

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和5年1月25日(2023.1.25)

【国際公開番号】WO2020/150534

【公表番号】特表2022-518463(P2022-518463A)

【公表日】令和4年3月15日(2022.3.15)

【年通号数】公開公報(特許)2022-046

【出願番号】特願2021-541429(P2021-541429)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09(2006.01)

C 1 2 N 5/10(2006.01)

C 1 2 N 5/0783(2010.01)

C 1 2 N 5/0781(2010.01)

C 1 2 N 15/62(2006.01)

A 6 1 P 35/00(2006.01)

A 6 1 P 35/02(2006.01)

A 6 1 P 37/04(2006.01)

A 6 1 K 35/17(2015.01)

C 1 2 N 15/13(2006.01)

C 1 2 N 15/12(2006.01)

10

20

【F I】

C 1 2 N 15/09 1 1 0

C 1 2 N 5/10 Z N A

C 1 2 N 5/0783

C 1 2 N 5/0781

C 1 2 N 15/62 Z

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 35/02

A 6 1 P 37/04

A 6 1 K 35/17 Z

C 1 2 N 15/13

C 1 2 N 15/12

30

【手続補正書】

【提出日】令和5年1月12日(2023.1.12)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0865

【補正方法】変更

40

【補正の内容】

【0865】

本開示は以下の実施形態を含む。

実施形態1

免疫原性が低減されたおよび/または抗新生物活性が増加した、改変された免疫細胞を多重化編集によって産生するための方法であって、免疫細胞中の少なくとも4つの遺伝子配列またはその調節エレメントをその各々における単一の標的核酸塩基で改変し、それによって前記免疫原性が低減されたおよび/または抗新生物活性が増加した、改変された免疫細胞を生成することを含む方法。

実施形態2

50

免疫原性が低減されたおよび/または抗新生物活性が増加した、改変された免疫細胞の集団を多重化編集によって産生するための方法であって、免疫細胞の集団中の少なくとも4つの遺伝子配列またはその調節エレメントをその各々における単一の標的核酸塩基で改変し、それによって前記免疫原性が低減されたおよび/または抗新生物活性が増加した、改変された免疫細胞の集団を生成することを含む方法。

実施形態 3

前記少なくとも4つの遺伝子配列の少なくとも1つが、チェックポイント阻害因子遺伝子配列、免疫応答調節遺伝子配列、または免疫原性遺伝子配列である、実施形態1または2に記載の方法。

実施形態 4

前記改変することが、前記少なくとも4つの遺伝子配列の少なくとも1つの発現を低減する、実施形態1～3のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 5

前記少なくとも4つの遺伝子の少なくとも1つの発現が、前記改変を有さない対照細胞と比較して少なくとも80%低減される、実施形態1に記載の方法。

実施形態 6

前記少なくとも4つの遺伝子の各々の発現が、前記改変を有さない対照細胞と比較して少なくとも80%低減される、実施形態5に記載の方法。

実施形態 7

前記少なくとも4つの遺伝子の少なくとも1つの発現が、前記免疫細胞の集団の少なくとも50%で低減される、実施形態2に記載の方法。

実施形態 8

前記少なくとも4つの遺伝子の各々の発現が、前記免疫細胞の集団の少なくとも50%で低減される、実施形態7に記載の方法。

実施形態 9

前記少なくとも4つの遺伝子配列が、TCR複合体遺伝子配列を含む、前記実施形態のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 10

前記少なくとも4つの遺伝子配列が、TRAC遺伝子配列を含む、実施形態9に記載の方法。

実施形態 11

前記少なくとも4つの遺伝子配列が、チェックポイント阻害因子遺伝子配列を含む、実施形態1～8のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 12

前記少なくとも4つの遺伝子配列が、PDCD1遺伝子配列を含む、実施形態10に記載の方法。

実施形態 13

前記少なくとも4つの遺伝子配列が、T細胞マーカー遺伝子配列を含む、実施形態1～8のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 14

前記少なくとも4つの遺伝子配列が、CD52遺伝子配列を含む、実施形態13に記載の方法。

実施形態 15

前記少なくとも4つの遺伝子配列が、CD7遺伝子配列を含む、実施形態13に記載の方法。

実施形態 16

前記少なくとも4つの遺伝子配列が、TRAC遺伝子配列、PDCD1遺伝子配列、CD52遺伝子配列、またはCD7遺伝子配列を含む、実施形態1～15のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 17

前記少なくとも4つの配列が、TCR複合体遺伝子配列、CD7遺伝子配列、CD52遺伝子

10

20

30

40

50

配列、ならびにCD2遺伝子配列、CD4遺伝子配列、CD5遺伝子配列、CD7遺伝子配列、CD30遺伝子配列、CD33遺伝子配列、CD52遺伝子配列、CD70遺伝子配列、B2M遺伝子配列、およびCIITA遺伝子配列からなる群より選択される遺伝子配列を含む、実施形態1~16のいずれか一項に記載の方法。

実施形態18

前記少なくとも4つの遺伝子配列が、CD2遺伝子配列、TRAC遺伝子配列、CD3イプシロン遺伝子配列、CD3ガンマ遺伝子配列、CD3デルタ遺伝子配列、TRBC1遺伝子配列、TRBC2遺伝子配列、CD4遺伝子配列、CD5遺伝子配列、CD7遺伝子配列、CD30遺伝子配列、CD33遺伝子配列、CD52遺伝子配列、CD70遺伝子配列、B2M遺伝子配列、およびCIITA遺伝子配列からなる群より選択される遺伝子配列を含む、実施形態1~17のい

10

実施形態19

前記免疫細胞中の5つの遺伝子配列またはその調節エレメントをその各々における単一の標的核酸塩基で改変することを含む、実施形態1、5、および6のいずれか一項に記載の方法。

実施形態20

前記免疫細胞中の6つの遺伝子配列またはその調節エレメントをその各々における単一の標的核酸塩基で改変することを含む、実施形態1、5、および6のいずれか一項に記載の方法。

実施形態21

前記免疫細胞中の7つの遺伝子配列またはその調節エレメントをその各々における単一の標的核酸塩基で改変することを含む、実施形態1、5、および6のいずれか一項に記載の方法。

20

実施形態22

前記免疫細胞中の8つの遺伝子配列またはその調節エレメントをその各々における単一の標的核酸塩基で改変することを含む、実施形態1、5、および6のいずれか一項に記載の方法。

実施形態23

前記免疫細胞の集団中の5つの遺伝子配列またはその調節エレメントをその各々における単一の標的核酸塩基で改変することを含む、実施形態2、7、および8のいずれか一項

30

実施形態24

前記免疫細胞の集団中の6つの遺伝子配列またはその調節エレメントをその各々における単一の標的核酸塩基で改変することを含む、実施形態2、7、および8のいずれか一項

実施形態25

前記免疫細胞の集団中の7つの遺伝子配列またはその調節エレメントをその各々における単一の標的核酸塩基で改変することを含む、実施形態2、7、および8のいずれか一項

実施形態26

前記免疫細胞の集団中の8つの遺伝子配列またはその調節エレメントをその各々における単一の標的核酸塩基で改変することを含む、実施形態2、7、および8のいずれか一項

40

実施形態27

前記5つ、6つ、7つ、または8つの遺伝子配列またはその調節エレメントが、CD2遺伝子配列、TRAC遺伝子配列、CD3イプシロン遺伝子配列、CD3ガンマ遺伝子配列、CD3デルタ遺伝子配列、TRBC1遺伝子配列、TRBC2遺伝子配列、CD4遺伝子配列、CD5遺伝子配列、CD7遺伝子配列、CD30遺伝子配列、CD33遺伝子配列、CD52遺伝子配列、CD70遺伝子配列、B2M遺伝子配列、およびCIITA遺伝子配列からなる群より選択される、実施形態19~26のいずれか一項に記載の方法。

50

実施形態 2 8

前記5つ、6つ、7つ、または8つの遺伝子配列またはその調節エレメントが、CD3遺伝子配列、CD7遺伝子配列、CD2遺伝子配列、CD5遺伝子配列、およびCD52遺伝子配列を含む、実施形態19~27のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 2 9

前記改変することが、前記単一の標的核酸塩基を脱アミノ化することを含む、前記実施形態のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 3 0

前記脱アミノ化することが、デアミナーゼを含むポリペプチドによって行われる、実施形態29に記載の方法。

実施形態 3 1

前記デアミナーゼが核酸プログラム可能DNA結合タンパク質(napDNAbp)と会合して塩基エディターを形成する、実施形態30に記載の方法。

実施形態 3 2

前記デアミナーゼが核酸プログラム可能DNA結合タンパク質(napDNAbp)と融合している、実施形態31に記載の方法。

実施形態 3 3

前記napDNAbpが、Cas9ポリペプチドまたはその一部を含む、実施形態32に記載の方法。

実施形態 3 4

前記napDNAbpが、Cas9ニッカーゼまたはヌクレアーゼ不活Cas9を含む、実施形態33に記載の方法。

実施形態 3 5

前記デアミナーゼがシチジンデアミナーゼである、実施形態30~34のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 3 6

前記単一の標的核酸塩基がシトシン(C)であり、前記改変が、前記Cのチミン(T)への変換を含む、実施形態35に記載の方法。

実施形態 3 7

前記塩基エディターが、ウラシルグリコシラーゼ阻害因子をさらに含む、実施形態36に記載の方法。

実施形態 3 8

前記デアミナーゼがアデノシンデアミナーゼである、実施形態30~34のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 3 9

前記単一の標的核酸塩基がアデノシン(A)であり、前記改変が、前記Aのグアニン(G)への変換を含む、実施形態38に記載の方法。

実施形態 4 0

前記改変することが、前記免疫細胞をガイド核酸配列に接触させることを含む、実施形態30~39のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 4 1

