(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公表特許公報(A)　　(11)公表番号
特表2023-524666
(P2023-524666A)
(43)公表日　令和5年6月13日(2023.6.13)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）	
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10	ＺＮＡ	４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*15/88 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/88	Ｚ	４Ｃ０８４
Ａ６１Ｋ	*35/28 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/28		４Ｃ０８７
Ａ６１Ｋ	*35/15 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/15		
Ａ６１Ｋ	*35/44 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/44		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全329頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-565535(P2022-565535)
(86)(22)出願日　令和3年4月27日(2021.4.27)
(85)翻訳文提出日　令和4年12月26日(2022.12.26)
(86)国際出願番号　PCT/US2021/029446
(87)国際公開番号　WO2021/222287
(87)国際公開日　令和3年11月4日(2021.11.4)
(31)優先権主張番号　63/016,913
(32)優先日　令和2年4月28日(2020.4.28)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/121,781
(32)優先日　令和2年12月4日(2020.12.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/124,058
最終頁に続く

(71)出願人　518196169
インテリア セラピューティクス，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 ０
２１３９，ケンブリッジ，エリー スト
リート ４０，スイート １３０
(74)代理人　100092783
弁理士　小林 浩
(74)代理人　100093676
弁理士　小林 純子
(74)代理人　100120134
弁理士　大森 規雄
(74)代理人　100153693
弁理士　岩田 耕一
(72)発明者　ナレンドラ，プージャ キャトサンドラ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　インビトロ細胞送達の方法

(57)【要約】
インビトロでの多重送達及び遺伝子編集のための組成物及び方法が提供される。
【選択図】

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集細胞を含む細胞集団であって、前記細胞集団における前記細胞のうちの少なくとも５０％が、少なくとも２つのゲノム編集を含み、（ｉ）前記細胞集団における前記細胞のうちの１％未満、０．５％未満、０．２％未満、若しくは０．１％未満が、標的対標的転座を有するか、又は（ｉｉ）前記細胞集団が、相互転座、複合転座、若しくはオフターゲット転座の２倍未満のバックグラウンドレベルを有する、細胞集団。
【請求項２】
前記細胞集団が、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍、３０倍、４０倍、又は５０倍の拡大が可能である、請求項１に記載の細胞集団。
【請求項３】
細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集細胞を含む細胞集団であって、前記細胞集団における前記細胞のうちの少なくとも５０％が、少なくとも２つのゲノム編集を含み、前記細胞集団が、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、５０倍の拡大が可能である、細胞集団。
【請求項４】
前記細胞のうちの１％未満、０．５％未満、０．２％未満、若しくは０．１％未満が、標的対標的転座を有するか、又は相互転座、複合転座、若しくはオフターゲット転座の２倍未満のバックグラウンドレベルを有する、請求項３に記載の細胞集団。
【請求項５】
前記複数のゲノム編集のうちの少なくとも１つのゲノム編集が、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含むゲノム編集ツールによって産生され、前記ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、任意選択によりクリバーゼ（ｃｌｅａｖａｓｅ）である、請求項１～４のいずれか一項に記載の細胞集団。
【請求項６】
複数のゲノム編集が、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤によって産生され、前記ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、クリバーゼであり、任意選択によりＣａｓ９である、請求項５に記載の細胞集団。
【請求項７】
単一ゲノム編集が、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤によって産生され、前記ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、クリバーゼであり、任意選択によりＣａｓ９である、請求項５に記載の細胞集団。
【請求項８】
前記複数のゲノム編集が、外来性核酸の挿入を含み、前記挿入が、任意選択により標的化挿入である、請求項１～７のいずれか一項に記載の細胞集団。
【請求項９】
前記細胞集団が、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、少なくとも２０倍、３０倍、４０倍、又は５０倍に拡大している、請求項１～８のいずれか一項に記載の細胞集団。
【請求項１０】
前記細胞が、ヒト細胞である、請求項１～９のいずれか一項に記載の細胞集団。
【請求項１１】
前記細胞が、間葉系幹細胞、造血幹細胞（ＨＳＣ）、単核細胞、血管内皮前駆細胞（ＥＰＣ）、神経幹細胞（ＮＳＣ）、角膜上皮幹細胞（ＬＳＣ）、組織特異的初代細胞又はそれに由来する細胞（ＴＳＣ）、誘導多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）、眼幹細胞、多能性幹細胞（ＰＳＣ）、胚性幹細胞（ＥＳＣ）、臓器又は組織移植のための細胞、及び任意選択によりＡＣＴ療法に使用される細胞から選択される、請求項１～１０のいずれか一項に記載の細胞集団。
【請求項１２】

前記細胞が、免疫細胞である、請求項１～１１のいずれか一項に記載の細胞集団。
【請求項１３】
前記免疫細胞が、リンパ球（例えば、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ナチュラルキラー細胞（「ＮＫ細胞」、及びＮＫＴ細胞、又はｉＮＫＴ細胞））、単球、マクロファージ、肥満細胞、樹状細胞、顆粒球（例えば、好中球、好酸球、及び好塩基球）、初代免疫細胞、ＣＤ３＋細胞、ＣＤ４＋細胞、ＣＤ８＋Ｔ細胞、制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、Ｂ細胞、ＮＫ細胞、及び樹状細胞（ＤＣ））から選択される、請求項１２に記載の細胞集団。
【請求項１４】
前記免疫細胞が、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）、リンパ球、Ｔ細胞、任意選択によりＣＤ４＋細胞、ＣＤ８＋細胞、メモリＴ細胞、ナイーブＴ細胞、幹細胞メモリＴ細胞、又はＢ細胞、任意選択によりメモリＢ細胞、ナイーブＢ細胞、及び初代細胞から選択される、請求項１２に記載の細胞集団。
【請求項１５】
前記細胞が、Ｔ細胞である、請求項１４に記載の細胞集団。
【請求項１６】
前記Ｔ細胞が、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）、アルファ－ベータＴＣＲを発現するＴ細胞、ガンマ－デルタＴＣＲを発現するＴ細胞、制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、メモリＴ細胞、及び初期幹細胞メモリＴ細胞（Ｔｓｃｍ、ＣＤ２７＋／ＣＤ４５＋）から選択される、請求項１５に記載の細胞集団。
【請求項１７】
前記細胞集団が、編集前に、ヒトドナーＰＢＭＣ又はレウコパク（ｌｅｕｋｏｐａｋ）から単離される、請求項１３に記載の細胞集団。
【請求項１８】
前記細胞集団が、編集前の前駆細胞に由来する、請求項１～１７のいずれか一項に記載の細胞集団。
【請求項１９】
前記細胞集団における前記細胞のうちの少なくとも９５％が、内因性Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）配列のゲノム編集を含む、請求項１５に記載の細胞集団。
【請求項２０】
ゲノム編集が、標的化リガンド又は代替抗原結合部分をコードする外来性核酸の挿入を含み、前記細胞集団の前記細胞のうちの少なくとも７０％が、標的配列への外来性核酸の挿入を含む、請求項１５～１９のいずれか一項に記載の細胞集団。
【請求項２１】
前記細胞集団が、編集されたＴ細胞を含み、前記細胞集団の前記細胞のうちの少なくとも３０％、４０％、５０％、５５％、６０％、６５％が、メモリ表現型（ＣＤ２７＋、ＣＤ４５ＲＡ＋）を有する、請求項１５～２０のいずれか一項に記載の細胞集団。
【請求項２２】
前記細胞が、非活性化された免疫細胞である、請求項１～２１のいずれか一項に記載の細胞集団。
【請求項２３】
前記細胞が、活性化された免疫細胞である、請求項１～２２のいずれか一項に記載の細胞集団。
【請求項２４】
複数のゲノム編集を含む前記細胞が、少なくとも３つのゲノム編集を含む、請求項１～２３のいずれか一項に記載の細胞集団。
【請求項２５】
前記細胞が、ヒト対象に移入するためのものである、請求項１～２４のいずれか一項に記載の細胞集団。
【請求項２６】
インビトロ培養細胞において複数のゲノム編集を産生する方法であって、

ａ．前記細胞を、少なくとも第１の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）組成物及び第２のＬＮＰ組成物とインビトロで接触させるステップであって、前記第１のＬＮＰ組成物が、第１の標的配列に指向された第１のガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）及び任意選択により核酸ゲノム編集ツールを含み、前記第２のＬＮＰ組成物が、前記第１の標的配列とは異なる第２の標的配列に指向された第２のｇＲＮＡ及び任意選択により核酸ゲノム編集ツールを含む、接触させるステップと、
ｂ．インビトロで前記細胞を拡大するステップと、
を含み、それによって前記細胞内で複数のゲノム編集を産生する、方法。
【請求項２７】
エクスビボ培養細胞において複数のゲノム編集を産生する方法であって、
ａ．前記細胞を、少なくとも第１の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）組成物及び第２のＬＮＰ組成物とインビトロで接触させるステップであって、前記第１の脂質ＬＮＰ組成物が、第１の標的配列に指向された第１のガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）及び任意選択により核酸ゲノム編集ツールを含み、前記第２のＬＮＰ組成物が、前記第１の標的配列とは異なる第２の標的配列に指向された第２のｇＲＮＡ及び任意選択により核酸ゲノム編集ツールを含む、接触させるステップと、
ｂ．エクスビボで前記細胞を培養するステップと、
を含み、それによって前記細胞内で複数のゲノム編集を産生する、方法。
【請求項２８】
前記細胞を、ゲノム編集ツールを含む少なくとも１つのＬＮＰ組成物と接触させる、請求項２６又は２７に記載の方法。
【請求項２９】
前記ゲノム編集ツールが、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードする核酸を含む、請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
前記細胞を、標的配列内の挿入のために、ドナー核酸と更に接触させる、請求項２６～２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３１】
前記ＬＮＰ組成物を、逐次的に投与する、請求項２６～３０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３２】
前記ＬＮＰ組成物を、同時に投与する、請求項２６～３１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３３】
脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）組成物を、インビトロ培養細胞の集団に送達する方法であって、
ａ．前記細胞の集団を、第１の核酸を含む少なくとも第１のＬＮＰ組成物とインビトロで接触させ、それによって接触させた細胞の集団を産生するステップと、
ｂ．インビトロで前記接触させた細胞の集団を培養し、それによって培養された接触させた細胞の集団を産生するステップと、
ｃ．前記細胞の集団又は前記培養された接触させた細胞の集団を、第２の核酸を含む少なくとも第２のＬＮＰ組成物とインビトロで接触させるステップであって、前記第２の核酸が前記第１の核酸とは異なる、接触させるステップと、
ｄ．インビトロで前記細胞の集団を拡大するステップと、
を含み、前記拡大された細胞の集団が、少なくとも７０％の生存率を示す、方法。
【請求項３４】
前記拡大された細胞の集団が、２４時間の拡大時に少なくとも７０％、８０％、９０％、又は９５％の生存率を有する、請求項３３に記載の方法。
【請求項３５】
脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）組成物を、インビトロ培養細胞の集団に送達する方法であって

、
ａ．前記細胞の集団を、第１の核酸を含む少なくとも第１のＬＮＰ組成物とインビトロで接触させ、それによって接触させた細胞の集団を産生するステップと、
ｂ．インビトロで前記接触させた細胞の集団を培養し、それによって培養された接触させた細胞の集団を産生するステップと、
ｃ．前記細胞の集団又は前記培養された接触させた細胞の集団を、第２の核酸を含む少なくとも第２のＬＮＰ組成物とインビトロで接触させるステップであって、前記第２の核酸が前記第１の核酸とは異なる、接触させるステップと、
を含み、前記細胞の集団における前記細胞のうちの少なくとも７０％、８０％、９０％、又は９５％が、ＬＮＰ組成物との最後の接触の２４時間後に生存可能である、方法。
【請求項３６】
前記細胞の集団及び前記培養された接触させた細胞の集団を、合計２～１２個のＬＮＰ組成物、２～８個のＬＮＰ組成物、２～６個のＬＮＰ組成物、３～８個のＬＮＰ組成物、３～６個のＬＮＰ組成物、４～６個のＬＮＰ組成物、６～１２個のＬＮＰ組成物、又は３、４、５、若しくは６個のＬＮＰ組成物と接触させる、請求項２６～３５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３７】
前記細胞の集団を、前記ＬＮＰ組成物と同時に接触させる、請求項２６～３６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３８】
前記細胞の集団を、６個以下のＬＮＰ組成物と同時に接触させる、請求項２６～３７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３９】
前記細胞の集団を、２個以下のＬＮＰ組成物と同時に接触させる、請求項２６～３８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４０】
細胞の集団における遺伝子編集の方法であって、
ａ．前記細胞の集団を、第１のゲノム編集ツールを含む第１の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）組成物、及び第２のゲノム編集ツールを含む第２のＬＮＰ組成物とインビトロで接触させるステップと、
ｂ．インビトロで前記細胞の集団を拡大するステップと、
を含み、それによって前記細胞の集団を編集する、方法。
【請求項４１】
細胞の集団における遺伝子編集の方法であって、
ａ．前記細胞の集団を、第１のゲノム編集ツールを含む第１の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）組成物、及び第２のゲノム編集ツールを含む第２のＬＮＰ組成物とインビトロで接触させるステップと、
ｂ．インビトロで前記細胞の集団を培養するステップであって、前記細胞の集団における前記細胞のうちの少なくとも７０％、８０％、９０％、又は９５％が、ＬＮＰ組成物との最後の接触の２４時間後に生存可能である、培養するステップと、
を含み、それによって前記細胞の集団を編集する、方法。
【請求項４２】
前記第１のゲノム編集ツールが、ガイドＲＮＡを含む、請求項４０又は４１に記載の方法。
【請求項４３】
前記細胞を、ゲノム編集ツールを含む第３のＬＮＰ組成物とインビトロで接触させることを更に含み、少なくとも２つのＬＮＰ組成物が、ｇＲＮＡを含む、請求項４０～４２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４４】
少なくとも１つのＬＮＰ組成物が、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含む、請求項４０～４

３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４５】
前記ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、Ｃａｓ９である、請求項４４に記載の方法。
【請求項４６】
前記細胞を、ドナー核酸と接触させることを更に含む、請求項４０～４５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４７】
前記第２のゲノム編集ツールが、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、例えばＳ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９である、請求項４０～４６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４８】
前記細胞が、免疫細胞、任意選択により間葉系幹細胞、造血幹細胞（ＨＳＣ）、単核細胞、血管内皮前駆細胞（ＥＰＣ）、神経幹細胞（ＮＳＣ）、角膜上皮幹細胞（ＬＳＣ）、組織特異的初代細胞又はそれに由来する細胞（ＴＳＣ）、誘導多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）、眼幹細胞、多能性幹細胞（ＰＳＣ）、胚性幹細胞（ＥＳＣ）、臓器又は組織移植のための細胞、及び任意選択によりＡＣＴ療法に使用される細胞である、請求項２６～４７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４９】
前記細胞が、リンパ球、任意選択によりＴ細胞、Ｂ細胞、ナチュラルキラー細胞（「ＮＫ細胞」、及びＮＫＴ細胞、又はｉＮＫＴ細胞））、単球、マクロファージ、肥満細胞、樹状細胞、顆粒球（例えば、好中球、好酸球、及び好塩基球）、初代免疫細胞、ＣＤ３＋細胞、ＣＤ４＋細胞、ＣＤ８＋Ｔ細胞、制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、Ｂ細胞、ＮＫ細胞、及び樹状細胞（ＤＣ）である、請求項２６～４８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５０】
前記細胞が、Ｔ細胞である、請求項２６～４９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５１】
前記細胞が、非活性化された細胞である、請求項２６～５０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５２】
前記細胞が、活性化された細胞である、請求項２６～５０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５３】
（ａ）の前記細胞が、少なくとも１つのＬＮＰ組成物との接触後に活性化される、請求項２６～５０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５４】
前記方法が、単一ゲノム編集を産生する、請求項４０～５３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５５】
インビトロ培養Ｔ細胞において複数のゲノム編集を産生する方法であって、
ａ．前記Ｔ細胞を、（ｉ）第１の標的配列に指向されたガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含む第１の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）組成物、及び任意選択により（ｉｉ）１つ又は２つの追加のＬＮＰ組成物とインビトロで接触させるステップであって、各追加のＬＮＰ組成物が、前記第１の標的配列とは異なる標的配列に指向されたｇＲＮＡ及び／又はゲノム編集ツールを含む、接触させるステップと、
ｂ．インビトロで前記Ｔ細胞を活性化するステップと、
ｃ．前記活性化されたＴ細胞を、（ｉ）（ａ）の前記標的配列とは異なる標的配列に指向された更なるガイドＲＮＡを含む更なるＬＮＰ組成物、及び任意選択により（ｉｉ）１つ以上のＬＮＰ組成物とインビトロで接触させるステップであって、各ＬＮＰ組成物が、（ａ）の前記標的配列とは異なり、かつ互いに異なる標的配列に指向されたガイドＲＮＡ、及び／又はゲノム編集ツールを含む、接触させるステップと、
ｄ．インビトロで前記細胞を拡大するステップと、

を含み、それによって前記Ｔ細胞内で複数のゲノム編集を産生する、方法。
【請求項５６】
前記方法が、前記細胞又はＴ細胞を、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、又は１１個のＬＮＰ組成物と接触させることを含む、請求項２６～５５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５７】
前記方法が、前記細胞又はＴ細胞を、４～１２又は４～８個のＬＮＰ組成物と接触させることを含む、請求項２６～５６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５８】
ステップ（ａ）の前記細胞又はＴ細胞を、２個のＬＮＰ組成物と接触させ、前記ＬＮＰ組成物を、逐次的に又は同時に投与する、請求項５５～５７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５９】
ステップ（ａ）の前記細胞又はＴ細胞を、３個のＬＮＰ組成物と接触させ、前記ＬＮＰ組成物を、（ｉ）逐次的に、（ｉｉ）同時に、又は（ｉｉｉ）同時に（２個の組成物）かつ逐次的に（１個の組成物を前又は後に投与する）投与する、請求項５５～５８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６０】
ステップ（ｃ）の前記細胞又はＴ細胞を、１～８個のＬＮＰ組成物、任意選択により１～４個のＬＮＰ組成物と接触させ、前記ＬＮＰ組成物を、（ｉ）逐次的に、（ｉｉ）同時に、又は（ｉｉｉ）同時に（少なくとも２個の組成物）かつ逐次的に（少なくとも１個の組成物を前又は後に投与する）投与する、請求項５５～５９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６１】
前記細胞を、２～８個、又は２～６個、任意選択により２～５個、３～５個、又は３～６個のＬＮＰ組成物と同時に接触させる、請求項２６～６０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６２】
初代細胞を遺伝子組換えする方法であって、
ａ．細胞培養培地中で初代細胞を培養することと、
ｂ．核酸を含む脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）組成物を提供することと、
ｃ．（ａ）の前記初代細胞を（ｂ）の前記ＬＮＰ組成物とインビトロで組み合わせることと、
ｄ．任意選択により、前記初代細胞が遺伝子組換えされていることを確認することと、
ｅ．任意選択により、前記初代細胞を増殖させることと、を含む、方法。
【請求項６３】
前記初代細胞が、初代免疫細胞である、請求項６２に記載の方法。
【請求項６４】
前記組み合わせステップ（ｃ）を、非活性化された免疫細胞上で行うことを含む、請求項６３に記載の方法。
【請求項６５】
前記組み合わせステップ（ｃ）を、活性化された免疫細胞上で行うことを含む、請求項６２又は６３に記載の方法。
【請求項６６】
前記免疫細胞を、ステップ（ｃ）の後に活性化することを更に含む、請求項６４に記載の方法。
【請求項６７】
（ｂ２）第２の核酸を含む第２のＬＮＰ組成物を提供することと、
（ｃ２）ステップ（ｃ）の前記遺伝子組換えされた細胞を前記第２のＬＮＰ組成物とインビトロで組み合わせることと、

（ｄ２）任意選択により、前記細胞が、遺伝子組換えのための前記第２の核酸を使用して遺伝子組換えされていることを確認することと、
任意選択により、前記細胞を増殖させることと、を更に含む、請求項６２又は６３に記載の方法。
【請求項６８】
（ｂ３）第３の核酸を含む第３のＬＮＰ組成物を提供することと、
（ｃ３）ステップ（ｃ２）の前記遺伝子組換えされた細胞を前記第３のＬＮＰ組成物とインビトロで組み合わせることと、
（ｄ２）任意選択により、前記細胞が、遺伝子組換えのための前記第３の核酸を使用して遺伝子組換えされていることを確認することと、
（ｅ）任意選択により、前記細胞を増殖させることと、を更に含む、請求項６７に記載の方法。
【請求項６９】
ステップ（ｃ）及び（ｃ２）、並びに存在する場合、ステップ（ｃ３）を逐次的に行う、請求項６７又は６８に記載の方法。
【請求項７０】
ステップ（ｃ）及び（ｃ２）、並びに存在する場合、ステップ（ｃ３）を同時に行う、請求項６７又は６８に記載の方法。
【請求項７１】
前記ＬＮＰ組成物が、ｇＲＮＡを含む、請求項６２～７０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７２】
前記ＬＮＰ組成物が、核酸ゲノム編集ツールを含む、請求項６２～７１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７３】
前記ゲノム編集ツールが、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、任意選択によりＣａｓヌクレアーゼをコードする核酸を含む、請求項７２に記載の方法。
【請求項７４】
前記インビトロ培養細胞が、ヒト細胞である、請求項２６～７３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７５】
前記細胞を、エクスビボで培養、拡大、又は増殖させる、請求項２６～７４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７６】
少なくとも２つのＬＮＰ組成物を、逐次的に投与し、逐次的投与が、投与から１０時間、１２時間、２４時間、４８時間、若しくは７２時間を含む期間にわたって細胞を培養するステップ、又は前記細胞にＬＮＰ組成物を提供し、前記細胞に後続のＬＮＰ組成物を提供するステップを含む、請求項２６～７５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７７】
前記細胞を、少なくとも２０倍、３０倍、４０倍、又は５０倍増殖又は拡大し、任意選択により、拡大又は増殖が、編集開始後１４日間以内の培養における、請求項２６～７６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７８】
前記細胞が、２％未満の転座、１％未満の転座、０．５％未満の転座、又は０．１％未満の転座を含み、前記転座が、任意選択により、標的対標的転座であるか、又は相互転座、複合転座、若しくはオフターゲット転座の２倍未満のバックグラウンドレベルである、請求項２６～７７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７９】
前記細胞のうちの少なくとも７０％、８０％、又は９０％が、ＬＮＰ組成物との最後の接触の２４時間後に生存可能である、請求項２６～７８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項８０】
前記核酸又は核酸ゲノム編集ツール又はｇＲＮＡが、ＲＮＡを含む、請求項２６～７９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８１】
前記核酸又は核酸ゲノム編集ツールが、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含む、請求項２６～８０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８２】
前記核酸又は核酸ゲノム編集ツール又はｇＲＮＡが、ｓｇＲＮＡを含む、請求項２６～８１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８３】
前記核酸又は核酸ゲノム編集ツール又はｇＲＮＡが、ｄｇＲＮＡを含む、請求項２６～８２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８４】
前記核酸又は核酸ゲノム編集ツールが、ｍＲＮＡを含む、請求項２６～８３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８５】
前記核酸又は核酸ゲノム編集ツールが、ゲノム編集ツールをコードするｍＲＮＡを含む、請求項２６～８４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８６】
前記核酸又は核酸ゲノム編集ツールが、ドナー核酸を含む、請求項２６～８５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８７】
前記核酸又は核酸ゲノム編集ツールが、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含む、請求項２６～８６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８８】
前記核酸又は核酸ゲノム編集ツールが、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含み、前記ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、Ｃａｓヌクレアーゼである、請求項２６～８７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８９】
前記核酸又は核酸ゲノム編集ツールが、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含み、前記ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、Ｃａｓ９である、請求項２６～８８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９０】
前記核酸又は核酸ゲノム編集ツールが、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含み、前記ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９である、請求項２６～８９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９１】
前記核酸又は核酸ゲノム編集ツールが、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含み、前記ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、Ｃｐｆ１である、請求項２６～９０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９２】
前記ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、ニッカーゼである、請求項８７～９１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９３】
前記ニッカーゼが、デアミナーゼである、請求項９２に記載の方法。
【請求項９４】
前記ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、クリバーゼである、請求項８７～９１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９５】
前記細胞又は細胞の集団を、クリバーゼ及び２つ以下のガイドＲＮＡと同時に接触させ

る、請求項９４に記載の方法。
【請求項９６】
前記細胞を、ＤＮＡ依存性タンパク質キナーゼ阻害剤（ＤＮＡ－ＰＫｉ）と接触させることを更に含む、請求項２６～９５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９７】
前記ＤＮＡ－ＰＫｉが、化合物１及び化合物４から選択される、請求項９６に記載の方法。
【請求項９８】
前記方法が、前記細胞を１つ以上のドナー核酸と接触させることを更に含む、請求項２６～９７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９９】
前記方法が、前記細胞を１つ以上のドナー核酸と接触させることを更に含み、前記１つ以上のドナー核酸が、ベクターを含む、請求項２６～９８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１００】
前記方法が、前記細胞を１つ以上のドナー核酸と接触させることを更に含み、前記１つ以上のドナー核酸が、ウイルスベクターを含む、請求項２６～９９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０１】
前記方法が、前記細胞を１つ以上のドナー核酸と接触させることを更に含み、前記１つ以上のドナー核酸が、レンチウイルスベクター又は任意選択によりレトロウイルスベクターを含む、請求項２６～１００のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０２】
前記方法が、前記細胞を１つ以上のドナー核酸と接触させることを更に含み、前記１つ以上のドナー核酸が、ＡＡＶを含む、請求項２６～１０１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０３】
前記方法が、前記細胞を１つ以上のドナー核酸と接触させることを更に含み、前記１つ以上のドナー核酸のうちの少なくとも１つが、ＬＮＰ組成物中に提供されている、請求項２６～１０２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０４】
前記方法が、前記細胞を１つ以上のドナー核酸と接触させることを更に含み、前記１つ以上のドナー核酸のうちの少なくとも１つが、相同組換えによって組み込まれる、請求項２６～１０３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０５】
前記方法が、前記細胞を１つ以上のドナー核酸と接触させることを更に含み、前記１つ以上のドナー核酸のうちの少なくとも１つが、前記標的配列の全て又は一部に相同な隣接する核酸領域を含む、請求項２６～１０４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０６】
前記方法が、前記細胞を１つ以上のドナー核酸と接触させることを更に含み、前記１つ以上のドナー核酸のうちの少なくとも１つが、平滑末端挿入によって組み込まれる、請求項２６～１０５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０７】
前記方法が、前記細胞を１つ以上のドナー核酸と接触させることを更に含み、前記１つ以上のドナー核酸のうちの少なくとも１つが、非相同末端結合によって組み込まれる、請求項２６～１０６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０８】
前記方法が、前記細胞を１つ以上のドナー核酸と接触させることを更に含み、前記１つ以上のドナー核酸が、セーフハーバー遺伝子座に挿入される、請求項２６～１０７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０９】
前記方法が、前記細胞を１つ以上のドナー核酸と接触させることを更に含み、前記１つ

以上のドナー核酸のうちの少なくとも１つが、Ｔ細胞受容体配列の対応する領域と相同性を有する領域を含む、請求項２６～１０８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１０】
前記方法が、前記細胞を１つ以上のドナー核酸と接触させることを更に含み、前記１つ以上のドナー核酸のうちの少なくとも１つが、ＴＲＡＣ遺伝子座、Ｂ２Ｍ遺伝子座、ＡＡＶＳ１遺伝子座、及び／若しくはＣＩＩＴＡ遺伝子座、又は任意選択によりＴＲＢＣ遺伝子座の対応する領域と相同性を有する領域を含む、請求項２６～１０９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１１】
前記ＬＮＰ組成物が、ガイドＲＮＡを含む、請求項２６～１１０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１２】
前記ＬＮＰ組成物が、２～６個のガイドＲＮＡ、任意選択により２～５個、２～４個、又は３～５個のガイドＲＮＡを含む、請求項１１１に記載の方法。
【請求項１１３】
前記ＬＮＰ組成物のうちの少なくとも１つが、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、例えばＣａｓ９、任意選択によりＳ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９をコードするｍＲＮＡを含む、請求項２６～１１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１４】
前記ＬＮＰ組成物が、前記ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、例えばＣａｓ９、任意選択によりＳ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９をコードする、ガイドＲＮＡ及びｍＲＮＡを含む、請求項２６～１１３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１５】
前記ＬＮＰ組成物のうちの１つが、ＴＲＡＣを標的とするｇＲＮＡを含む、請求項２６～１１４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１６】
前記ＬＮＰ組成物のうちの１つが、ＴＲＢＣを標的とするｇＲＮＡを含む、請求項２６～１１５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１７】
前記ＬＮＰ組成物のうちの１つが、ＭＨＣクラスＩの表面発現を低減又は排除する遺伝子を標的とするｇＲＮＡを含む、請求項２６～１１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１８】
前記ＬＮＰ組成物のうちの１つが、Ｂ２Ｍを標的とするｇＲＮＡを含む、請求項２６～１１７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１９】
前記ＬＮＰ組成物のうちの１つが、ＨＬＡ－Ａの表面発現を低減又は排除する遺伝子を標的とするｇＲＮＡを含む、請求項２６～１１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２０】
前記ＬＮＰ組成物のうちの１つが、ＨＬＡ－Ａを標的とするｇＲＮＡを含む、請求項２６～１１９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２１】
前記細胞が、ＨＬＡ－Ｂについてホモ接合であり、ＨＬＡ－Ｃについてホモ接合である、請求項１２０に記載の方法。
【請求項１２２】
前記ＬＮＰ組成物のうちの１つが、ＭＨＣクラスＩＩの表面発現を低減又は排除する遺伝子を標的とするｇＲＮＡを含む、請求項２６～１２１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２３】
前記ＬＮＰ組成物のうちの１つが、ＣＩＩＴＡを標的とするｇＲＮＡを含む、請求項２６～１２２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２４】

前記ＬＮＰ組成物のうちの１つが、ＴＲＡＣを標的とするｇＲＮＡを含み、前記ＬＮＰ組成物のうちの１つが、ＴＲＢＣを標的とするｇＲＮＡを含む、請求項２６～１２３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１２５】

前記ＬＮＰ組成物のうちの１つが、ＴＲＡＣを標的とするｇＲＮＡを含み、前記ＬＮＰ組成物のうちの１つが、ＴＲＢＣを標的とするｇＲＮＡを含み、更なるＬＮＰ組成物が、Ｂ２Ｍを標的とするｇＲＮＡを含む、請求項２６～１２４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１２６】

前記ＬＮＰ組成物のうちの１つが、ＴＲＡＣを標的とするｇＲＮＡを含み、前記ＬＮＰ組成物のうちの１つが、ＴＲＢＣを標的とするｇＲＮＡを含み、更なるＬＮＰ組成物が、ＨＬＡ－Ａを標的とするｇＲＮＡを含む、請求項２６～１２５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１２７】

前記ＬＮＰ組成物のうちの１つが、ＴＲＡＣを標的とするｇＲＮＡを含み、前記ＬＮＰ組成物のうちの１つが、ＴＲＢＣを標的とするｇＲＮＡを含み、更なるＬＮＰ組成物が、Ｂ２Ｍを標的とするｇＲＮＡを含み、更なるＬＮＰ組成物が、ＣＩＩＴＡを標的とするｇＲＮＡを含む、請求項２６～１２６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１２８】

前記ＬＮＰ組成物のうちの１つが、ＴＲＡＣを標的とするｇＲＮＡを含み、前記ＬＮＰ組成物のうちの１つが、ＴＲＢＣを標的とするｇＲＮＡを含み、更なるＬＮＰ組成物が、ＨＬＡ－Ａを標的とするｇＲＮＡを含み、更なるＬＮＰ組成物が、ＣＩＩＴＡを標的とするｇＲＮＡを含む、請求項２６～１２７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１２９】

前記細胞が、Ｔ細胞であり、前記集団における前記細胞のうちの少なくとも９５％が、内因性Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）配列のゲノム編集を含む、請求項２６～１２８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１３０】

前記細胞が、Ｔ細胞であり、前記細胞の集団の前記細胞のうちの少なくとも３０％、４０％、任意選択により５０％、５５％、６０％、６５％が、メモリ表現型（ＣＤ４５＋／ＣＤ２７＋）を有する、請求項２６～１２９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１３１】

前記細胞が、Ｔ細胞であり、前記細胞が、編集後の反復刺激に応答する、請求項２６～１３０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１３２】

ゲノム編集が、前記集団の前記細胞のうちの７０％、７５％、８０％、又は８５％において、標的化リガンド又は代替抗原結合部分をコードする異種配列の挿入を含む、請求項２６～１３１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１３３】

編集効率パーセントが、各標的部位で少なくとも６０％、７０％、任意選択により少なくとも８０％、９０％、又は９５％である、請求項２６～１３２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１３４】

前記方法が、選択ステップを含まない、請求項２６～１３３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１３５】

前記方法が、選択ステップを含み、前記選択ステップが、任意選択により、物理的選別ステップ又は生化学的選択ステップである、請求項２６～１３３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１３６】

前記ＬＮＰが、１～２５０ｎｍ、１０～２００ｎｍ、２０～１５０ｎｍ、５０～１５０

ｎｍ、５０～１００ｎｍ、５０～１２０ｎｍ、６０～１００ｎｍ、７５～１５０ｎｍ、７５～１２０ｎｍ、又は７５～１００ｎｍの直径を有する、請求項２６～１３５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１３７】

前記ＬＮＰ組成物が、１０～２００ｎｍ、２０～１５０ｎｍ、５０～１５０ｎｍ、５０～１００ｎｍ、５０～１２０ｎｍ、６０～１００ｎｍ、７５～１５０ｎｍ、７５～１２０ｎｍ、又は７５～１００ｎｍの平均直径を有する前記ＬＮＰの集団を含む、請求項２６～１３６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１３８】

前記ＬＮＰが、１００ｎｍ未満の直径を有する、請求項２６～１３７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１３９】

前記ＬＮＰ組成物が、イオン化脂質を含む、請求項２６～１３８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４０】

前記イオン化脂質が、生分解性イオン化脂質を含む、請求項２６～１３９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４１】

前記イオン化脂質が、約５．１～約７．４、例えば約５．５～約６．６、約５．６～約６．４、約５．８～約６．２、又は約５．８～約６．５の範囲におけるｐＫａの範囲のＰＫ値を有する、請求項２６～１４０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４２】

前記ＬＮＰ組成物が、アミン脂質を含む、請求項２６～１４１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４３】

前記ＬＮＰ組成物が、アミン脂質を含み、前記アミン脂質が、脂質Ａ若しくはそのアセタール類似体、又は脂質Ｄである、請求項２６～１４２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４４】

前記ＬＮＰ組成物が、ヘルパー脂質を含む、請求項２６～１４３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４５】

前記ＬＮＰ組成物のＮ／Ｐ比が、約６である、請求項２６～１４４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４６】

前記ＬＮＰ組成物が、アミン脂質、ヘルパー脂質、及びＰＥＧ脂質を含む、請求項２６～１４５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４７】

前記ＬＮＰ組成物が、アミン脂質、ヘルパー脂質、中性脂質、及びＰＥＧ脂質を含む、請求項２６～１４６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４８】

前記ＬＮＰ組成物が、脂質構成要素を含み、前記脂質構成要素が、約５０～６０ｍｏｌ％の脂質Ａなどのアミン脂質と、約８～１０ｍｏｌ％の中性脂質と、約２．５～４ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、前記脂質構成要素の残りが、ヘルパー脂質であり、前記脂質ＬＮＰ組成物の前記Ｎ／Ｐ比が、約３～７である、請求項２６～１４７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４９】

前記ＬＮＰ組成物が、脂質構成要素を含み、前記脂質構成要素が、約２５～４５ｍｏｌ％の脂質Ａなどのアミン脂質と、約１０～３０ｍｏｌ％の中性脂質と、約２５～６５ｍｏｌ％のヘルパー脂質と、約１．５～３．５ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、前記ＬＮＰ組成物の前記Ｎ／Ｐ比が、約３～７である、請求項２６～１４８

のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５０】
前記アミン脂質の量が、前記脂質構成要素の約２９～３８ｍｏｌ％、前記脂質構成要素の約３０～４３ｍｏｌ％、又は前記脂質構成要素の約２５～３４ｍｏｌ％、任意選択により前記脂質構成要素の約３３ｍｏｌ％である、請求項１４９に記載の方法。
【請求項１５１】
前記中性脂質の量が、前記脂質構成要素の約１１～２０ｍｏｌ％、任意選択により前記脂質構成要素の約１５ｍｏｌ％である、請求項１４９又は１５０に記載の方法。
【請求項１５２】
前記ヘルパー脂質の量が、前記脂質構成要素の約４３～６５ｍｏｌ％、又は前記脂質構成要素の約４３～５５ｍｏｌ％、任意選択により前記脂質構成要素の約４９ｍｏｌ％である、請求項１４９～１５１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５３】
前記ＰＥＧ脂質の量が、前記脂質構成要素の約２．０～３．５ｍｏｌ％、前記脂質構成要素の約２．３～３．５ｍｏｌ％、又は前記脂質構成要素の約２．３～２．７ｍｏｌ％、前記脂質構成要素の約２．７ｍｏｌ％である、請求項１４９～１５２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５４】
ａ．前記アミン脂質の前記量が前記脂質構成要素の約２９～４４ｍｏｌ％であり、前記中性脂質の前記量が前記脂質構成要素の約１１～２８ｍｏｌ％であり、前記ヘルパー脂質の前記量が前記脂質構成要素の約２８～５５ｍｏｌ％であり、前記ＰＥＧ脂質の前記量が前記脂質構成要素の約２．３～３．５ｍｏｌ％である
ｂ．前記アミン脂質の前記量が前記脂質構成要素の約２９～３８ｍｏｌ％であり、前記中性脂質の前記量が前記脂質構成要素の約１１～２０ｍｏｌ％であり、前記ヘルパー脂質の前記量が前記脂質構成要素の約４３～５５ｍｏｌ％であり、前記ＰＥＧ脂質の前記量が前記脂質構成要素の約２．３～２．７ｍｏｌ％である、
ｃ．前記アミン脂質の前記量が前記脂質構成要素の約２５～３４ｍｏｌ％であり、前記中性脂質の前記量が前記脂質構成要素の約１０～２０ｍｏｌ％であり、前記ヘルパー脂質の前記量が前記脂質構成要素の約４５～６５ｍｏｌ％であり、前記ＰＥＧ脂質の前記量が前記脂質構成要素の約２．５～３．５ｍｏｌ％である、又は
ｄ．前記アミン脂質の前記量が前記脂質構成要素の約３０～４３ｍｏｌ％であり、前記中性脂質の前記量が前記脂質構成要素の約１０～１７ｍｏｌ％であり、前記ヘルパー脂質の前記量が前記脂質構成要素の約４３．５～５６ｍｏｌ％であり、前記ＰＥＧ脂質の前記量が前記脂質構成要素の約１．５～３ｍｏｌ％である、請求項１４９～１５３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５５】
前記ＬＮＰ組成物が、脂質構成要素を含み、前記脂質構成要素が、約２５～５０ｍｏｌ％の脂質Ｄなどのアミン脂質と、約７～２５ｍｏｌ％の中性脂質と、約３９～６５ｍｏｌ％のヘルパー脂質と、約０．５～１．８ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、前記ＬＮＰ組成物の前記Ｎ／Ｐ比が、約３～７である、請求項２６～１５４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５６】
前記アミン脂質の前記量が、前記脂質構成要素の約３０～４５ｍｏｌ％、又は前記脂質構成要素の約３０～４０ｍｏｌ％、任意選択により前記脂質構成要素の約３０ｍｏｌ％、４０ｍｏｌ％、又は５０ｍｏｌ％である、請求項１５５に記載の方法。
【請求項１５７】
前記中性脂質の前記量が、前記脂質構成要素の約１０～２０ｍｏｌ％、又は前記脂質構成要素の約１０～１５ｍｏｌ％、任意選択により前記脂質構成要素の約１０ｍｏｌ％又は１５ｍｏｌ％である、請求項１５５又は１５６に記載の方法。
【請求項１５８】

前記ヘルパー脂質の前記量が、前記脂質構成要素の約５０～６０ｍｏｌ％、前記脂質構成要素の約３９～５９ｍｏｌ％、又は前記脂質構成要素の約４３．５～５９ｍｏｌ％、任意選択により前記脂質構成要素の約５９ｍｏｌ％、前記脂質構成要素の約４３．５ｍｏｌ％、又は前記脂質構成要素の約３９ｍｏｌ％である、請求項１５５～１５７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１５９】

前記ＰＥＧ脂質の前記量が、前記脂質構成要素の約０．９～１．６ｍｏｌ％、又は前記脂質構成要素の約１～１．５ｍｏｌ％、任意選択により前記脂質構成要素の約１ｍｏｌ％、又は前記脂質構成要素の約１．５ｍｏｌ％である、請求項１５５～１５８のいずれか一項に記載のＬＮＰ組成物。

【請求項１６０】

ａ．前記イオン化脂質の前記量が前記脂質構成要素の約２７～４０ｍｏｌ％であり、前記中性脂質の前記量が前記脂質構成要素の約１０～２０ｍｏｌ％であり、前記ヘルパー脂質の前記量が前記脂質構成要素の約５０～６０ｍｏｌ％であり、前記ＰＥＧ脂質の前記量が前記脂質構成要素の約０．９～１．６ｍｏｌ％である、

ｂ．前記イオン化脂質の前記量が前記脂質構成要素の約３０～４５ｍｏｌ％であり、前記中性脂質の前記量が前記脂質構成要素の約１０～１５ｍｏｌ％であり、前記ヘルパー脂質の前記量が前記脂質構成要素の約３９～５９ｍｏｌ％であり、前記ＰＥＧ脂質の前記量が前記脂質構成要素の約１～１．５ｍｏｌ％である、

ｃ．前記イオン化脂質の前記量が前記脂質構成要素の約３０ｍｏｌ％であり、前記中性脂質の前記量が前記脂質構成要素の約１０ｍｏｌ％であり、前記ヘルパー脂質の前記量が前記脂質構成要素の約５９ｍｏｌ％であり、前記ＰＥＧ脂質の前記量が前記脂質構成要素の約１ｍｏｌ％である、

ｄ．前記イオン化脂質の前記量が前記脂質構成要素の約４０ｍｏｌ％であり、前記中性脂質の前記量が前記脂質構成要素の約１５ｍｏｌ％であり、前記ヘルパー脂質の前記量が前記脂質構成要素の約４３．５ｍｏｌ％であり、前記ＰＥＧ脂質の前記量が前記脂質構成要素の約１．５ｍｏｌ％である、又は

ｅ．前記イオン化脂質の前記量が前記脂質構成要素の約５０ｍｏｌ％であり、前記中性脂質の前記量が前記脂質構成要素の約１０ｍｏｌ％であり、前記ヘルパー脂質の前記量が前記脂質構成要素の約３９ｍｏｌ％であり、前記ＰＥＧ脂質の前記量が前記脂質構成要素の約１ｍｏｌ％である、請求項１５５～１５９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１６１】

前記アミン脂質が、脂質Ａである、請求項１４２～１６１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１６２】

前記アミン脂質が、脂質Ｄである、請求項１４１～１６１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１６３】

前記中性脂質が、ＤＳＰＣである、請求項１４７～１６２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１６４】

前記ステルス脂質が、ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧである、請求項１４６～１６３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１６５】

前記ヘルパー脂質が、コレステロールである、請求項１４４～１６４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１６６】

前記ＬＮＰ組成物を、前記細胞に接触させる前に血清因子を用いて前処理し、任意選択により、前記血清因子が、霊長類血清因子、任意選択によりヒト血清因子である、請求項２６～１６５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１６７】
前記ＬＮＰ組成物を、前記細胞に接触させる前にヒト血清を用いて前処理する、請求項２６～１６６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６８】
前記ＬＮＰ組成物を、前記細胞に接触させる前にＡｐｏＥを用いて前処理し、任意選択により、前記ＡｐｏＥが、ヒトＡｐｏＥである、請求項２６～１６７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６９】
前記ＬＮＰ組成物を、前記細胞に接触させる前に組換えＡｐｏＥ３又はＡｐｏＥ４を用いて前処理し、任意選択により、前記ＡｐｏＥ３又はＡｐｏＥ４が、ヒトＡｐｏＥ３又はＡｐｏＥ４である、請求項２６～１６８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７０】
請求項２６～１６９のいずれか一項に記載の方法によって作製されたか、又はそれによって得ることができる、細胞集団。
【請求項１７１】
前記細胞のうちの少なくとも７０％が、前記細胞又は細胞の集団を前記第２のＬＮＰ組成物と接触させた２４時間後に生存可能である、請求項１７０に記載の細胞集団。
【請求項１７２】
治療方法又は薬学的組成物における、請求項１～２５又は１７０若しくは１７１のいずれか一項に記載の細胞集団の使用。
【請求項１７３】
前記治療方法又は前記薬学的組成物が、がん又は自己免疫療法の治療のためのものである、請求項１７２に記載の細胞集団の使用。
【請求項１７４】
前記治療方法又は薬学的組成物が、養子細胞移入療法のためのものである、請求項１７３に記載の細胞集団の使用。
【請求項１７５】
遺伝子組換えされた細胞の集団を得るために、請求項２６～１６９のいずれか一項に記載の方法を使用して、細胞、任意選択により、免疫細胞を遺伝子組換えすることと、前記遺伝子組換えされた細胞を細胞バンクに移入することと、を含む、細胞バンクを作製する方法。
【発明の詳細な説明】
【背景技術】
【０００１】
複数の遺伝子編集をインビトロで細胞に導入する能力は、遺伝子編集及び臨床治療用途に関心がある。例えば、遺伝子組換え免疫細胞を使用する養子細胞療法アプローチは、がんを含む様々な状態及び疾患を治療して、細胞系統及び免疫系防御を再構成するための魅力的なモダリティとなっている。しかしながら、細胞生成物療法の臨床用途は、複雑な遺伝子工学的要件のために、部分的には困難となっている。複数の属性を単一の細胞に操作する能力は、生存能及び所望の細胞表現型を保持しながら、ノックアウト及び遺伝子座挿入を含む複数の標的遺伝子において効率的に編集を実施する能力に依存する。
【０００２】
ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ゲノム編集は、非常に効率的であることが実証されているが、異なる遺伝子座における同時編集は、より乏しい細胞生存、細胞生成物の品質及び安全性を損なう可能性がある転座の増加、並びに編集数の増加に伴う遺伝子編集効率の低下をもたらすことが報告されている。エレクトロポレーションを含む既存の細胞操作技術は、細胞への累積毒性により、逐次編集プロセスを使用して必要な細胞品質及び収率を提供することに制限を提示する。更に、例えば、Ｔ細胞を含むある特定の細胞型は、インビトロでの永続的な多重編集のために特に困難であることが証明されている。
【０００３】

したがって、複数のゲノム編集ツールを細胞に送達するため、及び遺伝子編集を実施するためのより安全なプロセスが必要とされている。

【０００４】

本明細書で提供される方法は、ゲノム編集ツールのより安全な送達のために、及び従来の方法よりも実質的な利点を提供する多重ゲノム編集用途のために、脂質核酸アセンブリ組成物（例えば、脂質ナノ粒子（「ＬＮＰ」））を使用することを含む。

【０００５】

いくつかの実施形態において、本方法は、より低い毒性プロファイル、より少ない転座、並びにより高い生存及び拡大を有する細胞を産生し、それによって製造に必要な時間を短縮し、収率を増加させる。いくつかの実施形態において、本方法は、内因性Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）を治療的ＴＣＲで置き換えるためのインビトロでのＴ細胞における非常に効率的な多重編集を提供し、サイトカイン産生の増加、有利な初期幹細胞メモリ表現型、及び抗原特異的刺激による継続的な増殖を伴う操作されたＴ細胞をもたらす。

【図面の簡単な説明】

【０００６】

【図１】編集後の培養１０日後の、ＡＡＶの有無にかかわらず、エレクトロポレーション（ＥＰ）又は脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を用いて処理したＴ細胞の倍率拡大を示す。

【図２】編集後７日目の、ＡＡＶの有無にかかわらず、エレクトロポレーション（ＥＰ）又は脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を用いて処理したＣＤ３＋Ｖｂ８＋ＴＣＲ　Ｔ細胞（ＣＤ８＋及びＣＤ４＋にゲーティングされた）のパーセンテージを示す。

【図３】編集後７日目の、ＡＡＶの有無にかかわらず、エレクトロポレーション（ＥＰ）又は脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を用いて処理した残留内因性ＴＣＲ発現（ＣＤ３＋Ｖｂ８－）Ｔ細胞（ＣＤ８＋及びＣＤ４＋にゲーティングされた）のパーセンテージを示す。

【図４】ＥＰ処理Ｔ細胞及びＬＮＰ処理Ｔ細胞におけるフローサイトメトリー（ＣＤ２７＋、ＣＤ４５ＲＡ＋）による初期幹細胞メモリ表現型ＣＤ８＋Ｔ細胞の染色を示す。

【図５】ＶＬＤペプチドによりパルス化したＯＣＩ－ＡＭＬ２細胞との共培養におけるＷＴ１　ＴＣＲ操作Ｔ細胞（ＥＰ処理対ＬＮＰ処理）のＩＬ－２分泌を示す。

【図６】Ｋ５６２　ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１陽性細胞との共培養におけるＷＴ１　ＴＣＲ操作Ｔ細胞（ＥＰ処理対ＬＮＰ処理）のＩＦＮγ分泌を示す。

【図７】Ｋ５６２　ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１陽性細胞のＷＴ１　ＴＣＲ操作Ｔ細胞（ＥＰ処理対ＬＮＰ処理）による特異的溶解を示す。

【図８】ＶＬＤペプチドによりパルス化したＯＣＩ－ＡＭＬ３標的細胞と共培養した場合の、ＥＰ処理対ＬＮＰ処理のＷＴ１　ＴＣＲ操作Ｔ細胞に対する反復刺激後の増殖（累積倍率変化として）を示す。

【図９】エレクトロポレーション（「ＥＰ」）、同時ＬＮＰ（「ＳＩＭ」）、逐次プロセス１（２．５μｇ／ｍｌ　ＬＮＰ）（「ＢＦ２．５」；ＴＲＢＣ標的、次いでＴＲＡＣ標的）、逐次プロセス２（５μｇ／ｍｌ　ＬＮＰ）（「ＢＦ５」；ＴＲＢＣ標的、次いでＴＲＡＣ標的）、逐次プロセス３（２．５μｇ／ｍｌ　ＬＮＰ）（「ＡＦ」；ＴＲＡＣ標的、次いでＴＲＢＣ標的）によるＴ細胞の編集後の拡大を示す。

【図１０】エレクトロポレーション（「ＥＰ」）、同時ＬＮＰ（「ＳＩＭ」）、逐次プロセス１（２．５μｇ／ｍｌ　ＬＮＰ）（「ＢＦ２．５」；ＴＲＢＣ標的、次いでＴＲＡＣ標的）、逐次プロセス２（５μｇ／ｍｌ　ＬＮＰ）（「ＢＦ５」；ＴＲＢＣ標的、次いでＴＲＡＣ標的）、逐次プロセス３（２．５μｇ／ｍｌ　ＬＮＰ）（「ＡＦ」；ＴＲＡＣ標的、次いでＴＲＢＣ標的）による編集後のトランスジェニックＴＣＲ（ｔｇＴＣＲ）の挿入率（％Ｖｂ８＋、ＣＤ３＋）を示す。

【図１１】エレクトロポレーション（「ＥＰ」）、同時ＬＮＰ（「ＳＩＭ」）、逐次プロセス１（２．５μｇ／ｍｌ　ＬＮＰ）（「ＢＦ２．５」；ＴＲＢＣ標的、次いでＴＲＡＣ標的）、逐次プロセス２（５μｇ／ｍｌ　ＬＮＰ）（「ＢＦ５」；ＴＲＢＣ標的、次いでＴＲＡＣ標的）、逐次プロセス３（２．５μｇ／ｍｌ　ＬＮＰ）（「ＡＦ」；ＴＲＡＣ標的、次いでＴＲＢＣ標的）による編集後の内因性ＴＣＲを保持するＣＤ８＋Ｔ細胞のパー

センテージを示す。
【図１２】エレクトロポレーション（「ＥＰ」）、同時ＬＮＰ（「ＳＩＭ」）、逐次プロセス１（２．５μｇ／ｍｌ　ＬＮＰ）（「ＢＦ２．５」；ＴＲＢＣ標的、次いでＴＲＡＣ標的）、逐次プロセス２（５μｇ／ｍｌ　ＬＮＰ）（「ＢＦ５」；ＴＲＢＣ標的、次いでＴＲＡＣ標的）、逐次プロセス３（２．５μｇ／ｍｌ　ＬＮＰ）（「ＡＦ」；ＴＲＡＣ標的、次いでＴＲＢＣ標的）による編集後のメモリ表現型（ＣＤ２７＋）と関連する操作されたＴ細胞のパーセンテージを示す。
【図１３Ａ】エレクトロポレーション（「ＥＰ」）、同時ＬＮＰ（「ＳＩＭ」）、逐次プロセス１（２．５μｇ／ｍｌ　ＬＮＰ）（「ＢＦ２．５」；ＴＲＢＣ標的、次いでＴＲＡＣ標的）、逐次プロセス２（５μｇ／ｍＬ　ＬＮＰ）（「ＢＦ５」；ＴＲＢＣ標的、次いでＴＲＡＣ標的）、逐次プロセス３（２．５μｇ／ｍＬ　ＬＮＰ）（「ＡＦ」；ＴＲＡＣ標的、次いでＴＲＢＣ標的）による編集後の操作されたＴ細胞における、ＴＲＡＣ－ＴＲＢＣ転座細胞、及びＴＲＢＣ遺伝子座へのＴＣＲ挿入を伴う細胞のパーセンテージを示し、ＴＲＡＣプローブにより検出された転座を、図１３Ａに示し、ＴＲＢＣプローブを図１３Ｂに示す。
【図１３Ｂ】（上記の通り。）
【図１４Ａ】エレクトロポレーション（「ＥＰ」）、同時ＬＮＰ（「ＳＩＭ」）、逐次プロセス１（２．５μｇ／ｍｌ　ＬＮＰ）（「ＢＦ２．５」；ＴＲＢＣ標的、次いでＴＲＡＣ標的）、逐次プロセス２（５μｇ／ｍＬ　ＬＮＰ）（「ＢＦ５」；ＴＲＢＣ標的、次いでＴＲＡＣ標的）、逐次プロセス３（２．５μｇ／ｍＬ　ＬＮＰ）（「ＡＦ」；ＴＲＡＣ標的、次いでＴＲＢＣ標的）による編集後の操作されたＴ細胞における、ＴＲＢＣ－ＴＲＡＣ転座細胞、及びＴＲＢＣ遺伝子座へのＴＣＲ挿入を伴う細胞のパーセンテージを示し、ＴＲＡＣプローブにより検出された転座を、図１４Ａに示し、ＴＲＢＣプローブを図１４Ｂに示す。
【図１４Ｂ】（上記の通り。）
【図１４Ｃ】エレクトロポレーション（「ＥＰ」）、同時ＬＮＰ（「ＳＩＭ」）、逐次プロセス１（２．５μｇ／ｍｌ　ＬＮＰ）（「ＢＦ２．５」；ＴＲＢＣ標的、次いでＴＲＡＣ標的）、逐次プロセス２（５μｇ／ｍＬ　ＬＮＰ）（「ＢＦ５」；ＴＲＢＣ標的、次いでＴＲＡＣ標的）、逐次プロセス３（２．５μｇ／ｍＬ　ＬＮＰ）（「ＡＦ」；ＴＲＡＣ標的、次いでＴＲＢＣ標的）による編集後の操作されたＴ細胞における、ＴＲＡＣ－ＴＲＢＣ転座細胞のパーセンテージを示し、ＴＲＡＣプローブにより検出された転座を、図１４Ｃに示し、ＴＲＢＣプローブを図１４Ｄに示す。
【図１４Ｄ】（上記の通り。）
【図１４Ｅ】エレクトロポレーション（「ＥＰ」）、同時ＬＮＰ（「ＳＩＭ」）、逐次プロセス１（２．５μｇ／ｍｌ　ＬＮＰ）（「ＢＦ２．５」；ＴＲＢＣ標的、次いでＴＲＡＣ標的）、逐次プロセス２（５μｇ／ｍＬ　ＬＮＰ）（「ＢＦ５」；ＴＲＢＣ標的、次いでＴＲＡＣ標的）、逐次プロセス３（２．５μｇ／ｍＬ　ＬＮＰ）（「ＡＦ」；ＴＲＡＣ標的、次いでＴＲＢＣ標的）による編集後の操作されたＴ細胞における、ＴＲＢＣ－ＴＲＡＣ転座細胞のパーセンテージを示し、ＴＲＡＣプローブにより検出された転座を、図１４Ｅに示し、ＴＲＢＣプローブを図１４Ｆに示す。
【図１４Ｆ】（上記の通り。）
【図１５Ａ－Ｃ】ルシフェラーゼベースの標的細胞死滅アッセイによって評価した場合の、ＷＴ１　ＴＣＲ操作Ｔ細胞のＴ細胞媒介性細胞傷害を示す。操作されたＴ細胞を、Ｋ５６２細胞（図１５Ａ及び図１５Ｄ）、Ｋ５６２－Ａ２．１細胞（図１５Ｂ及び図１５Ｅ）、６９７－ｌｕｃ細胞（図１５Ｃ及び図１５Ｆ）と共培養した。
【図１５Ｄ－Ｆ】（上記の通り。）
【図１６】フローサイトメトリーによって評価した場合の、操作されたＴ細胞のｔｇＴＣＲ挿入（Ｖｂ８＋、ＣＤ３＋）率を示す（ＥＰ処理対ＬＮＰ処理）。
【図１７】フローサイトメトリーによって評価した場合の、編集後の挿入されたＧＦＰ（ＣＤ３－、ＧＦＰ＋）、又は内因性ＴＣＲ（ＣＤ３＋）の保持を伴うＣＤ８＋Ｔ細胞のパ

ーセンテージを示す（ＥＰ処理対ＬＮＰ処理）。
【図１８】編集後のメモリ表現型（ＣＤ２７＋、ＣＤ４５ＲＯ－）と関連する操作されたＴ細胞のパーセンテージを示す（ＥＰ処理対ＬＮＰ処理）。
【図１９】操作されたＴ細胞による処理後のＮＯＧ－ｈＩＬ－２マウスにおける液体腫瘍負荷を示し、白血病腫瘍負荷の尺度として、生物発光を使用した。
【図２０】操作されたＴ細胞による処理後のＮＯＧ－ｈＩＬ－２マウスの生存パーセントを示す。
【図２１Ａ】ＬＮＰ用量に応答して、フローサイトメトリーによるβ－２マイクログロブリン（Ｂ２Ｍ）陰性細胞のパーセンテージ（図２１Ａ）及びＮＧＳによるＢ２Ｍ編集パーセント（図２１Ｂ）を示す。
【図２１Ｂ】（上記の通り。）
【図２２Ａ】ＬＮＰ用量に応答して、フローサイトメトリーによるＴＲＡＣ陰性細胞のパーセンテージ（図２２Ａ）及びＮＧＳによるＴＲＡＣインデルのパーセント（図２２Ｂ）を示す。
【図２２Ｂ】（上記の通り。）
【図２３Ａ】ＭＡＣＳ処理前（図２３Ａ）及びＭＡＣＳ処理後（図２３Ｂ）のＮＧＳによる編集のパーセンテージを示す。
【図２３Ｂ】（上記の通り。）
【図２４Ａ】ＭＡＣＳ処理前（図２４Ａ）及びＭＡＣＳ処理後（図２４Ｂ）のフローサイトメトリーによる操作されたＴ細胞のタンパク質発現を示す。
【図２４Ｂ】（上記の通り。）
【図２５】ＫｒｏｍａＴｉＤ　ｄＧＨアッセイによる操作された細胞における染色体構造の変動を示す。
【図２６】異なるイオン化脂質製剤を用いてｍＲＮＡ及びｇＲＮＡ送達を使用して編集したＴ細胞の平均編集パーセンテージ（インデル％で表される）を示す。
【図２７】異なるイオン化脂質製剤を用いてｍＲＮＡ及びｇＲＮＡ送達を使用して編集したＴ細胞において、編集プラトーに到達するまでの時間を示す。
【図２８】ＬＮＰ及び異なる血清因子を用いて処理したＴ細胞におけるフローサイトメトリーによるＣＤ３－細胞のパーセンテージを示す。
【図２９】フローサイトメトリーによるＢ２Ｍ陰性Ｔ細胞（リポプレックスを用いて処理された）の頻度を示す。
【図３０】リポプレックス処理Ｔ細胞の編集頻度（インデル）を示す。
【図３１】活性化されたＴ細胞における編集パーセントに対する培地組成物の効果を示し、ＬＮＰによるＣａｓ９　ｍＲＮＡ及びｇＲＮＡの送達を示す。
【図３２】非活性化されたＴ細胞における編集パーセントに対する培地組成物の効果を示し、ＬＮＰによるＣａｓ９　ｍＲＮＡ及びｇＲＮＡの送達を示す。
【図３３】ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤のｍＲＮＡ及びｇＲＮＡを送達するＬＮＰを用いて処理したリンパ芽球様細胞における編集頻度を示す。
【図３４】ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤のｍＲＮＡ及びｇＲＮＡを送達するＬＮＰを用いて処理したＢ２Ｍ陰性リンパ芽球様細胞のパーセンテージを示す。
【図３５】ＬＮＰとの同時送達後のフローサイトメトリーによる、複数の挿入（ＴＣＲ挿入及びＧＦＰ挿入）を伴う操作されたＴ細胞のパーセンテージを示す。
【図３６】ＬＮＰとの同時送達後のフローサイトメトリーによる、残留ＴＣＲ又は残留ＨＬＡ－ＡＢＣ発現を伴う操作されたＴ細胞のパーセンテージを示す。
【図３７】操作されたＴ細胞の転写物レベルのヒートマップを示す。
【図３８Ａ】操作されたＷＴ１　Ｔ細胞及び対照を用いて処理したマウスの実験的概略図及び白血病芽球レベルを示す。図３８Ａは、インビボ実験のタイムライン及び概略図を示す。図３８Ｂは、無関係なＭＡＲＴ１－ＴＣＲを用いて形質導入されたＴ細胞、又は任意の処理を伴わない別の対照（白血病芽球のみ）と比較して、エレクトロポレーションプロセスにより、又はＬＮＰプロセスにより生成された操作されたＷＴ１－Ｔ細胞を有するマ

ウスの処理時の、ＡＭＬ白血病芽球の増殖を示す。白血病の発生を、血液のマイクロリットル当たりの細胞として経時的に測定した。図３８Ｃは、マウス群の処理時の骨髄における全生細胞当たりのＡＭＬ細胞のパーセンテージを示す。図３８Ｄは、マウス群の処理時の脾臓における全生細胞当たりのＡＭＬ細胞のパーセンテージを示す。

【図３８Ｂ】（上記の通り。）

【図３８Ｃ】（上記の通り。）

【図３８Ｄ】（上記の通り。）

【図３９Ａ】様々なレベルのＢＣ２２ｎ（本明細書で使用される場合、「ＢＣ２２ｎ」は、ＵＧＩを含まないＢＣ２２を指す）ｍＲＮＡ及びＣａｓ９　ｍＲＮＡを用いて処理した場合のＴ細胞の編集プロファイルを示す。個々のガイドＲＮＡのＧ０１５９９５（図３９Ａ）、Ｇ０１６０１７（図３９Ｂ）、Ｇ０１６２０６（図３９Ｃ）、及びＧ０１８１１７（図３９Ｄ）を用いて、細胞を編集した。

【図３９Ｂ】（上記の通り。）

【図３９Ｃ】（上記の通り。）

【図３９Ｄ】（上記の通り。）

【図４０Ａ】様々なレベルのＢＣ２２ｎ　ｍＲＮＡ又はＣａｓ９　ｍＲＮＡを使用して４つのガイドにより同時に編集したＴ細胞の編集プロファイルを示す。各編集された遺伝子座における編集プロファイルは、別々に表される：Ｇ０１５９９５（図４０Ａ）、Ｇ０１６０１７（図４０Ｂ）、Ｇ０１６２０６（図４０Ｃ）、及びＧ０１８１１７（図４０Ｄ）。

【図４０Ｂ】（上記の通り。）

【図４０Ｃ】（上記の通り。）

【図４０Ｄ】（上記の通り。）

【図４１Ａ】ＢＣ２２試料とＣａｓ９試料との両方の総ＲＮＡの増加を伴う、抗体結合に対して陰性である細胞のパーセントとしての表現型解析結果を示す。図４１Ａは、Ｂ２ＭガイドＧ０１５９９５を編集に使用したときのＢ２Ｍ陰性細胞のパーセンテージを示す。図４１Ｂは、マルチガイドを編集に使用したときのＢ２Ｍ陰性細胞のパーセンテージを示す。図４１Ｃは、ＴＲＡＣガイドＧ０１６０１７を編集に使用したときのＣＤ３陰性細胞のパーセンテージを示す。図４１Ｄは、ＴＲＢＣガイドＧ０１６２０６を編集に使用したときのＣＤ３陰性細胞のパーセンテージを示す。図４１Ｅは、複数のガイドを編集に使用したときのＣＤ３陰性細胞のパーセンテージを示す。図４１Ｆは、ＣＩＩＴＡガイドＧ０１８１１７を編集に使用したときのＭＨＣＩＩ陰性細胞のパーセンテージを示す。図４１Ｇは、複数のガイドを編集に使用したときのＭＨＣＩＩ陰性細胞のパーセンテージを示す。図４１Ｈは、複数のガイドを編集に使用したときの三重（Ｂ２Ｍ、ＣＤ３、ＭＨＣＩＩ）陰性細胞のパーセンテージを示す。

【図４１Ｂ】（上記の通り。）

【図４１Ｃ】（上記の通り。）

【図４１Ｄ】（上記の通り。）

【図４１Ｅ】（上記の通り。）

【図４１Ｆ】（上記の通り。）

【図４１Ｇ】（上記の通り。）

【図４１Ｈ】（上記の通り。）

【図４２】ＢＣ２２ｎ又はＣａｓ９エディタ及びシングルガイド又は複数のガイドのエレクトロポレーション又はＬＮＰ送達後の未処理の細胞に対する細胞生存能を示す。

【図４３】ＢＣ２２ｎ又はＣａｓ９エディタ及びシングルガイド又は複数のガイドのエレクトロポレーション又はＬＮＰ送達後の核当たりの総γＨ２ＡＸスポット強度を示す。

【図４４】ＢＣ２２ｎ又はＣａｓ９エディタ及びシングルガイド又は複数のガイドのＬＮＰ送達後の目的の遺伝子座における編集パーセンテージを示す。

【図４５】ＢＣ２２ｎ又はＣａｓ９エディタ及びシングルガイド又は複数のガイドのＬＮＰ送達後の、明記された表面タンパク質についての陰性細胞のパーセンテージを示す。

【図４６】ＢＣ２２ｎ又はＣａｓ９エディタ及び複数のガイドのＬＮＰ送達後の総固有分子中の染色体間転座のパーセンテージを示す。
【図４７Ａ】ＣＤ８＋Ｔ細胞における逐次編集の結果を示す。図４７Ａは、ＨＬＡ－Ａ陽性細胞のパーセンテージを示す。図４７Ｂは、ＭＨＣクラスＩＩ陽性細胞のパーセンテージを示す。図４７Ｃは、ＷＴ１　ＴＣＲ陽性ＣＤ３＋、Ｖｂ８＋細胞のパーセンテージを示す。図４７Ｄは、誤対合ＴＣＲを示すＣＤ３＋、Ｖｂ８低細胞のパーセンテージを示す。図４７Ｅは、内因性ＴＣＲのみを示すＣＤ３＋、ｖｂ８－細胞のパーセンテージを示す。図４７Ｆは、ＷＴ１　ＴＣＲに対しては陽性であり、ＨＬＡ－Ａ及びＭＨＣクラスＩＩに対しては陰性であるＣＤ３＋、Ｖｂ８＋のパーセンテージを示す。
【図４７Ｂ】（上記の通り。）
【図４７Ｃ】（上記の通り。）
【図４７Ｄ】（上記の通り。）
【図４７Ｅ】（上記の通り。）
【図４７Ｆ】（上記の通り。）
【図４８Ａ】ＣＤ４＋Ｔ細胞における逐次編集の結果を示す。図４８Ａは、ＨＬＡ－Ａ陽性細胞のパーセンテージを示す。図４８Ｂは、ＭＨＣクラスＩＩ陽性細胞のパーセンテージを示す。図４８Ｃは、ＷＴ１　ＴＣＲ陽性ＣＤ３＋、Ｖｂ８＋細胞のパーセンテージを示す。図４８Ｄは、誤対合ＴＣＲを示すＣＤ３＋、Ｖｂ８低細胞のパーセンテージを示す。図４８Ｅは、内因性ＴＣＲのみを示すＣＤ３＋、ｖｂ８－細胞のパーセンテージを示す。図４８Ｆは、ＷＴ１　ＴＣＲに対しては陽性であり、ＨＬＡ－Ａ及びＭＨＣクラスＩＩに対しては陰性であるＣＤ３＋、Ｖｂ８＋のパーセンテージを示す。
【図４８Ｂ】（上記の通り。）
【図４８Ｃ】（上記の通り。）
【図４８Ｄ】（上記の通り。）
【図４８Ｅ】（上記の通り。）
【図４８Ｆ】（上記の通り。）
【図４９Ａ】Ｔ細胞におけるＣＩＩＴＡ（図４９Ａ）、ＨＬＡ－Ａ（図４９Ｂ）、ＴＲＢＣ１（図４９Ｃ）、及びＴＲＢＣ２（図４９Ｄ）のＴ細胞の逐次編集後のインデルパーセントを示す。
【図４９Ｂ】（上記の通り。）
【図４９Ｃ】（上記の通り。）
【図４９Ｄ】（上記の通り。）
【図５０Ａ】ＴＲＡＣ又はＴＲＢＣ１／２遺伝子座での遺伝子破壊のないＴ細胞の集団を表すＣＤ３ｅｔａ＋、Ｖｂ８－細胞のパーセントを示す。
【図５０Ｂ】ＴＲＡＣにおけるＷＴ１　ＴＣＲ挿入を伴うＴ細胞の集団を表すＣＤ３ｅｔａ＋、Ｖｂ８＋細胞のパーセントを示す。
【図５０Ｃ】ＨＬＡ遺伝子座における有効な遺伝子破壊を伴うＴ細胞の集団を表すＨＬＡ－Ａ２－細胞のパーセントを示す。
【図５０Ｄ】ＣＩＩＴＡ遺伝子座における有効な遺伝子破壊を伴うＴ細胞の集団を表すＨＬＡ－ＤＲＤＰＤＱ－細胞のパーセントを示す。
【図５０Ｅ】ＡＡＶＳ１遺伝子座におけるＧＦＰ挿入を伴うＴ細胞の集団を表すＧＦＰ＋細胞のパーセントを示す。
【図５０Ｆ】５つのゲノム編集を保有するＴ細胞の集団を表すＶｂ８＋ＧＦＰ＋ＨＬＡ－Ａ－ＨＬＡ－ＤＲＤＰＤＱ－細胞のパーセントを示す。
【図５１Ａ】活性化されたＴ細胞を、異なるレベルのＡｐｏタンパク質とともに事前インキュベートしたＬＮＰを用いて処理した後の、ＴＲＢＣ１／２遺伝子座での有効な遺伝子破壊を伴うＴ細胞の集団を表すＣＤ３陰性細胞パーセントを示す。
【図５１Ｂ】非活性化されたＴ細胞を、異なるレベルのＡｐｏタンパク質とともに事前インキュベートしたＬＮＰを用いて処理した後の、ＴＲＢＣ１／２遺伝子座での有効な遺伝子破壊を伴うＴ細胞の集団を表すＣＤ３陰性細胞パーセントを示す。

【図５２Ａ】ＰＥＧ－２ｋＤＭＧとともに製剤化された共製剤化又はｍＲＮＡのみの第１のＬＮＰを用いる、０時間での非活性化されたＴ細胞の処理、及び０時間又は７２時間でのｇＲＮＡのみの第２のＬＮＰを用いる処理の後の、ＴＲＡＣ遺伝子座での有効な遺伝子破壊を伴うＴ細胞の集団を表すＣＤ３陰性細胞パーセントを示す。
【図５２Ｂ】ＰＥＧ－脂質Ｈとともに製剤化された共製剤化又はｍＲＮＡのみの第１のＬＮＰを用いる、０時間での非活性化されたＴ細胞の処理、及び０時間又は７２時間でのｇＲＮＡのみの第２のＬＮＰを用いる処理の後の、ＴＲＡＣ遺伝子座での有効な遺伝子破壊を伴うＴ細胞の集団を表すＣＤ３陰性細胞パーセントを示す。
【図５３Ａ】様々な脂質のモル比により製剤化されたＬＮＰを用いる活性化されたＴ細胞の処理後の、ＴＲＡＣ遺伝子座での有効な遺伝子破壊を伴うＴ細胞の集団を表すＣＤ３－細胞のパーセントを示す。
【図５３Ｂ】様々な脂質のモル比により製剤化されたＬＮＰを用いる非活性化されたＴ細胞の処理後の、ＴＲＡＣ遺伝子座での有効な遺伝子破壊を伴うＴ細胞の集団を表すＣＤ３－細胞のパーセントを示す。
【図５４】様々なｗ／ｗ比のｍＲＮＡ及びｓｇＲＮＡとともに製剤化されたＬＮＰを用いる活性化されたＴ細胞の処理後の、ＴＲＡＣ遺伝子座での有効な遺伝子破壊を伴うＴ細胞の集団を表すＣＤ３－細胞パーセントを示す。
【図５５Ａ】様々なｗ／ｗ比のｍＲＮＡ及びｓｇＲＮＡとともに製剤化されたＬＮＰを用いる非活性化されたＴ細胞の処理後の、ＴＲＡＣ遺伝子座での有効な遺伝子破壊を伴うＴ細胞の集団を表すＣＤ３－細胞パーセントを示す。図５５Ａは、ドナー１を示す。図５５Ｂは、ドナー２を示す。
【図５５Ｂ】（上記の通り。）
【図５６Ａ】種々の培地条件下での培養後の活性化されたＢ細胞の集団を表すＣＤ２０＋のうちのＣＤ８６＋細胞のパーセンテージを示す。図５６Ａは、ＩＭＤＭベースの培地で培養した細胞を示す。図５６Ｂは、ＳｔｅｍＳｐａｎベースの培地で培養した細胞を示す。
【図５６Ｂ】（上記の通り。）
【図５６Ｃ】種々の培地条件下での培養後のＣＤ２０＋Ｂ細胞のうちのＬＤＬＲ＋細胞のパーセンテージを示す。図５６Ｃは、ＩＭＤＭベースの培地で培養した細胞を示す。図５６Ｄは、ＳｔｅｍＳｐａｎベースの培地で培養した細胞を示す。
【図５６Ｄ】（上記の通り。）
【図５７Ａ】１、１０又は１００ｎｇ／ｍｌのＣＤ４０Ｌを含有する培地で培養したＢ細胞の１４日目の倍率拡大を示す。図５７Ａは、一次活性化のみのために刺激された細胞を示す。図５７Ｂは、二次活性化（形質芽球分化）のために刺激された細胞を示す。
【図５７Ｂ】（上記の通り。）
【図５８Ａ】明記された脂質とともに製剤化されたＬＮＰによる編集後のＢ細胞における、ＮＧＳによって決定される平均編集パーセントを示す。図５８Ａは、ＩＭＤＭにおいて培養したＢ細胞を示す。図５８Ｂは、ＳｔｅｍＳｐａｎにおいて培養したＢ細胞を示す。
【図５８Ｂ】（上記の通り。）
【図５９】脂質Ａ又は脂質Ｄとともに製剤化され、ＡｐｏＥ３又はＡｐｏＥ４とともに事前インキュベートされたＬＮＰによる処理後の、有効な遺伝子破壊を伴うＢ細胞の集団を表すＢ２Ｍ陰性細胞のパーセントを示す。
【図６０Ａ】脂質Ａ又は脂質Ｄとともに製剤化されたＬＮＰによる処理後の、有効な遺伝子破壊を伴うＢ細胞の集団を表すＢ２Ｍ陰性細胞パーセントを示す。図６０Ａは、活性化の１日前から活性化の５日後までのＬＮＰ処理を示す。図６０Ｂは、活性化の６～１０日後の、脂質Ａとともに製剤化されたＬＮＰによる処理を示す。
【図６０Ｂ】（上記の通り。）
【図６１】ＤＮＡＰＫ阻害剤の化合物１又は化合物４による編集後の、有効な遺伝子破壊を伴うＢ細胞の集団を表すＢ２Ｍ陰性細胞のパーセントを示す。
【図６２】明記された脂質とともに製剤化されたＬＮＰを用いて処理したＮＫ細胞におけ

る、ＮＧＳによって評価された編集パーセントを示す。
【図６３】ＬＮＰ処理後の１４日目に、様々な用量（ｄｏｅｓ）のＬＮＰを用いて処理したＮＫ細胞における、ＮＧＳによって評価された編集パーセントを示す。
【図６４】ＡＡＶＳ１遺伝子座にＧＦＰを挿入するための編集後の、高ＧＦＰ発現（ＧＦＰ＋＋）を伴うＮＫ細胞のパーセントを示す。
【図６５Ａ】ＬＮＰ及び様々な用量のＤＮＡＰＫ阻害剤の化合物１又は化合物４による処理後の、ＮＧＳによって評価されたＡＡＶＳ１における平均編集パーセントを示す。
【図６５Ｂ】ＤＮＡＰＫ阻害剤の化合物１又は化合物４によりＡＡＶＳ１遺伝子座にＧＦＰを挿入するための編集後の、高ＧＦＰ発現（ＧＦＰ＋＋）を伴うＮＫ細胞のパーセントを示す。
【図６６】脂質Ａに対する種々の脂質組成物での編集後の、マクロファージ細胞における相対的なＣａｓ９タンパク質発現を示す。
【図６７】マクロファージ又は単球細胞における編集後の、有効な遺伝子破壊を伴う細胞の集団を表すＢ２Ｍ陰性細胞のパーセントを示す。
【図６８】解凍後０～８日間のＬＮＰによる処理後のマクロファージ細胞における、ＮＧＳによって評価された編集パーセントを示す。
【図６９Ａ】連続ＬＮＰ処理後の陰性細胞の平均パーセントを示す。図６９Ａは、ＣＩＩＴＡ遺伝子座の有効な破壊を表すＨＬＡ－ＤＲ、ＤＰ、ＤＱ陰性細胞パーセントを示す。図６９Ｂは、Ｂ２Ｍ陰性細胞パーセントを示す。
【図６９Ｂ】（上記の通り。）
【図７０】脂質Ａ又は脂質Ｄとともに製剤化されたＬＮＰにより編集した後のＣＤ６８＋、ＣＤ１１ｂ＋、ＨＬＡ－ＡＢＣ－細胞パーセンテージを示す。
【発明を実施するための形態】
【０００７】
本開示は、例えば、ゲノム編集ツールなどの核酸を細胞に送達するための、及びインビトロでの多重ゲノム編集のための脂質核酸アセンブリ組成物を使用するプラットフォーム方法を提供する。本方法は、例えば、顕著な細胞副作用なしに複数のゲノム編集ツールを細胞に送達する能力を提供する。本方法はまた、例えば、細胞の生存能を著しく失うことなく単一の細胞内で複数のインビトロゲノム編集を提供するが、一方で、例えば、エレクトロポレーションを使用する以前の方法は、細胞に対するそれらの毒性によって妨げられていた。いくつかの実施形態において、プラットフォームは、対象へのその後の治療的投与のために、インビトロで細胞を調製するための製造方法に関する。いくつかの実施形態において、プラットフォームは、ゲノム編集ツールを含む脂質核酸アセンブリ組成物の同時又は逐次投与を介する多重ゲノム編集に関する。プラットフォームは、任意の細胞型に関連するが、例えば、初代免疫細胞において、完全な治療的適用性のために複数のゲノム編集を必要とする細胞を調製する際に特に有利である。本方法は、以前の送達技術と比較して改善された特性を示してもよく、例えば、本方法は、ゲノム編集ツールなどの核酸の効率的な送達を提供すると同時に、例えば、以前のトランスフェクション方法によって引き起こされる転座を含む高レベルのＤＮＡ損傷による、トランスフェクションプロセス自体によって引き起こされる細胞生存能の喪失及び／又は細胞死を低減させる。本明細書で提供されるように、プラットフォーム方法は、インビトロで「細胞」に、又はインビトロで「細胞集団」（又は「細胞の集団」）に適用される。本明細書で「細胞」の送達又は遺伝子編集方法に言及する場合、これらの方法は、「細胞集団」への送達又は遺伝子編集のために使用され得ることが理解される。
【０００８】
いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるのは、インビトロで核酸、例えば、ゲノム編集ツールを含む２つ以上の脂質核酸アセンブリ組成物を細胞に送達する方法である。いくつかの実施形態において、本方法は、複数の核酸アセンブリ組成物を、逐次的に及び／又は同時に投与することを含む。いくつかの実施形態において、本方法は、血清因子を脂質核酸アセンブリ組成物と事前インキュベートすることを含む。いくつかの実施

