ２Ａ及びＢ２Ｍの機能喪失、並びにＨＬＡ－Ｇ及びドミナントネガティブＴＧＦｂＲＩＩ変異型の機能獲得を示す改変ＮＫ細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ＡＤＯＲＡ２Ａ及びＢ２Ｍの機能喪失、並びに一本鎖ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒ融合タンパク質及びドミナントネガティブＴＧＦｂＲＩＩ変異型の機能獲得を示す改変ＮＫ細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ＡＤＯＲＡ２Ａ、ＣＩＳＨ、及びＢ２Ｍの機能喪失、並びにｈｎＣＤ１６及びＨＬＡ－Ｇの機能獲得を示す改変ＮＫ細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ＡＤＯＲＡ２Ａ及びＢ２Ｍの機能喪失、並びに一本鎖ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒ融合タンパク質、ＨＬＡ－Ｇ、及びドミナントネガティブＴＧＦｂＲＩＩ変異型の機能獲得を示す改変ＮＫ細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ＴＩＧＩＴ及びＢ２Ｍの機能喪失、並びにｈｎＣＤ１６及びドミナントネガティブＴＧＦｂＲＩＩ変異型の機能獲得を示す改変ＮＫ細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ＴＩＧＩＴとＢ２Ｍの機能喪失、及び例えば、ＣＡＲ結合Ｈｅｒ２、ＥＧＦＲ、α葉酸受容体、ＣＥＡ、ｃＭＥＴ、ＭＵＣ１、メソテリン、ＲＯＲ１、又は例えば、本明細書で開示されるような又はさもな

ければ当該技術分野で公知の異なる標的、及びドミナントネガティブＴＧＦｂＲＩＩ変異型など、ＣＡＲの機能獲得を示す改変ＮＫ細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ＴＩＧＩＴ及びＢ２Ｍの機能喪失、並びにＨＬＡ－Ｇ及びドミナントネガティブＴＧＦｂＲＩＩ変異型の機能獲得を示す改変ＮＫ細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ＴＩＧＩＴ及びＢ２Ｍの機能喪失、並びに一本鎖ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒ融合タンパク質及びドミナントネガティブＴＧＦｂＲＩＩ変異型の機能獲得を示す改変ＮＫ細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、及びＢ２Ｍの機能喪失、並びにｈｎＣＤ１６及びＨＬＡ－Ｇの機能獲得を示す改変ＮＫ細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ＴＩＧＩＴ及びＢ２Ｍの機能喪失、並びに一本鎖ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒ融合タンパク質、ＨＬＡ－Ｇ、及びドミナントネガティブＴＧＦｂＲＩＩ変異型の機能獲得を示す改変ＮＫ細胞が提供される。いくつかの実施形態では、ＡＤＯＲＡ２Ａ、ＴＩＧＩＴ、ＰＤ－１、及びＢ２Ｍの機能喪失、並びに一本鎖ＩＬ－１／ＩＬ－１５Ｒ融合タンパク質、ＨＬＡ－Ｇ、及びドミナントネガティブＴＧＦｂＲＩＩ変異型の機能獲得を示す改変ＮＫ細胞が提供される。

【０３３５】

本明細書で提供される例示的な実施形態は、本開示によって包含されるＮＫ細胞のいくつかの例を説明することを意図していることが理解されるべきである。簡潔さのために、本明細書では詳述されていない追加的な構成が包含されるが、このような実施形態は、本開示に基づいて当業者には即座に明らかになるであろう。

【０３３６】

キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）

本明細書の用法では、「キメラ抗原受容体」又は「ＣＡＲ」という用語は、ＣＡＲを発現する細胞に、特異的ンパク質を標的化する新しい能力を与えるように改変された受容体タンパク質を指す。本開示の文脈内で、ＣＡＲを含んでなるように改変されたＮＫ細胞は、例えば、がん細胞などの疾患又は障害に関連する細胞を標的化して破壊するための免疫療法で使用されてもよい。

【０３３７】

関心のあるＣＡＲとしては、メソテリン、ＥＧＦＲ、ＨＥＲ２、及び／又はＭＩＣＡ／Ｂを標的化するＣＡＲが挙げられるが、これらに限定されるものではない。現在までに、メソテリン標的化ＣＡＲ　Ｔ細胞療法は、中皮腫、非小細胞肺がん、及び乳がんを有する対象の第Ｉ相臨床試験で、有効性の初期の証拠を示している（ＮＣＴ０２４１４２６９）。同様に、ＥＧＦＲ、ＨＥＲ２、ＭＩＣＡ／Ｂを標的化するＣＡＲは、初期の研究で有望であることが示されている（例えば、そのそれぞれの全内容が参照によりそれらの全体が本明細書に明示的に援用される、Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０１８），Ｃｅｌｌ　Ｄｅａｔｈ　＆　Ｄｉｓｅａｓｅ，９（１７７）；Ｈａｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１８）Ａｍ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，８（１）：１０６－１１９；ａｎｄ　Ｄｅｍｏｕｌｉｎ　２０１７）Ｆｕｔｕｒｅ　Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，１３（８）を参照されたい）。

【０３３８】

ＣＡＲは当業者に周知であり、例えば、そのそれぞれの全内容が参照によりそれらの全体が本明細書に明示的に援用される、国際公開第１３／０６３４１９号パンフレット（メソテリン）、国際公開第１５／１６４５９４号パンフレット（ＥＧＦＲ）、国際公開第１３／０６３４１９号パンフレット（ＨＥＲ２）、国際公開第１６／１５４５８５号パンフレット（ＭＩＣＡ及びＭＩＣＢ）に記載されるものが挙げられる。例えば、ＮＫ細胞などの細胞を例えば、疾患や障害に関連する細胞などの標的細胞に標的化する任意の適切なＣＡＲ、ＮＫ－ＣＡＲ、又はその他の結合剤が、本明細書で提供される改変ＮＫ細胞中で発現されてもよい。例示的なＣＡＲ、及びバインダーとしては、ＣＡＲと、ＢＣＭＡ、ＣＤ１９、ＣＤ２２、ＣＤ２０、ＣＤ３３、ＣＤ１２３、アンドロゲン受容体、ＰＳＭＡ、ＰＳＣＡ、Ｍｕｃ１、ＨＰＶウイルスペプチド（ｉｅ．Ｅ７）、ＥＢＶウイルスペプチド、ＣＤ７０、ＷＴ１、ＣＥＡ、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ＩＬ１３Ｒα２、及びＧＤ２、ＣＡ１２５、ＣＤ７、ＥｐＣＡＭ、Ｍｕｃ１６、ＣＤ３０に結合するバインダーとが挙げられるが、

これらに限定されるものではない。本明細書で提供される改変ＮＫ細胞で使用するための追加的な適切なＣＡＲ及び結合剤は、本開示に基づいて、及び当該技術分野の一般知識に基づいて、当業者に明らかになるであろう。このような追加的な適切なＣＡＲとしては、その内容全体が参照により本明細書に援用される、Ｆｉｇｕｒｅ ３ ｏｆ Ｄａｖｉｅｓ ａｎｄ Ｍａｈｅｒ，Ａｄｏｐｔｉｖｅ Ｔ－ｃｅｌｌ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ Ｕｓｉｎｇ Ｃｈｉｍｅｒｉｃ Ａｎｔｉｇｅｎ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ－Ｇｒａｆｔｅｄ Ｔ Ｃｅｌｌｓ，Ａｒｃｈｉｖｕｍ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉａｅ ｅｔ Ｔｈｅｒａｐｉａｅ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌｉｓ ５８（３）：１６５－７８（２０１０）に記載されているものが挙げられる。

【０３３９】

本明細書で提供される改変ＮＫ細胞は、いくつかの実施形態では、ＣＡＲと例えばｈｎＣＤ１６などのＣＤ１６変異型を含んでなってもよく、又はＣＤ１６変異型なしでＣＡＲを含んでなってもよい。ＣＤ１６又はその変異型を発現する任意の細胞は、例えば、がん治療法で使用されるモノクローナル抗体などのモノクローナル抗体、又は病的細胞を標的化するＦｃ融合タンパク質との併用療法に適しているであろう。

【０３４０】

ノックイン及びノックアウト

いくつかの実施形態では、改変細胞は、外因性ｈｎＣＤ１６、外因性ＩＬ－１５、外因性ＩＬ－１５ＲＡ、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、外因性ＤＮ－ＴＧＦβＲ２、及び／又はＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失の１つ又は複数を発現してもよい。なおも別の実施形態では、改変細胞は、Ｂ２Ｍの機能喪失、外因性ＨＬＡ－Ｇ、ＣＩＩＴＡの機能喪失、ＰＤ１の機能喪失、ＴＩＧＩＴの機能喪失、又はＣＩＳＨの機能喪失を含んでなってもよい。

【０３４１】

いくつかの実施形態では、改変細胞は、外因性ｈｎＣＤ１６、外因性ＩＬ－１５、外因性ＩＬ－１５ＲＡ、外因性ＨＬＡ－Ｇ、外因性ＤＮ－ＴＧＦβＲ２、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、Ｂ２Ｍの機能喪失、ＰＤ１の機能喪失、ＴＩＧＩＴの機能喪失、及び／又はＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失の１つ又は複数を発現してもよい。

【０３４２】

いくつかの実施形態では、改変細胞は、外因性ｈｎＣＤ１６、外因性ＩＬ－１５、外因性ＩＬ－１５ＲＡ、外因性ＨＬＡ－Ｇ、外因性ＤＮ－ＴＧＦβＲ２、可溶性ＭＩＣＡ及び／又はＭＩＣＢ、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、Ｂ２Ｍの機能喪失、ＰＤ１の機能喪失、ＴＩＧＩＴの機能喪失、及び／又はＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失の１つ又は複数を発現してもよい。

【０３４３】

いくつかの実施形態では、改変細胞は、外因性ｈｎＣＤ１６、外因性ＩＬ－１５、外因性ＩＬ－１５ＲＡ、外因性ＨＬＡ－Ｇ、外因性ＤＮ－ＴＧＦβＲ２、外因性ＩＬ－１２、外因性ＩＬ－１８、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、Ｂ２Ｍの機能喪失、ＰＤ１の機能喪失、ＴＩＧＩＴの機能喪失、及び／又はＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失の１つ又は複数を発現してもよい。

【０３４４】

いくつかの実施形態では、改変細胞は、外因性ｈｎＣＤ１６、外因性ＩＬ－１５、外因性ＩＬ－１５ＲＡ、外因性ＨＬＡ－Ｇ、外因性ＤＮ－ＴＧＦβＲ２、外因性ＩＬ－１２、外因性ＩＬ－１８、可溶性ＭＩＣＡ及び／又はＭＩＣＢ、ＴＧＦβＲ２の機能喪失、Ｂ２Ｍの機能喪失、ＰＤ１の機能喪失、ＴＩＧＩＴの機能喪失、及び／又はＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失の１つ又は複数を発現してもよい。

【０３４５】

本明細書の用法では、「発現する」又は「発現」という用語は、転写及び翻訳をはじめとする、ポリペプチドを生成するプロセスを指す。発現は、例えば、ポリペプチドをコード化する遺伝子の数を増加させること、（構成的プロモーターの制御下に遺伝子を置くことなどによって）遺伝子の転写を増加させること、遺伝子の翻訳を増加させ競合的遺伝子を

ノックアウトすること、又はこれらの及び／又はその他のアプローチの組み合わせをはじめとする、いくつかのアプローチによって増加させてもよい。

【０３４６】

本明細書の用法では、「ノックイン」という用語は、細胞の遺伝子座への標的遺伝子の付加を指す。

【０３４７】

本明細書の用法では、「ノックアウト」という用語は、標的遺伝子の不活性化変異を指し、ここで標的遺伝子の産物は、機能喪失を含んでなる。

【０３４８】

本明細書の用法では、「機能喪失」という用語は、標的遺伝子の不活化変異を指し、ここで遺伝子産物は、機能がより少ないか、又は皆無である（部分的に又は完全に不活化されている）。本明細書の用法では、「完全機能喪失」という用語は、標的遺伝子の不活化変異を指し、ここで遺伝子産物は機能を有さない（完全に不活化されている）。

【０３４９】

本明細書の用法では、「ｈｎＣＤ１６ａ」という用語は、ＣＤ１６（抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）に関与する低親和性Ｆｃγ受容体）の高親和性の切断不能変異型を指す。典型的には、ＣＤ１６はＡＤＣＣ中に切断され、ｈｎＣＤ１６ＣＡＲはこの切断を受けないので、ＡＤＣＣ信号をより長く維持する。いくつかの実施形態では、ｈｎＣＤ１６ａは、その内容が明示的に参照により本明細書に援用されるＢｌｏｏｄ　２０１６　１２８：３３６３で開示される。

【０３５０】

本明細書の用法では、用語「ＭＩＣＡ／Ｂ」は、ＭＨＣクラスＩ鎖－関連プロテインＡ（ＭＩＣＡ）及びＢ（ＭＩＣＢ）を指し、これは、細胞のストレス、損傷、又は（悪性）形質転換時に誘発される多型タンパク質であり、細胞傷害性リンパ球上で発現されるナチュラルキラーグループ２、メンバーＤ受容体を介して「ｋｉｌｌ　ｍｅ」シグナルとして機能する。ＭＩＣＡ／Ｂは、健康な正常細胞によって構成的に発現されるとは考えられていないが、ほとんどの腫瘍タイプで発現が報告されている。ＭＩＣＡの例示的な配列はＮＧ＿０３４１３９．１に記載され、ＭＩＣＢの例示的な配列はＮＧ＿０２１４０５．１に記載される。

【０３５１】

本明細書の用法では、「ＡＡＶＳＩ」という用語は、アデノ随伴組み込み部位１を指す。

【０３５２】

本明細書の用法では、「２Ａ」という用語は、自己切断２Ａペプチドを指す。

【０３５３】

本明細書の用法では、「ＴＧＦβＲＩＩ」又は「ＴＧＦベータＲ２」という用語は、タンパク質キナーゼドメインを有し、ＴＧＦ－β受容体１型と共にヘテロ二量体複合体を形成し、ＴＧＦ－βに結合する膜貫通タンパク質を指す。この受容体／リガンド複合体はタンパク質をリン酸化し、次にそれは核に入って、細胞増殖、細胞周期停止、創傷治癒、免疫抑制、及び腫瘍形成に関連する遺伝子の転写を調節する。ＴＧＦβＲＩＩの例示的な配列は、ＫＲ７１０９２３．１、ＮＭ＿００１０２４８４７．２、及びＮＭ＿００３２４２．５に記載されている。

【０３５４】

本明細書の用法では、「ＤＮ－ＴＧＦβＲＩＩ」という用語は、ドミナントネガティブＴＧＦβ受容体ＩＩを指し（ＮＫ特異的プロモーターから発現され得る）、ＴＧＦβＲＩＩはＴ細胞の分化に重要な役割を果たしており、ｉＰＳＣでＫＯするとＣＤ３４＋の分化が阻害され；ＫＯは後で実施する必要があるが、ＤＮはＮＫ特異的プロモーターから発現させ得る（ＣＤ３４＋ｄｉｆｆの後にオンになる）。いくつかの実施形態では、ＤＮ－ＴＧＦβＲＩＩは、その内容が明示的に参照により本明細書に援用される、Ｉｍｍｕｎｉｔｙ．２０００　Ｆｅｂ；１２（２）：１７１－８１で開示される。

【０３５５】

ＴＧＦ－βの影響から自身を保護するために腫瘍細胞が用いるストラテジーは、腫瘍分泌ＴＧＦ－βの阻害効果から腫瘍特異的細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）を保護するように操作され得る。ドミナントネガティブＴＧＦβ受容体ＩＩを発現する腫瘍特異的ＣＴＬ（例えば、ＴＧＦβＲＩＩＤＮＲ配列）は、ＴＧＦ－β分泌腫瘍の存在下で、未改変ＣＴＬよりも選択的な機能的及び生存上の優位性を有する（参照によりその全体が本明細書に援用される、Ｂｏｌｌａｒｄ ｅｔ ａｌ．，２００２ Ｂｌｏｏｄ．２００２ Ｍａｙ１；９９（９）：３１７９－８７）。したがって、いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞は、ＤＮ－ＴＧＦβＲＩＩコンストラクトを発現する。いくつかの実施形態では、ＤＮ－ＴＧＦβＲＩＩコンストラクトは、ＥＦ１ａロングプロモーターによって駆動される。いくつかの実施形態では、ＤＮ－ＴＧＦβＲＩＩコンストラクトは、Ｓ．ピオゲネス（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）ｇＲＮＡを使用してＡＤＯＲＡ２Ａ遺伝子座にノックインされる。いくつかの実施形態では、ＤＮ－ＴＧＦβＲＩＩコンストラクトは、コンストラクトを効率的に発現する細胞の追跡を可能にするために、ＴＧＦβＲＩＩＤＮＲ配列、直後に続く２Ａ配列、さらにその後に続く短縮型ＥＧＦＲ配列（ＥＧＦＲｔ）を含んでなる。いくつかの実施形態では、ＤＮ－ＴＧＦβＲＩＩコンストラクトは、長い一本鎖ＤＮＡ分子として生成される。いくつかの実施形態では、ＤＮ－ＴＧＦβＲＩＩコンストラクトは、ＲＮＰ中で細胞に送達される。いくつかの実施形態では、ＤＮ－ＴＧＦβＲＩＩコンストラクトは、（例えば、ＡＡＶ６を介して）ＡＡＶ送達によって細胞に送達される。

【０３５６】

本明細書の用法では、ＣＤ５６とも称される「神経細胞接着分子」（ＮＣＡＭ）という用語は、神経細胞、グリア細胞、及び骨格筋、並びに造血系の特定の細胞の表面に発現される同種親和性結合糖タンパク質を指す。ＣＤ５６の発現は、ナチュラルキラー細胞に関連しているが、これらに限定されるものではない。ＮＣＡＭの例示的な配列は、ＮＭ＿０００６１５．６、ＮＭ＿１８１３５１．４、ＮＭ＿００１０７６６８２．３、ＮＭ＿００１２４２６０８．１、及びＮＭ＿００１２４２６０７．１に記載される。

【０３５７】

本明細書の用法では、「ＣＩＳＨ」という用語は、サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質を指し、例えば、参照によりその全体が本明細書に援用される、Ｄｅｌｃｏｎｔｅ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１６ Ｊｕｌ；１７（７）：８１６－２４を参照されたい。ＣＩＳＨの例示的な配列は、ＮＧ＿０２３１９４．１として記載されている。