前記改変することが、前記免疫細胞を少なくとも4つのガイド核酸配列に接触させることを含み、各ガイド核酸配列が、前記napDNAbpを前記少なくとも4つの遺伝子配列またはその調節エレメントの1つに標的化する、実施形態40に記載の方法。

実施形態 4 2

前記ガイド核酸配列が、表8A、表8B、または表8CのガイドRNA配列より選択される配列を含む、実施形態40に記載の方法。

実施形態 4 3

前記ガイド核酸配列が、UUCGUAUCUGUAAAACCAAG、CCUACCUGUCACCAGGACCA、CUCUUAACCGUACCAUAACC、CACCUACCUAAGAACCAUCC、ACUCACGC

10

20

30

40

50

UGGAUAGCCUCC、ACUCACCCAGCAUCCCCAGC、CACUCACCUUAGCCUGAGCA、およびCACGCACCUGGACAGCUGACからなる群より選択される配列を含む、実施形態40に記載の方法。

実施形態44

前記改変することが、逆転写酵素および伸長されたガイド核酸配列を用いた標的プライム逆転写によって前記単一の標的核酸塩基を異なる核酸塩基で置き換えることを含む、実施形態1～28のいずれか一項に記載の方法。

実施形態45

前記伸長されたガイド核酸配列が、逆転写テンプレート配列、逆転写プライマー結合部位、またはそれらの組合せを含む、実施形態44に記載の方法。

10

実施形態46

前記単一の標的核酸塩基がエクソン中にある、実施形態1～45のいずれか一項に記載の方法。

実施形態47

前記改変することが、前記エクソン中に未熟終止コドンを生成する、実施形態46に記載の方法。

実施形態48

前記単一の標的核酸塩基が、前記TRAC遺伝子配列のエクソン1、エクソン2、またはエクソン3内にある、実施形態46または47に記載の方法。

実施形態49

前記単一の標的核酸塩基が、前記PCDC1遺伝子配列のエクソン1、エクソン2、またはエクソン5内にある、実施形態46または47に記載の方法。

20

実施形態50

前記単一の標的核酸塩基が、前記CD52遺伝子配列のエクソン1またはエクソン2内にある、実施形態46または47に記載の方法。

実施形態51

前記単一の標的核酸塩基が、前記CD7遺伝子配列のエクソン1、エクソン2、またはエクソン3内にある、実施形態46または47に記載の方法。

実施形態52

前記単一の標的核酸塩基が、前記B2M遺伝子配列のエクソン1またはエクソン2内にある、実施形態46または47に記載の方法。

30

実施形態53

前記単一の標的核酸塩基が、前記CD5遺伝子配列のエクソン2、エクソン3、エクソン4、エクソン5、エクソン6、エクソン7、またはエクソン8内にある、実施形態46または47に記載の方法。

実施形態54

前記単一の標的核酸塩基が、前記CD2遺伝子配列のエクソン2、エクソン3、エクソン4、またはエクソン5内にある、実施形態46または47に記載の方法。

実施形態55

前記単一の標的核酸塩基が、前記CIITA遺伝子配列のエクソン1、エクソン2、エクソン4、エクソン7、エクソン8、エクソン9、エクソン10、エクソン11、エクソン12、エクソン14、エクソン15、エクソン18、またはエクソン19内にある、実施形態46または47に記載の方法。

40

実施形態56

前記単一の標的核酸塩基が、スプライスドナー部位またはスプライスアクセプター部位にある、実施形態1～45のいずれか一項に記載の方法。

実施形態57

前記単一の標的核酸塩基が、前記TRAC遺伝子配列のエクソン1スプライスアクセプター部位、エクソン1スプライスドナー部位、またはエクソン3スプライスアクセプター部位にある、実施形態50に記載の方法。

50

実施形態 5 8

前記単一の標的核酸塩基が、前記PDCD1遺伝子配列のエクソン1スプライスアクセプター部位、エクソン1スプライスドナー部位、エクソン2スプライスアクセプター部位、エクソン3スプライスドナー部位、エクソン4スプライスアクセプター部位、エクソン4スプライスドナー部位、またはエクソン5スプライスアクセプター部位にある、実施形態50に記載の方法。

実施形態 5 9

前記単一の標的核酸塩基が、前記CD52遺伝子配列のエクソン1スプライスドナー部位、またはエクソン2スプライスアクセプター部位にある、実施形態50に記載の方法。

実施形態 6 0

前記単一の標的核酸塩基が、前記CD7遺伝子配列のエクソン1スプライスドナー部位、エクソン2スプライスドナー部位、エクソン2スプライスアクセプター部位、またはエクソン3スプライスアクセプター部位にある、実施形態50に記載の方法。

実施形態 6 1

前記単一の標的核酸塩基が、前記B2M遺伝子配列のエクソン1スプライスドナー部位、エクソン2スプライスドナー部位、エクソン2スプライスアクセプター部位、またはエクソン3スプライスアクセプター部位にある、実施形態50に記載の方法。

実施形態 6 2

前記単一の標的核酸塩基が、前記CD2遺伝子配列のエクソン3スプライスドナー部位にある、実施形態50に記載の方法。

実施形態 6 3

前記単一の標的核酸塩基が、前記CD5遺伝子配列のエクソン1スプライスドナー部位、エクソン1スプライスアクセプター部位、エクソン3スプライスアクセプター部位、エクソン3スプライスドナー部位、エクソン4スプライスアクセプター部位、エクソン5スプライスドナー部位、エクソン6スプライスアクセプター部位、エクソン9スプライスドナー部位、またはエクソン10スプライスアクセプター部位にある、実施形態50に記載の方法。

実施形態 6 4

前記単一の標的核酸塩基が、前記CIITA遺伝子配列のエクソン1スプライスドナー部位、エクソン7スプライスドナー部位、エクソン8スプライスアクセプター部位、エクソン9スプライスドナー部位、エクソン10スプライスアクセプター部位、エクソン11スプライスアクセプター部位、エクソン14スプライスアクセプター部位、エクソン14スプライスドナー部位、エクソン15スプライスドナー部位、エクソン16スプライスアクセプター部位、エクソン16スプライスドナー部位、エクソン17スプライスアクセプター部位、エクソン17スプライスドナー部位、またはエクソン19スプライスアクセプター部位にある、実施形態50に記載の方法。

実施形態 6 5

前記免疫細胞がヒト細胞である、実施形態4～64のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 6 6

前記免疫細胞が、細胞傷害性T細胞、調節性T細胞、ヘルパーT細胞、樹状細胞、B細胞、またはNK細胞である、実施形態65に記載の方法。

実施形態 6 7

前記免疫細胞の集団がヒト細胞である、実施形態7～66のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 6 8

前記免疫細胞の集団が、細胞傷害性T細胞、調節性T細胞、ヘルパーT細胞、樹状細胞、B細胞、またはNK細胞である、実施形態67に記載の方法。

実施形態 6 9

前記改変することがex vivoである、実施形態1～68のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 7 0

前記免疫細胞または前記免疫細胞の集団が、単一のヒトドナーに由来する、実施形態1

10

20

30

40

50

～69のいずれか一項に記載の方法。

実施形態7 1

前記免疫細胞または前記免疫細胞の集団を、外因性機能的キメラ抗原受容体(CAR)またはその機能的断片をコードするポリヌクレオチドに接触させることをさらに含む、実施形態1～70のいずれか一項に記載の方法。

実施形態7 2

前記免疫細胞または前記免疫細胞の集団を、前記CARをコードする前記ポリヌクレオチドを含むレンチウイルスに接触させることを含む、実施形態71に記載の方法。

実施形態7 3

前記免疫細胞または前記免疫細胞の集団を、napDNAbpと、前記CARをコードする前記ポリヌクレオチドを含むドナーDNA配列とに接触させることを含む、実施形態71に記載の方法。

10

実施形態7 4

前記napDNAbpがCas12bである、実施形態73に記載の方法。

実施形態7 5

前記CARが、新生物に関連するマーカーに特異的に結合する、実施形態71～74のいずれか一項に記載の方法。

実施形態7 6

前記新生物が、T細胞がん、B細胞がん、リンパ腫、白血病、または多発性骨髄腫である、実施形態75に記載の方法。

20

実施形態7 7

前記CARが、CD7に特異的に結合する、実施形態76に記載の方法。

実施形態7 8

前記CARが、BCMAに特異的に結合する、実施形態76に記載の方法。

実施形態7 9

前記免疫細胞または前記免疫細胞の集団が、検出可能な転座を含まない、実施形態2～78のいずれか一項に記載の方法。

実施形態8 0

前記免疫細胞の集団の少なくとも50%が、前記CARを発現する、実施形態79に記載の方法。

30

実施形態8 1

前記免疫細胞の集団の少なくとも50%が生存可能である、実施形態79に記載の方法。

実施形態8 2

前記免疫細胞の集団の少なくとも50%が、前記改変を有さない同じ型の対照細胞の集団の拡大速度の少なくとも80%で拡大する、実施形態79に記載の方法。

実施形態8 3

前記改変することが、前記免疫細胞において1%未満のインデルを生成する、実施形態4～79のいずれか一項に記載の方法。

実施形態8 4

前記改変することが、前記免疫細胞において5%未満の非標的編集を生成する、実施形態4～79のいずれか一項に記載の方法。

40

実施形態8 5

前記改変することが、前記免疫細胞において5%未満のオフターゲット編集を生成する、実施形態4～79のいずれか一項に記載の方法。

実施形態8 6

実施形態4～85のいずれか一項に記載の方法に従って産生された、改変された免疫細胞。

実施形態8 7

実施形態7～85のいずれか一項に記載の方法に従って産生された、改変された免疫細胞の集団。

50

実施形態 8 8

免疫原性が低減されたまたは抗新生物活性が増加した、改変された免疫細胞であって、少なくとも4つの遺伝子配列またはその調節エレメントの各々に単一の標的核酸塩基の改変を含む、改変された免疫細胞。