形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、核酸、アミン脂質、ヘルパー脂質、中性脂質、及びＰＥＧ脂質を含む。いくつかの実施形態において、本方法は、細胞を事前インキュベートした脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させることを更に含む。いくつかの実施形態において、本方法は、細胞をインビトロで培養することを更に含む。いくつかの実施形態において、本方法は、細胞の生存能を著しく失うことなく、ゲノム編集ツールを細胞に送達することをもたらす。

【０００９】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるのは、遺伝子操作された初代免疫細胞、例えば、Ｔ細胞又はＢ細胞をインビトロで産生する方法である。いくつかの実施形態において、初代免疫細胞は、インビトロで培養され、核酸ゲノム編集ツールを含む脂質核酸アセンブリ組成物を提供する。いくつかの実施形態において、初代免疫細胞では、１つより多いそのような組成物が提供される。いくつかの実施形態において、本方法は、遺伝子操作された初代免疫細胞の産生をもたらす。いくつかの実施形態において、本方法は、１つより多い遺伝子組換えを伴う遺伝子操作された初代免疫細胞の産生をもたらす。

【００１０】

いくつかの実施形態において、本明細書に提供されるのは、有用な特性を有する、脂質核酸アセンブリ、例えば、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）ベースの組成物を、特にＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子編集構成要素の送達のために利用する方法である。脂質核酸アセンブリ組成物は、細胞膜を通過する核酸の送達を促進し、特定の実施形態において、それらは生細胞に遺伝子編集用の構成要素及び組成物を導入する。いくつかの実施形態において、本方法は、例えば、ＬＮＰ組成物を介して、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系などのＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤とともに、ガイドＲＮＡの送達を提供し、特定の遺伝子の発現を実質的に低減させるか、又はノックアウトする。いくつかの実施形態において、本方法は、ＬＮＰ組成物などの脂質核酸アセンブリ、及びドナー核酸（本明細書では、「テンプレート核酸」又は「外来性核酸」とも称される）、例えば、標的配列に挿入され得る所望のタンパク質をコードするＤＮＡを介して、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系などのＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤とともに、ガイドＲＮＡの送達を提供する。いくつかの実施形態は、両方を行う。

【００１１】

ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ遺伝子編集系の構成要素を、培養におけるリンパ球を含む単核細胞、特にＴ細胞などの免疫細胞に送達する方法は、特別な関心対象である。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系の構成要素を含むＲＮＡを、リンパ球を含む単核細胞、特にＴ細胞などの免疫細胞に送達する方法が、本明細書において提供される。本方法は、核酸を、インビトロで培養したリンパ球を含む細胞、特にＴ細胞に送達し、タンパク質をコードするｍＲＮＡを提供する脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）組成物と細胞を接触させることを含む。加えて、免疫細胞、例えば、リンパ球、及び特にＴ細胞におけるインビトロでの遺伝子編集の方法、並びに操作された細胞を産生する方法が提供される。

【００１２】

いくつかの実施形態において、本明細書に提供されるのは、編集細胞を含む細胞集団の組成物である。いくつかの実施形態において、そのような細胞集団は、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集細胞を含む。本開示は、編集細胞を含む細胞集団を提供し、細胞の集団は、単一ゲノム編集を含む編集細胞を含む。いくつかの実施形態において、本開示は、少なくとも２つのゲノム編集を含む編集細胞を含む、細胞集団を提供する。いくつかの実施形態において、編集細胞を含む細胞集団は、例えば、低レベルの転座を有し、例えば、編集の開始後に拡大することができ、細胞療法生成物として好適である。

【００１３】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるのは、免疫腫瘍学などの養子細胞移入（ＡＣＴ）療法のための組成物及び方法、例えば、標的配列を標的とするｇＲＮＡ分子を含むＣＲＩＳＰＲ系の導入によって修飾されたものを含む、ゲノム中の当該１つ以上の特定の標的配列で修飾された細胞、並びにそれらを作製及び使用する方法である。例えば、本開示は、免疫細胞のゲノム編集、例えば、内因性ＴＣＲ発現を欠くように操作され

たＴ細胞、例えば、目的の核酸を挿入するための更なる操作に好適なＴ細胞、例えば、トランスジェニックＴＣＲ（ｔｇＴＣＲ）などのＴＣＲを発現するように更に操作され、ＡＣＴ療法に有用なＴ細胞；及びＢ細胞のゲノム編集、例えば、内因性Ｂ細胞受容体（ＢＣＲ）発現を欠くように操作されたＢ細胞、例えば、目的の核酸を挿入するための更なる操作に好適なＢ細胞、例えば、トランスジェニックＢＣＲ（ｔｇＢＣＲ）などのＢＣＲを発現するように、若しくは抗体の発現のために更に操作されたＢ細胞；例えば、ＡＣＴ療法への適合性を改善するために、内因性分子を欠くように操作された本明細書に記載されるＮＫ細胞、又は単球、又はマクロファージ、又はｉＰＳＣ、又は初代細胞、又は前駆細胞、例えば、目的の核酸を挿入するための操作に好適な本明細書に記載されるＮＫ細胞、又は単球、又はマクロファージ、又はｉＰＳＣ、又は初代細胞、又は前駆細胞、例えば、異種タンパク質配列を発現するように更に操作され、ＡＣＴ療法に有用な本明細書に記載されるＮＫ細胞、又は単球、又はマクロファージ、又はｉＰＳＣ、又は初代細胞、又は前駆細胞のゲノム編集に有用な、ｇＲＮＡ分子、ＣＲＩＳＰＲ系、細胞、及び方法に関し、かつそれらを提供する。

【００１４】

いくつかの実施形態において、本方法は、養子細胞療法として有用な遺伝子操作Ｔ細胞のための新たなプロセスを提供する。例えば、いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は、インビトロで遺伝子組換えされ、例えば、内因性Ｔ細胞受容体遺伝子などを含む複数の標的遺伝子の発現を低減させ、ドナー核酸の形態でトランスジェニックＴＣＲを挿入するように更に修飾される。いくつかの実施形態において、養子細胞療法としての使用に特に望ましいＴ細胞は、複数の遺伝子編集を必要とする。本明細書に開示されるゲノムに対する多数の修飾を用いてインビトロでＴ細胞を遺伝子操作する能力は、技術的課題であることが以前に証明されている。上述した多重遺伝子編集と関連する障害に加えて、Ｔ細胞は、例えば、培養物中で遺伝子組換えを行うことが特に困難であり、枯渇する可能性がある。

【００１５】

本明細書に提供されるのは、以前のプロセスの障害を克服する、インビトロでＴ細胞を遺伝子操作するための方法である。いくつかの実施形態において、ナイーブＴ細胞を、少なくとも１つの脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させ、遺伝子組換えする。いくつかの実施形態において、非活性化されたＴ細胞を、２つ以上の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させ、遺伝子組換えする。いくつかの実施形態において、活性化されたＴ細胞を、２つ以上の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させ、遺伝子組換えする。いくつかの実施形態において、（非活性化された）Ｔ細胞を１つ以上の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させることを含む活性化前ステップにおいて、Ｔ細胞を修飾し、続いてＴ細胞を活性化し、続いて、活性化されたＴ細胞を１つ以上の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させることを含む活性化後ステップにおいて、Ｔ細胞への更なる修飾を行う。いくつかの実施形態において、非活性化されたＴ細胞を、１、２、又は３個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、活性化されたＴ細胞を、１～１２個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、活性化されたＴ細胞を、１～８個の脂質核酸アセンブリ組成物、任意選択により１～４個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、活性化されたＴ細胞を、１～６個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞を、２個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞を、３個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞を、４個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞を、５個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞を、６個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞を、７個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞を、８個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞を、９個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞を、１０個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる

。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞を、１１個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞を、１２個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。脂質核酸アセンブリ組成物のそのような例示的な逐次投与（任意選択により、活性化前ステップ及び活性化後ステップにおいて更なる逐次投与又は同時投与を伴う）は、Ｔ細胞の活性化状態を利用し、特有の利点及び編集後のより健康な細胞を提供する。いくつかの実施形態において、遺伝子操作されたＴ細胞は、各標的部位における高い編集効率、編集後の生存率の増加、トランスフェクションの多様性にもかかわらず低い毒性、低い転座（例えば、測定可能な標的－標的転座なし）、サイトカイン（例えば、ＩＬ－２、ＩＦＮγ、ＴＮＦα）の産生の増加、反復刺激による継続的な増殖（例えば、反復抗原刺激による）、拡大の増加、例えば、初期幹細胞を含む、メモリ細胞表現型マーカーの発現の有利な特性を有する。

【００１６】

Ｉ．定義

特に明記しない限り、本明細書で使用される以下の用語及び句は、以下の意味を有することを意図する。

【００１７】

「ポリヌクレオチド」及び「核酸」は、骨格に沿って一緒に連結された窒素系複素環式塩基又は塩基類似体を有するヌクレオシド又はヌクレオシド類似体（従来のＲＮＡ、ＤＮＡ、混合ＲＮＡ－ＤＮＡ、及びそれらの類似体であるポリマーを含む）を含む多量体化合物を指すために本明細書で使用される。核酸「骨格」は、糖ホスホジエステル連結、ペプチド－核酸結合（「ペプチド核酸」又はＰＮＡ、ＰＣＴ第９５／３２３０５号）、ホスホロチオエート連結、メチルホスホネート連結、又はそれらの組み合わせのうちの１つ以上を含む、様々な連結から構成され得る。核酸の糖部分は、リボース、デオキシリボース、又は置換、例えば、２’メトキシ又は２’ハロゲン化物置換を有する類似の化合物であり得る。窒素系塩基は、従来の塩基（Ａ、Ｇ、Ｃ、Ｔ、Ｕ）、その類似体（例えば、５－メトキシウリジン、シュードウリジン、若しくはＮ１－メチルシュードウリジン等の修飾ウリジン）、イノシン、プリン若しくはピリミジンの誘導体（例えば、N^4－メチルデオキシグアノシン、デアザ－若しくはアザ－プリン、デアザ－若しくはアザ－ピリミジン、５位若しくは６位に置換基を有するピリミジン塩基（例えば、５－メチルシトシン）、２、６、若しくは８位に置換基を有するプリン塩基、２－アミノ－６－メチルアミノプリン、O^6－メチルグアニン、４－チオ－ピリミジン、４－アミノ－ピリミジン、４－ジメチルヒドラジン－ピリミジン、及びO^4－アルキル－ピリミジン、米国特許第５，３７８，８２５号及びＰＣＴ第９３／１３１２１号）であってもよい。一般的な考察については、Ｔｈｅ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｏｆ ｔｈｅ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ ５－３６、Ａｄａｍｓ ｅｔ ａｌ．編集、11^{th} ｅｄ．，１９９２を参照）。核酸は、骨格がポリマーの位置に窒素系塩基を含まない１つ以上の「脱塩基」残基を含み得る（米国特許第５，５８５，４８１号）。核酸は、従来のＲＮＡ若しくはＤＮＡ糖、塩基及び連結のみを含んでいてもよく、又は従来の構成要素及び置換の両方（例えば、２’メトキシ連結を有する従来の塩基、又は従来の塩基及び１つ以上の塩基類似体の両方を含有するポリマー）を含むことができる。核酸は、ＲＮＡ模倣糖構造にロックされた二環式フラノース単位を有し、相補的なＲＮＡ及びＤＮＡ配列に対するハイブリダイゼーション親和性を高める、１つ以上のＬＮＡヌクレオチドモノマーを含有する類似体である「ロックド核酸」（ＬＮＡ）を含む（Ｖｅｓｔｅｒ ａｎｄ Ｗｅｎｇｅｌ，２００４，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ４３（４２）：１３２３３－４１）。ＲＮＡ及びＤＮＡは異なる糖部分を有し、ＲＮＡ内のウラシル若しくはその類似体及びＤＮＡ内のチミン若しくはその類似体の存在によって異なり得る。

【００１８】

「ガイドＲＮＡ」、「ｇＲＮＡ」、及び単に「ガイド」は、標的ＤＮＡに対してＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を指向させるガイドを指すために、本明細書で互換的に使用され、ｃｒＲＮＡ（ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡとしても知られる）、又はｃｒＲＮＡ及びｔｒＲＮＡの

組み合わせ（ｔｒａｃｒＲＮＡとしても知られる）のいずれかであり得る。ｃｒＲＮＡ及びｔｒＲＮＡは、一本鎖ＲＮＡ分子（シングルガイドＲＮＡ、ｓｇＲＮＡ）として会合し得るか、又は２つの別々のＲＮＡ分子（デュアルガイドＲＮＡ、ｄｇＲＮＡ）において会合し得る。「ガイドＲＮＡ」又は「ｇＲＮＡ」は、各種類を指す。ｔｒＲＮＡは、天然に存在する配列、又は天然に存在する配列と比較して修飾若しくは多様性を有するｔｒＲＮＡ配列であり得る。

【００１９】

本明細書で使用される場合、「ガイド配列」は、標的配列に対して相補的であり、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤による結合又は修飾（例えば、開裂）のための標的配列に対してガイドＲＮＡを指向させるように機能する、ガイドＲＮＡ内の配列を指す。「ガイド配列」は、「標的化配列」又は「スペーサー配列」とも称され得る。ガイド配列は、例えば、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ（すなわち、Ｓｐｙ　Ｃａｓ９）及び関連するＣａｓ９ホモログ／オルソログの場合、２０塩基対の長さであり得る。例えば、１５、１６、１７、１８、１９、２１、２２、２３、２４、又は２５ヌクレオチド長のような、より短い配列又はより長い配列もまたガイドとして使用できる。いくつかの実施形態において、標的配列は、例えば、遺伝子内又は染色体上にあり、例えば、ガイド配列に対して相補的である。いくつかの実施形態では、ガイド配列とそれに対応する標的配列との間の相補性又は同一性の程度は、約７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％であり得る。いくつかの実施形態において、ガイド配列及び標的配列は、１００％相補的又は同一であり得る。他の実施形態では、ガイド配列と標的配列とは、少なくとも１個のミスマッチを含有していてもよい。例えば、ガイド配列及び標的配列は、１、２、３、又は４個のミスマッチを含有していてもよく、標的配列の全長は、少なくとも１７、１８、１９、２０個、又はそれ以上の塩基対である。いくつかの実施形態では、ガイド配列及び標的配列は、１～４個のミスマッチを含有していてもよく、ガイド配列は、少なくとも１７、１８、１９、２０個、又はそれ以上のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、ガイド配列及び標的配列は、１、２、３、又は４個のミスマッチを含有していてもよく、ガイド配列は、２０個のヌクレオチドを含む。

【００２０】

ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の核酸基質は二本鎖核酸であるので、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の標的配列は、ゲノムＤＮＡのプラス鎖とマイナス鎖（すなわち、与えられる配列と、配列の逆相補体）の両方を含む。したがって、ガイド配列が、「標的配列に対して相補的」であると言われる場合、標的配列の逆相補体に結合するようにガイドＲＮＡを指向させ得ると理解されるべきである。したがって、いくつかの実施形態において、ガイド配列が、標的配列の逆相補体に結合する場合、ガイド配列は、ガイド配列におけるＵのＴへの置換を除いて、標的配列の特定のヌクレオチド（例えばＰＡＭを含まない標的配列）と同一である。

【００２１】

本明細書で使用される場合、「ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤」は、ＲＮＡ及びＤＮＡ結合活性を有するポリペプチド若しくはポリペプチドの複合体、又はそのような複合体のＤＮＡ結合サブユニットを意味し、ＤＮＡ結合活性は、配列特異的であり、ＲＮＡの配列に依存する。例示的なＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤には、Ｃａｓクリバーゼ（ｃｌｅａｖａｓｅ）／ニッカーゼ及びその不活性化形態（ｄＣａｓ　ＤＮＡ結合剤」）が含まれる。本明細書で使用される「Ｃａｓタンパク質」とも称される「ＣａｓヌクレアーゼⅠ」には、Ｃａｓクリバーゼ、Ｃａｓニッカーゼ、及びｄＣａｓ　ＤＮＡ結合剤が包含される。Ｃａｓクリバーゼ／ニッカーゼ及びｄＣａｓ　ＤＮＡ結合剤には、ＩＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ系のＣｓｍ又はＣｍｒ複合体、Ｃａｓ１０、Ｃｓｍ１、又はそのＣｍｒ２サブユニット、Ⅰ型ＣＲＩＳＰＲ系のカスケード複合体、そのＣａｓ３サブユニット及びクラス２Ｃａｓヌクレアーゼが含まれる。本明細書で使用される場合、「クラス２ＣａｓヌクレアーゼⅠ」は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合活性を有する一本鎖ポリペプチドである。クラス２ＣａｓヌクレアーゼⅠ

には、ＲＮＡガイドＤＮＡクリバーゼ若しくはニッカーゼ活性を更に有するクラス２Ｃａｓクリバーゼ／ニッカーゼ（例えば、Ｈ８４０Ａ、Ｄ１０Ａ、又はＮ８６３Ａバリアント）、並びに切断／ニッカーゼ活性が不活性化されたクラス２ｄＣａｓ　ＤＮＡ結合剤が含まれる。クラス２Ｃａｓヌクレアーゼには、例えば、Ｃａｓ９、Ｃｐｆ１、Ｃ２ｃ１、Ｃ２ｃ２、Ｃ２ｃ３、ＨＦ　Ｃａｓ９（例えば、Ｎ４９７Ａ、Ｒ６６１Ａ、Ｑ６９５Ａ、Ｑ９２６Ａバリアント）、ＨｙｐａＣａｓ９（例えば、Ｎ６９２Ａ、Ｍ６９４Ａ、Ｑ６９５Ａ、Ｈ６９８Ａバリアント）、ｅＳＰＣａｓ９（１．０）（例えば、Ｋ８１０Ａ、Ｋ１００３Ａ、Ｒ１０６０Ａバリアント）、及びｅＳＰＣａｓ９（１．１）（例えば、Ｋ８４８Ａ、Ｋ１００３Ａ、Ｒ１０６０Ａバリアント）タンパク質、並びにそれらの修飾物が含まれる。Ｃｐｆ１タンパク質，Ｚｅｔｓｃｈｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ，１６３：１－１３（２０１５）は、Ｃａｓ９と相同であり、ＲｕｖＣ様ヌクレアーゼドメインを含む。ＺｅｔｓｃｈｅのＣｐｆ１配列は、参照によりそれらの全体が組み込まれる。例えば、Ｚｅｔｓｃｈｅの表Ｓ１及びＳ３を参照。例えば、Ｍａｋａｒｏｖａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｒｅｖ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ，１３（１１）：７２２－３６（２０１５）；Ｓｈｍａｋｏｖ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｅｌｌ，６０：３８５－３９７（２０１５）を参照のこと。

【００２２】

本明細書で使用される場合、「リボ核タンパク質」（ＲＮＰ）又は「ＲＮＰ複合体」は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、例えば、ＣａｓヌクレアーゼＣａｓクリバーゼ、Ｃａｓニッカーゼ、又はｄＣａｓ　ＤＮＡ結合剤（例えば、Ｃａｓ９）とともに含むガイドＲＮＡを指す。いくつかの実施形態において、ガイドＲＮＡは、Ｃａｓ９などのＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を標的配列へとガイドし、ガイドＲＮＡは、標的配列とハイブリダイズし、薬剤が標的配列に結合し、その場合、この薬剤はクリバーゼ又はニッカーゼであり、結合の後に切断又はニッキングを行うことができる。

【００２３】

本明細書で使用される場合、「エディタ」という用語は、核酸配列（例えば、ＤＮＡ又はＲＮＡ）内の塩基（例えば、Ａ、Ｔ、Ｃ、Ｇ、又はＵ）への修飾を行うことができるポリペプチドを含む薬剤を指す。いくつかの実施形態において、エディタは、核酸内の塩基を脱アミノ化することができる。いくつかの実施形態において、エディタは、ＤＮＡ分子内の塩基を脱アミノ化することができる。いくつかの実施形態において、エディタは、ＤＮＡ内のシトシン（Ｃ）を脱アミノ化することができる。いくつかの実施形態において、エディタは、シチジンデアミナーゼドメインに融合したＲＮＡガイドニッカーゼを含む融合タンパク質である。いくつかの実施形態において、エディタは、ＡＰＯＢＥＣ３Ａデアミナーゼ（Ａ３Ａ）に融合したＲＮＡガイドニッカーゼを含む融合タンパク質である。いくつかの実施形態において、エディタは、ＡＰＯＢＥＣ３Ａデアミナーゼ（Ａ３Ａ）に融合したＣａｓ９ニッカーゼを含む。

【００２４】

本明細書で使用される場合、第２の配列に対する第１の配列のアラインメントにより、第２の配列の位置の全体でのＸ％以上が第１の配列によって一致することが示される場合、第１の配列は、第２の配列と「少なくともＸ％の同一性を有する配列を含む」とみなされる。例えば、配列ＡＡＧＡは、配列ＡＡＧと１００％の同一性を有する配列を含むが、その理由は、アラインメントが、第２の配列の３つの全ての位置において一致があるという点で１００％の同一性を与えるからである。ＲＮＡとＤＮＡとの間の差（一般に、チミジンをウリジンに交換すること、又はその逆）、及び修飾ウリジン等のヌクレオシド類似体の存在は、関連するヌクレオチド（チミジン、ウリジン、又は修飾ウリジン等）が同じ相補体（例えば、チミジン、ウリジン、又は修飾ウリジンの全てについてのアデノシン；別の例は、シトシン及び５－メチルシトシンであり、これらの両方が相補体としてグアノシン又は修飾グアノシンを有する）を有する限り、ポリヌクレオチド間の同一性又は相補性の差に寄与しない。したがって、例えば、Ｘが任意の修飾ウリジン、例えば、シュードウリジン、Ｎ１－メチルシュードウリジン、又は５－メトキシウリジンである配列５’－

ＡＸＧは、両方とも同じ配列（５’－ＣＡＵ）に完全に相補的である点において、ＡＵＧと１００％同一であるとみなされる。例示的なアライメントアルゴリズムは、当該技術分野において周知である、Ｓｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎ及びＮｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアルゴリズムである。当業者は、アラインメントされる配列の所与の対について、どのようなアルゴリズム及びパラメータ設定の設定が適切であることを理解するであろう。一般的に類似する長さ及び予想される同一性がアミノ酸については５０％超の配列、又はヌクレオチドについては７５％超の配列に関して、ｗｗｗ．ｅｂｉ．ａｃ．ｕｋウェブサーバでＥＢＩによって提供されるＮｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアルゴリズムインターフェースのデフォルト設定を用いたＮｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアルゴリズムが一般的に適切である。

【００２５】

「ｍＲＮＡ」は、ポリヌクレオチドを指すために本明細書で使用され、ポリペプチドへと翻訳することができる（すなわち、リボソーム及びアミノアシル化ｔＲＮＡによる翻訳のための基質として機能し得る）オープンリーディングフレームを含む。ｍＲＮＡは、リボース残基又はその類似体を含むリン酸糖骨格（例えば、２’－メトキシリボース残基）を含むことができる。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡリン酸糖骨格の糖は、リボース残基、２’－メトキシリボース残基、又はそれらの組み合わせから本質的になる。

【００２６】

本明細書で使用される場合、「インデル」は、例えば、標的核酸内の二本鎖切断（ＤＳＢ）の部位において挿入されるか、又は欠失するかのいずれかである多数のヌクレオチドからなる挿入／欠失変異を指す。

【００２７】

本明細書で使用される場合、「ノックダウン」は、特定の遺伝子産物（例えば、タンパク質、ｍＲＮＡ、又はその両方）の発現の低下を指す。タンパク質のノックダウンは、目的の組織、流体、又は細胞集団等の試料からタンパク質の総細胞量を検出することによって測定することができる。これは、タンパク質の代替物、マーカー、又は活性を測定することによっても測定することができる。ｍＲＮＡのノックダウンを測定する方法は既知であり、目的の試料から単離されたｍＲＮＡのシークエンシングを含む。いくつかの実施形態では、「ノックダウン」は、特定の遺伝子産物の発現のいくつかの喪失、例えば、転写されるｍＲＮＡの量の減少、又は細胞集合（組織に見られるもの等のインビボ集合を含む）によって発現されるタンパク質の量の減少を指し得る。

【００２８】

本明細書で使用される場合、「ノックアウト」は、細胞における特定の遺伝子からの発現の喪失、又は細胞における特定のタンパク質の喪失を指す。ノックアウトは、細胞、組織、又は細胞集団におけるタンパク質の総細胞量を検出することのいずれかによって測定することができる。

【００２９】

本明細書で使用される場合、「標的配列」は、ｇＲＮＡのガイド配列に対して相補性を有する標的遺伝子内の核酸配列を指す。標的配列とガイド配列との相互作用により、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、標的配列内で結合し、潜在的に（薬剤の活性に応じて）ニックを形成するか、又は切断するように指向される。

【００３０】

本明細書で使用される場合、「処理」は、対象における疾患又は障害のための任意の投与又は治療の適用を指し、その疾患を阻害すること、その進行を止めること、その疾患の１つ以上の症状を緩和すること、その疾患を治癒させること、又は症状の再発を含む、その疾患の１つ以上の症状を予防することを含む。

【００３１】

本明細書で使用される場合、「編集細胞を含む細胞集団」、又は「編集細胞を含む細胞の集団」などは、編集細胞を含む細胞集団を指すが、集団内の全ての細胞が編集されなければならないわけではない。編集細胞を含む細胞集団はまた、未編集細胞を含んでもよい

。編集細胞を含む細胞集団内の編集細胞のパーセンテージは、標準細胞計数方法によって決定されるように、集団内で編集されている集団内の細胞の数を計数することによって決定され得る。例えば、いくつかの実施形態において、単一ゲノム編集を含む編集細胞を含む細胞集団は、少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、又は９９％の、単一の編集を有する集団内の細胞を有する。いくつかの実施形態において、少なくとも２つのゲノム編集を含む編集細胞を含む細胞集団は、少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は９５％の、少なくとも２つのゲノム編集を有する集団内の細胞を有する。

【００３２】

「約」又は「およそ」という用語は、当業者によって決定される特定の値について許容される誤差を意味し、これは、値がどのように測定若しくは決定されるか、あるいは記載された主題の特性に実質的に影響を与えない変動、又は当該技術分野において許容される許容誤差、例えば、１０％、５％、２％、若しくは１％以内の程度に部分的に依存する。したがって、そうでないことが示されない限り、以下の明細書及び添付の特許請求の範囲に示される数値パラメータは、得ようとする所望の特性に応じて変化し得る近似値である。少なくとも、かつ、等価物の見解の適用を特許請求の範囲に限定しようとするものではなく、各数値パラメータは、少なくとも報告された有意な桁の数に照らし合わせて、かつ通常の四捨五入技法を適用することによって解釈されるべきである。

【００３３】

ここで、本発明の特定の実施形態を詳細に参照し、本発明の実施形態の例は添付の図面で例示される。本発明は例示される実施形態と併せて説明されるが、それらは、本発明をそれらの実施形態に限定することを意図するものではないことが理解されるであろう。逆に、本発明は、添付の特許請求の範囲によって定義され、含まれる実施形態によって本発明内に含まれ得る全ての代替物、改変物、及び均等物を網羅することが意図される。

【００３４】

本教示を詳細に説明する前に、本開示は、特定の組成物又はプロセスステップに限定されるものではなく、したがって変化し得ると理解されるべきである。本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用されるように、単数形「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」は、文脈が別途明確に指示しない限り、複数の参照物を含めることに留意されたい。したがって、例えば、「コンジュゲート（ａ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅ）」への言及は、複数のコンジュゲートを含み、「細胞（ａ　ｃｅｌｌ）」への言及は、複数の細胞を含むなどである。

【００３５】

数値範囲は、範囲を定義する数を含む。測定値及び測定可能な値は、有意な桁及び測定に関連する誤差を考慮して、おおよその値であると理解される。また、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、「含有する（ｃｏｎｔａｉｎ）」、「含有する（ｃｏｎｔａｉｎｓ）」、「含有する（ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」、及び「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」の使用は、限定することを意図するものではない。上述の概略的な説明と、以下の詳細な説明はいずれも例示であり、単に説明するためのものであり、その教示を限定するものではないことが理解されるべきである。

【００３６】

本明細書に特に記載されていない限り、様々な構成要素を「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」と列挙する本明細書の実施形態はまた、その列挙された構成要素「からなる」か、又はそれら「から本質的になる」ものであると想定される。様々な構成要素「からなる」と列挙する本明細書の実施形態はまた、その列挙された構成要素を「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」か、又はそれら「から本質的になる」ものであると想定される。様々な構成要素「から本質的になる」と列挙する本明細書の実施形態はまた、その列挙された構成要素「からなる」か、又はそれらを「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」ものであると想定される（この互換性は、特許請求の範囲におけるこれらの用語の使用には適用されない）。「又は」という用語は、文脈が別途明確に示さない限り、包括的な意味で、すなわち、「

及び／又は」に等しい意味で使用される。

【００３７】

本明細書で使用される章の見出しは、構成的な目的のみのためであり、所望の主題を決して限定するものとして解釈されるべきではない。参照により組み込まれる任意の材料が、本明細書で定義される任意の用語又は本明細書の任意の他の明示的な内容と矛盾する場合、本明細書が優先する。本教示を様々な実施形態と併せて記載するが、本教示をそのような実施形態に限定することを意図するものではない。逆に、本教示は、当業者によって理解されるように、様々な代替物、修飾物、及び均等物を包含する。

【００３８】

ＩＩ．多重送達及びゲノム編集

Ａ．多重送達

いくつかの実施形態において、複数の脂質核酸アセンブリ組成物を細胞にインビトロで送達する方法が提供される。いくつかの実施形態において、多重送達方法は、細胞集団に拡大することができる細胞をもたらす。いくつかの実施形態において、細胞集団への細胞の拡大は、多重送達に成功したマーカーである。同様に、複数の脂質核酸アセンブリ組成物を細胞にインビトロで送達して、増加した生存を有する拡大した細胞集団を産生する方法が提供される。そのような方法は、例えば、細胞療法において使用される細胞の産生／製造において有用であり、細胞療法は、本明細書で使用される場合、疾患又は障害を治療するための対象への生きた無傷の細胞の移入を指す。ＡＣＴ療法を含む治療細胞の移植などの細胞療法アプローチが含まれる。細胞療法には、自己由来（対象に由来する細胞）及び同種（ドナーに由来する細胞）の細胞療法が含まれる。

【００３９】

いくつかの実施形態において、多重送達方法は、少なくとも２つの脂質核酸アセンブリ組成物をインビトロ培養細胞に送達することを含む。いくつかの実施形態において、細胞を、第１の核酸を含む少なくとも第１の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させ、それによって接触させた細胞を産生し、接触させた細胞を培養し、それによって培養された接触させた細胞を産生し、培養された接触させた細胞を、第２の核酸を含む少なくとも第２の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させ、この第２の核酸は第１の核酸とは異なっている。次いで、得られる細胞をインビトロで拡大する。いくつかの実施形態において、送達方法は、拡大された細胞集団、例えば、増加した生存を有する細胞集団をもたらす。いくつかの実施形態において、拡大された細胞は、少なくとも７０％の生存率を有する。「第１の」及び「第２の」核酸は、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含み得る。

【００４０】

いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物をインビトロ培養細胞に送達するための方法であって、ａ）細胞を、第１の核酸を含む少なくとも第１の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させ、それによって接触させた細胞を産生するステップと、ｂ）接触させた細胞をインビトロで培養し、それによって培養された接触させた細胞を産生するステップと、ｃ）培養された接触させた細胞を、第２の核酸を含む少なくとも第２の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させるステップであって、第２の核酸が第１の核酸とは異なる、接触させるステップと、ｄ）細胞をインビトロで拡大するステップと、を含み、拡大された細胞が増加した生存を示す、方法が提供される。いくつかの実施形態において、拡大された細胞は、少なくとも７０％の生存率を有する。いくつかの実施形態において、細胞を、２～１２個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞を、２～８個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞を、２～６個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞を、３～８個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞を、３～６個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞を、４～６個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞を、４～１２個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞を、４～８個の脂質核酸ア

センブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞を、６～１２個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞を、３、４、５、又は６個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞を、６個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞を、８個以下の脂質核酸アセンブリ組成物と同時に接触させる。いくつかの実施形態において、細胞を、６個以下の脂質核酸アセンブリ組成物と同時に接触させる。いくつかの実施形態において、細胞は、Ｔ細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は、非活性化された細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は、活性化された細胞である。いくつかの実施形態において、（ａ）の細胞は、少なくとも１つの脂質核酸アセンブリ組成物との接触後に活性化される。

【００４１】

いくつかの実施形態において、「増加した生存」は、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％の、トランスフェクション後の細胞生存率、又は拡大された細胞の細胞生存率、又は細胞によって実証される（拡大された細胞から生じる、編集細胞を含む細胞の集団の生存能を指す）。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ方法は、エレクトロポレーションなどの既知の技術と比較して、細胞死を低減し得る。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ方法は、５％未満、１０％未満、２０％未満、３０％未満、又は４０％未満の細胞死を引き起こし得る。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ方法は、細胞の生存能を著しく失うことなくＲＮＡなどの核酸を送達するが、一方で、例えば、エレクトロポレーションを使用する以前の方法は、細胞に対するそれらの毒性によって妨げられていた。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ方法は、好ましい初期幹細胞メモリ表現型を有する操作されたＴ細胞集団、サイトカイン産生、反復抗原刺激後の増殖プロファイル、及び／又は染色体転座速度などの細胞拡大及び／又は細胞表現型の改善をもたらす。

【００４２】

いくつかの実施形態において、細胞を、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、又は１１個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞を、少なくとも６個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞を、１２個以下の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞を、２～１２個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞を、２～８個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞を、２～６個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞を、３～８個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞を、３～６個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞を、４～６個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞を、４～１２個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞を、４～８個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞を、６～１２個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞を、３、４、５、又は６個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞を、８個以下の脂質核酸アセンブリ組成物と同時に接触させる。いくつかの実施形態において、細胞を、６個以下の脂質核酸アセンブリ組成物と同時に接触させる。

【００４３】

いくつかの実施形態において、細胞を、２個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞を、３個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞を、４個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞を、５個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞を、６個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。

【００４４】
いくつかの実施形態において、細胞と脂質核酸アセンブリ組成物との間の接触は、逐次的である（次から次へと行われる）。いくつかの実施形態において、細胞と脂質核酸アセンブリ組成物との間の接触は、同時である（接触が同時発生的又はほぼ同時発生的である）。いくつかの実施形態において、複数の脂質核酸アセンブリ組成物は、逐次的に投与される。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、同時に投与される。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、逐次的かつ同時に投与される。例えば、いくつかの実施形態において、３つの脂質核酸組成物が提供され、２つの脂質核酸組成物が最初に同時に投与され、細胞がある期間培養され、次いで第３の脂質核酸組成物が投与される（すなわち、最初の２つの組成物の投与の後に逐次的である）。別の実施形態において、３つの脂質核酸組成物が提供され、１つの脂質核酸組成物が最初に投与され、細胞がある期間培養され、次いで２つの脂質核酸組成物が同時に（及び第１の組成物の投与の後に逐次的に）投与される。したがって、脂質核酸アセンブリ組成物の同時及び逐次投与は、ある特定の実施形態において、重複し得る。

【００４５】
いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物をインビトロ培養細胞に送達するための方法であって、ａ）細胞を、第１の核酸を含む少なくとも第１の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させ、それによって接触させた細胞を産生するステップと、ｂ）接触させた細胞をインビトロで培養し、それによって培養された接触させた細胞を産生するステップと、ｃ）培養された接触させた細胞を、第２の核酸を含む少なくとも第２の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させるステップであって、第２の核酸が第１の核酸とは異なる、接触させるステップと、ｄ）細胞をインビトロで拡大するステップと、を含み、拡大された細胞が増加した生存を示し、細胞を、少なくとも６個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる、方法が提供される。いくつかの実施形態において、拡大された細胞は、少なくとも７０％の生存率を有する。いくつかの実施形態において、少なくとも４個の脂質核酸アセンブリ組成物は、ガイドＲＮＡを含み、少なくとも１つの脂質核酸アセンブリ組成物は、第１のゲノム編集ツールを含み、それによって、細胞において複数のゲノム編集を産生する。いくつかの実施形態において、少なくとも６個の脂質核酸アセンブリ組成物は、同時に投与される。いくつかの実施形態において、第１のゲノム編集ツールは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤である。いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、Ｃａｓ９である。いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、ＡＰＯＢＥＣ３Ａデアミナーゼ（Ａ３Ａ）及びＲＮＡガイドニッカーゼを含む。いくつかの実施形態において、本方法は、細胞を、第２のゲノム編集ツールを含む脂質核酸組成物と接触させることを含む。いくつかの実施形態において、第２のゲノム編集ツールは、ＵＧＩである。いくつかの実施形態において、第２のゲノム編集ツールは、ドナー核酸である。いくつかの実施形態において、本方法は、細胞を、第３のゲノム編集ツールを含む脂質核酸組成物と接触させることを含む。いくつかの実施形態において、第３のゲノム編集ツールは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤である。いくつかの実施形態において、第３のゲノム編集ツールは、ＵＧＩである。いくつかの実施形態において、第３のゲノム編集ツールは、ドナー核酸である。いくつかの実施形態において、ゲノム編集ツール（例えば、第１のゲノム編集ツール、第２のゲノム編集ツール、第３のゲノム編集ツール）は、ｍＲＮＡである。いくつかの実施形態において、細胞は、Ｔ細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は、非活性化された細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は、活性化された細胞である。いくつかの実施形態において、（ａ）の細胞は、少なくとも１つの脂質核酸アセンブリ組成物との接触後に活性化される。

【００４６】
いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）組成物をインビトロ培養細胞の集団に送達するための方法であって、ａ）細胞の集団を、第１の核酸を含む少なくとも第１のＬＮＰ組成物とインビトロで接触させ、それによって接触させた細胞の集団を産生するステップと、ｂ）接触させた細胞の集団をインビトロで培養し、それによって培養され

た接触させた細胞の集団を産生するステップと、ｃ）細胞の集団又は培養された接触させた細胞の集団を、第２の核酸を含む少なくとも第２のＬＮＰ組成物とインビトロで接触させるステップであって、第２の核酸が第１の核酸とは異なる、接触させるステップと、ｄ）細胞の集団をインビトロで拡大するステップと、を含み、拡大された細胞の集団が、少なくとも７０％の生存率を示す、方法が提供される。いくつかの実施形態において、拡大された細胞の集団は、２４時間の拡大時に少なくとも７０％の生存率を有する。いくつかの実施形態において、拡大された細胞の集団は、２４時間の拡大時に少なくとも８０％の生存率を有する。いくつかの実施形態において、拡大された細胞の集団は、２４時間の拡大時に少なくとも９０％の生存率を有する。いくつかの実施形態において、拡大された細胞の集団は、２４時間の拡大時に少なくとも９５％の生存率を有する。いくつかの実施形態において、細胞の集団及び培養された接触させた細胞の集団を、合計２～１２個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団及び培養された接触させた細胞の集団を、合計２～８個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団及び培養された接触させた細胞の集団を、合計２～６個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団及び培養された接触させた細胞の集団を、合計３～８個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団及び培養された接触させた細胞の集団を、合計３～６個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団及び培養された接触させた細胞の集団を、合計４～６個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団及び培養された接触させた細胞の集団を、合計６～１２個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団及び培養された接触させた細胞の集団を、合計３個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団及び培養された接触させた細胞の集団を、合計４個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団及び培養された接触させた細胞の集団を、合計６個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団及び培養された接触させた細胞の集団を、合計３個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、ＬＮＰ組成物と同時に接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、６個以下のＬＮＰ組成物と同時に接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、２個以下のＬＮＰ組成物と同時に接触させる。

【００４７】

いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）組成物をインビトロ培養細胞の集団に送達するための方法であって、ａ）細胞の集団を、第１の核酸を含む少なくとも第１のＬＮＰ組成物とインビトロで接触させ、それによって接触させた細胞の集団を産生するステップと、ｂ）接触させた細胞の集団をインビトロで培養し、それによって培養された接触させた細胞の集団を産生するステップと、ｃ）細胞の集団又は培養された接触させた細胞の集団を、第２の核酸を含む少なくとも第２のＬＮＰ組成物とインビトロで接触させるステップであって、第２の核酸が第１の核酸とは異なる、接触させるステップと、ｄ）細胞の集団をインビトロで拡大するステップと、を含み、細胞の集団における細胞のうちの少なくとも７０％、８０％、９０％、又は９５％が、ＬＮＰ組成物との最後の接触の２４時間後に生存可能である、方法が提供される。いくつかの実施形態において、細胞の集団における細胞のうちの少なくとも７０％は、ＬＮＰ組成物との最後の接触の２４時間後に生存可能である。いくつかの実施形態において、細胞の集団における細胞のうちの少なくとも８０％は、ＬＮＰ組成物との最後の接触の２４時間後に生存可能である。いくつかの実施形態において、細胞の集団における細胞のうちの少なくとも９０％は、ＬＮＰ組成物との最後の接触の２４時間後に生存可能である。いくつかの実施形態において、細胞の集団における細胞のうちの少なくとも９５％は、ＬＮＰ組成物との最後の接触の２４時間後に生存可能である。いくつかの実施形態において、細胞の集団及び培養された接触させた細胞の集団を、合計２～１２個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団及び培養された接触させた細胞の集団を、合計２～８個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団及び培養された接触させた細

胞の集団を、合計２～６個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団及び培養された接触させた細胞の集団を、合計３～８個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団及び培養された接触させた細胞の集団を、合計３～６個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団及び培養された接触させた細胞の集団を、合計４～６個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団及び培養された接触させた細胞の集団を、合計６～１２個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団及び培養された接触させた細胞の集団を、合計３個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団及び培養された接触させた細胞の集団を、合計４個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団及び培養された接触させた細胞の集団を、合計６個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団及び培養された接触させた細胞の集団を、合計３個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、ＬＮＰ組成物と同時に接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、６個以下のＬＮＰ組成物と同時に接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、２個以下のＬＮＰ組成物と同時に接触させる。

【００４８】

いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物をインビトロ培養細胞に送達するための方法であって、ａ）細胞を、第１の核酸を含む少なくとも第１の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させ、それによって接触させた細胞を産生するステップと、ｂ）接触させた細胞をインビトロで培養し、それによって培養された接触させた細胞を産生するステップと、ｃ）培養された接触させた細胞を、第２の核酸を含む少なくとも第２の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させるステップであって、第２の核酸が第１の核酸とは異なる、接触させるステップと、ｄ）細胞をインビトロで拡大するステップと、を含み、拡大された細胞が増加した生存を示し、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＡＣを標的とするｇＲＮＡを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つは、ＴＲＢＣを標的とするｇＲＮＡを含む。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つは、ＭＨＣクラスＩの表面発現を低減又は排除する遺伝子を標的とするｇＲＮＡを含む。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つは、Ｂ２Ｍを標的とするｇＲＮＡを含む。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つは、ＨＬＡ－Ａを標的とするｇＲＮＡを含み、任意選択により、細胞は、ＨＬＡ－Ｂについてホモ接合であり、ＨＬＡ－Ｃについてホモ接合である。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つは、ＭＨＣクラスＩＩの表面発現を低減又は排除する遺伝子を標的とするｇＲＮＡを含む。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つは、ＣＩＩＴＡを標的とするｇＲＮＡを含む。

【００４９】

いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物をインビトロ培養細胞に送達するための方法であって、ａ）細胞を、第１の核酸を含む少なくとも第１の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させ、それによって接触させた細胞を産生するステップと、ｂ）接触させた細胞をインビトロで培養し、それによって培養された接触させた細胞を産生するステップと、ｃ）培養された接触させた細胞を、第２の核酸を含む少なくとも第２の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させるステップであって、第２の核酸が第１の核酸とは異なる、接触させるステップと、ｄ）細胞をインビトロで拡大するステップと、を含み、拡大された細胞が増加した生存を示し、第１及び第２の脂質核酸組成物が各々、ａ）ＴＲＡＣを標的とするｇＲＮＡ、ｂ）ＴＲＢＣを標的とするｇＲＮＡ、Ｂ２Ｍを標的とするｇＲＮＡ又はＨＬＡ－Ａを標的とするｇＲＮＡ、及びｄ）ＣＩＩＴＡを標的とするｇＲＮＡから選択されるｇＲＮＡを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、更なる脂質核酸アセンブリ組成物は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含む。いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、Ｃａｓ９である。いくつか

の実施形態において、更なる脂質核酸アセンブリ組成物は、ドナー核酸を含む。
【００５０】
いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物をインビトロ培養細胞に送達するための方法であって、ａ）細胞を、第１の核酸を含む少なくとも第１の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させ、それによって接触させた細胞を産生するステップと、ｂ）接触させた細胞をインビトロで培養し、それによって培養された接触させた細胞を産生するステップと、ｃ）培養された接触させた細胞を、第２の核酸を含む少なくとも第２の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させるステップであって、第２の核酸が第１の核酸とは異なる、接触させるステップと、ｄ）細胞をインビトロで拡大するステップと、を含み、拡大された細胞が増加した生存を示し、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＡＣを標的とするｇＲＮＡを含み、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＢＣを標的とするｇＲＮＡを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、更なる脂質核酸アセンブリ組成物は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含む。いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、Ｃａｓ９である。いくつかの実施形態において、更なる脂質核酸アセンブリ組成物は、ドナー核酸を含む。
【００５１】
いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物をインビトロ培養細胞に送達するための方法であって、ａ）細胞を、第１の核酸を含む少なくとも第１の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させ、それによって接触させた細胞を産生するステップと、ｂ）接触させた細胞をインビトロで培養し、それによって培養された接触させた細胞を産生するステップと、ｃ）培養された接触させた細胞を、第２の核酸を含む少なくとも第２の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させるステップであって、第２の核酸が第１の核酸とは異なる、接触させるステップと、ｄ）細胞をインビトロで拡大するステップと、を含み、拡大された細胞が増加した生存を示し、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＡＣを標的とするｇＲＮＡを含み、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＢＣを標的とするｇＲＮＡを含み、更なる脂質核酸アセンブリ組成物が、Ｂ２Ｍを標的とするｇＲＮＡを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、更なる脂質核酸アセンブリ組成物は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含む。いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、Ｃａｓ９である。いくつかの実施形態において、更なる脂質核酸アセンブリ組成物は、ドナー核酸を含む。
【００５２】
いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物をインビトロ培養細胞に送達するための方法であって、ａ）細胞を、第１の核酸を含む少なくとも第１の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させ、それによって接触させた細胞を産生するステップと、ｂ）接触させた細胞をインビトロで培養し、それによって培養された接触させた細胞を産生するステップと、ｃ）培養された接触させた細胞を、第２の核酸を含む少なくとも第２の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させるステップであって、第２の核酸が第１の核酸とは異なる、接触させるステップと、ｄ）細胞をインビトロで拡大するステップと、を含み、拡大された細胞が増加した生存を示し、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＡＣを標的とするｇＲＮＡを含み、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＢＣを標的とするｇＲＮＡを含み、更なる脂質核酸アセンブリ組成物が、ＨＬＡ－Ａを標的とするｇＲＮＡを含み、任意選択により、細胞が、ＨＬＡ－Ｂについてホモ接合であり、ＨＬＡ－Ｃについてホモ接合である、方法が提供される。いくつかの実施形態において、更なる脂質核酸アセンブリ組成物は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含む。いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、Ｃａｓ９である。いくつかの実施形態において、更なる脂質核酸アセンブリ組成物は、ドナー核酸を含む。
【００５３】
いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物をインビトロ培養細胞に送達するための方法であって、ａ）細胞を、第１の核酸を含む少なくとも第１の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させ、それによって接触させた細胞を産生するステップ

と、ｂ）接触させた細胞をインビトロで培養し、それによって培養された接触させた細胞を産生するステップと、ｃ）培養された接触させた細胞を、第２の核酸を含む少なくとも第２の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させるステップであって、第２の核酸が第１の核酸とは異なる、接触させるステップと、ｄ）細胞をインビトロで拡大するステップと、を含み、拡大された細胞が増加した生存を示し、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＡＣを標的とするｇＲＮＡを含み、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＢＣを標的とするｇＲＮＡを含み、更なる脂質核酸アセンブリ組成物が、Ｂ２Ｍを標的とするｇＲＮＡを含み、更なる脂質核酸アセンブリ組成物が、ＣＩＩＴＡを標的とするｇＲＮＡを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、更なる脂質核酸アセンブリ組成物は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含む。いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、Ｃａｓ９である。いくつかの実施形態において、更なる脂質核酸アセンブリ組成物は、ドナー核酸を含む。

【００５４】

いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物をインビトロ培養細胞に送達するための方法であって、ａ）細胞を、第１の核酸を含む少なくとも第１の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させ、それによって接触させた細胞を産生するステップと、ｂ）接触させた細胞をインビトロで培養し、それによって培養された接触させた細胞を産生するステップと、ｃ）培養された接触させた細胞を、第２の核酸を含む少なくとも第２の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させるステップであって、第２の核酸が第１の核酸とは異なる、接触させるステップと、ｄ）細胞をインビトロで拡大するステップと、を含み、拡大された細胞が増加した生存を示し、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＡＣを標的とするｇＲＮＡを含み、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＢＣを標的とするｇＲＮＡを含み、更なる脂質核酸アセンブリ組成物が、ＨＬＡ－Ａを標的とするｇＲＮＡを含み、任意選択により、細胞が、ＨＬＡ－Ｂについてホモ接合であり、ＨＬＡ－Ｃについてホモ接合であり、更なる脂質核酸アセンブリ組成物が、ＣＩＩＴＡを標的とするｇＲＮＡを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、更なる脂質核酸アセンブリ組成物は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含む。いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、Ｃａｓ９である。いくつかの実施形態において、更なる脂質核酸アセンブリ組成物は、ドナー核酸を含む。

【００５５】

いくつかの実施形態において、ドナー核酸は、標的化受容体をコードする。「標的化受容体」は、細胞、例えば、Ｔ細胞の表面上に存在し、細胞の標的部位、例えば、生物における特定の細胞又は組織への結合を可能にするポリペプチドである。いくつかの実施形態において、標的化受容体は、ＣＡＲである。いくつかの実施形態において、標的化受容体は、ユニバーサルＣＡＲ（ＵｎｉＣＡＲ）である。いくつかの実施形態において、標的化受容体は、ＴＣＲである。いくつかの実施形態において、標的化受容体は、Ｔ細胞受容体融合構築物（ＴＲｕＣ）である。いくつかの実施形態において、標的化受容体は、Ｂ細胞受容体（ＢＣＲ）である（例えば、Ｂ細胞上で発現される）。いくつかの実施形態において、標的化受容体は、ケモカイン受容体である。いくつかの実施形態において、標的化受容体は、サイトカイン受容体である。

【００５６】

β２Ｍ又はＢ２Ｍは、本明細書において、β－２マイクログロブリンの核酸配列又はタンパク質配列に関して互換的に使用され、ヒト遺伝子は、受託番号ＮＣ＿０００００１５（範囲４４７１１４９２．．４４７１８８７７）、参照ＧＲＣｈ３８．ｐ１３を有する。Ｂ２Ｍタンパク質は、有核細胞の表面上にヘテロ二量体としてＭＨＣクラスＩ分子と会合しており、ＭＨＣクラスＩタンパク質の発現に必要とされる。

【００５７】

ＣＩＩＴＡ又はＣＩＩＴＡ又はＣ２ＴＡは、本明細書において、クラスＩＩ主要組織適合性複合体トランスアクチベーターの核酸配列又はタンパク質配列に関して互換的に使用され、ヒト遺伝子は、受託番号ＮＣ＿０００００１６．１０（範囲１０８６６２０８．．１

０９４１５６２）、参照ＧＲＣｈ３８．ｐ１３を有する。核内のＣＩＩＴＡタンパク質は、ＭＨＣクラスＩＩ遺伝子転写の正の調節因子として機能し、ＭＨＣクラスＩＩタンパク質発現に必要とされる。

【００５８】

ＭＨＣ、又はＭＨＣ分子、又はＭＨＣタンパク質、又はＭＨＣ複合体は、主要組織適合性複合体分子（又は複数）を指し、例えば、ＭＨＣクラスＩ及びＭＨＣクラスＩＩ分子を含む。ヒトにおいて、ＭＨＣ分子は、ヒト白血球抗原複合体又はＨＬＡ分子又はＨＬＡタンパク質と称される。ＭＨＣ及びＨＬＡという用語の使用は、限定することを意味するものではなく、本明細書で使用される場合、ＭＨＣという用語は、ヒトＭＨＣ分子、すなわち、ＨＬＡ分子を指すために使用され得る。したがって、ＭＨＣ及びＨＬＡという用語は、本明細書において互換的に使用される。

【００５９】

ＨＬＡ－Ａタンパク質の文脈において本明細書で使用されるＨＬＡ－Ａは、重鎖（ＨＬＡ－Ａ遺伝子によってコードされる）及び軽鎖（すなわち、ベーター２マイクログロブリン）からなるヘテロ二量体であるＭＨＣクラスＩタンパク質分子を指す。核酸の文脈において本明細書で使用されるＨＬＡ－Ａ又はＨＬＡ－Ａ遺伝子という用語は、ＨＬＡ－Ａタンパク質分子の重鎖をコードする遺伝子を指す。ＨＬＡ－Ａ遺伝子は、ＨＬＡクラスＩ組織適合性、Ａアルファ鎖とも称され、ヒト遺伝子は、受託番号ＮＣ＿０００００６．１２（２９９４２５３２．．２９９４５８７０）を有する。ＨＬＡ－Ａ遺伝子は、集団全体にわたって数百の異なるバージョン（対立遺伝子とも称される）を有することが既知である（個体は、ＨＬＡ－Ａ遺伝子の２つの異なる対立遺伝子を受容してもよい）。ＨＬＡ－Ａの全ての対立遺伝子は、用語ＨＬＡ－Ａ及びＨＬＡ－Ａ遺伝子によって包含される。

【００６０】

核酸の文脈において本明細書で使用されるＨＬＡ－Ｂは、ＨＬＡ－Ｂタンパク質分子の重鎖をコードする遺伝子を指す。ＨＬＡ－Ｂは、ＨＬＡクラスＩ組織適合性、Ｂアルファ鎖とも称され、ヒト遺伝子は、受託番号ＮＣ＿０００００６．１２（３１３５３８７５．．３１３５７１７９）を有する。

【００６１】

核酸の文脈において本明細書で使用されるＨＬＡ－Ｃは、ＨＬＡ－Ｃタンパク質分子の重鎖をコードする遺伝子を指す。ＨＬＡ－Ｃは、ＨＬＡクラスＩ組織適合性、Ｃアルファ鎖とも称され、ヒト遺伝子は、受託番号ＮＣ＿０００００６．１２（３１２６８７４９．．３１２７２０９２）を有する。

【００６２】

ホモ接合という用語は、特定の遺伝子の２つの同一の対立遺伝子を有することを指す。

【００６３】

本明細書において記載される任意の細胞型は、送達方法において使用され得る。幹細胞、前駆細胞、及び初代細胞などのＡＣＴ療法に有用な細胞が含まれる。

【００６４】

いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、細胞に接触する前に血清因子を用いて前処理される。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、細胞に接触する前にヒト血清を用いて前処理される。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、細胞に接触する前にＡｐｏＥを用いて前処理される。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、細胞に接触する前に組換えＡｐｏＥ３又はＡｐｏＥ４を用いて前処理される。いくつかの実施形態において、細胞は、脂質核酸アセンブリ組成物と接触する前に、血清飢餓される。

【００６５】

いくつかの実施形態において、多重方法は、血清因子及び脂質核酸アセンブリ組成物を約３０秒間から一晩事前インキュベートすることを含む。いくつかの実施形態において、事前インキュベートステップは、血清因子及び脂質核酸アセンブリ組成物を、約１分間～１時間事前インキュベートすることを含む。いくつかの実施形態において、それは、約１

～３０分間事前インキュベートすることを含む。他の実施形態において、それは、約１～１０分間事前インキュベートすることを含む。なお更なる実施形態は、約５分間事前インキュベートすることを含む。

【００６６】

いくつかの実施形態において、事前インキュベートステップは、約４℃で生じる。いくつかの実施形態において、事前インキュベートステップは、約２５℃で生じる。ある特定の実施形態において、事前インキュベートステップは、約３７℃で生じる。事前インキュベートステップは、重炭酸ナトリウム又はＨＥＰＥＳなどの緩衝液を含み得る。

【００６７】

Ｂ．多重ゲノム編集

いくつかの実施形態において、細胞において複数のゲノム編集をインビトロで産生する方法が提供される（本明細書及び他の箇所では、「多重化」又は「多重遺伝子編集」又は「多重ゲノム編集」と称されることがある）。いくつかの実施形態において、本方法は、細胞をインビトロで培養することと、細胞を２つ以上の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させることであって、各脂質核酸アセンブリ組成物が、標的部位を編集することができる核酸ゲノム編集ツールを含む、接触させることと、細胞をインビトロで拡大することと、を含む。本方法は、１つより多いゲノム編集を有する細胞をもたらし、ゲノム編集は異なる。いくつかの実施形態において、本方法は、単一ゲノム編集を有する細胞をもたらす。

【００６８】

「ゲノム編集」及び「遺伝子編集」という用語は、本明細書において互換的に使用される。「ゲノム編集ツール」及び「遺伝子編集ツール」という用語もまた、本明細書において互換的に使用される。「核酸ゲノム編集ツール」及び「ゲノム編集ツール」という用語もまた、本明細書において互換的に使用され得る。

【００６９】

いくつかの実施形態において、インビトロ培養細胞において複数のゲノム編集を産生するための方法であって、ａ）細胞を、少なくとも第１の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）組成物及び第２のＬＮＰ組成物とインビトロで接触させるステップであって、第１のＬＮＰ組成物が、第１の標的配列に指向された第１のガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）及び任意選択により核酸ゲノム編集ツールを含み、第２のＬＮＰ組成物が、第１の標的配列とは異なる第２の標的配列に指向された第２のｇＲＮＡ及び任意選択により核酸ゲノム編集ツールを含む、接触させるステップと、ｂ）細胞をインビトロで拡大するステップと、を含み、それによって細胞において複数のゲノム編集を産生する、方法が提供される。いくつかの実施形態において、細胞を、ゲノム編集ツールを含む少なくとも１つのＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、ゲノム編集ツールは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードする核酸を含む。いくつかの実施形態において、細胞を、標的配列における挿入のためにドナー核酸と更に接触させる。いくつかの実施形態において、ＬＮＰ組成物は、逐次的に投与される。いくつかの実施形態において、ＬＮＰ組成物は、同時に投与される。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、２～１２個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、２～８個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、２～６個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、３～８個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、３～６個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、４～６個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、６～１２個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、３個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、４個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、６個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、３個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、ＬＮＰ組成物と同時に接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、６個以下のＬＮＰ組成物と同時に接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、

２個以下のＬＮＰ組成物と同時に接触させる。

【００７０】

いくつかの実施形態において、インビトロ培養細胞において複数のゲノム編集を産生するための方法であって、細胞を、少なくとも第１の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）組成物及び第２のＬＮＰ組成物とインビトロで接触させるステップであって、第１の脂質ＬＮＰ組成物が、第１の標的配列に指向された第１のガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）及び任意選択により核酸ゲノム編集ツールを含み、第２のＬＮＰ組成物が、第１の標的配列とは異なる第２の標的配列に指向された第２のｇＲＮＡ及び任意選択により核酸ゲノム編集ツールを含む、接触させるステップと、ｂ）細胞をエクスビボで培養するステップと、を含み、それによって細胞において複数のゲノム編集を産生する、方法が提供される。いくつかの実施形態において、細胞を、ゲノム編集ツールを含む少なくとも１つのＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、ゲノム編集ツールは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードする核酸を含む。いくつかの実施形態において、細胞を、標的配列における挿入のためにドナー核酸と更に接触させる。いくつかの実施形態において、ＬＮＰ組成物は、逐次的に投与される。いくつかの実施形態において、ＬＮＰ組成物は、同時に投与される。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、２～１２個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、２～８個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、２～６個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、３～８個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、３～６個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、４～６個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、６～１２個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、３個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、４個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、６個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、３個のＬＮＰ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、ＬＮＰ組成物と同時に接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、６個以下のＬＮＰ組成物と同時に接触させる。いくつかの実施形態において、細胞の集団を、２個以下のＬＮＰ組成物と同時に接触させる。

【００７１】

いくつかの実施形態において、細胞の集団における遺伝子編集のための方法であって、ａ）細胞の集団を、第１のゲノム編集ツールを含む第１の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）組成物、及び第２のゲノム編集ツールを含む第２のＬＮＰ組成物とインビトロで接触させるステップと、ｂ）細胞の集団をインビトロで培養するステップと、を含み、細胞の集団における細胞のうちの少なくとも７０％、８０％、９０％、又は９５％が、ＬＮＰ組成物との最後の接触の２４時間後に生存可能であり、それによって細胞の集団を編集する、方法が提供される。いくつかの実施形態において、細胞の集団における細胞のうちの少なくとも７０％は、ＬＮＰ組成物との最後の接触の２４時間後に生存可能である。いくつかの実施形態において、細胞の集団における細胞のうちの少なくとも８０％は、ＬＮＰ組成物との最後の接触の２４時間後に生存可能である。いくつかの実施形態において、細胞の集団における細胞のうちの少なくとも９０％は、ＬＮＰ組成物との最後の接触の２４時間後に生存可能である。いくつかの実施形態において、細胞の集団における細胞のうちの少なくとも９５％は、ＬＮＰ組成物との最後の接触の２４時間後に生存可能である。いくつかの実施形態において、第１のゲノム編集ツールは、ガイドＲＮＡを含む。いくつかの実施形態において、細胞を、ゲノム編集ツールを含む第３のＬＮＰ組成物とインビトロで接触させることを更に含む方法であって、少なくとも２つのＬＮＰ組成物が、ｇＲＮＡを含む、方法。いくつかの実施形態において、少なくとも１つのＬＮＰ組成物は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含む。いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、Ｃａｓ９である。いくつかの実施形態において、本方法は、細胞を、標的配列における挿入のためにドナー核酸と接触させることを更に含む。いくつかの実施形態において、第２のゲノム編

集ツールは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤である。いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、Ｓ．Ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９である。

【００７２】

いくつかの実施形態において、細胞における遺伝子編集のための方法であって、ａ）細胞を、少なくとも６個の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させるステップであって、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの少なくとも２～４個が、各々、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含み、少なくとも１つの脂質核酸アセンブリ組成物が、第１のゲノム編集ツールを含む、接触させるステップと、ｂ）細胞をインビトロで拡大するステップと、を含み、それによって細胞を編集する、方法が提供される。いくつかの実施形態において、第１のゲノム編集ツールは、ガイドＲＮＡを含む。いくつかの実施形態において、本方法は、細胞を、ゲノム編集ツールを含む第３の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させることを更に含み、少なくとも２つの脂質核酸アセンブリ組成物は、ｇＲＮＡを含む。いくつかの実施形態において、少なくとも１つの脂質核酸アセンブリ組成物は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含む。いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、Ｃａｓ９である。いくつかの実施形態において、本方法は、細胞をドナー核酸と接触させることを更に含む。いくつかの実施形態において、第２のゲノム編集ツールは、Ｃａｓ９である。いくつかの実施形態において、細胞は、Ｔ細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は、非活性化された細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は、活性化された細胞である。いくつかの実施形態において、（ａ）の細胞は、少なくとも１つの脂質核酸アセンブリ組成物との接触後に活性化される。

【００７３】

いくつかの実施形態において、細胞を、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、又は１１個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、これは、例えば、異なるｇＲＮＡに基づいて、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２個、又はそれ以上のゲノム編集を有する細胞をもたらす。

【００７４】

いくつかの実施形態において、細胞を、単一の脂質核酸アセンブリ組成物において１つ以上のゲノム編集ツールを有する１つ以上の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、単一の脂質核酸アセンブリ組成物は、複数のガイドＲＮＡを含む。いくつかの実施形態において、単一の脂質核酸アセンブリ組成物は、２～８、２～６、２～５、２～４、３～５、又は３～６個のガイドＲＮＡを含む。いくつかの実施形態において、単一の脂質核酸アセンブリ組成物は、３～５個又は３～６個のガイドＲＮＡを含む。ある特定の実施形態において、１つより多いガイドＲＮＡを含む脂質核酸アセンブリ組成物は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を更に含む。ある特定の実施形態において、１つより多いガイドＲＮＡを含む脂質核酸アセンブリ組成物は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含まない。

【００７５】

いくつかの実施形態において、細胞と脂質核酸アセンブリ組成物との間の接触は、逐次的である（次から次へと行われる）。いくつかの実施形態において、細胞と脂質核酸アセンブリ組成物との間の接触は、同時である（接触が同時発生的又はほぼ同時発生的である）。いくつかの実施形態において、複数の脂質核酸アセンブリ組成物は、逐次的に投与される。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、同時に投与される。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、逐次的かつ同時に投与される。いくつかの実施形態において、３つの脂質核酸組成物が提供され、２つの脂質核酸組成物が最初に同時に投与され、細胞がある期間培養され、次いで第３の脂質核酸組成物が投与される（すなわち、最初の２つの組成物の投与の後に逐次的である）。別の実施形態において、３つの脂質核酸組成物が提供され、１つの脂質核酸組成物が最初に投与され、細胞がある期間培養され、次いで２つの脂質核酸組成物が同時に（及び第１の組成物の投与の後に逐次的に）投与される。したがって、脂質核酸アセンブリ組成物の同時及び逐次投与は、ある特定の実施形態において、重複し得る。いくつかの実施形態において、第１

及び第２の脂質核酸アセンブリ組成物は各々、標的配列に指向されたｇＲＮＡを含み、任意選択により、各々はＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤も含む。いくつかの実施形態において、第１及び第２の脂質核酸アセンブリ組成物は各々、標的配列に指向されたｇＲＮＡを含み、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を更に含み得る。言い換えれば、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、いくつかの実施形態において、ｇＲＮＡ含有脂質核酸アセンブリ組成物以外の手段によって細胞に提供され得る。いくつかの実施形態において、ｇＲＮＡ及びＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、脂質核酸アセンブリ組成物中に共カプセル化され得る。いくつかの実施形態において、ｇＲＮＡ及びＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、別々の脂質核酸アセンブリ組成物において細胞に提供され得る。いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含む脂質核酸アセンブリは、同じ脂質核酸アセンブリ、又は異なる脂質核酸アセンブリのいずれかにおいて、ガイドＲＮＡと同時に最初に投与され、続いて、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の更なる投与を伴わずに、ガイドＲＮＡの逐次投与が行われる。いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含む脂質核酸アセンブリは、同じ脂質核酸アセンブリ、又は異なる脂質核酸アセンブリのいずれかにおいて、ガイドＲＮＡと同時に最初に投与され、続いて、追加のＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤とともにガイドＲＮＡの逐次投与が行われ、任意選択により、第２のＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、第１のＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤とは異なる。

【００７６】

いくつかの実施形態において、細胞は、逐次的な接触又は編集ステップの間に凍結される。

【００７７】

いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、細胞に接触する前に血清因子を用いて前処理される。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、細胞に接触する前にヒト血清を用いて前処理される。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、血清代替物、例えば、市販の血清代替物を用いて前処理され、好ましくは、血清代替物は、エクスビボでの使用に適切である。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、細胞に接触する前にＡｐｏＥを用いて前処理される。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、細胞に接触する前に組換えＡｐｏＥ３又はＡｐｏＥ４を用いて前処理される。いくつかの実施形態において、細胞は、脂質核酸アセンブリ組成物と接触する前に、血清飢餓される。

【００７８】

いくつかの実施形態において、多重方法は、血清因子及び脂質核酸アセンブリ組成物を約３０秒間から一晩事前インキュベートすることを含む。いくつかの実施形態において、事前インキュベートステップは、血清因子及び脂質核酸アセンブリ組成物を、約１分間～１時間事前インキュベートすることを含む。いくつかの実施形態において、それは、約１～３０分間事前インキュベートすることを含む。他の実施形態において、それは、約１～１０分間事前インキュベートすることを含む。なお更なる実施形態は、約５分間事前インキュベートすることを含む。

【００７９】

いくつかの実施形態において、事前インキュベートステップは、約４℃で生じる。いくつかの実施形態において、事前インキュベートステップは、約２５℃で生じる。いくつかの実施形態において、事前インキュベートステップは、約３７℃で生じる。事前インキュベートステップは、重炭酸ナトリウム又はＨＥＰＥＳなどの緩衝液を含み得る。

【００８０】

いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、「非活性化された」細胞に提供される。「非活性化された」細胞は、インビトロで刺激されていない細胞を指す。いくつかの実施形態において、「非活性化された」Ｔ細胞は、体内にいる間、インビボで（例えば、抗原によって）刺激されている可能性があるが、当該細胞が培養においてインビトロで刺激されていない場合、当該細胞は本明細書では非活性化されたと称され得る。「活性化された」細胞は、本明細書に開示される方法においても有用であり、インビトロ

で刺激されている細胞を指すことができる。細胞をインビトロで活性化するための薬剤は、本明細書で提供され、特にＴ細胞又はＢ細胞の活性化について当該技術分野において既知である。

【００８１】

いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は、脂質核酸アセンブリ組成物と接触する前に、培養培地中で培養される。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は、１つ以上の増殖性サイトカイン、例えば、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１のうちの１つ以上若しくは全て、並びに／又はＣＤ３及び／若しくはＣＤ２８を介して活性化を提供する１つ以上の薬剤により培養される。

【００８２】

いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は、脂質核酸アセンブリ組成物と接触する前に活性化され、脂質核酸アセンブリ組成物と接触する間に活性化され、及び／又は脂質核酸アセンブリ組成物と接触した後に活性化される。

【００８３】

いくつかの実施形態において、細胞は、Ｔ細胞であり、本方法は、第１の接触ステップと第２の接触ステップとの間の活性化ステップを更に含む。いくつかの実施形態において、非活性化されたＴ細胞を、１、２、又は３個の核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、活性化されたＴ細胞を、１～８個の脂質核酸アセンブリ組成物、任意選択により１～４個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞を、少なくとも６個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞を、１２個以下の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞を、２～１２個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞を、２～８個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞を、２～６個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞を、３～８個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞を、３～６個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞を、４～６個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞を、４～１２個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞を、４～８個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞を、６～１２個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞を、３、４、５、又は６個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞を、８個以下の脂質核酸アセンブリ組成物と同時に接触させる。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞を、６個以下の脂質核酸アセンブリ組成物と同時に接触させる。いくつかの実施形態において、活性化されたＴ細胞を、少なくとも６個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、活性化されたＴ細胞を、１２個以下の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、活性化されたＴ細胞を、２～１２個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、活性化されたＴ細胞を、４～１２個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、活性化されたＴ細胞を、４～８個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、活性化されたＴ細胞を、８個以下の脂質核酸アセンブリ組成物と同時に接触させる。いくつかの実施形態において、活性化されたＴ細胞を、６個以下の脂質核酸アセンブリ組成物と同時に接触させる。

【００８４】

いくつかの実施形態において、Ｔ細胞を、第１の標的配列を標的とする第１の核酸ゲノム編集ツールを含む少なくとも第１の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させ、活性化し、活性化されたＴ細胞を、第２の標的配列を標的とする第２の核酸ゲノム編集ツールを含む少なくとも第２の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。活性化されたＴ細胞を、追加の脂質核酸アセンブリ組成物と更に接触させることができる。いくつかの実施形態におい

て、Ｔ細胞を、２つの脂質核酸アセンブリ組成物と接触させ、活性化し、活性化されたものを、第３の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させ、任意選択により、活性化された細胞を、追加の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞を、３つの脂質核酸アセンブリ組成物と接触させ、活性化し、活性化されたものを、第３の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させ、任意選択により、活性化された細胞を、追加の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる。活性化ステップは、活性化ステップなしの同じ方法と比較して、複数のゲノム編集の結果を改善し得る。

【００８５】

いくつかの実施形態において、インビトロ培養Ｔ細胞において複数のゲノム編集を産生するための方法であって、ａ）Ｔ細胞を、（ｉ）第１の標的配列に指向されたガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含む第１の脂質核酸アセンブリ組成物、及び任意選択により、（ｉｉ）１つ又は２つの追加の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させるステップであって、各追加の脂質核酸アセンブリ組成物が、第１の標的配列とは異なる標的配列に指向されたｇＲＮＡ及び／又はゲノム編集ツールを含む、接触させるステップと、ｂ）Ｔ細胞をインビトロで活性化するステップと、ｃ）活性化されたＴ細胞を、（ｉ）（ａ）の標的配列とは異なる標的配列に指向された更なるガイドＲＮＡを含む更なる核酸アセンブリ組成物、及び任意選択により、（ｉｉ）１つ以上の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させるステップであって、各脂質核酸アセンブリ組成物が、（ａ）の標的配列とは異なり、かつ互いに異なる標的配列に指向されたガイドＲＮＡ及び／又はゲノム編集ツールを含む、接触させるステップと、ｄ）細胞をインビトロで拡大するステップと、を含み、それによってＴ細胞において複数のゲノム編集を産生する、方法が提供される。いくつかの実施形態において、本方法は、Ｔ細胞を、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、又は１１個の脂質核酸アセンブリ組成物、任意選択により４～１２個又は４～８個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させることを含む。いくつかの実施形態において、本方法は、細胞又はＴ細胞を、４～１２個又は４～８個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させることを含む。いくつかの実施形態において、ステップ（ａ）のＴ細胞を、２個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させ、脂質核酸アセンブリ組成物を、逐次的に又は同時に投与する。いくつかの実施形態において、ステップ（ａ）のＴ細胞を、３個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させ、脂質核酸アセンブリ組成物を、（ｉ）逐次的に、（ｉｉ）同時に、又は（ｉｉｉ）同時に（２個の組成物）かつ逐次的に（１個の組成物を前又は後に投与する）投与する。いくつかの実施形態において、ステップ（ｃ）のＴ細胞を、１～８個の脂質核酸アセンブリ組成物、任意選択により１～４個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させ、脂質核酸アセンブリ組成物を、（ｉ）逐次的に、（ｉｉ）同時に、又は（ｉｉｉ）同時に（少なくとも２個の組成物）かつ逐次的に（少なくとも１個の組成物を前又は後に投与する）投与する。

【００８６】

いくつかの実施形態において、細胞における遺伝子編集のための方法であって、ａ）細胞を、第１のゲノム編集ツールを含む第１の脂質核酸アセンブリ組成物、及び第２のゲノム編集ツールを含む第２の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させるステップと、ｂ）細胞をインビトロで拡大するステップと、を含み、それによって細胞を編集し、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＡＣを標的とするｇＲＮＡを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つは、ＴＲＢＣを標的とするｇＲＮＡを含む。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つは、ＭＨＣクラスＩの表面発現を低減又は排除する遺伝子を標的とするｇＲＮＡを含む。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つは、Ｂ２Ｍを標的とするｇＲＮＡを含む。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つは、ＨＬＡ－Ａを標的とするｇＲＮＡを含み、任意選択により、細胞は、ＨＬＡ－ＢについてホモＨＬＡ－Ｃについてホモ接合である。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つは、ＭＨＣクラスＩＩの表面発現を低減又は排除する遺伝子を標的とするｇＲＮＡを含む。いくつかの実

施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つは、ＣＩＩＴＡを標的とするｇＲＮＡを含む。

【００８７】

いくつかの実施形態において、細胞における遺伝子編集のための方法であって、ａ）細胞を、第１のゲノム編集ツールを含む第１の脂質核酸アセンブリ組成物、及び第２のゲノム編集ツールを含む第２の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させるステップと、ｂ）細胞をインビトロで拡大するステップと、を含み、それによって細胞を編集し、第１及び第２の脂質核酸組成物が、各々、ａ）ＴＲＡＣを標的とするｇＲＮＡ、ｂ）ＴＲＢＣを標的とするｇＲＮＡ、ｃ）Ｂ２Ｍを標的とするｇＲＮＡ又はＨＬＡ－Ａを標的とするｇＲＮＡ、及びｄ）ＣＩＩＴＡを標的とするｇＲＮＡから選択されるｇＲＮＡを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、更なる脂質核酸アセンブリ組成物は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含む。いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、Ｃａｓ９である。いくつかの実施形態において、更なる脂質核酸アセンブリ組成物は、ドナー核酸を含む。

【００８８】

いくつかの実施形態において、細胞における遺伝子編集のための方法であって、ａ）細胞を、第１のゲノム編集ツールを含む第１の脂質核酸アセンブリ組成物、及び第２のゲノム編集ツールを含む第２の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させるステップと、ｂ）細胞をインビトロで拡大するステップと、を含み、それによって細胞を編集し、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＡＣを標的とするｇＲＮＡを含み、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＢＣを標的とするｇＲＮＡを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、更なる脂質核酸アセンブリ組成物は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含む。いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、Ｃａｓ９である。いくつかの実施形態において、更なる脂質核酸アセンブリ組成物は、ドナー核酸を含む。

【００８９】

いくつかの実施形態において、細胞における遺伝子編集のための方法であって、ａ）細胞を、第１のゲノム編集ツールを含む第１の脂質核酸アセンブリ組成物、及び第２のゲノム編集ツールを含む第２の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させるステップと、ｂ）細胞をインビトロで拡大するステップと、を含み、それによって細胞を編集し、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＡＣを標的とするｇＲＮＡを含み、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＢＣを標的とするｇＲＮＡを含み、更なる脂質核酸アセンブリ組成物が、Ｂ２Ｍを標的とするｇＲＮＡを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、更なる脂質核酸アセンブリ組成物は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含む。いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、Ｃａｓ９である。いくつかの実施形態において、更なる脂質核酸アセンブリ組成物は、ドナー核酸を含む。