【０３５８】

本明細書の用法では、「ＩＬ－１５／ＩＬ１５ＲＡ」又は「インターロイキン－１５」（ＩＬ－１５）という用語は、インターロイキン－２（ＩＬ－２）と構造的に類似しているサイトカインを指す。ＩＬ－２と同様に、ＩＬ－１５は、ＩＬ－２／ＩＬ－１５受容体β鎖（ＣＤ１２２）と共通γ鎖（γ－Ｃ、ＣＤ１３２）からなる複合体に結合し、それを介してシグナルを伝達する。ＩＬ－１５は、ウイルスによる感染に続いて、単核食細胞（及びその他のいくつかの細胞）によって分泌される。このサイトカインは、その主な役割がウイルス感染細胞を死滅させることである、自然免疫系の細胞である、ナチュラルキラー細胞の細胞増殖を誘導する。ＩＬ－１５受容体α（ＩＬ１５ＲＡ）は、非常に高い親和性でＩＬ１５に特異的に結合し、その他のサブユニットとは独立してＩＬ－１５に結合できる。この特性によって、ＩＬ－１５が１つの細胞によって産生され、別の細胞によって取り込まれ、次に第三者の細胞に提示できるようになることが示唆される。ＩＬ１５ＲＡは、細胞増殖とアポトーシス阻害剤ＢＣＬ２Ｌ１／ＢＣＬ２－ＸＬ及びＢＣＬ２の発現を増強すると報告されている。ＩＬ－１５の例示的な配列はＮＧ＿０２９６０５．２に記載され、ＩＬ－１５ＲＡの例示的な配列はＮＭ＿００２１８９．４に記載される。

【０３５９】

ＩＬ－１５は、ＮＫ細胞の増殖と記憶Ｔ細胞の恒常性維持を促進する重要なサイトカインである。ＩＬ－１５とその受容体鎖であるＩＬ－１５Ｒａは、ＮＫの生存に不可欠であり、制御性Ｔ細胞を刺激しない。ＩＬ－１５／ＩＬ－１５ＲａはＩＬ－２受容体のβ及びγ

サブユニットに結合し、それによってＪＡＫ１／３及びＳＴＡＴ５を活性化する。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞（例えば、ＮＫ細胞）は、外因性ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒａを発現する。いくつかの実施形態では、外因性ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒａは、その全体が参照により本明細書に援用される、Ｉｍａｍｕｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．２０１４ Ａｕｇ １４；１２４（７）：１０８１－８及びＨｕｒｔｏｎ ＬＶ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ，２０１６に記載されるように、膜結合ＩＬ１５．ＩＬ１５Ｒａ複合体として表される。いくつかの実施形態では、外因性ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒａは、その全体が参照により本明細書に援用される、Ｍｏｒｔｉｅｒ Ｅ ｅｔ ａｌ，ＪＢＣ ２００６；Ｂｅｓｓａｒｄ Ａ，Ｍｏｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒ ２００９；及びＤｅｓｂｏｉｓ Ｍ，ＪＩ ２０１６に記載されるように、可溶性ＩＬ１５Ｒａ．ＩＬ１５複合体として表される。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞（例えば、ＮＫ細胞）は、膜結合ＩＬ１５．ＩＬ１５Ｒａ複合体及び可溶性ＩＬ１５Ｒａ．ＩＬ１５複合体を発現す。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞（例えば、ＮＫ細胞）は、切断可能リンカーを有する膜結合型のＩＬ１５．ＩＬ１５Ｒａ複合体を発現する。ＣＩＳＨのノックアウトは、参照によりその全体が本明細書に援用される、Ｄｅｌｃｏｎｔｅ Ｐ，Ｎａｔ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２０１６に記載されるように、ＩＬ－１５シグナル伝達をさらに促進することに関連している。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞（例えば、ＮＫ細胞）は、ＣＩＳＨの機能喪失を発現する。いくつかの実施形態では、本開示の改変細胞（例えば、ＮＫ細胞）は、外因性ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒａ及びＣＩＳＨの機能喪失を発現する。

【０３６０】

本明細書の用法では、「ＡＤＯＲＡ２Ａ」という用語は、クラス及びサブタイプに細分化されるグアニンヌクレオチド結合タンパク質（Ｇタンパク質）共役型受容体（ＧＰＣＲ）スーパーファミリーのメンバーをコード化するアデノシンＡ２Ａ受容体を指す。受容体は、細胞外シグナルに応答し、細胞内のシグナル伝達経路を活性化する７回膜貫通タンパク質である。Ａ２Ａサブタイプのアデノシン受容体であるこのタンパク質は、好ましい内在性作動薬としてアデノシンを使用し、Ｇタンパク質のＧ（ｓ）及びＧ（ｏｌｆ）ファミリーと優先的に相互作用して細胞内ｃＡＭＰレベルを増加させる。これは、心律動と循環、脳と腎臓の血流、免疫機能、疼痛制御、及び睡眠などの多くの生物学的機能において重要な役割を果たしている。これは、炎症性疾患及び神経変性障害などの病態生理学的状態に関与するとされている。ＡＤＯＲＡ２ａの例示的な配列は、ＮＧ＿０５２８０４．１に記載される。

【０３６１】

本明細書の用法では、「Ｂ２Ｍ」（β２ミクログロブリン）という用語は、ほぼ全ての有核細胞の表面上にある主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）クラスＩの重鎖に関連して見られる、血清タンパク質を指す。タンパク質は主にβプリーツ型シート構造を有し、いくつかの病的状態でアミロイド原線維を形成し得る。コード化される抗菌タンパク質は、羊水中で抗菌活性を示す。Ｂ２Ｍの例示的な配列は、ＮＧ＿０１２９２０．２記載されている。

【０３６２】

本明細書の用法では、「ＣＤ３２Ｂ」という用語は、ヒトにおいてＦＣＧＲ２Ｂ遺伝子によってコード化される、低親和性免疫グロブリンγＦｃ領域受容体ＩＩ－ｂタンパク質を指す。例えば、その内容全体が参照により本明細書に援用される、Ｒａｎｋｉｎ－ＣＴ ｅｔ ａｌ．，ＣＤ３２Ｂ，ｔｈｅ ｈｕｍａｎ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｙ Ｆｃ－ｇａｍｍａ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ＩＩＢ，ａｓ ａ ｔａｒｇｅｔ ｆｏｒ ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ Ｂ－ｃｅｌｌ ｌｙｍｐｈｏｍａ．Ｂｌｏｏｄ ２００６ １０８（７）：２３８４－９１を参照されたい。

【０３６３】

本明細書の用法では、「インテグリン関連タンパク質」（ＩＡＰ）ともまた称されることがある「ＣＤ４７」という用語は、ヒトにおいてＣＤ４７遺伝子によってコード化されるｍ、膜貫通タンパク質を指す。ＣＤ４７は免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、膜

インテグリンとパートナーを組み、リガンドであるトロンボスポンジン－１（ＴＳＰ－１）及びシグナル調節タンパク質α（ＳＩＲＰα）にもまた結合する。ＣＤ４７はマクロファージへのシグナルの役割を果たし、ＣＤ４７発現細胞がマクロファージの攻撃から逃れることを可能にする。例えば、その内容全体が参照により本明細書に援用される、Ｄｅｕｓｅ－Ｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２０１９　３７：２５２－２５８を参照されたい。

【０３６４】

本明細書の用法では、「ＨＬＡ－Ｅ」という用語は、ＭＨＣクラスＩ抗原Ｅともまた称されることがある、ＨＬＡクラスＩ組織適合性抗原、α鎖Ｅを指す。ヒトのＨＬＡ－Ｅタンパク質は、ＨＬＡ－Ｅ遺伝子によってコード化されている。ヒトＨＬＡ－Ｅは非古典的なＭＨＣクラスＩ分子であり、その古典的なパラログよりも限られた多型性と、低い細胞表面発現によって特徴付けられる。このクラスＩ分子は、重鎖及び軽鎖（β－２ミクログロブリン）からなるヘテロ二量体である。重鎖は膜に固定されている。ＨＬＡ－Ｅは、その他のクラスＩ分子のリーダーペプチドに由来するペプチドの限定されたサブセットに結合する。ＨＬＡ－Ｅ発現細胞は、ＮＫ細胞による同種異系応答及び溶解を回避する。例えば、その内容全体が参照により本明細書に援用される、Ｇｅｏｒｎａｌｕｓｓｅ－Ｇ　ｅｔａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２０１７　３５（８）を参照されたい。ＨＬＡ－Ｅタンパク質例示的な配列は、ＮＭ＿００５５１６．６に記載される。

【０３６５】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される改変リンパ球における例えば、ゲノム編集によって、２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子及び／又は２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子がノックアウトされる。例えば、いくつかの実施形態では、ＨＬＡ－ＤＱＡ１、ＨＬＡ－ＤＲＡ、ＨＬＡ－ＤＰＡ１、ＨＬＡ－ＤＭＡ、ＨＬＡ－ＤＱＡ２、及びＨＬＡ－ＤＯＡから選択される、２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子がノックアウトされる。別の例として、いくつかの実施形態では、ＨＬＡ－ＤＭＢ、ＨＬＡ－ＤＯＢ、ＨＬＡ－ＤＰＢ１、ＨＬＡ－ＤＱＢ１、ＨＬＡ－ＤＱＢ３、ＨＬＡ－ＤＱＢ２、ＨＬＡ－ＤＲＢ１、ＨＬＡ－ＤＲＢ３、ＨＬＡ－ＤＲＢ４、及びＨＬＡ－ＤＲＢ５から選択される、２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子がノックアウトされる。例えば、その内容全体が参照により本明細書に援用される、Ｃｒｉｖｅｌｌｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　Ｊａｎｕａｒｙ　２０１９，ｊｉ１８００２５７；ＤＯＩ：ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．４０４９／ｊｉｍｍｕｎｏｌ．１８００２５７を参照されたい。

【０３６６】

本明細書の用法では、「ＨＬＡ－Ｇ」という用語は、ＨＬＡ非古典的クラスＩ重鎖パラログを指す。このクラスＩ分子は、重鎖及びａ軽鎖（β－２ミクログロブリン）からなるヘテロ二量体である。重鎖は膜に固定されている。ＨＬＡ－Ｇは、胎児由来の胎盤細胞上で発現される。ＨＬＡ－ＧはＮＫ細胞阻害性受容体ＫＩＲ２ＤＬ４のリガンドであり、したがって栄養膜によるこのＨＬＡの発現は、ＮＫ細胞媒介死からＨＬＡを守る。例えば、その内容全体が参照により本明細書に援用される、Ｆａｖｉｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｔｏｌｅｒｏｇｅｎｉｃ　Ｆｕｎｃｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｄｉｍｅｒｉｃ　Ｆｏｒｍｓ　ｏｆ　ＨＬＡ－Ｇ　Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ａ　Ｃｏｍｐａｒａｔｉｖｅ　Ｓｔｕｄｙ　Ｉｎ　Ｖｉｖｏ　ＰＬＯＳ　Ｏｎｅ　２０１１を参照されたい。ＨＬＡ－Ｇの例示的な配列は、ＮＧ＿０２９０３９．１として記載されている。

【０３６７】

本明細書の用法では、「ＣＩＩＴＡ」という用語は、クラスＩＩ主要組織適合遺伝子複合体遺伝子転写の正の調節因子の役割を果たす、核内に位置するタンパク質を指し、これらの遺伝子の発現の「マスター制御因子」と称される。タンパク質はＧＴＰにもまた結合し、ＧＴＰ結合を使用して、核内への自身の輸送を容易にする。核に入ると、それはＤＮＡとは結合せず、内在性アセチルトランスフェラーゼ（ＡＴ）活性を利用して、活性化補助因子のような様式で機能する。この遺伝子の変異は、裸リンパ球症候群ＩＩ型（遺伝性Ｍ

ＨＣクラスＩＩ欠損症又はＨＬＡクラスＩＩ欠損複合免疫不全症としても知られている）、関節リウマチ、多発性硬化症に、及びおそらくは心筋梗塞に対する感受性増加に関連付けられている。例えば、そのそれぞれの全内容が参照により本明細書に援用される、Ｃｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ １８０：１３６７－１３７４；及びＣｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ．１９９６ Ｆｅｂ；４（２）：１６７－７８を参照されたい。ＣＩＩＴＡの例示的な配列は、ＮＧ＿００９６２８．１として記載されている。

【０３６８】

本明細書の用法では、ＣＤ２７９（分化抗原群２７９）しても知られる「ＰＤ１」プログラム細胞死タンパク質１という用語は、細胞の表面上に見られるタンパク質を指し、これは、免疫系を下方制御することによって人体の細胞に対する免疫系の応答を調節し、Ｔ細胞の炎症活性を抑制することによって自己寛容を促進する役割を有する。これは自己免疫疾患を予防するが、免疫系が、がん細胞を死滅させることもまた妨げる。殺滅ＰＤ－１は免疫チェックポイントであり、２つのメカニズムを通じて自己免疫を防ぐ。第一に、それは、リンパ節の抗原特異的Ｔ細胞のアポトーシス（プログラム細胞死）を促進する。第二に、調節性Ｔ細胞（抗炎症性、抑制性Ｔ細胞）のアポトーシスを減少させる。ＰＤ１の例示的な配列は、ＮＭ＿００５０１８．３として記載されている。

【０３６９】

本明細書の用法では、「ＴＩＧＩＴ」という用語は、免疫グロブリン（ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｉｎ）タンパク質のＰＶＲ（ポリオウイルス受容体）ファミリーのメンバーを指す。この遺伝子の産物は、濾胞ＢヘルパーＴ細胞（ＴＦＨ）をはじめとするいくつかのクラスのＴ細胞上で発現される。このタンパク質は、ＰＶＲに高親和性で結合することが示されており；この結合は、ＴＦＨと樹状細胞との間の相互作用を助けて、Ｔ細胞依存性Ｂ細胞応答を調節すると考えられている。ＴＩＧＩＴの例示的な配列は、ＮＭ＿１７３７９９．４に記載されている。

【０３７０】

本明細書の用法では、「ＮＬＲＣ５」という用語は、免疫系において役割を果たす５つの細胞内タンパク質を含有するＮＯＤ様受容体ファミリーＣＡＲＤドメインを指す。ＮＬＲＣ５は、インターフェロン活性を調節することによって、ウイルスに対する自然免疫に関与するとされるパターン認識受容体である。ＮＬＲＣ５の例示的な配列は、ＮＭ＿０３２２０６．４として記載されている。

【０３７１】

本明細書の用法では、「ＣＴＬＡ４」という用語は、Ｔ細胞に阻害シグナルを伝達する免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーを指す。タンパク質は、Ｖドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞質尾部を含む。ＣＴＬＡ４の例示的な配列は、ＡＦ４１４１２０．１として記載されている。

【０３７２】

本明細書の用法では、「ＬＡＧ３」という用語は、Ｉｇスーパーファミリーに属し、４細胞外Ｉｇ様ドメインを含有する、リンパ球活性化タンパク質３を指す。ＬＡＧ３の例示的な配列は、ＮＭ＿００２２８６．６として記載されている。

【０３７３】

本明細書の用法では、「ＣＢＬＢ」という用語は、Ｅ２ユビキチン結合酵素から基質にユビキチンを転移することによってプロテオソーム媒介タンパク質分解を促進するＥ３ユビキチンタンパク質リガーゼを指す。コード化されたタンパク質は、Ｔ細胞受容体、Ｂ細胞受容体、及び高親和性免疫グロブリンε受容体活性化を制限することによって、免疫応答の調節に関与する。ＣＢＬＢの例示的な配列は、ＫＲ７０９５３３．１として記載されている。

【０３７４】

本明細書の用法では、「ＮＫＧ２Ａ」という用語は、ＮＫ細胞で優先的に発現される膜貫通タンパク質のグループである、ＮＫＧ２ファミリーとも称されるキラー細胞レクチン様

受容体ファミリーに属するタンパク質を指す。このタンパク質ファミリーは、ＩＩ型の膜配向とＣ型レクチンドメインの存在によって特徴付けられる。このタンパク質は、別のファミリーメンバーであるＫＬＲＤ１／ＣＤ９４と複合体を形成し、ＮＫ細胞中のＭＨＣクラスＩＨＬＡ－Ｅ分子の認識に関与するとされている。例えば、その内容全体が参照により本明細書に援用される、Ｋａｍｉｙａ－Ｔ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ ２０１９ ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１７２／ＪＣＩ１２３９５５を参照されたい。ＮＫＧ２Ａの例示的な配列は、ＡＦ４６１８１２．１として記載されている。

【０３７５】

本明細書の用法では、「ＣＣＲ５」という用語は、βケモカイン受容体ファミリーのメンバーを指し、これは、Ｇタンパク質共役型受容体と同様の７回膜貫通タンパク質であると予測される。このタンパク質はＴ細胞とマクロファージによって発現され、ＨＩＶをはじめとするマクロファージ指向性ウイルスが、宿主細胞に侵入するための重要な共受容体であることが知られている。ＣＣＲ５の例示的な配列は、Ｕ５４９９４．１として記載されている。

【０３７６】

本明細書の用法では、「ＳＯＣＳ」という用語は、ＪＡＫ－ＳＴＡＴシグナル伝達経路の阻害に関与する遺伝子ファミリーを指す。

【０３７７】

本明細書の用法では、「ＢＩＭ」という用語は、ＢＣＬ－２タンパク質ファミリーのプロアポトーシスメンバーを指し、それは、ＢＣＬ２、ＢＣＬ２Ｌ１／ＢＣＬ－Ｘ（Ｌ）、ＭＣＬ１をはじめとするＢＣＬ－２タンパク質ファミリーのその他のメンバーと相互作用し、アポトーシス活性化剤として機能する。

【０３７８】

本明細書の用法では、「ＦＡＳ」という用語は、ＴＮＦ受容体スーパーファミリーのメンバーを指す。この受容体は、デスドメインを含む。プログラム細胞死の生理学的調節において、中心的な役割を果たすことが示されている。

【０３７９】

本明細書の用法では、「ＧＩＴＲ」という用語は、活性化誘導性ＴＮＦＲファミリー受容体（ＡＩＴＲ）又は糖質コルチコイド誘導性ＴＮＦＲ関連タンパク質としても知られている、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー１８（ＴＮＦＲＳＦ１８）を指す。それは、活性化Ｔリンパ球と内皮細胞との間の相互作用、及びＴ細胞受容体を介した細胞死の調節に関与していた。