実施形態 8 9

前記少なくとも4つの遺伝子配列の各々が、チェックポイント阻害因子遺伝子配列、免疫応答調節遺伝子配列、または免疫原性遺伝子配列である、実施形態88に記載の改変された免疫細胞。

実施形態 9 0

前記少なくとも4つの遺伝子配列が、TCR複合体遺伝子配列を含む、実施形態88または89に記載の改変された免疫細胞。

10

実施形態 9 1

前記少なくとも4つの遺伝子配列が、TRAC遺伝子配列を含む、実施形態90に記載の改変された免疫細胞。

実施形態 9 2

前記少なくとも4つの遺伝子配列が、チェックポイント阻害因子遺伝子配列を含む、実施形態88または89に記載の改変された免疫細胞。

実施形態 9 3

前記少なくとも4つの遺伝子配列が、PDCD1遺伝子配列を含む、実施形態92に記載の改変された免疫細胞。

20

実施形態 9 4

前記少なくとも4つの遺伝子配列が、T細胞マーカー遺伝子配列を含む、実施形態88または89に記載の改変された免疫細胞。

実施形態 9 5

前記少なくとも4つの遺伝子配列が、CD52遺伝子配列を含む、実施形態94に記載の改変された免疫細胞。

実施形態 9 6

前記少なくとも4つの遺伝子配列が、CD7遺伝子配列を含む、実施形態94に記載の改変された免疫細胞。

実施形態 9 7

前記少なくとも4つの遺伝子の1つの発現が、前記改変を有さない対照細胞と比較して少なくとも80%低減される、実施形態88~96のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

30

実施形態 9 8

前記少なくとも4つの遺伝子の各々の発現が、前記改変を有さない対照細胞と比較して少なくとも90%低減される、実施形態97に記載の改変された免疫細胞。

実施形態 9 9

5つの遺伝子配列またはその調節エレメントの各々における単一の標的核酸塩基に改変を含み、前記5つの遺伝子配列の各々が、チェックポイント阻害因子遺伝子配列、免疫応答調節遺伝子配列、または免疫原性遺伝子配列である、実施形態88~98のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

40

実施形態 1 0 0

6つの遺伝子配列またはその調節エレメントの各々における単一の標的核酸塩基に改変を含み、前記6つの遺伝子配列の各々が、チェックポイント阻害因子遺伝子配列、免疫応答調節遺伝子配列、または免疫原性遺伝子配列である、実施形態88~98のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

実施形態 1 0 1

7つの遺伝子配列またはその調節エレメントの各々における単一の標的核酸塩基に改変を含み、前記7つの遺伝子配列の各々が、チェックポイント阻害因子遺伝子配列、免疫応答調節遺伝子配列、または免疫原性遺伝子配列である、実施形態88~98のいずれか一項

50

に記載の改変された免疫細胞。

実施形態 1 0 2

8つの遺伝子配列またはその調節エレメントの各々における単一の標的核酸塩基に改変を含み、前記8つの遺伝子配列の各々が、チェックポイント阻害因子遺伝子配列、免疫応答調節遺伝子配列、または免疫原性遺伝子配列である、実施形態88～98のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

実施形態 1 0 3

前記5つ、6つ、7つまたは8つの遺伝子の少なくとも1つの発現が、前記改変を有さない対照細胞と比較して少なくとも90%低減される、実施形態99～102のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

実施形態 1 0 4

前記5つ、6つ、7つ、または8つの遺伝子の各々の発現が、前記改変を有さない対照細胞と比較して少なくとも90%低減される、実施形態99～102のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

実施形態 1 0 5

前記5つ、6つ、7つ、または8つの遺伝子配列またはその調節エレメントが、CD2遺伝子配列、TRAC遺伝子配列、CD3イプシロン遺伝子配列、CD3ガンマ遺伝子配列、CD3デルタ遺伝子配列、TRBC1遺伝子配列、TRBC2遺伝子配列、CD4遺伝子配列、CD5遺伝子配列、CD7遺伝子配列、CD30遺伝子配列、CD33遺伝子配列、CD52遺伝子配列、CD70遺伝子配列、B2M遺伝子配列、およびCIITA遺伝子配列からなる群より選択される配列を含む、実施形態99～104のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

実施形態 1 0 6

CD3遺伝子配列、CD5遺伝子配列、CD52遺伝子配列、およびCD7遺伝子配列の各々に単一の標的核酸塩基の改変を含む改変された免疫細胞であって、前記改変を有さない同じ型の対照細胞と比較して免疫原性の低減または抗新生物活性の増加を示す、改変された免疫細胞。

実施形態 1 0 7

CD2遺伝子配列、CIITAまたはその各々の調節エレメントに単一の標的核酸塩基の改変をさらに含む、実施形態106に記載の改変された免疫細胞。

実施形態 1 0 8

TRAC遺伝子配列、CD3イプシロン遺伝子配列、CD3ガンマ遺伝子配列、CD3デルタ遺伝子配列、TRBC1遺伝子配列、またはTRBC2遺伝子配列に単一の標的核酸塩基の改変を含み、CD4遺伝子配列、CD30遺伝子配列、CD33遺伝子配列、CD70遺伝子配列、B2M遺伝子配列、およびCIITA遺伝子配列からなる群より選択される遺伝子配列またはその各々の調節エレメントに単一の標的核酸塩基の改変をさらに含む、実施形態106に記載の改変された免疫細胞。

実施形態 1 0 9

TRAC遺伝子配列、PDCD1遺伝子配列、CD52遺伝子配列、CD7遺伝子配列、CD2遺伝子配列、CD5遺伝子配列、CIITA遺伝子配列、およびB2M遺伝子配列の各々に単一の核酸塩基の改変を含む、実施形態107に記載の改変された免疫細胞。

実施形態 1 1 0

検出可能な転座を含まない、実施形態88～109のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

実施形態 1 1 1

1%未満のインデルを含む、実施形態88～110のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

実施形態 1 1 2

5%未満の非標的編集を含む、実施形態88～110のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

実施形態 1 1 3

10

20

30

40

50

5%未満のオフターゲット編集を含む、実施形態88～110のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

実施形態114

哺乳動物細胞である、実施形態88～110のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

実施形態115

ヒト細胞である、実施形態88～110のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

実施形態116

細胞傷害性T細胞、調節性T細胞、ヘルパーT細胞、樹状細胞、B細胞、またはNK細胞である、実施形態88～115のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

実施形態117

ex vivo培養物中にある、実施形態88～116のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

実施形態118

単一のヒトドナーに由来する、実施形態88～117のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

実施形態119

外因性機能的キメラ抗原受容体(CAR)またはその機能的断片をコードするポリヌクレオチドをさらに含む、実施形態88～118のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

実施形態120

前記CARをコードする前記ポリヌクレオチドが、前記免疫細胞のゲノムに組み入れられている、実施形態119に記載の改変された免疫細胞。

実施形態121

前記CARが、新生物に関連するマーカーに特異的に結合する、実施形態119または120に記載の改変された免疫細胞。

実施形態122

前記新生物が、T細胞がん、B細胞がん、リンパ腫、白血病、または多発性骨髄腫である、実施形態119または120に記載の改変された免疫細胞。

実施形態123

前記CARが、CD7に特異的に結合する、実施形態119～122のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

実施形態124

前記CARが、BCMAに特異的に結合する、実施形態119～122のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

実施形態125

前記単一の標的核酸塩基がエクソン中にある、実施形態88～124のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

実施形態126

前記単一の標的核酸塩基が、前記TRAC遺伝子配列のエクソン1、エクソン2、またはエクソン3内にある、実施形態125に記載の改変された免疫細胞。

実施形態127

前記単一の標的核酸塩基が、前記PCDC1遺伝子配列のエクソン1、エクソン2、またはエクソン5内にある、実施形態125に記載の改変された免疫細胞。

実施形態128

前記単一の標的核酸塩基が、前記CD52遺伝子配列のエクソン1またはエクソン2内にある、実施形態125に記載の改変された免疫細胞。

実施形態129

前記単一の標的核酸塩基が、CD7遺伝子配列のエクソン1、エクソン2、またはエクソン3内にある、実施形態125に記載の改変された免疫細胞。

実施形態130

前記単一の標的核酸塩基が、スプライスドナー部位またはスプライスアクセプター部位

10

20

30

40

50

にある、実施形態88～124のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

実施形態131

前記単一の標的核酸塩基が、前記TRAC遺伝子配列のエクソン1スプライスアクセプター部位、エクソン1スプライスドナー部位、またはエクソン3スプライスアクセプター部位にある、実施形態130に記載の改変された免疫細胞。

実施形態132

前記単一の標的核酸塩基が、前記PDCD1遺伝子配列のエクソン1スプライスアクセプター部位、エクソン1スプライスドナー部位、エクソン2スプライスアクセプター部位、エクソン3スプライスドナー部位、エクソン4スプライスアクセプター部位、エクソン4スプライスドナー部位、またはエクソン5スプライスアクセプター部位にある、実施形態130に記載の改変された免疫細胞。

10

実施形態133

前記単一の標的核酸塩基が、前記CD52遺伝子配列のエクソン1スプライスドナー部位、またはエクソン2スプライスアクセプター部位にある、実施形態130に記載の改変された免疫細胞。