【００９０】

いくつかの実施形態において、細胞における遺伝子編集のための方法であって、ａ）細胞を、第１のゲノム編集ツールを含む第１の脂質核酸アセンブリ組成物、及び第２のゲノム編集ツールを含む第２の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させるステップと、ｂ）細胞をインビトロで拡大するステップと、を含み、それによって細胞を編集し、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＡＣを標的とするｇＲＮＡを含み、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＢＣを標的とするｇＲＮＡを含み、更なる脂質核酸アセンブリ組成物が、ＨＬＡ－Ａを標的とするｇＲＮＡを含み、任意選択により、細胞が、ＨＬＡ－ＢについてホモＥＤＩＴ接合であり、ＨＬＡ－ＣについてホモＥＤＩＴ接合である、方法が提供される。いくつかの実施形態において、更なる脂質核酸アセンブリ組成物は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含む。いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、Ｃａｓ９である。いくつかの実施形態において、更なる脂質核酸アセンブリ組成物は、ドナー核酸を含む。

【００９１】
いくつかの実施形態において、細胞における遺伝子編集のための方法であって、ａ）細胞を、第１のゲノム編集ツールを含む第１の脂質核酸アセンブリ組成物、及び第２のゲノム編集ツールを含む第２の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させるステップと、ｂ）細胞をインビトロで拡大するステップと、を含み、それによって細胞を編集し、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＡＣを標的とするｇＲＮＡを含み、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＢＣを標的とするｇＲＮＡを含み、更なる脂質核酸アセンブリ組成物が、Ｂ２Ｍを標的とするｇＲＮＡを含み、更なる脂質核酸アセンブリ組成物が、ＣＩＩＴＡを標的とするｇＲＮＡを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、更なる脂質核酸アセンブリ組成物は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含む。いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、Ｃａｓ９である。いくつかの実施形態において、更なる脂質核酸アセンブリ組成物は、ドナー核酸を含む。
【００９２】
いくつかの実施形態において、細胞における遺伝子編集のための方法であって、ａ）細胞を、第１のゲノム編集ツールを含む第１の脂質核酸アセンブリ組成物、及び第２のゲノム編集ツールを含む第２の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させるステップと、ｂ）細胞をインビトロで拡大するステップと、を含み、それによって細胞を編集し、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＡＣを標的とするｇＲＮＡを含み、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＢＣを標的とするｇＲＮＡを含み、更なる脂質核酸アセンブリ組成物が、ＨＬＡ－Ａを標的とするｇＲＮＡを含み、任意選択により、細胞が、ＨＬＡ－Ｂについてホモ接合であり、ＨＬＡ－Ｃについてホモ接合であり、更なる脂質核酸アセンブリ組成物が、ＣＩＩＴＡを標的とするｇＲＮＡを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、更なる脂質核酸アセンブリ組成物は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含む。いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、Ｃａｓ９である。いくつかの実施形態において、更なる脂質核酸アセンブリ組成物は、ドナー核酸を含む。
【００９３】
いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は、ポリクローナル活性化（又は「ポリクローナル刺激」）によって活性化される（抗原特異的刺激ではない）。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は、ＣＤ３刺激（例えば、抗ＣＤ３抗体を提供する）によって活性化される。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は、ＣＤ３及びＣＤ２８刺激（例えば、抗ＣＤ３抗体及び抗ＣＤ２８抗体を提供する）によって活性化される。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は、（例えば、ＣＤ３／ＣＤ２８刺激を介して）Ｔ細胞を活性化するために、すぐに使用可能な試薬を使用して活性化される。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は、ビーズによって提供されるＣＤ３／ＣＤ２８刺激を介して活性化される。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は、ＣＤ３／ＣＤ２８刺激を介して活性化され、１つ以上の構成要素は、可溶性であり、及び／又は１つ以上の構成要素は、固体表面（例えば、プレート又はビーズ）に結合される。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は、抗原非依存性マイトジェン（例えば、例えばコンカナバリンＡ（「ＣｏｎＡ」）、又はＰＨＡを含むレクチン）によって活性化される。
【００９４】
いくつかの実施形態において、１つ以上のサイトカインは、Ｔ細胞の活性化のために使用される。ＩＬ－２は、Ｔ細胞活性化のために提供される。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞の活性化のためのサイトカインは、共通のガンマ鎖（γｃ）受容体に結合するサイトカインである。いくつかの実施形態において、ＩＬ－２は、Ｔ細胞活性化のために提供される。いくつかの実施形態において、ＩＬ－７は、Ｔ細胞活性化のために提供される。いくつかの実施形態において、ＩＬ－７は、Ｔ細胞生存を促進するために提供される。いくつかの実施形態において、ＩＬ－１５は、Ｔ細胞活性化のために提供される。いくつかの実施形態において、ＩＬ－２１は、Ｔ細胞活性化のために提供される。いくつかの実施形態において、例えば、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／又はＩＬ－２１を含

む、Ｔ細胞活性化のためのサイトカインの組み合わせが提供される。

【００９５】

いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は、細胞を抗原に曝露することによって活性化される（抗原刺激）。Ｔ細胞は、抗原が、主要組織適合性複合体（「ＭＨＣ」）分子においてペプチドとして提示されるとき（ペプチド－ＭＨＣ複合体）、抗原によって活性化される。同族抗原は、Ｔ細胞を抗原提示細胞（フィーダ細胞）及び抗原と共培養することによってＴ細胞に提示され得る。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は、抗原によりパルス化されている抗原提示細胞との共培養によって活性化される。いくつかの実施形態において、抗原提示細胞は、抗原のペプチドによりパルス化されている。

【００９６】

いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は、１２～７２時間活性化され得る。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は、１２～４８時間活性化され得る。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は、１２～２４時間活性化され得る。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は、２４～４８時間活性化され得る。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は、２４～７２時間活性化され得る。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は、１２時間活性化され得る。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は、４８時間活性化され得る。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は、７２時間活性化され得る。

【００９７】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法は、選択ステップを含まない。いくつかの実施形態において、選択ステップが含まれ、任意選択により、選択ステップは、物理的選別ステップ（例えば、ＦＡＣＳ又はＭＡＣＳ）、又は生化学的選択ステップ（例えば、自殺遺伝子、薬物耐性選択、又は抗体－毒素コンジュゲート選択）である。

【００９８】

本明細書に開示される脂質核酸アセンブリ組成物は、インビトロでの多重ゲノム編集方法において使用され得る。本方法は、トランスフェクションプロセス自体に関連する毒性を低減させることによって、そのような方法に伴う既存の問題を克服する。各トランスフェクション事象の低減された毒性は、複数のトランザクションを可能にし、それによって細胞当たり複数のゲノム編集を可能にする。

【００９９】

いくつかの実施形態において、ゲノム編集は、標的配列における少なくとも１つのヌクレオチドの挿入、欠失、又は置換のうちのいずれか１つ以上を含む。いくつかの実施形態において、ゲノム編集は、標的配列における１、２、３、４、若しくは５個、又はそれ以上のヌクレオチドの挿入を含む。いくつかの実施形態において、ゲノム編集は、標的配列における１、２、３、４、若しくは５個、又はそれ以上のヌクレオチドの欠失を含む。他の実施形態において、ゲノム編集は、標的配列における１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、若しくは２５個、又はそれ以上のヌクレオチドの挿入を含む。他の実施形態において、ゲノム編集は、標的配列における１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、若しくは２５個、又はそれ以上のヌクレオチドの欠失を含む。いくつかの実施形態において、ゲノム編集は、１０００塩基対未満（ｂｐ）の挿入又は欠失として一般に当該技術分野において定義されるインデルを含む。いくつかの実施形態において、ゲノム編集は、標的配列におけるフレームシフト変異をもたらすインデルを含む。いくつかの実施形態において、ゲノム編集は、標的配列における１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、若しくは２５個、又はそれ以上のヌクレオチドの置換を含む。いくつかの実施形態において、ゲノム編集は、テンプレート核酸の組み込みから生じるヌクレオチドの挿入、欠失、又は置換のうちの１つ以上を含む。いくつかの実施形態において、ゲノム編集は、標的配列におけるドナー核酸の挿入を含む。いくつかの実施形態において、編集又は修飾は、一過性ではない。

【０１００】

いくつかの実施形態において、１つ以上のドナー核酸は、標的配列における挿入のために提供される。いくつかの実施形態において、挿入のための標的配列は、セーフハーバー

遺伝子座である。セーフハーバー遺伝子座は、宿主ゲノムに有害な変化を引き起こすことなく、外因性配列の組み込みに適合することができるゲノム内の部位であり、当該技術分野において既知である。いくつかの実施形態において、挿入のための標的配列は、β－２マイクログロブリン（Ｂ２Ｍ）遺伝子における。いくつかの実施形態において、挿入のための標的配列は、クラスＩＩ主要組織適合性複合体トランスアクチベーター（ＣＩＩＴＡ）遺伝子における。いくつかの実施形態において、挿入のための標的配列は、ＴＲＡＣ遺伝子における。いくつかの実施形態において、挿入のための標的配列は、ＡＡＶＳ１における。

【０１０１】

ＩＩＩ．細胞集団及び方法／使用

Ａ．細胞集団

いくつかの実施形態において、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集細胞を含む細胞集団を含む、組成物が本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集細胞を含む細胞集団が提供され、細胞集団における細胞のうちの少なくとも５０％が、少なくとも２つのゲノム編集を含み、（ｉ）細胞集団における細胞のうちの１％未満、０．５％未満、０．２％未満、若しくは０．１％未満が、標的対標的転座を有するか、又は（ｉｉ）細胞集団が、相互転座、複合転座、若しくはオフターゲット転座の２倍未満のバックグラウンドレベルを有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも５０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団における細胞のうちの１％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも５０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団における細胞のうちの０．５％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも５０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団における細胞のうちの０．２％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも５０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団における細胞のうちの０．１％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも５０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、相互転座、複合転座、又はオフターゲット転座の２倍未満のバックグラウンドレベルを有する。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍、３０倍、４０倍、又は５０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍、３０倍、４０倍、５０倍、６０倍、７０倍、８０倍、９０倍、又は１００倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、３０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、４０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、５０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、６０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、７０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、８０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、９０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、１００倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集のうちの少なくとも１つのゲノム編集は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含むゲノム編集ツールによって産生され、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、任意選択によりクリバーゼである。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集のうちの少なくとも２つのゲノム編集は、ＲＮＡ

ガイドＤＮＡ結合剤を含むゲノム編集ツールによって産生され、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、任意選択によりクリバーゼである。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集は、ドナー核酸の挿入を含み、挿入は、任意選択により標的化挿入である。

【０１０２】

いくつかの実施形態において、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集細胞を含む細胞集団が提供され、細胞集団における細胞のうちの少なくとも６０％が、少なくとも２つのゲノム編集を含み、（ｉ）細胞集団における細胞のうちの１％未満、０．５％未満、０．２％未満、若しくは０．１％未満が、標的対標的転座を有するか、又は（ｉｉ）細胞集団が、相互転座、複合転座、若しくはオフターゲット転座の２倍未満のバックグラウンドレベルを有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも６０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団における細胞のうちの１％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも６０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団における細胞のうちの０．５％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも６０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団における細胞のうちの０．２％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも６０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団における細胞のうちの０．１％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも６０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、相互転座、複合転座、又はオフターゲット転座の２倍未満のバックグラウンドレベルを有する。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍、３０倍、４０倍、又は５０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍、３０倍、４０倍、５０倍、６０倍、７０倍、８０倍、９０倍、又は１００倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、３０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、４０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、５０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、６０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、７０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、８０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、９０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、１００倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集のうちの少なくとも１つのゲノム編集は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含むゲノム編集ツールによって産生され、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、任意選択によりクリバーゼである。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集のうちの少なくとも２つのゲノム編集は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含むゲノム編集ツールによって産生され、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、任意選択によりクリバーゼである。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集は、ドナー核酸の挿入を含み、挿入は、任意選択により標的化挿入である。

【０１０３】

いくつかの実施形態において、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集細胞を含む細胞集団が提供され、細胞集団における細胞のうちの少なくとも７０％が、少なくとも２つのゲノム編集を含み、（ｉ）細胞集団における細胞のうちの１％未満、０．５％未満、０．２％未満、若しくは０．１％未満が、標的対標的転座を有するか、又は（ｉｉ）細胞集団

が、相互転座、複合転座、若しくはオフターゲット転座の２倍未満のバックグラウンドレベルを有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも７０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団における細胞のうちの１％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも７０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団における細胞のうちの０．５％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも７０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団における細胞のうちの０．２％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも７０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団における細胞のうちの０．１％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも７０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、相互転座、複合転座、又はオフターゲット転座の２倍未満のバックグラウンドレベルを有する。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍、３０倍、４０倍、又は５０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍、３０倍、４０倍、５０倍、６０倍、７０倍、８０倍、９０倍、又は１００倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、３０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、４０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、５０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、６０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、７０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、８０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、９０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、１００倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集のうちの少なくとも１つのゲノム編集は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含むゲノム編集ツールによって産生され、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、任意選択によりクリバーゼである。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集のうちの少なくとも２つのゲノム編集は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含むゲノム編集ツールによって産生され、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、任意選択によりクリバーゼである。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集は、ドナー核酸の挿入を含み、挿入は、任意選択により標的化挿入である。

【０１０４】

いくつかの実施形態において、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集細胞を含む細胞集団が提供され、細胞集団における細胞のうちの少なくとも８０％が、少なくとも２つのゲノム編集を含み、（ｉ）細胞集団における細胞のうちの１％未満、０．５％未満、０．２％未満、若しくは０．１％未満が、標的対標的転座を有するか、又は（ｉｉ）細胞集団が、相互転座、複合転座、若しくはオフターゲット転座の２倍未満のバックグラウンドレベルを有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも８０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団における細胞のうちの１％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも８０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団における細胞のうちの０．５％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも８０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団における細胞のうちの０．２％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形

態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも８０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団における細胞のうちの０．１％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも８０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、相互転座、複合転座、又はオフターゲット転座の２倍未満のバックグラウンドレベルを有する。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍、３０倍、４０倍、又は５０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍、３０倍、４０倍、５０倍、６０倍、７０倍、８０倍、９０倍、又は１００倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、３０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、４０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、５０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、６０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、７０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、８０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、９０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、１００倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集のうちの少なくとも１つのゲノム編集は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含むゲノム編集ツールによって産生され、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、任意選択によりクリバーゼである。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集のうちの少なくとも２つのゲノム編集は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含むゲノム編集ツールによって産生され、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、任意選択によりクリバーゼである。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集は、ドナー核酸の挿入を含み、挿入は、任意選択により標的化挿入である。

【０１０５】

いくつかの実施形態において、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集細胞を含む細胞集団が提供され、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９０％が、少なくとも２つのゲノム編集を含み、（ｉ）細胞集団における細胞のうちの１％未満、０．５％未満、０．２％未満、若しくは０．１％未満が、標的対標的転座を有するか、又は（ｉｉ）細胞集団が、相互転座、複合転座、若しくはオフターゲット転座の２倍未満のバックグラウンドレベルを有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団における細胞のうちの１％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団における細胞のうちの０．５％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団における細胞のうちの０．２％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団における細胞のうちの０．１％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、相互転座、複合転座、又はオフターゲット転座の２倍未満のバックグラウンドレベルを有する。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍、３０倍、４０倍、又は５０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍、３０倍、４０倍、５０倍、６０

倍、７０倍、８０倍、９０倍、又は１００倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、３０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、４０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、５０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、６０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、７０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、８０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、９０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、１００倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集のうちの少なくとも１つのゲノム編集は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含むゲノム編集ツールによって産生され、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、任意選択によりクリバーゼである。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集のうちの少なくとも２つのゲノム編集は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含むゲノム編集ツールによって産生され、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、任意選択によりクリバーゼである。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集は、ドナー核酸の挿入を含み、挿入は、任意選択により標的化挿入である。

【０１０６】

いくつかの実施形態において、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集細胞を含む細胞集団が提供され、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９５％が、少なくとも２つのゲノム編集を含み、（ｉ）細胞集団における細胞のうちの１％未満、０．５％未満、０．２％未満、若しくは０．１％未満が、標的対標的転座を有するか、又は（ｉｉ）細胞集団が、相互転座、複合転座、若しくはオフターゲット転座の２倍未満のバックグラウンドレベルを有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９５％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団における細胞のうちの１％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９５％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団における細胞のうちの０．５％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９５％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団における細胞のうちの０．２％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９５％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団における細胞のうちの０．１％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９５％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、相互転座、複合転座、又はオフターゲット転座の２倍未満のバックグラウンドレベルを有する。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍、３０倍、４０倍、又は５０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍、３０倍、４０倍、５０倍、６０倍、７０倍、８０倍、９０倍、又は１００倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、３０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、４０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、５０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、６０倍の拡大が可能である。

いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、７０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、８０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、９０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、１００倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集のうちの少なくとも１つのゲノム編集は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含むゲノム編集ツールによって産生され、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、任意選択によりクリバーゼである。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集のうちの少なくとも２つのゲノム編集は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含むゲノム編集ツールによって産生され、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、任意選択によりクリバーゼである。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集は、ドナー核酸の挿入を含み、挿入は、任意選択により標的化挿入である。

【０１０７】

いくつかの実施形態において、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集細胞を含む細胞集団が提供され、細胞集団における細胞のうちの少なくとも５０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、５０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍、３０倍、４０倍、又は５０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍、３０倍、４０倍、５０倍、６０倍、７０倍、８０倍、９０倍、又は１００倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも５０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも５０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、３０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも５０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、４０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも５０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、６０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも５０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、７０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも５０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、８０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも５０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、９０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも５０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、１００倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの１％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの０．５％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの０．２％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの０．１％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団は、相互転座、複合転座、又はオフターゲット転座の２倍未満のバックグラウンドレベルを有する。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集のうちの少なくとも１つのゲノム編集は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含むゲノム編集ツールによって産生され、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、任意選択によりクリ

バーゼである。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集のうちの少なくとも２つのゲノム編集は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含むゲノム編集ツールによって産生され、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、任意選択によりクリバーゼである。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集は、ドナー核酸の挿入を含み、挿入は、任意選択により標的化挿入である。

【０１０８】

いくつかの実施形態において、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集細胞を含む細胞集団が提供され、細胞集団における細胞のうちの少なくとも６０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、５０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍、３０倍、４０倍、又は５０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍、３０倍、４０倍、５０倍、６０倍、７０倍、８０倍、９０倍、又は１００倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも６０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも６０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、３０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも６０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、４０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも６０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、６０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも６０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、７０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも６０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、８０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも６０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、９０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも６０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、１００倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの１％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの０．５％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの０．２％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの０．１％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団は、相互転座、複合転座、又はオフターゲット転座の２倍未満のバックグラウンドレベルを有する。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集のうちの少なくとも１つのゲノム編集は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含むゲノム編集ツールによって産生され、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、任意選択によりクリバーゼである。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集のうちの少なくとも２つのゲノム編集は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含むゲノム編集ツールによって産生され、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、任意選択によりクリバーゼである。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集は、ドナー核酸の挿入を含み、挿入は、任意選択により標的化挿入である。

【０１０９】

いくつかの実施形態において、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集細胞を含む細胞集団が提供され、細胞集団における細胞のうちの少なくとも７０％は、少なくとも２つの

ゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、５０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍、３０倍、４０倍、又は５０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍、３０倍、４０倍、５０倍、６０倍、７０倍、８０倍、９０倍、又は１００倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも７０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも７０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、３０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも７０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、４０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも７０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、６０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも７０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、７０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも７０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、８０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも７０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、９０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも７０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、１００倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの１％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの０．５％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの０．２％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの０．１％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団は、相互転座、複合転座、又はオフターゲット転座の２倍未満のバックグラウンドレベルを有する。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集のうちの少なくとも１つのゲノム編集は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含むゲノム編集ツールによって産生され、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、任意選択によりクリバーゼである。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集のうちの少なくとも２つのゲノム編集は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含むゲノム編集ツールによって産生され、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、任意選択によりクリバーゼである。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集は、ドナー核酸の挿入を含み、挿入は、任意選択により標的化挿入である。

【０１１０】

いくつかの実施形態において、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集細胞を含む細胞集団が提供され、細胞集団における細胞のうちの少なくとも８０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、５０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍、３０倍、４０倍、又は５０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍、３０倍、４０倍、５０倍、６０倍、７０倍、８０倍、９０倍、又は１００倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも８０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍の拡大が可能である。いくつ

かの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも８０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、３０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも８０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、４０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも８０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、６０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも８０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、７０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも８０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、８０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも８０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、９０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも８０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、１００倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの１％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの０．５％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの０．２％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの０．１％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団は、相互転座、複合転座、又はオフターゲット転座の２倍未満のバックグラウンドレベルを有する。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集のうちの少なくとも１つのゲノム編集は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含むゲノム編集ツールによって産生され、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、任意選択によりクリバーゼである。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集のうちの少なくとも２つのゲノム編集は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含むゲノム編集ツールによって産生され、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、任意選択によりクリバーゼである。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集は、ドナー核酸の挿入を含み、挿入は、任意選択により標的化挿入である。

【０１１１】

いくつかの実施形態において、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集細胞を含む細胞集団が提供され、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、５０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍、３０倍、４０倍、又は５０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍、３０倍、４０倍、５０倍、６０倍、７０倍、８０倍、９０倍、又は１００倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、３０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、４０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、６０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のう

ちの少なくとも９０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、７０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、８０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、９０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９０％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、１００倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの１％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの０．５％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの０．２％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの０．１％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団は、相互転座、複合転座、又はオフターゲット転座の２倍未満のバックグラウンドレベルを有する。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集のうちの少なくとも１つのゲノム編集は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含むゲノム編集ツールによって産生され、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、任意選択によりクリバーゼである。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集のうちの少なくとも２つのゲノム編集は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含むゲノム編集ツールによって産生され、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、任意選択によりクリバーゼである。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集は、ドナー核酸の挿入を含み、挿入は、任意選択により標的化挿入である。

【０１１２】

いくつかの実施形態において、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集細胞を含む細胞集団が提供され、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９５％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、５０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍、３０倍、４０倍、又は５０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍、３０倍、４０倍、５０倍、６０倍、７０倍、８０倍、９０倍、又は１００倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９５％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、２０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９５％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、３０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９５％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、４０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９５％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、６０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９５％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、７０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９５％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、８０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９５％は、少なくとも２つのゲノム編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、９０倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９５％は、少なくとも２つのゲノム

編集を含み、細胞集団は、編集開始後１４日間以内の培養におけるエクスビボで、１００倍の拡大が可能である。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの１％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの０．５％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの０．２％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの０．１％未満は、標的対標的転座を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団は、相互転座、複合転座、又はオフターゲット転座の２倍未満のバックグラウンドレベルを有する。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集のうちの少なくとも１つのゲノム編集は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含むゲノム編集ツールによって産生され、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、任意選択によりクリバーゼである。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集のうちの少なくとも２つのゲノム編集は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含むゲノム編集ツールによって産生され、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、任意選択によりクリバーゼである。いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集は、ドナー核酸の挿入を含み、挿入は、任意選択により標的化挿入である。

【０１１３】

本明細書で使用される場合、「培養の日数」は、細胞が培養前、編集前、又は編集ステップの間に凍結されている場合、細胞が解凍され、培養に入れられた日から培養の日数の測定が開始される。すなわち、培養の日数は、不連続であり得る。

【０１１４】

本明細書で使用される場合、「編集開始後」は、細胞又は細胞の集団を第１のＬＮＰ組成物と接触させたときからの時間を指す。

【０１１５】

本明細書に記載される標的対標的転座は、標準的なｄｄＰＣＲアッセイを使用して検出され得る。

【０１１６】

いくつかの実施形態において、編集細胞を含む細胞集団の細胞は、ヒト細胞である。いくつかの実施形態において、編集細胞を含む細胞集団の細胞は、間葉系幹細胞、造血幹細胞（ＨＳＣ）、単核細胞、血管内皮前駆細胞（ＥＰＣ）、神経幹細胞（ＮＳＣ）、角膜上皮幹細胞（ＬＳＣ）、組織特異的初代細胞又はそれに由来する細胞（ＴＳＣ）、誘導多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）、眼幹細胞、多能性幹細胞（ＰＳＣ）、胚性幹細胞（ＥＳＣ）、臓器又は組織移植のための細胞、及びＡＣＴ療法に使用される細胞から選択される。

【０１１７】

いくつかの実施形態において、編集細胞を含む細胞集団の細胞は、免疫細胞である。いくつかの実施形態において、編集細胞を含む細胞集団の細胞は、リンパ球（例えば、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ナチュラルキラー細胞（「ＮＫ細胞」、及びＮＫＴ細胞、又はｉＮＫＴ細胞））、単球、マクロファージ、肥満細胞、樹状細胞、顆粒球（例えば、好中球、好酸球、及び好塩基球）、初代免疫細胞、ＣＤ３＋細胞、ＣＤ４＋細胞、ＣＤ８＋Ｔ細胞、制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、Ｂ細胞、ＮＫ細胞、及び樹状細胞（ＤＣ））から選択される免疫細胞である。いくつかの実施形態において、編集細胞を含む細胞集団の細胞は、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）、リンパ球、Ｔ細胞、任意選択によりＣＤ４＋細胞、ＣＤ８＋細胞、メモリＴ細胞、ナイーブＴ細胞、幹細胞メモリＴ細胞、又はＢ細胞、任意選択によりメモリＢ細胞、ナイーブＢ細胞、及び初代細胞から選択される免疫細胞である。いくつかの実施形態において、編集細胞を含む細胞集団の細胞は、Ｔ細胞である。いくつかの実施形態において、編集細胞を含む細胞集団の細胞は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）、アルファ－ベータＴＣＲを発現するＴ細胞、ガンマ－デルタＴＣＲを発現するＴ細胞、制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、メモリＴ細胞、及び初期幹細胞メモリＴ細胞（Ｔｓｃｍ、ＣＤ２７＋／ＣＤ４５＋）から選択されるＴ細胞である。

【０１１８】

いくつかの実施形態において、編集細胞を含む細胞集団の細胞は、編集前にヒトドナー

ＰＢＭＣ又はレウコパクから単離された免疫細胞である。いくつかの実施形態において、編集細胞を含む細胞集団の細胞は、前駆細胞に由来する免疫細胞である。

【０１１９】

いくつかの実施形態において、編集細胞を含む細胞集団の細胞は、非活性化された免疫細胞である。いくつかの実施形態において、編集細胞を含む細胞集団の細胞は、活性化された免疫細胞である。

【０１２０】

いくつかの実施形態において、複数のゲノム編集を含む編集細胞を含む細胞集団の細胞は、第３のゲノム編集を含む。

【０１２１】

いくつかの実施形態において、編集細胞を含む細胞集団の細胞は、ヒト対象に移入するためのものである。

【０１２２】

いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９５％は、内因性ＴＣＲ配列のゲノム編集を含む。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９６％は、内因性ＴＣＲ配列のゲノム編集を含む。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９７％は、内因性ＴＣＲ配列のゲノム編集を含む。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９８％は、内因性ＴＣＲ配列のゲノム編集を含む。いくつかの実施形態において、細胞集団における細胞のうちの少なくとも９９％は、内因性ＴＣＲ配列のゲノム編集を含む。

【０１２３】

いくつかの実施形態において、細胞集団は、標的化リガンド又は代替抗原結合部分をコードする外来性核酸配列の挿入を含むゲノム編集を伴う編集細胞を含み、細胞集団の細胞のうちの少なくとも７０％は、標的配列への外来性核酸の挿入を含む。いくつかの実施形態において、細胞集団は、標的化リガンド又は代替抗原結合部分をコードする外来性核酸配列の挿入を含むゲノム編集を伴う編集細胞を含み、細胞集団の細胞のうちの少なくとも８０％は、標的配列への外来性核酸の挿入を含む。いくつかの実施形態において、細胞集団は、標的化リガンド又は代替抗原結合部分をコードする外来性核酸の挿入を含むゲノム編集を伴う編集細胞を含み、細胞集団の細胞のうちの少なくとも９０％は、標的配列への外来性核酸の挿入を含む。いくつかの実施形態において、細胞集団は、標的化リガンド又は代替抗原結合部分をコードする外来性核酸の挿入を含むゲノム編集を伴う編集細胞を含み、細胞集団の細胞のうちの少なくとも９５％は、標的配列への外来性核酸の挿入を含む。

【０１２４】

いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集されたＴ細胞を含み、細胞集団の細胞のうちの少なくとも３０％、４０％、５０％、５５％、６０％、又は６５％は、メモリ表現型（ＣＤ２７＋、ＣＤ４５ＲＡ＋）を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集されたＴ細胞を含み、細胞集団の細胞のうちの少なくとも３０％は、メモリ表現型（ＣＤ２７＋、ＣＤ４５ＲＡ＋）を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集されたＴ細胞を含み、細胞集団の細胞のうちの少なくとも４０％は、メモリ表現型（ＣＤ２７＋、ＣＤ４５ＲＡ＋）を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集されたＴ細胞を含み、細胞集団の細胞のうちの少なくとも５０％は、メモリ表現型（ＣＤ２７＋、ＣＤ４５ＲＡ＋）を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集されたＴ細胞を含み、細胞集団の細胞のうちの少なくとも５５％は、メモリ表現型（ＣＤ２７＋、ＣＤ４５ＲＡ＋）を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集されたＴ細胞を含み、細胞集団の細胞のうちの少なくとも６０％は、メモリ表現型（ＣＤ２７＋、ＣＤ４５ＲＡ＋）を有する。いくつかの実施形態において、細胞集団は、編集されたＴ細胞を含み、細胞集団の細胞のうちの少なくとも６５％は、メモリ表現型（ＣＤ２７＋、ＣＤ４５ＲＡ＋）を有する。

【０１２５】
いくつかの実施形態において、編集細胞を含む細胞集団は、ＭＨＣクラスＩ及び／又はＭＨＣクラスＩＩの表面発現が低減又は排除された細胞を含む。いくつかの実施形態において、編集細胞を含む細胞集団は、ＭＨＣクラスＩとＭＨＣクラスＩＩとの両方の表面発現が低減又は排除された細胞を含む。いくつかの実施形態において、編集細胞を含む細胞集団は、低減又は排除された表面発現ＨＬＡ－Ａを有する細胞を含み、細胞は、ＨＬＡ－Ｂについてホモ接合であり、ＨＬＡ－Ｃについてホモ接合である。
【０１２６】
いくつかの実施形態において、編集されたＴ細胞を含む細胞集団は、ＭＨＣクラスＩ及び／又はＭＨＣクラスＩＩの表面発現が低減又は排除された細胞を含む。いくつかの実施形態において、編集されたＴ細胞を含む細胞集団は、ＭＨＣクラスＩとＭＨＣクラスＩＩとの両方の表面発現が低減又は排除された細胞を含む。いくつかの実施形態において、編集されたＴ細胞を含む細胞集団は、低減又は排除された表面発現ＨＬＡ－Ａを有する細胞を含み、細胞は、ＨＬＡ－Ｂについてホモ接合であり、ＨＬＡ－Ｃについてホモ接合である。
【０１２７】
いくつかの実施形態において、細胞の集団は、提供される多重送達及びゲノム編集方法に従って産生される。いくつかの実施形態において、集団における細胞のうちの少なくとも５０％以上は、１つより多いゲノム編集を含む。いくつかの実施形態において、集団における細胞のうちの少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％（すなわち、検出の方法によって決定される全ての細胞）は、１つより多いゲノム編集を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法は、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、好ましくは少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％の、少なくとも２つのゲノム編集を有する細胞をもたらす。他の実施形態において、本明細書に開示される方法は、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、好ましくは少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％の、２、３、４、５、６、７、又は８個のゲノム編集を有する細胞をもたらす。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法は、約５％～約１００％、約１０％～約５０％、約２０～約１００％、約２０～約８０％、約４０～約１００％、又は約４０～約８０％の、少なくとも２つのゲノム編集を有する集団における全ての細胞をもたらす。いくつかの実施形態において、細胞は、編集細胞の集団を濃縮するために、編集の完了時に、選択プロセス、例えば、ＦＡＣＳ又は生化学的選択プロセスを受けていない。
【０１２８】
いくつかの実施形態において、送達方法及びゲノム編集方法は、増加した生存を有するインビトロでの拡大された細胞を産生する。実施形態において、改善された生存率は、エレクトロポレーションプロセスを用いて処理した細胞と比較され得る。実施形態において、拡大された細胞の細胞生存率は、少なくとも７０％、８０％、９０％、又は９５％である。
【０１２９】
いくつかの実施形態において、送達方法及びゲノム編集方法は、低い毒性を有する細胞をインビトロで産生した。例えば、実施形態において、開示される方法の結果として生じる細胞は、例えば、標的－標的転座、及び／又はオフターゲット転座を含む、２％、１％

、０．５％、０．２％、０．１％未満の転座を有する。いくつかの実施形態において、開示される方法の結果として生じる細胞は、１％、０．５％、０．２％、０．１％未満の標的－標的転座を有する。いくつかの実施形態において、例えば、標的－標的転座、及び／又はオフターゲット転座を含む、測定可能な転座なしの、開示される方法の結果として生じる細胞。いくつかの実施形態において、結果として生じる細胞は、例えば、本明細書に提供される方法を使用して決定されるような測定可能な相互転座を有さない。いくつかの実施形態において、結果として生じる細胞は、例えば、本明細書に提供される方法を使用して決定されるような測定可能な複合転座を有さない。いくつかの実施形態において、結果として生じる細胞は、例えば、本明細書に提供される方法を使用して決定されるような測定可能なオフターゲット転座を有さない。いくつかの実施形態において、結果として生じる細胞は、例えば、本明細書に提供される方法を使用して決定されるような、相互転座、複合転座、又はオフターゲット転座の２倍未満のバックグラウンドレベルを有する。

【０１３０】

いくつかの実施形態において、ゲノム編集方法は、高い編集効率を有する細胞を産生する。開示される方法の特定の利点は、複数のゲノム編集を有する細胞において観察される高い編集率である。例えば、いくつかの実施形態において、編集効率パーセントは、各標的部位で少なくとも６０％、７０％、８０％、９０％、又は９５％である。

【０１３１】

任意の特定の使用に必要な集団における細胞の数は、例えば、細胞の種類及び細胞の意図される使用に依存することが理解される。編集する細胞の数は、編集後に細胞を増殖する能力にも依存する。また、必要とされる編集のレベル、又は必要とされるノックダウンのレベルは、少なくとも部分的に、行われる特定の編集、及び細胞集団の意図される使用に依存することも理解される。例えば、例えば、３０％以下、４０％以下、５０％以下のゲノム編集を伴うＢ細胞の集団は、タンパク質発現系において有用であり得る。例えば、対象への移植のためのＴ細胞の表面上の内因性Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）のより高いレベルのノックダウンが必要とされ、これは、Ｔ細胞の表面上の低レベルの内因性ＴＣＲが、対象への移植時に重度の有害反応をもたらし得るためである。したがって、内因性ＴＣＲを発現するＴ細胞は、移植目的のためのＴ細胞の集団において、できるだけ低いレベルで存在するべきである。しかしながら、サイトカイン又は他の分泌因子を産生するためのＴ細胞の編集は、移植での使用であっても、移植のためのＴ細胞の集団における内因性ＴＣＲに必要とされるような高いレベルの編集を必要としない場合がある。

【０１３２】

例示的な編集細胞集団のサイズを以下に提供する。任意の特定の適応症に必要とされる編集細胞の数は、変化し得、例えば、治療方法は、変化し得ることが理解される。また、自己由来療法よりも同種療法での使用のための細胞集団には、より多くの数の細胞が望ましい場合がある。

【０１３３】

ある特定の実施形態において、編集細胞を含む細胞の集団は、Ｔ細胞の集団である。ある特定の実施形態において、Ｔ細胞の集団は、複数の、すなわち、少なくとも２つの編集を伴う１×１０ｅ９の編集されたＴ細胞を含む。ある特定の実施形態において、Ｔ細胞の集団は、少なくとも単一の編集を伴う５×１０ｅ９の編集されたＴ細胞を含む。ある特定の実施形態において、Ｔ細胞の集団は、１～１０ｘ１０ｅ９の編集されたＴ細胞を含み、ＴＣＲ－Ｔ細胞療法に有用である。ある特定の実施形態において、Ｔ細胞の集団は、１ｘ１０ｅ８の編集されたＴ細胞を含み、ＣＡＲ－Ｔ療法に有用である。

【０１３４】

ある特定の実施形態において、編集細胞を含む細胞の集団は、Ｂ細胞の集団である。ある特定の実施形態において、Ｂ細胞の集団は、少なくとも単一の編集を伴う１～５ｘ１０ｅ８の編集されたＢ細胞を含み、好ましくは、複数の編集を伴う編集されたＢ細胞を含む。

【０１３５】

ある特定の実施形態において、編集細胞を含む細胞の集団は、ＮＫ細胞の集団である。ある特定の実施形態において、ＮＫ細胞の集団は、少なくとも単一の編集を伴う３ｘ１０ｅ９のＮＫの編集されたＮＫ細胞を含む。ある特定の実施形態において、ＮＫ細胞の集団は、複数の編集を伴う少なくとも５ｘ１０ｅ８の編集されたＮＫ細胞を含む。ある特定の実施形態において、ＮＫ細胞の集団は、療法に使用するための１ｘ１０ｅ８～９ｘ１０ｅ９の編集されたＮＫ細胞を含む。

【０１３６】

ある特定の実施形態において、編集細胞を含む細胞の集団は、単球又はマクロファージの集団である。ある特定の実施形態において、編集細胞を含む単球又はマクロファージの集団は、少なくとも単一の編集を有する少なくとも１×１０ｅ９の単球若しくはマクロファージ、又は複数の編集を伴う少なくとも２×１０ｅ８の単球若しくはマクロファージを含む。

【０１３７】

ある特定の実施形態において、編集細胞を含む細胞の集団は、樹状細胞である。ある特定の実施形態において、樹状細胞の集団は、５ｘ１０ｅ６～５ｘ１０ｅ７の編集された樹状細胞を含む。

【０１３８】

いくつかの実施形態において、インビトロでのＴ細胞に対するゲノム編集方法は、複数の標的部位で高い編集効率を生み出している。いくつかの実施形態において、操作されたＴ細胞が産生され、内因性ＴＣＲがノックアウトされる。いくつかの実施形態において、操作されたＴ細胞が産生され、内因性ＴＣＲの発現が低減される。いくつかの実施形態において、操作されたＴ細胞が産生され、３個の遺伝子は、発現が低減されているか、及び／又はノックアウトされる。いくつかの実施形態において、操作されたＴ細胞が産生され、４個の遺伝子は、発現が低減されているか、及び／又はノックアウトされる。いくつかの実施形態において、操作されたＴ細胞が産生され、５個の遺伝子は、発現が低減されているか、及び／又はノックアウトされる。いくつかの実施形態において、操作されたＴ細胞が産生され、６個の遺伝子は、発現が低減されているか、及び／又はノックアウトされる。いくつかの実施形態において、操作されたＴ細胞が産生され、７個の遺伝子は、発現が低減されているか、及び／又はノックアウトされる。いくつかの実施形態において、操作されたＴ細胞が産生され、８個の遺伝子は、発現が低減されているか、及び／又はノックアウトされる。いくつかの実施形態において、操作されたＴ細胞が産生され、９個の遺伝子は、発現が低減されているか、及び／又はノックアウトされる。いくつかの実施形態において、操作されたＴ細胞が産生され、１０個の遺伝子は、発現が低減されているか、及び／又はノックアウトされる。いくつかの実施形態において、操作されたＴ細胞が産生され、１１個の遺伝子は、発現が低減されているか、及び／又はノックアウトされる。

【０１３９】

いくつかの実施形態において、操作されたＴ細胞が産生され、内因性ＴＣＲがノックアウトされ、かつトランスジェニックＴＣＲが挿入及び発現される。いくつかの実施形態において、操作されたＴ細胞は、初代ヒトＴ細胞である。いくつかの実施形態において、ｔｇＴＣＲは、ウィルムスの腫瘍１（ＷＴ１）を標的とする。いくつかの実施形態において、ＷＴ１　ｔｇＴＣＲは、開示される脂質核酸アセンブリ組成物を使用して、高い割合のＴ細胞（例えば、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、又は９５％を超える）に挿入される。

【０１４０】

いくつかの実施形態において、開示される方法によって産生されるＴ細胞は、サイトカインの産生が増加している。いくつかの実施形態において、サイトカインの産生の増加は、エレクトロポレーションプロセスを用いて処理したＴ細胞と比較され得る。例えば、いくつかの実施形態において、遺伝子操作されたＴ細胞は、増加したレベルのＩＬ－２を産生した。いくつかの実施形態において、遺伝子操作されたＴ細胞は、増加したレベルのＩＦＮγを産生した。いくつかの実施形態において、遺伝子操作されたＴ細胞は、増加した

レベルのＴＮＦαを産生した。サイトカインレベルは、例えば、ＥＬＩＳＡ、細胞内フローサイトメトリー染色を含む標準的な方法によって決定され得る。

【０１４１】

いくつかの実施形態において、開示される方法によって産生されるＴ細胞は、反復刺激による継続的な増殖を示す。例えば、Ｔ細胞は、Ｔ細胞を刺激するために使用される薬剤を用いたインビトロでの培養における反復刺激後に増殖し得る。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は、Ｔ細胞のＴＣＲに対する同族抗原（例えば、Ｔ細胞と共培養される細胞上のペプチド－ＭＨＣ複合体）による反復刺激に応答して刺激され、増殖され得る。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は、反復ポリクローナル刺激に応答して刺激され、増殖され得る。いくつかの実施形態において、反復刺激は、少なくとも２回、３回、４回、５回、又はそれ以上である。いくつかの実施形態において、細胞の増殖は、遺伝子組換えを含む細胞の集団を形成するように拡大される。

【０１４２】

いくつかの実施形態において、開示される方法によって産生されるＴ細胞は、拡大の増加を示す。いくつかの実施形態において、拡大の増加は、エレクトロポレーションプロセスを用いて処理したＴ細胞と比較され得る。拡大は、細胞計数、増殖、又はＴ細胞の拡大を測定するための他の標準的な方法によって評価され得る。

【０１４３】

いくつかの実施形態において、開示される方法によって産生されるＴ細胞は、メモリＴ細胞表現型を示す。いくつかの実施形態において、初期幹細胞メモリＴ細胞（又は「Ｔｓｃｍ」）と称されるＴ細胞メモリ表現型は、特に有利であり、本開示の方法によって産生される。いくつかの実施形態において、遺伝子操作されたＴ細胞は、Ｔｓｃｍ表現型（ＣＤ２７＋、ＣＤ４５ＲＡ＋）を有する。

【０１４４】

いくつかの実施形態において、開示された方法によって産生された操作された細胞（例えば、Ｔ細胞）は、ＭＨＣクラスＩ及び／又はＭＨＣクラスＩＩの表面発現を低減又は排除している。いくつかの実施形態において、操作された細胞は、ＭＨＣクラスＩとＭＨＣクラスＩＩとの両方の表面発現を低減又は排除している。いくつかの実施形態において、操作された細胞は、表面発現ＨＬＡ－Ａを低減又は排除しており、細胞は、ＨＬＡ－Ｂについてホモ接合であり、ＨＬＡ－Ｃについてホモ接合である。

【０１４５】

いくつかの実施形態において、開示された方法によって産生された操作されたＴ細胞は、ＭＨＣクラスＩ及び／又はＭＨＣクラスＩＩの表面発現を低減又は排除している。いくつかの実施形態において、操作された細胞は、ＭＨＣクラスＩとＭＨＣクラスＩＩとの両方の表面発現を低減又は排除している。いくつかの実施形態において、操作された細胞は、表面発現ＨＬＡ－Ａを低減又は排除しており、細胞は、ＨＬＡ－Ｂについてホモ接合であり、ＨＬＡ－Ｃについてホモ接合である。

【０１４６】

いくつかの実施形態において、本方法、そのために使用される試薬、及びそれによって産生された生成物の以下の全ての利点のうちの１つ以上が、当該技術分野において既知の他のゲノム編集の方法、例えば、エレクトロポレーションによって産生された生成物と比較して、観察される。

ａ．編集開始後１４日間以内の培養において、例えば、２０倍、３０倍、４０倍、若しくは５０倍の拡大、任意選択により６０倍、７０倍、若しくは８０倍の、編集細胞を拡大する能力の改善；

ｂ．エレクトロポレーションなどの代替方法と同等の挿入率；

ｃ．１つより多い編集、例えば、少なくとも２、３、４、５、若しくは６つの編集を有する細胞のパーセンテージの増加を含む、すなわち、好ましくは、未編集細胞を除去するか、若しくは編集細胞を濃縮するための選択ステップを伴わない、より高い編集効率による、未編集細胞の数／パーセンテージの低減；

ｄ．メモリＴ細胞表現型（ＣＤ２７＋、ＣＤ４５ＲＡ＋）を有する、例えば、少なくとも３０％、４０％、好ましくは少なくとも５０％のより望ましいメモリ細胞表現型；
ｅ．増加したサイトカイン産生（例えば、ＩＬ－２、ＩＦＮγ、ＴＮＦα）、若しくは編集された細胞型に依存する他のサイトカイン；
ｆ．編集細胞の細胞傷害の改善；
ｇ．編集細胞の増殖及び／若しくは増殖能力の改善；
ｈ．特にＴ細胞における、反復刺激による応答の耐久性の増強；並びに／又は
ｉ．転座速度の減少などの、望ましくない副作用及び変異の速度の減少、例えば、２％、１％、０．５％、０．２％、若しくは０．１％未満の転座、好ましくは標的対標的転座の転座速度；又はバックグラウンドと比較して全転座数の２倍未満。

【０１４７】
Ｂ．障害を治療するための方法／使用
開示される多重方法によって産生される、本明細書で提供される細胞及び／又は細胞の集団は、様々な疾患及び障害を治療する方法において使用され得る。
【０１４８】
いくつかの実施形態において、本開示は、対象において免疫療法を提供する方法を提供し、本方法は、対象に、有効量の本明細書に記載される細胞（例えば、細胞の集団）、例えば、前述の細胞の態様及び実施形態のいずれかの細胞を投与することを含む。
【０１４９】
本方法のいくつかの実施形態において、本方法には、対象に、有効量の本明細書に記載される細胞（例えば、細胞の集団）、例えば、前述の細胞の態様及び実施形態のいずれかの細胞を投与する前に、リンパ枯渇（ｌｙｍｐｈｏｄｅｐｌｅｔｉｎｇ）剤又は免疫抑制剤を投与することが含まれる。別の態様において、本開示は、細胞（例えば、細胞の集団）を調製する方法を提供する。
【０１５０】
免疫療法は、免疫系を活性化又は抑制することによる疾患の治療である。免疫応答を誘発又は増幅するように設計された免疫療法は、活性化免疫療法として分類される。細胞に基づく免疫療法は、いくつかのがんの治療に有効であることが実証されている。リンパ球、マクロファージ、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）などの免疫エフェクタ細胞は、腫瘍細胞の表面上に発現する異常な抗原に応答して作用するようにプログラムされ得る。したがって、がん免疫療法は、免疫系の構成要素が腫瘍又は他のがん細胞を破壊することを可能にする。細胞に基づく免疫療法はまた、自己免疫疾患又は移植拒絶の治療に有効であることが実証されている。制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）又は間葉系幹細胞などの免疫エフェクタ細胞は、正常組織の表面上に発現する自己抗原又は移植抗原に応答して作用するようにプログラムされ得る。
【０１５１】
いくつかの実施形態において、本開示は、細胞の集団、又は細胞（例えば、細胞の集団）を調製する方法を提供する。細胞の集団は、免疫療法に使用され得る。
【０１５２】
本開示の細胞は、例えば、更に編集された、又は修飾された遺伝子若しくは対立遺伝子の導入による、更なる操作に好適である。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、野生型又はバリアントＴＣＲである。本開示の細胞はまた、代替抗原結合部分をコードする異種配列の導入による、例えば、特定のタンパク質を標的にするように操作されたキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）などの代替（非内因性）ＴＣＲをコードする異種配列の導入による、更なる操作に好適であり得る。ＣＡＲは、キメラ免疫受容体、キメラＴ細胞受容体、又は人工Ｔ細胞受容体としても知られている。
【０１５３】
いくつかの実施形態において、本開示は、治療を必要としている対象を治療する方法であって、細胞（例えば、細胞の集団）、例えば、本明細書に記載される細胞を調製する方法、例えば、細胞を調製する方法の前述の態様及び実施形態のいずれかの方法によって調

製される細胞を投与することを含む、方法を提供する。

【０１５４】

いくつかの実施形態において、開示される方法によって産生される細胞又は細胞の集団は、がん、感染性疾患、炎症性疾患、自己免疫性疾患、心血管疾患、神経学的疾患、眼科学的疾患、腎臓疾患、肝臓疾患、筋骨格系疾患、赤血球疾患、又は移植拒絶を治療するために使用され得る。

【０１５５】

いくつかの実施形態において、がんは、リンパ腫、乳がん、肺がん、多発性骨髄腫、白血病、肝臓がん、尿路がん、腎臓がん、膀胱がん、黒色腫、結腸直腸がん、膵臓がん、上皮悪性腫瘍、中皮腫、口腔咽頭がん、子宮頸がん、子宮がん、卵巣がん、肛門生殖器がん、又は脳がんである。いくつかの実施形態において、リンパ腫は、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）、侵攻性Ｂ細胞リンパ腫、又は高悪性度Ｂ細胞リンパ腫、又はマントル細胞リンパ腫を含む非ホジキンのリンパ腫である。いくつかの実施形態において、乳がんは、三重陰性乳がんである。いくつかの実施形態において、肺がんは、非小細胞肺がん（ＮＳＣＬＣ）又は小細胞肺がん（ＳＣＬＣ）である。いくつかの実施形態において、白血病は、急性リンパ芽球性白血病又は急性骨髄性白血病である。いくつかの実施形態では、がんは、固形腫瘍である。

【０１５６】

いくつかの実施形態において、感染性疾患は、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、Ａ型肝炎ウイルス、Ｃ型肝炎ウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス、ヒトサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、エプスタイン－バールウイルス、ヒトパピローマウイルス、結核菌、ヒトコロナウイルス、又は侵襲性アスペルギルス・フミガタス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｆｕｍｉｇａｔｕｓ）によって引き起こされる。いくつかの実施形態において、感染性疾患は、後天性免疫不全症候群（ＡＩＤＳ）、Ａ型肝炎、Ｂ型肝炎、Ｃ型肝炎、結核、重症急性呼吸器症候群（ＳＡＲＳ）、中東呼吸器症候群（ＭＥＲＳ）、又はコロナウイルス疾患２０１９（ＣＯＶＩＤ－１９）である。いくつかの実施形態において、結核は、多剤耐性（ＭＤＲ）結核又は超多剤耐性（ｅｘｔｅｎｓｉｖｅｌｙ　ｄｒｕｇ－ｒｅｓｉｓｔａｎｔ、ＸＤＲ）結核である。いくつかの実施形態において、ヒトコロナウイルスは、中東呼吸器症候群コロナウイルス（ＭＥＲＳ－ＣｏＶ）、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、又は重症急性呼吸器症候群コロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２）である。いくつかの実施形態において、感染性疾患は、ヒトパピローマウイルス陽性がん、例えば、子宮がん、子宮頸がん、又は口腔咽頭がんである。

【０１５７】

いくつかの実施形態において、炎症性疾患は、アレルギー、喘息、セリアック病、糸球体腎炎、炎症性腸疾患、痛風、関節リウマチ（ＲＡ）、筋炎、強皮症、強直性脊椎炎（ＡＳ）、抗リン脂質抗体症候群（ＡＰＳ）、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、シェーグレン症候群、リウマチ性心疾患、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、又は移植拒絶である。

【０１５８】

いくつかの実施形態において、自己免疫疾患は、１型糖尿病、多発性硬化症、クローン病、潰瘍性大腸炎、自己免疫性甲状腺疾患、関節リウマチ（ＲＡ）、炎症性腸疾患、抗リン脂質抗体症候群（ＡＰＳ）、シェーグレン症候群、強皮症、乾癬、乾癬性関節炎、ギラン・バレー症候群、アジソン病、グレーブス病、橋本甲状腺炎、重症筋無力症、自己免疫性血管炎、自己免疫性ぶどう膜炎、自己免疫性肝炎、悪性貧血、セリアック病、又は全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）である。

【０１５９】

いくつかの実施形態において、心血管疾患は、虚血性心疾患、冠動脈性心疾患、大動脈疾患、マルファン症候群、先天性心疾患、心臓弁疾患、心膜疾患、リウマチ性心疾患、末梢動脈疾患、又は脳卒中である。

【０１６０】

いくつかの実施形態において、神経学的疾患は、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症

、脳卒中、脊髄損傷、アルツハイマー病、加齢関連黄斑変性症、外傷性脳損傷、多発性硬化症、ハンチントン病、筋ジストロフィー、又はギラン・バレー症候群である。

【０１６１】

いくつかの実施形態において、眼科学的疾患は、緑内障、網膜症、黄斑変性症、又はサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）網膜炎である。いくつかの実施形態において、眼科学的疾患は、網膜疾患である。いくつかの実施形態では。眼科学的疾患は、ＶＥＧＦによって媒介される。

【０１６２】

いくつかの実施形態において、本開示の方法によって産生される操作された細胞は、自己由来細胞療法を含む細胞療法として使用され得る。いくつかの実施形態において、操作された細胞は、同種幹細胞療法を含む細胞療法として使用され得る。いくつかの実施形態において、細胞療法は、誘導多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）を含む。ｉＰＳＣは、例えば、ベータ島細胞、ニューロン、及び血液細胞を含む他の細胞型に分化するように誘導され得る。いくつかの実施形態において、細胞療法は、造血幹細胞を含む。いくつかの実施形態において、幹細胞は、骨、軟骨、筋肉、及び脂肪細胞に発達し得る間葉系幹細胞を含む。いくつかの実施形態において、幹細胞は、眼幹細胞を含む。いくつかの実施形態において、同種幹細胞移植は、同種骨髄移植を含む。いくつかの実施形態において、幹細胞は、多能性幹細胞（ＰＳＣ）を含む。いくつかの実施形態において、幹細胞は、誘導胚性幹細胞（ＥＳＣ）を含む。

【０１６３】

いくつかの実施形態において、細胞治療は、トランスジェニックＴ細胞治療である。いくつかの実施形態において、細胞療法は、トランスジェニックＴ細胞を標的とするウィルムスの腫瘍１（ＷＴ１）を含む。いくつかの実施形態において、細胞療法は、標的化受容体、又はＣＡＲ　Ｔ細胞療法などの市販のＴ細胞の療法の標的化受容体をコードするドナー核酸を含む。現在、細胞療法のために承認されている標的化受容体がいくつか存在する。本明細書で提供される細胞及び方法は、これらの既知の構築物とともに使用され得る。細胞療法として使用するための標的化受容体構築物を含む商業的に承認された細胞製品には、例えば、Ｋｙｍｒｉａｈ（登録商標）（チサゲンレクロイセル（ｔｉｓａｇｅｎｌｅｃｌｅｕｃｅｌ））；Ｙｅｓｃａｒｔａ（登録商標）（アキシカブタゲンシロルユーセル（ａｘｉｃａｂｔａｇｅｎｅ　ｃｉｌｏｌｅｕｃｅｌ））；Ｔｅｃａｒｔｕｓ（商標）（ブレクスカブタジェンアウトルーセル（ｂｒｅｘｕｃａｂｔａｇｅｎｅ　ａｕｔｏｌｅｕｃｅｌ））；Ｔａｂｅｌｅｃｌｅｕｃｅｌ（Ｔａｂ－ｃｅｌ（登録商標））；Ｖｉｒａｌｙｍ－Ｍ（ＡＬＶＲ１０５）；及びＶｉｒａｌｙｍ－Ｃが含まれる。

【０１６４】

Ｃ．例示的な細胞型

いくつかの実施形態において、細胞は、免疫細胞である。本明細書で使用される場合、「免疫細胞」は、例えば、リンパ球（例えば、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ナチュラルキラー細胞（「ＮＫ細胞」、及びＮＫＴ細胞、又はｉＮＫＴ細胞））、単球、マクロファージ、肥満細胞、樹状細胞、又は顆粒球（例えば、好中球、好酸球、及び好塩基球）を含む、免疫系の細胞を指す。いくつかの実施形態において、細胞は、初代免疫細胞である。いくつかの実施形態において、免疫系細胞は、ＣＤ３$^{+}$、ＣＤ４$^{+}$、及びＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、Ｂ細胞、ＮＫ細胞、並びに樹状細胞（ＤＣ）から選択され得る。いくつかの実施形態において、免疫細胞は、同種である。

【０１６５】

いくつかの実施形態において、細胞は、リンパ球である。いくつかの実施形態において、細胞は、適応免疫細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は、Ｔ細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は、Ｂ細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は、ＮＫ細胞である。

【０１６６】

本明細書で使用される場合、Ｔ細胞は、Ｔ細胞受容体（「ＴＣＲ」又は「αβＴＣＲ」

又は「γδＴＣＲ」）を発現する細胞として定義され得るが、いくつかの実施形態において、Ｔ細胞のＴＣＲは、その発現を低減させるように（例えば、ＴＲＡＣ又はＴＲＢＣ遺伝子への遺伝子組換えによって）遺伝子組換えされてもよく、したがって、タンパク質ＣＤ３の発現は、標準的なフローサイトメトリー方法によってＴ細胞を同定するためのマーカーとして使用されてもよい。ＣＤ３は、ＴＣＲと会合する多サブユニットシグナル伝達複合体である。したがって、Ｔ細胞は、ＣＤ３＋と称され得る。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は、ＣＤ３＋マーカー、及びＣＤ４＋又はＣＤ８＋マーカーのいずれかを発現する細胞である。

【０１６７】

いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は、糖タンパク質ＣＤ８を発現し、したがって、標準的なフローサイトメトリー方法によりＣＤ８＋であり、「細胞傷害性」Ｔ細胞と称され得る。いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は、糖タンパク質ＣＤ４を発現し、したがって、標準的なフローサイトメトリー方法によりＣＤ４＋であり、「ヘルパー」Ｔ細胞と称され得る。ＣＤ４＋Ｔ細胞は、サブセットに分化され得、Ｔｈ１細胞、Ｔｈ２細胞、Ｔｈ９細胞、Ｔｈ１７細胞、Ｔｈ２２細胞、Ｔ制御性（「Ｔｒｅｇ」）細胞、又はＴ濾胞性ヘルパー細胞（「Ｔｆｈ」）と称され得る。各ＣＤ４＋サブセットは、炎症誘発性又は抗炎症機能、生存若しくは保護機能のいずれかを有し得る特異的サイトカインを放出する。Ｔ細胞は、ＣＤ４＋又はＣＤ８＋選択方法によって対象から単離され得る。

【０１６８】

いくつかの実施形態において、Ｔ細胞は、メモリＴ細胞である。体内では、メモリＴ細胞は抗原に遭遇している。メモリＴ細胞は、二次リンパ器官（セントラルメモリＴ細胞）又は直近に感染した組織（エフェクタメモリＴ細胞）に位置し得る。メモリＴ細胞は、ＣＤ８＋Ｔ細胞であり得る。メモリＴ細胞は、ＣＤ４＋Ｔ細胞であり得る。

【０１６９】

本明細書で使用される場合、「セントラルメモリＴ細胞」は、抗原経験のあるＴ細胞として定義され得、例えば、ＣＤ６２Ｌ及びＣＤ４５ＲＯを発現し得る。セントラルメモリＴ細胞は、セントラルメモリＴ細胞によってＣＤ６２Ｌ＋及びＣＤ４５ＲＯ＋として検出されてもよく、ＣＣＲ７も発現するため、標準的なフローサイトメトリー方法によってＣＣＲ７＋として検出されてもよい。

【０１７０】

本明細書で使用される場合、「初期幹細胞メモリＴ細胞」（又は「Ｔｓｃｍ」）は、ＣＤ２７及びＣＤ４５ＲＡを発現するＴ細胞として定義され得、したがって、標準的なフローサイトメトリー方法によりＣＤ２７＋及びＣＤ４５ＲＡ＋である。Ｔｓｃｍは、ＣＤ４５アイソフォームＣＤ４５ＲＯを発現しないため、標準的なフローサイトメトリー方法によってこのアイソフォームのために染色された場合、Ｔｓｃｍは更にＣＤ４５ＲＯ－となる。したがって、ＣＤ４５ＲＯ－ＣＤ２７＋細胞はまた、初期幹細胞メモリＴ細胞である。Ｔｓｃｍ細胞は、ＣＤ６２Ｌ及びＣＣＲ７を更に発現するため、標準的なフローサイトメトリー方法によってＣＤ６２Ｌ＋及びＣＣＲ７＋として検出され得る。初期幹細胞メモリＴ細胞は、細胞療法生成物の持続性及び治療有効性の増加と相関することが示されている。

【０１７１】

いくつかの実施形態において、細胞は、Ｂ細胞である。本明細書で使用される場合、「Ｂ細胞」は、ＣＤ１９及び／又はＣＤ２０、及び／又はＢ細胞成熟抗原（「ＢＣＭＡ」）を発現する細胞として定義され得、したがって、Ｂ細胞は、標準的なフローサイトメトリー方法によりＣＤ１９＋、及び／又はＣＤ２０＋、及び／又はＢＣＭＡ＋である。Ｂ細胞は、標準的なフローサイトメトリー方法によってＣＤ３及びＣＤ５６に対して更に陰性である。Ｂ細胞は、形質細胞であり得る。Ｂ細胞は、メモリＢ細胞であり得る。Ｂ細胞は、ナイーブＢ細胞であり得る。Ｂ細胞は、ＩｇＭ＋であり得るか、又はクラススイッチされたＢ細胞受容体（例えば、ＩｇＧ＋、又はＩｇＡ＋）を有する。

【０１７２】

いくつかの実施形態において、細胞は、骨髄又は末梢血からなどの単核細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は、末梢血単核細胞（「ＰＢＭＣ」）である。いくつかの実施形態において、細胞は、ＰＢＭＣ、例えば、リンパ球又は単球である。いくつかの実施形態において、細胞は、末梢血リンパ球（「ＰＢＬ」）である。

【０１７３】

ＡＣＴ療法で使用される細胞には、例えば、間葉系幹細胞（例えば、骨髄（ＢＭ）、末梢血（ＰＢ）、胎盤、臍帯（ＵＣ）又は脂肪から単離される）、造血幹細胞（ＨＳＣ；例えば、ＢＭから単離される）、単核細胞（例えば、ＢＭ又はＰＢから単離される）、血管内皮前駆細胞（ＥＰＣ；ＢＭ、ＰＢ、及びＵＣから単離される）、神経幹細胞（ＮＳＣ）、角膜上皮幹細胞（ＬＳＣ）、又は組織特異的初代細胞若しくはそれに由来する細胞（ＴＳＣ）が含まれる。ＡＣＴ療法で使用される細胞には、誘導多能性幹細胞（ｉＰＳＣ；例えば、Ｍａｈｌａ，Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．２０１６（Ａｒｔｉｃｌｅ ＩＤ ６９４０２８３）：１－２４（２０１６）を参照）が更に含まれ、例えば、島細胞、ニューロン、及び血液細胞；眼幹細胞；多能性幹細胞（ＰＳＣ）；胚性幹細胞（ＥＳＣ）；島細胞、心筋細胞、甲状腺細胞、胸腺細胞、神経細胞、皮膚細胞、網膜細胞、軟骨細胞、筋細胞、及びケラチノサイトなどの臓器又は組織移植のための細胞を含む他の細胞型に分化するように誘導され得る。

【０１７４】

いくつかの実施形態において、細胞は、ヒト細胞、例えば、対象からの細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は、ヒト対象から単離される。いくつかの実施形態において、細胞は、患者から単離される。いくつかの実施形態において、細胞は、ドナーから単離される。いくつかの実施形態において、細胞は、ヒトドナーＰＢＭＣ又はレウコパクから単離される。いくつかの実施形態において、細胞は、状態、障害、又は疾患を有する対象からのものである。いくつかの実施形態において、細胞は、エプスタインバール（Ｅｐｓｔｅｉｎ Ｂａｒｒ）ウイルス（「ＥＢＶ」）を有するヒトドナーからのものである。

【０１７５】

いくつかの実施形態において、細胞は、ＨＬＡ－Ｂについてホモ接合であり、ＨＬＡ－Ｃについてホモ接合である。いくつかの実施形態において、細胞は、ＨＬＡ－Ａ遺伝子における遺伝子組換えを含有し、ＨＬＡ－Ｂについてホモ接合であり、ＨＬＡ－Ｃについてホモ接合である。

【０１７６】

いくつかの実施形態において、本方法は、エクスビボで行われる。本明細書で使用される場合、「エクスビボ」は、例えば、ＡＣＴ療法のように、細胞が対象に移入されることが可能であるインビトロ方法を指す。いくつかの実施形態において、エクスビボ方法は、ＡＣＴ療法の細胞又は細胞集団を伴うインビトロ方法である。

【０１７７】

いくつかの実施形態において、細胞は、培養物中で維持される。いくつかの実施形態において、細胞は、患者に移植される。いくつかの実施形態において、細胞は、対象から取り除かれ、エクスビボで遺伝子組換えされ、次いで、同じ患者に再投与される。いくつかの実施形態において、細胞は、対象から取り除かれ、エクスビボで遺伝子組換えされ、次いで、それが取り除かれた対象以外の対象に投与される。

【０１７８】

いくつかの実施形態において、細胞は、細胞株からのものである。いくつかの実施形態において、細胞株は、ヒト対象に由来する。いくつかの実施形態において、細胞株は、リンパ芽球様細胞株（「ＬＣＬ」）である。細胞は、凍結保存され、解凍され得る。細胞は、以前に凍結保存されていない可能性がある。

【０１７９】

いくつかの実施形態において、細胞は、細胞バンクからのものである。いくつかの実施形態において、細胞は、遺伝子組換えされ、次いで細胞バンクに移入される。いくつかの実施形態において、細胞は、対象から取り除かれ、エクスビボで遺伝子組換えされ、細胞

バンクに移入される。いくつかの実施形態において、遺伝子組換えされた細胞の集団は、細胞バンクに移入される。いくつかの実施形態において、遺伝子組換えされた免疫細胞の集団は、細胞バンクに移入される。いくつかの実施形態において、第１及び第２の亜集団が少なくとも１つの共通の遺伝子組換え、及び少なくとも１つの異なる遺伝子組換えを有する、第１及び第２の亜集団を含む遺伝子組換えされた免疫細胞の集団が、細胞バンクに移入される。

【０１８０】

ＩＶ．例示的なゲノム編集ツール

いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリは、ゲノム編集ツール又はそれをコードする核酸を含む。

【０１８１】

本明細書で使用される場合、「ゲノム編集ツール」（又は「遺伝子編集ツール」）という用語は、細胞のゲノムにおける編集を産生するために必要又は役立つ「ゲノム編集系」（又は「遺伝子編集系」）の任意の構成要素である。いくつかの実施形態において、本開示は、ゲノム編集系（例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ系、ＴＡＬＥＮ系、メガヌクレアーゼ系、又はＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系）のゲノム編集ツールを細胞（又は細胞の集団）に送達する方法を提供する。ゲノム編集ツールには、例えば、細胞のＤＮＡ又はＲＮＡにおいて、例えば、細胞のゲノムにおいて、一本鎖又は二本鎖切断を作製することができるヌクレアーゼが含まれる。ゲノム編集ツール、例えば、ヌクレアーゼは、核酸又はニッカーゼを開裂することなく、任意選択により細胞のゲノムを修飾し得る。ゲノム編集ヌクレアーゼ又はニッカーゼは、ｍＲＮＡによってコードされ得る。そのようなヌクレアーゼには、例えば、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ構成要素が含まれる。ゲノム編集ツールには、例えば、エディタドメインなどのエフェクタドメインに融合したニッカーゼを含む融合タンパク質が含まれる。ゲノム編集ツールには、例えば、ガイドＲＮＡ、ｓｇＲＮＡ、ｄｇＲＮＡ、ドナー核酸などのゲノム編集の目標を達成するのに必要であるか、又はそれに役立つ任意の項目が含まれる。

【０１８２】

脂質核酸アセンブリ組成物との送達のためのゲノム編集ツールを含む、種々の好適な遺伝子編集系が本明細書に記載されており、これには、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）系、及び転写活性化因子様エフェクタヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）系が含まれるが、これらに限定されない。一般に、遺伝子編集系は、標的ＤＮＡ配列において二本鎖切断（ＤＳＢ）又はニック（例えば、一本鎖切断、又はＳＳＢ）を誘導するように操作された開裂系の使用を伴う。開裂又はニッキングは、操作されたＺＦＮ、ＴＡＬＥＮなどの特定のヌクレアーゼの使用、又は標的ＤＮＡ配列の特定の開裂又はニッキングを誘導するための操作されたガイドＲＮＡとともにＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系を使用することによって生じ得る。更に、標的ヌクレアーゼは、Ａｒｇｏｎａｕｔｅ系に基づいて開発されており（例えば、「ＴｔＡｇｏ」として知られるＴ．サーモフィルス（Ｔ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）から、Ｓｗａｒｔｓ ｅｔ ａｌ（２０１４）Ｎａｔｕｒｅ ５０７（７４９１）：２５８－２６１を参照）、ゲノム編集及び遺伝子療法における使用の可能性も有し得る。

【０１８３】

Ａ．ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓゲノム編集ツール

いくつかの実施形態において、ゲノム編集ツールは、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系の構成要素である。

【０１８４】

１．ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）

いくつかの実施形態において、ゲノム編集ツールは、デュアルガイドＲＮＡ（ｄｇＲＮＡ）又はシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）であり得る、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）である。ガイドＲＮＡは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を標的配列に指向させる。

【０１８５】

本開示のいくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ製剤のカーゴには、少なくとも１つのｇＲＮＡ又はそれをコードする核酸が含まれる。ｇＲＮＡは、Ｃａｓヌクレアーゼ又はクラス２　Ｃａｓヌクレアーゼを標的核酸分子上の標的配列に誘導してもよい。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、クラス２　Ｃａｓヌクレアーゼと結合し、それによる開裂の特異性を提供する。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡ及びＣａｓヌクレアーゼは、リボヌクレオプロテイン（ＲＮＰ）、例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９複合体などのＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ複合体を形成してもよい。いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ複合体は、タイプＩＩ　ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９複合体であってもよい。いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ複合体は、Ｃｐｆ１／ガイドＲＮＡ複合体などのタイプＶ　ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ複合体であってもよい。Ｃａｓヌクレアーゼ及び同族のｇＲＮＡは対になってもよい。各クラス２　Ｃａｓヌクレアーゼと対になるｇＲＮＡ足場構造は、特定のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムによって異なる。

【０１８６】

いくつかの実施形態では、ｓｇＲＮＡは、Ｃａｓ９タンパク質によるＲＮＡ誘導ＤＮＡ開裂を媒介することができる「Ｃａｓ９　ｓｇＲＮＡ」である。いくつかの実施形態では、ｓｇＲＮＡは、Ｃｐｆ１タンパク質によるＲＮＡ誘導ＤＮＡ開裂を媒介することができる「Ｃｐｆ１　ｓｇＲＮＡ」である。いくつかの実施形態において、ｇＲＮＡは、Ｃａｓ９タンパク質と活性複合体を形成し、ＲＮＡガイドＤＮＡ開裂を媒介するのに十分なｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡを含む。いくつかの実施形態において、ｇＲＮＡは、Ｃｐｆ１タンパク質と活性複合体を形成し、ＲＮＡガイドＤＮＡ開裂を媒介するのに十分なｃｒＲＮＡを含む。Ｚｅｔｓｃｈｅ　２０１５を参照されたい。

【０１８７】

本開示のある特定の実施形態はまた、本明細書に記載のｇＲＮＡをコードする核酸、例えば、発現カセットを提供する。「ガイドＲＮＡ核酸」は、本明細書では、ガイドＲＮＡ（例えば、ｓｇＲＮＡ又はｄｇＲＮＡ）及び１つ以上のガイドＲＮＡをコードする核酸であるガイドＲＮＡ発現カセットを指すように使用される。

【０１８８】

いくつかの実施形態において、核酸は、ＤＮＡ分子であり得る。いくつかの実施形態において、核酸は、ｃｒＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含み得る。いくつかの実施形態において、ｃｒＲＮＡをコードするヌクレオチド配列は、天然に存在するＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系からの反復配列の全て又は一部によって隣接される標的化配列を含む。いくつかの実施形態において、核酸は、ｔｒａｃｒＲＮＡをコードするヌクレオチド配列を含み得る。いくつかの実施形態において、ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡは、２つの別々の核酸によってコードされ得る。他の実施形態において、ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡは、単一の核酸によってコードされ得る。いくつかの実施形態において、ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡは、単一の核酸の反対側の鎖によってコードされ得る。他の実施形態において、ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡは、単一の核酸の同一の鎖によってコードされ得る。いくつかの実施形態において、ｇＲＮＡ核酸は、ｓｇＲＮＡをコードする。いくつかの実施形態において、ｇＲＮＡ核酸は、Ｃａｓ９ヌクレアーゼｓｇＲＮＡをコードする。いくつかの（ｃｏｍｅ）実施形態において、ｇＲＮＡ核酸は、Ｃｐｆ１ヌクレアーゼｓｇＲＮＡをコードする。

【０１８９】

ガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列は、プロモーター、３’ＵＴＲ、又は５’ＵＴＲなどの少なくとも１つの転写又は調節制御配列に作動可能に連結され得る。一実施例において、プロモーターは、ｔＲＮＡプロモーター、例えばｔＲＮＡ^{Lys3}、又はｔＲＮＡキメラであり得る。Ｍｅｆｆｅｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，ＲＮＡ．２０１５　２１：１６８３－９、Ｓｃｈｅｒｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２００７　３５：２６２０－２６２８を参照のこと。いくつかの実施形態において、プロモーターは、ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩ（Ｐｏｌ　ＩＩＩ）によって認識され得る。Ｐｏｌ　ＩＩＩプロモーターの非限定的な例にはまた、Ｕ６及びＨ１プロモーターが含まれる。い

くつかの実施形態において、ガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列は、マウス又はヒトのＵ６プロモーターに作動可能に連結され得る。いくつかの実施形態において、ｇＲＮＡ核酸は、修飾核酸である。いくつかの実施形態において、ｇＲＮＡ核酸には、修飾ヌクレオシド又はヌクレオチドが含まれる。いくつかの実施形態において、ｇＲＮＡ核酸には、核酸の安定化及び組み込みを防止するための５’末端修飾、例えば、修飾ヌクレオシド又はヌクレオチドが含まれる。いくつかの実施形態において、ｇＲＮＡ核酸は、各鎖に５’末端修飾を有する二本鎖ＤＮＡを含む。いくつかの実施形態において、ｇＲＮＡ核酸には、５’末端修飾としての、反転したジデオキシ－Ｔ又は反転した脱塩基ヌクレオシド又はヌクレオチドが含まれる。いくつかの実施形態において、ｇＲＮＡ核酸には、例えば、ＦＡＭ、ＲＯＸ、ＴＡＭＲＡ、及びＡｌｅｘａＦｌｕｏｒを含む、ビオチン、デスチオビオチン－ＴＥＧ、ジゴキシゲニン、及び蛍光マーカーなどの標識が含まれる。

【０１９０】

いくつかの実施形態において、ｇＲＮＡなどの１つより多いｇＲＮＡ核酸は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓヌクレアーゼ系とともに使用され得る。各ｇＲＮＡ核酸は、異なる標的化配列を含有し得、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系が１つより多い標的配列を切断するようにする。いくつかの実施形態において、１つ以上のｇＲＮＡは、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ複合体内の活性又は安定性などの、同じ又は異なる特性を有し得る。１つより多いｇＲＮＡが使用される場合、各ｇＲＮＡは同じ又は異なるｇＲＮＡ核酸上にコードされ得る。１つを超えるｇＲＮＡの発現を駆動するために使用されるプロモーターは、同一であっても異なっていてもよい。

【０１９１】

Ｃａｓタンパク質の核酸基質は二本鎖核酸であるため、Ｃａｓタンパク質の標的配列は、ゲノムＤＮＡのプラス鎖及びマイナス鎖（すなわち、与えられる配列及びその配列の逆相補体）の両方を含む。したがって、ガイド配列が、「標的配列に対して相補的」であると言われる場合、標的配列の逆相補体に結合するようにガイドＲＮＡを指向させ得ると理解されるべきである。したがって、いくつかの実施形態において、ガイド配列が、標的配列の逆相補体に結合する場合、ガイド配列は、ガイド配列におけるＵのＴへの置換を除いて、標的配列の特定のヌクレオチド（例えばＰＡＭを含まない標的配列）と同一である。

【０１９２】

標的化配列の長さは、使用するＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステム及び構成要素に依存する。例えば、様々な細菌種に由来する様々なクラス２　Ｃａｓヌクレアーゼは、最適な標的化配列の長さが異なる。したがって、標的化配列は、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、３５、４０、４５、５０、又は５０超のヌクレオチド長を含んでもよい。いくつかの実施形態では、標的化配列の長さは、天然に存在するＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムのガイド配列よりも０、１、２、３、４、又は５ヌクレオチド、長い又は短い。いくつかの実施形態において、Ｃａｓヌクレアーゼ及びｇＲＮＡ足場は、同じＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系に由来する。いくつかの実施形態では、標的化配列は、１８～２４ヌクレオチドを含んでもよく、又はそれからなってもよい。いくつかの実施形態において、標的化配列は、１９～２１ヌクレオチドを含み得るか、又はそれからなり得る。いくつかの実施形態では、標的化配列は、２０ヌクレオチドを含んでもよく、又はそれからなってもよい。

【０１９３】

２．ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤

いくつかの実施形態において、ゲノム編集ツールは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤である。いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、Ｃａｓクリバーゼ／ニッカーゼ及びその不活性化形態（ｄＣａｓ　ＤＮＡ結合剤）である。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、Ｃａｓヌクレアーゼである。

【０１９４】

いくつかの実施形態において、ゲノム編集ツールは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコー

ドするｍＲＮＡである。いくつかの実施形態において、ゲノム編集ツールは、ＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡである。

【０１９５】

いくつかの実施形態において、ゲノム編集ツールは、脂質核酸アセンブリ組成物中に共カプセル化される、ＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡなどのｍＲＮＡ及びｇＲＮＡ核酸を含む。いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするｍＲＮＡは、第１の脂質核酸アセンブリ組成物中に製剤化され、ｇＲＮＡ核酸は、第２の脂質核酸アセンブリ組成物中に製剤化される。いくつかの実施形態において、第１及び第２の脂質核酸アセンブリ組成物は、同時に投与される。他の実施形態において、第１及び第２の脂質核酸アセンブリ組成物は、逐次的に投与される。いくつかの実施形態において、第１及び第２の脂質核酸アセンブリ組成物は、事前インキュベートステップの前に組み合わされる。いくつかの実施形態において、第１及び第２の脂質核酸アセンブリ組成物は、別々に事前インキュベートされる。