【０３８０】

本本明細書の用法では、「ソルチリン」という用語は、ＶＰＳ１０関連のソルチリンファミリーのタンパク質を指す。

【０３８１】

本明細書の用法では、「ＴＩＭ３」という用語は、ヒトにおいてＨＡＶＣＲ２遺伝子によってコード化される、Ｔ細胞免疫グロブリン及びムチンドメイン含有－３（ＴＩＭ－３）タンパク質を指す。

【０３８２】

本明細書の用法では、「ＣＤ９６」又は「ＴＡＣＴＩＬＥ」という用語は、免疫応答の後期の間に活性化されたＴ細胞及びＮＫ細胞の接着相互作用において役割を果たす、Ｉ型膜タンパク質を指す。

【０３８３】

本明細書の用法では、「ＩＬ１Ｒ８」という用語は、インターロイキン１受容体ファミリーのメンバーを指し、インターロイキン１アクセサリータンパク質に類似している。

【０３８４】

本明細書の用法では、「ＫＩＲ２ＤＬ１」、「ＫＩＲ２ＤＬ２」、及び「ＫＩＲ２ＤＬ３」という用語は、ナチュラルキラー細胞及びＴ細胞のサブセットによって発現される膜貫

通糖タンパク質である、キラー細胞免疫グロブリン様受容体（ＫＩＲ）を指す。
【０３８５】
本明細書の用法では、「ＣＤＫ８」という用語は、細胞周期進行の調節因子として機能する、サイクリン依存性プロテインキナーゼ（ＣＤＫ）ファミリーのメンバーを指す。
【０３８６】
本明細書の用法では、「ＣＸＣＲ３」という用語は、ＣＸＣＬ９／Ｍｉｇ（インターフェロン－ｇ誘導性モノカイン）、ＣＸＣＬ１０／ＩＰ１０（インターフェロン－ｇ誘導性１０ｋＤａタンパク質）、及びＣＸＣＬ１１／Ｉ－ＴＡＣ（インターフェロン－ｇ誘導性Ｔ細胞ａ－化学誘引物質）と称される、３つのケモカインに対する選択性を有する、Ｇタンパク質共役型受容体を指す。
【０３８７】
明細書の用法では、「ＣＣＲ７」という用語は、Ｇタンパク質共役型受容体ファミリーのメンバーを指す。この受容体は様々なリンパ組織で発現され、Ｂリンパ球とＴリンパ球を活性化する。
【０３８８】
本明細書の用法では、「ＥＰ４」という用語は、Ｇタンパク質共役型受容体ファミリーのメンバーを指す。このタンパク質は、プロスタグランジンＥ２（ＰＧＥ２）について同定された、４つの受容体の１つである。この受容体は、Ｔ細胞因子シグナル伝達を活性化し得る。
【０３８９】
本明細書の用法では、「ＩＬ－２」という用語は、Ｔリンパ球とＢリンパ球の増殖に重要な分泌サイトカインである、インターロイキン－２を指す。
【０３９０】
本明細書の用法では、「ＩＬ－１２」という用語は、Ｔ細胞及びナチュラルキラー細胞に作用するサイトカインである、インターロイキン－１２を指す。
【０３９１】
本明細書の用法では、「ＩＬ－１８」という用語は、主に極性Ｔヘルパー１（Ｔｈ１）細胞及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞の免疫応答に関与する炎症性サイトカインである、インターロイキン－１８を指す。
【０３９２】
本明細書の用法では、「ＣＸＣＲ１」という用語は、Ｇタンパク質共役型受容体ファミリーのメンバーを指す。このタンパク質は、インターロイキン８（ＩＬ８）の受容体である。
【０３９３】
本明細書の用法では、「ＣＸ３ＣＲ１」という用語は、白血球の接着及び遊走に関与する膜貫通タンパク質及びケモカインを指す。
【０３９４】
本明細書の用法では、「ｍＴＲＡＩＬ」という用語は、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）リガンドファミリーに属するサイトカインを指す。このタンパク質は、形質転換細胞及び腫瘍細胞中で、優先的にアポトーシスを誘導する。
【０３９５】
本明細書の用法では、「ＴＯＳＯ」という用語は、ＩｇＭ受容体のＦｃ断片を指す。
本明細書の用法では、「ＣＤ１６」という用語は、免疫グロブリンＧのＦｃ部分の受容体を指し、それは、循環からの抗原－抗体複合体の除去、並びにその他の抗体依存性応答に関与する。
【０３９６】
いくつかの実施形態では、ＴＲＡＣの機能喪失を示す改変細胞が本明細書で提供される。「ＴＲＡＣ」という用語は、ＴＲＡＣ遺伝子座によってコード化されるＴ細胞受容体αサブユニット（定常）を指す。ＴＲＡＣの機能喪失を示す細胞は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）を発現しない。いくつかの実施形態では、ＴＣＲを発現する細胞に由来する、又は例えば

、Ｔ細胞などの再構成された内在性ＴＣＲ遺伝子座を有する細胞に由来する、例えば、万能性又は多能性幹細胞又は分化したその娘細胞（例えば、ｉＮＫ細胞）などの改変細胞が、本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、このような細胞は、ＴＲＡＣの機能喪失をもたらす修飾を含んでなり、したがって機能的なＴＣＲを発現しない。ＴＲＡＣの機能喪失をもたらすための適切な方法及び組成物は、本開示に基づいて当業者には明らかであろう。このような方法及び組成物としては、限定されることなく、そのそれぞれの全内容が参照により本明細書に援用される、“ＣＲＩＳＰＲ－ＣＡＳ－ｒｅｌａｔｅｄ ｍｅｔｈｏｄｓ，ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ ａｎｄ ｃｏｍｐｏｎｅｎｔｓ ｆｏｒ ｃａｎｃｅｒ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ”と題された、ＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１５／０２６５０４号明細書；“ＣＲＩＳＰＲ－ＣＡＳ－ｒｅｌａｔｅｄ ｍｅｔｈｏｄｓ，ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ ａｎｄ ｃｏｍｐｏｎｅｎｔｓ”と題されたＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０２４３５３号明細書；及び“ＣＲＩＳＰＲ－ＣＰＦ１－ｒｅｌａｔｅｄ ｍｅｔｈｏｄｓ，ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ ａｎｄ ｃｏｍｐｏｎｅｎｔｓ ｆｏｒ ｃａｎｃｅｒ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ”と題された、ＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０２０５９８号明細書で開示されるものが挙げられる。

【０３９７】

本開示は、上記遺伝子及びＣＡＲの変異型を特に包含し、上記同定された遺伝子配列にと、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の同一性を有する変異型を含む。本明細書の用法では、「相同性」もまた含む「パーセント（％）配列同一性」又は「パーセント（％）同一性」という用語は、配列を整列させ、必要に応じてギャップを導入して、最大パーセント配列同一性を達成した後、配列同一性の一部としての保存的置換を考慮せずに、参照配列のアミノ酸残基又はヌクレオチドと同一である、候補配列中のアミノ酸残基又はヌクレオチドの百分率として定義される。比較のための配列の最適なアラインメントは、手動に加えて、Ｓｍｉｔｈ ａｎｄ Ｗａｔｅｒｍａｎ，１９８１，Ａｄｓ Ａｐｐ．Ｍａｔｈ．２，４８２の局所相同性アルゴリズムの手段によって、Ｎｅｄｄｌｅｍａｎ ａｎｄ Ｗｕｎｓｃｈ，１９７０，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８，４４３の局所相同性アルゴリズムの手段によって、Ｐｅａｒｓｏｎ ａｎｄ Ｌｉｐｍａｎ，１９８８，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５，２４４４の類似性検索法の手段によって、又はこれらのアルゴリズムを使用するコンピュータプログラムの手段によって（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｐａｃｋａｇｅ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ，５７５ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｄｒｉｖｅ，Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓ．のＧＡＰ，ＢＥＳＴＦＩＴ，ＦＡＳＴＡ，ＢＬＡＳＴ Ｐ，ＢＬＡＳＴ Ｎ、及びＴＦＡＳＴＡ）生成されてもよい。

【０３９８】

ノックイン及びノックアウトは、当業者に知られている、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ技術をはじめとするゲノム編集技術によってもたらされ得る。シングルカット及びマルチプレックス編集ストラテジーは、本明細書で提供される所望の製品構成を達成するのに適しており、そのようなストラテジーは、本明細書に記載されているか、さもなければ当業者に知られている。

【０３９９】

いくつかの実施形態では、例えば、改変万能性細胞又は例えば、ｉＮＫ細胞又はその他の改変リンパ球タイプなどのその分化した子孫などの例示的な改変細胞が、例えば免疫療法を必要とする患者などの非自己宿主の免疫系から逃れる能力について評価される。いくつかの実施形態では、このような評価は、生体外アッセイを含む。このような評価に適した生体外アッセイは関連技術分野の当業者に知られており、混合リンパ球反応性（ＭＬＲ）アッセイが挙げられるが、これに限定されない。例えば、このアッセイ及びその他の適切なアッセイは、その内容全体が参照により本明細書に援用される、Ａｂｂａｓ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌｕｌａｒ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，７ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ，ＩＳＢＮ ９７８１４３７７３５７３４に記載される。その他の適切な

アッセイは、本開示に鑑みて当業者には明らかであろう。

【０４００】

使用方法

本発明の改変細胞を対象に導入することによって、様々な疾患が改善されてもよい。疾患の例としては、脳、前立腺、乳房、肺、結腸、子宮、皮膚、肝臓、骨、膵臓、卵巣、精巣、膀胱、腎臓、頭部、頸部、胃、子宮頸部、直腸、喉頭、又は食道の腫瘍をはじめとするが、これらに限定されるものではない固形腫瘍；及び急性及び慢性白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、及び骨髄異形成症候群をはじめとするが、これらに限定されるものではない悪性血液疾患をはじめとするがんが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【０４０１】

本発明の特定の実施形態は、本明細書に記載の細胞のいずれかを含んでなる組成物を対象に投与することによって、それを必要とする対象を治療する方法に関する。特定の実施形態では、「治療する」、「治療」などの用語は、一般に、所望の薬理学的及び／又は生理学的効果を得ることを意味するために、本明細書で使用される。効果は、疾患を完全に又は部分的に予防する観点から予防的であってもよく、及び／又は疾患に帰せられる有害作用を部分的又は完全に治癒させる観点から治療的であり得る。本明細書の用法では、「治療」は、疾患の素因があってもよいが、まだそれを有すると診断されていない対象で疾患が発生するのを予防すること；疾患を阻害する、すなわち、その発症を阻止すること；又は疾患を軽減する、すなわち、疾患の退縮をもたらすことをはじめとする、哺乳類における疾患のあらゆる治療をカバーする。治療薬又は組成物は、疾患又は傷害の発症前、発症中、又は発症後に投与されてもよい。進行中の疾患の治療で、治療によって患者の望ましくない臨床症状を安定させたり、軽減したりすることは、特に興味深い。

【０４０２】

特定の実施形態では、対象は、細胞療法によって治療、寛解、及び／又は改善できる疾患、状態、及び／又は傷害を有する。いくつかの実施形態では、細胞治療を必要とする対象が、傷害、疾患、又は病状を有する対象であり、それによって、例えば、細胞物質が対象に投与される治療などの細胞療法が、傷害、疾患、又は病状に関連する少なくとも１つの症状の重症度を治療、改善、寛解、及び／又は軽減できることが、想定される。特定の実施形態では、骨髄又は幹細胞移植の候補；化学療法又は照射療法を受けた対象；例えば、造血系の増殖性障害又はがんなどの増殖性障害又はがんを有する、又は発症するリスクのある対象；例えば、固形腫瘍などの腫瘍を有する、又は発症するリスクのある対象；ウイルス感染又はウイルス感染に関連する疾患を有する、又は発症するリスクがある対象をはじめとするが、これらに限定されるものではない、細胞治療を必要とする対象が想定される。

【０４０３】

したがって（Ａｃｃｏｒｄｉｎｇ）、本発明は、本明細書で開示される方法及び組成物によって作製された、万能性細胞由来の造血系細胞を含んでなる医薬組成物をさらに提供し、医薬組成物は、薬学的に許容可能な媒体をさらに含んでなる。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、本明細書で開示される方法及び組成物によって作製された、万能性細胞由来のＴ細胞を含んでなる。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、本明細書で開示される方法及び組成物によって作製された、万能性細胞由来のＮＫ細胞を含んでなる。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、本明細書で開示される方法及び組成物によって作製された、万能性細胞由来のＣＤ３４ＨＥ細胞を含んでなる。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、本明細書で開示される方法及び組成物によって作製された、万能性細胞由来のＨＳＣを含んでなる。

【０４０４】

さらに、本発明は、養子細胞療法に適した対象に組成物を導入することによる、上記の医薬組成物の治療的使用を提供し、ここで、対象は自己免疫障害；血液学的悪性腫瘍；固形腫瘍；又は、ＨＩＶ、ＲＳＶ、ＥＢＶ、ＣＭＶ、アデノウイルス、又はＢＫポリオーマウイルスに関連する感染症を有する。

【０４０５】
単離された万能性幹細胞由来の造血系細胞は、少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９８％、又は９９％のＴ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＣＤ３４＋ＨＥ細胞又はＨＳＣを有し得る。いくつかの実施形態では、単離された万能性幹細胞由来の造血系細胞は、約９５％から約１００％のＴ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＣＤ３４＋ＨＥ細胞又はＨＳＣを有する。いくつかの実施形態では、本発明は、例えば、約９５％のＴ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＣＤ３４＋ＨＥ細胞又はＨＳＣの分離された集団を有する組成物など、精製されたＴ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＣＤ３４＋ＨＥ細胞又はＨＳＣを有する医薬組成物を提供し、細胞療法を必要とする対象を治療する。
【０４０６】
いくつかの実施形態では、医薬組成物は、万能性幹細胞由来の造血系細胞の単離された集団を含み、ここで集団は、約０．１％、０．５％、１％、２％、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、又は３０％未満のｉＰＳＣ由来Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＣＤ３４＋ＨＥ細胞又はＨＳＣを有する。いくつかの実施形態における誘導造血系細胞の単離集団は、約０．１％、０．５％、１％、２％、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、又は３０％を超えるＴ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＣＤ３４＋ＨＥ細胞又はＨＳＣを有し得る。その他の実施形態では、誘導造血系細胞の単離集団は、約０．１％～約１％、約１％～約３％、約３％～約５％、約１０％～約１５％、約１５％～２０％、約２０％～２５％、約２５％～３０％、約３０％～３５％、約３５％～４０％、約４０％～４５％、約４５％～５０％、約６０％～７０％、約７０％～８０％、約８０％～９０％、約９０％～９５％、又は約９５％～約１００％のＴ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＣＤ３４＋ＨＥ細胞又はＨＳＣを有し得る。
【０４０７】
特定の実施形態では、誘導造血系細胞は、約０．１％、約１％、約３％、約５％、約１０％、約１５％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、約９５％、約９８％、約９９％、又は約１００％のＴ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＣＤ３４＋ＨＥ細胞又はＨＳＣを有し得る。
【０４０８】
当業者が理解するように、自系及び同種異系免疫細胞の双方が、細胞療法に使用され得る。自己細胞療法は、感染の軽減、ＧｖＨＤの可能性の低下、迅速な免疫再構築を有し得る。同種異系細胞療法は、免疫介在性移植片対悪性腫瘍（ＧＶＭ）効果、及び再発率低下をもたらし得る。細胞療法を必要とする患者又は対象の特定の病状に基づいて、当業者は、どの特定のタイプの治療法を投与するかを決定できるであろう。
【０４０９】
特定の実施形態では、本発明の医薬組成物の誘導造血系細胞は、対象に対して同種異系である。特定の実施形態では、本発明の医薬製剤の誘導造血系細胞は、対象に対して自系である。自家移植の場合、誘導造血系細胞の単離集団は、患者との完全な又は部分的なＨＬＡ適合のいずれかである。別の実施形態では、誘導造血系細胞は、対象に対してＨＬＡ適合されていない。
【０４１０】
本発明によって提供される誘導された誘導造血系細胞は、投与前に生体外又は試験管内で増殖させることなく、対象に投与され得る。特定の実施形態では、誘導造血系細胞の単離集団は、１つ又は複数の薬剤を使用して生体外で調節及び治療されて、改善された治療可能性を有する免疫細胞が得られる。誘導造血系細胞の調節された集団は洗浄され治療剤が除去され得て、改善された集団は、生体外で集団をさらに増殖させることなく患者に投与される。
【０４１１】
その他の実施形態では、本発明は、１つ又は複数の薬剤でＴリンパ球の単離された集団又は亜集団を調節する前に増殖された、誘導造血系細胞の単離集団を提供する。誘導された造血系統細誘導造血系細胞の単離集団は組換え的に産生されて、ＴＣＲ、ＣＡＲ又はその

他のタンパク質が発現され得る。

【０４１２】

組換えＴＣＲ又はＣＡＲを発現する遺伝子操作された誘導造血系細胞の場合、細胞の遺伝子改変の前又は後を問わず、例えば、米国特許第６，３５２，６９４号明細書；米国特許第６，５３４，０５５号明細書；米国特許第６，９０５，６８０号明細書；米国特許第６，６９２，９６４号明細書；米国特許第５，８５８，３５８号明細書；米国特許第６，８８７，４６６号明細書；米国特許第６，９０５，６８１号明細書；米国特許第７，１４４，５７５号明細書；米国特許第７，０６７，３１８号明細書；米国特許第７，１７２，８６９号明細書；米国特許第７，２３２，５６６号明細書；米国特許第７，１７５，８４３号明細書；米国特許第５，８８３，２２３号明細書；米国特許第６，９０５，８７４号明細書；米国特許第６，７９７，５１４号明細書；米国特許第６，８６７，０４１号明細書；及び米国特許出願公開第２００６０１２１００５号明細書に記載される方法を使用して、細胞を活性化及び増殖させ得る。