実施形態134

前記単一の標的核酸塩基が、前記CD7遺伝子配列のエクソン1スプライスドナー部位、エクソン2スプライスドナー部位、エクソン2スプライスアクセプター部位、またはエクソン3スプライスアクセプター部位にある、実施形態130に記載の改変された免疫細胞。

実施形態135

改変された免疫細胞の集団であって、複数の前記細胞の集団が、少なくとも4つの遺伝子配列またはその調節エレメントの各々に単一の標的核酸塩基の改変を含み、前記改変を有する前記複数の前記細胞の集団が、改変を有さない同じ型の複数の対照細胞と比較して免疫原性の低減または抗新生物活性の増加を示す、改変された免疫細胞の集団。

20

実施形態136

前記複数の細胞が、前記集団の少なくとも50%を構成する、実施形態135に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態137

前記少なくとも4つの遺伝子配列の各々が、チェックポイント阻害因子遺伝子配列、免疫応答調節遺伝子配列、または免疫原性遺伝子配列である、実施形態135または136に記載の改変された免疫細胞の集団。

30

実施形態138

前記少なくとも4つの遺伝子配列が、TCR成分遺伝子配列、チェックポイント阻害因子遺伝子配列、またはT細胞マーカー遺伝子配列を含む、実施形態137に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態139

前記少なくとも4つの遺伝子配列が、TRAC遺伝子配列を含む、実施形態137に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態140

前記少なくとも4つの遺伝子配列が、PDCD1遺伝子配列を含む、実施形態137に記載の改変された免疫細胞の集団。

40

実施形態141

前記少なくとも4つの遺伝子配列が、CD52遺伝子配列を含む、実施形態137に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態142

前記少なくとも4つの遺伝子配列が、CD7遺伝子配列を含む、実施形態137に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態143

前記少なくとも4つの遺伝子の少なくとも1つの発現が、前記改変を有さない対照細胞と比較して前記改変を有する前記複数の細胞において少なくとも80%低減される、実施

50

形態135～142のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態144

前記少なくとも4つの遺伝子の各々の発現が、前記改変を有さない対照細胞と比較して前記改変を有する前記複数の細胞において少なくとも80%低減される、実施形態143に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態145

前記複数の前記集団が、5つの遺伝子配列またはその調節エレメントの各々における単一の標的核酸塩基に改変を含み、前記5つの遺伝子配列の各々が、チェックポイント阻害因子遺伝子配列、免疫応答調節遺伝子配列、または免疫原性遺伝子配列である、実施形態135～144のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞の集団。

10

実施形態146

前記複数の前記集団が、6つの遺伝子配列またはその調節エレメントの各々における単一の標的核酸塩基に改変を含み、前記6つの配列の各々が、チェックポイント阻害因子遺伝子配列、免疫応答調節遺伝子配列、または免疫原性遺伝子配列である、実施形態135～144のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態147

前記複数の前記集団が、7つの遺伝子配列またはその調節エレメントの各々における単一の標的核酸塩基に改変を含み、前記7つの遺伝子配列の各々が、チェックポイント阻害因子遺伝子配列、免疫応答調節遺伝子配列、または免疫原性遺伝子配列である、実施形態135～144のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞の集団。

20

実施形態148

前記複数の前記集団が、8つの遺伝子配列またはその調節エレメントの各々における単一の標的核酸塩基に改変を含み、前記8つの遺伝子配列の各々が、チェックポイント阻害因子遺伝子配列、免疫応答調節遺伝子配列、または免疫原性遺伝子配列である、実施形態135～144のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態149

前記5つ、6つ、7つ、または8つの遺伝子の少なくとも1つの発現が、前記改変を有さない対照細胞と比較して前記改変を有する前記複数の細胞において少なくとも90%低減される、実施形態145～148のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態150

前記5つ、6つ、7つ、または8つの遺伝子の各々の発現が、前記改変を有さない対照細胞と比較して前記改変を有する前記複数の細胞において少なくとも90%低減される、実施形態145～148のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞の集団。

30

実施形態151

前記5つ、6つ、7つ、または8つの遺伝子配列またはその調節エレメントが、CD2遺伝子配列、TRAC遺伝子配列、CD3イプシロン遺伝子配列、CD3ガンマ遺伝子配列、CD3デルタ遺伝子配列、TRBC1遺伝子配列、TRBC2遺伝子配列、CD4遺伝子配列、CD5遺伝子配列、CD7遺伝子配列、CD30遺伝子配列、CD33遺伝子配列、CD52遺伝子配列、CD70遺伝子配列、B2M遺伝子配列、およびCIITA遺伝子配列からなる群より選択される、実施形態145～148のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞の集団。

40

実施形態152

改変された免疫細胞の集団であって、複数の前記集団が、TRAC遺伝子配列、PDCD1遺伝子配列、CD52遺伝子配列、およびCD7遺伝子配列の各々に単一の標的核酸塩基の改変を含み、前記改変を有する前記複数の前記集団が、前記改変を有さない同じ型の複数の対照細胞と比較して免疫原性の低減または抗新生物活性の増加を示す、改変された免疫細胞の集団。

実施形態153

前記複数の前記集団が、CD2遺伝子配列、CD5遺伝子配列、CIITA遺伝子配列、B2M遺伝子配列、またはその各々の調節エレメントに単一の標的核酸塩基の改変をさらに含む、実施形態152に記載の改変された免疫細胞の集団。

50

実施形態 1 5 4

前記複数の前記集団が、CD2遺伝子配列、TRAC遺伝子配列、CD3イプシロン遺伝子配列、CD3ガンマ遺伝子配列、CD3デルタ遺伝子配列、TRBC1遺伝子配列、TRBC2遺伝子配列、CD4遺伝子配列、CD5遺伝子配列、CD7遺伝子配列、CD30遺伝子配列、CD33遺伝子配列、CD52遺伝子配列、CD70遺伝子配列、B2M遺伝子配列、およびCIITA遺伝子配列からなる群より選択される遺伝子の遺伝子配列またはその各々の調節エレメントに単一の標的核酸塩基の改変をさらに含む、実施形態152に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態 1 5 5

前記複数の前記集団が、TRAC遺伝子配列、PDCD1遺伝子配列、CD52遺伝子配列、CD7遺伝子配列、CD2遺伝子配列、CD5遺伝子配列、CIITA遺伝子配列、およびB2M遺伝子配列の各々に単一の核酸塩基の改変を含む、実施形態153に記載の改変された免疫細胞の集団。

10

実施形態 1 5 6

前記複数の前記集団が検出可能な転座を含まない、実施形態135～155のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態 1 5 7

少なくとも60%が生存可能である、実施形態135～156のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態 1 5 8

少なくとも60%が、前記改変を有さない同じ型の対照細胞の集団の拡大速度の少なくとも80%で拡大する、実施形態135～156のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞の集団。

20

実施形態 1 5 9

ヒト細胞である、実施形態135～158のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態 1 6 0

細胞傷害性T細胞、調節性T細胞、ヘルパーT細胞、樹状細胞、B細胞、またはNK細胞である、実施形態135～159のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態 1 6 1

単一のヒトドナーに由来する、実施形態135～160のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞の集団。

30

実施形態 1 6 2

前記改変を有する前記複数の細胞が、外因性機能的キメラ抗原受容体(CAR)またはその機能的断片をコードするポリヌクレオチドをさらに含む、実施形態135～161のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態 1 6 3

少なくとも50%が前記CARを発現する、実施形態162に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態 1 6 4

前記CARが、新生物に関連するマーカーに特異的に結合する、実施形態162または163に記載の改変された免疫細胞の集団。

40

実施形態 1 6 5

前記新生物が、T細胞がん、B細胞がん、リンパ腫、白血病、または多発性骨髄腫である、実施形態164に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態 1 6 6

前記CARが、CD7に特異的に結合する、実施形態165に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態 1 6 7

前記CARが、BCMAに特異的に結合する、実施形態165に記載の改変された免疫細胞

50

の集団。

実施形態 168

前記単一の標的核酸塩基がエクソン中にある、実施形態135～167のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態 169

前記単一の標的核酸塩基が、前記TRAC遺伝子配列のエクソン1、エクソン2、またはエクソン3内にある、実施形態168に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態 170

前記単一の標的核酸塩基が、前記PCDC1遺伝子配列のエクソン1、エクソン2、またはエクソン5内にある、実施形態168に記載の改変された免疫細胞の集団。

10

実施形態 171

前記単一の標的核酸塩基が、前記CD52遺伝子配列のエクソン1またはエクソン2内にある、実施形態168に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態 172

前記単一の標的核酸塩基が、CD7遺伝子配列のエクソン1、エクソン2、またはエクソン3内にある、実施形態168に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態 173

前記単一の標的核酸塩基が、スプライドナー部位またはスプライスアクセプター部位にある、実施形態135～167のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態 174

前記単一の標的核酸塩基が、前記TRAC遺伝子配列のエクソン1スプライスアクセプター部位、エクソン1スプライドナー部位、またはエクソン3スプライスアクセプター部位にある、実施形態173に記載の改変された免疫細胞の集団。

20

実施形態 175

前記単一の標的核酸塩基が、前記PDCD1遺伝子配列のエクソン1スプライスアクセプター部位、エクソン1スプライドナー部位、エクソン2スプライスアクセプター部位、エクソン3スプライドナー部位、エクソン4スプライスアクセプター部位、エクソン4スプライドナー部位、またはエクソン5スプライスアクセプター部位にある、実施形態173に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態 176

前記単一の標的核酸塩基が、前記CD52遺伝子配列のエクソン1スプライドナー部位、またはエクソン2スプライスアクセプター部位にある、実施形態173に記載の改変された免疫細胞の集団。

30

実施形態 177

前記単一の標的核酸塩基が、前記CD7遺伝子配列のエクソン1スプライドナー部位、エクソン2スプライドナー部位、エクソン2スプライスアクセプター部位、またはエクソン3スプライスアクセプター部位にある、実施形態173に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態 178