【０１９６】

Ｃａｓヌクレアーゼの由来となり得る非限定的な例示的な種としては、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ、Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｉｎｎｏｃｕａ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｇａｓｓｅｒｉ、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｎｏｖｉｃｉｄａ、Ｗｏｌｉｎｅｌｌａ ｓｕｃｃｉｎｏｇｅｎｅｓ、Ｓｕｔｔｅｒｅｌｌａ ｗａｄｓｗｏｒｔｈｅｎｓｉｓ、Ｇａｍｍａｐｒｏｔｅｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｊｅｊｕｎｉ、Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ ｍｕｌｔｏｃｉｄａ、Ｆｉｂｒｏｂａｃｔｅｒ ｓｕｃｃｉｎｏｇｅｎｅ、Ｒｈｏｄｏｓｐｉｒｉｌｌｕｍ ｒｕｂｒｕｍ、Ｎｏｃａｒｄｉｏｐｓｉｓ ｄａｓｓｏｎｖｉｌｌｅｉ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｐｒｉｓｔｉｎａｅｓｐｉｒａｌｉｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｖｉｒｉｄｏｃｈｒｏｍｏｇｅｎｅｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｖｉｒｉｄｏｃｈｒｏｍｏｇｅｎｅｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｓｐｏｒａｎｇｉｕｍ ｒｏｓｅｕｍ、Ｓｔｒｅｐｔｏｓｐｏｒａｎｇｉｕｍ ｒｏｓｅｕｍ、Ａｌｉｃｙｃｌｏｂａｃｉｌｌｕｓ ａｃｉｄｏｃａｌｄａｒｉｕｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｐｓｅｕｄｏｍｙｃｏｉｄｅｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｅｌｅｎｉｔｉｒｅｄｕｃｅｎｓ、Ｅｘｉｇｕｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｓｉｂｉｒｉｃｕｍ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｓａｌｉｖａｒｉｕｓ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｂｕｃｈｎｅｒｉ、Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｄｅｎｔｉｃｏｌａ、Ｍｉｃｒｏｓｃｉｌｌａ ｍａｒｉｎａ、Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａｌｅｓ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｐｏｌａｒｏｍｏｎａｓ ｎａｐｈｔｈａｌｅｎｉｖｏｒａｎｓ、Ｐｏｌａｒｏｍｏｎａｓ ｓｐ．、Ｃｒｏｃｏｓｐｈａｅｒａ ｗａｔｓｏｎｉｉ、Ｃｙａｎｏｔｈｅｃｅ ｓｐ．、Ｍｉｃｒｏｃｙｓｔｉｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ、Ｓｙｎｅｃｈｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．、Ａｃｅｔｏｈａｌｏｂｉｕｍ ａｒａｂａｔｉｃｕｍ、Ａｍｍｏｎｉｆｅｘ ｄｅｇｅｎｓｉｉ、Ｃａｌｄｉｃｅｌｕｌｏｓｉｒｕｐｔｏｒ ｂｅｃｓｃｉｉ、Ｃａｎｄｉｄａｔｕｓ Ｄｅｓｕｌｆｏｒｕｄｉｓ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ、Ｆｉｎｅｇｏｌｄｉａ ｍａｇｎａ、Ｎａｔｒａｎａｅｒｏｂｉｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ、Ｐｅｌｏｔｏｍａｃｕｌｕｍ ｔｈｅｒｍｏｐｒｏｐｉｏｎｉｃｕｍ、Ａｃｉｄｉｔｈｉｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｃａｌｄｕｓ、Ａｃｉｄｉｔｈｉｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｆｅｒｒｏｏｘｉｄａｎｓ、Ａｌｌｏｃｈｒｏｍａｔｉｕｍ ｖｉｎｏｓｕｍ、Ｍａｒｉｎｏｂａｃｔｅｒ ｓｐ．、Ｎｉｔｒｏｓｏｃｏｃｃｕｓ ｈａｌｏｐｈｉｌｕｓ、Ｎｉｔｒｏｓｏｃｏｃｃｕｓ ｗａｔｓｏｎｉ、Ｐｓｅｕｄｏａｌｔｅｒｏｍｏｎａｓ ｈａｌｏｐｌａｎｋｔｉｓ、Ｋｔｅｄｏｎｏｂａｃｔｅｒ ｒａｃｅｍｉｆｅｒ、Ｍｅｔｈａｎｏｈａｌｏｂｉｕｍ ｅｖｅｓｔｉｇａｔｕｍ、Ａｎａｂａｅｎａ ｖａｒｉａｂｉｌｉｓ、Ｎｏｄｕｌａｒｉａ ｓｐｕｍｉｇｅｎａ、Ｎｏｓｔｏｃ ｓｐ．、Ａｒｔｈｒｏｓｐｉｒａ ｍａｘｉｍａ、Ａｒｔｈｒｏｓｐｉｒａ ｐｌａｔｅｎｓｉｓ、

Ａｒｔｈｒｏｓｐｉｒａ ｓｐ．、Ｌｙｎｇｂｙａ ｓｐ．、Ｍｉｃｒｏｃｏｌｅｕｓ ｃｈｔｈｏｎｏｐｌａｓｔｅｓ、Ｏｓｃｉｌｌａｔｏｒｉａ ｓｐ．、Ｐｅｔｒｏｔｏｇａ ｍｏｂｉｌｉｓ、Ｔｈｅｒｍｏｓｉｐｈｏ ａｆｒｉｃａｎｕｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐａｓｔｅｕｒｉａｎｕｓ、Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｃｉｎｅｒｅａ、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｌａｒｉ、Ｐａｒｖｉｂａｃｕｌｕｍ ｌａｖａｍｅｎｔｉｖｏｒａｎｓ、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｄｉｐｈｔｈｅｒｉａ、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＮＤ２００６、及びＡｃａｒｙｏｃｈｌｏｒｉｓ ｍａｒｉｎａが挙げられる。

【０１９７】

いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ由来のＣａｓ９ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ由来のＣａｓ９ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ由来のＣａｓ９ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ由来のＣａｓ９ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｎｏｖｉｃｉｄａ由来のＣｐｆ１ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．由来のＣｐｆ１ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＮＤ２００６由来のＣｐｆ１ヌクレアーゼである。更なる実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｂｕｔｙｒｉｖｉｂｒｉｏ ｐｒｏｔｅｏｃｌａｓｔｉｃｕｓ、Ｐｅｒｅｇｒｉｎｉｂａｃｔｅｒｉａ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｐａｒｃｕｂａｃｔｅｒｉａ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｓｍｉｔｈｅｌｌａ、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ、Ｃａｎｄｉｄａｔｕｓ Ｍｅｔｈａｎｏｐｌａｓｍａ ｔｅｒｍｉｔｕｍ、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｅｌｉｇｅｎｓ、Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ、Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ ｉｎａｄａｉ、Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ ｃｒｅｖｉｏｒｉｃａｎｉｓ、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｄｉｓｉｅｎｓ、又はＰｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ ｍａｃａｃａｅ由来のＣｐｆ１ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ又はＬａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅからのＣｐｆ１ヌクレアーゼである。

【０１９８】

野生型Ｃａｓ９は、２つのヌクレアーゼドメイン、ＲｕｖＣ及びＨＮＨを有する。ＲｕｖＣドメインは、非標的ＤＮＡ鎖を切断し、ＨＮＨドメインは、ＤＮＡの標的鎖を切断する。いくつかの実施形態において、Ｃａｓ９ヌクレアーゼは、１個より多いＲｕｖＣドメイン及び／又は１個より多いＨＮＨドメインを含む。いくつかの実施形態において、Ｃａｓ９ヌクレアーゼは、野生型Ｃａｓ９である。いくつかの実施形態において、Ｃａｓ９は、標的ＤＮＡにおける二本鎖切断を誘導することができる。いくつかの実施形態において、Ｃａｓヌクレアーゼは、ｄｓＤＮＡを切断してもよく、ｄｓＤＮＡの１つの鎖を切断してもよく、又はＤＮＡクリバーゼ若しくはニッカーゼ活性を有していなくてもよい。

【０１９９】

いくつかの実施形態において、キメラＣａｓヌクレアーゼが使用され、タンパク質の１つのドメイン又は領域が、異なるタンパク質の一部によって置き換えられている。いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼドメインは、Ｆｏｋ１等の異なるヌクレアーゼ由来のドメインで置き換えられてもよい。いくつかの実施形態において、Ｃａｓヌクレアーゼは、修飾ヌクレアーゼであってもよい。

【０２００】

他の実施形態において、Ｃａｓヌクレアーゼ又はＣａｓニッカーゼは、Ｉ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系からのものであり得る。いくつかの実施形態において、Ｃａｓヌクレアーゼは、Ｉ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系のカスケード複合体の構成要素であり得る。いくつかの

実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、Ｃａｓ３タンパク質であり得る。いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、ＩＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系由来であり得る。いくつかの実施形態において、Ｃａｓヌクレアーゼは、ＲＮＡ切断活性を有し得る。

【０２０１】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、一本鎖ニッカーゼ活性を有し、すなわち、１つのＤＮＡ鎖を切断して一本鎖切断（「ニック」としても知られる）を産生することができる。いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、Ｃａｓニッカーゼを含む。ニッカーゼは、ｄｓＤＮＡ内でニックを作製する酵素であり、すなわち、ＤＮＡ二重らせんの一方の鎖を切断するが、他方の鎖を切断しない。いくつかの実施形態では、Ｃａｓニッカーゼは、例えば、触媒ドメイン内の１つ以上の改変（例えば、点変異）によって、エンドヌクレオチド分解活性部位が不活性化されたＣａｓヌクレアーゼ（例えば、上で考察されるＣａｓヌクレアーゼ）の一態様である。例えば、Ｃａｓニッカーゼ及び例示的な触媒ドメイン改変の考察については、米国特許第８，８８９，３５６号を参照のこと。いくつかの実施形態において、Ｃａｓ９ニッカーゼなどのＣａｓニッカーゼは、不活性化されたＲｕｖＣ又はＨＮＨドメインを有する。

【０２０２】

いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、１個の機能的ヌクレアーゼドメインのみを含有するように修飾される。例えば、薬剤タンパク質は、その核酸切断活性を低下させるために、ヌクレアーゼドメインの１つが突然変異されるか、又は完全若しくは部分的に欠失するように修飾されてもよい。いくつかの実施形態では、活性が低下したＲｕｖＣドメインを有するニッカーゼが使用される。いくつかの実施形態では、不活性なＲｕｖＣドメインを有するニッカーゼが使用される。いくつかの実施形態では、活性が低下したＨＮＨドメインを有するニッカーゼが使用される。いくつかの実施形態において、不活性なＨＮＨドメインを有するニッカーゼが使用される。

【０２０３】

いくつかの実施形態において、Ｃａｓタンパク質ヌクレアーゼドメイン内の保存アミノ酸は、ヌクレアーゼ活性を低減させるか、又は改変させるように置換される。いくつかの実施形態において、Ｃａｓヌクレアーゼは、ＲｕｖＣ又はＲｕｖＣ様ヌクレアーゼドメイン内にアミノ酸置換を含み得る。ＲｕｖＣ又はＲｕｖＣ様ヌクレアーゼドメインにおける例示的なアミノ酸置換としては、Ｄ１０Ａ（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９タンパク質に基づく）が挙げられる。例えば、Ｚｅｔｓｃｈｅ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）ＣｅｌｌＯｃｔ　２２：１６３（３）：７５９－７７１を参照のこと。いくつかの実施形態において、Ｃａｓヌクレアーゼは、ＨＮＨ又はＨＮＨ様ヌクレアーゼドメイン内にアミノ酸置換を含み得る。ＨＮＨ又はＨＮＨ様ヌクレアーゼドメインにおける例示的なアミノ酸置換としては、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８６３Ａ、Ｈ９８３Ａ、及びＤ９８６Ａ（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓのＣａｓ９タンパク質に基づく）が挙げられる。例えば、Ｚｅｔｓｃｈｅ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）を参照のこと。更なる例示的なアミノ酸置換としては、Ｄ９１７Ａ、Ｅ１００６Ａ、及びＤ１２５５Ａ（Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ　ｎｏｖｉｃｉｄａ　Ｕ１１２　Ｃｐｆ１（ＦｎＣｐｆ１）配列（ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ－Ａ０Ｑ７Ｑ２（ＣＰＦ１＿ＦＲＡＴＮ）に基づく）が挙げられる。

【０２０４】

いくつかの実施形態では、ニッカーゼをコードするｍＲＮＡは、それぞれ、標的配列のセンス鎖及びアンチセンス鎖に対して相補的な一対のガイドＲＮＡと組み合わせて提供される。この実施形態では、ガイドＲＮＡは、標的配列の反対側の鎖にニックを生成することによって（すなわち、ダブルニッキング）、ニッカーゼを標的配列に指向させ、ＤＳＢを導入する。いくつかの実施形態では、二重ニッキングの使用は、特異性を改善し、オフターゲット効果を低減し得る。いくつかの実施形態では、ニッカーゼは、ＤＮＡの反対側の鎖を標的とする２つの別個のガイドＲＮＡとともに使用され、標的ＤＮＡ内に二重ニックを生成する。いくつかの実施形態において、ニッカーゼは、ごく接近した位置にあるように選択された２つの別個のガイドＲＮＡとともに使用され、標的ＤＮＡ内にダブルニッ

クを産生する。
【０２０５】
いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、クリバーゼ活性及びニッカーゼ活性を欠いている。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、ｄＣａｓ　ＤＮＡ結合ポリペプチドを含む。ｄＣａｓポリペプチドは、触媒（切断／ニッカーゼ）活性を本質的に欠く一方で、ＤＮＡ結合活性を有する。いくつかの実施形態において、ｄＣａｓポリペプチドは、ｄＣａｓ９ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、クリバーゼ活性及びニッカーゼ活性を欠くＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、又はｄＣａｓ　ＤＮＡ結合ポリペプチドは、例えば、その触媒ドメイン内の１つ以上の改変（例えば、点変異）によって、そのエンドヌクレオチド分解活性部位が不活性化されたＣａｓヌクレアーゼ（例えば、上で考察されるＣａｓヌクレアーゼ）の一態様である。例えば、ＵＳ２０１４／０１８６９５８Ａ１、ＵＳ２０１５／０１６６９８０Ａ１を参照のこと。
【０２０６】
いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、ＡＰＯＢＥＣ３デアミナーゼを含む。いくつかの実施形態において、ＡＰＯＢＥＣ３デアミナーゼは、ＡＰＯＢＥＣ３Ａ（Ａ３Ａ）である。いくつかの実施形態において、Ａ３Ａは、ヒトＡ３Ａである。いくつかの実施形態において、Ａ３Ａは、野生型Ａ３Ａである。
【０２０７】
いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、エディタを含む。例示的なエディタは、ＸＴＥＮリンカーによってＳ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ－Ｄ１０Ａ　Ｃａｓ９ニッカーゼに融合されたＨ．ｓａｐｉｅｎｓ　ＡＰＯＢＥＣ３Ａを含むＢＣ２２ｎである。
【０２０８】
いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、１つ以上の異種機能ドメインを含む（例えば、融合ポリペプチドであるか、又は融合ポリペプチドを含む）。
【０２０９】
いくつかの実施形態において、異種機能ドメインは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の細胞核への輸送を促進し得る。例えば、異種機能ドメインは、核局在化シグナル（ＮＬＳ）であり得る。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、１～１０個のＮＬＳと融合され得る。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、１～５個のＮＬＳと融合され得る。いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、１個のＮＬＳと融合され得る。１個のＮＬＳが使用される場合、ＮＬＳは、ＲＮＡ誘導ＤＮＡ結合剤の配列のＮ末端部又はＣ末端部で融合され得る。これをＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の配列内に挿入することもできる。他の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、１個より多いＮＬＳと融合され得る。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、２、３、４、又は５個のＮＬＳと融合され得る。いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、２個のＮＬＳと融合され得る。いくつかの状況では、２個のＮＬＳは、同じ（例えば、２個のＳＶ４０　ＮＬＳ）であってもよく、又は異なっていてもよい。いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、カルボキシ末端部で融合した２個のＮＬＳ配列（例えば、ＳＶ４０）に融合される。いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、２個のＮＬＳと融合していてもよく、１つはＮ末端部に連結しており、１つはＣ末端部に連結している。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、３個のＮＬＳと融合され得る。いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、ＮＬＳなしで融合され得る。いくつかの実施形態では、ＮＬＳは、例えば、ＳＶ４０　ＮＬＳ、ＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号２３）又はＰＫＫＫＲＲＶ（配列番号２４）等の単一部分配列であってもよい。いくつかの実施形態では、ＮＬＳは、ヌクレオプラズミンのＮＬＳ、ＫＲＰＡＡＴＫＫＡＧＱＡＫＫＫＫ（配列番号２５）等の二部分配列であってもよい。特定の実施形態では、単一のＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号２３）ＮＬＳは、ＲＮＡ誘導ＤＮＡ結合剤のＣ末端部において融合され得る。１つ以上のリンカーは、任意選択により、融合部位に含まれる。
【０２１０】

いくつかの実施形態において、異種機能ドメインは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の細胞内半減期を修正することができる。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の半減期が増加し得る。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の半減期が低減し得る。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の安定性を増加させることができる。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の安定性を低減させることができる。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、タンパク質分解のシグナルペプチドとして機能し得る。いくつかの実施形態では、タンパク質分解は、例えば、プロテアソーム、リソソームプロテアーゼ、又はカルペインプロテアーゼ等のタンパク質分解酵素によって媒介され得る。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、ＰＥＳＴ配列を含み得る。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、ユビキチン又はポリユビキチン鎖の付加によって修飾され得る。いくつかの実施形態において、ユビキチンは、ユビキチン様タンパク質（ＵＢＬ）であってもよい。ユビキチン様タンパク質の非限定的な例としては、小さなユビキチン様修飾因子（ＳＵＭＯ）、ユビキチン交差反応性タンパク質（ＵＣＲＰ、インターフェロン刺激遺伝子－１５（ＩＳＧ１５）としても知られる）、ユビキチン関連修飾因子－１（ＵＲＭ１）、神経前駆細胞が発現する発達的に下方制御されたタンパク質－８（ＮＥＤＤ８、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅにおいてＲｕｂ１とも呼ばれる）、ヒト白血球抗原Ｆ関連（ＦＡＴ１０）、オートファジー－８（ＡＴＧ８）及び－１２（ＡＴＧ１２）、Ｆａｕユビキチン様タンパク質（ＦＵＢ１）、膜固定ＵＢＬ（ＭＵＢ）、ユビキチン折りたたみ修飾因子－１（ＵＦＭ１）、及びユビキチン様タンパク質－５（ＵＢＬ５）が挙げられる。

【０２１１】

いくつかの実施形態において、異種機能ドメインは、マーカードメインであってもよい。マーカードメインの非限定的な例としては、蛍光タンパク質、精製タグ、エピトープタグ、及びレポーター遺伝子配列が挙げられる。いくつかの実施形態において、マーカードメインは、蛍光タンパク質であってもよい。好適な蛍光タンパク質の非限定的な例としては、緑色蛍光タンパク質（例えば、ＧＦＰ、ＧＦＰ－２、ｔａｇＧＦＰ、ｔｕｒｂｏＧＦＰ、ｓｆＧＦＰ、ＥＧＦＰ、Ｅｍｅｒａｌｄ、Ａｚａｍｉ　Ｇｒｅｅｎ、Ｍｏｎｏｍｅｒｉｃ　Ａｚａｍｉ　Ｇｒｅｅｎ、ＣｏｐＧＦＰ、ＡｃｅＧＦＰ、ＺｓＧｒｅｅｎ１）、黄色蛍光タンパク質（例えば、ＹＦＰ、ＥＹＦＰ、Ｃｉｔｒｉｎｅ、Ｖｅｎｕｓ、ＹＰｅｔ、ＰｈｉＹＦＰ、ＺｓＹｅｌｌｏｗ１）、青色蛍光タンパク質（例えば、ＥＢＦＰ、ＥＢＦＰ２、Ａｚｕｒｉｔｅ、ｍＫａｌａｍａｌ、ＧＦＰｕｖ、Ｓａｐｐｈｉｒｅ、Ｔ－ｓａｐｐｈｉｒｅ）、シアン蛍光タンパク質（例えば、ＥＣＦＰ、Ｃｅｒｕｌｅａｎ、ＣｙＰｅｔ、ＡｍＣｙａｎ１、Ｍｉｄｏｒｉｉｓｈｉ－Ｃｙａｎ）、赤色蛍光タンパク質（例えば、ｍＫａｔｅ、ｍＫａｔｅ２、ｍＰｌｕｍ、ＤｓＲｅｄモノマー、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｍＲＦＰ１、ＤｓＲｅｄ－Ｅｘｐｒｅｓｓ、ＤｓＲｅｄ２、ＤｓＲｅｄ－Ｍｏｎｏｍｅｒ、ＨｃＲｅｄ－Ｔａｎｄｅｍ、ＨｃＲｅｄ１、ＡｓＲｅｄ２、ｅｑＦＰ６１１、ｍＲａｓｂｅｒｒｙ、ｍＳｔｒａｗｂｅｒｒｙ、Ｊｒｅｄ）、及び橙色蛍光タンパク質（ｍＯｒａｎｇｅ、ｍＫＯ、Ｋｕｓａｂｉｒａ－Ｏｒａｎｇｅ、Ｍｏｎｏｍｅｒｉｃ　Ｋｕｓａｂｉｒａ－Ｏｒａｎｇｅ、ｍＴａｎｇｅｒｉｎｅ、ｔｄＴｏｍａｔｏ）、又は任意の他の好適な蛍光タンパク質が挙げられる。他の実施形態において、マーカードメインは、精製タグ及び／又はエピトープタグであってもよい。非限定的な例示的なタグとしては、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、キチン結合タンパク質（ＣＢＰ）、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、チオレドキシン（ＴＲＸ）、ポリ（ＮＡＮＰ）、タンデムアフィニティ精製（ＴＡＰ）タグ、ｍｙｃ、ＡｃＶ５、ＡＵ１、ＡＵ５、Ｅ、ＥＣＳ、Ｅ２、ＦＬＡＧ、ＨＡ、ｎｕｓ、Ｓｏｆｔａｇ１、Ｓｏｆｔａｇ３、Ｓｔｒｅｐ、ＳＢＰ、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ、ＨＳＶ、ＫＴ３、Ｓ、Ｓ１、Ｔ７、Ｖ５、ＶＳＶ－Ｇ、６ｘＨｉｓ、８ｘＨｉｓ、ビオチンカルボキシル担体タンパク質（ＢＣＣＰ）、ポリ－Ｈｉｓ、及びカルモジュリンが挙げられる。非限定的な例示的なレポーター遺伝子としては、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）、β－ガラクトシダーゼ、β－グル

クロニダーゼ、ルシフェラーゼ、又は蛍光タンパク質が挙げられる。

【０２１２】

追加の実施形態において、異種機能ドメインは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を特異的なオルガネラ、細胞型、組織、又は臓器に標的化し得る。いくつかの実施形態において、異種機能ドメインは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をミトコンドリアに標的化し得る。

【０２１３】

更なる実施形態において、異種機能ドメインは、エディタドメインなどのエフェクタドメインであり得る。ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤がその標的配列に指向されるとき、例えば、Ｃａｓヌクレアーゼが、ｇＲＮＡによって標的配列に指向されるとき、エディタドメインなどのエフェクタドメインは、標的配列を修飾するか、又は影響を及ぼし得る。いくつかの実施形態において、エディタドメインなどのエフェクタドメインは、核酸結合ドメイン、ヌクレアーゼドメイン（例えば、非Ｃａｓヌクレアーゼドメイン）、エピジェネティック修飾ドメイン、転写活性化ドメイン、又は転写抑制ドメインから選択され得る。いくつかの実施形態において、異種機能ドメインは、ヌクレアーゼ、例えばＦｏｋＩヌクレアーゼである。例えば、米国特許第９，０２３，６４９号を参照のこと。いくつかの実施形態において、異種機能ドメインは、転写活性化因子又は転写抑制因子である。例えば、Ｑｉ ｅｔ ａｌ．，“Ｒｅｐｕｒｐｏｓｉｎｇ ＣＲＩＳＰＲ ａｓ ａｎ ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ ｐｌａｔｆｏｒｍ ｆｏｒ ｓｅｑｕｅｎｃｅ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｃｏｎｔｒｏｌ ｏｆ ｇｅｎｅ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ，”Ｃｅｌｌ １５２：１１７３－８３（２０１３）、Ｐｅｒｅｚ－Ｐｉｎｅｒａ ｅｔ ａｌ．，“ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ ｇｅｎｅ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ ｂｙ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９－ｂａｓｅｄ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ｆａｃｔｏｒｓ，”Ｎａｔ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １０：９７３－６（２０１３）、Ｍａｌｉ ｅｔ ａｌ．，“ＣＡＳ９ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎａｌ ａｃｔｉｖａｔｏｒｓ ｆｏｒ ｔａｒｇｅｔ ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ ａｎｄ ｐａｉｒｅｄ ｎｉｃｋａｓｅｓ ｆｏｒ ｃｏｏｐｅｒａｔｉｖｅ ｇｅｎｏｍｅ ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，”Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．３１：８３３－８（２０１３）、Ｇｉｌｂｅｒｔ ｅｔ ａｌ．，“ＣＲＩＳＰＲ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｍｏｄｕｌａｒ ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ｉｎ ｅｕｋａｒｙｏｔｅｓ，”Ｃｅｌｌ １５４：４４２－５１（２０１３）を参照のこと。したがって、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、本質的に、ガイドＲＮＡを使用して所望の標的配列に結合するように指向され得る転写因子になる。いくつかの実施形態において、ＤＮＡ修飾ドメインは、脱メチル化ドメイン又はメチルトランスフェラーゼドメインなどのメチル化ドメインである。いくつかの実施形態において、エフェクタドメインは、塩基編集ドメインなどのＤＮＡ修飾ドメインである。特定の実施形態において、ＤＮＡ修飾ドメインは、ＤＮＡに特異的修飾、例えばデアミナーゼドメインを導入する核酸編集ドメインである。例えば、ＷＯ２０１５／０８９４０６、ＵＳ ２０１６／０３０４８４６を参照のこと。ＷＯ２０１５／０８９４０６及びＵ．Ｓ．２０１６／０３０４８４６に記載されている核酸編集ドメイン、デアミナーゼドメイン、及びＣａｓ９バリアントは、参照により本明細書に組み込まれる。

【０２１４】

ヌクレアーゼは、ガイドＲＮＡ（「ｇＲＮＡ」）と相互作用する少なくとも１つのドメインを含み得る。加えて、ヌクレアーゼは、ｇＲＮＡによって標的配列に指向され得る。クラス２Ｃａｓヌクレアーゼ系において、ｇＲＮＡは、ヌクレアーゼ及び標的配列と相互作用し、その結果、ｇＲＮＡは、標的配列への結合を指向する。いくつかの実施形態において、ｇＲＮＡは、標的化された開裂に対する特異性を提供し、ヌクレアーゼは、汎用性があり、異なるｇＲＮＡと対になり、異なる標的配列を切断し得る。クラス２Ｃａｓヌクレアーゼは、上に列挙されるタイプ、オルソログ、及び例示的な種のｇＲＮＡ足場構造と対になり得る。

【０２１５】

Ｂ．追加のゲノム編集系ツール

いくつかの実施形態において、ゲノム編集ツールは、ジンクフィンガーヌクレアーゼ系、ＴＡＬＥＮ系、及びメガヌクレアーゼ系から選択されるゲノム編集系の構成要素である。いくつかの実施形態において、ゲノム編集ツールは、そのようなゲノム編集系のうちの１つ以上の構成要素をコードする核酸である。この系の例示的な構成要素には、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、ＴＡＬＥＮＳ、及びそれらのフラグメントが含まれる。

【０２１６】

いくつかの実施形態において、遺伝子編集系は、ＴＡＬＥＮ系である。転写活性化因子様エフェクタヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）は、ＤＮＡの特定の配列を切断するように操作することができる制限酵素である。これらは、ＴＡＬエフェクタＤＮＡ結合ドメインをＤＮＡ切断ドメイン（ＤＮＡ鎖を切断するヌクレアーゼ）に融合することによって作製される。転写活性化因子様エフェクタ（ＴＡＬＥ）を操作して、所望のＤＮＡ配列に結合し、特定の位置でのＤＮＡ切断を促進し得る（例えば、Ｂｏｃｈ，２０１１，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈを参照）。制限酵素は、遺伝子編集における使用のために、又は操作されたヌクレアーゼによるゲノム編集として知られている技術である系中でのゲノム編集のために、細胞内に導入され得る。そのような方法、及びその中で使用するための組成物は、当該技術分野において既知である。例えば、その内容がその全体において本明細書に組み込まれるＷＯ２０１９／１４７８０５、ＷＯ２０１４／０４０３７０、ＷＯ２０１８／０７３３９３を参照のこと。

【０２１７】

いくつかの実施形態において、遺伝子編集系は、ジンクフィンガー系である。ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）は、ジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメインをＤＮＡ開裂ドメインに融合することによって生成される人工制限酵素である。ジンクフィンガードメインは、特定の所望のＤＮＡ配列を標的化するように操作して、ジンクフィンガーヌクレアーゼが複合体ゲノム内の独自の配列を標的化することを可能にすることができる。ＩＩｓ型制限エンドヌクレアーゼＦｏｋＩからの非特異的開裂ドメインは、典型的には、ＺＦＮにおける開裂ドメインとして使用される。開裂は、内因性ＤＮＡ修復機構によって修復され、ＺＦＮが高等生物のゲノムを正確に改変させることを可能にする。そのような方法、及びその中で使用するための組成物は、当該技術分野において既知である。例えば、その内容がその全体において本明細書に組み込まれるＷＯ２０１１／０９１３２４を参照のこと。

【０２１８】

Ｖ．脂質核酸アセンブリ組成物のための例示的な核酸

いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、核酸（又はポリヌクレオチド）を細胞に送達する。いくつかの実施形態において、核酸は、従来のＲＮＡ、ＤＮＡ、混合ＲＮＡ－ＤＮＡ、及びそれらの類似体であるポリマーを含む、骨格に沿って一緒に連結された窒素系複素環式塩基又は塩基類似体を有するヌクレオシド又はヌクレオシド類似体を含む。

【０２１９】

Ａ．修飾核酸

いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、修飾されたＲＮＡを含む。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、修飾されたＤＮＡを含む。

【０２２０】

修飾されたヌクレオシド又はヌクレオチドは、ＲＮＡ、例えば、ｇＲＮＡ又はｍＲＮＡに存在することができる。例えば、１つ以上の修飾されたヌクレオシド又はヌクレオチドを含むｇＲＮＡ又はｍＲＮＡは、「修飾された」ＲＮＡと呼ばれ、標準的なＡ、Ｇ、Ｃ、及びＵ残基の代わりに又はそれらに加えて使用される１つ以上の非天然の及び／又は天然に存在する構成要素又は配置の存在を説明する。いくつかの実施形態において、修飾されたＲＮＡは、非標準的なヌクレオシド又はヌクレオチドによって合成され、本明細書では

「修飾された」と呼ばれる。

【０２２１】

修飾ヌクレオシド又はヌクレオチドは、（ｉ）ホスホジエステル骨格結合における改変、例えば、非架橋のリン酸酸素の１つ若しくは両方、及び／又は、架橋リン酸酸素の１つ以上の置き換え（例示的な骨格修飾）、（ｉｉ）リボース糖の成分、例えば、リボース糖の２’ヒドロキシルの改変、例えば、置き換え（例示的な糖修飾）、（ｉｉｉ）リン酸部分の「脱リン酸型」リンカーによる大規模な置き換え（例示的な骨格修飾）、（ｉｖ）非標準的な核酸塩基によるものを含め、天然に存在する核酸塩基の修飾又は置き換え（例示的な塩基修飾）、（ｖ）リボースリン酸骨格の置き換え又は修飾（例示的な骨格修飾）、（ｖｉ）オリゴヌクレオチドの３’末端又は５’末端の修飾、例えば、末端リン酸基の除去、修飾若しくは置き換え、又は部分、キャップ、若しくはリンカーのコンジュゲーション（そのような３’又は５’のキャップ修飾は、糖及び／又は骨格の修飾を含み得る）、並びに（ｖｉｉ）糖の修飾又は置き換え（例示的な糖修飾）の１つ以上を含み得る。ある特定の実施形態は、ｍＲＮＡ、ｇＲＮＡ、又は核酸に対する５’末端修飾を含む。ある特定の実施形態は、ｍＲＮＡ、ｇＲＮＡ、又は核酸に対する３’末端修飾を含む。修飾されたＲＮＡは、５’末端及び３’末端修飾を含み得る。修飾されたＲＮＡは、非末端位置に１つ以上の修飾された残基を含み得る。いくつかの実施形態において、ｇＲＮＡには、少なくとも１つの修飾された残基が含まれる。いくつかの実施形態において、ｍＲＮＡには、少なくとも１つの修飾された残基が含まれる。

【０２２２】

本明細書で使用される場合、第２の配列に対する第１の配列のアラインメントにより、第２の配列の位置の全体でのＸ％以上が第１の配列によって一致することが示される場合、第１の配列は、第２の配列と「少なくともＸ％の同一性を有する配列を含む」とみなされる。例えば、配列ＡＡＧＡは、配列ＡＡＧと１００％の同一性を有する配列を含むが、その理由は、アラインメントが、第２の配列の３つの全ての位置において一致があるという点で１００％の同一性を与えるからである。ＲＮＡとＤＮＡとの間の差（一般に、チミジンをウリジンに交換すること、又はその逆）、及び修飾ウリジン等のヌクレオシド類似体の存在は、関連するヌクレオチド（チミジン、ウリジン、又は修飾ウリジン等）が同じ相補体（例えば、チミジン、ウリジン、又は修飾ウリジンの全てについてのアデノシン；別の例は、シトシン及び５－メチルシトシンであり、これらの両方が相補体としてグアノシン又は修飾グアノシンを有する）を有する限り、ポリヌクレオチド間の同一性又は相補性の差に寄与しない。したがって、例えば、Ｘが任意の修飾ウリジン、例えば、シュードウリジン、Ｎ１－メチルシュードウリジン、又は５－メトキシウリジンである配列５’－ＡＸＧは、両方とも同じ配列（５’－ＣＡＵ）に完全に相補的である点において、ＡＵＧと１００％同一であるとみなされる。例示的なアライメントアルゴリズムは、当該技術分野において周知である、Ｓｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎ及びＮｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアルゴリズムである。当業者は、アラインメントされる配列の所与の対について、どのようなアルゴリズム及びパラメータ設定の設定が適切であることを理解するであろう。一般的に類似する長さ及び予想される同一性がアミノ酸については５０％超の配列、又はヌクレオチドについては７５％超の配列に関して、ｗｗｗ．ｅｂｉ．ａｃ．ｕｋウェブサーバでＥＢＩによって提供されるＮｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアルゴリズムインターフェースのデフォルト設定を用いたＮｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアルゴリズムが一般的に適切である。

【０２２３】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される組成物又は製剤は、例えば、本明細書に記載のＣａｓヌクレアーゼ又はクラス２ＣａｓヌクレアーゼなどのＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするＯＲＦなどの、オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を含むｍＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼ又はクラス２　ＣａｓヌクレアーゼなどのＲＮＡ誘導ＤＮＡ結合剤をコードするＯＲＦを含むｍＲＮＡが提供され、使用され、又は投与される。いくつかの実施形態において、ＯＲＦは、コドン最適化さ

れる。いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするＯＲＦは、「修飾されたＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤ＯＲＦ」又は単に「修飾されたＯＲＦ」であり、ＯＲＦが以下の方法のうちの１つ以上において修飾されていることを示すための略語として使用される。（１）修飾されたＯＲＦは、その最小ウリジン含有量から最小ウリジン含有量の１５０％までの範囲であるウリジン含有量を有する；（２）修飾されたＯＲＦは、その最小ウリジンジヌクレオチド含有量から最小ウリジンジヌクレオチド含有量の１５０％までの範囲であるウリジンジヌクレオチド含有量を有する；（３）修飾されたＯＲＦは、表８９のＣａｓＯＲＦのいずれかのうちの任意の１つと少なくとも９０％の同一性を有する；（４）修飾されたＯＲＦは、コドンのうちの少なくとも７５％が、所与のアミノ酸についての最小ウリジンコドンである、例えば、最も少ないウリジンを有するコドン（通常、フェニルアラニンについてのコドンを除いて０又は１であり、最小ウリジンコドンは２つのウリジンを有する）である、コドンのセットからなる；又は（５）修飾されたＯＲＦは、少なくとも１つの修飾ウリジンを含む。いくつかの実施形態において、修飾されたＯＲＦは、前述の方法のうちの少なくとも２つ、３つ、又は４つにおいて修飾される。いくつかの実施形態において、修飾されたＯＲＦは、少なくとも１つの修飾ウリジンを含み、上記（１）～（４）のうちの少なくとも１つ、２つ、３つ、又は全てにおいて修飾される。

【０２２４】

「修飾ウリジン」は、本明細書では、ウリジンと同じ水素結合受容体を有し、ウリジンとは１つ以上の構造的差異を有する、チミジン以外のヌクレオシドを指すために使用される。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、置換ウリジン、すなわち、１つ以上の非プロトン置換基（例えば、アルコキシ、例えば、メトキシ）がプロトンの代わりに置かれるウリジンである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、シュードウリジンである。いくつかの実施形態において、修飾シュードウリジンは、置換シュードウリジン、すなわち、１つ以上の非プロトン置換基（例えば、アルキル、例えば、メチル）がプロトンの代わりに置かれるシュードウリジンである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、置換ウリジン、シュードウリジン、又は置換シュードウリジンのうちのいずれかである。

【０２２５】

本明細書で使用される「ウリジン位置」は、ウリジン又は修飾ウリジンによって占有されるポリヌクレオチド中の位置を指す。したがって、例えば、「ウリジン位置の１００％が修飾ウリジンである」ポリヌクレオチドは、同じ配列の従来のＲＮＡ（全ての塩基が標準的なＡ、Ｕ、Ｃ、又はＧ塩基である）中のウリジンであり得る全ての位置に修飾ウリジンを含有する。別に指示されない限り、本開示中又はそれに付随する配列表（ｓｅｑｕｅｎｃｅ　ｔａｂｌｅ）又は配列表（ｓｅｑｕｅｎｃｅ　ｌｉｓｔｉｎｇ）のポリヌクレオチド配列中のＵは、ウリジン又は修飾ウリジンであり得る。

【０２２６】

最小ウリジンコドン：

【表１】

	アミノ酸	最小ウリジンコドン
A	アラニン	GCA 又は GCC 又は GCG
G	グリシン	GGA 又は GGC 又は GGG
V	バリン	GUC 又は GUA 又は GUG
D	アスパラギン酸	GAC
E	グルタミン酸	GAA 又は GAG
I	イソロイシン	AUC 又は AUA 又は AUG
T	トレオニン	ACA 又は ACC 又は ACG
N	アスパラギン	AAC
K	リジン	AAG 又は AAA
S	セリン	AGC
R	アルギニン	AGA 又は AGG
L	ロイシン	CUG 又は CUA 又は CUC
P	プロリン	CCG 又は CCA 又は CCC
H	ヒスチジン	CAC 又は CAA 又は CAG
Q	グルタミン	CAG 又は CAA
F	フェニルアラニン	UUC
Y	チロシン	UAC
C	システイン	UGC
W	トリプトファン	UGG
M	メチオニン	AUG

【０２２７】
前述の実施形態のいずれかにおいて、修飾ＯＲＦは、コドンのうちの少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、又は１００％が、最小ウリジンコドンの上記表において列挙されるコドンである、コドンのセットからなり得る。前述の実施形態のいずれかにおいて、修飾ＯＲＦは、表８９のＣａｓ ＯＲＦのうちのいずれか１つと少なくとも９０％、９５％、９８％、９９％、又は１００％の同一性を有する配列を含み得る。
【０２２８】
前述の実施形態のいずれかにおいて、修飾ＯＲＦは、その最小ウリジン含有量から最小ウリジン含有量の１５０％、１４５％、１４０％、１３５％、１３０％、１２５％、１２０％、１１５％、１１０％、１０５％、１０４％、１０３％、１０２％、又は１０１％までの範囲である、ウリジン含有量を有し得る。
【０２２９】
前述の実施形態のいずれかにおいて、修飾ＯＲＦは、その最小ウリジンジヌクレオチド含有量から最小ウリジンジヌクレオチド含有量の１５０％、１４５％、１４０％、１３５％、１３０％、１２５％、１２０％、１１５％、１１０％、１０５％、１０４％、１０３％、１０２％、又は１０１％までの範囲である、ウリジンジヌクレオチド含有量を有し得る。
【０２３０】

前述の実施形態のいずれかにおいて、修飾ＯＲＦは、少なくとも１つ、複数、又は全てのウリジン位置に、修飾ウリジンを含み得る。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、例えば、ハロゲン、メチル、又はエチルで、５位で修飾されたウリジンである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、例えば、ハロゲン、メチル、又はエチルで、１位で修飾されたプソイドウリジンである。修飾ウリジンは、例えば、シュードウリジン、Ｎ１－メチル－シュードウリジン、５－メトキシウリジン、５－ヨードウリジン、又はそれらの組み合わせであり得る。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、５－メトキシウリジンである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、５－ヨードウリジンである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、プソイドウリジンである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、Ｎ１－メチル－プソイドウリジンである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、プソイドウリジンとＮ１－メチル－プソイドウリジンの組み合わせである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、プソイドウリジンと５－メトキシウリジンの組み合わせである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、Ｎ１－メチルプソイドウリジンと５－メトキシウリジンの組み合わせである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、５－ヨードウリジンとＮ１－メチル－プソイドウリジンの組み合わせである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、プソイドウリジンと５－ヨードウリジンの組み合わせである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、５－ヨードウリジンと５－メトキシウリジンとの組み合わせである。

【０２３１】

いくつかの実施形態において、本開示によるｍＲＮＡ中のウリジン位置の少なくとも１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、又は１００％は、修飾ウリジンである。いくつかの実施形態において、本開示によるｍＲＮＡ中のウリジン位置の１０％～２５％、１５～２５％、２５～３５％、３５～４５％、４５～５５％、５５～６５％、６５～７５％、７５～８５％、８５～９５％、又は９０～１００％は、修飾ウリジン、例えば、５－メトキシウリジン、５－ヨードウリジン、Ｎ１－メチルシュードウリジン、シュードウリジン、又はそれらの組み合わせである。いくつかの実施形態において、本開示によるｍＲＮＡ中のウリジン位置の１０％～２５％、１５～２５％、２５～３５％、３５～４５％、４５～５５％、５５～６５％、６５～７５％、７５～８５％、８５～９５％、又は９０～１００％は、５－メトキシウリジンである。いくつかの実施形態において、本開示によるｍＲＮＡ中のウリジン位置の１０％～２５％、１５～２５％、２５～３５％、３５～４５％、４５～５５％、５５～６５％、６５～７５％、７５～８５％、８５～９５％、又は９０～１００％は、シュードウリジンである。いくつかの実施形態において、本開示によるｍＲＮＡ中のウリジン位置の１０％～２５％、１５～２５％、２５～３５％、３５～４５％、４５～５５％、５５～６５％、６５～７５％、７５～８５％、８５～９５％、又は９０～１００％は、Ｎ１－メチルシュードウリジンである。いくつかの実施形態において、本開示によるｍＲＮＡ中のウリジン位置の１０％～２５％、１５～２５％、２５～３５％、３５～４５％、４５～５５％、５５～６５％、６５～７５％、７５～８５％、８５～９５％、又は９０～１００％は、５－ヨードウリジンである。いくつかの実施形態において、本開示によるｍＲＮＡ中のウリジン位置の１０％～２５％、１５～２５％、２５～３５％、３５～４５％、４５～５５％、５５～６５％、６５～７５％、７５～８５％、８５～９５％、又は９０～１００％は、５－メトキシウリジンであり、残りは、Ｎ１－メチルシュードウリジンである。いくつかの実施形態において、本開示によるｍＲＮＡ中のウリジン位置の１０％～２５％、１５～２５％、２５～３５％、３５～４５％、４５～５５％、５５～６５％、６５～７５％、７５～８５％、８５～９５％、又は９０～１００％は、５－ヨードウリジンであり、残りは、Ｎ１－メチルシュードウリジンである。

【０２３２】

前述の実施形態のいずれかにおいて、修飾されたＯＲＦは、可能な最小ウリジンジヌクレオチド（ＵＵ）含有量、例えば、（ａ）全ての位置で最小ウリジンコドン（上述のとお

り）を使用し、（ｂ）所与のＯＲＦと同じアミノ酸配列をコードするＯＲＦなどの、低減されたウリジンジヌクレオチド含有量を含み得る。ウリジンジヌクレオチド（ＵＵ）含有量は、ＯＲＦ中のＵＵジヌクレオチドの数え上げとして、又はウリジンジヌクレオチドのウリジンによって占められる位置の割合として、割合に基づいて、絶対的な用語で表現することができる（例えば、ＡＵＵＡＵは、５個の位置のうちの２個が、ウリジンジヌクレオチドのウリジンによって占められているため、ウリジンジヌクレオチド含有量は４０％である）。修飾ウリジン残基は、最小ウリジンジヌクレオチド含有量を評価する目的でウリジンと同等であるとみなされる。

【０２３３】

いくつかの実施形態において、ｍＲＮＡは、発現された哺乳動物ｍＲＮＡ、例えば、構成的に発現されたｍＲＮＡからの少なくとも１つのＵＴＲを含む。ｍＲＮＡが、健康な成体哺乳動物の少なくとも１つの組織において連続的に転写される場合、ｍＲＮＡは、哺乳動物において構成的に発現されるとみなされる。いくつかの実施形態において、ｍＲＮＡは、発現された哺乳動物ＲＮＡ、例えば、構成的に発現された哺乳動物ｍＲＮＡからの５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲ、又は５’及び３’ＵＴＲを含む。アクチンｍＲＮＡは、構成的に発現されたｍＲＮＡの一例である。

【０２３４】

いくつかの実施形態において、ｍＲＮＡは、ヒドロキシステロイド１７－ベータデヒドロゲナーゼ４（ＨＳＤ１７Ｂ４又はＨＳＤ）からの少なくとも１つのＵＴＲ、例えば、ＨＳＤからの５’ＵＴＲを含む。いくつかの実施形態において、ｍＲＮＡは、グロビンｍＲＮＡ、例えば、ヒトアルファグロビン（ＨＢＡ）ｍＲＮＡ、ヒトベータグロビン（ＨＢＢ）ｍＲＮＡ、又はＸｅｎｏｐｕｓ　ｌａｅｖｉｓベータグロビン（ＸＢＧ）ｍＲＮＡからの少なくとも１つのＵＴＲを含む。いくつかの実施形態において、ｍＲＮＡは、グロビンｍＲＮＡ、例えば、ＨＢＡ、ＨＢＢ、又はＸＢＧからの５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲ、又は５’及び３’ＵＴＲを含む。いくつかの実施形態において、ｍＲＮＡは、ウシ成長ホルモン、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、マウスＨｂａ－ａ１、ＨＳＤ、アルブミン遺伝子、ＨＢＡ、ＨＢＢ、又はＸＢＧからの５’ＵＴＲを含む。いくつかの実施形態において、ｍＲＮＡは、ウシ成長ホルモン、サイトメガロウイルス、マウスＨｂａ－ａ１、ＨＳＤ、アルブミン遺伝子、ＨＢＡ、ＨＢＢ、又はＸＢＧからの３’ＵＴＲを含む。いくつかの実施形態において、ｍＲＮＡは、ウシ成長ホルモン、サイトメガロウイルス、マウスＨｂａ－ａ１、ＨＳＤ、アルブミン遺伝子、ＨＢＡ、ＨＢＢ、ＸＢＧ、熱ショックタンパク質９０（Ｈｓｐ９０）、グリセルアルデヒド３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＡＰＤＨ）、ベータ－アクチン、アルファ－チューブリン、腫瘍タンパク質（ｐ５３）、又は上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）からの５’及び３’ＵＴＲを含む。

【０２３５】

いくつかの実施形態において、ｍＲＮＡは、同じ供給源、例えば、アクチン、アルブミン、又はＨＢＡ、ＨＢＢ、若しくはＸＢＧなどのグロビンなどの構成的に発現されたｍＲＮＡからのものである５’及び３’ＵＴＲを含む。

【０２３６】

いくつかの実施形態において、ｍＲＮＡは、５’ＵＴＲを含まず、例えば、５’キャップと開始コドンとの間に追加のヌクレオチドは存在しない。いくつかの実施形態において、ｍＲＮＡは、５’キャップと開始コドンとの間にＫｏｚａｋ配列（以下に記載される）を含むが、任意の追加の５’ＵＴＲを有しない。いくつかの実施形態において、ｍＲＮＡは、３’ＵＴＲを含まず、例えば、終止コドンとポリＡテールとの間に追加のヌクレオチドは存在しない。

【０２３７】

いくつかの実施形態において、ｍＲＮＡは、Ｋｏｚａｋ配列を含む。Ｋｏｚａｋ配列は、ｍＲＮＡから翻訳されるポリペプチドの翻訳開始及び全収率に影響を及ぼす可能性がある。Ｋｏｚａｋ配列は、開始コドンとして機能し得るメチオニンコドンを含む。最小Ｋｏｚａｋ配列は、ＮＮＮＲＵＧＮであり、以下のうちの少なくとも１つが真である。第１の

ＮがＡ又はＧであり、第２のＮがＧである。ヌクレオチド配列の文脈において、Ｒは、プリン（Ａ又はＧ）を意味する。いくつかの実施形態において、Ｋｏｚａｋ配列は、ＲＮＮＲＵＧＮ、ＮＮＮＲＵＧＧ、ＲＮＮＲＵＧＧ、ＲＮＮＡＵＧＮ、ＮＮＮＡＵＧＧ、又はＲＮＮＡＵＧＧである。いくつかの実施形態において、Ｋｏｚａｋ配列は、小文字の位置に対して、ミスマッチがゼロであるか、又は１個若しくは２個までのミスマッチを有するｒｃｃＲＵＧｇである。いくつかの実施形態において、Ｋｏｚａｋ配列は、小文字の位置に対して、ミスマッチがゼロであるか、又は１個若しくは２個までのミスマッチを有するｒｃｃＡＵＧｇである。いくつかの実施形態において、Ｋｏｚａｋ配列は、小文字の位置に対して、ミスマッチがゼロであるか、又は１個、２個、若しくは３個までのミスマッチを有するｇｃｃＲｃｃＡＵＧＧ（配列番号２６）である。いくつかの実施形態において、Ｋｏｚａｋ配列は、小文字の位置に対して、ミスマッチがゼロであるか、又は１個、２個、３個、若しくは４個までのミスマッチを有するｇｃｃＡｃｃＡＵＧである。いくつかの実施形態において、Ｋｏｚａｋ配列は、ＧＣＣＡＣＣＡＵＧである。いくつかの実施形態において、Ｋｏｚａｋ配列は、小文字の位置に対して、ミスマッチがゼロであるか、又は１個、２個、３個、若しくは４個までのミスマッチを有するｇｃｃｇｃｃＲｃｃＡＵＧＧ（配列番号２７）である。

【０２３８】

いくつかの実施形態において、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするＯＲＦを含むｍＲＮＡは、表８９のＣａｓＯＲＦのいずれかと少なくとも９０％の同一性を有する配列を含む。

【０２３９】

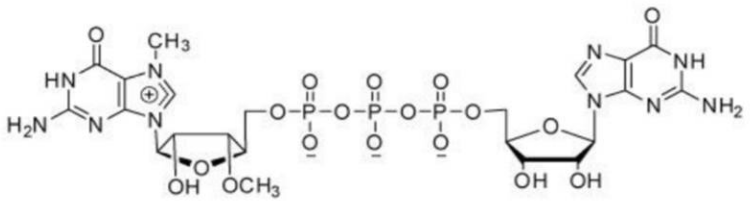
いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるｍＲＮＡは、５’キャップ、例えば、Ｃａｐ０、Ｃａｐ１、又はＣａｐ２を含む。５’キャップは、一般に、ｍＲＮＡの５’－３’鎖の第１のヌクレオチド（すなわち、第１のキャップ近位のヌクレオチド）の５’位に対して５’－トリホスフェートを介して連結した７－メチルグアニンリボヌクレオチド（例えば、ＡＲＣＡに関して、以下に考察されるように更に修飾されてもよい）である。Ｃａｐ０において、ｍＲＮＡの第１及び第２のキャップ近位のヌクレオチドのリボースは、両方とも、２’－ヒドロキシルを含む。Ｃａｐ１において、ｍＲＮＡの第１及び第２の転写ヌクレオチドのリボースは、それぞれ、２’－メトキシ及び２’－ヒドロキシを含む。Ｃａｐ２において、ｍＲＮＡの第１及び第２のキャップ近位のヌクレオチドのリボースは、両方とも、２’－メトキシを含む。例えば、Ｋａｔｉｂａｈ ｅｔ ａｌ．（２０１４）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ １１１（３３）：１２０２５－３０、Ａｂｂａｓ ｅｔ ａｌ．（２０１７）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ １１４（１１）：Ｅ２１０６－Ｅ２１１５を参照のこと。ヒトｍＲＮＡ等の哺乳動物ｍＲＮＡを含む、ほとんどの内因性の高級真核生物ｍＲＮＡは、Ｃａｐ１又はＣａｐ２を含む。Ｃａｐ０、及びＣａｐ１及びＣａｐ２とは異なる他のキャップ構造は、ＩＦＩＴ－１及びＩＦＩＴ－５等の自然免疫系の構成要素によって「非自己」として認識されるため、ヒト等の哺乳動物において免疫原性である場合があり、Ｉ型インターフェロンを含むサイトカインレベルの上昇を引き起こし得る。ＩＦＩＴ－１及びＩＦＩＴ－５等の自然免疫系の構成要素はまた、Ｃａｐ１又はＣａｐ２以外のキャップとのｍＲＮＡの結合についてｅＩＦ４Ｅと競合する場合があり、ｍＲＮＡの翻訳を潜在的に阻害する。

【０２４０】

キャップは、共転写的に含めることができる。例えば、ＡＲＣＡ（抗逆キャップ類似体、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃカタログ番号ＡＭ８０４５）は、グアニンリボヌクレオチドの５’位に連結する７－メチルグアニン ３’－メトキシ－５’－トリホスフェートを含むキャップ類似体であり、開始時にインビトロで転写産物に組み込むことができる。ＡＲＣＡは、第１のキャップ近位のヌクレオチドの２’位がヒドロキシルであるＣａｐ０キャップをもたらす。例えば、Ｓｔｅｐｉｎｓｋｉ ｅｔ ａｌ．，（２００１）“Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ａｎｄ ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ ｏｆ ｍＲＮＡｓ ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ ｔｈｅ ｎｏｖｅｌ ‘ａｎｔｉ－ｒｅｖｅｒｓｅ’ ｃａｐ ａｎ

ａｌｏｇｓ　７－ｍｅｔｈｙｌ（３’－Ｏ－ｍｅｔｈｙｌ）ＧｐｐｐＧ　ａｎｄ　７－ｍｅｔｈｙｌ（３’ｄｅｏｘｙ）ＧｐｐｐＧ，”ＲＮＡ　７：１４８６－１４９５を参照のこと。ＡＲＣＡの構造を以下に示す。

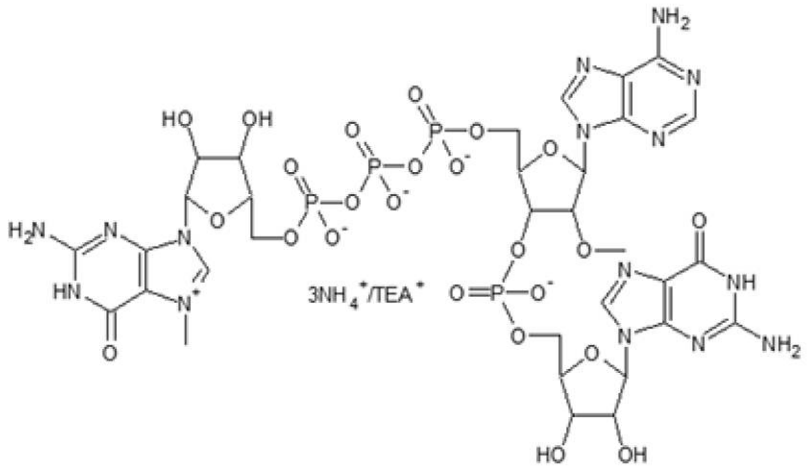
【化１】



【０２４１】

ＣｌｅａｎＣａｐ（商標）ＡＧ（ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧ、ＴｒｉＬｉｎｋ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓカタログ番号Ｎ－７１１３）又はＣｌｅａｎＣａｐ（商標）ＧＧ（ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＧ）ｐＧ、ＴｒｉＬｉｎｋ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓカタログ番号Ｎ－７１３３）を使用して、Ｃａｐ１構造を共転写的に提供することができる。ＣｌｅａｎＣａｐ（商標）ＡＧ及びＣｌｅａｎＣａｐ（商標）ＧＧの３’－Ｏ－メチル化態様も、それぞれ、カタログ番号Ｎ－７４１３及びＮ－７４３３としてＴｒｉＬｉｎｋ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから入手可能である。ＣｌｅａｎＣａｐ（商標）ＡＧの構造を以下に示す。

【化２】



【０２４２】

代替的に、転写後に、キャップをＲＮＡに付加することができる。例えば、Ｖａｃｃｉｎｉａキャッピング酵素は市販されており（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓカタログ番号Ｍ２０８０Ｓ）、そのＤ１サブユニットによって与えられるＲＮＡトリホスファターゼ及びグアニリルトランスフェラーゼ活性と、そのＤ１２サブユニットによって与えられるグアニンメチルトランスフェラーゼを有する。したがって、Ｓ－アデノシルメチオニン及びＧＴＰの存在下で、Ｃａｐ０を与えるように、７－メチルグアニンをＲＮＡに付加することができる。例えば、Ｇｕｏ，Ｐ．ａｎｄ　Ｍｏｓｓ，Ｂ．（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８７，４０２３－４０２７、Ｍａｏ，Ｘ．ａｎｄ　Ｓｈｕｍａｎ，Ｓ．（１９９４）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９，２４４７２－２４４７９を参照のこと。

【０２４３】

いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、ポリアデニル化（ポリ－Ａ）テールを更に含む。いくつかの実施形態では、ポリ－Ａテールは、少なくとも２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、又は１００個のアデニンを含み、任意選択で、３００個までのア

デニンを含む。いくつかの実施形態では、ポリ－Ａテールは、９５、９６、９７、９８、９９、又は１００個のアデニンヌクレオチドを含む。場合によっては、ポリＡテールは、ポリＡテール内の１つ以上の位置で、１つ以上の非アデニンヌクレオチド「アンカー」で「中断される」。ポリＡテールは、少なくとも８個の連続するアデニンヌクレオチドを含み得るが、１個以上の非アデニンヌクレオチドも含む。本明細書で使用される場合、「非アデニンヌクレオチド」は、アデニンを含まない任意の天然又は非天然ヌクレオチドを指す。グアニン、チミン、及びシトシンヌクレオチドは、例示的な非アデニンヌクレオチドである。したがって、本明細書に記載のｍＲＮＡ上のポリＡテールは、目的のＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤又は配列をコードするヌクレオチドに対して３’に位置する連続するアデニンヌクレオチドを含み得る。場合によっては、ｍＲＮＡ上のポリＡテールは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤又は目的の配列をコードするヌクレオチドに対して３’に位置する非連続アデニンヌクレオチドを含み、非アデニンヌクレオチドは、規則的な間隔若しくは不規則な間隔でアデニンヌクレオチドを中断する。

【０２４４】

本明細書で使用される場合、「非アデニンヌクレオチド」は、アデニンを含まない任意の天然又は非天然ヌクレオチドを指す。グアニン、チミン、及びシトシンヌクレオチドは、例示的な非アデニンヌクレオチドである。したがって、本明細書に記載のｍＲＮＡ上のポリＡテールは、目的のＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤又は配列をコードするヌクレオチドに対して３’に位置する連続するアデニンヌクレオチドを含み得る。場合によっては、ｍＲＮＡ上のポリＡテールは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤又は目的の配列をコードするヌクレオチドに対して３’に位置する非連続アデニンヌクレオチドを含み、非アデニンヌクレオチドは、規則的な間隔若しくは不規則な間隔でアデニンヌクレオチドを中断する。

【０２４５】

いくつかの実施形態において、ｍＲＮＡは、精製される。いくつかの実施形態において、ｍＲＮＡは、沈殿法（例えば、ＬｉＣｌ沈殿、アルコール沈殿、又は同等の方法、例えば、本明細書に記載されるもの）を使用して精製される。いくつかの実施形態において、ｍＲＮＡは、ＨＰＬＣベースの方法又は同等の方法（例えば、本明細書に記載されるもの）などのクロマトグラフィーベースの方法を使用して精製される。いくつかの実施形態において、ｍＲＮＡは、沈殿法（例えば、ＬｉＣｌ沈殿）とＨＰＬＣベースの方法との両方を使用して精製される。

【０２４６】

いくつかの実施形態において、少なくとも１つのｇＲＮＡは、本明細書に開示されるｍＲＮＡと組み合わせて提供される。いくつかの実施形態において、ｇＲＮＡは、ｍＲＮＡとは別々の分子として提供される。いくつかの実施形態において、ｇＲＮＡは、本明細書に開示されるｍＲＮＡの一部、例えば、ＵＴＲの一部として提供される。

【０２４７】

Ｂ．化学修飾核酸

いくつかの実施形態において、核酸は、化学修飾されたＲＮＡなどのＲＮＡである。いくつかの実施形態において、核酸は、化学修飾されたＤＮＡなどのＤＮＡであるか、又はＤＮＡを含む。

【０２４８】

１つ以上の修飾ヌクレオシド又はヌクレオチドを含むＲＮＡは、標準的なＡ、Ｇ、Ｃ、及びＵ残基の代わりに、又はそれらに加えて使用される１つ以上の非天然及び／又は天然に存在する構成要素又は構造の存在を記載するために、「修飾された」ＲＮＡ又は「化学修飾された」ＲＮＡと呼ばれる。いくつかの実施形態において、修飾されたＲＮＡは、非標準的なヌクレオシド又はヌクレオチドを用いて合成され、本明細書では「修飾された」と呼ばれる。修飾ヌクレオシド又はヌクレオチドは、（ｉ）ホスホジエステル骨格結合における改変、例えば、非架橋のリン酸酸素の１つ若しくは両方、及び／又は、架橋リン酸酸素の１つ以上の置き換え（例示的な骨格修飾）、（ｉｉ）リボース糖の成分、例えば、リボース糖の２’ヒドロキシルの改変、例えば、置き換え（例示的な糖修飾）、（ｉｉｉ

）リン酸部分の「脱リン酸型」リンカーによる大規模な置き換え（例示的な骨格修飾）、（ｉｖ）非標準的な核酸塩基によるものを含め、天然に存在する核酸塩基の修飾又は置き換え（例示的な塩基修飾）、（ｖ）リボースリン酸骨格の置き換え又は修飾（例示的な骨格修飾）、（ｖｉ）オリゴヌクレオチドの３’末端又は５’末端の修飾、例えば、末端リン酸基の除去、修飾若しくは置き換え、又は部分、キャップ、若しくはリンカーのコンジュゲーション（そのような３’又は５’のキャップ修飾は、糖及び／又は骨格の修飾を含み得る）、並びに（ｖｉｉ）糖の修飾又は置き換え（例示的な糖修飾）の１つ以上を含み得る。

【０２４９】

１つ以上の修飾ヌクレオシド又はヌクレオチドを含むｇＲＮＡは、標準的なＡ、Ｇ、Ｃ、及びＵ残基の代わりに、又はそれらに加えて使用される１つ以上の非天然及び／又は天然に存在する構成要素又は構造の存在を記載するために、「修飾された」ｇＲＮＡ又は「化学修飾された」ＲＮＡと呼ばれる。いくつかの実施形態において、修飾ｇＲＮＡは、非標準的なヌクレオシド又はヌクレオチドを用いて合成され、本明細書では「修飾された」と呼ばれる。

【０２５０】

上に列挙されるものなどの化学修飾を組み合わせて、２、３、４、又はそれ以上の修飾を有し得るヌクレオシド及びヌクレオチド（まとめて「残基」）を含む修飾された核酸、ＤＮＡ、ＲＮＡ、又はｇＲＮＡを提供することができる。例えば、修飾残基は、修飾糖及び修飾核酸塩基を有し得る。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡの各々の塩基は修飾され、例えば、全ての塩基がホスホロチオエート等の修飾リン酸基を有する。いくつかの実施形態において、ｇＲＮＡ分子のリン酸基の全て、又は実質的に全てがホスホロチオエート基によって置き換えられる。いくつかの実施形態において、修飾されたｇＲＮＡは、ＲＮＡの５’末端において、又はその近傍において少なくとも１つの修飾された残基を含む。いくつかの実施形態において、修飾されたｇＲＮＡは、ＲＮＡの３’末端において、又はその近傍において少なくとも１つの修飾された残基を含む。

【０２５１】

いくつかの実施形態において、ｇＲＮＡなどの核酸は、１、２、３、又はそれ以上の修飾された残基を含む。いくつかの実施形態では、修飾ｇＲＮＡ内の位置の少なくとも５％（例えば、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、又は１００％）が、修飾ヌクレオシド又はヌクレオチドである。

【０２５２】

非修飾核酸は、例えば、細胞内ヌクレアーゼ又は血清中に見られるものによる分解を受けやすい場合がある。例えば、ヌクレアーゼは核酸のホスホジエステル結合を加水分解し得る。したがって、一態様では、本明細書に記載されるｇＲＮＡなどの修飾核酸は、例えば、細胞内又は血清ベースのヌクレアーゼに対する安定性を導入するために、１つ以上の修飾ヌクレオシド又はヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾ｇＲＮＡ分子は、インビボとエクスビボの両方において細胞集合体に導入されるとき、低減した自然免疫応答を示し得る。「自然免疫応答」という用語は、サイトカイン（特にインターフェロン）発現及び放出の誘導及び細胞死を含む、一本鎖核酸を含む外来性核酸に対する細胞応答を含む。

【０２５３】

骨格修飾のいくつかの実施形態において、修飾残基のリン酸基は、１つ以上の酸素を異なる置換基によって置き換えることによって修飾され得る。更に、修飾残基、例えば修飾核酸中に存在する修飾残基は、本明細書において記載されるように、非修飾リン酸部分の修飾リン酸基による大規模な置き換えを含み得る。いくつかの実施形態において、リン酸

骨格の骨格修飾は、帯電していないリンカー又は非対称な電荷分布を有する帯電したリンカーのいずれかをもたらす改変を含み得る。

【０２５４】

修飾リン酸基の例は、ホスホロチオエート、ホスホロセレネート、ボラノリン酸、ボラノリン酸エステル、水素ホスホネート、ホスホロアミデート、アルキル又はアリールホスホネート、及びホスホトリエステルを含む。非修飾リン酸基中のリン酸原子は、アキラルである。しかしながら、非架橋酸素のうちの１つの、上述の原子又は原子群のうちの１つによる置き換えは、リン原子をキラルにすることができる。立体リン原子は、「Ｒ」配置（本明細書においてＲｐ）又は「Ｓ」配置（本明細書においてＳｐ）のいずれかを有し得る。骨格は、架橋酸素（すなわち、リン酸をヌクレオシドに連結する酸素）の、窒素（架橋ホスホロアミデート）、硫黄（架橋ホスホロチオエート）、及び炭素（架橋メチレンホスホネート）による置き換えによってもまた修飾できる。置き換えは、いずれかの架橋酸素又は両方の架橋酸素において生じ得る。

【０２５５】

リン酸基は、ある骨格修飾において、非リン含有連結基によって置き換えることができる。いくつかの実施形態において、帯電したリン酸基は、中性部分によって置き換えることができる。リン酸基を置き換えることのできる部分の例は、非限定的に、例えば、メチルホスホン酸、ヒドロキシルアミノ、シロキサン、カーボネート、カルボキシメチル、カルバメート、アミド、チオエーテル、エチレンオキシドリンカー、スフホネート、スルホンアミド、チオホルムアセタール、ホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、メチレンヒドラゾ（ｍｅｔｈｙｌｅｎｅｈｙｄｒａｚｏ）、メチレンジメチルヒドラゾ（ｍｅｔｈｙｌｅｎｅｄｉｍｅｔｈｙｌｈｙｄｒａｚｏ）、メチレンオキシメチルイミノ（ｍｅｔｈｙｌｅｎｅｏｘｙｍｅｔｈｙｌｉｍｉｎｏ）を含み得る。

【０２５６】

いくつかの実施形態において、本開示は、次のうちの１つ以上の領域内に１つ以上の修飾を含む、ｓｇＲＮＡを含む：５’末端部におけるヌクレオチド、下部ステム領域、バルジ領域、上部ステム領域、ネクサス領域、ヘアピン１領域、ヘアピン２領域、及び３’末端部におけるヌクレオチド。いくつかの実施形態において、修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、修飾は、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、修飾は、ヌクレオチド間ホスホロチオエート（ＰＳ）結合を含む。

【０２５７】

いくつかの実施形態では、５’末端部における最初の３又は４個のヌクレオチド、及び３’末端部における最後の３又は４個のヌクレオチドが修飾されている。いくつかの実施形態において、５’末端部における最初の４個のヌクレオチド、及び３’末端部における最後の４個のヌクレオチドは、ホスホロチオエート（ＰＳ）結合を用いて連結される。いくつかの実施形態では、修飾は、２’－Ｏ－Ｍｅを含む。いくつかの実施形態において、修飾は、２’－Ｆを含む。

【０２５８】

いくつかの実施形態において、５’末端部における最初の４個のヌクレオチド及び３’末端部における最後の４個のヌクレオチドは、ＰＳ結合により連結され、５’末端部における最初の３個のヌクレオチド及び３’末端部における最後の３個のヌクレオチドは、２’－Ｏ－Ｍｅ修飾を含む。

【０２５９】

いくつかの実施形態では、５’末端部における最初の４個のヌクレオチド及び３’末端部における最後の４個のヌクレオチドは、ＰＳ結合で結合され、５’末端部における最初の３個のヌクレオチド及び３’末端部における最後の３個のヌクレオチドは、２’－Ｆ修飾を含む。

【０２６０】

いくつかの実施形態において、ｓｇＲＮＡは、（ｍＮ＊ｍＮ＊ｍＮ＊ＮＮＮＮＮＮＮＮ

ＮＮＮＮＮＮＮＮＮＧＵＵＵＵＡＧＡｍＧｍＣｍＵｍＡｍＧｍＡｍＡｍＡｍＵｍＡｍＧｍＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡｍＡｍＣｍＵｍＵｍＧｍＡｍＡｍＡｍＡｍＡｍＡｍＧｍＵｍＧｍＧｍＣｍＡｍＣｍＣｍＧｍＡｍＧｍＵｍＣｍＧｍＧｍＵｍＧｍＣｍＵ＊ｍＵ＊ｍＵ＊ｍＵ（配列番号２８）の修飾パターンを含み、ここで、Ｎは、任意の天然又は非天然のヌクレオチドである。Ａ、Ｃ、Ｇ、及びＵは、それぞれ、アデニンヌクレオチド、シチジンヌクレオチド、グアニンヌクレオチド、及びウリジンヌクレオチドである。ある特定の実施形態において、Ａ、Ｃ、Ｇ、及びＵは、各々独立して、指示塩基を有する天然又は非天然に存在するヌクレオチドである。ある特定の実施形態において、Ａ、Ｃ、Ｇ、及びＵは、ＲＮＡヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、ｓｇＲＮＡは、前のこのｓｇＲＮＡの文に開示される配列を含む。いくつかの実施形態において、ｓｇＲＮＡは、ＲＮＡの残基１－２、２－３、及び３－４間のホスホロチオエート連結を有する、その５’末端における最初の３個の残基の２’Ｏ－メチル修飾を含む。

【０２６１】

Ｃ．テンプレート核酸

本明細書に開示される組成物及び方法は、ドナー核酸、すなわち、テンプレート核酸を含んでもよい。テンプレートを使用して、Ｃａｓヌクレアーゼの標的部位において又はその近傍において核酸配列を改変又は挿入してもよい。いくつかの実施形態では、本方法は、テンプレートを細胞に導入することを含む。いくつかの実施形態では、単一のテンプレートが提供されてもよい。他の実施形態では、編集が２つ以上の標的部位で生じ得るように、２つ以上のテンプレートが提供されてもよい。例えば、異なるテンプレートが、細胞内の単一の遺伝子、又は細胞内の２つの異なる遺伝子を編集するために提供されてもよい。

【０２６２】

いくつかの実施形態では、テンプレートは、相同組換えにおいて使用されてもよい。いくつかの実施形態では、相同組換えにより、テンプレート配列又はテンプレート配列の一部が標的核酸分子に組み込まれてもよい。他の実施形態では、テンプレートは、核酸の開裂部位でのＤＮＡ鎖の侵入を伴う相同性指向修復に使用されてもよい。いくつかの実施形態では、相同性指向修復により、編集された標的核酸分子中にテンプレート配列が含まれるようになってもよい。更に他の実施形態では、テンプレートは、非相同末端結合によって媒介される遺伝子編集において使用されてもよい。いくつかの実施形態では、テンプレート配列は、開裂部位近くの核酸配列に類似しない。いくつかの実施形態では、テンプレート又はテンプレート配列の一部が組み込まれる。いくつかの実施形態では、テンプレートは隣接する末端逆位反復（ＩＴＲ）配列を含む。

【０２６３】

いくつかの実施形態において、テンプレートは、それぞれ切断部位の上流及び下流に位置する配列に相補的である第１のホモロジーアーム及び第２のホモロジーアーム（第１及び第２のヌクレオチド配列とも呼ばれる）を含み得る。テンプレートが２つのホモロジーアームを含む場合、各々のアームは同一の長さ又は異なる長さであり得、ホモロジーアーム間の配列は、ホモロジーアーム間の標的配列に実質的に類似又は同一であり得るか、又は全体的に無関係であり得る。いくつかの実施形態において、テンプレート上の第１のヌクレオチド配列と開裂部位の上流の配列との間、及びテンプレート上の第２のヌクレオチド配列と開裂部位の下流の配列との間の相補性又は同一性パーセントの度合いは、テンプレートと標的核酸分子との間の相同組換え、例えば、高い忠実性の相同組換えを可能にし得る。いくつかの実施形態において、相補性の度合いは、約５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、９９％、又は１００％であり得る。いくつかの実施形態において、相補性の度合いは、約９５％、９７％、９８％、９９％、又は１００％であり得る。いくつかの実施形態において、相補性の度合いは、少なくとも９８％、９９％、又は１００％であり得る。いくつかの実施形態において、相補性の度合いは、１００％であり得る。いくつかの実施形態において、同一

性パーセントは、約５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、９９％、又は１００％であり得る。いくつかの実施形態において、同一性パーセントは、約９５％、９７％、９８％、９９％、又は１００％であり得る。いくつかの実施形態において、同一性パーセントは、少なくとも９８％、９９％、又は１００％であり得る。いくつかの実施形態において、同一性パーセントは、１００％であり得る。

【０２６４】

いくつかの実施形態では、テンプレート配列は、標的細胞の内因性配列に対応するか、それを含むか、又はそれからなってもよい。テンプレート配列は、また、又は代替的に、標的細胞の外因性配列に対応するか、それを含むか、又はそれからなってもよい。本明細書で使用されるとき、「内因性配列」という用語は、細胞に固有の配列を指す。「外因性配列」という用語は、細胞に固有ではない配列、又は細胞のゲノム内の固有の位置が異なる位置にある配列を指す。いくつかの実施形態では、内因性配列は、細胞のゲノム配列であってもよい。いくつかの実施形態では、内因性配列は、染色体配列であっても染色体外配列であってもよい。いくつかの実施形態では、内因性配列は、細胞のプラスミド配列であってもよい。いくつかの実施形態において、テンプレート配列は、開裂部位において又はその近傍の細胞における内因性配列の一部と実質的に同一であってもよいが、少なくとも１つのヌクレオチド変化を含む。いくつかの実施形態において、テンプレートを用いて切断された標的核酸分子を編集することにより、標的核酸分子のうちの１つ以上のヌクレオチドの挿入、欠失、又は置換を含む変異をもたらし得る。いくつかの実施形態において、変異は、標的配列を含む遺伝子から発現されるタンパク質に１つ以上のアミノ酸変化をもたらし得る。

【０２６５】

いくつかの実施形態において、変異は、標的挿入部位から発現されるＲＮＡに１つ以上のヌクレオチド変化をもたらし得る。いくつかの実施形態において、変異は、標的遺伝子の発現レベルを改変し得る。いくつかの実施形態において、変異は、標的遺伝子の発現の増加又は減少をもたらし得る。いくつかの実施形態において、変異は、遺伝子ノックダウンをもたらし得る。いくつかの実施形態において、変異は、遺伝子ノックアウトをもたらし得る。いくつかの実施形態において、変異は、遺伝子機能の回復をもたらし得る。いくつかの実施形態において、テンプレートを用いる切断された標的核酸分子の編集は、ＤＮＡなどの標的核酸分子のエクソン配列、イントロン配列、制御配列、転写制御配列、翻訳制御配列、スプライシング部位、又は非コード配列の変化をもたらし得る。

【０２６６】

他の実施形態において、テンプレート配列は、外因性配列を含み得る。いくつかの実施形態において、外因性配列は、コード配列を含み得る。いくつかの実施形態において、外因性配列は、外因性配列が標的核酸分子に組み込まれると、細胞が組み込まれた配列によってコードされるタンパク質又はＲＮＡを発現することができるように、外因性プロモーター配列に作用可能に連結されたタンパク質又はＲＮＡコード配列（例えば、ＯＲＦ）を含み得る。他の実施形態において、外因性配列が標的核酸分子に組み込まれると、組み込まれた配列の発現は、内因性プロモーター配列によって調節され得る。いくつかの実施形態において、外因性配列は、タンパク質又はタンパク質の一部をコードするｃＤＮＡ配列を提供し得る。更に他の実施形態において、外因性配列は、エクソン配列、イントロン配列、制御配列、転写制御配列、翻訳制御配列、スプライシング部位、又は非コード配列を含み得るか、又はそれらからなり得る。いくつかの実施形態において、外因性配列の組み込みは、遺伝子機能の回復をもたらし得る。いくつかの実施形態において、外因性配列の組み込みは、遺伝子ノックインをもたらし得る。いくつかの実施形態において、外因性配列の組み込みは、遺伝子ノックアウトをもたらし得る。

【０２６７】

テンプレートは任意の好適な長さであり得る。いくつかの実施形態において、テンプレートは、１０、１５、２０、２５、５０、７５、１００、１５０、２００、５００、１０

００、１５００、２０００、２５００、３０００、３５００、４０００、４５００、５０００、５５００、６０００、又はそれ以上ヌクレオチド長を含み得る。テンプレートは一本鎖核酸であり得る。テンプレートは、二本鎖又は部分的に二本鎖の核酸であり得る。いくつかの実施形態において、一本鎖テンプレートは、２０、３０、４０、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５、又は２００ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において，テンプレートは、標的配列を含む標的核酸分子の一部（すなわち「ホモロジーアーム」）に相補的である、核酸配列を含み得る。いくつかの実施形態において、テンプレートは、標的核酸分子上の切断部位の上流又は下流に位置する配列に相補的であるホモロジーアームを含み得る。

【０２６８】

いくつかの実施形態では、テンプレートは、隣接する末端逆位反復（ＩＴＲ）配列を含むｓｓＤＮＡ又はｄｓＤＮＡを含む。いくつかの実施形態では、テンプレートは、ベクター、プラスミド、ミニサークル、ナノサークル、又はＰＣＲ産物として提供される。