【０４１３】

がん

本開示の適切な治療標的であるがんとしては、膀胱、血液、骨、骨髄、脳、乳房、結腸、食道、眼、胃腸、歯茎、頭部、腎臓、肝臓、肺、鼻咽頭、頸部、卵巣、前立腺、皮膚、胃、精巣、舌、又は子宮からのがん細胞が挙げられる。さらに、がんは、具体的には以下の組織型であってもよいが、これらに限定されるものではない：悪性新生物；がん腫；未分化型がん；巨大及び紡錘細胞がん；小細胞がん；乳頭状がん；扁平上皮がん；リンパ上皮がん；基底細胞がん；石灰化上皮がん；移行細胞がん；乳頭状移行細胞がん；腺がん；悪性ガストリノーマ；胆管がん；肝細胞がん；肝細胞がんと胆管がんの複合型；小柱腺がん；腺様嚢胞がん；がん腺腫性ポリープにおける腺がん；家族性大腸腺腫症腺がん；固形がん；悪性カルチノイド腫瘍；分岐管肺胞腺がん；乳頭状腺がん；色素嫌性がん；好酸性がん；酸親和性腺がん；好塩基球がん；明細胞腺がん；顆粒細胞がん；濾胞性腺がん；乳頭状及び濾胞状腺がん；非被膜性硬化性がん；副腎皮質がん；類内膜（ｅｎｄｏｍｅｔｒｏｉｄ）がん；皮膚付属器がん；アポクリン腺がん；皮脂腺腺がん；耳道腺腺がん；粘液性類表皮腫；嚢胞腺がん；乳頭状嚢胞腺がん；乳頭状漿液性嚢胞腺がん；粘液性嚢胞腺がん；粘液性腺がん；印環細胞がん；浸潤性導管がん；髄様がん；小葉がん；炎症性がん；パジェット病、乳腺；腺房細胞がん；腺扁平上皮がん；扁平上皮化生を伴う腺がん；悪性胸腺腫；悪性卵巣間質腫瘍；悪性莢膜腫；悪性顆粒膜細胞腫瘍；悪性アンドロブラストーマ；セルトリ細胞がん；悪性ライディッヒ細胞腫；悪性脂質細胞腫瘍；悪性傍神経節腫；悪性乳腺外傍神経節腫；褐色細胞腫；血管球血管肉腫；悪性黒色腫；無色素性黒色腫；表在性拡散性黒色腫；巨大色素性母斑中の悪性（ｍａｌｉｇ）黒色腫；類上皮細胞黒色腫；悪性青色母斑；肉腫；線維肉腫；悪性線維性組織球腫；粘液肉腫；脂肪肉腫；平滑筋肉腫；横紋筋肉腫；胎児性横紋筋肉腫；肺胞横紋筋肉腫；間質肉腫；悪性混合腫瘍；ミュラー管混合腫瘍；腎芽細胞腫；肝芽細胞腫；がん肉腫；悪性間葉細胞腫；悪性ブレンナー腫瘍；悪性葉状腫瘍；滑膜肉腫；悪性中皮腫；未分化胚細胞腫；胚性がん；悪性奇形腫；卵巣甲状腺腫；絨毛がん；悪性中腎腫；血管肉腫；悪性血管内皮腫；カポジ肉腫；悪性血管周皮腫；悪性リンパ管肉腫；骨肉腫；傍骨性骨肉腫；軟骨肉腫；悪性軟骨芽細胞腫；間葉系軟骨肉腫；骨巨細胞腫；ユーイング肉腫；悪性歯原性腫瘍；エナメル芽細胞歯牙肉腫；悪性エナメル上皮腫；エナメル芽細胞線維肉腫；悪性松果体腫；脊索腫；悪性神経膠腫；上衣腫；星状細胞腫；原形質性星状細胞腫；線維性星状細胞腫；星状芽細胞腫；神経膠芽腫；乏突起膠腫；乏突起膠芽細胞腫；原始神経外胚葉性；小脳性肉腫；神経節芽細胞腫；神経芽腫；網膜芽細胞腫；嗅神経腫瘍；髄膜腫、悪性；神経線維肉腫；神経鞘腫、悪性；顆粒細胞腫、悪性；悪性リンパ腫；ホジキン病；ホジキンリンパ腫；小リンパ球性悪性リンパ腫；びまん性大細胞悪性リンパ腫；濾胞性悪性リンパ腫；菌状息肉腫；その他の特定の非ホジキンリンパ腫；悪性組織球症；多発性骨髄腫；肥満細胞肉腫；免疫増殖性小腸疾患；白血病；リンパ系白血病；形質細胞白血病；赤白血病；リンパ肉腫細胞白血病；骨髄性白血病；好塩基性白血病；好酸球性白血病；単球性白血病；肥満細胞白血病；巨核芽球性白

血病；骨髄肉腫；及び有毛細胞白血病．

【０４１４】

いくつかの実施形態では、がんは乳がんである。別の実施形態では、がんは結腸がんである。別の実施形態では、がんは胃がんである。別の実施形態では、がんはＲＣＣである。別の実施形態では、がんは非小細胞肺がん（ＮＳＣＬＣ）である。

【０４１５】

いくつかの実施形態では、単独でか、又は１つ若しくは複数の追加的ながん治療法と組み合わせてかのいすれかで、本明細書で提供される改変ＮＫ細胞で治療され得る固形がんの適応症としては、膀胱がん、肝細胞がん、前立腺がん、卵巣／子宮がん、膵臓がん、中皮腫、黒色腫、神経膠芽腫、子宮頸がんとＨＰＶ＋頭頸部がんと口腔がんなどのＨＰＶ関連及び／又はＨＰＶ陽性のがん、咽頭がん、甲状腺がん、胆嚢がん、及び軟部組織肉腫が挙げられる。

【０４１６】

いくつかの実施形態では、単独でか、又は１つ若しくは複数の追加的ながん治療法と組み合わせてかのいすれかで、本明細書で提供される改変ＮＫ細胞で治療され得る血液がんの適応症としては、ＡＬＬ、ＣＬＬ、ＮＨＬ、ＤＬＢＣＬ、ＡＭＬ、ＣＭＬ、多発性骨髄腫（ＭＭ）が挙げられる。

【０４１７】

本明細書の用法では、「がん」という用語（「過剰増殖性」及び「腫瘍性」という用語とも同義的に使用される）は、自律的増殖能力、すなわち、急速に増殖する細胞増殖によって特徴付けられる異常な状態又は病状を有する細胞を指す。がん性の疾病状態は、病理学的なもの、すなわち例えば、悪性腫瘍増殖などの病態を特徴付ける又は構成するするものに分類されてもよく、又は非病理学的なもの、すなわち例えば、創傷修復に伴う細胞増殖などの正常からの逸脱であるが病態とは関連しないものに分類されてもよい。用語には、組織病理学的タイプ又は侵襲段階にかかわりなく、全てのタイプのがん性増殖又は発がんプロセス、転移組織又は悪性に形質転換した細胞、組織、又は臓器が含まれることが意図される。「がん」という用語には、肺、乳房、甲状腺、リンパ系、胃腸、及び生殖器－尿路に影響を与えるもの、並びにほとんどの結腸がん、腎細胞がん、前立腺がん及び／又は精巣腫瘍、肺の非小細胞がん、小腸がん、食道がんなどの悪性腫瘍をはじめとする腺がんなど、様々な臓器系の悪性腫瘍が含まれる。「がん腫」という用語は、技術分野で認められており、呼吸器系がん腫、消化器系がん腫、泌尿生殖器系がん腫、精巣がん腫、乳がん腫、前立腺癌、内分泌系がん腫、及び黒色腫をはじめとする、上皮又は内分泌組織の悪性腫瘍を指す。例示的ながん腫としては、子宮頸部、肺、前立腺、乳房、頭頸部、結腸、及び卵巣組織から形成するものが挙げられる。「がん腫」という用語には、例えば、がん性及び肉腫性組織からなる悪性腫瘍をはじめとするがん肉腫もまた含まれる。「腺がん」は、腺組織に由来するがん腫、又はその中で腫瘍細胞が認識可能な腺構造を形成するがん腫を指す。「肉腫」という用語は、技術分野で認められており、間葉由来の悪性腫瘍を指す。

【０４１８】

肺の細胞増殖性及び／又は分化性障害の例としては、腫瘍随伴症候群をはじめとする気管支原性肺がんなどの腫瘍、細気管支肺胞がん、気管支カルチノイドなどの神経内分泌腫瘍、その他の腫瘍、転移性腫瘍、及び孤立性線維性腫瘍（胸膜線維腫）をはじめとする胸膜腫瘍、及び悪性中皮腫が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【０４１９】

乳房の細胞増殖性及び／又は分化性障害の例としては、例えば、上皮過形成、硬化性腺症、及び小管乳頭腫をはじめとする増殖性乳房疾患；腫瘍、例えば、線維腺腫、葉状腫瘍、及び肉腫などの間質性腫瘍や、大管乳頭腫などの上皮性腫瘍；腺管上皮内がん（パジェット病をはじめとする）を含む原位置（非浸潤性）がん腫をはじめとする乳房のがん腫；及び非浸潤性小葉がん；及び浸潤性乳管がん、浸潤性小葉がん、髄様がん、コロイド（粘液性）がん、尿細管がん、浸潤性乳頭がん、及びその他の悪性新生物をはじめとするが、こ

れらに限定されるものではない、侵襲的（浸潤性）がん腫が挙げられるが、これらに限定されるものではない。男性の乳房の障害としては、女性化乳房及びがん腫が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【０４２０】

結腸が関与する細胞の増殖性及び／又は分化性障害の例としては、非腫瘍性ポリープ、腺腫、家族性症候群、結腸直腸発がん、結腸直腸がん、及びカルチノイド腫瘍などの結腸の腫瘍が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【０４２１】

上記のものに加えて、がん又は腫瘍性病状の例としては、線維肉腫、筋肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、胃がん、食道がん、直腸がん、膵臓がん、卵巣がん、前立腺がん、子宮がん、頭頸部がん、皮膚がん、脳がん、扁平上皮がん、皮脂腺がん、乳頭がん、乳頭腺がん、嚢胞腺がん、髄様がん、気管支原性肺がん、腎細胞がん腫、肝細胞腫、胆管がん腫、絨毛がん、セミノーマ、胚性がん、ウィルムス腫瘍、子宮頸がん、精巣がん、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、膀胱がん、上皮性がん、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽腫、網膜芽細胞腫、白血病、リンパ腫、又はカポジ肉腫が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【０４２２】

この文脈で想定される有用な二次的又は補助的治療薬としては、チオテパ及びＣＹＴＯＸＡＮ（登録商標）シクロホスファミドなどのアルキル化剤をはじめとする化学療法剤；ブスルファン、インプロスルファン、及びピポスルファンなどのスルホン酸アルキル；ベンゾドパ、カルボコン、メトレドパ、及びウレドパなどのアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド、及びトリメチルオロメラミンをはじめとするエチレンイミン及びメチルアメラミン；アセトゲニン（特にブラタシン及びブラタシノン）；δ－９－テトラヒドロカンナビノール（ドロナビノール、ＭＡＲＩＮＯＬ（登録商標））；β－ラパコン；ラパコール；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトテシン（合成類似体トポテカン（ＨＹＣＡＭＴＩＮ（登録商標））、ＣＰＴ－１１（イリノテカン、ＣＡＭＰＴＯＳＡＲ（登録商標））、アセチルカンプトテシン、スコポレクチン、及び９－アミノカンプトテシンをはじめとする）；ブリオスタチン；カリスタチン；ＣＣ－１０６５（そのアドゼレシン、カルゼレシン、及びビゼレシン合成類似体をはじめとする）；ポドフィロトキシン；ポドフィリン酸；テニポシド；クリプトフィシン（特にクリプトフィシン１及びクリプトフィシン８）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成類似体、ＫＷ－２１８９及びＣＢ１－ＴＭ１をはじめとする）；エレウテロビン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンギスタチン；クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド（ｉｆｏｓｆａｎｉｄｅ）、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベンビキン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード；カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、及びラニムスチンなどのニトロソ尿素（ｎｉｔｒｏｓｕｒｅａｓ）；エンジイン抗生物質（例えば、カリケアマイシン、特にカリケアマイシンγ１Ｉ及びカリケアマイシンωｌ１（例えば、Ａｇｎｅｗ，Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔｌ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．，３３：１８３－１８６（１９９４）を参照されたい）などの抗生物質；ダイネミシンＡをはじめとするダイネミシン；エスペラミシン；並びにネオカルチノスタチン発色団及び関連色素タンパク質エンジイン抗生物質（ａｎｔｉｏｂｉｏｔｉｃ）発色団）、アクラシノマイシン（ａｃｌａｃｉｎｏｍｙｓｉｎｓ）、アクチノマイシン、オートラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン（ｃｈｒｏｍｏｍｙｃｉｎｉｓ）、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、６－ジアゾ－５－オキソ－Ｌ－ノルロイシン、ドキソルビシン（ＡＤＲＩＡＭＹＣＩＮ（登録商標）、モルホリノ－ドキソルビシン、シア

ノモルホリノ－ドキソルビシン、２－ピロリノ－ドキソルビシン、ドキソルビシンＨＣｌリポソーム注射（ドキシル（登録商標））、及びデオキシドキソルビシンをはじめとする）、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシンなどのマイトマイシンＣ、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン；メトトレキサート、ゲムシタビン（ＧＥＭＺＡＲ（登録商標））、テガフール（ＵＦＴＯＲＡＬ（登録商標））、カペシタビン（ＸＥＬＯＤＡ（登録商標））、エポチロン、及び５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）などの代謝拮抗薬；デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトレキサートなどの葉酸類似体；フルダラビン、６－メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなどのプリン類似体；アンシタビン、アザシチジン、６－アザウリジン、カルモフール、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジンなどのピリミジン類似体；カルステロン、プロピオン酸ドロモスタロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなどのアンドロゲン；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなどの抗アドレナリン薬；フォリン酸（ｆｒｏｌｉｎｉｃ）などの葉酸補給剤；アセグラトン；アルドホスファミド配糖体；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ビサントレン；エダトレキサート（ｅｄａｔｒａｘａｔｅ）；デフォファミン；デメコルシン；ジアジコン；エルフォルミチン；酢酸エリプチニウム；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン（ｌｏｎｉｄａｉｎｉｎｅ）；メイタンシン及びアンサミトシンなどのメイタンシノイド；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール（ｍｏｐｉｄａｎｍｏｌ）；ニトラミン（ｎｉｔｒａｅｒｉｎｅ）；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ロソキサントロン；２－エチルヒドラジド；プロカルバジン；ＰＳＫ（登録商標）多糖類複合体ＪＨＳ Ｎａｔｕｒａｌ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ，Ｅｕｇｅｎｅ，Ｏｒｅｇ．）；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；２，２’，２”－トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（特にＴ－２トキシン、ベラクリンＡ、ロリジンＡ、及びアングイジン）；ウレタン；ビンデシン（ＥＬＤＩＳＩＮＥ（登録商標）、ＦＩＬＤＥＳＩＮ（登録商標））；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポブロマン；ガシトシン；アラビノシド（「Ａｒａ－Ｃ」）；チオテパ；例えば、パクリタキセル（ＴＡＸＯＬ（登録商標））、パクリタキセル（ＡＢＲＡＸＡＮＥＴ（商標））のアルブミン操作ナノ粒子製剤、及びドセタキセル（ｄｏｘｅｔａｘｅｌ）（ＴＡＸＯＴＥＲＥ（登録商標））などのタキソイド；クロラムブシル（ｃｈｌｏｒａｎｂｕｃｉｌ；６－チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；シスプラチン及びカルボプラチンなどの白金類似体；ビンブラスチン（ＶＥＬＢＡＮ（登録商標））；白金；エトポシド（ＶＰ－１６）；イホスファミド；ミトキサントロン；ビンクリスチン（ＯＮＣＯＶＩＮ（登録商標））；オキサリプラチン；ロイコボリン（ｌｅｕｃｏｖｏｖｉｎ）；ビノレルビン（ＮＡＶＥＬＢＩＮＥ（登録商標））；ノバントロン；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；シクロスポリン、シロリムス、ラパマイシン、ラパログ、イバンドロネート；トポイソメラーゼ阻害剤ＲＦＳ２０００；ジフルオロメチルオルニチン（ＤＭＦＯ）；レチノイン酸などのレチノイド；シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、及びプレドニゾロンの併用療法の略語であるＣＨＯＰと、オキサリプラチン（ＥＬＯＸＡＴＩＮ（商標））と、５－ＦＵ、ロイコボリン（ｌｅｕｃｏｖｏｖｉｎ）との併用療法の略語であるＦＯＬＦＯＸ；例えば、タモキシフェン（ＮＯＬＶＡＤＥＸ（登録商標）タモキシフェン）、ラロキシフェン（ＥＶＩＳＴＡ（登録商標）をはじめとする）、ドロロキシフェン、４－ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、ＬＹ１１７０１８、オナプリストン、及びトレミフェン（ＦＡＲＥＳＴＯＮ（登録商標））をはじめとする、抗エストロゲン及び選択的エストロゲン受容体調節因子（ＳＥＲＭ）；抗プロゲステロン；エストロゲン受容体ダウンレギュレーター（ＥＲＤ）；フルベストラント（フェソロデックス（登録商標））などの