デアミナーゼおよび核酸配列を含む組成物であって、ガイド核酸配列が、UUCGUAUCUGUAAAACCAAG、CCUACCGUCACCAGGACCA、CUCUUACCGUACCAUAACC、CACCUACCUAAGAACCAUCC、ACUCACGCUGGAUAGCCUCC、ACUCACCCAGCAUCCCAGC、CACUCACCUUAGCCUGAGCA、およびCACGCACCUGGACAGCUGACからなる群より選択される配列を含む、組成物。

40

実施形態 179

前記デアミナーゼが核酸プログラム可能DNA結合タンパク質(napDNAbp)と会合して塩基エディターを形成する、実施形態178に記載の組成物。

実施形態 180

前記napDNAbpが、Cas9ニッカーゼまたはヌクレアーゼ不活Cas9を含み、前記デアミナーゼがシチジンデアミナーゼである、実施形態179に記載の組成物。

50

実施形態 181

前記塩基エディターが、ウラシルグリコシラーゼ阻害因子をさらに含む、実施形態180に記載の組成物。

実施形態 182

前記napDNAbpが、Cas9ニッカーゼまたはヌクレアーゼ不活Cas9を含み、前記デアミナーゼがアデノシンデアミナーゼである、実施形態166に記載の組成物。

実施形態 183

ポリメラーゼおよびガイド核酸配列を含む組成物であって、前記ガイド核酸配列が、UUCGUAUCUGUAAAACCAAG、CCUACCUGUCACCAGGACCA、CUCUUACCUGUACCAUAACC、CACCUACCUAAGAACCAUCC、ACUCACGCUGGAUAGCCUCC、ACUCACCCAGCAUCCCGAGC、CACUCACCUUAGCCUGAGCA、およびCACGCACCUGGACAGCUGACからなる群より選択される配列を含む、組成物。

10

実施形態 184

前記ポリメラーゼが逆転写酵素であり、前記ガイド核酸配列が、逆転写テンプレート配列、逆転写プライマー結合部位、またはそれらの組合せを含む伸長されたガイド核酸配列である、実施形態170に記載の組成物。

実施形態 185

免疫原性が低減されたおよび/または抗新生物活性が増加した、改変された免疫細胞を産生するための方法であって、

a) 免疫細胞中の第1の遺伝子配列またはその調節エレメントにおける単一の標的核酸塩基を改変する工程、および

20

b) Cas12ポリペプチドを用いて、前記免疫細胞中の第2の遺伝子配列またはその調節エレメントを改変する工程であって、前記Cas12ポリペプチドが、第2の遺伝子配列中に部位特異的切断を生成する工程

を含み、

前記第1の遺伝子および前記第2の遺伝子の各々が、免疫原性遺伝子、チェックポイント阻害因子遺伝子、または免疫応答調節遺伝子であり、

それによって免疫原性が低減されたおよび/または抗新生物活性が増加した、改変された免疫細胞を生成する方法。

実施形態 186

30

前記免疫細胞中で外因性機能的キメラ抗原受容体(CAR)またはその機能的断片を発現させることをさらに含む、実施形態185に記載の方法。

実施形態 187

前記CARまたはその機能的断片をコードするポリヌクレオチドが、Cas12ポリペプチドによって生成された前記部位特異的切断に挿入される、実施形態186に記載の方法。

実施形態 188

前記Cas12ポリペプチドがCas12bポリペプチドである、実施形態187に記載の方法。

実施形態 189

免疫原性が低減されたおよび/または抗新生物活性が増加した、改変された免疫細胞を産生するための方法であって、

40

a) 免疫細胞中の第1の遺伝子配列またはその調節エレメントにおける単一の標的核酸塩基を改変する工程、および

b) 第2の遺伝子に外因性機能的キメラ抗原受容体(CAR)もしくはその機能的断片または外因性機能的T細胞受容体もしくはその機能的断片を挿入することによって、前記免疫細胞中の前記第2の遺伝子配列またはその調節エレメントを改変する工程

を含み、

前記第1の遺伝子および前記第2の遺伝子の各々が、免疫原性遺伝子、チェックポイント阻害因子遺伝子、または免疫応答調節遺伝子であり、

それによって免疫原性が低減されたおよび/または抗新生物活性が増加した、改変された免疫細胞を生成する方法。

50

実施形態 190

工程b)が、核酸プログラム可能DNA結合タンパク質 (napDNAbp) を用いて前記第2の遺伝子配列に部位特異的切断を生成することをさらに含む、実施形態189に記載の方法。

実施形態 191

前記napDNAbpがCas12bである、実施形態190に記載の方法。

実施形態 192

前記改変を有さない同じ型の対照細胞と比較して、前記第1の遺伝子の発現が少なくとも60%低減され、または前記第2の遺伝子の発現が少なくとも60%低減される、実施形態185~191のいずれか一項に記載の方法。

10

実施形態 193

前記第1の遺伝子が、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD4、TRAC、TRBC1、TRBC2、PDCD1、CD30、CD33、CD7、CD52、B2M、CD70、CIITA、CD2、およびCD5からなる群より選択される、実施形態138~192のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 194

前記第1の遺伝子または前記第2の遺伝子が、TRAC、CIITA、CD2、CD5、CD7、およびCD52からなる群より選択される、実施形態193に記載の方法。

実施形態 195

前記第2の遺伝子がTRACである、実施形態185~194のいずれか一項に記載の方法。

20

実施形態 196

工程a)が、2つの他の遺伝子配列またはその調節エレメントにおける単一の標的核酸塩基を改変することをさらに含む、実施形態185~195のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 197

工程a)が、3つの他の遺伝子配列またはその調節エレメントにおける単一の標的核酸塩基を改変することをさらに含む、実施形態185~195のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 198

工程a)が、4つの他の遺伝子配列またはその調節エレメントにおける単一の標的核酸塩基を改変することをさらに含む、実施形態185~195のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 199

工程a)が、5つの他の遺伝子配列またはその調節エレメントにおける単一の標的核酸塩基を改変することをさらに含む、実施形態185~195のいずれか一項に記載の方法。

30

実施形態 200

工程a)が、6つの他の遺伝子配列またはその調節エレメントにおける単一の標的核酸塩基を改変することをさらに含む、実施形態185~195のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 201

工程a)が、7つの他の遺伝子配列またはその調節エレメントにおける単一の標的核酸塩基を改変することをさらに含む、実施形態185~195のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 202

工程a)における前記改変することが、デアミナーゼおよび核酸プログラム可能DNA結合タンパク質 (napDNAbp) を含む塩基エディターを用いて単一の標的核酸塩基を脱アミノ化することを含む、実施形態185~201のいずれか一項に記載の方法。

40

実施形態 203

前記napDNAbpが、Cas9ニッカーゼまたはヌクレアーゼ不活Cas9を含む、実施形態202に記載の方法。

実施形態 204

前記デアミナーゼがシチジンデアミナーゼであり、前記改変が、シチジン (C) のチミン (T) への変換を含む、実施形態203に記載の方法。

実施形態 205

前記デアミナーゼがアデノシンデアミナーゼであり、前記改変が、アデニン (A) のグ

50

アニン（G）への変換を含む、実施形態203に記載の方法。

実施形態206

a)における前記改変することが、前記免疫細胞をガイド核酸配列に接触させることを含む、実施形態185～205のいずれか一項に記載の方法。

実施形態207

前記ガイド核酸配列が、UUCGUAUCUGUAAAACCAAG、CCUACCUGUCACCAGGACCA、CUCUUAACCGUACCAUAACC、CACCUACCUAAGAACCAUCC、ACUCACGCGUGGAUAGCCUCC、ACUCACCCAGCAUCCCCAGC、CACUCACCUUAGCCUGAGCA、およびCACGCACCUGGACAGCUGACからなる群より選択される配列を含む、実施形態206に記載の方法。

10

実施形態208

b)における前記改変することが、前記免疫細胞をガイド核酸配列に接触させることを含む、実施形態185～207のいずれか一項に記載の方法。

実施形態209

前記ガイド核酸配列が、表1の配列より選択される配列を含む、実施形態208に記載の方法。

実施形態210

a)における前記改変することが、逆転写酵素および伸長されたガイド核酸配列を用いた標的プライム逆転写によって単一の標的核酸塩基を異なる核酸塩基で置き換えることを含み、前記伸長されたガイド核酸配列が、逆転写テンプレート配列、逆転写プライマー結合部位、またはそれらの組合せを含む、実施形態185～209のいずれか一項に記載の方法。

20

実施形態211

a)およびb)における前記改変することが、前記免疫細胞において1%未満のインデルを生成する、実施形態185～210のいずれか一項に記載の方法。

実施形態212

a)およびb)における前記改変することが、前記免疫細胞において5%未満のオフターゲット改変を生成する、実施形態185～211のいずれか一項に記載の方法。

実施形態213

a)およびb)における前記改変することが、前記免疫細胞において5%未満の非標的改変を生成する、実施形態185～211のいずれか一項に記載の方法。

30

実施形態214

前記免疫細胞がヒト細胞である、実施形態185～213のいずれか一項に記載の方法。

実施形態215

前記免疫細胞が、細胞傷害性T細胞、調節性T細胞、ヘルパーT細胞、樹状細胞、B細胞、またはNK細胞である、実施形態214に記載の方法。

実施形態216

前記CARが、新生物に関連するマーカーに特異的に結合する、実施形態186～215のいずれか一項に記載の方法。

実施形態217

前記CARが、CD7に特異的に結合する、実施形態216に記載の方法。

40

実施形態218

免疫原性が低減されたおよび/または抗新生物活性が増加した、改変された免疫細胞であって、

a)第1の遺伝子配列またはその調節エレメントにおける単一の標的核酸塩基の改変、および

b)第2の遺伝子配列またはその調節エレメントにおける改変であって、Cas12ポリペプチドによって生成された部位特異的切断である改変

を含み、

前記第1の遺伝子および前記第2の遺伝子の各々が、免疫原性遺伝子、チェックポイン

50

ト阻害因子遺伝子、または免疫応答調節遺伝子である、改変された免疫細胞。

実施形態 2 1 9

外因性機能的キメラ抗原受容体 (CAR) またはその機能的断片をさらに含む、実施形態 218 に記載の改変された免疫細胞。

実施形態 2 2 0

前記 CAR またはその機能的断片をコードするポリヌクレオチドが、Cas12 ポリペプチドによって生成された前記部位特異的切断に挿入される、実施形態 219 に記載の改変された免疫細胞。