【０２６９】

Ｄ．核酸の精製

いくつかの実施形態では、核酸は精製される。いくつかの実施形態では、核酸は、沈殿法（例えば、ＬｉＣｌ沈殿、アルコール沈殿、又は同等の方法、例えば、本明細書に記載されるもの）を使用して精製される。いくつかの実施形態では、核酸は、ＨＰＬＣベースの方法又は同等の方法（例えば、本明細書に記載されるもの）などのクロマトグラフィーベースの方法を使用して精製される。いくつかの実施形態において、核は、沈殿法（例えば、ＬｉＣｌ沈殿）とＨＰＬＣベースの方法との両方を使用して精製される。

【０２７０】

Ｅ．標的配列

いくつかの実施形態において、本開示のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、標的核酸分子上の標的配列に指向され、それを切断し得る。例えば、標的配列は、Ｃａｓヌクレアーゼによって認識及び切断され得る。いくつかの実施形態において、Ｃａｓヌクレアーゼの標的配列は、ヌクレアーゼの同族ＰＡＭ配列の近傍に位置する。いくつかの実施形態において、クラス２Ｃａｓヌクレアーゼは、ｇＲＮＡによって標的核酸分子の標的配列に指向され得、そこでは、ｇＲＮＡが標的配列とハイブリダイゼーションし、クラス２Ｃａｓタンパク質が標的配列を切断する。いくつかの実施形態において、ガイドＲＮＡは、その同族ＰＡＭに隣接するか、又はそれを含む標的配列とハイブリダイゼーションし、クラス２Ｃａｓヌクレアーゼは、その同族ＰＡＭに隣接するか、又はそれを含む標的配列を切断する。いくつかの実施形態において、標的配列は、ガイドＲＮＡの標的化配列に対して相補的であり得る。いくつかの実施形態において、ガイドＲＮＡの標的化配列と、ガイドＲＮＡにハイブリダイゼーションする対応する標的配列の一部との間の相補性の度合いは、約５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、９９％、又は１００％であり得る。いくつかの実施形態において、ガイドＲＮＡの標的化配列と、ガイドＲＮＡにハイブリダイゼーションする対応する標的配列の一部との間の同一性パーセントは、約５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、９９％、又は１００％であり得る。いくつかの実施形態において、標的の相同性領域は、同族ＰＡＭ配列に隣接する。いくつかの実施形態において、標的配列は、ガイドＲＮＡの標的化配列と１００％相補的な配列を含み得る。他の実施形態において、標的配列は、ガイドＲＮＡの標的化配列と比較して、少なくとも１つのミスマッチ、欠失、又は挿入を含み得る。

【０２７１】

標的配列の長さは、使用されるヌクレアーゼシステムに依存し得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系のためのガイドＲＮＡの標的化配列は、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、３５、４０、４５、５０、又は５０超のヌクレオチド長を含み得、標的配列は、任意選択によりＰＡＭ配列に隣接する対応する長さである

。いくつかの実施形態において、標的配列は、１５～２４ヌクレオチド長を含み得る。いくつかの実施形態において、標的配列は、１７～２１ヌクレオチド長を含み得る。いくつかの実施形態において、標的配列は、２０ヌクレオチド長を含み得る。ニッカーゼが使用されるとき、標的配列は、ＤＮＡ分子の対向する鎖を切断する一対のニッカーゼによって認識される一対の標的配列を含み得る。いくつかの実施形態において、標的配列は、ＤＮＡ分子の同一の鎖を切断する一対のニッカーゼによって認識される一対の標的配列を含み得る。いくつかの実施形態において、標的配列は、１つ以上のＣａｓヌクレアーゼによって認識される標的配列の一部を含み得る。

【０２７２】

標的核酸分子は、細胞に対して内因性又は外因性である任意のＤＮＡ又はＲＮＡ分子であり得る。いくつかの実施形態において、標的核酸分子は、細胞からの又は細胞内のエピソームＤＮＡ、プラスミド、ゲノムＤＮＡ、ウイルスゲノム、ミトコンドリアＤＮＡ、又は染色体ＤＮＡであり得る。いくつかの実施形態において、標的核酸分子の標的配列は、ヒト細胞を含む細胞からの又は細胞内のゲノム配列であり得る。

【０２７３】

更なる実施形態において、標的配列は、ウイルス配列であり得る。更なる実施形態において、標的配列は、病原体配列であり得る。更に他の実施形態において、標的配列は、合成配列であり得る。更なる実施形態において、標的配列は、染色体配列であり得る。ある特定の実施形態において、標的配列は、転座接合部、例えば、がんと関連する転座を含み得る。いくつかの実施形態において、標的配列は、真核生物染色体、例えば、ヒト染色体上にあり得る。

【０２７４】

いくつかの実施形態において、標的配列は、遺伝子のコード配列、遺伝子のイントロン配列、制御配列、遺伝子の転写制御配列、遺伝子の翻訳制御配列、スプライシング部位、又は遺伝子間の非コード配列内に位置し得る。いくつかの実施形態において、遺伝子は、タンパク質コード遺伝子であり得る。他の実施形態において、遺伝子は、非コードＲＮＡ遺伝子であり得る。いくつかの実施形態において、標的配列は、疾患関連遺伝子の全て又は一部を含み得る。いくつかの実施形態において、標的配列は、ゲノムにおける非遺伝子機能部位、例えば、足場部位又は遺伝子座制御領域などのクロマチン組織の態様を制御する部位に位置し得る。

【０２７５】

クラス２ＣａｓヌクレアーゼなどのＣａｓヌクレアーゼを伴ういくつかの実施形態において、標的配列は、プロトスペーサー隣接モチーフ（「ＰＡＭ」）に隣接し得る。いくつかの実施形態では、ＰＡＭは、標的配列の３’末端に隣接するか、又はその１、２、３、又は４個のヌクレオチド内にあり得る。ＰＡＭの長さ及び配列は、使用されるＣａｓタンパク質に依存し得る。例えば、ＰＡＭは、Ｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，５２０：１８６－１９１（２０１５）の図１、及びＺｅｔｓｃｈｅ　２０１５の図Ｓ５に開示されるものを含む、コンセンサス配列又は特定のＣａｓ９タンパク質若しくはＣａｓ９オルソログに対する特定のＰＡＭ配列から選択され得、これらの各々の関連する開示は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態において、ＰＡＭは、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０ヌクレオチド長であり得る。非限定的な例示的なＰＡＭ配列には、ＮＧＧ、ＮＧＧＮＧ、ＮＧ、ＮＡＡＡＡＮ、ＮＮＡＡＡＡＷ、ＮＮＮＮＡＣＡ、ＧＮＮＮＣＮＮＡ、ＴＴＮ、及びＮＮＮＮＧＡＴＴが含まれる（Ｎは、任意のヌクレオチドとして定義され、Ｗは、Ａ又はＴのいずれかとして定義される）。いくつかの実施形態では、ＰＡＭ配列はＮＧＧであり得る。いくつかの実施形態では、ＰＡＭ配列はＮＧＧＮＧであり得る。いくつかの実施形態において、ＰＡＭ配列はＴＴＮであり得る。いくつかの実施形態では、ＰＡＭ配列はＮＮＡＡＡＡＷであり得る。

【０２７６】

ＶＩ．例示的な脂質核酸アセンブリ

ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ構成要素、及びそれを発現するＲＮＡを含む、ＲＮＡなどのゲノ

ム編集ツールを含む脂質核酸アセンブリを使用する種々の実施形態が、本明細書に開示される。

【０２７７】

本明細書で使用される場合、「脂質核酸アセンブリ組成物」は、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）及びリポプレックスを含む脂質ベースの送達組成物を指す。いくつかの実施形態において、「ＬＮＰ組成物」は、「ＬＮＰ（複数）」又は「ＬＮＰ」と互換的に使用される。

【０２７８】

いくつかの実施形態において、ＬＮＰは、１００ｎＭ未満の直径を有する脂質ナノ粒子、又は１００ｎＭ未満の平均直径を有するＬＮＰの集団を指す。ある特定の実施形態において、ＬＮＰは、約１～２５０ｎｍ、１０～２００ｎｍ、約２０～１５０ｎｍ、約５０～１５０ｎｍ、約５０～１００ｎｍ、約５０～１２０ｎｍ、約６０～１００ｎｍ、約７５～１５０ｎｍ、約７５～１２０ｎｍ、若しくは約７５～１００ｎｍの直径、又は約１０～２００ｎｍ、約２０～１５０ｎｍ、約５０～１５０ｎｍ、約５０～１００ｎｍ、約５０～１２０ｎｍ、約６０～１００ｎｍ、約７５～１５０ｎｍ、約７５～１２０ｎｍ、若しくは約７５～１００ｎｍの平均直径を有するＬＮＰの集団を有する。好ましい実施形態において、ＬＮＰ組成物は、７５～１５０ｎｍの直径を有する。

【０２７９】

ＬＮＰは、脂質構成要素（例えば、エタノール中）を水性核酸構成要素と正確に混合することによって形成され、ＬＮＰは、サイズが均一である。リポプレックスは、脂質及び核酸構成要素をバルク混合することによって形成される粒子であり、サイズは約１００ｎｍ～１ミクロンである。ある特定の実施形態において、脂質核酸アセンブリは、ＬＮＰである。本明細書で使用される場合、「脂質核酸アセンブリ」は、分子間力によって互いに物理的に会合する複数の（すなわち、１つより多い）脂質分子を含む。脂質核酸アセンブリは、７．５未満又は７未満のｐＫａ値を有する生体利用可能な脂質を含み得る。脂質核酸アセンブリは、核酸含有水溶液を有機溶媒系脂質溶液、例えば、１００％エタノールと混合することによって形成される。好適な溶液又は溶媒は、水、ＰＢＳ、Ｔｒｉｓ緩衝液、ＮａＣｌ、クエン酸緩衝液、エタノール、クロロホルム、ジエチルエーテル、シクロヘキサン、テトラヒドロフラン、メタノール、イソプロパノールを含むか、又はそれらを含有してもよい。薬学的に許容される緩衝液は、任意選択により、例えば、エクスビボでのＡＣＴ療法のために、脂質核酸アセンブリを含む薬学的製剤中に含まれ得る。いくつかの実施形態において、水溶液は、ｍＲＮＡ又はｇＲＮＡなどのＲＮＡを含む。いくつかの実施形態において、水溶液は、Ｃａｓ９などのＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするｍＲＮＡを含む。

【０２８０】

いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ製剤には、任意選択の「ヘルパー脂質」、「中性脂質」、及びＰＥＧ脂質などのステルス脂質とともに、「アミン脂質」（本明細書又は他の箇所では、「イオン化脂質」又は「生分解性脂質」として記載されることがある）が含まれる。いくつかの実施形態において、アミン脂質又はイオン化脂質は、ｐＨに応じて、陽イオン性である。

【０２８１】

Ａ．アミン脂質

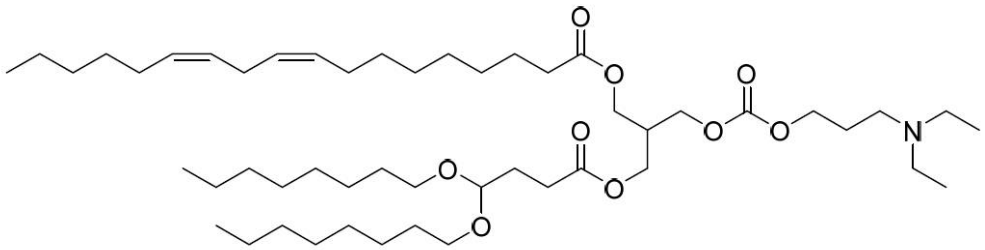
いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、「アミン脂質」を含み、アミン脂質は、例えば、脂質Ａ又は脂質Ｄのアセタール類似体を含む、脂質Ａ、又は脂質Ｄ、又はそれらの等価物などのイオン化脂質である。

【０２８２】

いくつかの実施形態において、アミン脂質は、３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエノアートとも呼ばれる、（９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチ

ル）プロピルオクタデカ－９，１２－ジエノアートである脂質Ａである。脂質Ａは以下のように描写できる。

【化３】



【０２８３】

脂質Ａは、ＷＯ２０１５／０９５３４０（例えば８４～８６ページ）に従って合成され得る。いくつかの実施形態において、アミン脂質は、脂質Ａ、又は参照により本明細書に組み込まれるＷＯ２０２０／２１９８７６において提供されるアミン脂質である。

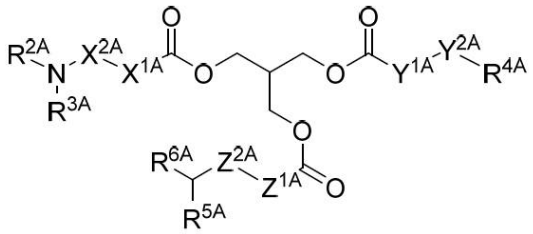
【０２８４】

いくつかの実施形態において、アミン脂質は、脂質Ａの類似体である。いくつかの実施形態において、脂質Ａ類似体は、脂質Ａのアセタール類似体である。特定の脂質核酸アセンブリ組成物において、アセタール類似体は、Ｃ４～Ｃ１２アセタール類似体である。いくつかの実施形態において、アセタール類似体は、Ｃ５～Ｃ１２アセタール類似体である。追加の実施形態において、アセタール類似体は、Ｃ５～Ｃ１０アセタール類似体である。更なる実施形態において、アセタール類似体は、Ｃ４、Ｃ５、Ｃ６、Ｃ７、Ｃ９、Ｃ１０、Ｃ１１、及びＣ１２アセタール類似体から選択される。

【０２８５】

いくつかの実施形態において、アミン脂質は、式ＩＡ

【化４】



（ＩＡ）

の構造を有する化合物であって、

式中、

Ｘ１Ａは、Ｏ、ＮＨ、又は直接結合であり、

Ｘ２Ａは、Ｃ２～３アルキレンであり、

Ｒ３Ａは、Ｃ１～３アルキルであり、

Ｒ２Ａは、Ｃ１～３アルキルであるか、又は

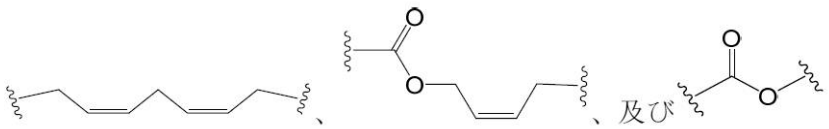
Ｒ２Ａは、それが結合する窒素原子、及びＸ２Ａの２～３個の炭素原子と一緒になって、５員若しくは６員の環を形成するか、又は

Ｒ２Ａは、Ｒ３Ａ及びそれらが結合する窒素原子と一緒になって、５員環を形成し、

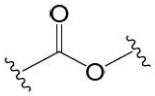
Ｙ１Ａは、Ｃ６～１０アルキレンであり、

Ｙ２Ａは、

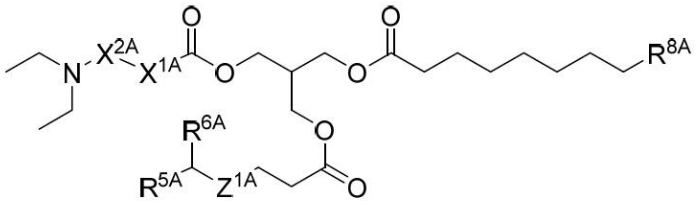
【化５】



から選択され、
Ｒ４Ａは、Ｃ４～１１アルキルであり、
Ｚ１Ａは、Ｃ２～５アルキレンであり、
Ｚ２Ａは、
【化６】



であるか、又は存在せず、
Ｒ５Ａは、Ｃ６～８アルキル又はＣ６～８アルコキシであり、
Ｒ６Ａは、Ｃ６～８アルキル若しくはＣ６～８アルコキシ、
又はその塩である、化合物。
【０２８６】
いくつかの実施形態において、アミン脂質は、式（ＩＩＡ）
【化７】



（ＩＩＡ）

の化合物であって、
式中、
Ｘ１Ａは、Ｏ、ＮＨ、又は直接結合であり、
Ｘ２Ａは、Ｃ２～３アルキレンであり、
Ｚ１Ａは、Ｃ３アルキレンであり、Ｒ５Ａ及びＲ６Ａは、各々Ｃ６アルキルであるか、又はＺ１Ａは、直接結合であり、Ｒ５Ａ及びＲ６Ａは、各々Ｃ８アルコキシであり、
Ｒ８Ａは、
【化８】



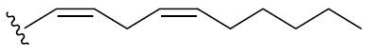
又はその塩である、化合物。
【０２８７】
ある特定の実施形態において、Ｘ１Ａは、Ｏである。他の実施形態において、Ｘ１Ａは、ＮＨである。更に他の実施形態において、Ｘ１Ａは、直接結合である。
【０２８８】
ある特定の実施形態において、Ｘ２Ａは、Ｃ３アルキレンである。特定の実施形態において、Ｘ２Ａは、Ｃ２アルキレンである。
【０２８９】

ある特定の実施形態において、Ｚ１Ａは、直接結合であり、Ｒ５Ａ及びＲ６Ａは、各々Ｃ８アルコキシである。いくつかの実施形態において、Ｚ１Ａは、Ｃ３アルキレンであり、Ｒ５Ａ及びＲ６Ａは、各々Ｃ６アルキルである。

【０２９０】

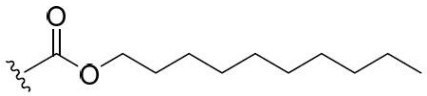
ある特定の実施形態において、Ｒ８Ａは、

【化９】



である。他の実施形態において、Ｒ８Ａは、

【化１０】



である。

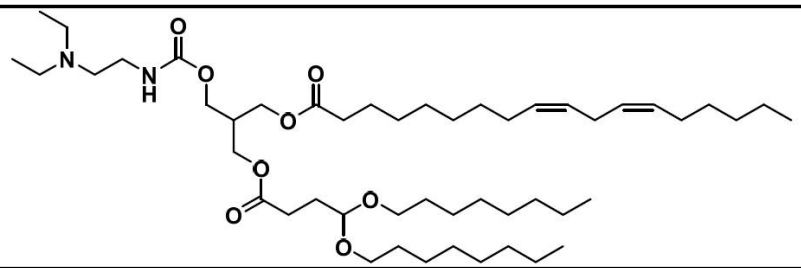
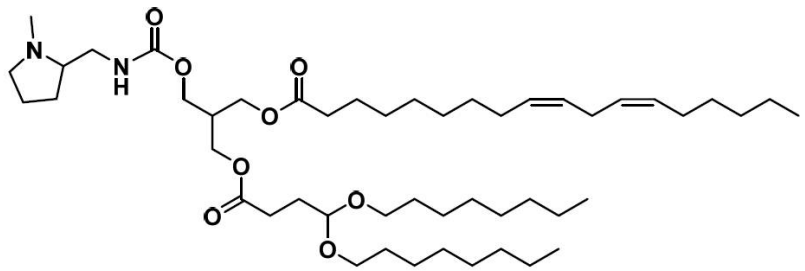
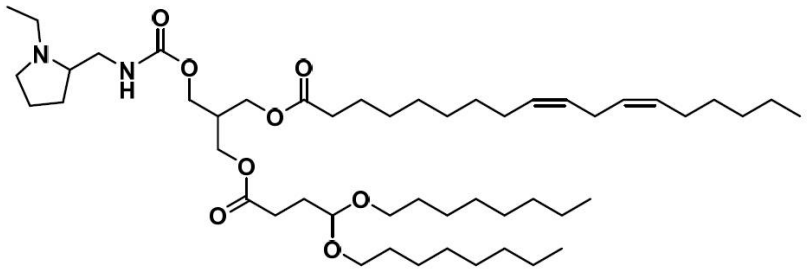
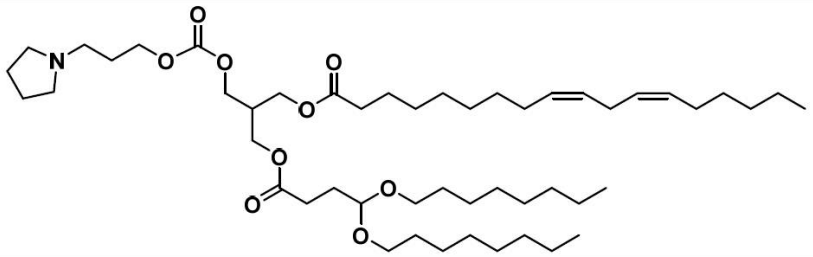
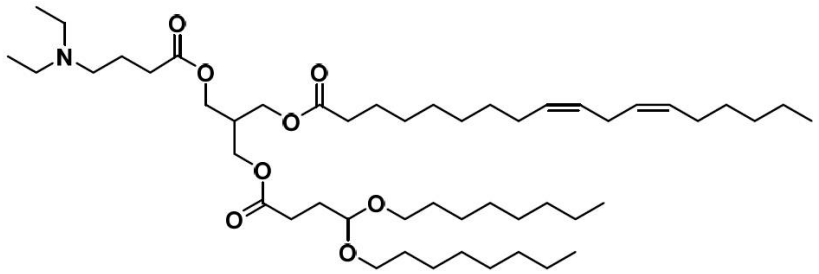
【０２９１】

ある特定の実施形態において、アミン脂質は、塩である。

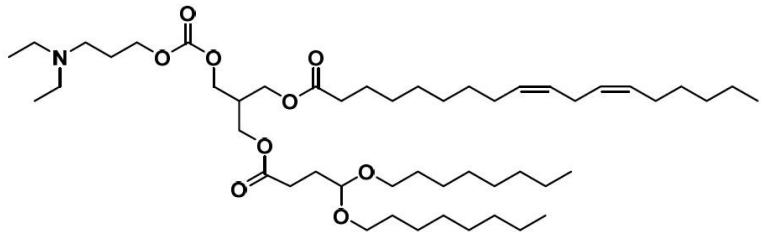
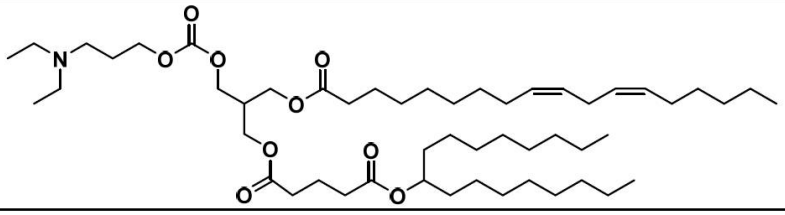
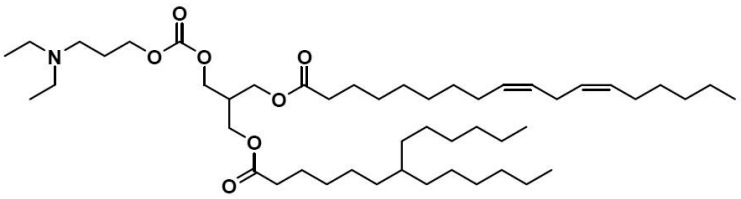
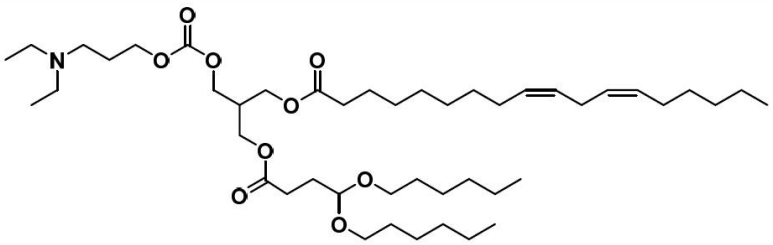
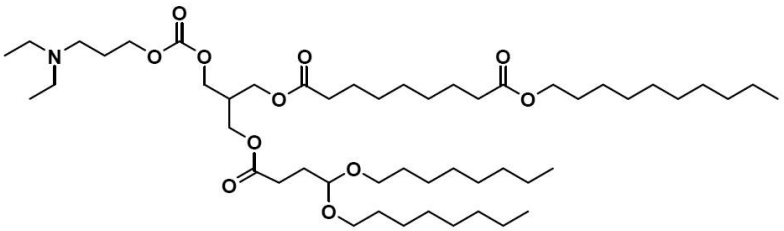
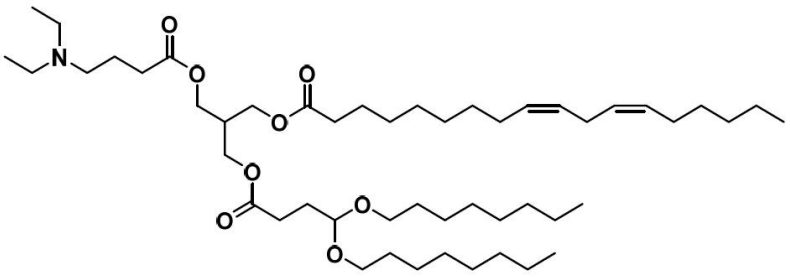
【０２９２】

式（ＩＡ）の代表的な化合物には、

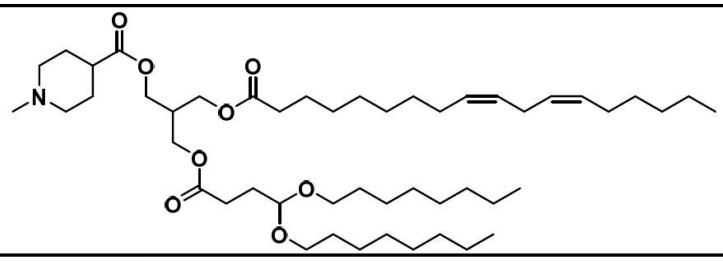
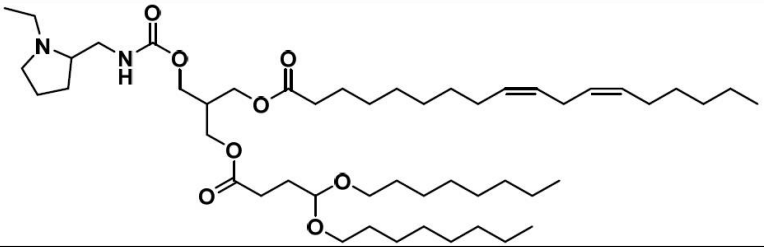
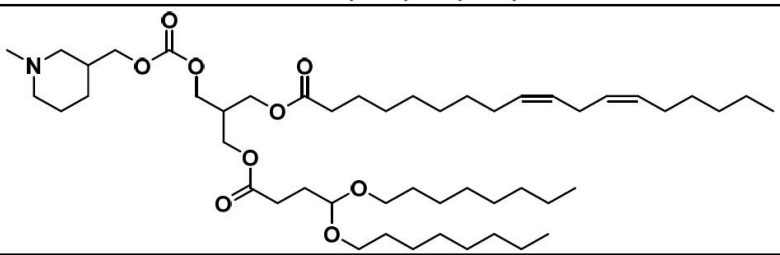
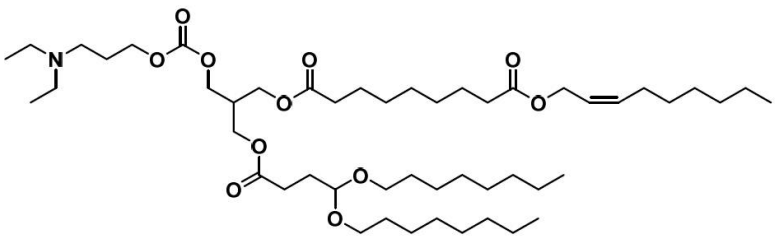
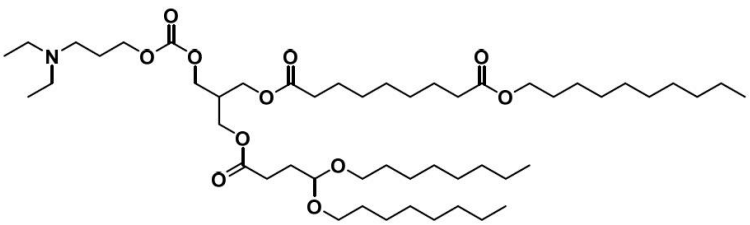
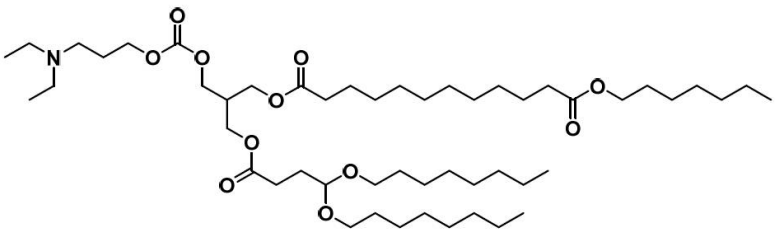
【表２－１】

化合物番号	化合物
1A	
2A	
3A	
4A	
5A	

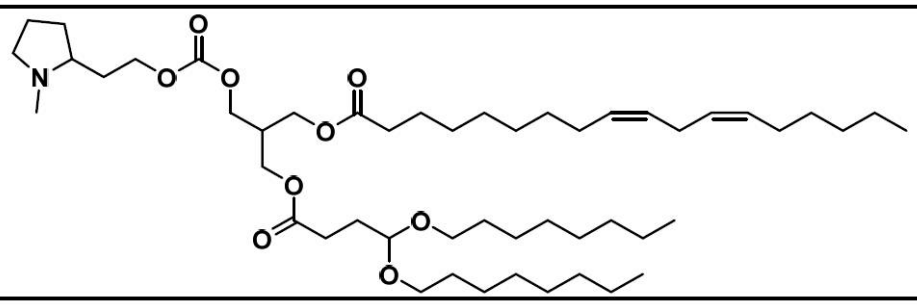
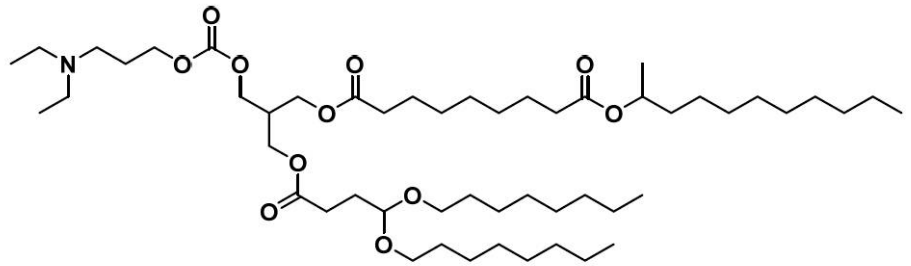
【表２－２】

6A	
7A	
8A	
9A	
10A	
11A	

【表２－３】

12A	
13A	
14A	
15A	
16A	
17A	

【表２－４】

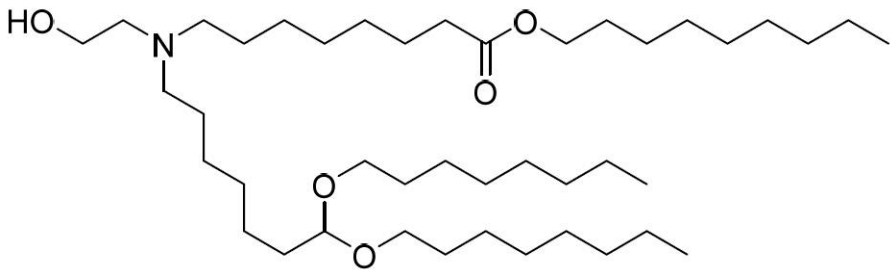
18A	
19A	

又はその塩、例えば、その薬学的に許容される塩が含まれる。

【０２９３】

いくつかの実施形態において、アミン脂質は、ノニル８－（（７，７－ビス（オクチルオキシ）ヘプチル）（２－ヒドロキシエチル）アミノ）オクタノエート：

【化１１】



、又はその塩である、脂質Ｄである。

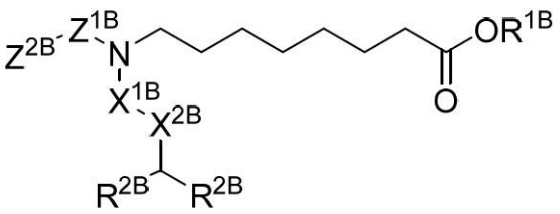
【０２９４】

脂質Ｄは、参考としてそれらの全体が組み込まれるＷＯ２０２００７２６０５、及びＭｏｌ．Ｔｈｅｒ．２０１８，２６（６），１５０９－１５１９（「Ｓａｂｎｉｓ」）に従って合成され得る。いくつかの実施形態における、参照により本明細書に組み込まれるＷＯ２０２００７２６０５に提供されるアミン脂質の脂質Ｄ、又はアミン脂質。

【０２９５】

いくつかの実施形態において、アミン脂質は、式ＩＢ：

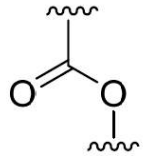
【化１２】



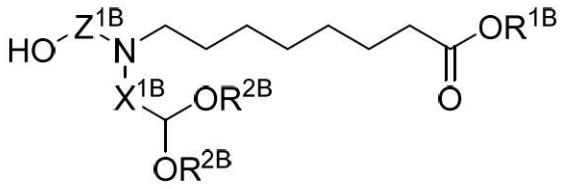
（ＩＢ）

の構造を有する化合物であって、

式中、
X^{1B}は、$C_{6\sim7}$アルキレンであり、
X^{2B}は、又は存在しないが、但し、X^{2B}が
【化１３】

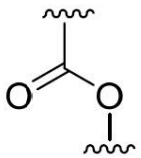


である場合、R^{2B}はアルコキシでないことを条件とし、
Z^{1B}は、$C_{2\sim3}$アルキレンであり、
Z^{2B}は、－ＯＨ、－ＮＨＣ（＝Ｏ）ＯＣＨ$_3$、及び－ＮＨＳ（＝Ｏ）$_2$ＣＨ$_3$から選択され、
R^{1B}は、$C_{7\sim9}$非分岐鎖アルキルであり、
各R^{2B}は、独立して、C_8アルキル若しくはC_8アルコキシ、
又はその塩である
【０２９６】
いくつかの実施形態において、アミン脂質は、式（ＩＩＢ）
【化１４】



（ＩＩＢ）

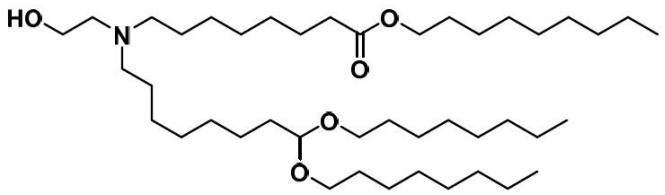
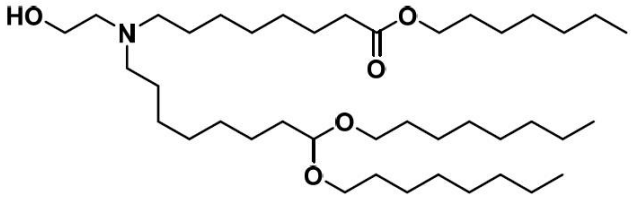
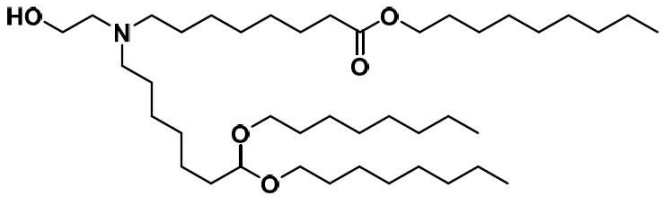
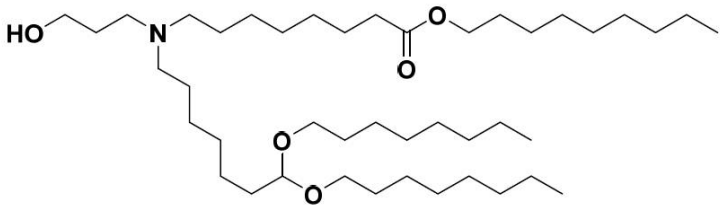
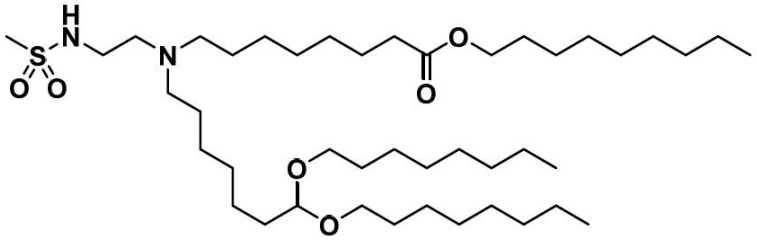
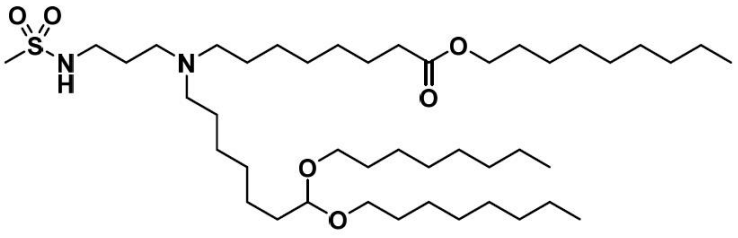
の化合物であって、
式中、
X^{1B}は、$C_{6\sim7}$アルキレンであり、
Z^{1B}は、$C_{2\sim3}$アルキレンであり、
R^{1B}は、$C_{7\sim9}$非分岐鎖アルキルであり、
各R^{2B}は、C_8アルキル、
又はその塩である、化合物。
【０２９７】
ある特定の実施形態において、X^{1B}は、C_6アルキレンである。他の実施形態において、X^{1B}は、C_7アルキレンである。
【０２９８】
ある特定の実施形態において、Z^{1B}は、直接結合であり、R^{5B}及びR^{6B}は、各々C_8アルコキシである。他の実施形態において、Z^{1B}は、C_3アルキレンであり、R^{5B}及びR^{6B}は、各々C_6アルキルである。
【０２９９】
ある特定の実施形態において、X^{2B}は、
【化１５】



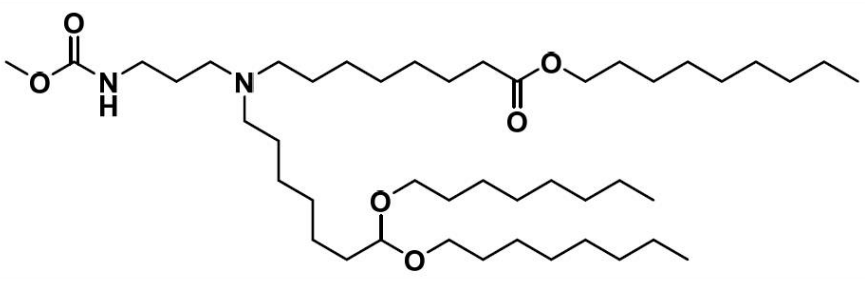
であり、R^{2B}は、アルコキシではない。他の実施形態において、X^{2B}は、存在しない。

【０３００】
ある特定の実施形態において、Z^{1B}は、C_2アルキレンであり、他の実施形態において、Z^{1B}は、C_3アルキレンである。
【０３０１】
ある特定の実施形態において、Z^{2B}は、－ＯＨである。他の実施形態において、Z^{2B}は、－ＮＨＣ（＝Ｏ）ＯＣＨ$_3$である。他の実施形態において、Z^{2B}は、－ＮＨＳ（＝Ｏ）$_2$ＣＨ$_3$である。
【０３０２】
ある特定の実施形態において、R^{1B}は、C_7非分岐鎖アルキレンである。他の実施形態において、R^{1B}は、C_8分岐鎖又は非分岐鎖アルキレンである。他の実施形態において、R^{1B}は、C_9分岐鎖又は非分岐鎖アルキレンである。
【０３０３】
ある特定の実施形態において、アミン脂質は、塩である。
【０３０４】
式（ＩＢ）の代表的な化合物には、

【表３－１】

化合物番号	化合物
1B	
2B	
3B	
4B	
5B	
6B	

【表３－２】

7B	

又はその塩、例えば、その薬学的に許容される塩が含まれる。

【０３０５】

本明細書に記載の脂質核酸アセンブリでの使用に好適なアミン脂質及び他の「生分解性脂質」は、インビボ又はエクスビボで生分解可能である。アミン脂質は、低い毒性を有する（例えば、１０ｍｇ／ｋｇ以上の量で副作用がない動物モデルにおいて許容される）。いくつかの実施形態において、アミン脂質を含む脂質核酸アセンブリには、アミン脂質のうちの少なくとも７５％が、８、１０、１２、２４、若しくは４８時間以内、又は３、４、５、６、７、若しくは１０日間以内に血漿又は操作された細胞から除去されるものが含まれる。いくつかの実施形態において、アミン脂質を含む脂質核酸アセンブリには、核酸、例えばｍＲＮＡ又はｇＲＮＡのうちの少なくとも５０％が、８、１０、１２、２４、若しくは４８時間以内、又は３、４、５、６、７、若しくは１０日間以内に血漿から除去されるものが含まれる。いくつかの実施形態において、アミン脂質を含む脂質核酸アセンブリには、例えば、脂質（例えば、アミン脂質）、核酸、例えば、ＲＮＡ／ｍＲＮＡ、又は他の構成要素を測定することによって、脂質核酸アセンブリのうちの少なくとも５０％が、８、１０、１２、２４、若しくは４８時間以内、又は３、４、５、６、７、若しくは１０日間以内に血漿から除去されるものが含まれる。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリの脂質カプセル化対遊離脂質、ＲＮＡ、又は核酸構成要素が測定される。

【０３０６】

生分解性脂質には、例えば、ＷＯ／２０２０／２１９８７６（例えば、１３～３３、６６～８７ページにおいて）、ＷＯ／２０２０／１１８０４１、ＷＯ／２０２０／０７２６０５（例えば、５～１２、２１～２９、６１～６８ページにおいて、ＷＯ／２０１９／０６７９９２、ＷＯ／２０１７／１７３０５４、ＷＯ２０１５／０９５３４０、及びＷＯ２０１４／１３６０８６の生分解性脂質が含まれ、ＬＮＰには、その中に記載されるＬＮＰ組成物が含まれ、その脂質及び組成物は、参照により本明細書に組み込まれる。

【０３０７】

脂質クリアランスは、文献に記載されているように測定されてもよい。Ｍａｉｅｒ，Ｍ．Ａ．，ｅｔ ａｌ．Ｂｉｏｄｅｇｒａｄａｂｌｅ Ｌｉｐｉｄｓ Ｅｎａｂｌｉｎｇ Ｒａｐｉｄｌｙ Ｅｌｉｍｉｎａｔｅｄ Ｌｉｐｉｄ Ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ｆｏｒ Ｓｙｓｔｅｍｉｃ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ＲＮＡｉ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ．Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．２０１３，２１（８），１５７０－７８（「Ｍａｉｅｒ」）を参照のこと。例えば、Ｍａｉｅｒにおいて、ルシフェラーゼを標的とするｓｉＲＮＡを含むＬＮＰ－ｓｉＲＮＡ系が、６～８週齢の雄Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに、外側尾静脈を介する静脈内ボーラス注射によって、０．３ｍｇ／ｋｇで投与された。投与後０．０８３、０．２５、０．５、１、２、４、８、２４、４８、９６、及び１６８時間で、血液、肝臓、及び脾臓試料を採取した。組織採取の前にマウスを生理食塩水で灌流させ、血液試料を処理して血漿を得た。全ての試料は、処理され、ＬＣ－ＭＳによって分析された。更に、Ｍａｉｅｒは、ＬＮＰ－ｓｉＲＮＡ製剤の投与後の毒性を評価するための手順を記載している。例えば、ルシフェラーゼを標的とするｓｉＲＮＡを、雄のＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットに、５ｍＬ／ｋｇの用量体積で単回静脈内ボーラス注射により、０、１、３、５、及び１０ｍｇ／ｋｇ（５動物／群）で投与した。２４時間後、意識のある動物の頸静脈から約１ｍＬの血液が得られ、血清を単離した。投与後７２時間で、全ての動物を剖検のために安楽死させた。臨床的徴候、体重、血清化学、臓器重量及び組織病理の評価を行った。Ｍａｉｅｒは、ｓｉＲＮＡ－ＬＮＰ製剤を評価するための方法を記載しているが、これらの方法は、本開示の脂質核酸アセンブリ組成物の投与のクリアランス、薬物動態、及び毒性の評価に適用され得る。

【０３０８】

当該技術分野において既知の核酸のＬＮＰ送達のためのイオン化脂質及び生体利用可能な脂質が好適である。脂質は、それらが含まれる媒体のｐＨに応じてイオン化していてもよい。例えば、わずかに酸性の媒体において、アミン脂質などの脂質は、プロトン化され、したがって正電荷を帯びていてもよい。逆に、例えば、ｐＨがおよそ７．３５である血

液などのわずかに塩基性の媒体では、アミン脂質などの脂質は、プロトン化されず、したがって電荷を帯びていない場合がある。

【０３０９】

脂質の電荷を帯びる能力は、その固有のｐＫａに関連する。いくつかの実施形態において、本開示のアミン脂質は、それぞれ独立して、約５．１～約７．４の範囲のｐＫａを有していてもよい。いくつかの実施形態において、本開示の生体利用可能な脂質は、各々、独立して、約５．１～約７．４、例えば、約５．５～約６．６、約５．６～約６．４、約５．８～約６．２、又は約５．８～約６．５の範囲のｐＫａを有してもよい。例えば、本開示のアミン脂質は、それぞれ独立して、約５．８～約６．５の範囲のｐＫａを有してもよい。約５．１～約７．４の範囲のｐＫａを有する脂質は、インビボで、例えば肝臓にカーゴを送達するのに有効である。更に、約５．３～約６．４の範囲のｐＫａを有する脂質は、インビボで、例えば腫瘍に送達するのに有効であることが見出されている。例えば、ＷＯ２０１４／１３６０８６を参照のこと。

【０３１０】

Ｂ．追加の脂質

本開示の脂質組成物における使用に好適な「中性脂質」としては、例えば、様々な中性、非荷電性、又は双性イオン性の脂質を含む。本開示における使用に好適な中性リン脂質の例は、５－ヘプタデシルベンゼン－１，３－ジオール（レゾルシノール）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ポスホコリン（ｐｏｈｓｐｈｏｃｈｏｌｉｎｅ）（ＤＯＰＣ）、ジミリストイルホスファチジルコリン（ＤＭＰＣ）、ホスファチジルコリン（ＰＬＰＣ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＡＰＣ）、ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）、卵ホスファチジルコリン（ＥＰＣ）、ジラウリロイルホスファチジルコリン（ＤＬＰＣ）、ジミリストイルホスファチジルコリン（ＤＭＰＣ）、１－ミリストイル－２－パルミトイルホスファチジルコリン（ＭＰＰＣ）、１－パルミトイル－２－ミリストイルホスファチジルコリン（ＰＭＰＣ）、１－パルミトイル－２－ステアロイルホスファチジルコリン（ＰＳＰＣ）、１，２－ジアラキドイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＢＰＣ）、１－ステアロイル－２－パルミトイルホスファチジルコリン（ＳＰＰＣ）、１，２－ジエイコセノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＥＰＣ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、リソホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、ジリノレオイルホスファチジルコリンジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＳＰＥ）、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、パルミトイルロレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、リソホスファチジルエタノールアミン、及びこれらの組み合わせを含むが、これらには限定されない。一実施形態において、中性リン脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、及びジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＭＰＥ）からなる群から選択され得る。別の実施形態において、中性リン脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）であり得る。

【０３１１】

「ヘルパー脂質」には、ステロイド、ステロール、及びアルキルレゾルシノールが含まれる。本開示において使用するのに好適なヘルパー脂質としては、限定されないが、コレステロール、５－ヘプタデシルレゾルシノール、及びヘミコハク酸コレステロールが挙げられる。一実施形態において、ヘルパー脂質は、コレステロールであってもよい。一実施形態において、ヘルパー脂質は、ヘミコハク酸コレステロールであってもよい。

【０３１２】

「ステルス脂質」は、ナノ粒子がインビボ（例えば血管中）で存在し得る時間の長さを変化させる脂質である。ステルス脂質は、例えば、粒子凝集を低減し、粒子サイズを制御することによって製剤化プロセスにおいて有用である。本明細書で使用されるステルス脂質は、脂質核酸アセンブリの薬物動態特性を調節し得るか、又はエクスビボでのナノ粒子

の安定性を補助し得る。本開示の脂質組成物における使用に好適なステルス脂質としては、限定されないが、脂質部分に連結した親水性頭部基を有するステルス脂質が挙げられる。本開示の脂質組成物における使用に好適なステルス脂質及びそのような脂質の生化学に関する情報は、Ｒｏｍｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ， Ｖｏｌ．２５，Ｎｏ．１，２００８，ｐｇ．５５－７１、及びＨｏｅｋｓｔｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｉｍｉｃａ ｅｔ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａ Ａｃｔａ １６６０（２００４）４１－５２に見出すことができる。追加の好適なＰＥＧ脂質は、例えば、ＷＯ２００６／００７７１２に開示される。

【０３１３】

一実施形態において、ステルス脂質の親水性頭部基は、ＰＥＧに基づくポリマーから選択されるポリマー部分を含む。ステルス脂質は、脂質部分を含み得る。いくつかの実施形態において、ステルス脂質は、ＰＥＧ脂質である。

【０３１４】

一実施形態において、ステルス脂質は、ＰＥＧに基づくポリマー（ポリ（エチレンオキシド）と呼ばれることもある）、ポリ（オキサゾリン）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（グリセロール）、ポリ（Ｎ－ビニルピロリドン）、ポリアミノ酸、及びポリ［Ｎ－（２－ヒドロキシプロピル）メタクリルアミド］から選択されるポリマー部分を含む。

【０３１５】

一実施形態において、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧに基づくポリマー部分（ポリ（エチレンオキシド）と呼ばれることもある）を含む。

【０３１６】

ＰＥＧ脂質は、脂質部分を更に含む。いくつかの実施形態において、脂質部分は、独立して約Ｃ４～約Ｃ４０の飽和若しくは不飽和炭素原子を含むアルキル鎖長を有するジアルキルグリセロール又はジアルキルグリカミド基を含むものを含め、ジアシルグリセロール又はジアシルグリカミドに由来していてもよく、鎖は、１つ以上の官能基（例えば、アミド若しくはエステルなど）を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、アルキル鎖長は、約Ｃ１０～Ｃ２０を含む。ジアルキルグリセロール又はジアルキルグリカミド基は、１つ以上の置換アルキル基を更に含み得る。鎖長は、対称又は非対称であり得る。

【０３１７】

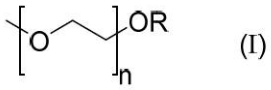
別に指示されない限り、本明細書において使用される「ＰＥＧ」という用語は、任意のポリエチレングリコール又は他のポリアルキレンエーテルポリマーを意味する。一実施形態において、ＰＥＧは、任意選択で置換されたエチレングリコール又はエチレンオキシドの直鎖又は分岐鎖のポリマーである。一実施形態において、ＰＥＧは非置換である。一実施形態において、ＰＥＧは、例えば、１つ以上のアルキル、アルコキシ、アシル、ヒドロキシ、又はアリール基によって置換されている。一実施形態において、この用語は、ＰＥＧ－ポリウレタン又はＰＥＧ－ポリプロピレンなどのＰＥＧコポリマーを含む（例えば、Ｊ．Ｍｉｌｔｏｎ Ｈａｒｒｉｓ，Ｐｏｌｙ（ｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ） ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ：ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｃａｌ ａｎｄ ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ（１９９２）を参照のこと）。別の実施形態において、この用語は、ＰＥＧコポリマーを含まない。一実施形態において、ＰＥＧは、約１３０～約５０，０００、副次的な実施形態において、約１５０～約３０，０００、副次的な実施形態において、約１５０～約２０，０００、副次的な実施形態において、約１５０～約１５，０００、副次的な実施形態において、約１５０～約１０，０００、副次的な実施形態において、約１５０～約６，０００、副次的な実施形態において、約１５０～約５，０００、副次的な実施形態において、約１５０～約４，０００、副次的な実施形態において、約１５０～約３，０００、副次的な実施形態において、約３００～約３，０００、副次的な実施形態において、約１，０００～約３，０００、副次的な実施形態において、約１，５００～約２，５００の分子量を有する。

【０３１８】

いくつかの実施形態において、ＰＥＧ（例えば、ステルス脂質などの脂質部分又は脂質

に共役する）は、「ＰＥＧ－２Ｋ」であり、「ＰＥＧ２０００」とも称され、これは約２，０００ダルトンの平均分子量を有する。ＰＥＧ－２Ｋは、本明細書において、以下の式（ＩＶ）によって表され、式中、ｎは４５であり、この数は、数平均重合度が約４５サブユニット

【化１６】



(I)

を含むことを意味する。しかしながら、例えば、数平均重合度が約２３サブユニット（ｎ＝２３）、及び／又は６８サブユニット（ｎ＝６８）を含む、当該技術分野において公知の他のＰＥＧの実施形態を使用してもよい。いくつかの実施形態において、ｎは約３０～約６０の範囲であってよい。いくつかの実施形態において、ｎは約３５～約５５の範囲であってよい。いくつかの実施形態において、ｎは約４０～約５０の範囲であってよい。いくつかの実施形態において、ｎは約４２～約４８の範囲であってよい。いくつかの実施形態において、ｎは４５であってもよい。いくつかの実施形態において、Ｒは、Ｈ、置換アルキル、及び非置換アルキルから選択され得る。いくつかの実施形態において、Ｒは非置換アルキルであってもよい。いくつかの実施形態において、Ｒはメチルであってもよい。

【０３１９】

本明細書に記載される実施形態のいずれかにおいて、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ－ジラウロイルグリセロール、ＰＥＧ－ジミリストイルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＭＧ）（ＮＯＦ、Ｔｏｋｙｏ、Ｊａｐａｎからのカタログ番号ＧＭ－０２０）、ＰＥＧ－ジパルミトイルグリセロール、ＰＥＧ－ジステアロイルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＳＰＥ）（カタログ番号ＤＳＰＥ－０２０ＣＮ、ＮＯＦ、Ｔｏｋｙｏ、Ｊａｐａｎ）、ＰＥＧ－ジラウリルグリカミド、ＰＥＧ－ジミリスチルグリカミド、ＰＥＧ－ジパルミトイルグリカミド、及びＰＥＧ－ジステアロイルグリカミド、ＰＥＧ－コレステロール（１－［８’－（コレスト－５－エン－３［ベータ］－オキシ）カルボキシアミド－３’，６’－ジオキサオクタニル］カルバモイル－［オメガ］－メチル－ポリ（エチレングリコール）、ＰＥＧ－ＤＭＢ（３，４－ジテトラデコキシルベンジル－［オメガ］－メチル－ポリ（エチレングリコール）エーテル）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］（ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧ）（カタログ番号８８０１５０Ｐ　ｆｒｏｍ　Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ，Ａｌａｂａｓｔｅｒ，Ａｌａｂａｍａ，ＵＳＡ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００）（ＰＥＧ２ｋ－ＤＳＰＥ）（ｃａｔ．番号８８０１２０Ｃ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロール、メトキシポリエチレングリコール（ＰＥＧ２ｋ－ＤＳＧ、ＧＳ－０２０，ＮＯＦ　Ｔｏｋｙｏ、Ｊａｐａｎ）、ポリ（エチレングリコール）－２０００－ジメタクリラート（ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＡ）、及び１，２－ジステアリルオキシプロピル－３－アミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］（ＰＥＧ２ｋ－ＤＳＡ）から選択され得る。一実施形態において、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧであってもよい。いくつかの実施形態において、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ２ｋ－ＤＳＧであってもよい。一実施形態において、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ２ｋ－ＤＳＰＥであってもよい。一実施形態において、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＡであってもよい。一実施形態において、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ２ｋ－Ｃ－ＤＭＡであってもよい。一実施形態において、ＰＥＧ脂質は、ＷＯ２０１６／０１０８４０（段落［００２４０］～［００２４４］）に開示される化合物Ｓ０２７であってもよい。一実施形態において、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ２ｋ－ＤＳＡであってもよい。一実施形態において、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ２ｋ－Ｃ１１であってもよい。いくつかの実施形態において、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ２ｋ－Ｃ１４であってもよい。いくつかの実施形態において、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ２ｋ－Ｃ１６であってもよい。いくつかの実施形態において、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ２ｋ－Ｃ１８であってもよい。

【０３２０】
Ｃ．脂質核酸アセンブリ組成物
脂質核酸アセンブリは、（ｉ）生分解性脂質、（ｉｉ）任意選択の中性脂質、（ｉｉｉ）ヘルパー脂質、及び（ｉｖ）ステルス脂質、例えば、ＰＥＧ脂質を含有し得る。脂質核酸アセンブリは、生分解性脂質と、中性脂質、ヘルパー脂質、及びステルス脂質、例えば、ＰＥＧ脂質のうちの１つ以上とを含有し得る。
【０３２１】
脂質核酸アセンブリは、（ｉ）カプセル化及びエンドソーム脱出のためのアミン脂質と、（ｉｉ）安定化のための中性脂質と、（ｉｉｉ）これも安定化のためのヘルパー脂質と、（ｉｖ）ステルス脂質、例えば、ＰＥＧ脂質とを含有し得る。脂質核酸アセンブリは、アミン脂質と、中性脂質、これも安定化のためのヘルパー脂質、及びステルス脂質、例えば、ＰＥＧ脂質のうちの１つ以上とを含有し得る。
【０３２２】
脂質核酸アセンブリ組成物は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、ＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡ、クラス２ＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡ、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ、及びｇＲＮＡのうちの１つ以上を含む核酸、例えば、ＲＮＡ構成要素を含み得る。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、ＲＮＡ構成要素としてのクラス２ＣａｓヌクレアーゼｇＲＮＡを含み得る。いくつかの実施形態において、ｎ脂質核酸アセンブリ組成物は、ＲＮＡ構成要素、アミン脂質、ヘルパー脂質、中性脂質、及びステルス脂質を含み得る。ある特定の脂質核酸アセンブリ組成物において、ヘルパー脂質は、コレステロールである。他の組成物において、中性脂質は、ＤＳＰＣである。追加の実施形態において、ステルス脂質は、ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧ又はＰＥＧ２ｋ－Ｃ１１である。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、脂質Ａ又は脂質Ａの等価物、ヘルパー脂質、中性脂質、ステルス脂質、及びｇＲＮＡなどのＲＮＡを含む。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、脂質Ａ又は脂質Ａの等価物、ヘルパー脂質、ステルス脂質、及びｇＲＮＡなどのＲＮＡを含む。いくつかの組成物において、アミン脂質は、脂質Ａである。いくつかの組成物において、アミン脂質は、脂質Ａ又はそのアセタール類似体であり、ヘルパー脂質はコレステロールであり、中性脂質はＤＳＰＣであり、ステルス脂質はＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧである。
【０３２３】
いくつかの実施形態において、脂質組成物は、製剤中の構成要素の脂質のそれぞれのモル比に従って記載される。本開示の実施形態は、製剤中の成分の脂質のそれぞれのモル比に従って記載される脂質組成物を提供する。一実施形態において、アミン脂質のｍｏｌ％は、約３０ｍｏｌ％～約６０ｍｏｌ％であり得る。一実施形態において、アミン脂質のｍｏｌ％は、約４０ｍｏｌ％～約６０ｍｏｌ％であり得る。一実施形態において、アミン脂質のｍｏｌ％は、約４５ｍｏｌ％～約６０ｍｏｌ％であり得る。一実施形態において、アミン脂質のｍｏｌ％は、約５０ｍｏｌ％～約６０ｍｏｌ％であり得る。一実施形態において、アミン脂質のｍｏｌ％は、約５５ｍｏｌ％～約６０ｍｏｌ％であり得る。一実施形態において、アミン脂質のｍｏｌ％は、約５０ｍｏｌ％～約５５ｍｏｌ％であり得る。一実施形態において、アミン脂質のｍｏｌ％は、約５０ｍｏｌ％であり得る。一実施形態において、アミン脂質のｍｏｌ％は、約５５ｍｏｌ％であり得る。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリバッチのアミン脂質のｍｏｌ％は、標的ｍｏｌ％の±３０％、±２５％、±２０％、±１５％、±１０％、±５％、又は±２．５％である。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリバッチのアミン脂質のｍｏｌ％は、標的ｍｏｌ％の±４ｍｏｌ％、±３ｍｏｌ％、±２ｍｏｌ％、±１．５ｍｏｌ％、±１ｍｏｌ％、±０．５ｍｏｌ％、又は±０．２５ｍｏｌ％である。全てのｍｏｌ％数は、脂質核酸アセンブリ組成物の脂質構成要素の分率として示される。いくつかの実施形態において、アミン脂質ｍｏｌ％の脂質核酸アセンブリのロット間の変動性は、１５％未満、１０％未満、又は５％未満である。
【０３２４】

一実施形態において、中性脂質のｍｏｌ％は、約５ｍｏｌ％～約１５ｍｏｌ％であり得る。一実施形態において、中性脂質のｍｏｌ％は、約７ｍｏｌ％～約１２ｍｏｌ％であり得る。一実施形態において、中性脂質のｍｏｌ％は、約９ｍｏｌ％であり得る。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリバッチの中性脂質のｍｏｌ％は、標的中性脂質ｍｏｌ％の±３０％、±２５％、±２０％、±１５％、±１０％、±５％、又は±２．５％である。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリのロット間の変動性は、１５％未満、１０％未満、又は５％未満である。

【０３２５】

一実施形態において、ヘルパー脂質のｍｏｌ％は、約２０ｍｏｌ％～約６０ｍｏｌ％であり得る。一実施形態において、ヘルパー脂質のｍｏｌ％は、約２５ｍｏｌ％～約５５ｍｏｌ％であり得る。一実施形態において、ヘルパー脂質のｍｏｌ％は、約２５ｍｏｌ％～約５０ｍｏｌ％であり得る。一実施形態において、ヘルパー脂質のｍｏｌ％は、約２５ｍｏｌ％～約４０ｍｏｌ％であり得る。一実施形態において、ヘルパー脂質のｍｏｌ％は、約３０ｍｏｌ％～約５０ｍｏｌ％であり得る。一実施形態において、ヘルパー脂質のｍｏｌ％は、約３０ｍｏｌ％～約４０ｍｏｌ％であり得る。一実施形態において、ヘルパー脂質のｍｏｌ％は、脂質構成要素を１００ｍｏｌ％にするように、アミン脂質、中性脂質、及びＰＥＧ脂質の濃度に基づいて調整される。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリバッチのヘルパーのｍｏｌ％は、標的ｍｏｌ％の±３０％、±２５％、±２０％、±１５％、±１０％、±５％、又は±２．５％である。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリのロット間の変動性は、１５％未満、１０％未満、又は５％未満である。

【０３２６】

一実施形態において、ＰＥＧ脂質のｍｏｌ％は、約１ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％であり得る。一実施形態において、ＰＥＧ脂質のｍｏｌ％は、約２ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％であり得る。一実施形態において、ＰＥＧ脂質のｍｏｌ％は、約１ｍｏｌ％～約３ｍｏｌ％であり得る。一実施形態において、ＰＥＧ脂質のｍｏｌ％は、約２ｍｏｌ％～約４ｍｏｌ％であり得る。一実施形態において、ＰＥＧ脂質のｍｏｌ％は、約１．５ｍｏｌ％～約２ｍｏｌ％であり得る。一実施形態において、ＰＥＧ脂質のｍｏｌ％は、約２．５ｍｏｌ％～約４ｍｏｌ％であり得る。一実施形態において、ＰＥＧ脂質のｍｏｌ％は、約３ｍｏｌ％であり得る。一実施形態において、ＰＥＧ脂質のｍｏｌ％は、約２．５ｍｏｌ％であり得る。一実施形態において、ＰＥＧ脂質のｍｏｌ％は、約２ｍｏｌ％であり得る。一実施形態において、ＰＥＧ脂質のｍｏｌ％は、約１．５ｍｏｌ％であり得る。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリバッチのＰＥＧ脂質のｍｏｌ％は、標的ＰＥＧ脂質ｍｏｌ％の±３０％、±２５％、±２０％、±１５％、±１０％、±５％、又は±２．５％である。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物、例えば、ＬＮＰ組成物のロット間の変動性は、１５％未満、１０％未満、又は５％未満である。

【０３２７】

本開示の実施形態は、製剤中の構成要素の脂質のそれぞれのモル比に従って記載される、ＬＮＰ組成物、例えば、イオン化脂質（例えば、脂質Ａ又はその類似体のうちの１つ）、ヘルパー脂質、ヘルパー脂質、及びＰＥＧ脂質を含むＬＮＰ組成物を提供する。ある特定の実施形態において、イオン化脂質の量は、約２５ｍｏｌ％～約４５ｍｏｌ％であり、中性脂質の量は、約１０ｍｏｌ％～約３０ｍｏｌ％であり、ヘルパー脂質の量は、約２５ｍｏｌ％～約６５ｍｏｌ％であり、ＰＥＧ脂質の量は、約１．５ｍｏｌ％～約３．５ｍｏｌ％である。ある特定の実施形態において、イオン化脂質の量は、脂質構成要素の約２９～４４ｍｏｌ％であり、中性脂質の量は、脂質構成要素の約１１～２８ｍｏｌ％であり、ヘルパー脂質の量は、脂質構成要素の約２８～５５ｍｏｌ％であり、ＰＥＧ脂質の量は、脂質構成要素の約２．３～３．５ｍｏｌ％である。ある特定の実施形態において、イオン化脂質の量は、脂質構成要素の約２９～３８ｍｏｌ％であり、中性脂質の量は、脂質構成要素の約１１～２０ｍｏｌ％であり、ヘルパー脂質の量は、脂質構成要素の約４３～５５ｍｏｌ％であり、ＰＥＧ脂質の量は、脂質構成要素の約２．３～２．７ｍｏｌ％である。

ある特定の実施形態において、イオン化脂質の量は、脂質構成要素の約２５～３４ｍｏｌ％であり、中性脂質の量は、脂質構成要素の約１０～２０ｍｏｌ％であり、ヘルパー脂質の量は、脂質構成要素の約４５～６５ｍｏｌ％であり、ＰＥＧ脂質の量は、脂質構成要素の約２．５～３．５ｍｏｌ％である。ある特定の実施形態において、イオン化脂質は、脂質構成要素の約３０～４３ｍｏｌ％であり、中性脂質の量は、脂質構成要素の約１０～１７ｍｏｌ％であり、ヘルパー脂質の量は、脂質構成要素の約４３．５～５６ｍｏｌ％であり、ＰＥＧ脂質の量は、脂質構成要素の約１．５～３ｍｏｌ％である。ある特定の実施形態において、イオン化脂質は、脂質構成要素の約３３ｍｏｌ％であり、中性脂質の量は、脂質構成要素の約１５ｍｏｌ％であり、ヘルパー脂質の量は、脂質構成要素の約４９ｍｏｌ％であり、ＰＥＧ脂質の量は、脂質構成要素の約３ｍｏｌ％である。ある特定の実施形態において、イオン化脂質の量は、脂質構成要素の約３２．９ｍｏｌ％であり、中性脂質の量は、脂質構成要素の約１５．２ｍｏｌ％であり、ヘルパー脂質の量は、脂質構成要素の約４９．２ｍｏｌ％であり、ＰＥＧ脂質の量は、脂質構成要素の約２．７ｍｏｌ％である。

【０３２８】

ある特定の実施形態において、イオン化脂質（例えば、脂質Ａ又はその類似体のうちの１つ）の量は、約２０～５０ｍｏｌ％、約２５～３４ｍｏｌ％、約２５～３８ｍｏｌ％、約２５～４５ｍｏｌ％、約２９～３８ｍｏｌ％、約２９～４３ｍｏｌ％、約２９～３４ｍｏｌ％、約３０～３４ｍｏｌ％、約３０～３８ｍｏｌ％、約３０～４３ｍｏｌ％、約３０～４３ｍｏｌ％、又は約３３ｍｏｌ％である。ある特定の実施形態において、中性脂質の量は、約１０～３０ｍｏｌ％、約１１～３０ｍｏｌ％、約１１～２０ｍｏｌ％、約１３～１７ｍｏｌ％、又は約１５ｍｏｌ％である。ある特定の実施形態において、ヘルパー脂質の量は、約３５～５０ｍｏｌ％、約３５～６５ｍｏｌ％、約３５～５５ｍｏｌ％、約３８～５０ｍｏｌ％、約３８～５５ｍｏｌ％、約３８～６５ｍｏｌ％、約４０～５０ｍｏｌ％、約４０～６５ｍｏｌ％、約４３～６５ｍｏｌ％、約４３～５５ｍｏｌ％、又は約４９ｍｏｌ％である。ある特定の実施形態において、ＰＥＧ脂質の量は、約１．５～３．５ｍｏｌ％、約２．０～２．７ｍｏｌ％、約２．０～３．５ｍｏｌ％、約２．３～３．５ｍｏｌ％、約２．３～２．７ｍｏｌ％、約２．５～３．５ｍｏｌ％、約２．５～２．７ｍｏｌ％、約２．９～３．５ｍｏｌ％、又は約２．７ｍｏｌ％である。

【０３２９】

本開示の他の実施形態は、製剤中の構成要素の脂質のそれぞれのモル比に従って記載される、ＬＮＰ組成物、例えば、イオン化脂質（例えば、脂質Ｄ又はその類似体のうちの１つ）、ヘルパー脂質、ヘルパー脂質、及びＰＥＧ脂質を含むＬＮＰ組成物を提供する。ある特定の実施形態において、イオン化脂質の量は、約２５ｍｏｌ％～約５０ｍｏｌ％であり、中性脂質の量は、約７ｍｏｌ％～約２５ｍｏｌ％であり、ヘルパー脂質の量は、約３９ｍｏｌ％～約６５ｍｏｌ％であり、ＰＥＧ脂質の量は、約０．５ｍｏｌ％～約１．８ｍｏｌ％である。ある特定の実施形態において、イオン化脂質の量は、脂質構成要素の約２７～４０ｍｏｌ％であり、中性脂質の量は、脂質構成要素の約１０～２０ｍｏｌ％であり、ヘルパー脂質の量は、脂質構成要素の約５０～６０ｍｏｌ％であり、ＰＥＧ脂質の量は、脂質構成要素の約０．９～１．６ｍｏｌ％である。ある特定の実施形態において、イオン化脂質の量は、脂質構成要素の約３０～４５ｍｏｌ％であり、中性脂質の量は、脂質構成要素の約１０～１５ｍｏｌ％であり、ヘルパー脂質の量は、脂質構成要素の約３９～５９ｍｏｌ％であり、ＰＥＧ脂質の量は、脂質構成要素の約１～１．５ｍｏｌ％である。ある特定の実施形態において、イオン化脂質の量は、脂質構成要素の約３０～４５ｍｏｌ％であり、中性脂質の量は、脂質構成要素の約１０～１５ｍｏｌ％であり、ヘルパー脂質の量は、脂質構成要素の約３９～５９ｍｏｌ％であり、ＰＥＧ脂質の量は、脂質構成要素の約１～１．５ｍｏｌ％である。ある特定の実施形態において、イオン化脂質は、脂質構成要素の約３０ｍｏｌ％であり、中性脂質の量は、脂質構成要素の約１０ｍｏｌ％であり、ヘルパー脂質の量は、脂質構成要素の約５９ｍｏｌ％であり、ＰＥＧ脂質の量は、脂質構成要素の約１～１．５ｍｏｌ％である。ある特定の実施形態において、イオン化脂質の量

は、脂質構成要素の約４０ｍｏｌ％であり、中性脂質の量は、脂質構成要素の約１５ｍｏｌ％であり、ヘルパー脂質の量は、脂質構成要素の約４３．５ｍｏｌ％であり、ＰＥＧ脂質の量は、脂質構成要素の約１．５ｍｏｌ％である。ある特定の実施形態において、イオン化脂質の量は、脂質構成要素の約５０ｍｏｌ％であり、中性脂質の量は、脂質構成要素の約１０ｍｏｌ％であり、ヘルパー脂質の量は、脂質構成要素の約３９ｍｏｌ％であり、ＰＥＧ脂質の量は、脂質構成要素の約１ｍｏｌ％である。

【０３３０】

ある特定の実施形態において、イオン化脂質（例えば、脂質Ｄ又はその類似体のうちの１つ）の量は、約２０～５５ｍｏｌ％、約２０～４５ｍｏｌ％、約２０～４０ｍｏｌ％、約２７～４０ｍｏｌ％、約２７～４５ｍｏｌ％、約２７～５５ｍｏｌ％、約３０～４０ｍｏｌ％、約３０～４５ｍｏｌ％、約３０～５５ｍｏｌ％、約３０ｍｏｌ％、約４０ｍｏｌ％、又は約５０ｍｏｌ％である。ある特定の実施形態において、中性脂質の量は、約７～２５ｍｏｌ％、約１０～２５ｍｏｌ％、約１０～２０ｍｏｌ％、約１５～２０ｍｏｌ％、約８～１５ｍｏｌ％、約１０～１５ｍｏｌ％、約１０ｍｏｌ％、又は約１５ｍｏｌ％である。ある特定の実施形態において、ヘルパー脂質の量は、約３９～６５ｍｏｌ％、約３９～５９ｍｏｌ％、約４０～６０ｍｏｌ％、約４０～６５ｍｏｌ％、約４０～５９ｍｏｌ％、約４３～６５ｍｏｌ％、約４３～６０ｍｏｌ％、約４３～５９ｍｏｌ％、又は約５０～６５ｍｏｌ％、約５０～５９ｍｏｌ％、約５９ｍｏｌ％、又は約４３．５ｍｏｌ％である。ある特定の実施形態において、ＰＥＧ脂質の量は、約０．５～１．８ｍｏｌ％、約０．８～１．６ｍｏｌ％、約０．８～１．５ｍｏｌ％、０．９～１．８ｍｏｌ％、約０．９～１．６ｍｏｌ％、約０．９～１．５ｍｏｌ％、１～１．８ｍｏｌ％、約１～１．６ｍｏｌ％、約１～１．５ｍｏｌ％、約１ｍｏｌ％、又は約１．５ｍｏｌ％である。

【０３３１】

いくつかの実施形態において、カーゴには、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤（例えば、Ｃａｓヌクレアーゼ、クラス２ＣａｓヌクレアーゼⅡ、又はＣａｓ９）をコードするｍＲＮＡ、又はｇＲＮＡ若しくはｇＲＮＡをコードする核酸、又はｍＲＮＡとｇＲＮＡとの組み合わせが含まれる。一実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、脂質Ａ若しくはその等価物、又はＷＯ２０２０２１９８７６において提供されるアミン脂質；又はＷＯ２０２０／０７２６０５において提供される脂質Ｄ又はアミン脂質を含み得る。いくつかの態様において、アミン脂質は、脂質Ａ、又は脂質Ｄである。いくつかの態様において、アミン脂質は、脂質Ａ等価物、例えば、脂質Ａの類似体、又はＷＯ２０２０／２１９８７６に提供されるアミン脂質である。ある特定の態様において、アミン脂質は、脂質Ａのアセタール類似体であり、任意選択により、ＷＯ２０２０／２１９８７６において提供されるアミン脂質である。いくつかの態様において、アミン脂質は、Ｗ２０２００７２６０５において見出される脂質Ｄ又はアミン脂質である。種々の実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、アミン脂質、中性脂質、ヘルパー脂質、及びＰＥＧ脂質を含む。いくつかの実施形態において、ヘルパー脂質は、コレステロールである。いくつかの実施形態において、中性脂質は、ＤＳＰＣである。特定の実施形態において、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧである。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、脂質Ａ、ヘルパー脂質、中性脂質、及びＰＥＧ脂質を含み得る。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、アミン脂質、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ脂質を含む。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、ＤＭＧを含むＰＥＧ脂質を含む。いくつかの実施形態において、アミン脂質は、脂質Ａ、及び脂質Ａのアセタール類似体を含む脂質Ａの等価物、若しくはＷＯ２０２０／２１９８７６において提供されるアミン脂質、又はＷＯ２０２０／０７２６０５において提供される脂質Ｄ若しくはアミン脂質から選択される。追加の実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、脂質Ａ、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む。追加の実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、脂質Ｄ、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む。

【０３３２】

本開示の実施形態はまた、封入される核酸のアミン脂質の正に帯電したアミン基（Ｎ）と負に帯電したリン酸基（Ｐ）との間のモル比に従って記載される脂質組成物を提供する。これは、式Ｎ／Ｐによって数学的に表されてもよい。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、アミン脂質、ヘルパー脂質、中性脂質、及びヘルパー脂質を含む脂質構成要素と、核酸構成要素とを含み得、Ｎ／Ｐ比は、約３～１０である。いくつかの実施形態において、ＬＮＰは、約４．５、５．０、５．５、６．０、又は６．５のＲＮＡ／ＤＮＡホスフェートに対するアミン脂質のモル比（Ｎ：Ｐ）を含む。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、アミン脂質、ヘルパー脂質、中性脂質、及びヘルパー脂質を含む脂質構成要素と、ＲＮＡ構成要素とを含み得、Ｎ／Ｐ比は、約３～１０である。一実施形態において、Ｎ／Ｐ比は、約５～７であってもよい。一実施形態において、Ｎ／Ｐ比は、約４．５～８であってもよい。一実施形態において、Ｎ／Ｐ比は、約６であってもよい。一実施形態において、Ｎ／Ｐ比は、６±１であってもよい。一実施形態において、Ｎ／Ｐ比は、約６±０．５であってもよい。いくつかの実施形態において、Ｎ／Ｐ比は、標的Ｎ／Ｐ比の±３０％、±２５％、±２０％、±１５％、±１０％、±５％、又は±２．５％である。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリのロット間の変動性は、１５％未満、１０％未満、又は５％未満である。

【０３３３】

いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリは、ＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡなどのｍＲＮＡを含み得るＲＮＡ構成要素を含む。一実施形態において、ＲＮＡ成分は、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡを含み得る。ＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡを含むいくつかの組成物において、脂質核酸アセンブリは、ｇＲＮＡなどのｇＲＮＡ核酸を更に含む。いくつかの実施形態において、ＲＮＡ成分は、Ｃａｓヌクレアーゼ　ｍＲＮＡと、ｇＲＮＡとを含む。いくつかの実施形態において、ＲＮＡ成分は、クラス２Ｃａｓヌクレアーゼ　ｍＲＮＡと、ｇＲＮＡとを含む。

【０３３４】

いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、クラス２Ｃａｓヌクレアーゼなどの ＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡ、アミン脂質、ヘルパー脂質、中性脂質、及びＰＥＧ脂質を含み得る。クラス２Ｃａｓヌクレアーゼなどの ＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡを含むある特定の脂質核酸アセンブリ組成物において、ヘルパー脂質はコレステロールである。クラス２Ｃａｓヌクレアーゼなどの ＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡを含む他の組成物において、中性脂質はＤＳＰＣである。クラス２Ｃａｓヌクレアーゼなどの ＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡを含む追加の実施形態において、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧ又はＰＥＧ２ｋ－Ｃ１１である。クラス２Ｃａｓヌクレアーゼなどの ＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡを含む特定の組成物において、アミン脂質は、脂質Ａ及びその等価物、例えば、脂質Ａのアセタール類似体、若しくはＷＯ２０２０／２１９８７６において提供されるアミン脂質、又はＷＯ２０２０／０７２６０５において提供される脂質Ｄ及びアミン脂質から選択される。