エストロゲン受容体拮抗薬；例えば、酢酸ロイプロリド（ＬＵＰＲＯＮ（登録商標）及びＥＬＩＧＡＲＤ（登録商標））、酢酸ゴセレリン、酢酸ブセレリン、及びトリプトレリン（ｔｒｉｐｔｅｒｅｌｉｎ）などの黄体形成（ｌｅｕｔｉｎｉｚｉｎｇ）ホルモン放出ホルモン（ＬＨＲＨ）作動薬などの卵巣を抑制又は停止させるように機能する薬剤；フルタミド、ニルタミド、及びビカルタミドなどのその他の抗アンドロゲン；及び例えば、４（５）－イミダゾール、アミノグルテチミド、酢酸メゲストロール（ＭＥＧＡＳＥ（登録商標））、エキセメスタン（ＡＲＯＭＡＳＩＮ（登録商標））、フォルメスタニー、ファドロゾール、ボロゾール（ＲＩＶＩＳＯＲ（登録商標））、レトロゾール（ＦＥＭＡＲＡ（登録商標））、及びアナストロゾール（ＡＲＩＭＩＤＥＸ（登録商標））などの、副腎におけるエストロゲン産生を制御する、酵素アロマターゼを抑制する、アロマターゼ阻害剤；クロドロネート（例えば、ＢＯＮＥＦＯＳ（登録商標）又はＯＳＴＡＣ（登録商標））、エチドロネート（ＤＩＤＲＯＣＡＬ（登録商標））、ＮＥ－５８０９５、ゾレドロン酸／ゾレドロネート（ＺＯＭＥＴＡ（登録商標））、アレンドロネート（ＦＯＳＡＭＡＸ（登録商標））、パミドロネート（ＡＲＥＤＩＡ（登録商標））、チルドロネート（ＳＫＥＬＩＤ（登録商標））、又はリセドロネート（ＡＣＴＯＮＥＬ（登録商標））などのビスホスホネート；トロキサシタビン（１，３－ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体）；例えば、その全体が参照により本明細書に援用される米国特許第６，３４４，３２１号明細書に記載される、アプタマー；抗ＨＧＦモノクローナル抗体（例えば、Ａｖｅｏからのａｖ２９９、ＡｍｇｅｎからのＡＭＧ１０２）；短縮型ｍＴＯＲ変異型（例えば、Ｃｏｍｐｕｇｅｎからのｃｇｅｎ２４１）；ｍＴＯＲ誘導経路を遮断するプロテインキナーゼ阻害剤（例えば、ＡｒｑｕｌｅからのＡＲＱ１９７、ＥｘｅｌｅｘｉｓからのＸＬ８８０、ＳＧＸ　ＰｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓからのＳＧＸ５２３、Ｓｕｐｅｒｇｅｎからのｍｐ４７０、ＰｆｉｚｅｒからのＰＦ２３４１０６６）；ＴＨＥＲＡＴＯＰＥ（登録商標）ワクチンと、例えば、ＡＬＬＯＶＥＣＴＩＮ（登録商標）ワクチン、ＬＥＵＶＥＣＴＩＮ（登録商標）ワクチン、及びＶＡＸＩＤ（登録商標）ワクチンなどの遺伝子療法ワクチンなどのワクチン；トポイソメラーゼ１阻害剤（例えば、ＬＵＲＴＯＴＥＣＡＮ（登録商標））；ｒｍＲＨ（例えば、ＡＢＡＲＥＬＩＸ（登録商標））；ラパチニブジトシレート（ＧＷ５７２０１６としても知られている、ＥｒｂＢ－２及びＥＧＦＲ二重チロシンキナーゼ小分子阻害剤）；セレコキシブなどのコックス－２阻害剤（セレブレックス（登録商標））；４－（５－（４－メチルフェニル）－３－（トリフルオロメチル）－１Ｈ－ピラゾール－１－イル）ベンゼンスルホンアミド；及び上記のいずれかの薬学的に許容可能な塩、酸、又は誘導体が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【０４２３】

本開示の方法本開示の組成物及び方法と共に使用するのに適した、がんの治療に有効なその他の化合物は、当該技術分野で公知であり、本明細書に記載されており、例えば、関連する部分に参照により本明細書に援用される、“Ｐｈｙｓｉｃｉａｎｓ　Ｄｅｓｋ　Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ，６２ｎｄ　ｅｄｉｔｉｏｎ．Ｏｒａｄｅｌｌ，Ｎ．Ｊ．：Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｅｃｏｎｏｍｉｃｓ　Ｃｏ．，２００８”，Ｇｏｏｄｍａｎ　＆　Ｇｉｌｍａｎ’ｓ“Ｔｈｅ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｂａｓｉｓ　ｏｆ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｅｌｅｖｅｎｔｈ　Ｅｄｉｔｉｏｎ．ＭｃＧｒａｗ－Ｈｉｌｌ，２００５”，“Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ　ｏｆ　Ｐｈａｒｍａｃｙ，２０ｔｈ　Ｅｄｉｔｉｏｎ．Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，Ｍｄ．：Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ　Ｗｉｌｌｉａｍｓ　＆　Ｗｉｌｋｉｎｓ，２０００．”、及び“Ｔｈｅ　Ｍｅｒｃｋ　Ｉｎｄｅｘ，Ｆｏｕｒｔｅｅｎｔｈ　Ｅｄｉｔｉｏｎ．Ｗｈｉｔｅｈｏｕｓｅ　Ｓｔａｔｉｏｎ，Ｎ．Ｊ．：Ｍｅｒｃｋ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，２００６”に記載される。

【０４２４】

本明細書で引用される全ての刊行物、特許、及び特許出願は、上記又は下記を問わず、それらの内容全体が本明細書に参照により援用される。

【０４２５】

本明細書全体を通じて、文脈上別段の必要がない限り、「含んでなる（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」、「含んでなる（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」、及び「含んでなる（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」という言葉は、記載されたステップ又は要素、又はステップ又は要素のグループを含むことを暗示するが、いかなるその他のステップ又は要素、又はステップ又は要素のグループの除外も暗示しないものと理解される。「からなる」は、「からなる」という語句に続くものを含み、それに限定されることを意味する。したがって、「からなる」という語句は、列挙された要素が必要又は必須であり、その他の要素が存在しなくてもよいことを示す。「から本質的になる」は、語句の後に列挙された要素を含むことを意味し、列挙された要素についての開示で指定された活性又は作用を妨害したり、それに寄与したりしないその他の要素に限定される。したがって、「から本質的になる」という語句は、列挙された要素が要求され又は必須であるが、その他の要素は任意選択的でなく、列挙された要素の活性又は作用に影響を与えるかどうかに応じて、存在しても存在しなくてもよいこと示す。

【０４２６】

上記の様々な実施形態を組み合わせて、さらなる実施形態が提供され得る。本仕様書で言及され、出願データシートに列挙される、全ての米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願、及び非特許刊行物は、それらの全体が参照により本明細書に援用される。例えば、本明細書で提供されるＮＣＢＩヌクレオチド又はタンパク質データベース入力項目などのデータベース入力項目の内容は、それらの全体が本明細書に援用される。データベース入力項目が時間経過と共に変更される可能性がある場合、本出願の出願日現在の内容は、参照により本明細書に援用される。実施形態の態様は、必要に応じて、様々な特許、出願、及び刊行物の概念を用いてさらに別の実施形態を提供するように修正され得る。

【０４２７】

これら及びその他の変更は、上記の詳細な説明に照らして実施形態に照らして行い得る。一般に、以下の特許請求の範囲において、使用されている用語は、明細書及び特許請求の範囲に開示されている特定の実施形態に特許請求の範囲を限定すると解釈されるべきではなく、このような特許請求の範囲が権利を有する完全な範囲の等価物と共に、全ての可能な実施形態を含むものと解釈されるべきである。したがって、特許請求の範囲は開示によって制限されない。

【実施例】

【０４２８】

以下の実施例は単なる例示であり、本開示の範囲又は内容をどのようにも限定することは意図されない。

【０４２９】

実施例１：ｉＰＳ細胞からの改変ｉＮＫ細胞の生成

複雑な編集ストラテジーを実施するためのｉＰＳ細胞技術の使用と、引き続くｉＮＫ細胞又はその他のリンパ球の誘導により、例えば、メソテリン、ＥＧＦＲ、ＨＥＲ２、及びＭＩＣＡ／Ｂなどの目的のＣＡＲを発現し、及び／又はリストＡ及び／又は表１０からの１つ又は複数の編集と、リストＢ及び／又は表１１からの１つ又は複数の編集とを有する、ｉＮＫ細胞の生成が可能となる。

【０４３０】

リストＡ：

・　例えば、ｈｎＣＤ１６ａ（ＣＤ１６の高親和性、切断不能な変異型－抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）に関与する低親和性Ｆｃｙ受容体）などのＣＤ１６の増強された変異型の外因性発現。典型的には、ＣＤ１６はＡＤＣＣ中にプロテアーゼによって切断され、ｈｎＣＤ１６　ＣＡＲはこの切断を受けないため、ＡＤＣＣシグナルをより長く維持する。

・　ＩＬ－１５／ＩＬ１５ＲＡの外因性発現

・　ＴＧＦｂＲ２の機能喪失、又はＴＧＦｂＲ２のドミナントネガティブ変異型の外因性発現（ドミナントネガティブＴＧＦβ受容体ＩＩは、（ｉＰＳ細胞に由来し得て、典型的

には、それからヘム系統（ＮＫ細胞同様に）が分化する細胞型として機能する）ＣＤ３４細胞の分化におけるＴＧＦｂＲＩＩの役割に干渉しないように、ＮＫ特異的プロモーターから発現される）
・　ＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失
【０４３１】
リストＢ：
・　Ｂ２Ｍの機能喪失（例えば、Ｂ２Ｍ発現を標的化することによりＭＨＣクラスＩ発現を排除する）ＨＬＡ－Ｇの外因性発現
・　ＣＩＩＴＡの機能喪失（例えば、ＣＩＩＴＡを標的化することによりＭＨＣクラスＩＩ発現を排除する）
・　ＰＤ１の機能喪失
・　ＴＩＧＩＴの機能喪失
・　ＣＩＳＨ（サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質）機能喪失
【０４３２】
機能喪失は、好ましくは、それぞれのタンパク質の表面発現の完全な排除を含む。
【０４３３】
例えば、ＣＡＲ及びＣＤ１６変異型（例えば、ｈｎＣＤ１６）を外因的に発現するｉＮＫ細胞、又はＣＡＲを発現するがＣＤ１６変異型を発現しないｉＮＫ細胞を作製し得る。ＣＡＲを発現するがＣＤ１６変異型を発現しない細胞もまた、作製し得る。ＣＤ１６又はその増強された変異型（例えば、ｈｎＣＤ１６）を発現する任意の細胞は、モノクローナル抗体（例えば、癌治療で使用される）との、又は病的細胞を標的化するＦｃ融合タンパク質との併用療法に適している。
【０４３４】
２つを超える導入遺伝子がノックインされる場合、導入遺伝子毎に個別のコンストラクトを挿入する必要を避けるために、マルチシストロン性発現コンストラクト、又は２Ａコンストラクトが有利であってもよい。
【０４３５】
このようなｉＮＫ細胞は、例えば、特定の形態のがんなどの増殖性疾患の治療をはじめとするが、これらに限定されるものではない、広範な免疫療法用途に有用である。上で概説したＣＡＲを使用する場合、乳がん、結腸がん、胃がん、腎細胞がん、及びＮＳＣＬＣにおける応用が想定される。このような細胞の表面分子のレパートリーが変化すれば、現在のＮＫ細胞ベースのストラテジーでは困難と証明されている、固形腫瘍の成功裏の治療が可能になるであろう。
【０４３６】
再プログラム化された体細胞（又はそれらの娘細胞）から得られた例示的なｉＮＫ細胞は、以下の特徴のうちの１つ又は複数（例えば、１つ以上、２つ以上、３つ以上、４つ以上、５つ以上、又は６つ以上）を含んでなる：
－　それらは、再配列された内在性ＴＣＲ遺伝子座（例えば、ＴＣＲａ　ＶＪ及び／又はＴＣＲｆ３　Ｖ（Ｄ）Ｊセクションの再配列及び完全なＶドメインエクソン）を含んでなり；
－　それらは例えば、ＣＤ３、ＣＤ４、及び／又はＣＤ８などの内在性Ｔ細胞補助受容体を発現せず；
－　それらは例えば、以下のようなＮＫ－細胞バイオマーカーを発現し；
・　ＣＤ５６（ＮＣＡＭ）、ＣＤ４９、及び／又はＣＤ４５；
・　ＮＫ細胞受容体免疫グロブリンγＦｃ領域受容体ＩＩＩ（ＦｃγＲＩＩＩ，分化抗原群１６（ＣＤ１６））；
・　ナチュラルキラーグループ２メンバー０（ＮＫＧ２Ｄ、ＭＩＣＡＩＢストレスリガンド受容体）；
・　ＣＤ６９；
・　天然細胞傷害性受容体（例えば、ＮＫｐ３０；ＮＫｐ４４；ＮＫｐ４６；及び／又は

ＣＤ１５８ｂ）；又はこれらの２つの以上の任意の組み合わせ；
－それらは以下を発現してもよい：
・　キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、
・免疫グロブリンγＦｃ領域受容体ＩＩＩ（ＦｃγＲＩＩＩ、ＣＤ１６）の非天然変異型
・　例えば、インターロイキン－１５（ＩＬ－１５）、インターロイキン１５受容体（ＩＬ－１５Ｒ）若しくはその変異型（例えば、ＩＬ－１５Ｒの構成的に活性な変異型、例えば、ＩＬ－１５Ｒ作動薬に融合したＩＬ－１５Ｒ（ＩＬ－１５ＲＡ）などのインターロイキン１５（ＩＬ－１５）経路作動薬；代替又はＩＬ－１５経路アゴニストとの組み合わせのいずれかでの、例えば、インターロイキン２（ＩＬ－２）経路作動薬、例えば、ＩＬ－２、インターロイキン２受容体（ＩＬ－２Ｒ）若しくはその変異型（例えば、ＩＬ－２Ｒの構成的に活性な変異型、例えば、ＩＬ－２Ｒ作動薬に融合したＩＬ－２Ｒ（ＩＬ－２ＲＡ）などその他のインターロイキン経路作動薬もまた想定され；及び／又は例えば、ＩＬ－１２、インターロイキン１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）若しくはその変異型（例えば、ＩＬ－１２Ｒの構成的に活性な変異型、例えば、ＩＬ－１２Ｒ作動薬に融合したＩＬ－１２Ｒ（ＩＬ－１２ＲＡ）などのインターロイキン１２（ＩＬ１２）経路作動薬；例えば、例えば、ＩＬ－１５Ｒ作動薬に融合したＩＬ－１５Ｒ（ＩＬ－１５ＲＡ）と組み合わされた、ＩＬ－１２Ｒに融合したＩＬ－１２Ｒ作動薬（ＩＬ－１５ＲＡ）などのＩＬ－１５経路作動薬又はＩＬ－２作動薬及びＩＬ－１２作動薬の組み合わせなど、２つ以上のインターロイキンの組み合わせもまた想定され；
・　ヒト白血球抗原Ｇ（ＨＬＡ－Ｇ）；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせ；
・　ヒト白血球抗原Ｅ（ＨＬＡ－Ｅ）
・　白血球表面抗原分化抗原群ＣＤ４７（ＣＤ４７）
・　及び
－　それらは以下の機能喪失を示してもよい：
・　形質転換成長因子β受容体２（ＴＧＦβＲ２、例えば、コード化配列の改変又はドミナントネガティブ変異型の発現のどちらかによる）；
・　アデノシンＡ２ａ受容体（ＡＤＯＲＡ２Ａ）；
・　Ｉｇ及びＩＴＩＭドメインを備えたＴ細胞免疫受容体（ＴＩＧＩＴ）；
・　β－２ミクログロブリン（ｍｉｃｒｏｇｏｂｕｌｉｎ）（Ｂ２Ｍ）；
・　クラスＩＩ、主要組織適合性複合体、トランス活性化因子（ＣＩＩＴＡ）；
・プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１、ＣＤ２７９）、又はＰＤ－１拮抗薬発現；
・　サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）；
・　ナチュラルキラー細胞受容体ＮＫＧ２Ａ（ナチュラルキラーグループ２Ａ）；
・　２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子、及び／又は２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子；
・　分化抗原群３２Ｂ（ＣＤ３２Ｂ、ＦＣＧＲ２Ｂ）；
・　又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせ。

【０４３７】

編集の数を最小限に抑えることによって、例えば、ＣＡＲ、ＩＬ－１５、及びＨＬＡ－Ｇを発現し、Ｂ２Ｍ及びＰＤ－１で機能喪失を示すｉＮＫ細胞など、これらの特性の特定の組み合わせを達成することが望ましい。例えば、ＣＡＲをコード化する発現コンストラクトをＢ２Ｍ遺伝子座に挿入し得て、ＩＬ－１５及びＨＬＡ－Ｇをコード化する発現コンストラクトをＢ２Ｍ遺伝子座に挿入し得る。同様のストラテジーが、その他の組み合わせにも適用される。

【０４３８】

ｉＮＫ細胞は単剤療法として使用され得て、ＣＡＲを発現するもの（例えば、ＣＡＲ結合メソテリン、ＥＧＦＲ、又はＨＥＲ２）は、ＣＡＲが結合する表面抗原を発現する細胞を特異的に標的化する治療アプローチに特に適している。想定されるいくつかのｉＮＫ細胞はまた、例えば、がん細胞を標的化するモノクローナル抗体との組み合わせで、併用療法アプローチに適してもよい。

【０４３９】
いくつかの実施形態では、ｉＰＳ細胞の生成は、例えば、健常ドナー個人からの体細胞などのドナー細胞を得ることを含むであろう。いくつかの実施形態では、ドナー細胞又は細胞集団は、核型的に正常であり、例えば、悪性状態などの病理学的状態に関連することが知られている遺伝子又は遺伝子の組み合わせの発現を示さないことが確認される。いくつかの実施形態では、体細胞は編集され、次に、万能性状態に再プログラム化される。いくつかの実施形態では、体細胞は再プログラム化されるのと同時に編集される。いくつかの実施形態では、体細胞が再プログラム化され、その結果生じる万能性細胞が編集される。いくつかの実施形態では、ｉＰＳ細胞の生成は、再プログラム化された細胞株のクローン増殖、このようなクローン化されたｉＰＳ細胞株の特性評価、及び核型的に正常でありながら所望の編集を全て含む細胞株の選択を含んでなる。
【０４４０】
臨床使用のための最終製品は、それぞれの編集を有するｉＮＫ細胞の集団である。細胞の数は、対象への投与後に所望の免疫応答を誘発するのに十分であろう。正確な数は、その他の要因の中でもとりわけ、特定の望ましい臨床転帰、患者、及び治療される疾患に依存し、非常に様々であってもよい。投与に適した細胞集団は、約１，０００細胞～約１億細胞の範囲であってもよいと予想される。臨床使用のためのｉＮＫ細胞集団は、例えば、Ｏｃｔ－４及び／又はＳｏｘ２を発現するｉＰＳ細胞含非含有など、幹細胞非含有でなければならず、理想的には、例えば、Ｔ細胞の再プログラム化中に使用されるエピソーム発現コンストラクトなど、エピソーム発現コンストラクトを保有する細胞を含まないか、最小限の量しか含まない必要があり；細胞マーカーと過剰発現した表面分子との望ましい組み合わせを発現しない細胞を含まないか、又は１％、５％、又は１０％を超えて含まない必要がある。
【０４４１】
実施例２：複雑な編集ストラテジーと引き続くｉＮＫ細胞の誘導のための起源細胞としてのＴ細胞の使用
例えば、複雑な編集ストラテジーの起源細胞としてのＴ細胞の使用と、それに続くｉＮＫ細胞又はその他のリンパ球の誘導は、メソテリン、ＥＧＦＲ、ＨＥＲ２、及びＭＩＣＡ／Ｂなどの目的のＣＡＲを発現し、及び／又はリストＡ及び／又は表１０からの１つ又は複数の編集、及び／又はリストＢ及び／又は表１１からの１つ又は複数の編集を有する、ｉＮＫ細胞の生成を可能にする。
【０４４２】
リストＡ：
・　例えば、ｈｎＣＤ１６ａ（ＣＤ１６の高親和性、切断不能な変異型－抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）に関与する低親和性Ｆｃｙ受容体）などのＣＤ１６の増強された変異型の外因性発現。典型的には、ＣＤ１６はＡＤＣＣ中にプロテアーゼによって切断され、ｈｎＣＤ１６　ＣＡＲはこの切断を受けないため、ＡＤＣＣシグナルをより長く維持する。
・　ＩＬ－１５／ＩＬ１５ＲＡの外因性発現
・　ＴＧＦｂＲ２の機能喪失、又はＴＧＦｂＲ２のドミナントネガティブ変異型の外因性発現（ドミナントネガティブＴＧＦβ受容体ＩＩは、（ｉＰＳ細胞に由来し得て、典型的には、それからヘム系統（ＮＫ細胞同様に）が分化する細胞型として機能する）ＣＤ３４細胞の分化におけるＴＧＦｂＲＩＩの役割に干渉しないように、ＮＫ特異的プロモーターから発現される）
・　ＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失
【０４４３】
リストＢ：
・　Ｂ２Ｍの機能喪失（例えば、Ｂ２Ｍ発現を標的化することによりＭＨＣクラスＩ発現を排除する）ＨＬＡ－Ｇの外因性発現
・　ＣＩＩＴＡの機能喪失（例えば、ＣＩＩＴＡを標的化することによりＭＨＣクラスＩＩ発現を排除する）