実施形態 2 2 1

免疫原性が低減されたおよび/または抗新生物活性が増加した、改変された免疫細胞であって、

a) 免疫細胞中の第1の遺伝子配列またはその調節エレメントにおける単一の標的核酸塩基の改変、および

b) 第2の遺伝子配列またはその調節エレメントにおける改変であって、外因性キメラ抗原受容体 (CAR) もしくはその機能的断片または外因性 T 細胞受容体 もしくはその機能的断片の挿入である改変

を含み、

前記第1の遺伝子および前記第2の遺伝子の各々が、免疫原性遺伝子、チェックポイント阻害因子遺伝子、または免疫応答調節遺伝子である、改変された免疫細胞。

実施形態 2 2 2

b) における前記改変が、Cas12b を用いた部位特異的切断によって生成される、実施形態 221 に記載の改変された免疫細胞。

実施形態 2 2 3

前記改変を有さない同じ型の対照細胞と比較して、前記第1の遺伝子の発現が少なくとも60%低減され、または前記第2の遺伝子の発現が少なくとも60%低減される、実施形態 218 ~ 222 のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

実施形態 2 2 4

前記第1の遺伝子または前記第2の遺伝子が、CD3 イプシロン、CD3 ガンマ、CD3 デルタ、CD4、TRAC、TRBC1、TRBC2、PDCD1、CD30、CD33、CD7、CD52、B2M、CD70、CIITA、CD2、および CD5 からなる群より選択される、実施形態 218 ~ 223 のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

実施形態 2 2 5

前記第1の遺伝子または前記第2の遺伝子が、TRAC、CD2、CD5、CD7、および CD5 2 からなる群より選択される、実施形態 193 に記載の方法。

実施形態 2 2 6

前記第2の遺伝子が TRAC である、実施形態 225 に記載の改変された免疫細胞。

実施形態 2 2 7

2つの他の遺伝子配列またはその調節エレメントにおける単一の標的核酸塩基に改変をさらに含む、実施形態 218 ~ 226 のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

実施形態 2 2 8

3つの他の遺伝子配列またはその調節エレメントにおける単一の標的核酸塩基に改変をさらに含む、実施形態 218 ~ 226 のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

実施形態 2 2 9

4つの他の遺伝子配列またはその調節エレメントにおける単一の標的核酸塩基に改変をさらに含む、実施形態 218 ~ 226 のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

実施形態 2 3 0

5つの他の遺伝子配列またはその調節エレメントにおける単一の標的核酸塩基に改変をさらに含む、実施形態 218 ~ 226 のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

実施形態 2 3 1

6つの他の遺伝子配列またはその調節エレメントにおける単一の標的核酸塩基に改変を

10

20

30

40

50

さらに含む、実施形態218～226のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

実施形態232

7つの他の遺伝子配列またはその調節エレメントにおける単一の標的核酸塩基に改変をさらに含む、実施形態218～226のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

実施形態233

a)における前記改変が、デアミナーゼおよび核酸プログラム可能DNA結合タンパク質(napDNAbp)を含む塩基エディターによって生成される、実施形態218～232のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

実施形態234

前記デアミナーゼがシチジンデアミナーゼであり、前記改変が、シチジン(C)のチミン(T)への変換を含む、実施形態233に記載の改変された免疫細胞。

10

実施形態235

前記デアミナーゼがアデノシンデアミナーゼであり、前記改変が、アデニン(A)のグアニン(G)への変換を含む、実施形態233に記載の改変された免疫細胞。

実施形態236

ゲノムにおいて1%未満のインデルを含む、実施形態218～235のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

実施形態237

ヒト細胞である、実施形態218～236のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

実施形態238

細胞傷害性T細胞、調節性T細胞、ヘルパーT細胞、樹状細胞、B細胞、またはNK細胞である、実施形態218～237のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

20

実施形態239

前記CARが、新生物に関連するマーカーに特異的に結合する、実施形態218～238のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

実施形態240

前記CARが、CD7に特異的に結合する、実施形態239に記載の改変された免疫細胞。

実施形態241

b)における前記改変が、前記TRAC遺伝子配列中のエクソン1における挿入である、実施形態218～240のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

30

実施形態242

改変された免疫細胞の集団であって、複数の前記免疫細胞の集団が、

a)免疫細胞中の第1の遺伝子配列またはその調節エレメントにおける単一の標的核酸塩基の改変、および

b)第2の遺伝子配列またはその調節エレメントにおける改変であって、Cas12ポリペプチドによって生成された部位特異的切断である改変

を含み、

前記第1の遺伝子および前記第2の遺伝子の各々が、免疫原性遺伝子、チェックポイント阻害因子遺伝子、または免疫応答調節遺伝子であり、

前記複数の前記集団が、外因性キメラ抗原受容体(CAR)またはその機能的断片を含む

40

、

改変された免疫細胞の集団。

実施形態243

前記CARまたはその機能的断片をコードするポリヌクレオチドが、Cas12ポリペプチドによって生成された前記部位特異的切断に挿入される、実施形態242に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態244

改変された免疫細胞の集団であって、複数の前記免疫細胞の集団が、

a)第1の遺伝子配列またはその調節エレメントにおける単一の標的核酸塩基の改変、および

50

b) 第2の遺伝子配列またはその調節配列における改変であって、外因性キメラ抗原受容体 (CAR) もしくはその機能的断片または外因性T細胞受容体もしくはその機能的断片の挿入である改変を含み、

前記第1の遺伝子および前記第2の遺伝子の各々が、免疫原性遺伝子、チェックポイント阻害因子遺伝子、または免疫応答調節遺伝子であり、a) またはb) における改変を有する複数の細胞が、免疫原性の低減および/または抗新生物活性の増加を示す、改変された免疫細胞の集団。

実施形態 2 4 5

b) における前記改変が、Cas12bを用いた部位特異的切断によって生成される、実施形態 244 に記載の改変された免疫細胞の集団。

10

実施形態 2 4 6

前記改変を有さない同じ型の複数の対照細胞と比較して、a) またはb) における前記改変を有する前記複数の細胞において、前記第1の遺伝子の発現が少なくとも60%低減され、または前記第2の遺伝子の発現が少なくとも60%低減される、実施形態 242 ~ 245 のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態 2 4 7

前記第1の遺伝子または前記第2の遺伝子が、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD4、TRAC、TRBC1、TRBC2、PDCD1、CD30、CD33、CD7、CD52、B2M、CD70、CIITA、CD2、およびCD5からなる群より選択される、実施形態 242 ~ 246 のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞の集団。

20

実施形態 2 4 8

前記第1の遺伝子または前記第2の遺伝子が、TRAC、CIITA、CD2、CD5、CD7、およびCD52からなる群より選択される、実施形態 247 に記載の改変された免疫細胞の集団

実施形態 2 4 9

前記第1の遺伝子が、TRAC、CD7、またはCD52である、実施形態 248 に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態 2 5 0

前記第2の遺伝子がTRACである、実施形態 248 に記載の改変された免疫細胞の集団。

30

実施形態 2 5 1

a) またはb) における前記改変を有する前記複数の細胞が、2つの他の遺伝子配列またはその調節エレメントにおける単一の標的核酸塩基に改変をさらに含む、実施形態 242 ~ 250 のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態 2 5 2

a) またはb) における前記改変を有する前記複数の細胞が、3つ、4つ、5つ、または6つの他の遺伝子配列またはその調節エレメントにおける単一の標的核酸塩基をさらに含む、実施形態 251 に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態 2 5 3

a) における前記改変が、塩基エディターを形成するためのデアミナーゼおよび核酸プログラム可能DNA結合タンパク質 (napDNAbp) を含む塩基エディターによって生成される、実施形態 242 ~ 252 のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞の集団。

40

実施形態 2 5 4

前記デアミナーゼがシチジンデアミナーゼであり、前記改変が、シチジン (C) のチミン (T) への変換を含む、実施形態 253 に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態 2 5 5

前記デアミナーゼがアデノシンデアミナーゼであり、前記改変が、アデニン (A) のグアニン (G) への変換を含む、実施形態 253 に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態 2 5 6

前記塩基エディターが、ウラシルグリコシラーゼ阻害因子をさらに含む、実施形態 254

50

に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態 2 5 7

少なくとも60%が生存可能である、実施形態242～256のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態 2 5 8

少なくとも60%が、前記改変を有さない同じ型の対照細胞の集団の拡大速度の少なくとも80%で拡大する、実施形態242～256のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態 2 5 9

前記免疫細胞がヒト細胞である、実施形態242～258のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞の集団。

10

実施形態 2 6 0

前記免疫細胞が、細胞傷害性T細胞、調節性T細胞、ヘルパーT細胞、樹状細胞、B細胞、またはNK細胞である、実施形態242～259のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態 2 6 1