【０３３５】

いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、ｇＲＮＡを含み得る。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、アミン脂質、ｇＲＮＡ、ヘルパー脂質、中性脂質、及びＰＥＧ脂質を含み得る。ｇＲＮＡを含むある特定の脂質核酸アセンブリ組成物において、ヘルパー脂質はコレステロールである。ｇＲＮＡを含むいくつかの組成物において、中性脂質はＤＳＰＣである。ｇＲＮＡを含む追加の実施形態において、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧ又はＰＥＧ２ｋ－Ｃ１１である。いくつかの実施形態において、アミン脂質は、脂質Ａ及びその等価物、例えば、脂質Ａのアセタール類似体、若しくはＷＯ２０２０／２１９８７６に提供されるアミン脂質及びその等価物、又はＷＯ２０２０／０７２６０５に提供される脂質Ｄ及びアミン脂質並びにその等価物から選択される。

【０３３６】

一実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、ｓｇＲＮＡを含み得る。一実施形

態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、Ｃａｓ９　ｓｇＲＮＡを含み得る。一実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、Ｃｐｆ１　ｓｇＲＮＡを含み得る。ｓｇＲＮＡを含むいくつかの組成物において、脂質核酸アセンブリには、アミン脂質、ヘルパー脂質、中性脂質、及びＰＥＧ脂質が含まれる。ｓｇＲＮＡを含む特定の実施形態において、ヘルパー脂質は、コレステロールである。ｓｇＲＮＡを含む他の組成物において、中性脂質は、ＤＳＰＣである。ｓｇＲＮＡを含む追加の実施形態において、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧ又はＰＥＧ２ｋ－Ｃ１１である。いくつかの実施形態において、アミン脂質は、脂質Ａ及びその等価物、例えば、脂質Ａのアセタール類似体、若しくはＷＯ２０２０／２１９８７６において提供されるアミン脂質、又はＷＯ２０２０／０７２６０５において提供される脂質Ｄ及びアミン脂質から選択される。

【０３３７】

いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、ＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡ、及びｓｇＲＮＡであり得るｇＲＮＡを含む。一実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、アミン脂質、ＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡ、ｇＲＮＡ、ヘルパー脂質、中性脂質、及びＰＥＧ脂質を含み得る。ＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡ及びｇＲＮＡを含む特定の組成物において、ヘルパー脂質は、コレステロールである。ＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡ及びｇＲＮＡを含むいくつかの組成物において、中性脂質は、ＤＳＰＣである。ＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡ及びｇＲＮＡを含む追加の実施形態において、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧ又はＰＥＧ２ｋ－Ｃ１１である。いくつかの実施形態において、アミン脂質は、脂質Ａ及びその等価物、例えば、脂質Ａのアセタール類似体、若しくはＷＯ２０２０／２１９８７６において提供されるアミン脂質、又はＷＯ２０２０／０７２６０５において提供される脂質Ｄ及びアミン脂質から選択される。

【０３３８】

いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物には、クラス２Ｃａｓ　ｍＲＮＡなどのＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡ、及び少なくとも１つのｇＲＮＡが含まれる。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物には、約２５：１～約１：２５重量／重量のｇＲＮＡ対ＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡ、例えば、クラス２ＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡの比が含まれる。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ製剤には、約１０：１～約１：１０のｇＲＮＡ対ＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡ、例えば、クラス２ＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡの比が含まれる。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ製剤には、約８：１～約１：８のｇＲＮＡ対ＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡ、例えば、クラス２ＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡの比が含まれる。本明細書で測定される場合、比は、重量基準である。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ製剤には、約５：１～約１：５のｇＲＮＡ対ＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡ、例えば、クラス２ＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡの比が含まれる。いくつかの実施形態において、比の範囲は、約３：１～１：３、約２：１～１：２、約５：１～１：２、約５：１～１：１、約３：１～１：２、約３：１～１：１、約３：１、約２：１～１：１である。いくつかの実施形態において、ｇＲＮＡ対ｍＲＮＡの比は、約３：１又は約２：１である。いくつかの実施形態において、ｇＲＮＡ対ＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡ、例えば、クラス２ＣａｓヌクレアーゼのＲＮＡ、例えば、クラス２Ｃａｓヌクレアーゼの比は、約１：１である。いくつかの実施形態において、ｇＲＮＡ対ＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡ、例えば、クラス２Ｃａｓヌクレアーゼの比は、約１：２である。比は、約２５：１、１０：１、５：１、３：１、２：１、１：１、１：２、１：３、１：５、１：１０、又は１：２５であり得る。

【０３３９】

本明細書に開示される脂質核酸アセンブリ組成物は、テンプレート核酸を含んでもよい。テンプレート核酸は、クラス２ＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡなどのＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡと共製剤化してもよい。いくつかの実施形態において、テンプレート核酸は、ガイドＲＮＡとともに製剤化され得る。いくつかの実施形態において、テンプレート核酸は、ＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡの両方ととも

に製剤化され得る。いくつかの実施形態において、テンプレート核酸は、ＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡ又はガイドＲＮＡとは別個に製剤化され得る。テンプレート核酸は、脂質核酸アセンブリ組成物とともに、又はそれとは別々に送達されてもよい。いくつかの実施形態において、テンプレート核酸は、所望の修復機序に応じて、一本鎖であっても二本鎖であってもよい。テンプレートは、標的ＤＮＡ、又は標的ＤＮＡに隣接する配列と相同性のある領域を有してもよい。

【０３４０】

いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリは、ＲＮＡ水溶液を有機溶媒系脂質溶液、例えば、１００％エタノールと混合することによって形成される。好適な溶液又は溶媒は、水、ＰＢＳ、Ｔｒｉｓ緩衝液、ＮａＣｌ、クエン酸緩衝液、エタノール、クロロホルム、ジエチルエーテル、シクロヘキサン、テトラヒドロフラン、メタノール、イソプロパノールを含むか、又はそれらを含有してもよい。例えば、脂質核酸アセンブリのインビボ投与のための薬学的に許容される緩衝液を使用してもよい。いくつかの実施形態において、緩衝液は、脂質核酸アセンブリを含む組成物のｐＨをｐＨ６．５以上に維持するために使用される。いくつかの実施形態において、緩衝液は、脂質核酸アセンブリを含む組成物のｐＨをｐＨ７．０以上に維持するために使用される。いくつかの実施形態において、本組成物は、約７．２～約７．７の範囲のｐＨを有する。追加の実施形態において、本組成物は、約７．３～約７．７の範囲、又は約７．４～約７．６の範囲のｐＨを有する。更なる実施形態において、本組成物は、約７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、又は７．７のｐＨを有する。組成物のｐＨは、マイクロｐＨプローブで測定されてもよい。いくつかの実施形態において、凍結保護剤が組成物に含まれる。凍結保護剤の非限定的な例としては、スクロース、トレハロース、グリセロール、ＤＭＳＯ、及びエチレングリコールが挙げられる。例示的な組成物は、例えばスクロースなどの凍結保護剤を最大１０％含んでもよい。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０％の凍結保護剤を含んでもよい。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０％のスクロースを含んでもよい。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、緩衝液を含んでもよい。いくつかの実施形態において、緩衝液は、リン酸緩衝液（ＰＢＳ）、Ｔｒｉｓ緩衝液、クエン酸緩衝液、及びそれらの混合物を含んでもよい。いくつかの例示的な実施形態において、緩衝液は、ＮａＣｌを含む。いくつかの実施形態において、ＮａＣｌは、省かれる。ＮａＣｌの例示的な量は、約２０ｍＭ～約４５ｍＭの範囲であってもよい。ＮａＣｌの例示的な量は、約４０ｍＭ～約５０ｍＭの範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、ＮａＣｌの量は、約４５ｍＭである。いくつかの実施形態において、緩衝液は、Ｔｒｉｓ緩衝液である。Ｔｒｉｓの例示的な量は、約２０ｍＭ～約６０ｍＭの範囲であってもよい。Ｔｒｉｓの例示的な量は、約４０ｍＭ～約６０ｍＭの範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、Ｔｒｉｓの量は、約５０ｍＭである。いくつかの実施形態において、緩衝液は、ＮａＣｌ及びＴｒｉｓを含む。脂質核酸アセンブリ組成物のある特定の例示的な実施形態は、Ｔｒｉｓ緩衝液中に５％のスクロース及び４５ｍＭのＮａＣｌを含有する。他の例示的な実施形態において、組成物は、約５％ｗ／ｖの量のスクロース、約４５ｍＭのＮａＣｌ、及び約５０ｍＭのＴｒｉｓをｐＨ７．５で含有する。塩、緩衝液、及び凍結保護剤の量は、製剤全体の浸透圧が維持されるように変化させてもよい。例えば、最終浸透圧は、４５０ｍＯｓｍ／Ｌ未満に維持されてもよい。更なる実施形態において、浸透圧は、３５０～２５０ｍＯｓｍ／Ｌである。特定の実施形態は、３００±２０ｍＯｓｍ／Ｌの最終浸透圧を有する。

【０３４１】

いくつかの実施形態において、マイクロ流体混合、Ｔ混合、又は交差混合が使用される。特定の態様において、流速、接合部のサイズ、接合部の幾何形状、接合部の形状、管の直径、溶液、及び／又はＲＮＡ及び脂質の濃度を変化させてもよい。脂質核酸アセンブリ又は脂質核酸アセンブリ組成物は、例えば、透析、タンジェンシャルフロー濾過、又はクロマトグラフィーを介して濃縮又は精製してもよい。脂質核酸アセンブリは、例えば、懸

濁液、エマルション、又は凍結乾燥粉末として保存してもよい。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は２～８℃で保存され、ある特定の態様において、脂質核酸アセンブリ組成物は室温で保存される。追加の実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、例えば－２０℃又は－８０℃で凍結保存される。他の実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、約０℃～約－８０℃の範囲の温度で保存される。凍結脂質核酸アセンブリ組成物は、使用前に、例えば氷上で、４℃で、室温で、又は２５℃で解凍してもよい。凍結脂質核酸アセンブリ組成物は、種々の温度で、例えば氷上で、４℃で、室温で、２５℃で、又は３７℃で維持してもよい。

【０３４２】

いくつかの実施形態において、ＬＮＰ組成物中のＬＮＰの濃度は、約１～１０μｇ／ｍＬ、約２～１０μｇ／ｍＬ、約２．５～１０μｇ／ｍＬ、約１～５μｇ／ｍＬ、約２～５μｇ／ｍＬ、約２．５～５μｇ／ｍＬ、約０．０４μｇ／ｍＬ、約０．０８μｇ／ｍＬ、約０．１６μｇ／ｍＬ、約０．２５μｇ／ｍＬ、約０．６３μｇ／ｍＬ、約１．２５μｇ／ｍＬ、約２．５μｇ／ｍＬ、又は約５μｇ／ｍＬである。

【０３４３】

いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、ステルス脂質を含み、任意選択により、

（ｉ）脂質核酸アセンブリ組成物は、脂質構成要素を含み、脂質構成要素は、約５０～６０ｍｏｌ％の脂質Ａ若しくは脂質Ｄなどのアミン脂質と、約８～１０ｍｏｌ％の中性脂質と、約２．５～４ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、脂質構成要素の残りは、ヘルパー脂質であり、脂質核酸アセンブリ組成物のＮ／Ｐ比は、約６である；

（ｉｉ）脂質核酸アセンブリ組成物は、約５０～６０ｍｏｌ％の脂質Ａ若しくは脂質Ｄなどのアミン脂質と、約２７～３９．５ｍｏｌ％のヘルパー脂質と、約８～１０ｍｏｌ％の中性脂質と、約２．５～４ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、脂質核酸アセンブリ組成物のＮ／Ｐ比は、約５～７（例えば、約６）である；

（ｉｉｉ）脂質核酸アセンブリ組成物は、脂質構成要素を含み、脂質構成要素は、約５０～６０ｍｏｌ％の脂質Ａ若しくは脂質Ｄなどのアミン脂質と、約５～１５ｍｏｌ％の中性脂質と、約２．５～４ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、脂質構成要素の残りは、ヘルパー脂質であり、脂質核酸アセンブリ組成物のＮ／Ｐ比は、約３～１０である；

（ｉｖ）脂質核酸アセンブリ組成物は、脂質構成要素を含み、脂質構成要素は、約４０～６０ｍｏｌ％の脂質Ａ若しくは脂質Ｄなどのアミン脂質と、約５～１５ｍｏｌ％の中性脂質と、約２．５～４ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、脂質構成要素の残りは、ヘルパー脂質であり、脂質核酸アセンブリ組成物のＮ／Ｐ比は、約６である；

（ｖ）脂質核酸アセンブリ組成物は、脂質構成要素を含み、脂質構成要素は、約５０～６０ｍｏｌ％の脂質Ａ若しくは脂質Ｄなどのアミン脂質と、約５～１５ｍｏｌ％の中性脂質と、約１．５～１０ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、脂質構成要素の残りは、ヘルパー脂質であり、脂質核酸アセンブリ組成物のＮ／Ｐ比は、約６である；

（ｖｉ）脂質核酸アセンブリ組成物は、脂質構成要素を含み、脂質構成要素は、約４０～６０ｍｏｌ％の脂質Ａ若しくは脂質Ｄなどのアミン脂質と、約０～１０ｍｏｌ％の中性脂質と、約１．５～１０ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、脂質構成要素の残りは、ヘルパー脂質であり、脂質核酸アセンブリ組成物のＮ／Ｐ比は、約３～１０である；

（ｖｉｉ）脂質核酸アセンブリ組成物は、脂質構成要素を含み、脂質構成要素は、約４０～６０ｍｏｌ％の脂質Ａ若しくは脂質Ｄなどのアミン脂質と、約１ｍｏｌ％未満の中性脂質と、約１．５～１０ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、脂質構成要素の残りは、ヘルパー脂質であり、脂質核酸アセンブリ組成物のＮ／Ｐ比は、約３～

１０である；
（ｖｉｉｉ）脂質核酸アセンブリ組成物は、脂質構成要素を含み、脂質構成要素は、約４０～６０ｍｏｌ％の脂質Ａ若しくは脂質Ｄなどのアミン脂質と、約１．５～１０ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、脂質構成要素の残りは、ヘルパー脂質であり、ＬＮＰ組成物のＮ／Ｐ比は、約３～１０であり、脂質核酸アセンブリ組成物は、中性リン脂質を本質的に含まないか、若しくは含まない；又は
（ｉｘ）脂質核酸アセンブリ組成物は、脂質構成要素を含み、脂質構成要素は、約５０～６０ｍｏｌ％の脂質Ａ若しくは脂質Ｄなどのアミン脂質と、約８～１０ｍｏｌ％の中性脂質と、約２．５～４ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、脂質構成要素の残りは、ヘルパー脂質であり、脂質核酸アセンブリ組成物のＮ／Ｐ比は、約３～７である。

【０３４４】
いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、脂質構成要素を含み、脂質構成要素は、約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ又は脂質Ｄなどのアミン脂質と、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣなどの中性脂質と、約３ｍｏｌ％のＰＥＧ脂質、例えば、ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧなどのステルス脂質とを含み、脂質構成要素の残りは、コレステロールなどのヘルパー脂質であり、脂質核酸アセンブリ組成物のＮ／Ｐ比は、約６である。

【０３４５】
いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、脂質構成要素を含み、脂質構成要素は、約５０ｍｏｌ％の脂質Ａと、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣと、約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧとを含み、脂質構成要素の残りは、コレステロールであり、脂質核酸アセンブリ組成物のＮ／Ｐ比は、約６である。

【０３４６】
いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、脂質構成要素を含み、脂質構成要素は、約３５ｍｏｌ％の脂質Ａと、約１５ｍｏｌ％の中性脂質と、約４７．５ｍｏｌ％のヘルパー脂質と、約２．５ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、ＬＮＰ組成物のＮ／Ｐ比は、約３～７である。

【０３４７】
いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、脂質構成要素を含み、脂質構成要素は、約３５ｍｏｌ％の脂質Ｄと、約１５ｍｏｌ％の中性脂質と、約４７．５ｍｏｌ％のヘルパー脂質と、約２．５ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、ＬＮＰ組成物のＮ／Ｐ比は、約３～７である。

【０３４８】
いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、脂質構成要素を含み、脂質構成要素は、約２５～４５ｍｏｌ％の脂質Ａなどのアミン脂質と、約１０～３０ｍｏｌ％の中性脂質と、約２５～６５ｍｏｌ％のヘルパー脂質と、約１．５～３．５ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、ＬＮＰ組成物のＮ／Ｐ比は、約３～７である。

【０３４９】
いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、脂質構成要素を含み、
ａ．アミン脂質の量は、脂質構成要素の約２９～４４ｍｏｌ％であり、中性脂質の量は、脂質構成要素の約１１～２８ｍｏｌ％であり、ヘルパー脂質の量は、脂質構成要素の約２８～５５ｍｏｌ％であり、ＰＥＧ脂質の量は、脂質構成要素の約２．３～３．５ｍｏｌ％である
ｂ．アミン脂質の量は、脂質構成要素の約２９～３８ｍｏｌ％であり、中性脂質の量は、脂質構成要素の約１１～２０ｍｏｌ％であり、ヘルパー脂質の量は、脂質構成要素の約４３～５５ｍｏｌ％であり、ＰＥＧ脂質の量は、脂質構成要素の約２．３～２．７ｍｏｌ％である、
ｃ．アミン脂質の量は、脂質構成要素の約２５～３４ｍｏｌ％であり、中性脂質の量は、脂質構成要素の約１０～２０ｍｏｌ％であり、ヘルパー脂質の量は、脂質構成要素の約

４５～６５ｍｏｌ％であり、ＰＥＧ脂質の量は、脂質構成要素の約２．５～３．５ｍｏｌ％である、又は

ｄ．アミン脂質の量は、脂質構成要素の約３０～４３ｍｏｌ％であり、中性脂質の量は、脂質構成要素の約１０～１７ｍｏｌ％であり、ヘルパー脂質の量は、脂質構成要素の約４３．５～５６ｍｏｌ％であり、ＰＥＧ脂質の量は、脂質構成要素の約１．５～３ｍｏｌ％である。

【０３５０】

いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、脂質構成要素を含み、脂質構成要素は、約２５～５０ｍｏｌ％の脂質Ｄなどのアミン脂質と、約７～２５ｍｏｌ％の中性脂質と、約３９～６５ｍｏｌ％のヘルパー脂質と、約０．５～１．８ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、ＬＮＰ組成物のＮ／Ｐ比は、約３～７である。

【０３５１】

いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、脂質構成要素を含み、アミン脂質の量は、脂質構成要素の約３０～４５ｍｏｌ％、又は脂質構成要素の約３０～４０ｍｏｌ％であり、任意選択により、脂質構成要素の約３０ｍｏｌ％、４０ｍｏｌ％、又は５０ｍｏｌ％である。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、脂質構成要素を含み、中性脂質の量は、脂質構成要素の約１０～２０ｍｏｌ％、又は脂質構成要素の約１０～１５ｍｏｌ％であり、任意選択により、脂質構成要素の約１０ｍｏｌ％、又は１５ｍｏｌ％である。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、脂質構成要素を含み、ヘルパー脂質の量は、脂質構成要素の約５０～６０ｍｏｌ％、脂質構成要素の約３９～５９ｍｏｌ％、又は脂質構成要素の約４３．５～５９ｍｏｌ％であり、任意選択により、脂質構成要素の約５９ｍｏｌ％、脂質構成要素の約４３．５ｍｏｌ％、又は脂質構成要素の約３９ｍｏｌ％である。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、脂質構成要素を含み、ＰＥＧ脂質の量は、脂質構成要素の約０．９～１．６ｍｏｌ％、又は脂質構成要素の約１～１．５ｍｏｌ％であり、任意選択により、脂質構成要素の約１ｍｏｌ％、又は脂質構成要素の約１．５ｍｏｌ％である。

【０３５２】

いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、脂質構成要素を含み、

ａ．イオン化脂質の量は、脂質構成要素の約２７～４０ｍｏｌ％であり、中性脂質の量は、脂質構成要素の約１０～２０ｍｏｌ％であり、ヘルパー脂質の量は、脂質構成要素の約５０～６０ｍｏｌ％であり、ＰＥＧ脂質の量は、脂質構成要素の約０．９～１．６ｍｏｌ％である、

ｂ．イオン化脂質の量は、脂質構成要素の約３０～４５ｍｏｌ％であり、中性脂質の量は、脂質構成要素の約１０～１５ｍｏｌ％であり、ヘルパー脂質の量は、脂質構成要素の約３９～５９ｍｏｌ％であり、ＰＥＧ脂質の量は、脂質構成要素の約１～１．５ｍｏｌ％である、

ｃ．イオン化脂質の量は、脂質構成要素の約３０ｍｏｌ％であり、中性脂質の量は、脂質構成要素の約１０ｍｏｌ％であり、ヘルパー脂質の量は、脂質構成要素の約５９ｍｏｌ％であり、ＰＥＧ脂質の量は、脂質構成要素の約１～１．５ｍｏｌ％である、

ｄ．イオン化脂質の量は、脂質構成要素の約４０ｍｏｌ％であり、中性脂質の量は、脂質構成要素の約１５ｍｏｌ％であり、ヘルパー脂質の量は、脂質構成要素の約４３．５ｍｏｌ％であり、ＰＥＧ脂質の量は、脂質構成要素の約１．５ｍｏｌ％である、又は

ｅ．イオン化脂質の量は、脂質構成要素の約５０ｍｏｌ％であり、中性脂質の量は、脂質構成要素の約１０ｍｏｌ％であり、ヘルパー脂質の量は、脂質構成要素の約３９ｍｏｌ％であり、ＰＥＧ脂質の量は、脂質構成要素の約１ｍｏｌ％である。

【０３５３】

いくつかの実施形態において、ＬＮＰは、約１～２５０ｎｍ、１０～２００ｎｍ、約２０～１５０ｎｍ、約５０～１５０ｎｍ、約５０～１００ｎｍ、約５０～１２０ｎｍ、約６０～１００ｎｍ、約７５～１５０ｎｍ、約７５～１２０ｎｍ、又は約７５～１００ｎｍの

直径を有する。いくつかの実施形態において、ＬＮＰは、１００ｎｍ未満の直径を有する。いくつかの実施形態において、ＬＮＰ組成物は、約１０～２００ｎｍ、約２０～１５０ｎｍ、約５０～１５０ｎｍ、約５０～１００ｎｍ、約５０～１２０ｎｍ、約６０～１００ｎｍ、約７５～１５０ｎｍ、約７５～１２０ｎｍ、又は約７５～１００ｎｍの平均直径を有するＬＮＰの集団を含む。いくつかの実施形態において、ＬＮＰは、１００ｎｍ未満の平均直径を有する。

【０３５４】

いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、約４０～６０ｍｏｌ％のアミン脂質と、約５～１５ｍｏｌ％の中性脂質と、約１．５～１０ｍｏｌ％のＰＥＧ脂質とを含み、脂質構成要素の残りは、ヘルパー脂質であり、ＬＮＰ組成物のＮ／Ｐ比は、約３～１０である。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、約５０～６０ｍｏｌ％のアミン脂質と、約８～１０ｍｏｌ％の中性脂質と、約２．５～４ｍｏｌ％のＰＥＧ脂質とを含み、脂質構成要素の残りは、ヘルパー脂質であり、ＬＮＰ組成物のＮ／Ｐ比は、約３～８である。いくつかの実施形態において、脂質核酸アセンブリ組成物は、約５０～６０ｍｏｌ％のアミン脂質と、約５～１５ｍｏｌ％のＤＳＰＣと、約２．５～４ｍｏｌ％のＰＥＧ脂質とを含み、脂質構成要素の残りは、コレステロールであり、ＬＮＰ組成物のＮ／Ｐ比は、３～８±０．２である。

【０３５５】

実施形態において、平均直径は、Ｚ平均直径である。ある特定の実施形態において、Ｚ平均直径は、当該技術分野において既知の方法を使用して動的光散乱（ＤＬＳ）によって測定される。例えば、平均粒子サイズ及び多分散性は、Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ　ＤＬＳ装置を使用して、動的光散乱（ＤＬＳ）によって測定され得る。ＬＮＰ試料を、ＤＬＳにより測定する前にＰＢＳ緩衝液を用いて希釈する。多分散指数（ｐｄｉ）とともにＺ平均直径及び数平均直径を決定することができる。Ｚ平均は、粒子のアンサンブルコレクションの強度加重平均流体力学的サイズである。数平均は、粒子のアンサンブルコレクションの粒子数加重平均流体力学的サイズである。Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ装置は、当該技術分野において既知の方法を使用して、ＬＮＰのゼータ電位を測定するためにも使用され得る。

【０３５６】

Ｄ．ＤＮＡ依存性タンパク質キナーゼ阻害剤

ＤＮＡ依存性タンパク質キナーゼ（ＤＮＡ－ＰＫ）は、ＤＮＡ二本鎖切断修復機構において必須であることが示されている細胞核セリン／スレオニンキナーゼである。哺乳動物において、二本鎖ＤＮＡ切断の修復のための優勢な経路は、細胞周期の相に関係なく機能し、二本鎖切断のライゲーション可能ではない末端及びライゲーション末端を除去することによって作用する非相同末端結合（ＮＨＥＪ）経路である。ＤＮＡ－ＰＫ阻害剤（ＤＮＡ－ＰＫｉ）は、ＤＮＡ－ＰＫの構造的に多様なクラスの阻害剤であり、ＮＨＥＪ経路である。例示的なＤＮＡ－ＰＫｉは、例えば、ＷＯ０３０２４９４９、ＷＯ２０１４１５９６９０Ａ１、及びＷＯ２０１８１１４９９９において提供される。

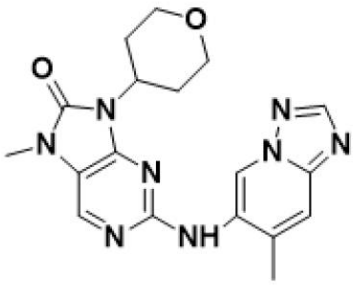
【０３５７】

ＤＮＡ依存性タンパク質キナーゼ（ＤＮＡ－ＰＫ）は、ＤＮＡ二本鎖切断修復機構において必須であることが示されている細胞核セリン／スレオニンキナーゼである。哺乳動物において、二本鎖ＤＮＡ切断の修復のための優勢な経路は、細胞周期の相に関係なく機能し、二本鎖切断のライゲーション可能ではない末端及びライゲーション末端を除去することによって作用する非相同末端結合（ＮＨＥＪ）経路である。ＤＮＡ－ＰＫ阻害剤（ＤＮＡ－ＰＫｉ）は、ＤＮＡ－ＰＫの構造的に多様なクラスの阻害剤であり、ＮＨＥＪ経路である。例示的なＤＮＡ－ＰＫｉは、例えば、ＷＯ０３０２４９４９、ＷＯ２０１４／１５９６９０Ａ１、及びＷＯ２０１８／１１４９９９において提供される。

【０３５８】

好ましい実施形態において、本開示は、

【化１７】

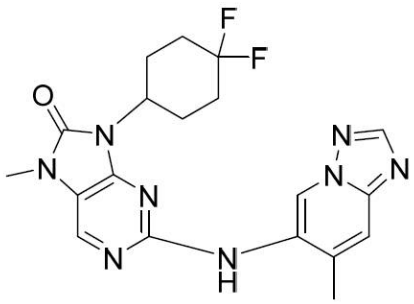


である、ＤＮＡＰＫＩ化合物１に関する。

【０３５９】

好ましい実施形態において、本開示は、

【化１８】

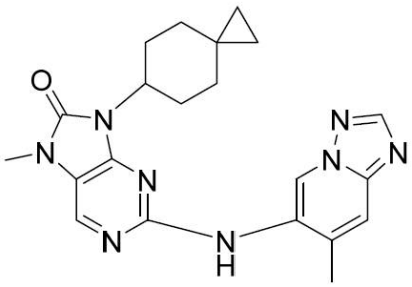


である、ＤＮＡＰＫＩ化合物３に関する。

【０３６０】

好ましい実施形態において、本開示は、

【化１９】



である、ＤＮＡＰＫＩ化合物４に関する。

【０３６１】

ある特定の実施形態において、本開示は、組成物中のＤＮＡＰＫＩの濃度が、約１μＭ以下、例えば、約０．２５μＭ以下、例えば、約０．１～１μＭ、好ましくは約０．１～０．５μＭである、本明細書に記載の組成物のいずれかに関する。

【０３６２】

いくつかの実施形態において、ＤＮＡＰＫＩは、参照により組み込まれるＷＯ２０１８１１４９９９に記載されている方法に従って形成される。

【０３６３】

例示的なＤＮＡ－ＰＫｉには、化合物１、化合物３、及び化合物４が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、ＤＮＡＰＫｉは、化合物１である。いくつかの実施形態において、ＤＮＡＰＫＩは、化合物３である。いくつかの実施形態にお

いて、ＤＮＡＰＫｉは、化合物４である。

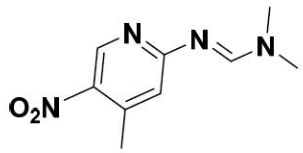
【０３６４】

１．ＤＮＡ依存性タンパク質キナーゼ阻害剤の合成

ａ）化合物１

中間体１ａ：（Ｅ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ’－（４－メチル－５－ニトロピリジン－２－イル）ホルムイミドアミド

【化２０】



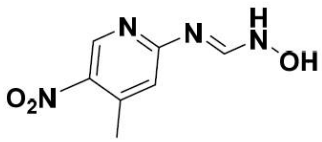
【０３６５】

４－メチル－５－ニトロ－ピリジン－２－アミン（５ｇ、１．０当量）のトルエン（０．３Ｍ）溶液に、ＤＭＦ－ＤＭＡ（３．０当量）を添加した。混合物を１１０℃で２時間撹拌した。反応混合物を減圧下で濃縮して残留物を得て、カラムクロマトグラフィーにより精製して、黄色固体の生成物を得た（５９％）。１Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，（ＣＤ３）２ＳＯ）δ８．８２（ｓ，１Ｈ），８．６３（ｓ，１Ｈ），６．７４（ｓ，１Ｈ），３．２１（ｍ，６Ｈ）。

【０３６６】

中間体１ｂ：（Ｅ）－Ｎ－ヒドロキシ－Ｎ’－（４－メチル－５－ニトロピリジン－２－イル）ホルムイミドアミド

【化２１】



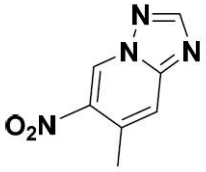
【０３６７】

中間体１ａ（４ｇ、１．０当量）のＭｅＯＨ（０．２Ｍ）溶液に、ＮＨ２ＯＨ・ＨＣｌ（２．０当量）を添加した。反応混合物を８０℃で１時間撹拌した。反応混合物を濾過し、濾液を減圧下で濃縮して、残留物を得た。残留物をＨ２ＯとＥｔＯＡｃとの間で分割し、続いてＥｔＯＡｃにより２回抽出した。有機相を減圧下で濃縮して残留物を得て、カラムクロマトグラフィーにより精製して、白色固体の生成物を得た（６６％）。１Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，（ＣＤ３）２ＳＯ）δ１０．５２（ｄ，Ｊ＝３．８Ｈｚ，１Ｈ），１０．０８（ｄｄ，Ｊ＝９．９，３．７Ｈｚ，１Ｈ），８．８４（ｄ，Ｊ＝３．８Ｈｚ，１Ｈ），７．８５（ｄｄ，Ｊ＝９．７，３．８Ｈｚ，１Ｈ），７．０１（ｄ，Ｊ＝３．９Ｈｚ，１Ｈ），３．３６（ｓ，３Ｈ）。

【０３６８】

中間体１ｃ：７－メチル－６－ニトロ－［１，２，４］トリアゾロ［１，５－ａ］ピリジン

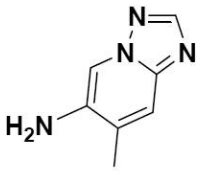
【化２２】



【０３６９】
中間体１ｂ（２．５ｇ、１．０当量）のＴＨＦ（０．４Ｍ）溶液に、トリフルオロ酢酸無水物（１．０当量）を０℃で添加した。混合物を２５℃で１８時間撹拌した。反応混合物を濾過し、濾液を減圧下で濃縮して、残留物を得た。残留物をカラムクロマトグラフィーにより精製して、白色固体の生成物を得た（４４％）。１Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ９．５３（ｓ，１Ｈ），８．４９（ｓ，１Ｈ），７．６９（ｓ，１Ｈ），２．７８（ｄ，Ｊ＝１．０Ｈｚ，３Ｈ）。

【０３７０】
中間体１ｄ：７－メチル－［１，２，４］トリアゾロ［１，５－ａ］ピリジン－６－アミン

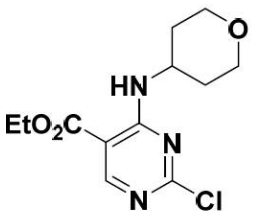
【化２３】



【０３７１】
Ｐｄ／Ｃ（１０％ｗ／ｗ、０．２当量）のＥｔＯＨ（０．１Ｍ）混合物に、中間体１ｃ（１．０当量、及びギ酸アンモニウム（５．０当量）を添加した。混合物を１０５℃で２時間加熱した。反応混合物を濾過し、濾液を減圧下で濃縮して、残留物を得た。残留物をカラムクロマトグラフィーにより精製して、薄茶色固体の生成物を得た。１Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，（ＣＤ３）２ＳＯ）δ８．４１（ｓ，２Ｈ），８．０７（ｄ，Ｊ＝９．０Ｈｚ，２Ｈ），７．４３（ｓ，１Ｈ），２．２２（ｓ，３Ｈ）。

【０３７２】
中間体１ｅ：エチル２－クロロ－４－（（テトラヒドロ－２Ｈ－ピラン－４－イル）アミノ）ピリミジン－５－カルボキシレート

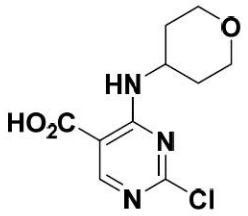
【化２４】



【０３７３】
テトラヒドロピラン－４－アミン（５ｇ、１．０当量）及びエチル２，４－ジクロロピリミジン－５－カルボキシレート（１．０当量）のＭｅＣＮ（０．２５～２．０Ｍ）溶液に、Ｋ２ＣＯ３（１．０～３．０当量）を添加した。混合物を２０～２５℃で少なくとも１２時間撹拌した。反応混合物を濾過し、濾液を減圧下で濃縮して、残留物を得た。残留物をカラムクロマトグラフィーにより精製して、淡黄色固体の生成物を得た（２１％）。１Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，（ＣＤ３）２ＳＯ）δ８．６０（ｓ，１Ｈ），８．２９（ｄ，Ｊ＝７．７Ｈｚ，１Ｈ），４．２８（ｑ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，２Ｈ），４．１４（ｄｔ，Ｊ＝１１．３，８．３，４．０Ｈｚ，１Ｈ），３．８２（ｄｔ，Ｊ＝１２．１，３．６Ｈｚ，２Ｈ），３．５７（ｓ，１Ｈ），１．８７－１．７８（ｍ，２Ｈ），１．７６－１．６７（ｍ，１Ｈ），１．５４（ｑｄ，Ｊ＝１０．９，４．３Ｈｚ，２Ｈ），１．２８（ｔ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，３Ｈ）。

【０３７４】
中間体１ｆ：２－クロロ－４－（（テトラヒドロ－２Ｈ－ピラン－４－イル）アミノ）ピリミジン－５－カルボン酸

【化２５】



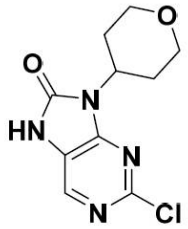
【０３７５】

ＬｉＯＨ（２．５当量）の１：１のＴＨＦ／Ｈ２Ｏ（０．２５～１．０Ｍ）溶液に、中間体１ｅ（３．０ｇ、１．０当量）を添加した。混合物を２５℃で１２時間撹拌した。混合物を減圧下で濃縮して、ＴＨＦを除去した。残留物を、２ＭのＨＣｌによってｐＨ２まで調整し、得られる沈殿物を濾過により収集し、水により洗浄し、真空下で乾燥させて残留物を得た。残留物をカラムクロマトグラフィーにより精製して、白色固体の生成物（７４％）を得るか、又は残留物を粗生成物として直接使用した。

【０３７６】

中間体１ｇ：２－クロロ－９－（テトラヒドロ－２Ｈ－ピラン－４－イル）－７，９－ジヒドロ－８Ｈ－プリン－８－オン

【化２６】



【０３７７】

中間体１ｆ（２ｇ、１．０当量）のＭｅＣＮ（０．２～０．５Ｍ）溶液に、Ｅｔ３Ｎ（１．０当量）を添加した。混合物を２５℃で３０分間撹拌した。次いで、ＤＰＰＡ（１．０当量）を混合物に添加した。混合物を１００℃で少なくとも７時間撹拌した。反応混合物を水に注ぎ、得られる沈殿物を濾過により収集し、水により洗浄し、真空下で乾燥させて残留物を得た。残留物をカラムクロマトグラフィーにより精製して、白色固体の生成物を得た（５６％）。１Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ９．５０（ｓ，１Ｈ），８．０９（ｓ，１Ｈ），４．５３（ｔｔ，Ｊ＝１２．４，４．２Ｈｚ，１Ｈ），４．０７（ｄｔ，Ｊ＝９．５，４．８Ｈｚ，２Ｈ），３．４８（ｔｄ，Ｊ＝１２．１，１．９Ｈｚ，２Ｈ），２．６９（ｑｄ，Ｊ＝１２．５，４．７Ｈｚ，２Ｈ），１．６７（ｄｄ，Ｊ＝１２．１，３．９Ｈｚ，２Ｈ）。

【０３７８】

中間体１ｈ：２－クロロ－７－メチル－９－（テトラヒドロ－２Ｈ－ピラン－４－イル）－７，９－ジヒドロ－８Ｈ－プリン－８－オン

【化２７】



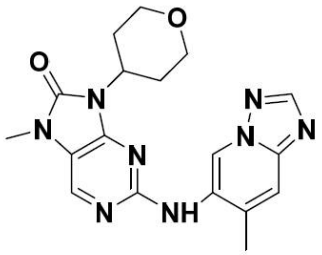
【０３７９】

中間体１ｇ（３００ｍｇ、１．０当量）及びＮａＯＨ（５．０当量）の１：１のＴＨＦ／Ｈ２Ｏ（０．２５～１．０Ｍ）混合物に、ヨードメタン（２．０当量）を添加した。反応混合物を２５℃で１２時間撹拌した。反応混合物を減圧下で濃縮して残留物を得て、カラムクロマトグラフィーにより精製して、白色固体の生成物を得た（４７％）。１Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，（ＣＤ３）２ＳＯ）δ８．３４（ｓ，１Ｈ），４．４３（ｄｄｔ，Ｊ＝１２．２，８．５，４．２Ｈｚ，１Ｈ），３．９５（ｄｄ，Ｊ＝１１．５，４．６Ｈｚ，２Ｈ），３．４３（ｔｄ，Ｊ＝１２．１，１．９Ｈｚ，２Ｈ），２．４５（ｓ，３Ｈ），２．４０（ｔｄ，Ｊ＝１２．５，４．７Ｈｚ，２Ｈ），１．６６（ｄｄｄ，Ｊ＝１２．２，４．４，１．９Ｈｚ，２Ｈ）。

【０３８０】

化合物１：７－メチル－２－（（７－メチル－［１，２，４］トリアゾロ［１，５－ａ］ピリジン－６－イル）アミノ）－９－（テトラヒドロ－２Ｈ－ピラン－４－イル）－７，９－ジヒドロ－８Ｈ－プリン－８－オン（化合物１）

【化２８】



【０３８１】

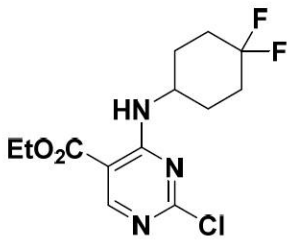
中間体１ｈ（１．３ｇ、１．０当量）、中間体１ｄ（１．０当量）、Ｐｄ（ｄｐｐｆ）Ｃｌ２（０．１～０．２当量）、ＸａｎｔＰｈｏｓ（０．１～０．２当量）、及びＣｓ２ＣＯ３（２．０当量）のＤＭＦ（０．０５～０．３Ｍ）混合物を脱気し、Ｎ２により３回パージし、混合物をＮ２雰囲気下で、１００～１３０℃で少なくとも１２時間撹拌した。次いで、反応混合物を水に注ぎ、ＤＣＭにより３回抽出した。組み合わせた有機相をブラインにより洗浄し、無水Ｎａ２ＳＯ４により乾燥させ、濾過し、濾液を真空濃縮した。残留物をカラムクロマトグラフィーにより精製して、淡黄色固体の生成物を得た。１Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，（ＣＤ３）２ＳＯ）δ９．１３（ｓ，１Ｈ），８．６９（ｓ，１Ｈ），８．３９（ｓ，１Ｈ），８．１０（ｓ，１Ｈ），７．７２（ｓ，１Ｈ），４．５０－４．３６（ｍ，１Ｈ），３．９８（ｄｄ，Ｊ＝１１．６，４．４Ｈｚ，２Ｈ），３．４４（ｄ，Ｊ＝１１．９Ｈｚ，２Ｈ），３．３２（ｓ，３Ｈ），２．４４－２．３８（ｍ，３Ｈ），１．６９（ｄ，Ｊ＝１１．６Ｈｚ，２Ｈ）。ＭＳ：３８１．３　ｍ／ｚ［Ｍ＋Ｈ］。

【０３８２】

ｂ）化合物３

中間体３ａ：エチル２－クロロ－４－（（４，４－ジフルオロシクロヘキシル）アミノ）ピリミジン－５－カルボキシレート

【化２９】



【０３８３】

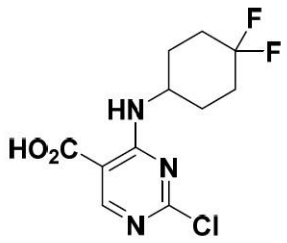
中間体３ａを、中間体１ｅで用いた方法を使用して、エチル２，４－ジクロロピリミジ

ン－５－カルボキシレート及び４，４－ジフルオロシクロヘキサンアミン塩酸塩から合成した。１Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，（ＣＤ３）２ＳＯ）δ８．６１（ｓ，１Ｈ），８．３０（ｄ，Ｊ＝７．７Ｈｚ，１Ｈ），４．２９（ｑ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，２Ｈ），４．１９－４．０９（ｍ，１Ｈ），２．０９－１．９０（ｍ，６Ｈ），１．６９－１．５８（ｍ，２Ｈ），１．２９（ｔ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，３Ｈ）。

【０３８４】

中間体３ｂ：２－クロロ－４－（（４，４－ジフルオロシクロヘキシル）アミノ）ピリミジン－５－カルボン酸

【化３０】



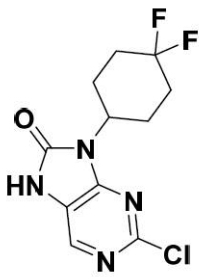
【０３８５】

中間体３ｂを、中間体１ｆで用いた方法を使用して、中間体３ａから合成した（７８％）。１Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，（ＣＤ３）２ＳＯ）δ１３．７７（ｓ，１Ｈ），８．５７（ｓ，１Ｈ），８．５３（ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ，１Ｈ），４．１２（ｄ，Ｊ＝１０．２Ｈｚ，１Ｈ），２．１４－１．８９（ｍ，６Ｈ），１．６２（ｄｄｔ，Ｊ＝１７．０，１０．３，６．０Ｈｚ，２Ｈ）。

【０３８６】

中間体３ｃ：２－クロロ－９－（４，４－ジフルオロシクロヘキシル）－７，９－ジヒドロ－８Ｈ－プリン－８－オン

【化３１】



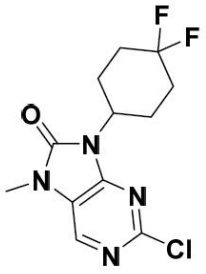
【０３８７】

中間体３ｃを、中間体１ｇで用いた方法を使用して、中間体３ｂから合成した（５６％）。１Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，（ＣＤ３）２ＳＯ）δ１１．７６－１１．６５（ｍ，１Ｈ），８．２０（ｓ，１Ｈ），４．４７（ｄｑ，Ｊ＝１２．６，６．２，４．３Ｈｚ，１Ｈ），２．３４－１．９７（ｍ，６Ｈ），１．９０（ｄ，Ｊ＝１２．９Ｈｚ，２Ｈ）。

【０３８８】

中間体３ｄ：２－クロロ－９－（４，４－ジフルオロシクロヘキシル）－７－メチル－７，９－ジヒドロ－８Ｈ－プリン－８－オン

【化３２】



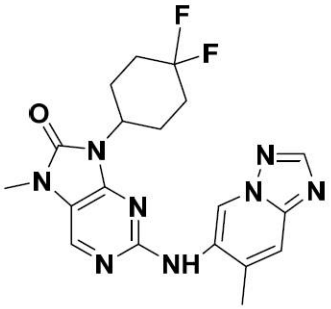
【０３８９】

中間体３ｃ（１．４ｇ、１．０当量）、ＮａＯＨ（５．０当量）の５：１のＴＨＦ／Ｈ２Ｏ（０．３Ｍ）混合物に、ＭｅＩ（２．０当量）を添加した。混合物をＮ２雰囲気下で、２０℃で１２時間撹拌した。反応混合物を減圧下で濃縮して残留物を得て、カラムクロマトグラフィーにより精製して、黄色固体の生成物を得た（４７％）。１Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ８．０１（ｓ，１Ｈ），４．５３－４．３９（ｍ，１Ｈ），３．４３（ｓ，３Ｈ），２．７３（ｑｄ，Ｊ＝１２．７，１２．１，３．８Ｈｚ，２Ｈ），２．３２－２．２０（ｍ，２Ｈ），２．０３－１．８２（ｍ，４Ｈ）。

【０３９０】

化合物３：９－（４，４－ジフルオロシクロヘキシル）－７－メチル－２－（（７－メチル－［１，２，４］トリアゾロ［１，５－ａ］ピリジン－６－イル）アミノ）－７，９－ジヒドロ－８Ｈ－プリン－８－オン（化合物３）

【化３３】



【０３９１】

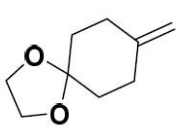
化合物３を、化合物１で用いた方法を使用して、中間体１ｄ及び中間体３ｄから合成し、続いて、逆相ＨＰＬＣにより精製した。１Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，（ＣＤ３）２ＳＯ）δ９．０３（ｓ，１Ｈ），８．６６（ｓ，１Ｈ），８．３８（ｓ，１Ｈ），８．１０（ｓ，１Ｈ），７．７１（ｄ，Ｊ＝１．４Ｈｚ，１Ｈ），４．３６（ｄ，Ｊ＝１２．３Ｈｚ，１Ｈ），３．３１（ｓ，３Ｈ），２．３８（ｄ，Ｊ＝１．０Ｈｚ，３Ｈ），２．１１－１．９６（ｍ，４Ｈ），１．８１（ｄ，Ｊ＝１２．６Ｈｚ，２Ｈ）。ＭＳ：４１５．５ｍ／ｚ［Ｍ＋Ｈ］。

【０３９２】

ｃ）化合物４

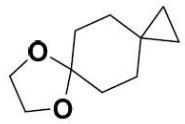
中間体４ａ：８－メチレン－１，４－ジオキサスピロ［４．５］デカン

【化３４】



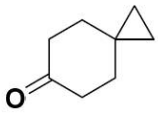
【０３９３】
メチル（トリフェニル）ホスホニウムブロミド（１．１５当量）のＴＨＦ（０．６Ｍ）溶液に、ｎ－ＢｕＬｉ（１．１当量）を－７８℃で滴加し、混合物を０℃で１時間撹拌した。次いで、１，４－ジオキサスピロ［４．５］デカン－８－オン（５０ｇ、１．０当量）を反応混合物に添加した。混合物を２５℃で１２時間撹拌した。反応混合物を、０℃でＮＨ４Ｃｌ水溶液に注ぎ、Ｈ２Ｏにより希釈し、ＥｔＯＡｃにより３回抽出した。組み合わせた有機層を減圧下で濃縮して残留物を得て、カラムクロマトグラフィーにより精製して、無色油の生成物を得た（５１％）。１Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ４．６７（ｓ，１Ｈ），３．９６（ｓ，４Ｈ），２．８２（ｔ，Ｊ＝６．４Ｈｚ，４Ｈ），１．７０（ｔ，Ｊ＝６．４Ｈｚ，４Ｈ）。

【０３９４】
中間体４ｂ：７，１０－ジオキサジスピロ［２．２．４６．２３］ドデカン
【化３５】



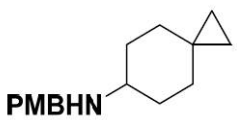
【０３９５】
中間体４ａ（５ｇ、１．０当量）のトルエン（３Ｍ）溶液に、ＺｎＥｔ２（２．５７当量）を－４０℃で滴加し、混合物を－４０℃で１時間撹拌した。次いで、ジヨードメタン（６．０当量）を、Ｎ２下で－４０℃で混合物に滴加した。次いで、混合物をＮ２雰囲気下で、２０℃で１７時間撹拌した。反応混合物を、０℃でＮＨ４Ｃｌ水溶液に注ぎ、ＥｔＯＡｃにより２回抽出した。組み合わせた有機相をブライン（２０ｍＬ）により洗浄し、無水Ｎａ２ＳＯ４により乾燥させ、濾過し、濾液を真空濃縮した。残留物をカラムクロマトグラフィーにより精製して、淡黄色油の生成物を得た（７３％）。

【０３９６】
中間体４ｃ：スピロ［２．５］オクタン－６－オン
【化３６】



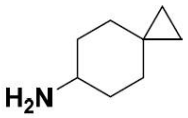
【０３９７】
中間体４ｂ（４ｇ、１．０当量）の１：１のＴＨＦ／Ｈ２Ｏ（１．０Ｍ）溶液に、ＴＦＡ（３．０当量）を添加した。混合物をＮ２雰囲気下で、２０℃で２時間撹拌した。反応混合物を減圧下で濃縮してＴＨＦを除去し、残留物を２ＭのＮａＯＨ（水溶液）によりｐＨ７まで調整した。混合物を水に注ぎ、ＥｔＯＡｃにより３回抽出した。組み合わせた有機相をブラインにより洗浄し、無水Ｎａ２ＳＯ４により乾燥させ、濾過し、濾液を真空濃縮した。残留物をカラムクロマトグラフィーにより精製して、淡黄色油の生成物を得た（６８％）。１Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ２．３５（ｔ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，４Ｈ），１．６２（ｔ，Ｊ＝６．６Ｈｚ，４Ｈ），０．４２（ｓ，４Ｈ）。

【０３９８】
中間体４ｄ：Ｎ－（４－メトキシベンジル）スピロ［２．５］オクタン－６－アミン
【化３７】



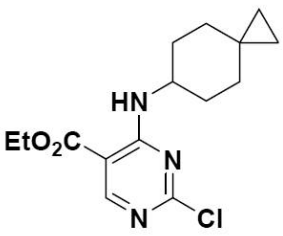
【０３９９】
中間体４ｃ（２ｇ、１．０当量）及び（４－メトキシフェニル）メタンアミン（１．１当量）のＤＣＭ（０．３Ｍ）混合物に、ＡｃＯＨ（１．３当量）を添加した。混合物をＮ２雰囲気下で、２０℃で１時間撹拌した。次いで、ＮａＢＨ（ＯＡｃ）３（３．３当量）を０℃で混合物に添加し、混合物をＮ２雰囲気下で、２０℃で１７時間撹拌した。反応混合物を、減圧下で濃縮してＤＣＭを除去し、得られる残留物をＨ２Ｏにより希釈し、ＥｔＯＡｃにより３回抽出した。組み合わせた有機層をブラインにより洗浄し、Ｎａ２ＳＯ４上で乾燥させ、濾過し、濾液を減圧下で濃縮して、残留物を得た。残留物をカラムクロマトグラフィーにより精製して、灰色固体の生成物を得た（５１％）。１Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，（ＣＤ３）２ＳＯ）δ７．１５－７．０７（ｍ，２Ｈ），６．７７－６．６８（ｍ，２Ｈ），３．５８（ｓ，３Ｈ），３．５４（ｓ，２Ｈ），２．３０（ｄｄｔ，Ｊ＝１０．１，７．３，３．７Ｈｚ，１Ｈ），１．６９－１．６２（ｍ，２Ｈ），１．３７（ｔｄ，Ｊ＝１２．６，３．５Ｈｚ，２Ｈ），１．１２－１．０２（ｍ，２Ｈ），０．８７－０．７８（ｍ，２Ｈ），０．１３－０．０４（ｍ，２Ｈ）。

【０４００】
中間体４ｅ：スピロ［２．５］オクタン－６－アミン
【化３８】



【０４０１】
Ｐｄ／Ｃ（１０％ｗ／ｗ、１．０当量）のＭｅＯＨ（０．２５Ｍ）懸濁液に、中間体４ｄ（２ｇ、１．０当量）を添加し、混合物をＨ２雰囲気下で、８０℃で、５０Ｐｓｉで２４時間撹拌した。反応混合物を濾過し、濾液を減圧下で濃縮して残留物を得て、これをカラムクロマトグラフィーにより精製して、白色固体の生成物を得た。１Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，（ＣＤ３）２ＳＯ）δ２．６１（ｔｔ，Ｊ＝１０．８，３．９Ｈｚ，１Ｈ），１．６３（ｄｄｄ，Ｊ＝９．６，５．１，２．２Ｈｚ，２Ｈ），１．４７（ｔｄ，Ｊ＝１２．８，３．５Ｈｚ，２Ｈ），１．２１－１．０６（ｍ，２Ｈ），０．８２－０．７２（ｍ，２Ｈ），０．１４－０．０５（ｍ，２Ｈ）。

【０４０２】
中間体４ｆ：エチル２－クロロ－４－（スピロ［２．５］オクタン－６－イルアミノ）ピリミジン－５－カルボキシレート
【化３９】



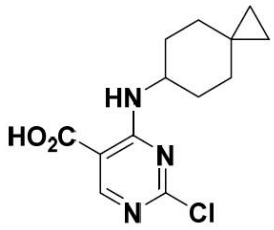
【０４０３】
中間体４ｆを、中間体１ｅで用いた方法を使用して、中間体４ｅから合成した（５４％）。１Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，（ＣＤ３）２ＳＯ）δ８．６４（ｓ，１Ｈ），８．４１（ｄ，Ｊ＝７．９Ｈｚ，１Ｈ），４．３３（ｑ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，２Ｈ），４．０８（ｄ，Ｊ＝９．８Ｈｚ，１Ｈ），１．９０（ｄｄ，Ｊ＝１２．７，４．８Ｈｚ，２Ｈ），１．６４（ｔ，Ｊ＝１２．３Ｈｚ，２Ｈ），１．５２（ｑ，Ｊ＝１０．７，９．１Ｈｚ，２Ｈ），１．３３（ｔ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，３Ｈ），１．１２（ｄ，Ｊ＝１３．０Ｈｚ，２Ｈ

），０．４０－０．２１（ｍ，４Ｈ）。

【０４０４】

中間体４ｇ：２－クロロ－４－（スピロ［２．５］オクタン－６－イルアミノ）ピリミジン－５－カルボン酸

【化４０】



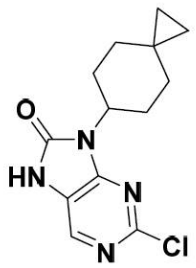
【０４０５】

中間体４ｇを、中間体１ｆで用いた方法を使用して、中間体４ｆから合成した（８２％）。１Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，（ＣＤ３）２ＳＯ）δ１３．５４（ｓ，１Ｈ），８．３８（ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，１Ｈ），８．３５（ｓ，１Ｈ），３．８２（ｑｔ，Ｊ＝８．２，３．７Ｈｚ，１Ｈ），１．６６（ｄｑ，Ｊ＝１２．８，４．１Ｈｚ，２Ｈ），１．４７－１．３４（ｍ，２Ｈ），１．３３－１．２０（ｍ，２Ｈ），０．８６（ｄｔ，Ｊ＝１３．６，４．２Ｈｚ，２Ｈ），０．０８（ｄｄ，Ｊ＝８．３，４．８Ｈｚ，４Ｈ）。

【０４０６】

中間体４ｈ：２－クロロ－９－（スピロ［２．５］オクタン－６－イル）－７，９－ジヒドロ－８Ｈ－プリン－８－オン

【化４１】



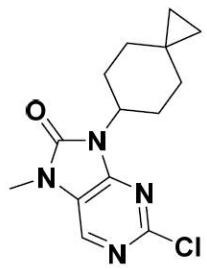
【０４０７】

中間体４ｈを、中間体１ｇで用いた方法を使用して、中間体４ｇから合成した（６７％）。１Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，（ＣＤ３）２ＳＯ）δ１１．６８（ｓ，１Ｈ），８．１８（ｓ，１Ｈ），４．２６（ｄｄｔ，Ｊ＝１２．３，７．５，３．７Ｈｚ，１Ｈ），２．４２（ｑｄ，Ｊ＝１２．６，３．７Ｈｚ，２Ｈ），１．９５（ｔｄ，Ｊ＝１３．３，３．５Ｈｚ，２Ｈ），１．８２－１．６９（ｍ，２Ｈ），１．０８－０．９５（ｍ，２Ｈ），０．３９（ｔｄｑ，Ｊ＝１１．６，８．７，４．２，３．５Ｈｚ，４Ｈ）。

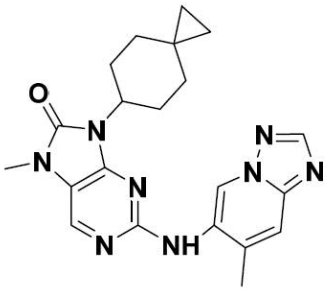
【０４０８】

中間体４ｉ：２－クロロ－７－メチル－９－（スピロ［２．５］オクタン－６－イル）－７，９－ジヒドロ－８Ｈ－プリン－８－オン

【化４２】



【０４０９】
中間体４ｉを、中間体１ｈで用いた方法を使用して、中間体４ｈから合成した（６７％）。１Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ７．５７（ｓ，１Ｈ），４．０３（ｔｔ，Ｊ＝１２．５，３．９Ｈｚ，１Ｈ），３．０３（ｓ，３Ｈ），２．１７（ｑｄ，Ｊ＝１２．６，３．８Ｈｚ，２Ｈ），１．６０（ｔｄ，Ｊ＝１３．４，３．６Ｈｚ，２Ｈ），１．４７－１．３４（ｍ，２Ｈ），１．０７（ｓ，１Ｈ），０．６３（ｄｐ，Ｊ＝１４．０，２．５Ｈｚ，２Ｈ），－０．０５（ｓ，４Ｈ）。
【０４１０】
化合物４：７－メチル－２－（（７－メチル－［１，２，４］トリアゾロ［１，５－ａ］ピリジン－６－イル）アミノ）－９－（スピロ［２．５］オクタン－６－イル）－７，９－ジヒドロ－８Ｈ－プリン－８－オン（化合物４）
【化４３】



【０４１１】
化合物４を、化合物１で用いた方法を使用して、中間体４ｉ及び中間体１ｄから合成した。１Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，（ＣＤ３）２ＳＯ）δ９．０９（ｓ，１Ｈ），８．７３（ｓ，１Ｈ），８．４４（ｓ，１Ｈ），８．１６（ｓ，１Ｈ），７．７８（ｓ，１Ｈ），４．２１（ｔ，Ｊ＝１２．５Ｈｚ，１Ｈ），３．３６（ｓ，３Ｈ），２．４３（ｓ，３Ｈ），２．３４（ｄｔ，Ｊ＝１３．０，６．５Ｈｚ，２Ｈ），１．９３－１．７７（ｍ，２Ｈ），１．７７－１．６２（ｍ，２Ｈ），０．９１（ｄ，Ｊ＝１３．２Ｈｚ，２Ｈ），０．３１（ｔ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，２Ｈ）。ＭＳ：４０５．５　ｍ／ｚ［Ｍ＋Ｈ］。
【０４１２】
ＶＩＩ．更なる例示的な実施形態
本発明は例示される実施形態と併せて記載されるが、それらは、本発明をそれらの実施形態に限定することを意図するものではないことが理解される。逆に、本発明は、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明内に含まれ得る全ての代替物、修正、及び特定の特徴の等価物を含む等価物を網羅することが意図されている。
【０４１３】
前述の一般的な説明及び詳細な説明の両方、並びに以下の実施例は、例示的及び説明的なものに過ぎず、本教示を限定するものではない。本明細書で使用される章の見出しは、構成的な目的のみのためであり、所望の主題を決して限定するものとして解釈されるべきではない。参照により組み込まれた任意の文献が本明細書で定義された任意の用語と矛盾する場合、本明細書が優先する。特に明記されていない限り、本出願で指定されている全ての範囲はエンドポイントを包含する。
【０４１４】
以下の非限定的な実施形態もまた包含される。
実施形態１。インビトロ培養細胞において複数のゲノム編集を産生する方法であって、
ａ．細胞を、少なくとも第１及び第２の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させるステップであって、第１の脂質核酸アセンブリ組成物が、第１の標的配列に指向された第１のガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）及び任意選択により第１の核酸ゲノム編集ツールを含み、第２の脂質核酸アセンブリ組成物が、第１の標的配列とは異なる第２の標的配列に指向された第２のｇＲＮＡ及び任意選択により核酸ゲノム編集ツールを含む、接触させ

るステップと、
ｂ．インビトロで細胞を拡大するステップと、
を含み、それによって細胞内で複数のゲノム編集を産生する、方法。
実施形態２。細胞を、ゲノム編集ツールを含む少なくとも１つの脂質核酸アセンブリ組成物と更に接触させる、実施形態１に記載の方法。
実施形態３。ゲノム編集ツールが、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードする核酸を含む、実施形態２に記載の方法。
実施形態４。細胞を、標的配列内の挿入のために、ドナー核酸と更に接触させる、実施形態１に記載の方法。
実施形態５。脂質核酸アセンブリ組成物を、逐次的に投与する、実施形態１～４のいずれか１つに記載の方法。
実施形態６。脂質核酸アセンブリ組成物を、同時に投与する、実施形態１～４のいずれか１つに記載の方法。
実施形態７。脂質核酸アセンブリ組成物を、インビトロ培養細胞に送達する方法であって、
ａ．細胞を、第１の核酸を含む少なくとも第１の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させ、それによって接触させた細胞を産生するステップと、
ｂ．インビトロで接触させた細胞を培養し、それによって培養された接触させた細胞を産生するステップと、
ｃ．培養された接触させた細胞を、第２の核酸を含む少なくとも第２の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させるステップであって、第２の核酸が第１の核酸とは異なる、接触させるステップと、
ｄ．インビトロで細胞を拡大するステップと、
を含み、拡大された細胞が、増加した生存を示す、方法。
実施形態８。インビトロ培養細胞が、非活性化された細胞である、実施形態１～７のいずれか１つに記載の方法。
実施形態９。インビトロ培養細胞が、活性化された細胞である、実施形態１～７のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１０。（ａ）の細胞が、少なくとも１つの脂質核酸アセンブリ組成物との接触後に活性化される、実施形態１～９のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１１。インビトロ培養Ｔ細胞において複数のゲノム編集を産生する方法であって、
ａ．Ｔ細胞を、（ｉ）第１の標的配列に指向されたガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含む第１の脂質核酸アセンブリ組成物、及び任意選択により（ｉｉ）１つ又は２つの追加の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させるステップであって、各追加の脂質核酸アセンブリ組成物が、第１の標的配列とは異なる標的配列に指向されたｇＲＮＡ及び／又はゲノム編集ツールを含む、接触させるステップと、
ｂ．インビトロでＴ細胞を活性化するステップと、
ｃ．活性化されたＴ細胞を、（ｉ）（ａ）の標的配列とは異なる標的配列に指向された更なるガイドＲＮＡを含む更なる核酸アセンブリ組成物、及び任意選択により（ｉｉ）１つ以上の更なる脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させるステップであって、各更なる脂質核酸アセンブリ組成物が、第１及び更なる標的配列とは異なる標的配列に指向されたガイドＲＮＡ、並びに／又はゲノム編集ツールを含む、接触させるステップと、
ｄ．インビトロで細胞を拡大するステップと、
を含み、それによって細胞内で複数のゲノム編集を産生する、方法。
実施形態１２。本方法が、細胞又はＴ細胞を、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、又は１１個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させることを含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１３。ステップ（ａ）の細胞又はＴ細胞を、２個の脂質核酸アセンブリ組成物

と接触させ、脂質核酸アセンブリ組成物を、逐次的に又は同時に投与する、実施形態１１又は１２に記載の方法。

実施形態１４。ステップ（ａ）の細胞又はＴ細胞を、３個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させ、脂質核酸アセンブリ組成物を、（ｉ）逐次的に、（ｉｉ）同時に、又は（ｉｉｉ）同時に（２個の組成物）かつ逐次的に（１個の組成物を前又は後に投与する）投与する、実施形態１１又は１２に記載の方法。

実施形態１５。ステップ（ｃ）の細胞又はＴ細胞を、１～８個の脂質核酸アセンブリ組成物、任意選択により１～４個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させ、脂質核酸アセンブリ組成物を、（ｉ）逐次的に、（ｉｉ）同時に、又は（ｉｉｉ）同時に（少なくとも２個の組成物）かつ逐次的に（少なくとも１個の組成物を前又は後に投与する）投与する、実施形態１１～１４のいずれか１つに記載の方法。

実施形態１６。初代免疫細胞を遺伝子組換えする方法であって、

ａ．細胞培養培地中で初代免疫細胞を培養することと、

ｂ．核酸を含む脂質核酸アセンブリ組成物を提供することと、

ｃ．（ａ）の免疫細胞を（ｂ）の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで組み合わせることと、

ｄ．任意選択により、免疫細胞が遺伝子組換えされていることを確認することと、

ｅ．任意選択により、免疫細胞を増殖させることと、を含む、方法。

実施形態１７。組み合わせステップ（ｃ）を、非活性化された免疫細胞上で行うことを含む、実施形態１６又は１７に記載の方法。

実施形態１８。組み合わせステップ（ｃ）を、活性化された免疫細胞上で行うことを含む、実施形態１６～１９のいずれか１つに記載の方法。

実施形態１９。免疫細胞を、ステップ（ｃ）の後に活性化することを更に含む、実施形態１６に記載の方法。

実施形態２０。

（ｂ２）第２の核酸を含む第２の脂質核酸アセンブリ組成物を提供することと、

（ｃ２）ステップ（ｃ）の遺伝子組換えされた免疫細胞を、第２の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで組み合わせることと、

（ｄ２）任意選択により、免疫細胞が、遺伝子組換えのための第２の核酸を使用して遺伝子組換えされていることを確認することと、

任意選択により、免疫細胞を増殖させることと、を更に含む、実施形態１６に記載の方法。

実施形態２１。

（ｂ３）第３の核酸を含む第３の脂質核酸アセンブリ組成物を提供することと、

（ｃ３）ステップ（ｃ２）の遺伝子組換えされた免疫細胞を、第３の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで組み合わせることと、

（ｄ２）任意選択により、免疫細胞が、遺伝子組換えのための第３の核酸を使用して遺伝子組換えされていることを確認することと、

（ｅ）任意選択により、免疫細胞を増殖させることと、を更に含む、実施形態２０に記載の方法。

実施形態２２。ステップ（ｃ）及び（ｃ２）、並びに存在する場合、ステップ（ｃ３）を逐次的に行う、実施形態２０又は２１に記載の方法。

実施形態２３。ステップ（ｃ）及び（ｃ２）、並びに存在する場合、ステップ（ｃ３）を同時に行う、実施形態２０又は２１に記載の方法。

実施形態２４。核酸又は核酸ゲノム編集ツール又はｇＲＮＡが、ＲＮＡを含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態２５。核酸又は核酸ゲノム編集ツールが、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態２６。核酸又は核酸ゲノム編集ツール又はｇＲＮＡが、ｓｇＲＮＡを含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態２７。核酸又は核酸ゲノム編集ツール又はｇＲＮＡが、ｄｇＲＮＡを含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態２８。核酸又は核酸ゲノム編集ツールが、ゲノム編集ツールをコードするｍＲＮＡを含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態２９。核酸又は核酸ゲノム編集ツールが、ドナー核酸を含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態３０。核酸又は核酸ゲノム編集ツールが、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態３１。核酸又は核酸ゲノム編集ツールが、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含み、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、Ｃａｓヌクレアーゼである、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態３２。核酸又は核酸ゲノム編集ツールが、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含み、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、Ｃａｓ９である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態３３。核酸又は核酸ゲノム編集ツールが、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含み、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態３４。核酸又は核酸ゲノム編集ツールが、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を含み、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、Ｃｐｆ１である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態３５。細胞が、ヒト細胞である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態３６。細胞が、ヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態３７。細胞が、リンパ球である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態３８。細胞が、Ｔ細胞である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態３９。細胞が、ＣＤ４＋Ｔ細胞である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態４０。細胞が、ＣＤ８＋Ｔ細胞である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態４１。細胞が、メモリＴ細胞、又はナイーブＴ細胞である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態４２。細胞が、Ｔｓｃｍ細胞である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態４３。細胞が、Ｂ細胞である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態４４。細胞が、メモリＢ細胞、又はナイーブＢ細胞である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態４５。細胞が、初代細胞である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態４６。脂質核酸アセンブリ組成物を、細胞に接触させる前に血清因子を用いて前処理し、任意選択により、血清因子が、霊長類血清因子、任意選択によりヒト血清因子である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態４７。脂質核酸アセンブリ組成物を、細胞に接触させる前にヒト血清を用いて前処理する、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態４８。脂質核酸アセンブリ組成物を、細胞に接触させる前にＡｐｏＥを用いて前処理し、任意選択により、ＡｐｏＥが、ヒトＡｐｏＥである、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態４９。脂質核酸アセンブリ組成物を、細胞に接触させる前に組換えＡｐｏＥ３又はＡｐｏＥ４を用いて前処理し、任意選択により、ＡｐｏＥ３又はＡｐｏＥ４が、ヒトＡｐｏＥ３又はＡｐｏＥ４である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態５０。細胞を、脂質核酸アセンブリ組成物又は第１の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる前に血清飢餓させる、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態５１。細胞を、１つ以上の増殖性サイトカインを含む細胞培養培地中で培養する、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態５２。細胞を、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で培養する、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態５３。細胞を、ＩＬ－７を含む細胞培養培地中で培養する、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態５４。細胞を、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１のうちの１つ以上若しくは全て、又は任意選択により、ＣＤ３及び／若しくはＣＤ２８を介して活性化を提供する薬剤のうちの１つ以上を含む細胞培養培地中で培養する、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態５５。細胞を、抗原に細胞を曝露することによって活性化する、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態５６。細胞を、ポリクローナル刺激によって活性化する、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態５７。本方法を、エクスビボで行う、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態５８。本方法が、細胞を１つ以上のドナー核酸と接触させることを更に含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態５９。本方法が、細胞を１つ以上のドナー核酸と接触させることを更に含み、１つ以上のドナー核酸が、ベクターを含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態６０。本方法が、細胞を１つ以上のドナー核酸と接触させることを更に含み、１つ以上のドナー核酸が、ウイルスベクターを含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態６１。本方法が、細胞を１つ以上のドナー核酸と接触させることを更に含み、１つ以上のドナー核酸が、レンチウイルスベクターを含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態６２。本方法が、細胞を１つ以上のドナー核酸と接触させることを更に含み、１つ以上のドナー核酸が、ＡＡＶを含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態６３。本方法が、細胞を１つ以上のドナー核酸と接触させることを更に含み、１つ以上のドナー核酸のうちの少なくとも１つが、脂質核酸アセンブリ組成物中に提供されている、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態６４。本方法が、細胞を１つ以上のドナー核酸と接触させることを更に含み、１つ以上のドナー核酸のうちの少なくとも１つが、相同組換えによって組み込まれる、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態６５。本方法が、細胞を１つ以上のドナー核酸と接触させることを更に含み、１つ以上のドナー核酸のうちの少なくとも１つが、標的配列の全て又は一部に相同な隣接する核酸領域を含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態６６。本方法が、細胞を１つ以上のドナー核酸と接触させることを更に含み、１つ以上のドナー核酸のうちの少なくとも１つが、平滑末端挿入によって組み込まれる、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態６７。本方法が、細胞を１つ以上のドナー核酸と接触させることを更に含み、１つ以上のドナー核酸のうちの少なくとも１つが、非相同末端結合よって組み込まれる、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態６８。本方法が、細胞を１つ以上のドナー核酸と接触させることを更に含み、１つ以上のドナー核酸が、セーフハーバー遺伝子座に挿入される、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態６９。本方法が、細胞を１つ以上のドナー核酸と接触させることを更に含み、１つ以上のドナー核酸のうちの少なくとも１つが、Ｔ細胞受容体配列の対応する領域と相同性を有する領域を含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態７０。本方法が、細胞を１つ以上のドナー核酸と接触させることを更に含み、

１つ以上のドナー核酸のうちの少なくとも１つが、ＴＲＡＣ遺伝子座、Ｂ２Ｍ遺伝子座、ＡＡＶＳ１遺伝子座、及び／又はＣＩＩＴＡ遺伝子座の対応する領域と相同性を有する領域を含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態７１。脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＡＣを標的とするｇＲＮＡを含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態７２。脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＢＣを標的とするｇＲＮＡを含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態７３。脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、Ｂ２Ｍを標的とするｇＲＮＡを含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態７４。脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＡＣを標的とするｇＲＮＡを含み、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＢＣを標的とするｇＲＮＡを含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態７５。脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＡＣを標的とするｇＲＮＡを含み、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＢＣを標的とするｇＲＮＡを含み、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、Ｂ２Ｍを標的とするｇＲＮＡを含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態７６。細胞が、Ｔ細胞であり、本方法が、内因性Ｔ細胞受容体の発現を低減させることを含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態７７。細胞が、Ｔ細胞であり、本方法が、遺伝子組換えされたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を発現するようにＴ細胞を遺伝子組換えすることを含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態７８。本方法が、細胞をドナー核酸と接触させることを含み、ドナー核酸が、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）をコードする、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態７９。本方法が、細胞をドナー核酸と接触させることを含み、ドナー核酸が、ＴＣＲ　ＷＴ１をコードする、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態８０。脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＡＣを標的とするｇＲＮＡを含み、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＢＣを標的とするｇＲＮＡを含み、本方法が、細胞をドナー核酸と接触させることを更に含み、ドナー核酸が、ＴＣＲをコードする、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態８１。ＴＣＲが、ＴＣＲ　ＷＴ１である、実施形態８０に記載の方法。

実施形態８２。脂質核酸アセンブリ組成物が、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態８３。脂質核酸アセンブリ組成物が、リポプレックスである、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態８４。脂質核酸アセンブリ組成物が、イオン化脂質を含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態８５。イオン化脂質が、生分解性イオン化脂質を含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態８６。イオン化脂質が、約５．１～約７．４、例えば約５．５～約６．６、約５．６～約６．４、約５．８～約６．２、又は約５．８～約６．５の範囲におけるｐＫａの範囲のＰＫ値を有する、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態８７。脂質核酸アセンブリ組成物が、アミン脂質を含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態８８。脂質核酸アセンブリ組成物が、アミン脂質を含み、アミン脂質が、脂質Ａ又はそのアセタール類似体である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態８９。脂質核酸アセンブリ組成物が、ヘルパー脂質を含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態９０。脂質核酸アセンブリ組成物が、ステルス脂質を含み、任意選択により、

（ｉ）脂質核酸アセンブリ組成物が、脂質構成要素を含み、脂質構成要素が、約５０～６０ｍｏｌ％の脂質Ａなどのアミン脂質と、約８～１０ｍｏｌ％の中性脂質と、約２．

５～４ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、脂質構成要素の残りが、ヘルパー脂質であり、脂質核酸アセンブリ組成物のＮ／Ｐ比が、約６である、

（ｉｉ）脂質核酸アセンブリ組成物が、約５０～６０ｍｏｌ％の脂質Ａなどのアミン脂質と、約２７～３９．５ｍｏｌ％のヘルパー脂質と、約８～１０ｍｏｌ％の中性脂質と、約２．５～４ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、脂質核酸アセンブリ組成物のＮ／Ｐ比が、約５～７（例えば、約６）である、

（ｉｉｉ）脂質核酸アセンブリ組成物が、脂質構成要素を含み、脂質構成要素が、約５０～６０ｍｏｌ％の脂質Ａなどのアミン脂質と、約５～１５ｍｏｌ％の中性脂質と、約２．５～４ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、脂質構成要素の残りが、ヘルパー脂質であり、脂質核酸アセンブリ組成物のＮ／Ｐ比が、約３～１０である、

（ｉｖ）脂質核酸アセンブリ組成物が、脂質構成要素を含み、脂質構成要素が、約４０～６０ｍｏｌ％の脂質Ａなどのアミン脂質と、約５～１５ｍｏｌ％の中性脂質と、約２．５～４ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、脂質構成要素の残りが、ヘルパー脂質であり、脂質核酸アセンブリ組成物のＮ／Ｐ比が、約６である、

（ｖ）脂質核酸アセンブリ組成物が、脂質構成要素を含み、脂質構成要素が、約５０～６０ｍｏｌ％の脂質Ａなどのアミン脂質と、約５～１５ｍｏｌ％の中性脂質と、約１．５～１０ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、脂質構成要素の残りが、ヘルパー脂質であり、脂質核酸アセンブリ組成物のＮ／Ｐ比が、約６である、

（ｖｉ）脂質核酸アセンブリ組成物が、脂質構成要素を含み、脂質構成要素が、約４０～６０ｍｏｌ％の脂質Ａなどのアミン脂質と、約０～１０ｍｏｌ％の中性脂質と、約１．５～１０ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、脂質構成要素の残りが、ヘルパー脂質であり、脂質核酸アセンブリ組成物のＮ／Ｐ比が、約３～１０である、

（ｖｉｉ）脂質核酸アセンブリ組成物が、脂質構成要素を含み、脂質構成要素が、約４０～６０ｍｏｌ％の脂質Ａなどのアミン脂質と、約１ｍｏｌ％未満の中性脂質と、約１．５～１０ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、脂質構成要素の残りが、ヘルパー脂質であり、脂質核酸アセンブリ組成物のＮ／Ｐ比が、約３～１０である、

（ｖｉｉｉ）脂質核酸アセンブリ組成物が、脂質構成要素を含み、脂質構成要素が、約４０～６０ｍｏｌ％の脂質Ａなどのアミン脂質と、約１．５～１０ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、脂質構成要素の残りが、ヘルパー脂質であり、ＬＮＰ組成物のＮ／Ｐ比が、約３～１０であり、脂質核酸アセンブリ組成物が、中性リン脂質を本質的に含まないか、若しくは含まない、又は

（ｉｘ）脂質核酸アセンブリ組成物が、脂質構成要素を含み、脂質構成要素が、約５０～６０ｍｏｌ％の脂質Ａなどのアミン脂質と、約８～１０ｍｏｌ％の中性脂質と、約２．５～４ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、脂質構成要素の残りが、ヘルパー脂質であり、脂質核酸アセンブリ組成物のＮ／Ｐ比が、約３～７である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態９１。脂質核酸アセンブリ組成物が、中性脂質を含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態９２。中性脂質が、脂質核酸アセンブリ組成物中に約９ｍｏｌ％で存在している、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態９３。アミン脂質が、脂質核酸アセンブリ組成物中に約５０ｍｏｌ％で存在している、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態９４。ステルス脂質が、脂質核酸アセンブリ組成物中に約３ｍｏｌ％で存在している、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態９５。ヘルパー脂質が、脂質核酸アセンブリ組成物中に約３８ｍｏｌ％で存在している、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。