・　ＰＤ１の機能喪失
・　ＴＩＧＩＴの機能喪失
・　ＣＩＳＨ（サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質）機能喪失
【０４４４】
機能喪失は、好ましくは、それぞれのタンパク質の表面発現の完全な排除を含む。
【０４４５】
例えば、ＣＡＲ及びＣＤ１６変異型（例えば、ｈｎＣＤ１６）を外因的に発現するｉＮＫ細胞、又はＣＡＲを発現するがＣＤ１６変異型を発現しないｉＮＫ細胞を作製し得る。ＣＡＲを発現しないがＣＤ１６変異型を発現する細胞もまた、作製し得る。ＣＤ１６又はその増強された変異型（例えば、ｈｎＣＤ１６）を発現する任意の細胞は、モノクローナル抗体（例えば、癌治療で使用される）との、又は病的細胞を標的化するＦｃ融合タンパク質との併用療法に適している。
【０４４６】
２つを超える導入遺伝子がノックインされる場合、導入遺伝子毎に個別のコンストラクトを挿入する必要を避けるために、マルチシストロン性発現コンストラクト、又は２Ａコンストラクトが有利であってもよい。
【０４４７】
このようなｉＮＫ細胞は、例えば、特定の形態のがんなどの増殖性疾患の治療をはじめとするが、これらに限定されるものではない、広範な免疫療法用途に有用である。上で概説したＣＡＲを使用する場合、乳がん、結腸がん、胃がん、腎細胞がん、及びＮＳＣＬＣにおける応用が想定される。このような細胞の表面分子のレパートリーが変化すれば、現在のＮＫ細胞ベースのストラテジーでは困難と証明されている、固形腫瘍の成功裏の治療が可能になるであろう。
【０４４８】
再プログラム化／編集されたＴ細胞（又はそれらの娘細胞）から得られた例示的なｉＮＫ細胞は、以下の特徴のうちの１つ又は複数（例えば、１つ以上、２つ以上、３つ以上、４つ以上、５つ以上、又は６つ以上）を含んでなる：
－　それらは、再配列された内在性ＴＣＲ遺伝子座（例えば、ＴＣＲａ　ＶＪ及び／又はＴＣＲｆ３　Ｖ（Ｄ）Ｊセクションの再配列及び完全なＶドメインエクソン）を含んでなり；
－　それらは例えば、ＣＤ３、ＣＤ４、及び／又はＣＤ８などの内在性Ｔ細胞補助受容体を発現せず；
－　それらは例えば、以下のようなＮＫ－細胞バイオマーカーを発現し；
・　ＣＤ５６（ＮＣＡＭ）、ＣＤ４９、及び／又はＣＤ４５；
・　ＮＫ細胞受容体免疫グロブリンγＦｃ領域受容体ＩＩＩ（ＦｃγＲＩＩＩ，分化抗原群１６（ＣＤ１６））；
・　ナチュラルキラーグループ２メンバー０（ＮＫＧ２Ｄ、ＭＩＣＡＩＢストレスリガンド受容体）；
・　ＣＤ６９；
・　天然細胞傷害性受容体（例えば、ＮＫｐ３０；ＮＫｐ４４；ＮＫｐ４６；及び／又はＣＤ１５８ｂ）；又はこれらの２つの以上の任意の組み合わせ；
－　それらは以下を発現してもよい：
・　キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、
・免疫グロブリンγＦｃ領域受容体ＩＩＩ（ＦｃｙＲＩＩＩ、ＣＤ１６）の非天然変異型
・　インターロイキン１５（ＩＬ－１５）経路作動薬、例えば、インターロイキン－１５（ＩＬ－１５）、インターロイキン１５受容体（ＩＬ－１５Ｒ）若しくはその変異型（例えば、ＩＬ－１５Ｒ作動薬に融合したＩＬ－１５Ｒ（ＩＬ－１５ＲＡ）などのＩＬ－１５Ｒの構成的に活性な変異型；代替又はＩＬ－１５経路アゴニストとの組み合わせのいずれかでの、例えば、インターロイキン２（ＩＬ－２）経路作動薬、例えば、ＩＬ－２、インターロイキン２受容体（ＩＬ－２Ｒ）若しくはその変異型（例えば、ＩＬ－２Ｒの構成的

に活性な変異型、例えば、ＩＬ－２Ｒ作動薬に融合したＩＬ－２Ｒ（ＩＬ－２ＲＡ）などその他のインターロイキン経路作動薬もまた想定され；及び／又は例えば、ＩＬ－１２、インターロイキン１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）若しくはその変異型（例えば、ＩＬ－１２Ｒの構成的に活性な変異型、例えば、ＩＬ－１２Ｒ作動薬に融合したＩＬ－１２Ｒ（ＩＬ－１２ＲＡ）などのインターロイキン１２（ＩＬ１２）経路作動薬；例えば、例えば、ＩＬ－１５Ｒ作動薬に融合したＩＬ－１５Ｒ（ＩＬ－１５ＲＡ）と組み合わされた、ＩＬ－１２Ｒに融合したＩＬ－１２Ｒ作動薬（ＩＬ－１５ＲＡ）などのＩＬ－１５経路作動薬又はＩＬ－２作動薬及びＩＬ－１２作動薬の組み合わせなど、２つ以上のインターロイキンの組み合わせもまた想定され；

・　ヒト白血球抗原Ｇ（ＨＬＡ－Ｇ）；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせ；
・　ヒト白血球抗原Ｅ（ＨＬＡ－Ｅ）
・　白血球表面抗原分化抗原群ＣＤ４７（ＣＤ４７）
・　及び
－　それらは以下の機能喪失を示してもよい：
・　形質転換成長因子β受容体２（ＴＧＦｆ３Ｒ２、例えば、コード化配列の改変又はドミナントネガティブ変異型の発現のどちらかによる）；
・　アデノシンＡ２ａ受容体（ＡＤＯＲＡ２Ａ）；
・　Ｉｇ及びＩＴＩＭドメインを備えたＴ細胞免疫受容体（ＴＩＧＩＴ）；
・　β－２ミクログロブリン（ｍｉｃｒｏｇｏｂｕｌｉｎ）（Ｂ２Ｍ）；
・　クラスＩＩ、主要組織適合性複合体、トランス活性化因子（ＣＩＩＴＡ）；
・プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１、ＣＤ２７９）、又はＰＤ－１拮抗薬発現；
・　サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）；
・　ナチュラルキラー細胞受容体ＮＫＧ２Ａ（ナチュラルキラーグループ２Ａ）；
・　２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子、及び／又は２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子；
・　分化抗原群３２Ｂ（ＣＤ３２Ｂ、ＦＣＧＲ２Ｂ）；
・　Ｔ細胞受容体αコンスタント（ＴＲＡＣ）；
・　又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせ。

【０４４９】

編集の数を最小限に抑えることによって、例えば、ＣＡＲ、ＩＬ－１５、及びＨＬＡ－Ｇを発現し、Ｂ２Ｍ及びＰＤ－１で機能喪失を示すｉＮＫ細胞など、これらの特性の特定の組み合わせを達成することが望ましい。例えば、ＣＡＲをコード化する発現コンストラクトをＢ２Ｍ遺伝子座に挿入し得て、ＩＬ－１５及びＨＬＡ－Ｇをコード化する発現コンストラクトをＢ２Ｍ遺伝子座に挿入し得る。同様のストラテジーが、その他の組み合わせにも適用される。

【０４５０】

ｉＮＫ細胞は単剤療法として使用され得て、ＣＡＲを発現するもの（例えば、ＣＡＲ結合メソテリン、ＥＧＦＲ、又はＨＥＲ２）は、ＣＡＲが結合する表面抗原を発現する細胞を特異的に標的化する治療アプローチに特に適している。想定されるいくつかのｉＮＫ細胞はまた、例えば、がん細胞を標的化するモノクローナル抗体との組み合わせで、併用療法アプローチに適してもよい。

【０４５１】

ｉＰＳ細胞の生成は、再プログラム化された細胞株のクローン増殖、このようなクローン化されたｉＰＳ細胞株の特性評価、及び核型的に正常でありながら所望の編集を全て含む細胞株の選択を含むであろう。

【０４５２】

臨床使用のための最終製品は、それぞれの編集を有するｉＮＫ細胞の集団である。細胞の数は、対象への投与後に所望の免疫応答を誘発するのに十分であろう。正確な数は、その他の要因の中でもとりわけ、特定の望ましい臨床転帰、患者、及び治療される疾患に依存し、非常に様々であってもよい。投与に適した細胞集団は、約１，０００細胞～約１億細

胞の範囲であってもよいと予想される。臨床使用のためのｉＮＫ細胞集団は、例えば、Ｏｃｔ－４及び／又はＳｏｘ２を発現するｉＰＳ細胞含非含有など、幹細胞非含有でなければならず、理想的には、例えば、Ｔ細胞の再プログラム化中に使用されるエピソーム発現コンストラクトなど、エピソーム発現コンストラクトを保有する細胞を含まないか、最小限の量しか含まない必要があり；細胞マーカーと過剰発現した表面分子との望ましい組み合わせを発現しない細胞を含まないか、又は１％、５％、又は１０％を超えて含まない必要がある。

【０４５３】

実施例３：臨床応用のためのｉＰＳ／ｉＮＫ細胞

免疫療法としての臨床使用のために、例えば、免疫腫瘍学の応用の文脈において、Ｂ２Ｍの機能喪失；ＣＩＩＴＡの機能喪失；及びＨＬＡ－Ｇをコード化する核酸配列を含んでなる外因性核酸発現コンストラクトを含んでなる、本明細書ではｉＮＫ細胞である改変リンパ球が生成される。これらの編集により、編集された細胞、及び／又はそれに由来する分化ｉＮＫ細胞が、非自己宿主の免疫系から逃れられるようになる。追加的な編集を行って、ｉＮＫ細胞の臨床特性が強化されてもよい。これらのｉＮＫ細胞は、健常ドナーからの体細胞ドナー細胞を再プログラム化し、ドナー細胞を万能性状態に再プログラム化し、所望の編集を行うことによって得られる。ひとたび編集されると、万能性細胞はＮＫ細胞に分化し、臨床応用のために改変ｉＮＫ細胞の集団をもたらす。

【０４５４】

実施例４：臨床応用のためのｉＰＳ／ｉＮＫ細胞

免疫療法としての臨床使用のために、例えば、免疫腫瘍学の応用の文脈において、Ｂ２Ｍの機能喪失；ＣＩＩＴＡの機能喪失；及びＨＬＡ－Ｅをコード化する核酸配列を含んでなる外因性核酸発現コンストラクトを含んでなる、本明細書ではｉＮＫ細胞である改変リンパ球が生成される。いくつかの実施形態では、細胞は、ＮＫＧ２Ａの機能喪失をさらに含んでなる。これらの編集により、編集された細胞、及び／又はそれに由来する分化ｉＮＫ細胞が、非自己宿主の免疫系から逃れられるようになる。追加的な編集を行って、ｉＮＫ細胞の臨床特性が強化されてもよい。これらのｉＮＫ細胞は、健常ドナーからの体細胞ドナー細胞を再プログラム化し、ドナー細胞を万能性状態に再プログラム化し、所望の編集を行うことによって得られる。ひとたび編集されると、万能性細胞はＮＫ細胞に分化し、臨床応用のために改変ｉＮＫ細胞の集団をもたらす。

【０４５５】

実施例５：臨床応用のためのｉＰＳ／ｉＮＫ細胞

免疫療法としての臨床使用のために、例えば、免疫腫瘍学の応用の文脈において、Ｂ２Ｍの機能喪失；ＣＩＩＴＡの機能喪失；及びＣＤ４７をコード化する核酸配列を含んでなる外因性核酸発現コンストラクトを含んでなる、本明細書ではｉＮＫ細胞である改変リンパ球が生成される。これらの編集により、編集された細胞、及び／又はそれに由来する分化ｉＮＫ細胞が、非自己宿主の免疫系から逃れられるようになる。追加的な編集を行って、ｉＮＫ細胞の臨床特性が強化されてもよい。これらのｉＮＫ細胞は、健常ドナーからの体細胞ドナー細胞を再プログラム化し、ドナー細胞を万能性状態に再プログラム化し、所望の編集を行うことによって得られる。ひとたび編集されると、万能性細胞はＮＫ細胞に分化し、臨床応用のために改変ｉＮＫ細胞の集団をもたらす。

【０４５６】

実施例６：臨床応用のためのｉＰＳ／ｉＮＫ細胞

免疫療法としての臨床使用のために、例えば、免疫腫瘍学の応用の文脈において、Ｂ２Ｍの機能喪失；ＨＬＡ－ＤＲＢ１、ＨＬＡ－ＤＲＢ３、ＨＬＡ－ＤＲＢ４、ＨＬＡ－ＤＲＢ５、ＨＬＡ－ＤＱＢ１、及びＨＬＡ－ＤＰＢ１の機能喪失；及びＨＬＡ－Ｇをコード化する核酸配列を含んでなる外因性核酸発現コンストラクトを含んでなる、本明細書ではｉＮＫ細胞である改変リンパ球が生成される。これらの編集により、編集された細胞、及び／又はそれに由来する分化ｉＮＫ細胞が、非自己宿主の免疫系から逃れられるようになる。追加的な編集を行って、ｉＮＫ細胞の臨床特性が強化されてもよい。これらのｉＮＫ細胞

は、健常ドナーからの体細胞ドナー細胞を再プログラム化し、ドナー細胞を万能性状態に再プログラム化し、所望の編集を行うことによって得られる。ひとたび編集されると、万能性細胞はＮＫ細胞に分化し、臨床応用のために改変ｉＮＫ細胞の集団をもたらす。

【０４５７】

実施例７：臨床応用のためのｉＰＳ／ｉＮＫ細胞

免疫療法としての臨床使用のために、例えば、免疫腫瘍学の応用の文脈において、Ｂ２Ｍの機能喪失；ＨＬＡ－ＤＲＢ１、ＨＬＡ－ＤＲＢ３、ＨＬＡ－ＤＲＢ４、ＨＬＡ－ＤＲＢ５、ＨＬＡ－ＤＱＢ１、及びＨＬＡ－ＤＰＢ１の機能喪失；及びＨＬＡ－Ｅをコード化する核酸配列を含んでなる外因性核酸発現コンストラクトを含んでなる、本明細書ではｉＮＫ細胞である改変リンパ球が生成される。いくつかの実施形態では、細胞は、ＮＫＧ２Ａの機能喪失をさらに含んでなる。これらの編集により、編集された細胞、及び／又はそれに由来する分化ｉＮＫ細胞が、非自己宿主の免疫系から逃れられるようになる。追加的な編集を行って、ｉＮＫ細胞の臨床特性が強化されてもよい。これらのｉＮＫ細胞は、健常ドナーからの体細胞ドナー細胞を再プログラム化し、ドナー細胞を万能性状態に再プログラム化し、所望の編集を行うことによって得られる。ひとたび編集されると、万能性細胞はＮＫ細胞に分化し、臨床応用のために改変ｉＮＫ細胞の集団をもたらす。

【０４５８】

実施例８：臨床応用のためのｉＰＳ／ｉＮＫ細胞

免疫療法としての臨床使用のために、例えば、免疫腫瘍学の応用の文脈において、Ｂ２Ｍの機能喪失；ＨＬＡ－ＤＲＢ１、ＨＬＡ－ＤＲＢ３、ＨＬＡ－ＤＲＢ４、ＨＬＡ－ＤＲＢ５、ＨＬＡ－ＤＱＢ１、及びＨＬＡ－ＤＰＢ１の機能喪失；及びＣＤ４７をコード化する核酸配列を含んでなる外因性核酸発現コンストラクトを含んでなる、本明細書ではｉＮＫ細胞である改変リンパ球が生成される。これらの編集により、編集された細胞、及び／又はそれに由来する分化ｉＮＫ細胞が、非自己宿主の免疫系から逃れられるようになる。追加的な編集を行って、ｉＮＫ細胞の臨床特性が強化されてもよい。これらのｉＮＫ細胞は、健常ドナーからの体細胞ドナー細胞を再プログラム化し、ドナー細胞を万能性状態に再プログラム化し、所望の編集を行うことによって得られる。ひとたび編集されると、万能性細胞はＮＫ細胞に分化し、臨床応用のために改変ｉＮＫ細胞の集団をもたらす。

【０４５９】

実施例９：臨床応用のためのｉＰＳ／ｉＮＫ細胞

治療薬としてのｉＮＫ細胞の有効性を増強するために、実施例３～８で提供される細胞に追加的な編集を行う。

【０４６０】

いくつかの実施形態では、これらの編集は、ここではＩＬ－１５Ｒとそのリガンド（ＩＬ－１５、又はそのＩＬ－１５結合断片）との融合体である、ＩＬ－１５Ｒの変異型をコード化する核酸配列を含んでなる外因性核酸発現コンストラクトのノックインを含み、その結果、ｉＮＫ細胞中で構成的に活性なＩＬ－１５経路がもたらされる。