前記CARが、新生物に関連するマーカーに特異的に結合する、実施形態242～260のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態 2 6 2

前記CARが、CD7に特異的に結合する、実施形態261に記載の改変された免疫細胞の集団。

20

実施形態 2 6 3

b)における前記改変が、前記TRAC遺伝子配列中のエクソン1における挿入である、実施形態242～262のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞の集団。

実施形態 2 6 4

抗新生物活性が増加した、改変された免疫細胞を産生するための方法であって、前記免疫細胞中のCblがん原遺伝子B (CBLB) 遺伝子配列またはその調節エレメントにおける単一の標的核酸塩基を改変することを含み、前記改変が、前記改変を欠く免疫細胞と比較して、前記免疫細胞の活性化閾値を低減し、それによって、抗新生物活性が増加した、改変された免疫細胞を生成する方法。

30

実施形態 2 6 5

抗新生物活性が増加した、改変された免疫細胞を含む組成物であって、前記改変された免疫細胞が、Cblがん原遺伝子B (CBLB) 遺伝子配列またはその調節エレメントにおける単一の標的核酸塩基に改変を含み、前記改変された免疫細胞が、前記改変を有さない同じ型の対照免疫細胞と比較して活性化閾値の低減を示す、組成物。

実施形態 2 6 6

免疫細胞の集団であって、複数の前記免疫細胞の集団が、CBLB遺伝子配列またはその調節エレメントにおける単一の標的核酸塩基における改変を含み、前記改変を含む前記複数の前記免疫細胞の集団が、前記改変を有さない同じ型の免疫細胞の対照集団と比較して活性化閾値の低減を示す、免疫細胞の集団。

40

実施形態 2 6 7

抗新生物活性が増加した、改変された免疫細胞の集団を産生するための方法であって、免疫細胞の集団中のCblがん原遺伝子B (CBLB) 遺伝子配列またはその調節エレメントにおける単一の標的核酸塩基を改変することを含み、ここで、免疫細胞の集団の少なくとも50%が、前記単一の標的核酸塩基の改変を含むように改変される方法。

実施形態 2 6 8

塩基編集のための少なくとも4つの異なるガイド核酸配列を含む組成物。

実施形態 2 6 9

塩基エディターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含み、前記塩基エディターポリペプチドが、核酸プログラム可能DNA結合タンパク質 (napDNAbp) およ

50

びデアミナーゼを含む、実施形態268に記載の組成物。

実施形態270

前記塩基エディターをコードする前記ポリヌクレオチドがmRNA配列である、実施形態269に記載の組成物。

実施形態271

前記デアミナーゼがシチジンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼである、実施形態269または270に記載の組成物。

実施形態272

塩基エディターポリペプチドをさらに含み、前記塩基エディターポリペプチドが、核酸プログラム可能DNA結合タンパク質(napDNAbp)およびデアミナーゼを含む、実施形態268に記載の組成物。

10

実施形態273

前記デアミナーゼがシチジンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼである、実施形態272に記載の組成物。

実施形態274

脂質ナノ粒子をさらに含む、実施形態272または273に記載の組成物。

実施形態275

前記少なくとも4つのガイド核酸配列それぞれが、CD2、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD4、CD5、CD7、CD30、CD33、CD52、CD70、およびCIITAからなる群より選択される遺伝子配列とハイブリダイズし、いくつかの実施形態において、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、または8つ以上の遺伝子またはその調節エレメントが、CD2、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD4、CD5、CD7、CD30、CD33、CD52、CD70、およびCIITAより選択され、いくつかの実施形態において、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、または8つ以上の遺伝子またはその調節エレメントが、CD2、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD4、CD5、CD7、CD30、CD33、CD52、CD70、およびCIITAより選択される1つまたは複数の遺伝子を含み、いくつかの実施形態において、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、または8つ以上の遺伝子またはその調節エレメントが、ACAT1、ACLY、ADORA2A、AXL、B2M、BATF、BCL2L11、BTLA、CAMK2D、cAMP、CASP8、Cblb、CCR5、CD2、CD3D、CD3E、CD3G、CD4、CD5、CD7、CD8A、CD33、CD38、CD52、CD70、CD82、CD86、CD96、CD123、CD160、CD244、CD276、CDK8、CDKN1B、Chi3I1、CIITA、CISH、CSF2CSK、CTLA-4、CUL3、Cyp11a1、DCK、DGKA、DGKZ、DHX37、ELOB(TCEB2)、ENTPD1(CD39)、FADD、FAS、GATA3、IL6、IL6R、IL10、IL10RA、IRF4、IRF8、JUNB、Lag3、LAIR-1(CD305)、LDHA、LIF、LYN、MAP4K4、MAPK14、MCJ、MEF2D、MGAT5、NR4A1、NR4A2、NR4A3、NT5E(CD73)、ODC1、OTULINL(FAM105A)、PAG1、PDCD1、PDIA3、PHD1(EGLN2)、PHD2(EGLN1)、PHD3(EGLN3)、PIK3CD、PIKFYVE、PPARα、PPARδ、PRDMI1、PRKACA、PTEN、PTPN2、PTPN6、PTPN11、PVRIG(CD112R)、RASA2、RFXANK、SELPG/PSGL1、SIGLEC15、SLA、SLAMF7、SOCS1、Spry1、Spry2、STK4、SUV39、H1TET2、TGFβRII、TIGIT、Tim-3、TMEM222、TNFAIP3、TNFRSF8(CD30)、TNFRSF10B、TOX、TOX2、TRAC、TRBC1、TRBC2、UBASH3A、VHL、VISTA、XBP1、YAP1、およびZC3H12Aより選択される、実施形態267~274のいずれか一項に記載の組成物。

20

30

40

実施形態276

前記少なくとも4つのガイド核酸配列それぞれが、CD3イプシロン、CD3デルタ、CD3ガンマ、TRAC、TRBC1、およびTRBC2、CD2、CD5、CD7、CD52、CD70、およびCIITAからなる群より選択される遺伝子配列とハイブリダイズする、実施形態267~274のいずれか一項に記載の組成物。

実施形態277

前記少なくとも4つのガイド核酸配列が、UUCGUAUCUGUAAAACCAAG、CCUACC

50

UGUCACCAGGACCA、CUCUUACCUGUACCAUAACC、CACCUACCUAAGAACCAUCC、ACUCACGCUGGAUAGCCUCC、ACUCACCCAGCAUCCCCAGC、CACUCACCUUAGCCUGAGCA、およびCACGCACCUGGACAGCUGACからなる群より選択される配列を含む、実施形態267～274のいずれか一項に記載の組成物。

実施形態278

前記組成物が、エレクトロポレーションを用いて免疫細胞に導入される、実施形態267～277のいずれか一項に記載の組成物を含む免疫細胞。

実施形態279

組成物が、エレクトロポレーション、ヌクレオフェクション、ウイルス形質導入、またはそれらの組合せを用いて免疫細胞に導入される、実施形態267～277のいずれか一項に記載の組成物を含む免疫細胞。

10

実施形態280

参照細胞と比較して成長または生存能が増加している、実施形態86および88～134のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

実施形態281

前記参照細胞が、Cas9ヌクレアーゼを用いて改変された免疫細胞である、実施形態280に記載の改変された免疫細胞。

実施形態282

細胞の参照集団と比較して、改変された免疫細胞の収率が増加している、実施形態87および135～179に記載の改変された免疫細胞の集団。

20

実施形態283

前記参照集団が、Cas9ヌクレアーゼを用いて改変された免疫細胞の集団である、実施形態282に記載の改変された免疫細胞の集団。

[他の実施形態]

上述の説明から、種々の用途および条件に適用するために、本明細書に記載する本発明に変形および修正を加えることができることが明らかであろう。そのような実施形態もまた、特許請求の範囲内である。

【手続補正2】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

30

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

免疫原性が低減されたおよび/または抗新生物活性が増加した、改変された免疫細胞または改変された免疫細胞の集団を多重化編集によって産生するための方法であって、免疫細胞中または免疫細胞の集団中の少なくとも4つの遺伝子またはその調節エレメントをその各々における単一の標的核酸塩基で改変し、それによって前記免疫原性が低減されたおよび/または抗新生物活性が増加した、改変された免疫細胞または改変された免疫細胞の集団を生成することを含む方法。

40

【請求項2】

前記遺伝子の少なくとも1つが、チェックポイント阻害因子遺伝子、免疫応答調節遺伝子、または免疫原性遺伝子である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記遺伝子の少なくとも1つの発現が、前記改変を有さない対照細胞と比較して少なくとも50%または少なくとも80%低減される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記遺伝子の少なくとも1つが、TCR複合体を形成するポリペプチドをコードする、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

50

前記遺伝子の少なくとも1つが、TRAC、チェックポイント阻害因子、PDCD1、T細胞マーカー、CD2、CD52、CD7、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、TRBC1、TRBC2、CD4、CD5、CD7、CD30、CD33、CD52、CD70、B2M、およびCIITAからなる群から選択されるポリペプチドをコードする、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

前記改変することが、前記単一の標的核酸塩基を脱アミノ化することを含む、請求項1~5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記脱アミノ化することが、デアミナーゼを含むポリペプチドによって行われる、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記デアミナーゼが核酸プログラム可能DNA結合タンパク質(napDNAbp)と会合して塩基エディターを形成する、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記デアミナーゼが核酸プログラム可能DNA結合タンパク質(napDNAbp)と融合している、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記napDNAbpが、Cas9ポリペプチド、Cas12bポリペプチド、またはその機能的な一部を含む、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記napDNAbpが、Cas9ニッカーゼまたはヌクレアーゼ不活Cas9を含む、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記デアミナーゼが、シトシン(C)をチミン(T)へ変換するシチジンデアミナーゼ、またはアデノシン(A)をグアニン(G)へ変換するアデノシンデアミナーゼである、請求項7~11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記塩基エディターが、ウラシルグリコシラーゼ阻害因子をさらに含む、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記改変することが、前記免疫細胞または前記免疫細胞の集団を塩基エディターおよびガイド核酸配列に接触させることを含み、および/または、前記改変することが、エクソン中に未熟終止コドンを生成する、請求項1~13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