実施形態９６。脂質核酸アセンブリ組成物のＮ／Ｐ比が、約６である、先行実施形態の

いずれか１つに記載の方法。
実施形態９７。脂質核酸アセンブリ組成物が、アミン脂質、ヘルパー脂質、及びＰＥＧ脂質を含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態９８。脂質核酸アセンブリ組成物が、アミン脂質、ヘルパー脂質、中性脂質、及びＰＥＧ脂質を含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態９９。脂質核酸アセンブリ組成物が、脂質構成要素を含み、脂質構成要素が、約５０ｍｏｌ％の脂質Ａなどのアミン脂質と、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣなどの中性脂質と、約３ｍｏｌ％のＰＥＧ脂質、例えば、ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧなどのステルス脂質とを含み、脂質構成要素の残りが、コレステロールなどのヘルパー脂質であり、脂質核酸アセンブリ組成物のＮ／Ｐ比が、約６である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１００。アミン脂質が、脂質Ａである、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１０１。中性脂質が、ＤＳＰＣである、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１０２。ステルス脂質が、ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧである、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１０３。ヘルパー脂質が、コレステロールである、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１０４。脂質核酸アセンブリ組成物が、脂質構成要素を含み、脂質構成要素が、約５０ｍｏｌ％の脂質Ａと、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣと、約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧとを含み、脂質構成要素の残りが、コレステロールであり、脂質核酸アセンブリ組成物のＮ／Ｐ比が、約６である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１０５。ＬＮＰが、約１～２５０ｎｍ、１０～２００ｎｍ、約２０～１５０ｎｍ、約５０～１５０ｎｍ、約５０～１００ｎｍ、約５０～１２０ｎｍ、約６０～１００ｎｍ、約７５～１５０ｎｍ、約７５～１２０ｎｍ、又は約７５～１００ｎｍの直径を有する、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１０６。ＬＮＰ組成物が、約１０～２００ｎｍ、約２０～１５０ｎｍ、約５０～１５０ｎｍ、約５０～１００ｎｍ、約５０～１２０ｎｍ、約６０～１００ｎｍ、約７５～１５０ｎｍ、約７５～１２０ｎｍ、又は約７５～１００ｎｍの平均直径を有するＬＮＰの集団を含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１０７。脂質核酸アセンブリ組成物が、
ａ．約４０～６０ｍｏｌ％のアミン脂質と、
ｂ．約５～１５ｍｏｌ％の中性脂質と、
ｃ．約１．５～１０ｍｏｌ％のＰＥＧ脂質とを含み、
脂質構成要素の残りが、ヘルパー脂質であり、ＬＮＰ組成物のＮ／Ｐ比が、約３～１０である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１０８。脂質核酸アセンブリ組成物が、
ａ．約５０～６０ｍｏｌ％のアミン脂質と、
ｂ．約８～１０ｍｏｌ％の中性脂質と、
ｃ．約２．５～４ｍｏｌ％のＰＥＧ脂質とを含み、
脂質構成要素の残りが、ヘルパー脂質であり、ＬＮＰ組成物のＮ／Ｐ比が、約３～８である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１０９。脂質核酸アセンブリ組成物が、
ａ．約５０～６０ｍｏｌ％のアミン脂質と、
ｂ．約５～１５ｍｏｌ％のＤＳＰＣと、
ｃ．約２．５～４ｍｏｌ％のＰＥＧ脂質とを含み、
脂質構成要素の残りが、コレステロールであり、
ＬＮＰ組成物のＮ／Ｐ比が、３～８±０．２である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１１０。平均直径が、Ｚ平均直径である、先行実施形態のいずれか１つに記載

の方法。
実施形態１１１。遺伝子組換えされた細胞が、
ａ．遺伝子の発現を減少するための遺伝子組換えを含む、
ｂ．ドナー核酸の挿入を含む遺伝子組換えを含む、
ｃ．サイトカイン（ＩＬ－２、ＩＦＮγ、及び／又はＴＮＦα）の分泌の増加を示す、
ｄ．細胞傷害性の増加を示す、
ｅ．メモリ細胞表現型の増加を示す
ｆ．拡大の増加を示す、
ｇ．反復刺激に対する増殖のより長い持続時間を示す、及び／又は
ｈ．転座事象の減少を示す、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１１２。接触させた細胞が、増加した生存を示し、増加した生存が、少なくとも７０％のトランスフェクション後の細胞生存率である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１１３。接触させた細胞が、増加した生存を示し、増加した生存が、少なくとも８０％のトランスフェクション後の細胞生存率である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１１４。接触させた細胞が、増加した生存を示し、増加した生存が、少なくとも９０％のトランスフェクション後の細胞生存率である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１１５。接触させた細胞が、増加した生存を示し、増加した生存が、少なくとも９５％のトランスフェクション後の細胞生存率である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１１６。接触させた細胞が、編集後の１％未満の転座を有する、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１１７。編集効率パーセントが、各ｇＲＮＡ標的部位に対して少なくとも６０％である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１１８。編集効率パーセントが、各ｇＲＮＡ標的部位に対して少なくとも７０％である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１１９。編集効率パーセントが、各ｇＲＮＡ標的部位に対して少なくとも８０％である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１２０。編集効率パーセントが、各ｇＲＮＡ標的部位に対して少なくとも９０％である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１２１。編集効率パーセントが、各ｇＲＮＡ標的部位に対して少なくとも９５％である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１２２。接触させた細胞が、Ｔ細胞であり、接触させたＴ細胞が、標準的なフローサイトメトリー方法によって、ＣＤ２７及びＣＤ４５ＲＡを発現する、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１２３。遺伝子組換えを含む細胞の集団を形成するために、細胞を増殖させることを更に含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１２４。編集又は修飾が、一過性ではない、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１２５。遺伝子組換えされた細胞が、療法に使用するためのものである、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１２６。遺伝子組換えされた細胞が、がん療法で使用するためのものである、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１２７。実施形態１～１２４のいずれか１つに記載の方法を使用して得ることができる、遺伝子組換えされている免疫細胞。
実施形態１２８。実施形態１２７に記載の細胞を含む、組成物。
実施形態１２９。患者に、請求項１２７に記載の細胞又は実施形態１２８に記載の組成

物を投与することを含む、治療方法。
実施形態１３０。がんの治療のための、実施形態１２９に記載の治療方法。
実施形態１３１。細胞が、がんの細胞によって発現されるポリペプチドに対して特異性を有するＴＣＲを発現する、実施形態１３０に記載の方法。
実施形態１３２。実施形態１～１２４のいずれか１つに記載のエクスビボ方法を行うことを含む、治療方法。
実施形態１３３。実施形態１～１２４のいずれか１つに記載の方法を行うことを含む、治療方法。
実施形態１３４。がんの治療のための、実施形態１３２又は１３３に記載の治療方法。
実施形態１３５。遺伝子組換えされた細胞の集団を得るために、実施形態１～１２６のいずれか１つに記載の方法を使用して、細胞、例えば、免疫細胞を遺伝子組換えすることと、遺伝子組換えされた細胞を細胞バンクに移入することと、を含む、細胞バンクを作製する方法。
実施形態１３６。第１の遺伝子組換えを含む、第１の細胞、例えば免疫細胞の集団を作製することと、第１の集団を少なくとも第１及び第２の亜集団に分割することと、第１及び第２の亜集団が少なくとも１つの共通の遺伝子組換え、及び少なくとも１つの異なる遺伝子組換えを有するように、先行請求項の請求項のいずれか一項に記載の各々の異なる遺伝子組換えを更に行うことと、を含む、実施形態１３５に記載の方法。
実施形態１３７。第１及び第２の亜集団を、細胞バンクに移入することを含む、実施形態１３６に記載の方法。
実施形態１３８。養子細胞移入（ＡＣＴ）療法として使用するための、実施形態１～１２４のいずれか１つに記載の方法によって産生された細胞又は細胞の集団。
実施形態１３９。細胞又は細胞の集団が、増加した編集後の生存率を有する、ＡＣＴ療法として使用するための、実施形態１～１２４のいずれか１つに記載の方法によって産生された細胞又は細胞の集団。
実施形態１４０。細胞又は細胞の集団が、低い毒性を有する、ＡＣＴ療法として使用するための、実施形態１～１２４のいずれか１つに記載の方法によって産生された細胞又は細胞の集団。
実施形態１４１。細胞又は細胞の集団が、２％未満の転座を有する、ＡＣＴ療法として使用するための、実施形態１～１２４のいずれか１つに記載の方法によって産生された細胞又は細胞の集団。
実施形態１４２。細胞又は細胞の集団が、測定可能な標的－標的転座を有さない、ＡＣＴ療法として使用するための、実施形態１～１２４のいずれか１つに記載の方法によって産生された細胞又は細胞の集団。
実施形態１４３。細胞又は細胞の集団が、増加したサイトカイン（ＩＬ－２、ＩＦＮγ、及び／又はＴＮＦα）の産生を有する、ＡＣＴ療法として使用するための、実施形態１～１２４のいずれか１つに記載の方法によって産生された細胞又は細胞の集団。
実施形態１４４。細胞又は細胞の集団が、反復刺激による応答の増強した耐久性を有する、ＡＣＴ療法として使用するための、実施形態１～１２４のいずれか１つに記載の方法によって産生された細胞又は細胞の集団。
実施形態１４５。細胞又は細胞の集団が、拡大の増加を有する、ＡＣＴ療法として使用するための、実施形態１～１２４のいずれか１つに記載の方法によって産生された細胞又は細胞の集団。
実施形態１４６。細胞又は細胞の集団が、メモリ細胞表現型を有する、ＡＣＴ療法として使用するための、実施形態１～１２４のいずれか１つに記載の方法によって産生された細胞又は細胞の集団。
実施形態１４７。細胞又は細胞の集団が、エレクトロポレーションなどの代替方法と同等の挿入率を有する、ＡＣＴ療法として使用するための、実施形態１～１２４のいずれか１つに記載の方法によって産生された細胞又は細胞の集団。
実施形態１４８。細胞又は細胞の集団が、低減された未編集細胞の数又はパーセンテー

ジを有する、ＡＣＴ療法として使用するための、実施形態１～１２４のいずれか１つに記載の方法によって産生された細胞又は細胞の集団。
実施形態１４９。細胞又は細胞の集団が、改善された細胞傷害性を有する、ＡＣＴ療法として使用するための、実施形態１～１２４のいずれか１つに記載の方法によって産生された細胞又は細胞の集団。
実施形態１５０。細胞又は細胞の集団が、改善された増殖を有する、ＡＣＴ療法として使用するための、実施形態１～１２４のいずれか１つに記載の方法によって産生された細胞又は細胞の集団。
実施形態１５１。実施形態１３８～１５０のいずれか１つに記載の細胞又は細胞集団を含む、薬学的組成物。
実施形態１５２。実施形態１３８～１５０のいずれか１つに記載の細胞又は集団を投与することを含む、養子細胞療法（ＡＣＴ）を必要としている対象においてそれを行う方法。

【０４１５】
以下の非限定的な実施形態もまた包含される。
実施形態０１　初代免疫細胞を遺伝子組換えする方法であって、
ａ．細胞培養培地中で初代免疫細胞を培養することと、
ｂ．核酸を含む脂質核酸アセンブリ組成物を提供することと、
ｃ．（ａ）の免疫細胞を（ｂ）の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで組み合わせることと、
ｄ．任意選択により、免疫細胞が遺伝子組換えされていることを確認することと、
ｅ．任意選択により、免疫細胞を増殖させることと、を含む、方法。
実施形態０２　組み合わせステップ（ｃ）を、非活性化された免疫細胞上で行うことを含む、実施形態１に記載の方法。
実施形態０３　組み合わせステップ（ｃ）を、活性化された免疫細胞上で行うことを含む、実施形態１に記載の方法。
実施形態０４　免疫細胞を、ステップ（ｃ）の後に活性化することを更に含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態０５　活性化ステップが、免疫細胞を抗原に曝露することを含む、実施形態４に記載の方法。
実施形態０６　培養ステップが、１つ以上の増殖性サイトカイン、例えば、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１のうちの１つ以上若しくは全て、並びに／又はＣＤ３及び／若しくはＣＤ２８を介して活性化を提供する１つ以上の薬剤を含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態０７　遺伝子組換えを含む免疫細胞の集団を形成するために、免疫細胞を増殖させることを更に含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態０８　細胞が、
ａ．遺伝子の発現を減少するための遺伝子組換えを含む、
ｂ．ドナー核酸構築物の挿入を含む遺伝子組換えを含む、
ｃ．サイトカイン（ＩＬ－２、インターフェロン－ガンマ、ＴＮＦ－αなど）の分泌の増加を示す、
ｄ．細胞傷害性の増加を示す、
ｅ．メモリ細胞表現型の増加を示す、
ｆ．拡大の増加を示す、
ｇ．反復刺激に対する増殖のより長い持続時間を示す、及び／又は
ｈ．転座事象の減少を示す、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態０９　免疫細胞が、Ｔ細胞又はＢ細胞などのリンパ球である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１０
（ｂ２）第２の核酸を含む第２の脂質核酸アセンブリ組成物を提供することと、

（ｃ２）ステップ（ｃ）の遺伝子組換えされた免疫細胞を、第２の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで組み合わせることと、
（ｄ２）任意選択により、免疫細胞が、遺伝子組換えのための第２の核酸を使用して遺伝子組換えされていることを確認することと、
任意選択により、免疫細胞を増殖させることと、を更に含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１１
（ｂ３）第３の核酸を含む第３の脂質核酸アセンブリ組成物を提供することと、
（ｃ３）ステップ（ｃ２）の遺伝子組換えされた免疫細胞を、第３の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで組み合わせることと、
（ｄ２）任意選択により、免疫細胞が、遺伝子組換えのための第３の核酸を使用して遺伝子組換えされていることを確認することと、
（ｅ）任意選択により、免疫細胞を増殖させることと、を更に含む、実施形態１０に記載の方法。
実施形態１２　ステップ（ｃ）及び（ｃ２）、並びに存在する場合、ステップ（ｃ３）を逐次的に行う、実施形態１０又は１１に記載の方法。
実施形態１３　ステップ（ｃ）及び（ｃ２）、並びに存在する場合、ステップ（ｃ３）を同時に行う、実施形態１０又は１１に記載の方法。
実施形態１４　核酸が、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤によって行われる遺伝子組換えのためのガイド配列である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１５　ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９タンパク質である、実施形態１４に記載の方法。
実施形態１６　脂質核酸アセンブリ組成物が、ドナーテンプレートをコードするベクターを更に含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態１７　ドナーテンプレートが、Ｔ細胞受容体遺伝子座の対応する領域と相同性を有する領域を含む、実施形態１６に記載の方法。
実施形態１８　ドナーテンプレートが、ＴＲＡＣ遺伝子座、Ｂ２Ｍ遺伝子座、ＡＡＶＳ１遺伝子座、及び／又はＣＩＩＴＡ遺伝子座の対応する領域と相同性を有する領域を含む、実施形態１６又は１７に記載の方法。
実施形態１９　複数の遺伝子組換えを、免疫細胞の活性化の前に免疫細胞に対して行う、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態２０ 免疫細胞が、ヒト細胞である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態２１　免疫細胞が、メモリＴ細胞、又はナイーブＴ細胞である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態２２　免疫細胞が、ＣＤ４＋Ｔ細胞である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態２３　免疫細胞が、ＣＤ８＋Ｔ細胞である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態２４　免疫細胞が、Ｂ細胞である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態２５　本方法が、エクスビボ方法である、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態２６　脂質核酸アセンブリ組成物を、血清因子と組み合わせることを更に含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態２７　脂質核酸アセンブリ組成物を血清因子と組み合わせることが、組成物を免疫細胞と組み合わせる前に生じる、実施形態２６に記載の方法。
実施形態２８　血清因子が、ＡｐｏＥである、実施形態２６又は２７に記載の方法。
実施形態２９　血清因子が、組換えＡｐｏＥ３又はＡｐｏＥ４である、実施形態２８に記載の方法。
実施形態３０　血清因子が、ヒト血清などの霊長類血清により含まれている、実施形態２６又は２７に記載の方法。

実施形態３１　遺伝子組換えされたＴ細胞受容体を発現するように、Ｔ細胞を遺伝子組換えすることを含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態３２　内因性Ｔ細胞受容体の発現を低減させることを含む、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態３３　遺伝子組換えされた免疫細胞が、療法に使用するためのものである、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態３４　遺伝子組換えされた免疫細胞が、がん療法に使用するためのものである、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法。
実施形態３５　遺伝子組換えされた細胞の集団を得るために、先行実施形態のいずれか１つに記載の方法を使用して、免疫細胞を遺伝子組換えすることと、遺伝子組換えされた細胞を細胞バンクに移入することと、を含む、細胞バンクを作製する方法。
実施形態３６　第１の遺伝子組換えを含む、第１の免疫細胞の集団を作製することと、第１の集団を少なくとも第１及び第２の亜集団に分割することと、第１及び第２の亜集団が少なくとも１つの共通の遺伝子組換え、及び少なくとも１つの異なる遺伝子組換えを有するように、実施形態１～３４のいずれか１つに記載の各々の異なる遺伝子組換えを更に行うことと、を含む、実施形態３５に記載の方法。
実施形態３７　第１及び第２の亜集団を、細胞バンクに移入することを含む、実施形態３６に記載の方法。
実施形態３８　実施形態１～３４のいずれか１つに記載の方法を使用して得ることができる、遺伝子組換えされている免疫細胞。
実施形態３９　少なくとも３つの別々の遺伝子組換えを導入するように遺伝子組換えされている、実施形態３８に記載の免疫細胞。
実施形態４０　実施形態３８又は３９に記載の免疫細胞を含む、組成物。
実施形態４１　患者に、実施形態３８若しくは３９に記載の免疫細胞、又は実施形態４０に記載の組成物を投与することを含む、治療方法。
実施形態４２　がんの治療のための、実施形態４１に記載の治療方法。
実施形態４３　実施形態１～３４のいずれか１つに記載のエクスビボ方法を行うことを含む、治療方法。
実施形態４４　実施形態１～３４のいずれか１つに記載の方法を行うことを含む、治療方法。
実施形態４５　がんの治療のための、実施形態４３又は４４に記載の治療方法。
【０４１６】
以下の非限定的な実施形態もまた包含される。
実施形態＿Ａ１。インビトロ培養細胞において複数のゲノム編集を産生する方法であって、
ａ．細胞を、少なくとも第１及び第２の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させるステップであって、第１の脂質核酸アセンブリ組成物が、第１の標的配列に指向された第１のガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）及び任意選択により核酸ゲノム編集ツールを含み、第２の脂質核酸アセンブリ組成物が、第１の標的配列とは異なる第２の標的配列に指向された第２のｇＲＮＡ及び任意選択により核酸ゲノム編集ツールを含む、接触させるステップと、
ｂ．インビトロで細胞を拡大するステップと、
を含み、それによって細胞内で複数のゲノム編集を産生する、方法。
実施形態＿Ａ２。細胞を、ゲノム編集ツールを含む少なくとも１つの脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる、実施形態＿Ａ１に記載の方法。
実施形態＿Ａ３。ゲノム編集ツールが、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードする核酸を含む、実施形態＿Ａ２に記載の方法。
実施形態＿Ａ４。細胞を、標的配列内の挿入のために、ドナー核酸と更に接触させる、実施形態＿Ａ１に記載の方法。
実施形態＿Ａ５。脂質核酸アセンブリ組成物を、逐次的に投与する、実施形態＿Ａ１～

４のいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ａ６。脂質核酸アセンブリ組成物を、同時に投与する、実施形態＿Ａ１～４のいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ａ７。脂質核酸アセンブリ組成物を、インビトロ培養細胞に送達する方法であって、
ａ．細胞を、第１の核酸を含む少なくとも第１の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させ、それによって接触させた細胞を産生するステップと、
ｂ．インビトロで接触させた細胞を培養し、それによって培養された接触させた細胞を産生するステップと、
ｃ．培養された接触させた細胞を、第２の核酸を含む少なくとも第２の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させるステップであって、第２の核酸が第１の核酸とは異なる、接触させるステップと、
ｄ．インビトロで細胞を拡大するステップと、
を含み、拡大された細胞が、増加した生存を示す、方法。
実施形態＿Ａ８。拡大された細胞が、少なくとも７０％の生存率を有し、任意選択により、生存率が、２４時間の拡大時に少なくとも７０％である、実施形態７に記載の方法。
実施形態＿Ａ９。細胞を、２～１２個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる、実施形態＿Ａ１～８のいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ａ１０。細胞を、２～８個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる、実施形態＿Ａ１～８のいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ａ１１。細胞を、２～６個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる、実施形態＿Ａ１～８のいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ａ１２。細胞を、３～８個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる、実施形態＿Ａ１～８のいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ａ１３。細胞を、３～６個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる、実施形態＿Ａ１～８のいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ａ１４。細胞を、４～６個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる、実施形態＿Ａ１～８のいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ａ１５。細胞を、６～１２個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる、実施形態＿Ａ１～８のいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ａ１６。細胞を、３、４、５、又は６個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させる、実施形態＿Ａ１～８のいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ａ１７。細胞を、脂質核酸アセンブリ組成物と同時に接触させる、実施形態＿Ａ１～８のいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ａ１８。細胞を、６個以下の脂質核酸アセンブリ組成物と同時に接触させる、実施形態＿Ａ１～８のいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ａ１９。細胞を、２個以下の脂質核酸アセンブリ組成物と同時に接触させる、実施形態＿Ａ１～８のいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ａ２０。細胞における遺伝子編集の方法であって、
ａ．細胞を、第１のゲノム編集ツールを含む第１の脂質核酸アセンブリ組成物、及び第２のゲノム編集ツールを含む第２の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させるステップと、
ｂ．インビトロで細胞を拡大するステップと、
を含み、それによって細胞を編集する、方法。
実施形態＿Ａ２１。第１のゲノム編集ツールが、ガイドＲＮＡを含む、実施形態＿Ａ２０に記載の方法。
実施形態＿Ａ２２。細胞を第３の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させることを更に含むことが、ゲノム編集ツールを含み、少なくとも２つの脂質核酸アセンブリ組成物が、ｇＲＮＡを含む、実施形態＿Ａ２０又は２１に記載の方法。
実施形態＿Ａ２３。少なくとも１つの脂質核酸アセンブリ組成物が、ＲＮＡガイドＤＮ

Ａ結合剤を含む、実施形態＿Ａ２０～２２のいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ａ２４。ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、Ｃａｓ９である、実施形態＿Ａ２３に記載の方法。
実施形態＿Ａ２５。細胞を、ドナー核酸と接触させることを更に含む、実施形態＿Ａ２０～２４のいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ａ２６。第２のゲノム編集ツールが、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、例えばＳ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９である、実施形態＿Ａ２０～２５のいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ａ２７。細胞が、免疫細胞である、実施形態＿Ａ１～２６のいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ａ２８。細胞が、リンパ球である、実施形態＿Ａ１～２７のいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ａ２９。細胞が、Ｔ細胞である、実施形態＿Ａ１～２８のいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ａ３０。細胞が、非活性化された細胞である、実施形態＿Ａ１～２９のいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ａ３１。細胞が、活性化された細胞である、実施形態＿Ａ１～２９のいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ａ３２。（ａ）の細胞が、少なくとも１つの脂質核酸アセンブリ組成物との接触後に活性化される、実施形態＿Ａ１～３１のいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ａ３３。インビトロ培養Ｔ細胞において複数のゲノム編集を産生する方法であって、
ａ．Ｔ細胞を、（ｉ）第１の標的配列に指向されたガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含む第１の脂質核酸アセンブリ組成物、及び任意選択により（ｉｉ）１つ又は２つの追加の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させるステップであって、各追加の脂質核酸アセンブリ組成物が、第１の標的配列とは異なる標的配列に指向されたｇＲＮＡ及び／又はゲノム編集ツールを含む、接触させるステップと、
ｂ．インビトロでＴ細胞を活性化するステップと、
ｃ．活性化されたＴ細胞を、（ｉ）（ａ）の標的配列とは異なる標的配列に指向された更なるガイドＲＮＡを含む更なる核酸アセンブリ組成物、及び任意選択により（ｉｉ）１つ以上の脂質核酸アセンブリ組成物とインビトロで接触させるステップであって、各脂質核酸アセンブリ組成物が、（ａ）の標的配列とは異なり、かつ互いに異なる標的配列に指向されたガイドＲＮＡ、及び／又はゲノム編集ツールを含む、接触させるステップと、
ｄ．インビトロで細胞を拡大するステップと、
を含み、それによってＴ細胞内で複数のゲノム編集を産生する、方法。
実施形態＿Ａ３４。本方法が、細胞又はＴ細胞を、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、又は１１個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させることを含む、先行実施形態＿Ａのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ａ３５。本方法が、細胞又はＴ細胞を、４～１２又は４～８個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させることを含む、先行実施形態＿Ａのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ａ３６。ステップ（ａ）の細胞又はＴ細胞を、２個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させ、脂質核酸アセンブリ組成物を、逐次的に又は同時に投与する、実施形態＿Ａ３３～３５のいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ａ３７。ステップ（ａ）の細胞又はＴ細胞を、３個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させ、脂質核酸アセンブリ組成物を、（ｉ）逐次的に、（ｉｉ）同時に、又は（ｉｉｉ）同時に（２個の組成物）かつ逐次的に（１個の組成物を前又は後に投与する）投与する、実施形態＿Ａ３３～３６のいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ａ３８。ステップ（ｃ）の細胞又はＴ細胞を、１～８個の脂質核酸アセンブリ組成物、任意選択により１～４個の脂質核酸アセンブリ組成物と接触させ、脂質核酸ア

センブリ組成物を、（ｉ）逐次的に、（ｉｉ）同時に、又は（ｉｉｉ）同時に（少なくとも２個の組成物）かつ逐次的に（少なくとも１個の組成物を前又は後に投与する）投与する、実施形態＿Ａ３３～３７のいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ａ３９。脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＭＨＣクラスＩの表面発現を低減又は排除する遺伝子を標的とするｇＲＮＡを含む、先行実施形態＿Ａのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ａ４０。脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、Ｂ２Ｍを標的とするｇＲＮＡを含む、先行実施形態＿Ａのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ａ４１。脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＨＬＡ－Ａの表面発現を低減又は排除する遺伝子を標的とするｇＲＮＡを含む、先行実施形態＿Ａのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ａ４２。脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＨＬＡ－Ａを標的とするｇＲＮＡを含む、先行実施形態＿Ａのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ａ４３。細胞が、ＨＬＡ－Ｂについてホモ接合であり、ＨＬＡ－Ｃについてホモ接合である、実施形態９８に記載の方法。

実施形態＿Ａ４４。脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＭＨＣクラスＩＩの表面発現を低減又は排除する遺伝子を標的とするｇＲＮＡを含む、先行実施形態＿Ａのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ａ４５。脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＣＩＩＴＡを標的とするｇＲＮＡを含む、先行実施形態＿Ａのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ａ４６。脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＡＣを標的とするｇＲＮＡを含み、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＢＣを標的とするｇＲＮＡを含む、先行実施形態＿Ａのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ａ４７。脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＡＣを標的とするｇＲＮＡを含み、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＢＣを標的とするｇＲＮＡを含み、更なる脂質核酸アセンブリ組成物が、Ｂ２Ｍを標的とするｇＲＮＡを含む、先行実施形態＿Ａのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ａ４８。脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＡＣを標的とするｇＲＮＡを含み、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＢＣを標的とするｇＲＮＡを含み、更なる脂質核酸アセンブリ組成物が、ＨＬＡ－Ａを標的とするｇＲＮＡを含む、先行実施形態＿Ａのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ａ４９。脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＡＣを標的とするｇＲＮＡを含み、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＢＣを標的とするｇＲＮＡを含み、更なる脂質核酸アセンブリ組成物が、Ｂ２Ｍを標的とするｇＲＮＡを含み、更なる脂質核酸アセンブリ組成物が、ＣＩＩＴＡを標的とするｇＲＮＡを含む、先行実施形態＿Ａのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ａ５０。脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＡＣを標的とするｇＲＮＡを含み、脂質核酸アセンブリ組成物のうちの１つが、ＴＲＢＣを標的とするｇＲＮＡを含み、更なる脂質核酸アセンブリ組成物が、ＨＬＡ－Ａを標的とするｇＲＮＡを含み、更なる脂質核酸アセンブリ組成物が、ＣＩＩＴＡを標的とするｇＲＮＡを含む、先行実施形態＿Ａのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ａ５１。更なる脂質核酸アセンブリ組成物が、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、任意選択によりＣａｓ９を含む、実施形態＿Ａ９４～１０６のいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ａ５２。更なる脂質核酸アセンブリ組成物が、ドナー核酸を含む、実施形態＿Ａ９４～１０７のいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ａ５３。ドナー核酸が、標的化受容体を含む、実施形態１０８に記載の方法。

実施形態＿Ａ５４。脂質核酸アセンブリ組成物が、アミン脂質を含み、アミン脂質が、脂質Ａ若しくはそのアセタール類似体；ＷＯ２０２０／２１９８７６において提供されて

いるアミン脂質であるか、又はアミン脂質が、脂質Ｄ若しくはＷＯ２０２０／０７２６０５において提供されているアミン脂質である、先行実施形態＿Ａのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ａ５５。脂質核酸アセンブリ組成物が、ヘルパー脂質を含む、先行実施形態＿Ａのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ａ５６。脂質核酸アセンブリ組成物が、ステルス脂質を含み、任意選択により、

（ｉ）脂質核酸アセンブリ組成物が、脂質構成要素を含み、脂質構成要素が、約５０～６０ｍｏｌ％の脂質Ａ［若しくは脂質Ｄ］などのアミン脂質と、約８～１０ｍｏｌ％の中性脂質と、約２．５～４ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、脂質構成要素の残りが、ヘルパー脂質であり、脂質核酸アセンブリ組成物のＮ／Ｐ比が、約６である、

（ｉｉ）脂質核酸アセンブリ組成物が、約５０～６０ｍｏｌ％の脂質Ａ［若しくは脂質Ｄ］などのアミン脂質と、約２７～３９．５ｍｏｌ％のヘルパー脂質と、約８～１０ｍｏｌ％の中性脂質と、約２．５～４ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、脂質核酸アセンブリ組成物のＮ／Ｐ比が、約５～７（例えば、約６）である、

（ｉｉｉ）脂質核酸アセンブリ組成物が、脂質構成要素を含み、脂質構成要素が、約５０～６０ｍｏｌ％の脂質Ａなどのアミン脂質と、約５～１５ｍｏｌ％の中性脂質と、約２．５～４ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、脂質構成要素の残りが、ヘルパー脂質であり、脂質核酸アセンブリ組成物のＮ／Ｐ比が、約３～１０である、

（ｉｖ）脂質核酸アセンブリ組成物が、脂質構成要素を含み、脂質構成要素が、約４０～６０ｍｏｌ％の脂質Ａ［若しくは脂質Ｄ］などのアミン脂質と、約５～１５ｍｏｌ％の中性脂質と、約２．５～４ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、脂質構成要素の残りが、ヘルパー脂質であり、脂質核酸アセンブリ組成物のＮ／Ｐ比が、約６である、

（ｖ）脂質核酸アセンブリ組成物が、脂質構成要素を含み、脂質構成要素が、約５０～６０ｍｏｌ％の脂質Ａ［若しくは脂質Ｄ］などのアミン脂質と、約５～１５ｍｏｌ％の中性脂質と、約１．５～１０ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、脂質構成要素の残りが、ヘルパー脂質であり、脂質核酸アセンブリ組成物のＮ／Ｐ比が、約６である、

（ｖｉ）脂質核酸アセンブリ組成物が、脂質構成要素を含み、脂質構成要素が、約４０～６０ｍｏｌ％の脂質Ａ［若しくは脂質Ｄ］などのアミン脂質と、約０～１０ｍｏｌ％の中性脂質と、約１．５～１０ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、脂質構成要素の残りが、ヘルパー脂質であり、脂質核酸アセンブリ組成物のＮ／Ｐ比が、約３～１０である、

（ｖｉｉ）脂質核酸アセンブリ組成物が、脂質構成要素を含み、脂質構成要素が、約４０～６０ｍｏｌ％の脂質Ａなどのアミン脂質と、約１ｍｏｌ％未満の中性脂質と、約１．５～１０ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、脂質構成要素の残りが、ヘルパー脂質であり、脂質核酸アセンブリ組成物のＮ／Ｐ比が、約３～１０である、

（ｖｉｉｉ）脂質核酸アセンブリ組成物が、脂質構成要素を含み、脂質構成要素が、約４０～６０ｍｏｌ％の脂質Ａ［若しくは脂質Ｄ］などのアミン脂質と、約１．５～１０ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、脂質構成要素の残りが、ヘルパー脂質であり、ＬＮＰ組成物のＮ／Ｐ比が、約３～１０であり、脂質核酸アセンブリ組成物が、中性リン脂質を本質的に含まないか、若しくは含まない、

（ｉｘ）脂質核酸アセンブリ組成物が、脂質構成要素を含み、脂質構成要素が、約５０～６０ｍｏｌ％の脂質Ａ［若しくは脂質Ｄ］などのアミン脂質と、約８～１０ｍｏｌ％の中性脂質と、約２．５～４ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含み、脂質構成要素の残りが、ヘルパー脂質であり、脂質核酸アセンブリ組成物のＮ／Ｐ比が、

約３～７である、
（ｘ）脂質核酸アセンブリ組成物が、脂質構成要素を含み、脂質構成要素が、約２５～４５ｍｏｌ％の脂質Ａなどのアミン脂質と、約１０～３０ｍｏｌ％の中性脂質と、約２５～６５ｍｏｌ％のヘルパー脂質と、約１．５～３．５ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含む、
（ｘｉ）脂質核酸アセンブリ組成物が、脂質構成要素を含み、脂質構成要素が、約２９～４４ｍｏｌ％の脂質Ａなどのアミン脂質と、約１１～２８ｍｏｌ％の中性脂質と、約２８～５５ｍｏｌ％のヘルパー脂質と、約２．３～３．５ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含む、
（ｘｉｉ）脂質核酸アセンブリ組成物が、脂質構成要素を含み、脂質構成要素が、約２９～３８ｍｏｌ％の脂質Ａなどのアミン脂質と、約１１～２０ｍｏｌ％の中性脂質と、約４３～５５ｍｏｌ％のヘルパー脂質と、約２．３～２．７ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含む、
（ｘｉｉｉ）脂質核酸アセンブリ組成物が、脂質構成要素を含み、脂質構成要素が、約２５～３４ｍｏｌ％の脂質Ａなどのアミン脂質と、約１０～２０ｍｏｌ％の中性脂質と、約４５～６５ｍｏｌ％のヘルパー脂質と、約２．５～３．５ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含む、
（ｘｉｖ）脂質核酸アセンブリ組成物が、脂質構成要素を含み、脂質構成要素が、約３０～４３ｍｏｌ％の脂質Ａなどのアミン脂質と、約１０～１７ｍｏｌ％の中性脂質と、約４３．５～５６ｍｏｌ％のヘルパー脂質と、約１．３～３ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含む、
（ｘｖ）脂質核酸アセンブリ組成物が、脂質構成要素を含み、脂質構成要素が、約２５～５０ｍｏｌ％の脂質Ｄなどのアミン脂質と、約７～２５ｍｏｌ％の中性脂質と、約３９～６５ｍｏｌ％のヘルパー脂質と、約０．５～１．８ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含む、
（ｘｖｉ）脂質核酸アセンブリ組成物が、脂質構成要素を含み、脂質構成要素が、約２７～４０ｍｏｌ％の脂質Ｄなどのアミン脂質と、約１０～２０ｍｏｌ％の中性脂質と、約５０～６０ｍｏｌ％のヘルパー脂質と、約０．９～１．６ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含む、又は
（ｘｖｉｉ）脂質核酸アセンブリ組成物が、脂質構成要素を含み、脂質構成要素が、約３０～４５ｍｏｌ％の脂質Ｄなどのアミン脂質と、約１０～１５ｍｏｌ％の中性脂質と、約３９～５９ｍｏｌ％のヘルパー脂質と、約１～１．５ｍｏｌ％のステルス脂質（例えば、ＰＥＧ脂質）とを含む、先行実施形態＿Ａのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ａ５７。アミン脂質が、脂質Ａ又は脂質Ｄである、先行実施形態＿Ａのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ａ５８。ＬＮＰが、約１～２５０ｎｍ、１０～２００ｎｍ、約２０～１５０ｎｍ、約５０～１５０ｎｍ、約５０～１００ｎｍ、約５０～１２０ｎｍ、約６０～１００ｎｍ、約７５～１５０ｎｍ、約７５～１２０ｎｍ、又は約７５～１００ｎｍの直径を有し、ＬＮＰが、１００ｎｍ未満の直径を有する、先行実施形態＿Ａのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ａ５９。ＬＮＰ組成物が、約１０～２００ｎｍ、約２０～１５０ｎｍ、約５０～１５０ｎｍ、約５０～１００ｎｍ、約５０～１２０ｎｍ、約６０～１００ｎｍ、約７５～１５０ｎｍ、約７５～１２０ｎｍ、若しくは約７５～１００ｎｍの平均直径を有するＬＮＰの集団、又は１００ｎｍ未満の平均直径を有するＬＮＰの集団を含む、先行実施形態＿Ａのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ａ６０。脂質核酸アセンブリ組成物が、
ａ．約５０～６０ｍｏｌ％のアミン脂質と、
ｂ．約５～１５ｍｏｌ％のＤＳＰＣと、
ｃ．約２．５～４ｍｏｌ％のＰＥＧ脂質とを含み、
脂質構成要素の残りが、コレステロールであり、

ＬＮＰ組成物のＮ／Ｐ比が、３～８±０．２である、先行実施形態＿Ａのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ａ６１。平均直径が、Ｚ平均直径である、先行実施形態＿Ａのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ａ６２。遺伝子組換えされた細胞が、

ａ．遺伝子の発現を減少するための遺伝子組換えを含む、

ｂ．ドナー核酸の挿入を含む遺伝子組換えを含む、

ｃ．サイトカイン（ＩＬ－２、ＩＦＮγ、及び／又はＴＮＦα）の分泌の増加を示す、

ｄ．細胞傷害性の増加を示す８、

ｅ．メモリ細胞表現型の増加を示す、

ｆ．拡大の増加を示す、

ｇ．反復刺激に対する増殖のより長い持続時間を示す、及び／又は

ｈ．転座事象の減少を示し、

任意選択により、特性が、特許請求される方法以外の方法によって作製された、遺伝子組換えされた細胞と相対的である、先行実施形態＿Ａのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ａ６３。接触させた細胞が、増加した生存を示し、増加した生存が、例えば、ＬＮＰ組成物との最後の接触の２４時間後に、少なくとも７０％のトランスフェクション後の細胞生存率である、先行実施形態＿Ａのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ａ６４。接触させた細胞が、増加した生存を示し、増加した生存が、例えば、ＬＮＰ組成物との最後の接触の２４時間後に、少なくとも８０％のトランスフェクション後の細胞生存率である、先行実施形態＿Ａのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ａ６５。接触させた細胞が、増加した生存を示し、増加した生存が、例えば、ＬＮＰ組成物との最後の接触の２４時間後に、少なくとも９０％のトランスフェクション後の細胞生存率である、先行実施形態＿Ａのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ａ６６。接触させた細胞が、増加した生存を示し、増加した生存が、例えば、ＬＮＰ組成物との最後の接触の２４時間後に、少なくとも９５％のトランスフェクション後の細胞生存率である、先行実施形態＿Ａのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ａ６７。例えば、転座が標的対標的転座である場合、接触させた細胞が、１％未満の転座、０．５％未満の転座、０．１％未満の転座、又は編集後の転座の２倍未満のバックグラウンド数を有する、先行実施形態＿Ａのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ａ６８。遺伝子組換えされた細胞が、がん療法、又は任意選択により自己免疫療法に使用するためのものである、先行実施形態＿Ａのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ａ６９。先行実施形態＿Ａのいずれか１つに記載の方法を使用して得ることができる、遺伝子組換えされている免疫細胞。

実施形態＿Ａ７０。実施形態＿Ａ６９に記載の細胞を含む、組成物。

実施形態＿Ａ７１。患者に、実施形態＿Ａ６９に記載の細胞又は実施形態＿Ａ７０に記載の組成物を投与することを含む、治療方法。

実施形態＿Ａ７２。がんの治療のための、又は任意選択により自己免疫療法のための、実施形態＿Ａ７１に記載の治療方法。

実施形態＿Ａ７３。細胞が、がんの細胞によって発現されるポリペプチドに対して特異性を有するＴＣＲを発現する、実施形態＿Ａ７２に記載の方法。

実施形態＿Ａ７４。細胞又は細胞の集団が、低い毒性を有し、すなわち、細胞又は細胞の集団を作製するために使用される方法が、細胞に対する低いレベルの毒性を有し、高いレベルの生存能を有する細胞又は細胞をもたらす、ＡＣＴ療法として使用するための、実施形態＿Ａ１～１５９のいずれか１つに記載の方法によって産生された細胞又は細胞の集団。

実施形態＿Ａ７５。細胞又は細胞の集団が、２％未満の転座、１％未満の転座、０．５％未満の転座、若しくは０．１％未満の転座、例えば、標的対標的転座を有するか、又は転座の２倍未満のバックグラウンドレベルを有する、ＡＣＴ療法として使用するための、

実施形態＿Ａ１～６７のいずれか１つに記載の方法によって産生された細胞又は細胞の集団。

【０４１７】

以下の非限定的な実施形態もまた包含される。

実施形態＿Ｂ１。Ｂ細胞の集団をインビトロで培養することと、集団をゲノム編集ツールを含む１つ以上の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と接触させることと、を含む、編集されたＢ細胞を含むＢ細胞の集団を産生する方法。

実施形態＿Ｂ２。Ｂ細胞の集団をインビトロで培養することと、集団を、ｉ）ゲノム編集ツールを含む１つ以上の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）、及びｉｉ）ＤＮＡ－ＰＫ阻害剤と接触させることと、を含む、編集されたＢ細胞を含むＢ細胞の集団を産生する方法。

実施形態＿Ｂ３。編集されたＢ細胞が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｂ４。Ｂ細胞の集団を、接触ステップの前に活性化することを更に含む、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｂ５。Ｂ細胞の集団をインビトロで培養することと、集団をゲノム編集ツールを含む１つ以上の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と接触させる前に、Ｂ細胞を活性化することと、を含み、集団を、活性化と同じ日又は活性化の最大１０日後に１つ以上のＬＮＰと接触させる、編集されたＢ細胞を含むＢ細胞の集団を産生する方法。

実施形態＿Ｂ６。編集されたＢ細胞を含むＢ細胞の集団を産生する方法であって、

ａ．Ｂ細胞の集団をインビトロで培養するステップと、

ｂ．Ｂ細胞の集団をインビトロで活性化するステップと、

ｃ．ｂ）のＢ細胞の集団を、１つ以上の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）とインビトロで接触させるステップであって、ＬＮＰが、ゲノム編集ツールを含む、接触させるステップと、

ｄ．Ｂ細胞の集団をＤＮＡ－ＰＫ阻害剤と接触させるステップと、

を含み、それによって編集されたＢ細胞の集団を産生する、方法。

実施形態＿Ｂ７。編集されたＢ細胞が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む、実施形態＿Ｂ５又は６に記載の方法。

実施形態＿Ｂ８。Ｂ細胞の集団を、活性化し、Ｂ細胞の集団を、ＣＤ４０Ｌを含む薬剤を使用して活性化する、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｂ９。Ｂ細胞の集団を、活性化し、Ｂ細胞の集団を、ＣｐＧを用いて活性化する、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｂ１０。Ｂ細胞の集団を、活性化し、Ｂ細胞の集団を、ヒト血清を含む培地で活性化する、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｂ１１。Ｂ細胞の集団を、活性化し、Ｂ細胞の集団を、活性化の同じ日又は最大１０日後に、１つ以上のＬＮＰとインビトロで接触させる、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｂ１２。Ｂ細胞の集団を、活性化し、Ｂ細胞の集団を、活性化と同じ日に１つ以上のＬＮＰとインビトロで接触させる、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｂ１３。Ｂ細胞の集団を、活性化し、Ｂ細胞の集団を、活性化の１日後に１つ以上のＬＮＰとインビトロで接触させる、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｂ１４。Ｂ細胞の集団を、活性化し、Ｂ細胞の集団を、活性化の２日後に１つ以上のＬＮＰとインビトロで接触させる、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｂ１５。Ｂ細胞の集団を、活性化し、Ｂ細胞の集団を、活性化の３日後に１つ以上のＬＮＰとインビトロで接触させる、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｂ１６。Ｂ細胞の集団を、活性化し、Ｂ細胞の集団を、活性化の４日後に１つ以上のＬＮＰとインビトロで接触させる、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方

法。
実施形態＿Ｂ１７。Ｂ細胞の集団を、活性化し、Ｂ細胞の集団を、活性化の５日後に１つ以上のＬＮＰとインビトロで接触させる、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ１８。Ｂ細胞の集団を、活性化し、Ｂ細胞の集団を、活性化の６日後に１つ以上のＬＮＰとインビトロで接触させる、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ１９。Ｂ細胞の集団を、活性化し、Ｂ細胞の集団を、活性化の７日後に１つ以上のＬＮＰとインビトロで接触させる、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ２０。Ｂ細胞の集団を、活性化し、Ｂ細胞の集団を、活性化の８日後に１つ以上のＬＮＰとインビトロで接触させる、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ２１。Ｂ細胞の集団を、活性化し、Ｂ細胞の集団を、活性化の９日後に１つ以上のＬＮＰとインビトロで接触させる、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ２２。Ｂ細胞の集団を、活性化し、Ｂ細胞の集団を、活性化の１０日後に１つ以上のＬＮＰとインビトロで接触させる、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ２３。ＬＮＰを、Ｂ細胞の集団をＬＮＰと接触させる前に、ＡｐｏＥとともに事前インキュベートする、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ２４。ＬＮＰを、Ｂ細胞の集団をＬＮＰと接触させる前に、ＡｐｏＥ３とともに事前インキュベートする、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ２５。ＬＮＰを、Ｂ細胞の集団をＬＮＰと接触させる前に、ＡｐｏＥ４とともに事前インキュベートする、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ２６。Ｂ細胞の集団を、２．５～１０μｇ／ｍＬの総ＲＮＡカーゴを含むＬＮＰと接触させる、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ２７。Ｂ細胞の集団を、２～１０個のＬＮＰ、例えば、２個の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と接触させる、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ２８。Ｂ細胞の集団を、３個の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と接触させる、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ２９。Ｂ細胞の集団を、４個の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と接触させる、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ３０。Ｂ細胞の集団を、５個の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と接触させる、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ３１。Ｂ細胞の集団を、６個の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と接触させる、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ３２。Ｂ細胞の集団を、標的配列への挿入のためにドナー核酸と接触させることを更に含む、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ３３。本方法が、ゲノム編集を含む細胞のうちの少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、又は８０％を含むＢ細胞の集団を産生する、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ３４。ゲノム編集が、インデル又は塩基編集を含み、Ｂ細胞の集団が、ゲノム編集を含む細胞のうちの少なくとも４０％、５０％、６０％、７０％、又は８０％を含む、実施形態＿Ｂ３３に記載の方法。
実施形態＿Ｂ３５。ゲノム編集が、標的配列への外来性核酸配列の挿入を含み、Ｂ細胞の集団が、ゲノム編集を含む細胞のうちの少なくとも２０％、３０％、又は４０％を含む、実施形態＿Ｂ３３又は３４に記載の方法。
実施形態＿Ｂ３６。細胞の集団が、少なくとも２つのゲノム編集を含む編集されたＢ細胞を含み、細胞のうちの少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、又は６０％が、両

方のゲノム編集を含む、実施形態＿Ｂ３３～３５のいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ３７。本方法が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集されたＢ細胞を含むＢ細胞の集団を産生し、細胞のうちの１％未満が、標的対標的転座を有する、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ３８。本方法が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集されたＢ細胞を含むＢ細胞の集団を産生し、細胞のうちの０．５％未満が、標的対標的転座を有する、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ３９。本方法が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集されたＢ細胞を含むＢ細胞の集団を産生し、細胞のうちの０．２％未満が、標的対標的転座を有する、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ４０。本方法が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集されたＢ細胞を含むＢ細胞の集団を産生し、細胞のうちの０．１％未満が、標的対標的転座を有する、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ４１。本方法が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集されたＢ細胞を含むＢ細胞の集団を産生し、編集細胞が、相互転座、複合転座、又はオフターゲット転座の２倍未満のバックグラウンドレベルを有する、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ４２。編集されたＢ細胞が、メモリＢ細胞を含む、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ４３。編集されたＢ細胞が、形質芽球を含む、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ４４。編集されたＢ細胞が、形質細胞を含む、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ４５。ＬＮＰ組成物のうちの１つが、ＭＨＣクラスＩの表面発現を低減させる遺伝子を標的とするｇＲＮＡを含む、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ４６。ＬＮＰ組成物のうちの１つが、Ｂ２Ｍを標的とするｇＲＮＡを含む、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ４７。ＬＮＰ組成物が、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、例えばＣａｓ９、任意選択によりＳ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９をコードする、ガイドＲＮＡ及びｍＲＮＡを含む、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ４８。ＬＮＰ組成物が、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするガイドＲＮＡ及びｍＲＮＡを含み、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、ニッカーゼである、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ４９。ＬＮＰ組成物が、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするガイドＲＮＡ及びｍＲＮＡを含み、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、クリバーゼである、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ５０。本方法が、選択ステップ、任意選択により物理的選択ステップ、又は生化学的選択ステップを含まない、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ５１。本方法を、エクスビボで実施する、先行実施形態＿Ｂのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｂ５２。Ｂ細胞の集団が、ゲノム編集を含む細胞のうちの少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％を含む、編集されたＢ細胞を含むＢ細胞の集団を含む組成物。
実施形態＿Ｂ５３。Ｂ細胞の集団が、ゲノム編集を含む細胞のうちの少なくとも４０％、５０％、６０％、７０％、又は８０％を含み、ゲノム編集が、インデル又は塩基編集を含む、編集されたＢ細胞を含むＢ細胞の集団を含む組成物。
実施形態＿Ｂ５４。Ｂ細胞の集団が、ゲノム編集を含む細胞のうちの少なくとも２０％、３０％、又は４０％を含み、ゲノム編集が、標的配列への外来性核酸の挿入を含む、編集されたＢ細胞を含むＢ細胞の集団を含む組成物。

実施形態＿Ｂ５５。Ｂ細胞の集団が、少なくとも２つのゲノム編集を含む細胞のうちの少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、又は６０％を含む、編集されたＢ細胞を含むＢ細胞の集団を含む組成物。

実施形態＿Ｂ５６。細胞のうちの１％未満が、標的対標的転座を有する、実施形態＿Ｂ５２～５５のいずれか１つに記載の組成物。

実施形態＿Ｂ５７。細胞のうちの０．５％未満が、標的対標的転座を有する、実施形態＿Ｂ５２～５５のいずれか１つに記載の組成物。

実施形態＿Ｂ５８。細胞のうちの０．２％未満が、標的対標的転座を有する、実施形態＿Ｂ５２～５５のいずれか１つに記載の組成物。

実施形態＿Ｂ５９。細胞のうちの０．１％未満が、標的対標的転座を有する、実施形態＿Ｂ５２～５５のいずれか１つに記載の組成物。

実施形態＿Ｂ６０。細胞が、相互転座、複合転座、又はオフターゲット転座の２倍未満のバックグラウンドレベルを有する、実施形態＿Ｂ５２～５９のいずれか１つに記載の組成物。

実施形態＿Ｂ６１。編集されたＢ細胞が、メモリＢ細胞を含む、実施形態＿Ｂ５２～６０のいずれか１つに記載の組成物。

実施形態＿Ｂ６２。編集されたＢ細胞が、形質芽球を含む、実施形態＿Ｂ５２～６１のいずれか１つに記載の組成物。

実施形態＿Ｂ６３。編集されたＢ細胞が、形質細胞を含む、実施形態＿Ｂ５２～６２のいずれか１つに記載の組成物。

実施形態＿Ｂ６４。編集されたＢ細胞が、実施形態＿Ｂ１～５１のいずれか１つに記載の方法によって得られるか、又はそれによって得ることができる、編集されたＢ細胞を含むＢ細胞の集団を含む組成物。

【０４１８】

以下の非限定的な実施形態もまた包含される。

実施形態＿Ｃ１。ＮＫ細胞の集団をインビトロで培養することと、集団をゲノム編集ツールを含む１つ以上の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と接触させることと、を含む、編集されたＮＫ細胞を含むＮＫ細胞の集団を産生する方法。

実施形態＿Ｃ２。ＮＫ細胞の集団をインビトロで培養することと、集団を、ｉ）ゲノム編集ツールを含む１つ以上の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）、及びｉｉ）ＤＮＡ－ＰＫ阻害剤と接触させることと、を含む、編集されたＮＫ細胞を含むＮＫ細胞の集団を産生する方法。

実施形態＿Ｃ３。編集されたＮＫ細胞が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む、先行実施形態＿Ｃのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｃ４。ＮＫ細胞の集団を、接触ステップの前に活性化することを更に含む、先行実施形態＿Ｃのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｃ５。ＮＫ細胞の集団を、接触ステップの前に活性化することを更に含み、集団を、活性化の少なくとも３日後に、１つ以上のＬＮＰと接触させる、先行実施形態＿Ｃのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｃ６。細胞当たり複数のゲノム編集を含む、編集されたＮＫ細胞を含むＮＫ細胞の集団を産生する方法であって、

ａ．ＮＫ細胞の集団をインビトロで培養するステップと、

ｂ．ＮＫ細胞の集団をインビトロで活性化するステップと、

ｃ．ｂ）のＮＫ細胞の集団を、１つ以上の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）とインビトロで接触させるステップであって、ＬＮＰが、ゲノム編集ツールを含む、接触させるステップと、

ｄ．ＮＫ細胞の集団をＤＮＡ－ＰＫ阻害剤と接触させるステップと、

を含み、それによって編集されたＮＫ細胞の集団を産生する、方法。

実施形態＿Ｃ７。編集されたＮＫ細胞が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む、実施形態＿Ｃ６に記載の方法。

実施形態＿Ｃ８。ＮＫ細胞の集団を、活性化し、ＮＫ細胞の集団を、フィーダ細胞及び

サイトカインを用いて活性化する、先行実施形態＿Ｃのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｃ９。ＮＫ細胞の集団を、活性化し、ＮＫ細胞の集団を、フィーダ細胞及びサイトカインを用いて活性化し、ステップａ）におけるフィーダ細胞に対するＮＫ細胞の比が、１：１である、先行実施形態＿Ｃのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｃ１０。ＮＫ細胞の集団を、活性化し、ＮＫ細胞の集団を、フィーダ細胞及びサイトカインを用いて活性化し、サイトカインが、ＩＬ－２を含む、先行実施形態＿Ｃのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｃ１１。ＮＫ細胞の集団を、活性化し、ＮＫ細胞の集団を、フィーダ細胞及びサイトカインを用いて活性化し、サイトカインが、ＩＬ－１５を含む、先行実施形態＿Ｃのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｃ１２。ＮＫ細胞の集団を、活性化し、ＮＫ細胞の集団を、フィーダ細胞及びサイトカインを用いて活性化し、サイトカインが、ＩＬ－２１を含む、先行実施形態＿Ｃのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｃ１３。ＮＫ細胞の集団を、活性化し、ＮＫ細胞の集団を、接触ステップの少なくとも３日前に活性化する、先行実施形態＿Ｃのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｃ１４。ＬＮＰを、ＮＫ細胞の集団をＬＮＰと接触させる前に、ＡｐｏＥとともに事前インキュベートする、先行実施形態＿Ｃのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｃ１５。ＬＮＰを、ＮＫ細胞の集団をＬＮＰと接触させる前に、ＡｐｏＥ３とともに事前インキュベートする、先行実施形態＿Ｃのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｃ１６。ＬＮＰを、ＮＫ細胞の集団をＬＮＰと接触させる前に、ＡｐｏＥ４とともに事前インキュベートする、先行実施形態＿Ｃのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｃ１７。ＮＫ細胞の集団を、２．５～１０μｇ／ｍＬの総ＲＮＡカーゴを含むＬＮＰと接触させる、先行実施形態＿Ｃのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｃ１８。ＮＫ細胞の集団を、２～１０個のＬＮＰ、例えば、２個の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と接触させる、先行実施形態＿Ｃのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｃ１９。ＮＫ細胞の集団を、３個の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と接触させる、先行実施形態＿Ｃのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｃ２０。ＮＫ細胞の集団を、４個の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と接触させる、先行実施形態＿Ｃのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｃ２１。ＮＫ細胞の集団を、５個の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と接触させる、先行実施形態＿Ｃのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｃ２２。ＮＫ細胞の集団を、６個の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と接触させる、先行実施形態＿Ｃのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｃ２３。ＮＫ細胞の集団を、標的配列への挿入のためにドナー核酸と接触させることを更に含む、先行実施形態＿Ｃのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｃ２４。本方法が、ゲノム編集を含む細胞のうちの少なくとも４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は９５％を含むＮＫ細胞の集団を産生する、先行実施形態＿Ｃのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｃ２５。ゲノム編集が、インデル又は塩基編集を含み、ＮＫ細胞の集団が、ゲノム編集を含む細胞のうちの少なくとも４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は９５％を含む、実施形態＿Ｃ２４に記載の方法。
実施形態＿Ｃ２６。ゲノム編集が、標的配列への外来性核酸配列としての挿入を含み、ＮＫ細胞の集団が、ゲノム編集を含む細胞のうちの少なくとも４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は９５％を含む、実施形態＿Ｃ２４又は２５に記載の方法。
実施形態＿Ｃ２７。細胞の集団が、少なくとも２つのゲノム編集を含む編集されたＮＫ細胞を含み、細胞のうちの少なくとも４０％、５０％、６０％、７０％、又は８０％が、両方のゲノム編集を含む、実施形態＿Ｃ２４～２６のいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｃ２８。本方法が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集されたＮＫ細胞を含むＮＫ細胞の集団を産生し、細胞のうちの１％未満が、標的対標的転座を有する、先行実施形態＿Ｃのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｃ２９。本方法が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集されたＮＫ細胞を含むＮＫ細胞の集団を産生し、細胞のうちの０．５％未満が、標的対標的転座を有する、先行実施形態＿Ｃのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｃ３０。本方法が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集されたＮＫ細胞を含むＮＫ細胞の集団を産生し、細胞のうちの０．２％未満が、標的対標的転座を有する、先行実施形態＿Ｃのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｃ３１。本方法が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集されたＮＫ細胞を含むＮＫ細胞の集団を産生し、細胞のうちの０．１％未満が、標的対標的転座を有する、先行実施形態、実施形態＿Ｃのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｃ３２。本方法が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集されたＮＫ細胞を含むＮＫ細胞の集団を産生し、編集細胞が、相互転座、複合転座、又はオフターゲット転座の２倍未満のバックグラウンドレベルを有する、先行実施形態、実施形態＿Ｃのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｃ３３。ＬＮＰ組成物が、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、例えばＣａｓ９、任意選択によりＳ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９をコードする、ガイドＲＮＡ及びｍＲＮＡを含む、先行実施形態＿Ｃのいずれか１つに記載の方法

実施形態＿Ｃ３４。ＬＮＰ組成物が、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするガイドＲＮＡ及びｍＲＮＡを含み、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、ニッカーゼである、先行実施形態＿Ｃのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｃ３５。ＬＮＰ組成物が、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするガイドＲＮＡ及びｍＲＮＡを含み、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、クリバーゼである、先行実施形態＿Ｃのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｃ３６。本方法を、エクスビボで実施する、先行実施形態＿Ｃのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｃ３７。ＮＫ細胞の集団が、ゲノム編集を含む細胞のうちの少なくとも４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は９５％を含む、編集されたＮＫ細胞を含むＮＫ細胞の集団を含む組成物。

実施形態＿Ｃ３８。ＮＫ細胞の集団が、ゲノム編集を含む細胞のうちの少なくとも４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は９５％を含み、ゲノム編集が、インデル又は塩基編集を含む、編集されたＮＫ細胞を含むＮＫ細胞の集団を含む組成物。

実施形態＿Ｃ３９。ＮＫ細胞の集団が、ゲノム編集を含む細胞のうちの少なくとも４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は９５％を含み、ゲノム編集が、標的配列への外来性核酸の挿入を含む、編集されたＮＫ細胞を含むＮＫ細胞の集団を含む組成物。

実施形態＿Ｃ４０。ＮＫ細胞の集団が、少なくとも２つのゲノム編集を含む細胞のうちの少なくとも４０％、５０％、６０％、７０％、又は８０％を含む、編集されたＮＫ細胞を含むＮＫ細胞の集団を含む組成物。

実施形態＿Ｃ４１。細胞のうちの１％未満が、標的対標的転座を有する、実施形態＿Ｃ３７～４０のいずれか１つに記載の組成物。

実施形態＿Ｃ４２。細胞のうちの０．５％未満が、標的対標的転座を有する、実施形態＿Ｃ３７～４０のいずれか１つに記載の組成物。

実施形態＿Ｃ４３。細胞のうちの０．２％未満が、標的対標的転座を有する、実施形態＿Ｃ３７～４０のいずれか１つに記載の組成物。

実施形態＿Ｃ４４。細胞のうちの０．１％未満が、標的対標的転座を有する、実施形態＿Ｃ３７～４０のいずれか１つに記載の組成物。

実施形態＿Ｃ４５。細胞が、相互転座、複合転座、又はオフターゲット転座の２倍未満のバックグラウンドレベルを有する、実施形態＿Ｃ３７～４４のいずれか１つに記載の組成物。

実施形態＿Ｃ４６。編集されたＮＫ細胞が、実施形態＿Ｃ１～Ｃ３６のいずれか１つに記載の方法によって得られるか、又はそれによって得ることができる、編集されたＮＫ細

胞を含むＮＫ細胞の集団を含む組成物。
【０４１９】
以下の非限定的な実施形態もまた包含される。
実施形態＿Ｄ１。単球の集団をインビトロで培養することと、集団をゲノム編集ツールを含む１つ以上の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と接触させることと、を含む、編集細胞を含む単球の集団を産生する方法。
実施形態＿Ｄ２。単球の集団をインビトロで培養することと、集団を、ｉ）ゲノム編集ツールを含む１つ以上の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）、及びｉｉ）ＤＮＡ－ＰＫ阻害剤と接触させることと、を含む、編集細胞を含む単球の集団を産生する方法。
実施形態＿Ｄ３。編集細胞が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｄ４。単球細胞の集団を、接触ステップの前に分化することを更に含む、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｄ５。単球の集団をインビトロで培養することと、集団をゲノム編集ツールを含む１つ以上の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と接触させる前に、単球の集団を分化することと、を含み、単球の集団を、１つ以上のＬＮＰと接触させる前に０～８日間分化する、編集細胞を含む単球の集団を産生する方法。
実施形態＿Ｄ６。編集細胞を含む単球の集団を産生する方法であって、
ａ．単球の集団をインビトロで培養するステップと、
ｂ．単球をインビトロで分化するステップと、
ｃ．ｂ）の細胞の集団を、１つ以上の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）とインビトロで接触させるステップであって、ＬＮＰが、ゲノム編集ツールを含む、接触させるステップと、
ｄ．ｂ）の細胞の集団をＤＮＡ－ＰＫ阻害剤と接触させるステップと、
を含み、それによって編集細胞の集団を産生する、方法。
実施形態＿Ｄ７。編集細胞が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む、実施形態＿Ｄ５又は６に記載の方法。
実施形態＿Ｄ８。単球の集団を、ＧＭ－ＣＳＦにより分化する、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｄ９。単球を、接触ステップの前に０～８日間分化する、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｄ１０。単球を、接触ステップの前に０～５日間分化する、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｄ１１。単球を、接触ステップの前に０日間分化する、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｄ１２。単球を、接触ステップの前に１日間分化する、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｄ１３。単球を、接触ステップの前に２日間分化する、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｄ１４。単球を、接触ステップの前に３日間分化する、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｄ１５。単球を、接触ステップの前に４日間分化する、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｄ１６。単球を、接触ステップの前に５日間分化する、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｄ１７。単球を、接触ステップの前に６日間分化する、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｄ１８。単球を、接触ステップの前に７日間分化する、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｄ１９。単球を、接触ステップの前に８日間分化する、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｄ２０。ＬＮＰを、単球又はマクロファージの集団をＬＮＰと接触させる前に、ＡｐｏＥとともに事前インキュベートする、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｄ２１。ＬＮＰを、単球の集団をＬＮＰと接触させる前に、ＡｐｏＥ３とともに事前インキュベートする、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｄ２２。ＬＮＰを、単球の集団をＬＮＰと接触させる前に、ＡｐｏＥ４とともに事前インキュベートする、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｄ２３。ＬＮＰを、単球の集団をＬＮＰと接触させる前に、血清とともに事前インキュベートする、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｄ２４。単球を、接触ステップの前に及び／又はその間に、血清を含む培地で培養する、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｄ２５。単球の集団を、２．５～１０μｇ／ｍＬの総ＲＮＡカーゴを含むＬＮＰと接触させる、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｄ２６。単球の集団を、２個の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と接触させる、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｄ２７。単球の集団を、３個の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と接触させる、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｄ２８。単球の集団を、４個の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と接触させる、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｄ２９。単球の集団を、５個の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と接触させる、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｄ３０。単球の集団を、６個の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と接触させる、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｄ３１。単球の集団を、標的配列への挿入のためにドナー核酸と接触させることを更に含む、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｄ３２。本方法が、ゲノム編集を含む細胞のうちの少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、又は９６％を含む編集細胞を含む単球の集団を産生する、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｄ３３。ゲノム編集が、インデル又は塩基編集を含み、単球の集団が、ゲノム編集を含む細胞のうちの少なくとも４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は９５％を含む、実施形態＿Ｄ３２に記載の方法。

実施形態＿Ｄ３４。ゲノム編集が、標的配列への外来性核酸配列の挿入を含み、単球の集団が、ゲノム編集を含む細胞のうちの少なくとも４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は９５％を含む、実施形態＿Ｄ３２又は３３に記載の方法。

実施形態＿Ｄ３５。細胞の集団が、少なくとも２つのゲノム編集を含む編集細胞を含み、細胞のうちの少なくとも４０％、５０％、６０％、７０％、又は８０％が、両方のゲノム編集を含む、実施形態＿Ｄ３２～３４のいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｄ３６。本方法が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集細胞を含む単球の集団を産生し、細胞のうちの１％未満が、標的対標的転座を有する、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｄ３７。本方法が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む細胞を含む単球の集団を産生し、細胞のうちの０．５％未満が、標的対標的転座を有する、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｄ３８。本方法が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む細胞を含む単球の集団を産生し、細胞のうちの０．２％未満が、標的対標的転座を有する、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｄ３９。本方法が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む細胞を含む単球の集団を産生し、細胞のうちの０．１％未満が、標的対標的転座を有する、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｄ４０。本方法が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む細胞を含む単球の集

団を産生し、細胞が、相互転座、複合転座、又はオフターゲット転座の２倍未満のバックグラウンドレベルを有する、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｄ４１。ＬＮＰ組成物のうちの１つが、ＭＨＣクラスＩの表面発現を低減又は排除する遺伝子を標的とするｇＲＮＡを含む、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｄ４２。ＬＮＰ組成物のうちの１つが、Ｂ２Ｍを標的とするｇＲＮＡを含む、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｄ４３。ＬＮＰ組成物のうちの１つが、ＭＨＣクラスＩＩの表面発現を低減又は排除する遺伝子を標的とするｇＲＮＡを含む、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｄ４４。ＬＮＰ組成物のうちの１つが、ＣＩＩＴＡを標的とするｇＲＮＡを含む、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｄ４５。ＬＮＰ組成物が、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、例えばＣａｓ９、任意選択によりＳ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９をコードする、ガイドＲＮＡ及びｍＲＮＡを含む、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法

実施形態＿Ｄ４６。ＬＮＰ組成物が、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするガイドＲＮＡ及びｍＲＮＡを含み、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、ニッカーゼである、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｄ４７。ＬＮＰ組成物が、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするガイドＲＮＡ及びｍＲＮＡを含み、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、クリバーゼである、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｄ４８。本方法を、エクスビボで実施する、先行実施形態＿Ｄのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｄ４９。単球の集団が、ゲノム編集を含む細胞のうちの少なくとも４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は９５％を含む、編集細胞を含む単球の集団を含む組成物。

実施形態＿Ｄ５０。単球の集団が、ゲノム編集を含む細胞のうちの少なくとも４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は９５％を含み、ゲノム編集が、インデル又は塩基編集を含む、編集細胞を含む単球の集団を含む組成物。

実施形態＿Ｄ５１。単球の集団が、ゲノム編集を含む細胞のうちの少なくとも４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は９５％を含み、ゲノム編集が、標的配列への外来性核酸配列の挿入を含む、編集細胞を含む単球の集団を含む組成物。

実施形態＿Ｄ５２。単球の集団が、少なくとも２つのゲノム編集を含む細胞のうちの少なくとも４０％、５０％、６０％、７０％、又は８０％を含む、編集細胞を含む単球の集団を含む組成物。

実施形態＿Ｄ５３。細胞のうちの１％未満が、標的対標的転座を有する、実施形態＿Ｄ４９～５２のいずれか１つに記載の組成物。

実施形態＿Ｄ５４。細胞のうちの０．５％未満が、標的対標的転座を有する、実施形態＿Ｄ４９～５２のいずれか１つに記載の組成物。

実施形態＿Ｄ５５。細胞のうちの０．２％未満が、標的対標的転座を有する、実施形態＿Ｄ４９～５２のいずれか１つに記載の組成物。

実施形態＿Ｄ５６。細胞のうちの０．１％未満が、標的対標的転座を有する、実施形態＿Ｄ４９～５５のいずれか１つに記載の組成物。

実施形態＿Ｄ５７。細胞が、相互転座、複合転座、又はオフターゲット転座の２倍未満のバックグラウンドレベルを有する、実施形態＿Ｄ４９～５６のいずれか１つに記載の組成物。

実施形態＿Ｄ５８。編集細胞が、マクロファージを含む、実施形態＿Ｄ４９～５７のいずれか１つに記載の組成物。

実施形態＿Ｄ５９。編集された単球又はマクロファージが、実施形態Ｄ１～４８のいずれか１つに記載の方法によって得られるか、又はそれによって得ることができる、編集さ

れた単球又はマクロファージを含む、単球又はマクロファージの集団を含む組成物。

【０４２０】

以下の非限定的な実施形態もまた包含される。

実施形態＿Ｅ１。インビトロ培養ｉＰＳＣにおいて複数のゲノム編集を産生する方法であって、

ａ．ｉＰＳＣを、少なくとも第１の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）組成物及び第２のＬＮＰ組成物とインビトロで接触させるステップであって、第１の脂質核酸アセンブリ組成物が、第１の標的配列に指向された第１のガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）及び任意選択により核酸ゲノム編集ツールを含み、第２の核酸アセンブリ組成物が、第１の標的配列とは異なる第２の標的配列に指向された第２のｇＲＮＡ及び任意選択により核酸ゲノム編集ツールを含む、接触させるステップと、

ｂ．任意選択により、インビトロで細胞を拡大するステップと、

を含み、それによって細胞内で複数のゲノム編集を産生する、方法。

実施形態＿Ｅ２。ｉＰＳＣを、インビトロで拡大する、実施形態＿Ｅ１に記載の方法。

実施形態＿Ｅ３。本方法を、ｉＰＳＣの集団に対して実行する、実施形態＿Ｅ１又は２に記載の方法。

実施形態＿Ｅ４。ｉＰＳＣの集団を、ゲノム編集ツールを含む１つ以上の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）によりインビトロで培養することを含む、ゲノム編集を含む編集されたｉＰＳＣを含むｉＰＳＣの集団を産生する方法。

実施形態＿Ｅ５。ｉＰＳＣの集団を、（ｉ）ゲノム編集ツールを含む１つ以上の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）、及び（ｉｉ）ＤＮＡ－ＰＫ阻害剤によりインビトロで培養することを含む、ゲノム編集を含む編集されたｉＰＳＣを含むｉＰＳＣの集団を産生する方法。

実施形態＿Ｅ６。ｉＰＳＣの集団を、（ｉ）ゲノム編集ツールを含む２つ以上の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）、及び（ｉｉ）ＤＮＡ－ＰＫ阻害剤によりインビトロで培養することを含む、複数のゲノム編集を含む編集されたｉＰＳＣを含むｉＰＳＣの集団を産生する方法。

実施形態＿Ｅ７。ｉＰＳＣの集団における編集されたｉＰＳＣを同定することを更に含む、先行実施形態＿Ｅのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｅ８。編集されたｉＰＳＣを、単離することを更に含む、先行実施形態＿Ｅのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｅ９。単離された細胞を、インビトロで拡大することを更に含む、実施形態＿Ｅ８に記載の方法。

実施形態＿Ｅ１０。細胞を、最大１０個のＬＮＰとインビトロで接触させることを含む、先行実施形態＿Ｅのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｅ１１。本方法が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集細胞を含む細胞の集団を産生し、細胞のうちの１％未満が、標的対標的転座を有する、先行実施形態＿Ｅのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｅ１２。本方法が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集細胞を含む細胞の集団を産生し、細胞のうちの０．５％未満が、標的対標的転座を有する、先行実施形態＿Ｅのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｅ１３。本方法が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集細胞を含む細胞の集団を産生し、細胞のうちの０．２％未満が、標的対標的転座を有する、先行実施形態＿Ｅのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｅ１４。本方法が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集細胞を含む細胞の集団を産生し、細胞のうちの０．１％未満が、標的対標的転座を有する、先行実施形態＿Ｅのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｅ１５。本方法が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集細胞を含む細胞の集団を産生し、細胞が、相互転座、複合転座、又はオフターゲット転座の２倍未満のバックグラウンドレベルを有する、先行実施形態＿Ｅのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｅ１６。本方法が、ゲノム編集を含む細胞のうちの少なくとも２０％、３０

％、４０％、又は５０％を含む編集細胞を含む細胞の集団を産生する、先行実施形態＿Ｅのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｅ１７。ＬＮＰ組成物が、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、例えばＣａｓ９、任意選択によりＳ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９をコードする、ガイドＲＮＡ及びｍＲＮＡを含む、先行実施形態＿Ｅのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｅ１８。ＬＮＰ組成物が、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするガイドＲＮＡ及びｍＲＮＡを含み、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、ニッカーゼである、先行実施形態＿Ｅのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｅ１９。ＬＮＰ組成物が、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするガイドＲＮＡ及びｍＲＮＡを含み、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、クリバーゼである、先行実施形態＿Ｅのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｅ２０。細胞の集団を、ＤＮＡ－ＰＫ阻害剤と更に接触させる、先行実施形態＿Ｅのいずれか１つに記載の組成物。

実施形態＿Ｅ２１。細胞が、ヒト細胞である、先行実施形態＿Ｅのいずれか１つに記載の組成物。

実施形態＿Ｅ２２。本方法を、エクスビボで実施する、先行実施形態＿Ｅのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｅ２３。ＬＮＰ組成物のうちの１つが、ＭＨＣクラスＩの表面発現を低減又は排除する遺伝子を標的とするｇＲＮＡを含む、先行実施形態＿Ｅのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｅ２４。ＬＮＰ組成物のうちの１つが、Ｂ２Ｍを標的とするｇＲＮＡを含む、先行実施形態＿Ｅのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｅ２５。ＬＮＰ組成物のうちの１つが、ＭＨＣクラスＩＩの表面発現を低減又は排除する遺伝子を標的とするｇＲＮＡを含む、先行実施形態＿Ｅのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｅ２６。ＬＮＰ組成物のうちの１つが、ＣＩＩＴＡを標的とするｇＲＮＡを含む、先行実施形態＿Ｅのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｅ２７。集団が、ゲノム編集を含む細胞のうちの少なくとも２０％、３０％、４０％、又は５０％を含む、編集細胞を含むｉＰＳＣの集団を含む組成物。

実施形態＿Ｅ２８。細胞のうちの１％未満が、標的対標的転座を有する、実施形態＿Ｅ２７に記載の組成物。

実施形態＿Ｅ２９。細胞のうちの０．５％未満が、標的対標的転座を有する、実施形態＿Ｅ２７に記載の組成物。

実施形態＿Ｅ３０。細胞のうちの０．２％未満が、標的対標的転座を有する、実施形態＿Ｅ２７に記載の組成物。

実施形態＿Ｅ３１。細胞のうちの０．１％未満が、標的対標的転座を有する、実施形態＿Ｅ２７に記載の組成物。

実施形態＿Ｅ３２。細胞が、相互転座、複合転座、又はオフターゲット転座の２倍未満のバックグラウンドレベルを有する、実施形態＿Ｅ２７～３１のいずれか１つに記載の組成物。

実施形態＿Ｅ３３。編集されたｉＰＳＣが、実施形態＿Ｅ１～２６のいずれか１つに記載の方法によって得られるか、又はそれによって得ることができる、編集されたｉＰＳＣを含むｉＰＳＣの集団を含む組成物。

【０４２１】

以下の非限定的な実施形態もまた包含される。

実施形態＿Ｆ１。Ｔ細胞の集団をインビトロで培養することと、集団をゲノム編集ツールを含む１つ以上の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と接触させることと、を含む、編集されたＴ細胞を含むＴ細胞の集団を産生する方法。

実施形態＿Ｆ２。Ｔ細胞の集団をインビトロで培養することと、集団を、ｉ）ゲノム編集ツールを含む１つ以上の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）、及びｉｉ）ＤＮＡ－ＰＫ阻害剤と接