【０４６１】

これらの編集はいくつかの実施形態では、例えば、ＣＤ４５プロモーターなどのＮＫ細胞特異的プロモーターの制御下で、形質転換成長因子β受容体２（ＴＧＦβＲ２）をコード化する核酸配列を含んでなる、外因性核酸発現コンストラクのノックインをさらに含む。

【０４６２】

これらの編集は、いくつかの実施形態では、ＣＤ３２Ｂ（ＦＣＧＲ２）の機能喪失をさらに含む。

【０４６３】

実施例１０：ＣＩＳＨ及び／又はＴＧＦＢＲ２の機能喪失を示す遺伝子編集ＮＫ細胞は腫瘍細胞に応答してエフェクター機能の改善を示す

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃｐｆ１遺伝子編集を使用して次世代の同種異系ＮＫ細胞治療法を開発し、ＣＩＳＨ及びＴＧＦＢＲ２遺伝子のノックアウトを通じてＮＫ細胞機能を強化した。

【０４６４】

ＮＫ細胞は、２０ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１５中のＣＤ３-ＰＢＭＣの培養から増殖させた。遺伝子編集は、異なるＮＫ細胞増殖段階（８～２１日目）で実施した。ＣＩＳＨ及びＴＧＦＢＲ２を編集するために、どちらかの標的のガイドを２：１の比率でＣｐｆ１ヌクレアーゼと複合体化して、リボ核タンパク質（ＲＮＰ）を形成した。細胞を双方の標的で編集する場合、各標的のＲＮＰ複合体形成を別々に実行し、電気穿孔前に１：１の比率で混合した。

【０４６５】

電気穿孔では、ＮＫ細胞をＨｙＣｌｏｎｅ緩衝液に８０×１０^{6}細胞／ｍＬの密度で懸濁した。９０マイクロリットルのＮＫ細胞を１０マイクロリットルの適切なＲＮＰと混合した。次に、電気穿孔のために、細胞とＲＮＰの混合物をＭａｘＣｙｔｅ　ＯＣ－１００又はＯＣ－４００カセットに移した。電気穿孔の直後に、ＮＫ細胞を１００マイクロリットルの培養培地中で３７℃で１０分間回収した後、編集後の回収と機能解析のために２４ウェルＧｒｅｘプレートに移した。

【０４６６】

ＣＩＳＨ及びＴＧＦＢＲ２の編集のために、以下の　ガイドＲＮＡ配列を使用した：どちらのガイドも、ＲＮＡ、標的化ドメインの５’側の配列ＵＡＡＵＵＵＣＵＡＣＵＣＵＵＧＵＡＧＡＵのＡｓＣｐｆスキャフォールド及びスキャフォールドの５’末端の配列ＡＴＧＴＧＴＴＴＧＴＣＡＡＡＡＧＡＣＣＴＴＴＴの２５量体ＤＮＡ伸長からなる標的化ドメインを用いて生成された

【０４６７】

【表４２】

表12:

標的	gRNA標的化ドメイン配列 (DNA)	gRNA配列
CISH 7050	GGTGTACAGCAGTGGCTGGT	ATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrGrGrUrGrUrArCrArGrCrArGrUrGrGrCrUrGrGrU
TGFBR2 24026	TGATGTGAGATTTTCCACCT	ATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrUrGrArUrGrUrGrArGrArUrUrUrUrCrCrArCrCrU

【０４６８】

図１Ａ～１Ｂに実証されるように、ＮＫ細胞では、ＴＧＦＢＲ２及びＣＩＳＨの単一遺伝子及び二重遺伝子の編集が堅牢に達成された。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃｐｆ１を使用したＮＫ細胞でのＴＧＦＢＲ２及びＣＩＳＨの単一及び同時標的化は、双方の標的でＮＫ細胞の８０％以上でインデルを生成し、編集後７２時間で編集済みＮＫ細胞の９０％以上が生存した。

【０４６９】

エフェクター細胞の有効性は３Ｄ腫瘍回転楕円アッセイによって生体外で評価した。

【０４７０】

回転楕円を形成するために、５，０００個のＮｕｃＬｉｇｈｔ　Ｒｅｄ標識ＰＣ－３又はＳＫ－ＯＶ－３腫瘍細胞を超低付着性９６ウェルプレートの単一ウェルにプレーティングし、１，０００ｒｐｍで１０分間遠心分離し、３７℃で９６時間インキュベートした。９６時間後、エフェクター細胞（異なるＲＮＰで処理された初代ヒトＮＫ細胞）を１０ｎｇ／ｍＬのＴＧＦ－βの存在下又は非存在下で、複数のエフェクター対標的細胞の比率で回転楕円添加した。赤色オブジェクトの強度は、Ｉｎｃｕｃｙｔｅイメージングシステムで

６日間にわたり２時間毎に測定された。示されているデータは、エフェクターの追加時の赤色オブジェクトの強度に対して正規化されている。回転楕円の正規化は、正規化されていないデータで観察されたのと同じ有効性パターンを維持する（図２Ａ～２Ｂ）。

【０４７１】

さらに、ＣＩＳＨ　ＫＯ　ＮＫ細胞は、卵巣腫瘍のＳＫ－ＯＶ－３（図３Ａ～３Ｂ、及び図５Ａ）と前立腺腫瘍のＰＣ－３（図４Ａ～４Ｂ、及び図５Ｂ）の回転楕円の成長を、未編集対象と比較して、それぞれ平均２３％と１２％（どちらの場合もｐ＜０．０００１）減少させた。しかし、ＣＩＳＨ　ＫＯ　ＮＫ細胞の活動は、外因性ＴＧＦ－βの添加によって弱められた。

【０４７２】

この観察を踏まえて、ＣＩＳＨ　ＫＯによるＴＧＦ－β受容体遺伝子ＴＧＦＢＲ２のノックアウトが生成された。ＴＧＦＢＲ２の単一ノックアウトは、ＮＫ細胞をＴＧＦβ阻害に対し抵抗性にした（ｐ＜０．０００１）。重要なことに、４つのユニークなドナーと７回の独立した実験にわたって、ＴＧＦＢＲ２／ＣＩＳＨ二重ノックアウト（ＤＫＯ）ＮＫ細胞は、外因性ＴＧＦ－βの補充あり（図３Ａ～３Ｂ及び図４Ａ～４Ｂ）及び外因性ＴＧＦ－βの補充なし（図５Ａ～５Ｂ）で、優れたエフェクター機能を実証し、ＳＫ－ＯＶ－３及びＰＣ－３腫瘍回転楕円の増殖を双方の腫瘍タイプで６０％以上弱めた。これらのエフェクター機能は、対象ＮＫ細胞又はＴＧＦＢＲ２及びＣＩＳＨ単一ノックアウトＮＫ細胞よりも統計的により大きかった（全例でｐ＜０．０００１）。さらに、ＴＧＦＢＲ２／ＣＩＳＨ　ＤＫＯ　ＮＫ細胞は、ＥＬＩＳＡで評価した場合、どちらの場合もより高濃度のＴＮＦ－α（図６Ａ）及びＩＦＮ－γ（図６Ｂ）を生成した。

【０４７３】

二重ＫＯ　ＮＫ細胞は、対象ＮＫ細胞と比較して有意に高いレベルの活性化マーカーＣＤ２５及びＣＤ６９を発現した（図６Ｃ）。

【０４７４】

編集されたＮＫ細胞の抗腫瘍活性は、生体内モデルで測定した。ＮＳＧマウスは、ルシフェラーゼで標識された５０万個のＳＫＯＶ３腫瘍細胞の腹腔内注射を投与された。腫瘍移植の７日後に、１，０００万個の編集された（ＣＩＳＨ／ＴＧＦＢＲ２二重ノックアウト）又は未編集（対照）ＮＫ細胞が、腫瘍保有マウスの腹腔内に注射された。腫瘍量は、ルシフェリンのＩＰ投与とＩＶＩＳイメージングによって毎週モニターされた。３４日目に二元ＡＮＯＶＡ解析を実施して、対照群とＤＫＯ　ＮＫ細胞群の間の統計的有意性を判定した（****、Ｐ＜０．０００１）（図６Ｄ）。

【０４７５】

これらの結果は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃｐｆ１と同時に２つのユニークな標的で初代ヒトＮＫ細胞を効率的に編集することを示す。総合して、単一ノックアウト又は未編集のＮＫ細胞と比較して、生体外及び生体内でのＣＩＳＨ／ＴＧＦＢＲ２　ＤＫＯ初代ヒトＮＫ細胞のエフェクター機能の増加は、ＣＩＳＨ／ＴＧＦＢＲ２　ＤＫＯの増強された相乗効果を示す。

【０４７６】

実施例１１：ＴＩＧＩＴ、ＮＫＧ２Ａ、又はＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失を示す遺伝子編集されたＮＫ細胞は腫瘍細胞に応答してエフェクター機能の改善を示す

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃｐｆ１遺伝子編集を使用して次世代の同種異系ＮＫ細胞療法を開発し、ＴＩＧＩＴ、ＮＫＧ２Ａ、又はＡＤＯＲＡ２Ａ遺伝子のノックアウトを通じてＮＫ細胞機能を強化した。

【０４７７】

ＮＫ細胞は、実施例１０で以前に記載されたように増殖させた。簡潔に述べると、ＮＫ細胞を生体外でＩＬ１５中で１４日間増殖させ、次にそれぞれの標的化ＲＮＰ複合体で編集した。遺伝子編集は、異なるＮＫ細胞増殖段階（８～２１日目）で実施した。ＴＩＧＩＴ、ＮＫＧ２Ａ、又はＡＤＯＲＡ２Ａを編集するために、対応する標的のガイドを２：１の比率でＣｐｆ１ヌクレアーゼと複合体化して、リボヌクレオプロテイン（ＲＮＰ）を形成

した。細胞を双方の標的で編集する場合、各標的のＲＮＰ複合体形成を別々に実行し、電気穿孔前に１：１の比率で混合した。ＮＫ細胞は、実施例１０で以前に記載されたように電気穿孔した。

【０４７８】

以下のガイドＲＮＡ配列は、ＴＩＧＩＴ、ＮＫＧ２Ａ、又はＡＤＯＲＡ２Ａの編集に使用した：

【０４７９】

【表４３】

表13:

標的	gRNA標的化ドメイン配列 (DNA)	gRNA配列
TIGIT	TGCAGAGAAAGGTGGCTCTA	ATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrUrGrCrArGrArGrArArArGrGrUrGrGrCrUrCrUrA
NKG2A	GCAACTGAACAGGAAATAACC	UAAUUUCUACUCUUGUAGAUGCAACUGAACAGGAAAUAACC
ADORA2A	CCTGTGTGCTGGTGCCCCTG	ATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrGrUrGrUrGrGrUrGrCrCrCrCrUrG

【０４８０】

図７Ａ～７Ｃに実証されるように、ＴＩＧＩＴ、ＮＫＧ２Ａ、及びＡＤＯＲＡ２Ａの堅牢な単一遺伝子編集がＮＫ細胞で達成さした。

【０４８１】

３Ｄ腫瘍回転楕円アッセイによって、エフェクター細胞（異なるＲＮＰで処理した初代ヒトＮＫ細胞）の有効性を生体外で評価し、ＴＩＧＩＴ単一ＫＯ（図８Ａ～８Ｂ）、ＮＫＧ２Ａ単一ＫＯ（図９Ａ～９Ｂ）、及びＡＤＯＲＡ２Ａ単一ＫＯ（図１０Ａ～１０Ｂ）の機能を判定した。

【０４８２】

回転楕円を形成するために、５，０００個のＮｕｃＬｉｇｈｔ　Ｒｅｄ標識ＰＣ－３又はＳＫ－ＯＶ－３腫瘍細胞を超低付着性９６ウェルプレートの単一ウェルにプレーティングし、１，０００ｒｐｍで１０分間遠心分離し、３７℃で９６時間インキュベートした。９６時間後、エフェクター細胞（異なるＲＮＰで処理された初代ヒトＮＫ細胞）を１０ｎｇ／ｍＬのＴＧＦ－βの存在下又は非存在下で、複数のエフェクター対標的細胞の比率で回転楕円添加した。赤色オブジェクトの強度は、Ｉｎｃｕｃｙｔｅイメージングシステムで６日間にわたり２時間毎に測定された。示されているデータは、エフェクターの追加時の赤色オブジェクトの強度に対して正規化されている。

【０４８３】

２人のユニークなドナーと２回の独立した実験にわたり、ＴＩＧＩＴ単一ＫＯ（図８Ａ～８Ｂ）、ＮＫＧ２Ａ単一ＫＯ（図９Ａ～９Ｂ）、ＡＤＯＲＡ２Ａ単一ＫＯ（図１０Ａ～１０Ｂ）のＮＫ細胞は優れたエフェクター機能を実証し、ＳＫ－ＯＶ－３及びＰＣ－３の腫瘍回転楕円の成長を弱めた。これらのデータは、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃｐｆ１を使用した３つの独立したユニークな標的での初代ヒトＮＫ細胞の効率的な編集を示し、未編集のＮＫ細胞と比較して、生体外でＴＩＧＩＴ単一ＫＯ、ＮＫＧ２Ａ単一ＫＯ、及びＡＤＯＲＡ２Ａ単一ＫＯ初代ヒトＮＫ細胞のエフェクター機能の増加をもたらす。

【０４８４】

実施例１２：ＣＩＳＨ、ＴＧＦＢＲ２、及びＴＩＧＩＴの機能喪失を示す遺伝子編集ＮＫ細胞は腫瘍細胞に応答してエフェクター機能の改善を示す

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃｐｆ１遺伝子編集を使用して、次世代の同種異系ＮＫ細胞治療法を開発し、ＣＩＳＨ、ＴＧＦＢＲ２、及びＴＩＧＩＴ遺伝子のノックアウトを通じてＮＫ細胞機能を強化した。

【０４８５】

ＮＫ細胞は、実施例１０で以前に記載されたように増殖させた。簡潔に述べると、ＮＫ細胞を生体外でＩＬ１５中で１４日間増殖させ、次にそれぞれの標的化ＲＮＰ複合体で編集した。遺伝子編集は、異なるＮＫ細胞増殖段階（８～２１日目）で実施した。ＣＩＳＨ、ＴＧＦＢＲ２、ＴＩＧＩＴを編集するために、標的のガイドをＣｐｆ１ヌクレアーゼと複合体化してリボ核タンパク質（ＲＮＰ）を形成し、各標的のＲＮＰ複合体形成を別々に実行し、電気穿孔前に１：１の比率で混合した。ＮＫ細胞は、実施例１０で以前に記載されたように電気穿孔した。

【０４８６】

ＣＩＳＨ、ＴＧＦＢＲ２、ＴＩＧＩＴの編集に使用したガイドＲＮＡ配列を以下の表１４に示す：

【０４８７】

【表４４】

表14

標的	gRNA標的化ドメイン配列 (DNA)	gRNA配列
CISH	ACTGACAGCGTGAACAGGTAG	ATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrArCrUrGrArCrArGrCrGrUrGrArArCrArGrGrUrArG
TGFBR2	TGATGTGAGATTTTCCACCT	ATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrUrGrArUrGrUrGrArGrArUrUrUrUrCrCrArCrCrU
TIGIT	TGCAGAGAAAGGTGGCTCTA	ATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrUrGrCrArGrArGrArArArGrGrUrGrGrCrUrCrUrA

【０４８８】

図１１に実証されるように、ＴＧＦＢＲ２、ＣＩＳＨ、及びＴＩＧＩＴの堅牢な三重遺伝子編集がＮＫ細胞で達成された。

【０４８９】

エフェクター細胞の有効性は、３Ｄ腫瘍回転楕円アッセイによって生体外で評価した。

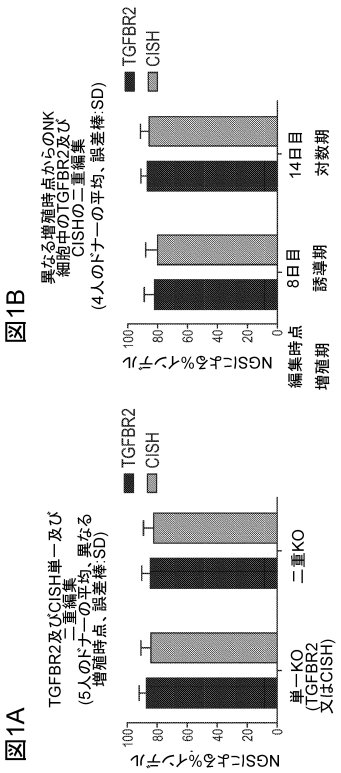
【０４９０】

回転楕円を形成するために、５，０００個のＮｕｃＬｉｇｈｔ　Ｒｅｄ標識ＰＣ－３又はＳＫ－ＯＶ－３腫瘍細胞を超低付着性９６ウェルプレートの単一ウェルにプレーティングし、１，０００ｒｐｍで１０分間遠心分離し、３７℃で９６時間インキュベートした。９６時間後、エフェクター細胞（異なるＲＮＰで処理された初代ヒトＮＫ細胞）を１０ｎｇ／ｍＬのＴＧＦ－βの存在下又は非存在下で、複数のエフェクター対標的細胞の比率で回転楕円添加した。赤色オブジェクトの強度は、Ｉｎｃｕｃｙｔｅイメージングシステムで６日間にわたり２時間毎に測定された。示されているデータは、エフェクターの追加時の赤色オブジェクトの強度に対して正規化されている。回転楕円曲線の正規化は、正規化されていないデータで観察されたのと同じ有効性パターンを維持する。