前記ガイド核酸配列が、UUCGUAUCUGUAAAACCAAG、CCUACCGUCACCAGGACCA、CUCUACCGUACCAUAACC、CACCUACCUAAGAACCAUCC、ACUCACGCUGGAUAGCCUCC、ACUCACCCAGCAUCCCAGC、CACUCACCUUAGCCUGAGCA、およびCACGCACCUGGACAGCUGACからなる群より選択される配列を含む、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記標的核酸塩基が、エクソン、スプライスドナー部位、もしくはスプライスアクセプター部位にあるか、または、前記標的核酸塩基が、TRAC、PCDC1、CD52、CD7、B2M、CD2、CD5、もしくはCIITA遺伝子のスプライスアクセプター部位またはスプライスドナー部位にある、請求項1~15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

前記免疫細胞が、ヒト細胞、細胞傷害性T細胞、調節性T細胞、ヘルパーT細胞、樹状細胞、B細胞、NK細胞、またはそれらの集団である、請求項1~16のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 18】

a) 前記改変することがex vivoであり、および/または
 b) 前記免疫細胞または前記免疫細胞の集団が、単一のヒトドナーに由来し、および/または
 c) 前記方法が、前記免疫細胞または前記免疫細胞の集団を、
 c 1) 外因性機能的キメラ抗原受容体 (CAR) もしくはその機能的断片をコードするポリヌクレオチド; もしくは
 c 2) 外因性CARもしくはその機能的断片をコードするポリヌクレオチドを含むレンチウイルス
 に接触させることを含む

10

請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記CARもしくはその機能的断片が、新生物に関連するマーカーに特異的に結合するか、もしくは、T細胞がん、B細胞がん、リンパ腫、白血病、もしくは多発性骨髄腫から選択される新生物に特異的に結合し、または、
 前記CARもしくはその機能的断片が、CD7もしくはBCMAに特異的に結合する、

請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法に従って産生された、改変された免疫細胞。

20

【請求項 21】

免疫原性が低減されたまたは抗新生物活性が増加した、改変された免疫細胞であって、少なくとも4つの遺伝子配列またはその調節エレメントの各々に単一の標的核酸塩基の改変を含む、改変された免疫細胞。

【請求項 22】

前記少なくとも4つの遺伝子配列の各々が、チェックポイント阻害因子遺伝子配列、免疫応答調節遺伝子配列、または免疫原性遺伝子配列であり、および/または前記少なくとも4つの遺伝子配列が、TCR複合体遺伝子配列、もしくはT細胞マーカー遺伝子配列、CD2、CD3、CD5、CD52、CD7、CD2、TRAC、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、TRBC1、TRBC2、CD4、CD30、CD33、CD70、B2M、PDCD1、CIITA遺伝子配列、もしくはそれらいずれかの調節エレメントを含み、かつ前記免疫細胞が、細胞傷害性T細胞、調節性T細胞、Tヘルパー細胞、樹状細胞、B細胞、およびNK細胞からなる群から選択されるヒト免疫細胞である、

30

請求項 21 に記載の改変された免疫細胞。

【請求項 23】

前記免疫細胞はex vivo培養物中あり、および/または前記免疫細胞は単一のヒトドナーに由来する免疫細胞である、請求項 20 ~ 22 のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞。

【請求項 24】

前記免疫細胞は、外因性機能的キメラ抗原受容体 (CAR) またはその機能的断片をコードするポリヌクレオチドをさらに含むか、または、
 前記CARは、新生物に関連するマーカーに特異的に結合するか、もしくは、前記CARは、T細胞がん、B細胞がん、リンパ腫、白血病、または多発性骨髄腫から選択される新生物に関連するマーカーに特異的に結合し、および/または前記CARは、CD7もしくはBCMAに特異的に結合する、

40

請求項 22 または 23 に記載の改変された免疫細胞。

【請求項 25】

核酸プログラム可能DNA結合タンパク質 (napDNAbp) とデアミナーゼを含む塩基エディター、および
 ガイド核酸配列

50

を含む組成物であって、前記ガイド核酸配列が、UUCGUAUCUGUAAAACCAAG、CCU ACCUGUCACCAGGACCA、CUCUUACCUGUACCAUAACC、CACCUACCUAAGAACC AUCC、ACUCACGCUGGAUAGCCUCC、ACUCACCCAGCAUCCCCAGC、CACUCAC CUUAGCCUGAGCA、およびCACGCACCUGGACAGCUGACからなる群より選択される配列を含む、組成物。

【請求項 26】

前記napDNAbpが、Cas9ニッカーゼ (nCas9) またはヌクレアーゼ不活Cas9 (dCas9) を含み、前記デアミナーゼがシチジンデアミナーゼである、請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 27】

前記塩基エディターが、ウラシルグリコシラーゼ阻害因子をさらに含む、請求項 25 または 26 に記載の組成物。

【請求項 28】

前記napDNAbpが、Cas9ニッカーゼ (nCas9) またはヌクレアーゼ不活Cas9 (dCas9) を含み、前記デアミナーゼがアデノシンデアミナーゼである、請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 29】

免疫原性が低減されたおよび/または抗新生物活性が増加した、改変された免疫細胞を産生するための方法であって、

a) 免疫細胞中の第1の遺伝子配列またはその調節エレメントにおける単一の標的核酸塩基を改変する工程、および

b) Cas12ポリペプチドを用いて、前記免疫細胞中の第2の遺伝子配列またはその調節エレメントを改変する工程であって、前記Cas12ポリペプチドが、第2の遺伝子配列中に部位特異的切断を生成する工程、および

c) 前記改変された免疫細胞を、外因性機能的キメラ抗原受容体 (CAR) またはその機能的断片をコードするポリヌクレオチドを含むレンチウイルスに接触させる工程 を含み、

前記第1の遺伝子および前記第2の遺伝子の各々が、免疫原性遺伝子、チェックポイント阻害因子遺伝子、または免疫応答調節遺伝子であり、

それによって免疫原性が低減されたおよび/または抗新生物活性が増加した、改変された免疫細胞を生成する方法。

【請求項 30】

前記CARまたはその機能的断片をコードするポリヌクレオチドが、Cas12ポリペプチドによって生成された前記部位特異的切断に挿入される、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記Cas12ポリペプチドがCas12bポリペプチドである、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記第1の遺伝子が、CD3イプシロン、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD4、TRAC、TRBC1、TRBC2、PDCD1、CD30、CD33、CD7、CD52、B2M、CD70、CIITA、CD2、およびCD5からなる群より選択され、および/または

前記第1の遺伝子または前記第2の遺伝子が、TRAC、CIITA、CD2、CD5、CD7、およびCD52からなる群より選択される、

請求項 29 ~ 31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

免疫原性が低減されたおよび/または抗新生物活性が増加した、改変された免疫細胞であって、

a) 免疫細胞中の第1の遺伝子配列またはその調節エレメントにおける単一の標的核酸塩基の改変、および

b) 第2の遺伝子配列またはその調節エレメントにおける改変であって、外因性キメラ抗原受容体 (CAR) もしくはその機能的断片または外因性T細胞受容体もしくはその機能

10

20

30

40

50

的断片の挿入である改変

を含み、

前記第1の遺伝子および前記第2の遺伝子の各々が、免疫原性遺伝子、チェックポイント阻害因子遺伝子、または免疫応答調節遺伝子である、改変された免疫細胞。

【請求項34】

b)における前記改変が、Cas12bを用いた部位特異的切断によって生成される、請求項33に記載の改変された免疫細胞。

【請求項35】

抗新生物活性が増加した、改変された免疫細胞を産生するための方法であって、免疫細胞中のCblがん原遺伝子B(CBLB)遺伝子配列またはその調節エレメントにおける単一の標的核酸塩基を改変することを含み、前記改変が、前記改変を欠く免疫細胞と比較して、前記免疫細胞の活性化閾値を低減し、それによって、抗新生物活性が増加した、改変された免疫細胞を生成する方法。

10

【請求項36】

請求項20～24、33、または34のいずれか一項に記載の改変された免疫細胞を含む組成物。

【請求項37】

塩基エディターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、前記塩基エディターポリペプチドが、核酸プログラム可能DNA結合タンパク質(napDNAbp)とシチジンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼとを含む、ポリヌクレオチドと、塩基編集のための少なくとも4つの異なるガイド核酸配列と

20

を含む、組成物。

【請求項38】

前記塩基エディターポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドがmRNA配列である、請求項37に記載の組成物。

【請求項39】

脂質ナノ粒子をさらに含む、請求項36～38のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項40】

前記少なくとも4つのガイド核酸配列が、UUCGUAUCUGUAAAACCAAG、CCUACCUUGUCACCAGGACCA、CUCUUACCUUGUACCAUAACC、CACCUACCUAAGAACCAUCC、ACUCACGCUGGAUAGCCUCC、ACUCACCCAGCAUCCCCAGC、CACUCACCUUAGCCUGAGCA、およびCACGCACCUUGGACAGCUGACからなる群より選択される配列を含む、請求項37～39のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項41】

前記組成物が、エレクトロポレーション、ヌクレオフェクション、ウイルス形質導入、またはそれらの組合せにより免疫細胞に導入される、請求項36～40のいずれか一項に記載の組成物を含む免疫細胞。

40

50