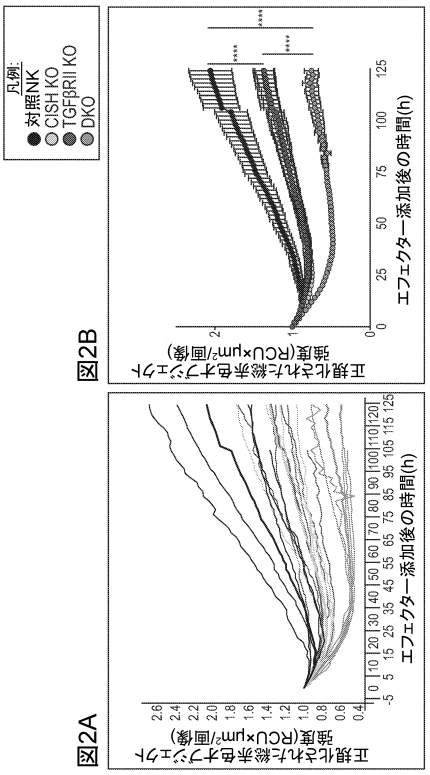
【０４９１】
ＴＧＦＢＲ２／ＣＩＳＨ／ＴＩＧＩＴ三重ノックアウト（ＴＫＯ）ＮＫ細胞は、優れたエフェクター機能を示し、ＳＫ－ＯＶ－３及びＰＣ－３腫瘍回転楕円の増殖を弱めた（図１２Ａ～１２Ｂ）。これらのエフェクター機能は、対照のＮＫ細胞よりも統計的により大きかった。これらの結果は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃｐｆ１と同時に３つのユニークなターゲットで初代ヒトＮＫ細胞を効率的に編集することを示す。総合して、生体外でのＣＩＳＨ／ＴＧＦＢＲ２／ＴＩＧＩＴ　ＴＫＯ一次ヒトＮＫ細胞のエフェクター機能の増加は、未編集ＮＫ細胞と比較して、ＣＩＳＨ／ＴＧＦＢＲ２／ＴＩＧＩＴ　ＴＫＯの強化された効果を示す。

【図面】

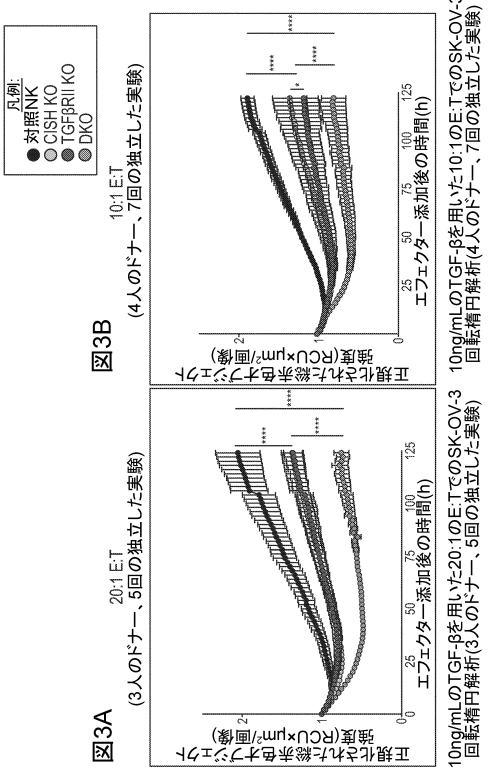
【図１Ａ－１Ｂ】



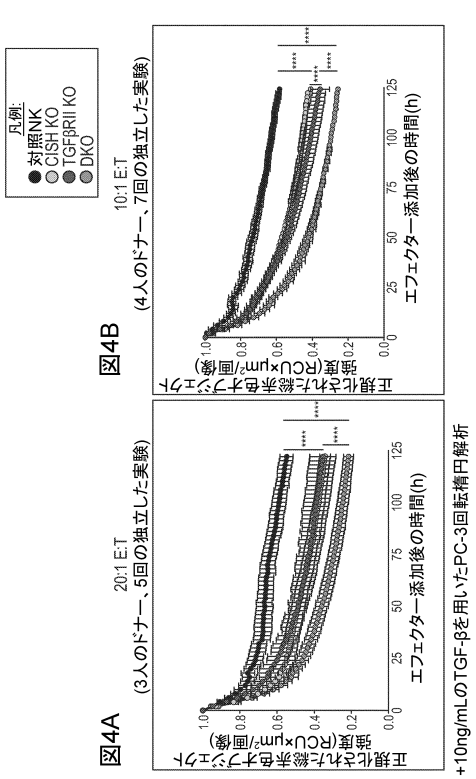
【図２Ａ－２Ｂ】



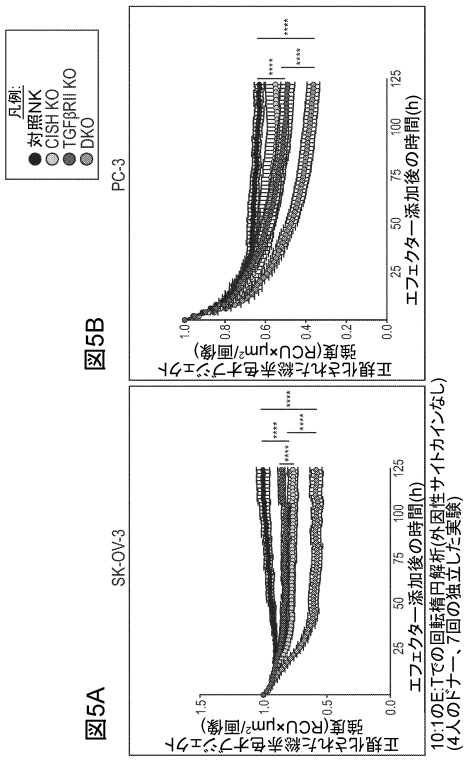
【図３Ａ－３Ｂ】



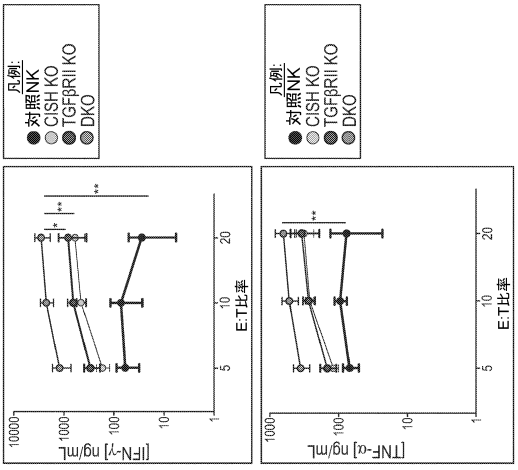
【図４Ａ－４Ｂ】



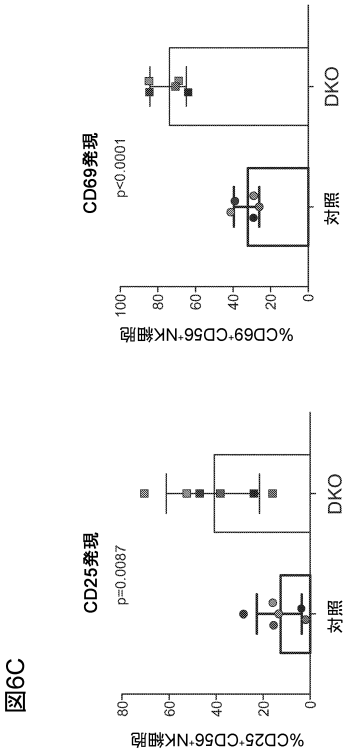
【図５Ａ－５Ｂ】



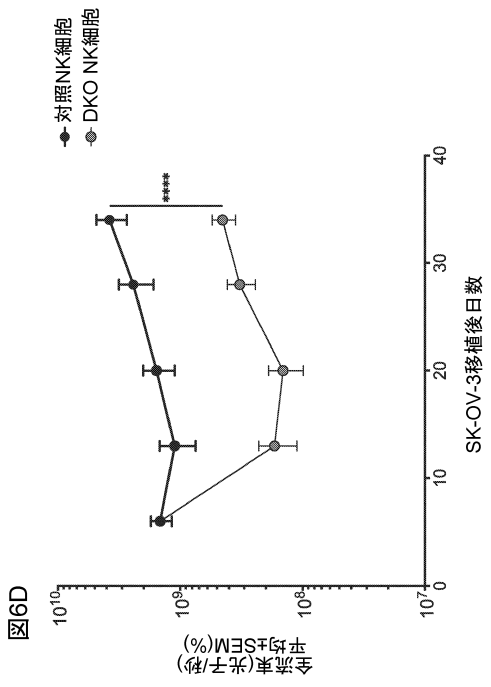
【図６Ａ－Ｂ】



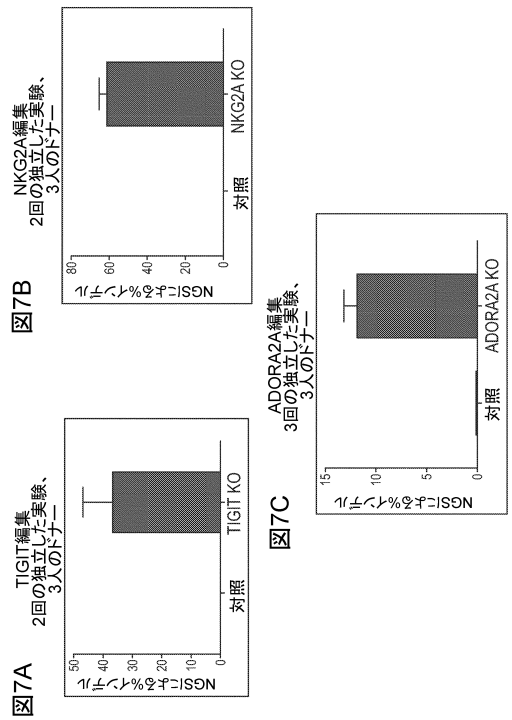
【図６Ｃ】



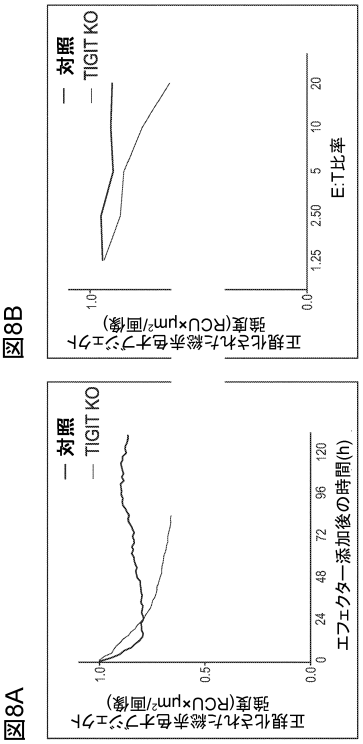
【図６Ｄ】



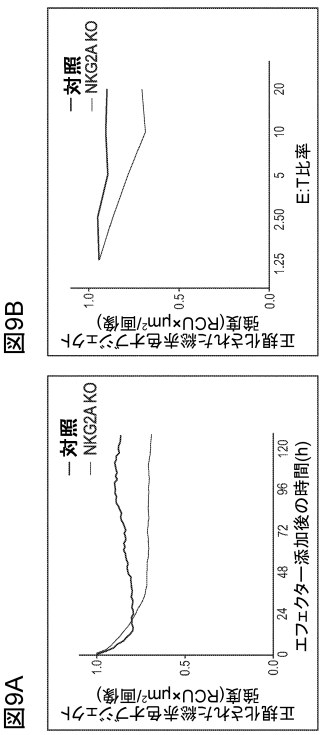
【図７Ａ－Ｃ】



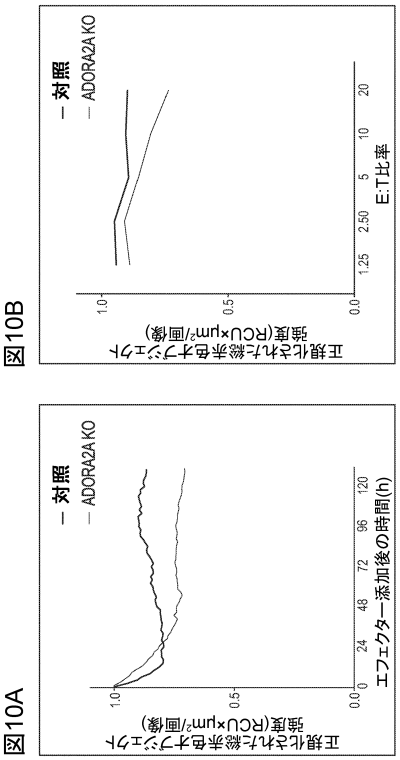
【図８Ａ－８Ｂ】



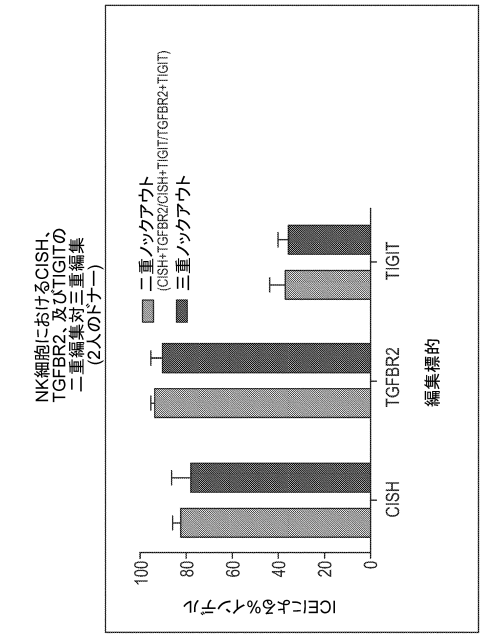
【図９Ａ－９Ｂ】



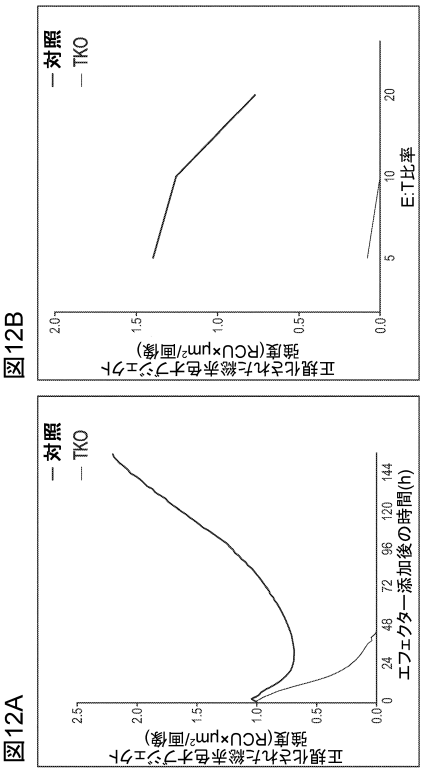
【図１０Ａ－１０Ｂ】



【図１１】



【図１２Ａ－１２Ｂ】



【配列表】
20222520402000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/018443

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N5/0783 C12N5/10 A61K35/17 A61P35/00
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61P A61K C12N

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2018/171298 A1 (DUCHATEAU PHILIPPE [FR] ET AL) 21 June 2018 (2018-06-21) claims; examples 2,3	1-88
X	US 2018/273903 A1 (ZHANG XIAOKUI [US] ET AL) 27 September 2018 (2018-09-27) examples	1-88
X	WO 2017/017184 A1 (ONKIMMUNE LTD [IE]) 2 February 2017 (2017-02-02) claims 1-3, 10	1-88

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 June 2020	19/06/2020

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Teyssier, Bertrand

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/018443

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LI YE ET AL: "Human iPSC-Derived Natural Killer Cells Engineered with Chimeric Antigen Receptors Enhance Anti-tumor Activity", CELL STEM CELL, vol. 23, no. 2, 28 June 2018 (2018-06-28), pages 181-192.e5, XP055700643, ISSN: 1934-5909, DOI: 10.1016/j.stem.2018.06.002 cited in the application	1-88
A	OBERSCHMIDT O ET AL: "Redirected Primary Human Chimeric Antigen Receptor Natural Killer Cells As an "Off-the-Shelf Immunotherapy" for Improvement in Cancer Treatment", FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, vol. 8, 654, 9 June 2017 (2017-06-09), XP055438713, DOI: 10.3389/fimmu.2017.00654 cited in the application the whole document	1-88
X,P	WO 2019/112899 A2 (FATE THEREPEUTICS INC [US]) 13 June 2019 (2019-06-13) examples 3-5	1-88
X,P	WO 2019/217956 A1 (UNIV CALIFORNIA [US]) 14 November 2019 (2019-11-14) examples	1-88

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2020/018443

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2018171298 A1	21-06-2018	AU 2016287440 A1	23-11-2017
		CA 2986314 A1	05-01-2017
		EP 3317399 A1	09-05-2018
		JP 2018519816 A	26-07-2018
		US 2018171298 A1	21-06-2018
		WO 2017001572 A1	05-01-2017
US 2018273903 A1	27-09-2018	AU 2017386790 A1	18-07-2019
		BR 112019013282 A2	17-12-2019
		CA 3048979 A1	05-07-2018
		CN 110913870 A	24-03-2020
		EA 201991607 A1	24-01-2020
		EP 3562492 A1	06-11-2019
		JP 2020503043 A	30-01-2020
		US 2018273903 A1	27-09-2018
		WO 2018126074 A1	05-07-2018
WO 2017017184 A1	02-02-2017	AU 2016300128 A1	22-02-2018
		BR 112018001660 A2	18-09-2018
		CA 2993796 A1	02-02-2017
		CN 108026512 A	11-05-2018
		DK 3317401 T3	02-01-2019
		EP 3317401 A1	09-05-2018
		EP 3421590 A1	02-01-2019
		EP 3434762 A1	30-01-2019
		ES 2701338 T3	21-02-2019
		HK 1252582 A1	31-05-2019
		JP 2018522592 A	16-08-2018
		KR 20180028530 A	16-03-2018
		RU 2018104871 A	28-08-2019
		US 2017157230 A1	08-06-2017
		US 2018326029 A1	15-11-2018
		WO 2017017184 A1	02-02-2017
WO 2019112899 A2	13-06-2019	AU 2018381191 A1	04-06-2020
		WO 2019112899 A2	13-06-2019
WO 2019217956 A1	14-11-2019	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*35/17*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/17	Ｚ	
Ａ６１Ｋ	*35/15*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/15	Ｚ	
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｐ	*35/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/02		
Ｃ１２Ｎ	*15/09*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/09	１１０	

(32)優先日 令和1年12月4日(2019.12.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 62/806,457
(32)優先日 平成31年2月15日(2019.2.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,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

８６７ リーディング，カンバーランド ロード ２１
(72)発明者 ウォン，カリー，カー ワイ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４５ サマービル，ユニット ３，ワーウィック ストリート ２０

Ｆターム（参考） 4B065 AA90X AB01 BA02 BD50 CA24 CA25 CA44
4C087 AA01 AA02 AA04 BB37 BB64 NA05 NA14 ZB26 ZB27