触させることと、を含む、編集されたＴ細胞を含むＢ細胞の集団を産生する方法。
実施形態＿Ｆ３。編集されたＴ細胞が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む、先行実施形態＿Ｆのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｆ４。Ｔ細胞の集団を、接触ステップの前に活性化することを更に含む、先行実施形態＿Ｆのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｆ５。編集されたＴ細胞を含むＴ細胞の集団を産生する方法であって、
ａ．Ｔ細胞の集団をインビトロで培養するステップと、
ｂ．Ｔ細胞の集団をインビトロで活性化するステップと、
ｃ．ｂ）のＴ細胞の集団を、１つ以上の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）とインビトロで接触させるステップであって、ＬＮＰが、ゲノム編集ツールを含む、接触させるステップと、
ｄ．Ｔ細胞の集団をＤＮＡ－ＰＫ阻害剤と接触させるステップと、
を含み、それによって編集されたＴ細胞の集団を産生する、方法。
実施形態＿Ｆ６。編集されたＴ細胞が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む、実施形態＿Ｆ５に記載の方法。
実施形態＿Ｆ７。ＬＮＰを、Ｔ細胞の集団をＬＮＰと接触させる前に、ＡｐｏＥとともに事前インキュベートする、先行実施形態＿Ｆのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｆ８。ＬＮＰを、Ｔ細胞の集団をＬＮＰと接触させる前に、ＡｐｏＥ３とともに事前インキュベートする、先行実施形態＿Ｆのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｆ９。ＬＮＰを、Ｔ細胞の集団をＬＮＰと接触させる前に、ＡｐｏＥ４とともに事前インキュベートする、先行実施形態＿Ｆのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｆ１０。Ｔ細胞の集団を、２．５～１０μｇ／ｍＬの総ＲＮＡカーゴを含むＬＮＰと接触させる、先行実施形態＿Ｆのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｆ１１。Ｔ細胞の集団を、２～１０個のＬＮＰ、例えば、２個の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と接触させる、先行実施形態＿Ｆのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｆ１２。Ｂ細胞の集団を、標的配列への挿入のためにドナー核酸と接触させることを更に含む、先行実施形態＿Ｆのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｆ１３。本方法が、ゲノム編集を含む細胞のうちの少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％を含むＴ細胞の集団を産生する、先行実施形態＿Ｆのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｆ１４。ゲノム編集が、インデル又は塩基編集を含み、Ｔ細胞の集団が、ゲノム編集を含む細胞のうちの少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％を含む、実施形態＿Ｆ１３に記載の方法。
実施形態＿Ｆ１５。ゲノム編集が、標的配列への外来性核酸配列の挿入を含み、Ｔ細胞の集団が、ゲノム編集を含む細胞のうちの少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は９５％を含む、実施形態＿Ｆ１３又は１４に記載の方法。
実施形態＿Ｆ１６。細胞の集団が、少なくとも２つのゲノム編集を含む編集されたＴ細胞を含み、細胞のうちの少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、又は８５％が、両方のゲノム編集を含む、実施形態＿Ｆ１３～１５のいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｆ１７。本方法が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集されたＴ細胞を含むＴ細胞の集団を産生し、細胞のうちの１％未満が、標的対標的転座を有する、先行実施形態＿Ｆのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｆ１８。本方法が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集されたＴ細胞を含むＴ細胞の集団を産生し、細胞のうちの０．５％未満が、標的対標的転座を有する、先行実施形態＿Ｆのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｆ１９。本方法が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集されたＴ細胞を含むＴ細胞の集団を産生し、細胞のうちの０．２％未満が、標的対標的転座を有する、先行実施形態＿Ｆのいずれか１つに記載の方法。
実施形態＿Ｆ２０。本方法が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集されたＴ細胞を含むＴ細胞の集団を産生し、細胞のうちの０．１％未満が、標的対標的転座を有する、先行実施形態＿Ｆのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｆ２１。本方法が、細胞当たり複数のゲノム編集を含む編集されたＴ細胞を含むＴ細胞の集団を産生し、編集細胞が、相互転座、複合転座、又はオフターゲット転座の２倍未満のバックグラウンドレベルを有する、先行実施形態＿Ｆのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｆ２２。編集されたＴ細胞が、ＣＤ４＋Ｔ細胞を含む、先行実施形態＿Ｆのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｆ２３。編集されたＴ細胞が、ＣＤ８＋Ｔ細胞を含む、先行実施形態＿Ｆのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｆ２４。編集されたＴ細胞が、メモリＴ細胞を含む、先行実施形態＿Ｆのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｆ２５。ＬＮＰ組成物が、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、例えばＣａｓ９、任意選択によりＳ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９をコードする、ガイドＲＮＡ及びｍＲＮＡを含む、先行実施形態＿Ｆのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｆ２６。ＬＮＰ組成物が、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするガイドＲＮＡ及びｍＲＮＡを含み、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、ニッカーゼである、先行実施形態＿Ｆのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｆ２７。ＬＮＰ組成物が、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするガイドＲＮＡ及びｍＲＮＡを含み、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、クリバーゼである、先行実施形態＿Ｆのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｆ２８。本方法が、選択ステップ、任意選択により物理的選択ステップ、又は生化学的選択ステップを含まない、先行実施形態＿Ｆのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｆ２９。本方法を、エクスビボで実施する、先行実施形態＿Ｆのいずれか１つに記載の方法。

実施形態＿Ｆ３０。Ｔ細胞の集団が、ゲノム編集を含む細胞のうちの少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％を含む、編集されたＴ細胞を含むＴ細胞の集団を含む組成物。

実施形態＿Ｆ３１。Ｔ細胞の集団が、ゲノム編集を含む細胞のうちの少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％を含み、ゲノム編集が、インデル又は塩基編集を含む、編集されたＴ細胞を含むＴ細胞の集団を含む組成物。

実施形態＿Ｆ３２。Ｔ細胞の集団が、ゲノム編集を含む細胞のうちの少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は９５％を含み、ゲノム編集が、標的配列への外来性核酸配列の挿入を含む、編集されたＴ細胞を含むＴ細胞の集団を含む組成物。

実施形態＿Ｆ３３。Ｔ細胞の集団が、少なくとも２つのゲノム編集を含む細胞のうちの少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、又は８５％を含む、編集されたＴ細胞を含むＴ細胞の集団を含む組成物。

実施形態＿Ｆ３４。細胞のうちの１％未満が、標的対標的転座を有する、実施形態＿Ｆ３０～３３のいずれか１つに記載の組成物。

実施形態＿Ｆ３５。細胞のうちの０．５％未満が、標的対標的転座を有する、先行実施形態＿Ｆ３０～３３のいずれか１つに記載の組成物。

実施形態＿Ｆ３６。細胞のうちの０．２％未満が、標的対標的転座を有する、先行実施形態＿Ｆ３０～３３のいずれか１つに記載の組成物。

実施形態＿Ｆ３７。細胞のうちの０．１％未満が、標的対標的転座を有する、先行実施形態＿Ｆ３０～３３のいずれか１つに記載の組成物。

実施形態＿Ｆ３８。細胞が、相互転座、複合転座、又はオフターゲット転座の２倍未満のバックグラウンドレベルを有する、先行実施形態＿Ｆ３０～３７のいずれか１つに記載の組成物。

実施形態＿Ｆ３９。編集されたＴ細胞が、実施形態＿Ｆ１～２９のいずれか１つに記載の方法によって得られるか、又はそれによって得ることができる、編集されたＴ細胞を含むＴ細胞の集団を含む組成物。

ＶＩＩＩ．
【実施例】
【０４２２】
実施例１．一般的な方法
実施例１．１．脂質核酸アセンブリの調製
一般に、脂質構成要素を、種々のモル比で、１００％エタノールに溶解した。ＲＮＡカーゴ（例えば、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びｓｇＲＮＡ）を２５ｍＭのクエン酸塩、１００ｍＭのＮａＣｌ（ｐＨ５．０）に溶解して、約０．４５ｍｇ／ｍＬのＲＮＡカーゴ濃度を得た。
【０４２３】
特に指示がない限り、脂質核酸アセンブリは、３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエノエート）とも称される、イオン化脂質Ａ（（９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル　オクタデカ－９，１２－ジエノエート、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧをそれぞれ５０：３８：９：３のモル比で含有していた。脂質核酸アセンブリを、特に指示がない限り、約６のＲＮＡホスフェートに対する脂質アミンの（Ｎ：Ｐ）モル比、及びｇＲＮＡ対ｍＲＮＡの重量比１：１により製剤化した。実施例１５～３４において、特に指示がない限り、ｇＲＮＡ対ｍＲＮＡの重量比１：２を使用した。
【０４２４】
クロスフロー技術を使用し、エタノール中の脂質の、２体積のＲＮＡ溶液及び１体積の水との衝突噴流混合を利用して、ＬＮＰを調製した。エタノール中の脂質を、交差混合により、２体積のＲＮＡ溶液と混合した。第４の水の流れを、ライン内のティーを通る交差部の出口流と混合した（ＷＯ２０１６／０１０８４０号の図２を参照）。ＬＮＰを室温で１時間保持し、さらに水で希釈した（約１：１ｖ／ｖ）。ＬＮＰを、例えば、フラットシートカートリッジ（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ、１００ｋＤ　ＭＷＣＯ）でタンジェンシャルフロー濾過を使用して濃縮し、ＰＤ－１０脱塩カラム（ＧＥ）を使用して、緩衝液を５０ｍＭのＴｒｉｓ、４５ｍＭのＮａＣｌ、５％（ｗ／ｖ）のスクロース、ｐＨ７．５（ＴＳＳ）に交換した。代替的に、ＬＮＰを、任意選択により、１００ｋＤａのＡｍｉｃｏｎスピンフィルタを使用して濃縮し、ＰＤ－１０脱塩カラム（ＧＥ）を使用して、緩衝液をＴＳＳに交換した。次いで、得られた混合物を０．２μｍの滅菌フィルタを使用して濾過した。最終ＬＮＰを、更なる使用まで４℃又は－８０℃で保存した。
【０４２５】
実施例１．２．ヌクレアーゼｍＲＮＡのインビトロ転写（「ＩＶＴ」）
Ｎ１－メチルシュード－Ｕを含有するキャップされたポリアデニル化ｍＲＮＡを、線状プラスミドＤＮＡテンプレート及びＴ７　ＲＮＡポリメラーゼを使用するインビトロ転写によって生成した。Ｔ７プロモーター、転写のための配列、及びポリアデニル化領域を含有するプラスミドＤＮＡを、以下の条件、２００ｎｇ／μＬのプラスミド、２Ｕ／μＬのＸｂａＩ（ＮＥＢ）、及び１ｘ反応緩衝液の条件で、ＸｂａＩとともに３７℃で２時間インキュベートすることによって線状化した。ＸｂａＩを、反応物を６５℃で２０分間加熱することによって不活性化した。線状プラスミドを、酵素及び緩衝塩から精製した。修飾ｍＲＮＡを生成するためのＩＶＴ反応を、以下の条件下、３７℃で１．５～４時間インキュベートすることによって実施した。５０ｎｇ／μＬの線状プラスミド、ＧＴＰ、ＡＴＰ、ＣＴＰ、及びＮ１－メチルシュードＵＴＰ（Ｔｒｉｌｉｎｋ）の各々、２～５ｍＭ、１０～２５ｍＭのＡＲＣＡ（Ｔｒｉｌｉｎｋ）、５Ｕ／μＬのＴ７　ＲＮＡポリメラーゼ（ＮＥＢ）、１Ｕ／μＬのマウスＲＮａｓｅ阻害剤（ＮＥＢ）、０．００４Ｕ／μＬの無機Ｅ．ｃｏｌｉピロホスファターゼ（ＮＥＢ）、並びに１ｘ反応緩衝液。ＴＵＲＢＯ　ＤＮａｓｅ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）を、最終濃度が０．０１Ｕ／μＬになるように添加

し、反応物をさらに３０分間インキュベートして、ＤＮＡテンプレートを除去した。ＭｅｇａＣｌｅａｒ転写クリーンアップキット（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）、又はＲＮｅａｓｙ　Ｍａｘｉキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用し、製造者のプロトコルに従って、ｍＲＮＡを精製した。代替的に、ｍＲＮＡを沈殿プロトコルにより精製し、いくつかの場合では、これに続いてＨＰＬＣベースの精製を行った。簡潔に述べると、ＤＮａｓｅ消化後に、ＬｉＣｌ沈殿、酢酸アンモニウム沈殿、及び酢酸ナトリウム沈殿を使用して、ｍＲＮＡを精製する。ＨＰＬＣ精製ｍＲＮＡについて、ＬｉＣｌ沈殿及び再構成後、ｍＲＮＡをＲＰ－ＩＰ　ＨＰＬＣによって精製した（例えば、Ｋａｒｉｋｏ，ｅｔ　ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２０１１，Ｖｏｌ．３９，Ｎｏ．２１　ｅ１４２を参照のこと）。プールのために選択された画分を合わせ、上記の酢酸ナトリウム／エタノール沈殿によって脱塩した。更なる代替的な方法において、ＬｉＣｌ沈殿法、これに続いてタンジェンシャルフロー濾過による更なる精製により、ｍＲＮＡを精製した。ＲＮＡ濃度を、２６０ｎｍでの光吸光度を測定することによって決定し（Ｎａｎｏｄｒｏｐ）、転写物をＢｉｏａｎｌａｙｚｅｒ（Ａｇｉｌｅｎｔ）によるキャピラリー電気泳動によって分析した。

【０４２６】

Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ（「Ｓｐｙ」）Ｃａｓ９　ｍＲＮＡを、配列番号１～３に従ってオープンリーディングフレームをコードするプラスミドＤＮＡから生成した（表８９の配列を参照）。ＢＣ２２ｎ　ｍＲＮＡを、配列番号１８に従ってオープンリーディングフレームをコードするプラスミドＤＮＡから生成した。ＵＧＩ　ｍＲＮＡを、配列番号２１に従ってオープンリーディングフレームをコードするプラスミドＤＮＡから生成した。この段落で引用する配列が、ＲＮＡに関して以下で参照される場合、Ｔは、Ｕ（上記のように、Ｎ１－メチルシュードウリジンであった）により置き換えられるべきであることが理解される。実施例で使用されるメッセンジャーＲＮＡには、５’キャップ及び３’ポリアデニル化配列、例えば、最大１００ｎｔが含まれ、表８９によって特定される。ガイドＲＮＡを、当該技術分野において既知の方法によって化学的に合成した。

【０４２７】

実施例１．３．次世代シークエンシング（「ＮＧＳ」）及びオンターゲット切断効率の分析

ゲノムＤＮＡを、ＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔ（商標）ＤＮＡ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ溶液（Ｌｕｃｉｇｅｎ、カタログＱＥ０９０５０）を使用して、製造業者のプロトコルに従って抽出した。

【０４２８】

ゲノム中の標的位置における編集効率を定量的に決定するために、ディープシークエンシングを使用して、遺伝子編集によって導入された挿入及び欠失（「インデル」）の存在を同定した。目的の遺伝子（例えば、ＴＲＡＣ）内の標的部位周辺でＰＣＲプライマーを設計し、目的のゲノム領域を増幅させた。プライマー配列設計は、現場で標準として行われた。

【０４２９】

シークエンシングのために必要な化学的性質を付加するために製造者のプロトコル（Ｉｌｌｕｍｉｎａ）に従って追加のＰＣＲを実施した。アンプリコンをＩｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑ装置でシークエンシングした。低品質スコアを有する読み取りを除去した後に、読み取りをヒト参照ゲノム（例えば、ｈｇ３８）とアラインメントした。目的の標的配列と重なり合った読み取りを、局所ゲノム配列に再アラインメントして、アラインメントを改善した。次いで、ＣからＴへの変異、ＣからＡ／Ｇへの変異、又はインデルを含有する読み取り数に対する、野生型の読み取り数を計算した。挿入及び欠失を、予測されるＣａｓ９切断部位を中心とする２０ｂｐ領域においてスコア化した。インデルパーセンテージは、２０ｂｐのスコア化領域内に１つ以上の塩基を挿入又は欠失したシークエンシング読み取りの総数を、野生型を含むシークエンシング読み取りの総数で割ったものとして定

義される。ＣからＴへの変異又はＣからＡ／Ｇへの変異を、２０ｂｐのｓｇＲＮＡ標的配列の１０ｂｐ上流及び１０ｂｐ下流を含む４０ｂｐ領域でスコア化した。ＣからＴへの編集パーセンテージは、４０ｂｐ領域内の１つ以上のＣからＴへの変異のいずれかを有するシークエンシング読み取りの総数を、野生型を含むシークエンシング読み取りの総数で割ったものとして定義される。ＣからＡ／Ｇへの変異のパーセンテージも同様に計算される。

【０４３０】

実施例１．４．Ｔ細胞培養培地の調製

以下で使用されるＴ細胞培養培地組成物を、本明細書及び表２に記載する。「Ｘ－ＶＩＶＯベース培地」は、Ｘ－ＶＩＶＯ（商標）１５培地、１％のＰｅｎｓｔｒｅｐ、５０μＭのベータ－メルカプトエタノール、１０ｍＭのＮＡＣからなる。「ＲＰＭＩベース培地」は、ＲＰＭＩ培地、１％のＰｅｎｓｔｒｅｐ、２ｍＭのＬ－グルタミン、１００μＭの非必須アミノ酸、１ｍＭのピルビン酸ナトリウム、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ緩衝液、及び５５μＭのベータ－メルカプトエタノールからなる。「ＣＴＳ　ＯｐＴｍｉｚｅｒベース培地」は、ＣＴＳ　ＯｐＴｍｉｚｅｒ培地、培地とともに提供されるサプリメントの全内容物、１Ｘ　Ｇｌｕｔａｍａｘ、及び１０ｍＭのＨＥＰＥＳからなる。上述の構成要素に加えて、ここで使用されるいくらかの可変培地構成要素は、表１にも記載されている、１．血清（ウシ胎児血清（ＦＢＳ）又はヒト血清ＡＢ、及び２．サイトカイン（ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５）である。培地構成要素を以下の表２に記載する。

【表４－１】

表１．培地構成要素

培地構成要素		濃度	供給業者	カタログ番号
塩基	RPMI 培地		Corning	
塩基	L-グルタミン	2mM	Corning	
任意選択的	Pen-Strep	1%	Corning	30-002-CI
塩基	非必須アミノ酸	100μM	Gibco	
塩基	ピルビン酸ナトリウム	1mM	Gibco	
塩基	HEPES 緩衝液	10mM	Gibco	
塩基	ベータ-メルカプトエタノール	55μM	Fisher	ICN19470583
可変	FBS(ウシ胎児血清)	10%	Gibco	
塩基	X-VIVO(商標)15 培地		LONZA	BE02-060Q
塩基	ヒト血清 AB	5%	Gemini Bio Products	100-512
任意選択的	Pen-Strep	1%	Corning	30-002-CI
塩基	ベータ-メルカプトエタノール	50μM	Fisher	ICN19470583
塩基	N-アセチル L-システイン(NAC)	10mM	Fisher	ICN19460325

【表４－２】

可変	rh　IL-15	200単位/mL	Peprotech	200-15
可変	rh-IL7	5ng/mL	Peprotech	200-07
可変	rh-IL-2	5ng/mL	Peprotech	200-02
塩基	CTS　Optimizer培地		ThermoFisher	
塩基	サプリメント	全ての提供された内容物	ThermoFisher	
可変	ヒト血清AB	5%	Gemini　Bio　Products	100-512
塩基	Glutamax	1X		
塩基	HEPES緩衝液	10mM	Gibco	
可変	rh　IL-15	5ng/mL	Peprotech	200-15
可変	rh-IL7	5ng/mL	Peprotech	200-07
可変	rh-IL-2	200単位/mL	Peprotech	200-02

【０４３１】

特に言及がない限り、Ｔ細胞を解凍、又は以下の表２の培地番号によって記載されるようなＴ細胞培養培地中で培養した。

【表５】

表２．Ｔ細胞培地組成物

培地番号	培地組成物	
1	X-VIVO ベース培地+IL-2+IL-15+IL7	ヒト血清 AB あり
2	X-VIVO ベース培地+IL-2+IL-15	
3	X-VIVO ベース培地+IL-2+IL7	
4	X-VIVO ベース培地+IL-2	
5	X-VIVO ベース培地	
6	X-VIVO ベース培地	血清なし
7	X-VIVO ベース培地+IL-2+IL-15+IL7	
8	X-VIVO ベース培地+IL-2+IL-15	
9	X-VIVO ベース培地+IL-2+IL7	
10	X-VIVO ベース培地+IL-2	
11	RPMI ベース培地+IL-2	ウシ胎児血清あり(FBS)
12	RPMI ベース培地+IL-2+IL-15	
13	RPMI ベース培地+IL-2+IL7	
14	RPMI ベース培地+IL-2+IL-15+IL7	
15	RPMI ベース培地	
16	CTS　Optimizer ベース培地+IL-2、IL7、IL-15	血清なし。
17	血清ありの CTS　Optimizer ベース培地+IL-2、IL7、IL-15	ヒト血清 AB あり

【０４３２】

実施例２．ＬＮＰ及びエレクトロポレーションを用いて操作されたＴ細胞のインビトロでの機能的特徴付け

Ｔ細胞操作の方法が得られる細胞の特性に影響を与えるかどうかを決定するために、本発明者らは、エレクトロポレーション（ＥＰ）又は脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を介して遺伝子操作されたＴ細胞のインビトロでの特徴を比較した。

【０４３３】

実施例２．１．Ｔ細胞の調製

健康なヒトドナーのアフェレーシスを商業的（Ｈｅｍａｃａｒｅ）に入手し、細胞を洗浄し、ＬＯＶＯデバイスにてＣｌｉｎｉＭＡＣＳ　ＰＢＳ／ＥＤＴＡ緩衝液（Ｍｉｌｔｅｎｙｉのカタログ１３０－０７０－５２５）中で再懸濁した。Ｔ細胞を、ＣｌｉｎｉＭＡＣＳ　Ｐｌｕｓ及びＣｌｉｎｉＭＡＣＳ　ＬＳ使い捨てキットを使用し、ＣＤ４及びＣＤ８磁気ビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　ＢｉｏＴｅｃのカタログ１３０－０３０－４０１／１３０－０３０－８０１）を使用して、陽性選択によって単離した。Ｔ細胞をバイアルに等分し、将来的な使用のためにＣｒｙｏｓｔｏｒ　ＣＳ１０（ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓのカタログ０７９３０）及びＰｌａｓｍａｌｙｔｅ　Ａ（Ｂａｘｔｅｒのカタログ２Ｂ２５２２Ｘ）の１：１製剤で凍結保存した。解凍時に、Ｔ細胞を、表２に記載されるような培地番号１において、１．５×１０ｅ６細胞／ｍＬの密度で一晩静置させた。一晩静置させた後、Ｔ細胞を、編集前にＴｒａｎｓＡｃｔ（１：１００希釈、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）により４８時間活性化した。

【０４３４】

実施例２．２．Ｔ細胞のＬＮＰ処理

ｇＲＮＡ対ｍＲＮＡの重量比１：２における、ＴＲＡＣ（Ｇ０１３００６）（配列番号７０８）又はＴＲＢＣ（Ｇ０１６２３９）（配列番号７０７）を標的とするＣａｓ９ ｍＲＮＡ及びｓｇＲＮＡを含有するＬＮＰを、６％のカニクイザル血清（ＢｉｏｒｅｃｌａｍａｔｉｏｎＩＶＴのカタログＣＹＮ２２０７６０）を補充した表２に記載されるような培地番号１において、３７℃で５分間、別々にインキュベートした。活性化から４８時間後、Ｔ細胞を洗浄し、表２に記載されるような培地番号１に懸濁した。事前インキュベートしたＬＮＰ混合物を各ウェルに添加して、ＬＮＰ当たり１μｇ／ｍＬ及び１×１０ｅ６細胞／ｍＬのＴ細胞の最終濃度を得た。ＡＡＶ６を使用して、ＴＲＡＣ遺伝子座への部位特異的組み込みのための、ホモロジーアームに隣接するトランスジェニックＴ細胞受容体（ｔｇＴＣＲ）を標的とするＷＴ１をコードする相同性指向修復テンプレート（ｈｏｍｏｌｏｇｙ ｄｉｒｅｃｔｅｄ ｒｅｐａｉｒ ｔｅｍｐｌａｔｅ、ＨＤＲＴ）を送達した。ＡＡＶを、３×１０ｅ５ゲノムコピーユニット（ＧＣＵ）／細胞の感染多重度（ＭＯＩ）で添加した。未編集Ｔ細胞（ＬＮＰ又はＡＡＶなし）、及びＬＮＰを用いてトランスフェクションされたが、ＡＡＶを用いて形質導入されなかったＴ細胞を含む対照群も含まれた。２４時間後、Ｔ細胞を収集し、遠心分離し、表２に記載されるような培地番号１のＧ－ＲＥＸ（登録商標）プレート（Ｗｉｌｓｏｎ Ｗｏｌｆ）に移入した。Ｔ細胞を７日間培養し、隔日で培地交換を行った後、フローサイトメトリーによる拡大、ｔｇＴＣＲ挿入、及び内因性ＴＣＲノックアウトについて評価した。全ての群を、複製ウェル（ｎ＝２）を用いて行った。拡大されたＴ細胞を、以下に記載するように機能アッセイのために凍結保存した。

【０４３５】

実施例２．３．Ｔ細胞のＲＮＰエレクトロポレーション

ＲＮＰは、ＴＲＡＣ（Ｇ０１３００６）（配列番号７０８）又はＴＲＢＣ（Ｇ０１６２３９）（配列番号７０７）を標的とする熱変性ｓｇＲＮＡとＣａｓ９タンパク質を２：１のガイド：Ｃａｓ９比で１５分間混合することにより、２０μＭのストック濃度で形成した。使用するまで、ＲＮＰストックを－８０℃で保存した。活性化から４８時間後、Ｔ細胞を採取し、遠心分離し、Ｐ３エレクトロポレーション緩衝液（Ｌｏｎｚａ）中で１０～２０×１０ｅ６Ｔ細胞／１００μＬの濃度で再懸濁した。細胞懸濁液をＲＮＰと混合して、２μＭの最終ＲＮＰ濃度を達成した後、Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒキュベットに移入し、製造者のパルスコードを使用してエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションされたＴ細胞を、サイトカインを有さない表２に記載されるような培地番号５の４００μＬ中に、直ちに１０分間静置させた後、３×１０ｅ５ＧＣＵ／細胞のＭＯＩでＷＴ１ＴＣＲをコードするＡＡＶを用いて、表２に記載されるような培地番号１に１×１０ｅ６細胞／ウェル／１ｍＬの密度でプレーティングした。２４時間後、Ｔ細胞を採取し、洗浄し、表２に記載されるような培地番号１のＧ－ＲＥＸ（登録商標）プレート（Ｗｉｌｓｏｎ Ｗｏｌｆ）に添加した。Ｔ細胞を７日間培養し、隔日で培地交換を行った後、フローサイトメトリーによる拡大、ｔｇＴＣＲ挿入、及び内因性ＴＣＲノックアウトについて評価した。その後、エレクトロポレーション処理されたＴ細胞を更に４日間培養した後、凍結保存した後、再びフローサイトメトリーによって分析し、Ｔ細胞機能アッセイにおいて評価した。

【０４３６】

実施例２．４．１　Ｔ細胞の拡大

Ｖｉ－ＣＥＬＬ細胞計数器（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ）を使用して細胞を計数し、倍率拡大を、細胞収率を挿入時の開始細胞計数で割ることによって計算した。ＬＮＰを用いて処理した細胞は、表３及び図１に示されるように、未編集Ｔ細胞と同等の編集後のＴ細胞拡大のレベル、並びにエレクトロポレーションを用いて処理した細胞よりも２倍超のより大きい拡大を示した。エレクトロポレーションされた細胞と比較して、ＬＮＰ処理細胞のより迅速な拡大により、より短い製造時間（１０対１４日間）を可能にし、臨床製造に望ましいレベルの拡大をもたらした（編集後５０倍超の増加）。

【表６】

表３．合計培養１０日又は１４日後の倍率拡大

群	日	倍率拡大(平均)	倍率拡大(SD)
EP+AAV	10	13	1
EP	10	20	1
LNP+AAV	10	84.5	2.5
LNP	10	88.5	1.5
未編集	10	94	10
EP+AAV	14	37	1.4

【０４３７】

実施例２．４．２．フローサイトメトリー

７日目に、編集後のＴ細胞をフローサイトメトリーによって表現型解析し、内因性ＴＣＲノックアウト及びｔｇＴＣＲ挿入率、並びにメモリ及び枯渇状態を決定した。簡潔に述べると、Ｔ細胞を、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、Ｖｂ８、ＣＤ６２Ｌ、ＣＤ４５ＲＯを標的とする抗体のカクテル中でインキュベートした。その後、細胞を洗浄し、Ｃｙｔｏｆｌｅｘ装置（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）にて処理し、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアパッケージを使用して分析した。Ｔ細胞を、サイズ、ＣＤ４／ＣＤ８状態、及びＷＴ１　ｔｇＴＣＲ発現（Ｖｂ８＋ＣＤ３＋）にてゲーティングした。Ｖｂ８は、ＷＴ１　ｔｇＴＣＲの発現を特定する。

【０４３８】

内因性ＴＣＲ遺伝子破壊及びＷＴ１　ｔｇＴＣＲ挿入率を、フローサイトメトリーによって評価した。表４及び図２は、ＣＤ３＋Ｖｂ８＋ＴＣＲ　Ｔ細胞のパーセントを示す。表５及び図３は、残留内因性ＴＣＲ（ＣＤ３＋Ｖｂ８－）を示す。

【表７】

表４．操作されたＴ細胞におけるトランスジェニックＴＣＲ挿入率

細胞型	群	挿入%(平均)	挿入(SD)
CD8	EP+AAV	68.5	0.4
	EP のみ	1.2	0.4
	LNP+AAV	60.9	1.4
	LNP のみ	0.8	0.0
	未編集	5.3	0.1
CD4	EP+AAV	71.55	0.85
	EP のみ	1.33	0.02
	LNP+AAV	55.4	1.3
	LNP のみ	0.855	0.115
	未編集	6.295	0.395

【表８】

表５．操作されたＴ細胞における残留内因性ＴＣＲ

細胞型	群	内因性 TCR%(平均)	内因性 TCR%(SD)
CD8	EP+AAV	12.0	0.3
	EP のみ	10.1	0.1
	LNP+AAV	0.8	0.1
	LNP のみ	1.6	0.0
	未編集	94.5	0.1
CD4	EP+AAV	6.67	0.11
	EP のみ	8.045	0.215
	LNP+AAV	1.46	0.29
	LNP のみ	1.765	0.005
	未編集	93.55	0.35

【０４３９】

拡大後の表現型分析（ＬＮＰ群については７日目の編集後、及びＥＰ群については１１日目の編集後）のために、凍結保存されたＴ細胞を解凍し、表２に記載されるような培地番号１に一晩静置させ、その後、Ｕ底９６ウェルプレートで２０分間、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ４５ＲＡ、ＩＬ－７Ｒ、ＣＤ４５ＲＯ、ＣＤ９５、ＬＡＧ３、ＣＤ２７、ＣＤ６２Ｌ、ＴＩＭ３、ＰＤ１、ＬＡＧ３により染色した。１４日目に採取されたＲＮＰのエレクトロポレーションされたＴ細胞に対して、１０日目に採取されたＬＮＰの操作されたＴ細胞は、図４及び表６に示されるように、増加したＣＤ４５ＲＡ＋ＣＤ２７＋初期幹細胞メモリ表現型を示す。細胞療法生成物の持続性及び治療有効性の増加と相関することが示されているＣＤ４５ＲＡ＋ＣＤ２７＋初期幹細胞メモリ表現型を、細胞生成物において分析した。

【表９】

表６．ＬＮＰ又はエレクトロポレーションにより操作されたＣＤ８＋Ｔ細胞のメモリ表現型

CD8+T 細胞	EP(14 日目)	LNP(10 日目)
CD45RA+CD27+%	33.2	67.4
CD45RA-CD27+%	11.2	23.1
CD54RA-CD27-%	37.4	18.2
CD45RA+CD27-%	18.2	4.1

【０４４０】

実施例２．５．Ｔ細胞機能アッセイ：細胞傷害性及びサイトカイン放出

実施例２．５．１．ＯＣＩ－ＡＭＬ３共培養

ＬＮＰ及びエレクトロポレーションＣａｓ９／ｓｇＲＮＡ送達プロセスを使用して操作されたＴ細胞を、滴定量のＷＴ１ペプチド（ＶＬＤＦＡＰＰＧＡ、以下、ＶＬＤペプチドと称する）によりパルス化されたＯＣＩ－ＡＭＬ３標的細胞との共培養後のＩＬ－２分泌を測定することによって、機能的反応性について更に評価した。ＯＣＩ－ＡＭＬ３細胞を４０，０００細胞／ウェルの密度で播種し、表７に示すように、滴定量のＶＬＤペプチドとともにインキュベートした。操作されたＴ細胞を、表２に記載されるような培地番号５において、２．５：１のエフェクタＴ細胞：標的細胞（Ｅ：Ｔ）比で、パルス化したＯＣ

Ｉ－ＡＭＬ３細胞に添加した。２４時間後の共培養の上清を採取し、製造者のプロトコルに従ってＥＬＩＳＡによりＩＬ－２分泌を定量化した（Ｒ＆Ｄ　Ｄｕｏｓｅｔ、カタログ番号ＤＹ２０２－５）と交換した。表７及び図５において、ＬＮＰの操作されたＴ細胞は、ＲＮＰの操作されたＴ細胞と比較して、ＶＬＤペプチドによりパルス化したＯＣＩ－ＡＭＬ３細胞と共培養した場合にＩＬ－２産生の増加を示した。

【表１０】

表７．ＬＮＰ又はＲＮＰ／ＥＰの操作されたＷＴ１　ＴＣＲ　Ｔ細胞の、滴定量のＶＬＤペプチドによりパルス化したＯＣＩ－ＡＭＬ３細胞との共培養におけるＩＬ－２分泌

群	VLD ペプチド(nM)	IL-2(平均 pg/mL)	IL-2(SD)
LNP+AAV	5000	5369	65
LNP+AAV	500	5604	54
LNP+AAV	50	5436	130
LNP+AAV	5	4372	nd
LNP+AAV	0.5	1390	nd
LNP+AAV	0.05	<LLOD	<LLOD
EP+AAV	5000	4022	117
EP+AAV	500	3661	155
EP+AAV	50	2875	32
EP+AAV	5	1943	65
EP+AAV	0.5	308	16
EP+AAV	0.05	<LLOD	<LLOD

決定されず=nd、検出の下限=LLOD

【０４４１】

実施例２．５．２．Ｋ５６２共培養

ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１及びルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いて形質導入されたＫ５６２細胞を、２５μｇ／ｍＬでマイトマイシンＣ（Ｔｏｃｒｉｓ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、カタログ番号３２５８）を用いて１時間処理して細胞分裂を停止させ、その後、ＷＴ１　ｔｇＴＣＲ　Ｔ細胞又はＴＣＲ－ｎｕｌｌ（ＬＮＰのみ）対照Ｔ細胞と二重に共培養した。２４時間後、サイトカイン放出（ＩＦＮγ）を、ＥＬＩＳＡ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓのカタログ番号ＤＹ２８５）によって定量化した。４８時間後、標的細胞のＴ細胞媒介性細胞傷害を、製造者のプロトコル（Ｐｒｏｍｅｇａ、Ｅ２６１０）に従って、Ｂｒｉｇｈｔ－ＧＬＯ試薬を使用して定量化した。特異的溶解パーセントを、式：

特異的溶解％＝１００－（（実験ウェル／標的のみの対照ウェル）×１００）によって決定した。

【０４４２】

表８及び図６は、Ｋ５６２　ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１陽性細胞との共培養に応答して、操作されたＴ細胞によるインターフェロン－ガンマ（ＩＦＮγ）放出を示す。

【０４４３】

表９及び図７は、操作されたＴ細胞と共培養した場合のＫ５６２　ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１陽性細胞の特異的溶解を示す。

【表１１】

表８．Ｋ５６２　ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１陽性細胞と共培養された操作されたＴ細胞によるＩＦＮγ放出

群	E:T	IFNγ（平均 pg/mL）	IFNγ（SD）
LNP+AAV	10	4742	151
LNP+AAV	5	5398	209
LNP+AAV	2.5	4937	227
LNP+AAV	1.25	2610	150
LNP+AAV	Ｔ細胞のみ	106	9
EP+AAV	10	2405	46
EP+AAV	5	2324	25
EP+AAV	2.5	2420	30
EP+AAV	1.25	1263	19
EP+AAV	Ｔ細胞のみ	150	35

【表１２】

表９．Ｋ５６２　ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１陽性細胞の特異的溶解

群	E:T	特異的溶解%	SD
LNP+AAV	10	98.51	0.12
LNP+AAV	5	98.28	0.02
LNP+AAV	2.5	96.38	0.53
LNP+AAV	1.25	75.27	0.06
EP+AAV	10	98.92	0.14
EP+AAV	5	98.48	0.27
EP+AAV	2.5	98.20	0.50
EP+AAV	1.25	83.05	0.60
LNP	10	31.08	5.53
LNP	5	10.40	0.02
LNP	2.5	2.90	2.90
LNP	1.25	0.00	0.00

【０４４４】

実施例２．６．標的細胞媒介Ｔ細胞再刺激アッセイ

簡潔に述べると、エフェクタＴ細胞を、表２に記載されるような培地番号５において、２．５：１のエフェクタＴ細胞：標的細胞（Ｅ：Ｔ）比で、５００ｎＭのＶＬＤペプチドによりパルス化されたＯＣＩ－ＡＭＬ３標的細胞と共培養した（刺激１）。５日後、エフェクタＴ細胞計数を記録し、細胞を刺激１のように再播種した。第２の刺激から５日後、細胞計数を記録し、フローサイトメトリー分析のために試料を採取した。残りの細胞を、５：１のＥ：Ｔ比を使用することを除いて、刺激１のように３回目の再刺激を行った。第３の刺激から５日後、細胞計数を記録し、フローサイトメトリー分析のために試料を採取した。ＬＮＰ又はＲＮＰの操作されたＴ細胞をＶＬＤ－ペプチドによりパルス化されたＯＣＩ－ＡＭＬ３細胞と共培養した長期再刺激アッセイは、複数の刺激にわたってＬＮＰ操

作Ｔ細胞の増殖の増加を示したが、ＲＮＰのエレクトロポレーションされたＴ細胞は、反復刺激後の増殖の減少を示した（図８、表１０）。

【０４４５】

表１０．ＶＬＤペプチドパルス化ＯＣＩ－ＡＭＬ３細胞による３回の連続する再刺激中のＴ細胞の拡大

データは、刺激１の前の量に対するＴ細胞数の倍率変化として示される。

【表１３】

【表１３】

群	刺激後番号	累積倍率変化	SD
LNP+AAV	1	7.2	0.4
LNP+AAV	2	34.2	3.5
LNP+AAV	3	120.1	17.2
EP+AAV	1	7.9	0.4
EP+AAV	2	19.0	1.0
EP+AAV	3	27.1	4.8

【０４４６】

実施例３．エレクトロポレーション及びＬＮＰの操作されたＴ細胞の構造ゲノム特徴付け

Ｔ細胞を、エレクトロポレーション又はＬＮＰプロセスによる操作の後、染色体転座及びインビトロ機能特徴についてアッセイした。

【０４４７】

実施例３．１．Ｔ細胞操作

Ｔ細胞を単離し、Ｔ細胞培養培地が表２に記載されるような培地番号１７であったことを除いて、実施例２のように培養した。

【０４４８】

Ｐ３緩衝液（Ｌｏｎｚａ　Ｘ　Ｋｉｔ　Ｌ、カタログＶ４Ｘ９－３０１２）において３～５×１０ｅ６細胞／１００ｕＬの密度で、Ｔ細胞をエレクトロポレーションしたことを除いて、Ｔ細胞のエレクトロポレーション処理を実施例２のように実施し、エレクトロポレーションキュベットの全内容物をＧＲＥＸプレート（Ｗｉｌｓｏｎ　Ｗｏｌｆ）に移入した。

【０４４９】

以下の修飾を用いて、実施例２のように、Ｔ細胞のＬＮＰ処理及び活性化を実施した。ＬＮＰを、概して、実施例１に記載されるように、５０／９／３９．５／１．５の脂質Ａ、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧの比で調製した。ＬＮＰは、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びＴＲＡＣを標的とするｓｇＲＮＡ　Ｇ０１３００６（配列番号７０８）、又はＣａｓ９　ｍＲＮＡ及びＴＲＢＣを標的とするｓｇＲＮＡ　Ｇ０１６２３９（配列番号７０７）のいずれかを含有した。ＬＮＰを、ｇＲＮＡ対ｍＲＮＡの１：２重量比により調製した。１μｇ／ｍＬの濃度において組換えヒトＡｐｏＥ３（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ番号３５０－０２）を補充した、表２に記載されるような培地番号１７において、ＬＮＰを、５μｇ／ｍＬの２倍の濃度（特に明記されない限り）で、３７℃で１５分間事前インキュベートした。Ｔ細胞を洗浄し、表２に記載されるような培地番号１６において懸濁した。事前インキュベートしたＬＮＰを各ウェルに添加して、０．５×１０ｅ６細胞／ｍＬのＴ細胞により、表１１に示されるような最終濃度のＬＮＰを得た。ＡＡＶ６を使用して、ＴＲＡＣ遺伝子座への部位特異的組み込みのための、ホモロジーアームに隣接するｔｇＴＣＲを標的とするＷＴ１をコードする相同性指向修復テンプレート（ＨＤＲＴ）を送達した。編集後、全てのＴ細胞をＧＲＥＸプレート中で拡大した。

【０４５０】

表１１は、各試料の編集ステップを記載する。いくつかの場合において、Ｔ細胞を、表１１にスケジュールされているように、ＬＮＰを用いて逐次様式で編集した。ＬＮＰ逐次１プロセス（ＢＦ）について簡潔に述べると、Ｔ細胞を、細胞を除いて上記のようにＴＲＢＣを標的とするＬＮＰを用いて処理し、１ｘ１０ｅ６細胞／ｍＬの密度で維持し、実施例２に記載されるようにＴｒａｎｓＡｃｔの１：１００希釈により活性化した。ＬＮＰを、２．５％（ＢＦ２．５）又は５％（ＢＦ５）又は５％（ＡＦ）のヒトＡＢ血清（ＨＡＢＳ）のいずれかでインキュベートした。３日目に、これらの編集されたＴ細胞を、上記のようにＴＲＡＣ　ＬＮＰ及びＡＡＶを用いて処理した。ＬＮＰ　ＡＦでは、Ｔ細胞を４８時間活性化し、上記のようにＴＲＡＣ　ＬＮＰ及びＡＡＶを用いて処理した。翌日、Ｔ細胞を収集し、洗浄し、ＴＲＢＣ　ＬＮＰを用いて２４時間処理した後、ＧＲＥＸプレートに移入した。同時試料（ＬＮＰ　ＳＩＭ）を、ＴＲＡＣ　ＬＮＰ、ＴＲＢＣ　ＬＮＰ、及びＡＡＶを用いて３日目に編集した。

【表１４】

表１１．Ｔ細胞操作条件

条件	１日目	２日目	３日目	４日目	５日目
未編集	解凍、活性化		洗浄	伸長	
EP	解凍、活性化		RNP+AAV	伸長	
LNP　SIM　LNP	解凍、活性化		TRAC LNP+TRBC LNP+AAV	伸長	
BF2.5　LNP	解凍、活性化、 TRBC　LNP　2.5% HABS、2.5μg/ml LNP		TRAC LNP+AAV	伸長	
BF5　LNP	解凍、活性化、 TRBC　LNP　5% HABS、5μg/ml LNP		TRAC LNP+AAV	伸長	
LNP　AF	解凍、活性化		TRAC LNP+AAV	TRBC　LNP	伸長

【０４５１】

処理及び増殖後、Ｔ細胞を採取し、ＣＤ３、Ｖｂ８、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ４５ＲＯ、及びＣＤ２７を標的とする抗体を使用して、実施例２に記載されるようにフローサイトメトリーによりアッセイした。Ｔ細胞をＣｒｙｏｓｔｏｒｅ（登録商標）ＣＳ１０培地に保存した。表１２及び図９は、操作後のＴ細胞培養物の拡大を示す。実験全体にわたる倍率拡大は、各ドナー又は群の９日目の全細胞を、０日目の細胞数（３００万）で割ることによって計算される。一般に、倍率拡大は、例えば、共焦点顕微鏡によって核を計数する、全細胞数を播種された細胞数で割ることによって計算され得る。表１３及び図１０は、操作されたＣＤ８＋Ｔ細胞のｔｇＴＣＲ挿入率を示す。表１４及び図１１は、処理後の内因性ＴＣＲを保持するＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージを示す。表１５及び図１２は、メモリ細胞表現型と関連する表現型である、ＣＤ２７＋である操作されたＴ細胞のパーセンテージを示す。

【表１５】

表１２．Ｔ細胞の拡大、全細胞

群	日	平均 (x10e6)	SD (x10e6)	N	複製	複製	複製	倍率変化
未編集	0	3	0	3	3.0	3.0	3.0	
	2	2.5	0.8	3	3.1	1.6	2.9	
	6	52	13.6	2	62.2	0.0	43.0	
	9	255	12.5	3	241.0	262.0	263.0	85
EP	0	3	0	3	3.0	3.0	3.0	
	2	3.0	5.4	3	3.0	2.5	3.5	
	6	20.4	7.1	3	28.0	19.3	13.9	
	9	123	22.8	3	149.0	109.0	110.0	41
	12	261	61.7	3	325.0	255.0	202.0	87
SIM LNP	0	3	0	3	3.0	3.0	3.0	
	2	2.8	1.0	3	3.9	1.9	2.8	
	6	54	15.6	3	71.7	51.1	41.1	
	9	253	51.5	3	312.0	230.0	217.0	84.3
BF2.5 LNP	0	3	0	3	3.0	3.0	3.0	
	2	2.42	0.3	3	2.7	2.1	2.4	
	6	51.1	23.9	3	78.4	41.4	33.5	
	9	256	57.0	3	317.0	247.0	204.0	85.3
BF5 LNP	0	3	0	3	3.0	3.0	3.0	
	2	1.94	0.5	3	2.2	1.4	2.3	
	6	48.1	20.9	3	71.3	42.5	30.6	
	9	238	47.9	3	293.0	210.0	210.0	79.3
AF LNP	0	3	0	3	3.0	3.0	3.0	
	2	2.52	0.5	3	3.1	2.0	2.5	
	6	62.5	25.8	3	92.3	48.1	47.1	
	9	256	40.9	3	293.0	263.0	212.0	85.3

【表１６】

表１３．ＣＤ８＋Ｔ細胞へのトランスジェニックＴＣＲ挿入率

群	挿入%(平均)	SD	N	複製	複製	複製
未編集	6.7	2.0	3	4.9	6.5	8.8
EP	81.1	5.4	3	76.7	87.2	79.6
SIM LNP	45.7	15.2	3	30.3	60.7	46.2
BF2.5 LNP	57.7	9.8	3	46.8	66.1	60.2
BF5 LNP	61.2	9.5	3	51.8	70.8	61.2
AF LNP	53.9	10.7	3	41.6	61.7	58.4

【表１７】

表１４．ＣＤ８＋Ｔ細胞における残留内因性ＴＣＲ

群	内因性 TCR%(平均)	SD	N	複製	複製	複製
未編集	93.1	1.61	3	94.90	93.40	91.00
EP	0.43	0.43	3	0.93	0.22	0.14
SIM　LNP	0.85	0.19	3	0.98	0.63	0.96
BF2.5　LNP	0.75	0.14	3	0.90	0.62	0.72
BF5　LNP	0.56	0.26	3	0.77	0.64	0.27
AF　LNP	0.52	0.22	3	0.75	0.49	0.32

【表１８】

表１５．メモリ表現型

群	CD27+%(平均)	SD	N	複製	複製	複製
未編集	76.1	23.6	3	91.4	88.0	48.9
EP	35.8	3.4	3	36.1	39.0	32.3
SIM　LNP	54.9	11.6	3	64.4	58.4	42.0
BF2.5　LNP	58.7	13.5	3	68.6	64.3	43.3
BF5　LNP	57.5	10.4	3	66.7	59.6	46.2
AF　LNP	67.4	11.8	3	76.4	71.7	54.0

【０４５２】

実施例３．２．Ｄｒｏｐｌｅｔ　Ｄｉｇｉｔａｌ（商標）ＰＣＲによる転座分析及びＴＲＢＣ遺伝子座への挿入

ＴＲＡＣ遺伝子座とＴＲＢＣ遺伝子座との間の転座、及びＴＲＢＣ遺伝子座への挿入を、Ｄｒｏｐｌｅｔ　Ｄｉｇｉｔａｌ（商標）ＰＣＲ（ｄｄＰＣＲ）を使用してアッセイした。簡潔に述べると、ｇＤＮＡを、製造者のプロトコルに従って、ＤＮｅａｓｙ血液及び組織キット（Ｑｉａｇｅｎ、カタログ６９５０６）を使用してＴ細胞試料から単離した。ＴＲＡＣ－ＴＲＢＣ及びＴＲＢＣ－ＴＲＡＣ接合部を増幅するために、ｄｄＰＣＲプライマーを選択し、ＴＲＡＣ－ＴＲＢＣ及びＴＲＢＣ－ＴＲＡＣ転座、並びに選択されたＴＣＲ　ＡＡＶ構築物の、相同性非依存的、ランダム組み込みによるＴＲＢＣ遺伝子座への挿入を検出した。製造者のプロトコルに従って、ｄｄＰＣＲアッセイを行った。簡潔に述べると、１００ｎｇのｇＤＮＡを、２ｘ　ｄｄＰＣＲ　Ｓｕｐｅｒｍｉｘ　ｆｏｒ　Ｐｒｏｂｅｓ（Ｂｉｏｒａｄ、カタログ１８６３０２４）及びＨｉｎｄ　ＩＩＩ　ＨＦ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｒ３１０４Ｓ）、検証された９００ｎＭでのプライマー及び２５０ｎＭでのプローブを用いて調製した。試料を、ＱＸ２００（商標）Ｄｒｏｐｌｅｔ　Ｇｅｎｅｒａｔｏｒ（Ｂｉｏｒａｄ、カタログ１８６４００２）により処理し、熱サイクルに供した。サイクルパラメータは以下の通りであった：９５℃で１０分間の酵素活性化；９４℃で３０秒間の変性の５０サイクル、６０℃で１分間のアニーリング、及び７２℃で４分間の伸長；９８℃で１０分間の酵素非活性化、及び４℃での保持。液滴蛍光を、ＱＸ２００（商標）Ｄｒｏｐｌｅｔ　Ｒｅａｄｅｒ（Ｂｉｏｒａｄ、カタログ１８６４００３）を使用して測定し、データを、ＱｕａｎｔａＳｏｆｔ（商標）ソフトウェア、Ｒｅｇｕｌａｔｏｒｙ　Ｅｄｉｔｉｏｎ（Ｂｉｏｒａｄ、カタログ１８６４０１１）を用いて分析した。ＴＲＡＣ－ＴＲＢＣ転座及びＴＲＢＣ挿入細胞（図１３Ａ（ＴＲＡＣプローブ）及び図１３Ｂ（ＴＲＢＣプローブ））、並びにＴＲＢＣ－ＴＲＡＣ（図１４Ａ（ＴＲＡＣプローブ）及び図１４Ｂ（ＴＲＢＣプローブ））転座及びＴＲＢＣ挿入細胞のパーセンテージを、表１６Ａに示す）。

【表１９－１】

表１６Ａ．転座細胞及びＴＲＢＣ挿入細胞のパーセント

ddPCR条件	試料	ドナー003			ドナー006			ドナー276		
		平均	ポアソン最大	ポアソン最小	平均	ポアソン最大	ポアソン最小	平均	ポアソン最大	ポアソン最小
TRAC-TRBC TRACプローブ	未編集	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	EP	2.56	2.96	2.16	1.94	2.32	1.56	1.71	2.05	1.35
	SIM LNP	1.59	1.95	1.22	1.73	2.03	1.43	1.31	1.62	1.00
	BF2.5 LNP	0.51	0.67	0.34	0.36	0.49	0.23	0.42	0.57	0.27
	BF5 LNP	0.63	0.83	0.44	0.39	0.55	0.23	0.57	0.77	0.36
	AF LNP	0.89	1.09	0.68	0.58	0.76	0.41	0.73	0.94	0.51
TRAC-TRBC TRBCプローブ	未編集	0.01	0.05	0.00	0.01	0.04	0.00	0.02	0.06	0.00
	EP	1.59	1.92	1.25	1.77	2.15	1.39	1.48	1.81	1.14
	SIM LNP	1.20	1.54	0.87	2.14	2.49	1.78	1.61	1.92	1.30
	BF2.5 LNP	0.06	0.12	0.01	0.27	0.39	0.16	0.17	0.29	0.06
	BF5 LNP	0.21	0.32	0.10	0.46	0.65	0.28	0.10	0.19	0.02
	AF LNP	0.68	0.87	0.48	0.61	0.80	0.41	0.94	1.16	0.71
TRBC-TRAC TRACプローブ	未編集	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	EP	1.81	2.16	1.47	1.92	2.32	1.53	2.20	2.59	1.81
	SIM LNP	2.30	2.77	1.83	2.69	3.09	2.29	2.40	2.79	2.01
	BF2.5 LNP	0.25	0.37	0.13	0.40	0.58	0.23	0.31	0.46	0.15
	BF5 LNP	0.19	0.30	0.08	0.60	0.80	0.40	0.20	0.31	0.08
	AF LNP	0.62	0.80	0.45	0.82	1.03	0.60	0.80	1.04	0.56
TRBC-TRAC TRBCプローブ	未編集	0.13	0.22	0.04	0.04	0.10	0.00	0.14	0.24	0.03
	EP	1.90	2.25	1.55	2.03	2.41	1.66	1.68	2.04	1.30
	SIM LNP	1.84	2.23	1.46	1.76	2.12	1.42	1.94	2.34	1.54

【表１９－２】

ddPCR条件	試料	ドナー003			ドナー006			ドナー276		
		平均	ポアソン最大	ポアソン最小	平均	ポアソン最大	ポアソン最小	平均	ポアソン最大	ポアソン最小
	BF2.5 LNP	0.39	0.54	0.23	0.44	0.60	0.28	0.28	0.41	0.14
	BF5 LNP	0.43	0.59	0.26	0.30	0.45	0.16	0.30	0.45	0.15
	AF LNP	0.63	0.80	0.45	0.80	1.01	0.58	0.75	0.98	0.53

【０４５３】

ＴＲＡＣ遺伝子座とＴＲＢＣ遺伝子座との間の転座速度を具体的に定量化し、相同性非依存的なランダムＴＲＢＣ挿入の検出を回避するために、新しいプライマーのセットを設計して、ＴＲＡＣ－ＴＲＢＣ又はＴＲＢＣ－ＴＲＡＣ転座部位の接合部にわたるアンプリコンを増幅した。フォワード及びリバースプライマーは、それぞれＴＲＡＣ遺伝子座（ＡＶホモロジーアームの外側）又はＴＲＢＣ遺伝子座のいずれかにあった。ＴＲＡＣ又はＴＲＢＣ遺伝子座のいずれかを標的とするプローブを、増幅された転座アンプリコンを認識するように設計した。新しいプライマーのセット及びプローブは、ＴＲＡＣ遺伝子座とＴＲＢＣ遺伝子座との間の転座の特異的検出を可能にするが、上記のように、ＴＲＢＣ遺伝子座における相同性非依存的なランダム組み込みを検出しない。ＴＲＡＣ遺伝子座とＴＲＢＣ遺伝子座との間の転座を、新しいプライマーのセット及びプローブを使用してアッセイした。上記のように、ｄｄＰＣＲプロセスを行った。ＴＲＡＣ－ＴＲＢＣ転座細胞（図１４Ｃ（ＴＲＡＣプローブ）及び図１４Ｄ（ＴＲＢＣプローブ））、及びＴＲＢＣ－ＴＲＡＣ（図１４Ｅ（ＴＲＡＣプローブ）及び図１４Ｆ（ＴＲＢＣプローブ））転座細胞のパーセンテージを、表１６Ｂに示す）。

【表２０－１】

表１６Ｂ．転座細胞パーセント

ddPCR条件	試料	ドナー003			ドナー006			ドナー276		
		平均	ポアソン最大	ポアソン最小	平均	ポアソン最大	ポアソン最小	平均	ポアソン最大	ポアソン最小
TRAC-TRBC TRACプローブ	未編集	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	EP	0.19	0.26	0.11	0.13	0.20	0.06	0.22	0.32	0.13
	SIM LNP	0.17	0.24	0.10	0.04	0.07	0.01	0.06	0.11	0.02
	BF2.5 LNP	0.01	0.03	0.00	0.04	0.07	0.01	0.01	0.02	0.00
	BF5 LNP	0.01	0.03	0.00	0.03	0.05	0.01	0.03	0.05	0.00
	AF LNP	0.06	0.10	0.02	0.02	0.03	0.00	0.03	0.05	0.02
TRAC-TRBC TRBCプローブ	未編集	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	EP	0.24	0.32	0.15	0.06	0.11	0.01	0.17	0.25	0.08
	SIM LNP	0.16	0.23	0.08	0.03	0.07	0.00	0.09	0.15	0.03
	BF2.5 LNP	0.01	0.02	0.00	0.01	0.02	0.00	0.01	0.01	0.00
	BF5 LNP	0.02	0.03	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.03	0.00
	AF LNP	0.04	0.07	0.00	0.02	0.04	0.00	0.03	0.04	0.01
TRBC-TRAC TRBCプローブ	未編集	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	EP	0.30	0.40	0.20	0.15	0.23	0.08	0.17	0.25	0.09
	SIM LNP	0.11	0.17	0.05	0.07	0.12	0.03	0.07	0.12	0.02
	BF2.5 LNP	0.01	0.02	0.00	0.01	0.03	0.00	0.01	0.01	0.00
	BF5 LNP	0.03	0.05	0.00	0.02	0.04	0.00	0.01	0.03	0.00
	AF LNP	0.07	0.11	0.03	0.03	0.05	0.01	0.04	0.06	0.02
TRBC-TRAC TRACプローブ	未編集	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	EP	0.24	0.33	0.16	0.19	0.27	0.10	0.17	0.25	0.08
	SIM LNP	0.14	0.20	0.07	0.04	0.07	0.00	0.05	0.10	0.00

【表２０－２】

ddPCR条件	試料	ドナー003			ドナー006			ドナー276		
		平均	ポアソン最大	ポアソン最小	平均	ポアソン最大	ポアソン最小	平均	ポアソン最大	ポアソン最小
	BF2.5 LNP	0.01	0.02	0.00	0.02	0.05	0.00	0.01	0.02	0.00
	BF5 LNP	0.01	0.02	0.00	0.02	0.03	0.00	0.01	0.02	0.00
	AF LNP	0.03	0.06	0.00	0.02	0.04	0.01	0.03	0.05	0.01

【０４５４】

実施例３．３．ルシフェラーゼベースの標的細胞死滅アッセイ

Ｔ細胞を、インビトロ機能特徴のために更に特徴付けた。Ｂ細胞急性リンパ芽球性白血病細胞株６９７（ＡＣＣ　４２）を、Ｄｅｕｔｓｃｈｅ　Ｚａｍｍｌｕｎｇ　ｖｏｎ　Ｍｉｋｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｅｎ　ｕｎｄ　Ｚｅｌｌｋｕｌｔｅｒｅｎ　ＧｍｂＨ（ＤＳＭＺ）（Ｂｒａｕｎｓｃｈｗｅｉｇ　Ｇｅｒｍａｎｙ）から入手した。細胞を、製造者のプロトコルに従って、ポリブレン（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｓｉｇｍａ、カタログ番号ＴＲ－１００３）の存在下で、ＬＶ－ＳＦＦＶ－Ｌｕｃ２－Ｐ２Ａ－ＥｍＧＦＰレンチウイルスベクター（Ｉｍａｎｉｓ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、カタログ番号ＬＶ０５０－Ｌ）を用いて形質導入した。クローン集団を、生物発光強度の測定によってルシフェラーゼ活性についてスクリーニングした。６９７－Ｌｕｃ２細胞を、１０％のウシ胎児血清（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号Ａ３８４０２－０１）、５％のペニシリン／ストレプトマイシン（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号１５１４０－１２２）、及びＧｌｕｔａｍａｘ（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号３５０５０－０６１）を補充したＲＰＭＩ－１６４０培地（Ｃｏｒｎｉｎｇ／Ｃｅｌｌｇｒｏ、カタログ番号１０－０４０－ＣＭ）において、３７℃、９５％湿度、５％のＣＯ２で培養した。

【０４５５】

ＨＬＡ－Ａ０２：０１標的（６９７－Ｌｕｃ２、Ｋ５６２　ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１－Ｌｕｃ２）及び陰性対照Ｋ５６２－Ｌｕｃ２を発現するＷＴ１のＴＣＲ－Ｔ細胞媒介性細胞傷害をアッセイした。このため、ＬＮＰ編集されたＷＴ１　ＴＣＲ　Ｔ細胞又は未編集対照Ｔ細胞を、上記標的細胞株と、３：１、１．５：１、及び０．７５：１のエフェクタ対標的比で、４８時間共培養した。次いで、Ｂｒｉｇｈｔ－ＧＬＯ試薬を使用してルシフェラーゼシグナルを検出し、実施例２に記載されるように分析した。特異的溶解を、表１７及び図１５Ａ～Ｆに示す。

【表２１】

表１７．操作されたＴ細胞による標的細胞の特異的溶解

ドナー	標的	E/T	未編集			EP			SIM　LNP			BF2.5　LNP		
			平均	SD	N	平均	SD	N	平均	SD	N	平均	SD	N
006	K562	3	-0.4	1.4	2	11.7	1.4	2	14.1	2.1	2	15.3	1.7	2
		1.5	8.3	0.2	2	16.3	2.1	2	15.7	1.6	2	17.2	1.4	2
		0.75	9.3	4.0	2	16.4	1.0	2	16.0	1.7	2	18.0	5.1	2
		0	-5.1	2.8	2	5.5	3.6	2	0.5	4.5	2	-1.0	4.3	2
	K562 HLA A*02:01	3	12.7	1.5	2	97.9	0.0	2	97.8	0.0	2	98.6	0.4	2
		1.5	12.4	2.1	2	94.6	0.2	2	98.1	0.4	2	99.1	0.4	2
		0.75	8.7	10.9	2	74.6	1.7	2	85.8	1.5	2	92.3	0.5	2
		0	0.5	6.9	2	0.4	0.1	2	4.1	2.1	2	-4.9	5.2	2
	697-luc	3	19.0	4.2	2	97.8	1.3	2	98.8	0.7	2	99.5	0.1	2
		1.5	8.3	3.4	2	92.0	0.2	2	96.4	3.8	2	98.9	0.4	2
		0.75	13.0	13.5	2	73.0	3.2	2	78.4	10.3	2	93.9	0.3	2
		0	-12.8	2.1	2	5.9	15.3	2	-5.2	3.1	2	12.2	6.5	2
276	K562	3	-3.8	3.5	2	-9.8	1.6	2	1.2	1.5	2	-3.2	2.5	2
		1.5	-7.7	2.6	2	0.4	0.5	2	-4.7	3.5	2	-3.5	1.0	2
		0.75	-5.2	7.7	2	-0.4	1.0	2	0.2	1.9	2	-5.3	1.8	2
		0	-9.6	11.7	2	5.4	4.7	2	4.8	4.0	2	-0.7	8.8	2
	K562 HLA A*02:01	3	-2.6	8.8	2	97.7	0.2	2	95.4	0.7	2	96.3	0.9	2
		1.5	-7.0	9.3	2	88.7	0.4	2	80.2	2.7	2	85.3	1.2	2
		0.75	-12.9	7.1	2	62.2	0.3	2	50.6	2.3	2	54.1	1.7	2
		0	0.4	3.1	2	-0.1	4.0	2	1.0	3.4	2	-1.4	6.1	2
	697-luc	3	5.1	9.8	2	98.0	0.9	2	90.1	0.4	2	95.5	0.9	2
		1.5	2.2	13.2	2	88.0	8.6	2	55.6	13.5	2	72.2	6.6	2
		0.75	-5.9	6.7	2	45.7	2.5	2	34.9	12.4	2	28.3	1.8	2
		0	-3.1	12.3	2	5.8	2.0	2	2.9	18.2	2	9.7	0.0	1

【０４５６】

実施例４．ＬＮＰの操作されたＴ細胞のインビボでの有効性。

Ｂ細胞急性リンパ芽球性白血病細胞株６９７を移植したマウスにおけるがん細胞の成長及び死亡率に影響を与えるために、インビボでの有効性について、ＬＮＰの操作されたＴ細胞をアッセイした。

【０４５７】

実施例４．１．６９７細胞の調製。

移植前に、実施例３に記載の６９７細胞を、１０％のウシ胎児血清（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号Ａ３８４０２－０１）、５％のペニシリン／ストレプトマイシン（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号１５１４０－１２２）、及びＧｌｕｔａｍａｘ（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号３５０５０－０６１）を補充したＲＰＭＩ－１６４０培地（Ｃｏｒｎｉｎｇ／Ｃｅｌｌｇｒｏ、カタログ番号１０－０４０－ＣＭ）において、３７℃、９５％湿度、５％のCO_2で培養した。

【０４５８】

実施例４．２．Ｔ細胞操作。

Ｔ細胞を単離し、実施例２のように調製した。ＬＮＰを、概して、実施例１に記載されるように、５０／９／３９．５／１．５の脂質Ａ、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧの比で調製した。ＬＮＰは、Ｃａｓ９（配列番号６）をコードするｍＲＮＡ及びＴＲＡＣを標的とするｓｇＲＮＡ　Ｇ０１３００６（配列番号７０８）、又はＣａｓ９　ｍＲＮＡ及びＴＲＢＣを標的とするｓｇＲＮＡ　Ｇ０１６２３９（配列番号７０７）のいずれかを含有した。以下の修飾を用いて、実施例２のようにＴ細胞のＬＮＰ処理を実施した。活性化から４８時間後、Ｔ細胞を洗浄し、表２に記載されるような培地番号７に懸濁した。ｇＲＮＡ対ｍＲＮＡの１：２重量比にて、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びＴＲＡＣ又はＴＲＢＣを標的とするｓｇＲＮＡを含有するＬＮＰを、１μｇ／ｍＬの最終濃度の組換えヒトＡｐｏＥ３（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ番号３５０－０２）に補充した、表２に記載されるような培地番号１において、３７℃で１５分間、一緒にインキュベートした（各々、５μｇ／ｍＬ）。事前インキュベートしたＬＮＰ混合物を各ウェルに添加して、ＬＮＰ当たり２．５μｇ／ｍＬ及び０．５×１０ｅ６細胞／ｍＬのＴ細胞の最終濃度を得た。ＡＡＶ６を使用して、ＴＲＡＣ遺伝子座への部位特異的組み込みのための、ホモロジーアームに各々隣接するｔｇＴＣＲ（配列番号９）又はＧＦＰ（Ｖｉｇｅｎｅ、配列番号８）を標的とするＷＴ１のいずれかをコードする相同性指向修復テンプレート（ＨＤＲＴ）を送達した。

【０４５９】

処理及び増殖後、Ｔ細胞を採取し、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ４５ＲＯ、及びＣＤ２７を標的とする抗体を使用して、実施例２に記載されるようにフローサイトメトリーによりアッセイした。Ｔ細胞をＣｒｙｏＳｔｏｒｅ（登録商標）ＣＳ１０培地に保存した。表１８及び図１６は、操作されたＴ細胞のｔｇＴＣＲ挿入率を示す。表１９及び図１７は、処理後の内因性ＴＣＲを保持するＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージを示す。表２０及び図１８は、メモリ細胞表現型と関連する表現型である、ＣＤ４５ＲＯ＋ＣＤ２７＋である操作されたＴ細胞のパーセンテージを示す。

【表２２】

表１８．ＣＤ８＋Ｔ細胞へのトランスジェニックＴＣＲ挿入

Ｔ細胞	EP	LNP
CD3+Vb8+%	78.2	53.1
CD3-Vb8+%	2.38	2.36
CD3-Vb8-%	15.7	43.4
CD3+Vb8-%	3.87	1.16

【表２３】

表１９．内因性ＴＣＲの保持

Ｔ細胞	EP	LNP
CD3+GFP+%	0.68	0.26
CD3-GFP+%	86.2	48.9
CD3-GFP-%	10.6	50.0
CD3+GFP-%	2.58	0.85

【表２４】

表２０．メモリ表現型ＣＤ８＋Ｔ細胞

CD8+T 細胞	EP	LNP
CD45RO+CD27+%	21.4	13.6
CD45RO-CD27+%	58.9	77.5
CD54RO-CD27-%	7.34	4.71
CD45RO+CD27-%	12.4	4.17

【０４６０】

実施例４．３．操作されたＴ細胞のインビボでの有効性

Ｔａｃｏｎｉｃ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓから入手した４つのヒト化免疫不全マウス株を、６９７細胞：ＮＯＧ－ｈ ＩＬ－２（モデル番号：１３４４０－Ｆ）、ＮＯＧ－ＩＬ－１５（モデル番号：１３６８３－Ｆ）、ＮＯＧ（モデル番号：ＮＯＧ－Ｆ）、及びＮＯＧ－ＥＸＬ（モデル番号：１３３９５－Ｆ）を用いて移植した。２００ｒａｄの亜致死的照射から２４時間後、マウスを、０．２×１０ｅ６ ６９７－Ｌｕｃ２白血病細胞により静脈内接種した。マウスを加熱ランプ下で３～５分間温め、ＨＢＳＳ（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号１４０２５－０９２）に懸濁させたヒト白血病細胞を尾静脈を介して静脈内移植した。白血病接種から２日後、マウスを、尾静脈可視化のために加熱ランプ下で３～５分間温めた後、１５×１０ｅ６ＴＣＲ＋Ｔ細胞により尾静脈を介して静脈内接種した。

【０４６１】

処置したマウスは、インビボ生物発光イメージングを行い、実験を通じて週に２回体重モニタリングを行った。イメージング手順中に、マウスを、吸入イソフルラン（２％）により麻酔した。ルシフェラーゼベースの生物発光イメージングを、ＩＶＩＳスペクトルシステムを用いて実施した。リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）に溶解させた１５０ｍｇ／ｋｇのＤ－ルシフェリン（Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ、パート番号１２２７９９）の腹腔内注射後に、動物をイメージングした。動物を、カメラを自動露光に設定して、注入から５分後にイメージングした。イメージを撮影し、Ｌｉｖｉｎｇ Ｉｍａｇｅ取得及び分析ソフトエア（ｃａｌｉｐｅｒ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｈｏｐｋｉｎｔｏｎ，ＭＡ）を使用して生物発光シグナルを記録した。光子（ｐ）／秒（ｓ）で測定された総フラックス値を決定するために、各マウスに同一の関心領域（ＲＯＩ）を描画した。動物を週３回臨床モニタリングし、白血病の播種及び臨床症状発現（体重減少＞１８％、後肢麻痺）により安楽死させた。疾患の進行により、体重が減少した。

【０４６２】

表２１は、全ての試料の全ての液体腫瘍負荷の尺度としての平均生物発光を示し、図１９は、ＮＯＧ－ｈＩＬ－２マウスの生物発光を示す。表２２は、全ての試料のＴ細胞処置マウスの生存パーセントを示し、図２０は、ＮＯＧ－ｈＩＬ－２マウスの生存パーセントを示す。

【表２５】

表２１．生物発光

		平均生物発光(腫瘍負荷)							
		WT1-tgTCR				GFP 対照 T 細胞			
		NOG-h IL-2	NOG-h IL-15	NOG	NOG-EXL	NOG-h IL-2	NOG-h IL-15	NOG	NOG-EXL
	N	7	7	7	5	7	7	7	5
全ての接種後の日数	1	2.03E+06	2.23E+06	1.48E+06	1.84E+06	2.59E+06	1.55E+06	1.56E+06	2.12E+06
	6	1.12E+06	1.10E+06	1.21E+06	1.00E+06	3.68E+07	3.89E+07	6.40E+07	1.30E+07
	9	1.26E+06	1.23E+06	1.82E+06	1.22E+06	2.21E+08	2.31E+08	5.58E+08	3.96E+08
	14	1.43E+06	1.71E+06	2.40E+07	5.42E+06	1.45E+10	1.26E+10	6.20E+09	8.19E+09
	16	1.12E+06	2.24E+06	4.76E+07	6.94E+06	1.44E+10	2.41E+10	2.92E+10	3.08E+10
	21	2.00E+06	3.20E+07	6.67E+08	3.46E+08	3.76E+10	3.28E+10		
	24	4.74E+06	8.19E+06	2.41E+09	1.34E+09				

【表２６】

表２２．Ｔ細胞処置マウスの生存パーセント

		EF1a-HD1				GFP-KO			
		NOG-h IL-2	NOG-h IL-15	NOG	NOG-EXL	NOG-h IL-2	NOG-h IL-15	NOG	NOG-EXL
N		7	7	7	5	7	7	7	5
全ての接種後の日	0	100	100	100	100	100	100	100	100
	2	100	100	100	100	100	100	100	100
	6	100	100	100	100	100	100	100	100
	9	100	71	100	100	100	100	100	100
	14	100	71	100	100	100	100	100	100
	16	86	71	100	100	86	86	43	100
	20	86	71	100	100	57	86	43	0
	21	86	71	100	100	14	14	0	
	24	86	71	100	100	0	0		
	27	86	71	100	100				

【０４６３】

実施例５．Ｔ細胞におけるＬＮＰ用量応答研究

Ｔ細胞を、商業的に入手した（例えば、ヒト末梢血ＣＤ４$^+$ＣＤ４５ＲＡ$^+$Ｔ細胞、凍結、Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ７００２９）か、又はレウコ

パクから内部的に調製した。内部調製では、Ｔ細胞を、製造者のプロトコルに従ってＥａｓｙＳｅｐヒトＴ細胞単離キット（Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ１７９５１）を使用して、陰性選択によって単離した。Ｔ細胞を、将来的な使用のために、Ｃｒｙｏｓｔｏｒ ＣＳ１０凍結培地（カタログ０７９３０）において凍結保存した。単離されたＴ細胞を、表２に記載されるような培地番号１１において解凍した。解凍時に、細胞を、３：１比のＣＤ３／ＣＤ２８ビーズ（Ｄｙｎａｂｅａｄｓ、Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）の添加によって活性化し、ＬＮＰ添加前に３７℃で４８時間培養した。

【０４６４】

活性化後、Ｃａｓ９ ｍＲＮＡ、並びにそれぞれＢ２Ｍ及びＴＲＡＣを標的とするｓｇＲＮＡ Ｇ０００５２９（配列番号７０１）及びＧ０１２０８６（配列番号７０３）を送達するＬＮＰを、Ｔ細胞に送達した。

【０４６５】

この実施例では、約４．５のカチオン性脂質アミン対ＲＮＡホスフェート（Ｎ：Ｐ）モル比により、ＬＮＰを製剤化した。脂質ナノ粒子成分を、以下のモル比で、１００％エタノール中で希釈した：４５ｍｏｌ％（１２．７ｍＭ）のカチオン性脂質（例えば、（９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ－９，１２－ジエノエート、別には３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエノエートとも称され、本明細書において脂質Ａと称される）；４４ｍｏｌ％（１２．４ｍＭ）のヘルパー脂質（例えば、コレステロール）；９ｍｏｌ％（２．５３ｍＭ）の中性脂質（例えば、ＤＳＰＣ）；及び２ｍｏｌ％（．５６３ｍＭ）のＰＥＧ（例えば、ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧ）。ＲＮＡカーゴを２５ｍＭのクエン酸ナトリウム、１００ｍＭのＮａＣｌ中、ｐＨ５で調製し、およそ０．４５ｍｇ／ｍｌのＲＮＡカーゴ濃度を得た。Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｎａｎｏｓｙｓｔｅｍｓ ＮａｎｏＡｓｓｅｍｂｌｒ（商標）Ｂｅｎｃｈｔｏｐ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔを使用し、製造者のプロトコルに従って、脂質及びＲＮＡ溶液をマイクロ流体混合することによって、ＬＮＰを形成した。製剤を、ＰＤ－１０脱塩カラム（ＧＥ）を使用して、５０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ、４５ｍＭのＮａＣｌ、５％（ｗ／ｖ）のスクロースｐＨ７．５（ＴＳＳ）に緩衝液を交換し、０．２ｕｍの膜フィルタを通して濾過した。

【０４６６】

ＬＮＰを、６％（ｖ／ｖ）においてＭ．ｆａｓｃｉｃｕｌａｒｉｓ（カニクイザル）血清（ＢｉｏＲｅｃｌａｍａｔｉｏｎＩＶＴ、ＣＹＮ１９７４５２）とともに、３７℃で約５分間事前インキュベートした。事前インキュベートしたＬＮＰを、表２３及び表２４に示されるように、種々の量の総ＲＮＡカーゴでＴ細胞に添加した。ＬＮＰ曝露から２４時間後、細胞を洗浄し、２４ウェルプレートに移入した。ＬＮＰトランスフェクションから５日後、フローサイトメトリー分析及びＮＧＳシークエンシングのために細胞を収集した。実施例１に記載されるように、ＰＣＲ及びその後のＮＧＳ分析にＤＮＡ試料を供した。

【０４６７】

実施例５．１．フローサイトメトリー分析

フローサイトメトリー分析のために、細胞を、ＦＡＣＳ緩衝液（ＰＢＳ＋２％ ＦＢＳ＋２ｍＭ ＥＤＴＡ）中で洗浄した。次いで、細胞を、ヒトＴｒｕＳｔａｉｎ ＦｃＸ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ（登録商標）、カタログ４２２３０２）により室温（ＲＴ）で５分間ブロックし、１：２００希釈において、ＡＰＣコンジュゲート抗ヒトＢ２Ｍ抗体（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ（登録商標）、３１６３１２）又はＰＥコンジュゲートＴＲＡＣ抗体（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ（登録商標）、カタログ３０４１２０）とともに、４℃で３０分間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を洗浄し、生死マーカー７ＡＡＤ（１：１０００希釈、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ（登録商標）、４２０４０４）を含有する緩衝液に再懸濁した。細胞を、例えば、Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ ＣｙｔｏｆｌｅｘＳを使用し

てフローサイトメトリーにより処理し、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアパッケージを使用して分析した。表２３及び図２１Ａ～Ｂは、各ＬＮＰ用量におけるＢ２Ｍ陰性細胞のパーセンテージ及び編集パーセントを示す。表２４及び図２２Ａ～Ｂは、各ＬＮＰ用量におけるＴＲＡＣ陰性細胞のパーセンテージ及び編集パーセントを示す。

【表２７】

表２３．Ｂ２Ｍ編集の用量応答研究

LNP 用量(ng 総 RNA)	平均編集%	SD	平均 B2M 陰性%	SD	N
10	23.1	2.6	8.1	1.3	3
25	54.5	3.0	35.3	2.4	3
50	83.0	0.9	72.4	1.5	3
75	93.4	1.3	86.0	2.0	3
100	95.5	0.2	89.2	0.1	3
125	97.6	0.3	92.0	0.6	3
150	98.4	0.2	93.0	0.3	3
175	98.5	0.6	93.1	0.4	3
200	99.1	0.1	93.9	0.2	3

【表２８】

表２４．ＴＲＡＣ編集の用量応答研究

LNP 用量 (ng 総 RNA)	平均編集%	SD	N	平均 TRAC 陰性%	SD	N
10	23.1	2.6	3	7.7	0.2	3
25	54.5	3.0	3	18.6	2.0	2
50	83.0	0.9	3	44.1	9.9	3
75	93.4	1.3	3	51.6	8.7	3
100	95.5	0.2	3	68.6	2.8	3
125	97.6	0.3	3	69.3	1.3	3
150	98.4	0.2	3	75.2	1.8	3
175	98.5	0.6	3	81.5	2.3	3
200	99.1	0.1	3	85.4	2.3	3

【０４６８】

実施例６．遺伝子編集後の染色体転座のための方向性ゲノムハイブリダイゼーション分析。

Ｃａｓ９ ｍＲＮＡ及びガイドを送達するためのエレクトロポレーション又は脂質ナノ粒子を用いて処理したＴ細胞を、ＫｒｏｍａＴｉＤ（Ｌｏｎｇｍｏｎｔ，ＣＯ）による方向性ゲノムハイブリダイゼーション（ｄＧＨ（商標））による転座を含む染色体構造の変動について分析した。

【０４６９】

実施例６．１．エレクトロポレーション処理

エレクトロポレーション処理のために、Ｔ細胞を、実施例５のように単離し、凍結保存した。凍結保存されたＴ細胞を解凍し、表２に記載されるような培地番号１において一晩静置させた。

【０４７０】
静置させたＴ細胞をエレクトロポレーションして、それぞれＣＩＩＴＡ及びＢ２Ｍ遺伝子を標的とする、ガイドＧ０１３６７４（配列番号７０２）又はＧ０００５２９（配列番号７０１）を含有するリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体を送達した。簡潔に述べると、４０μＭのｓｇＲＮＡとの、２０μＭのＣａｓ９（１：２のＣａｓ９タンパク質対ガイド比）の最終濃度まで、組換えＣａｓ９－ＮＬＳタンパク質（５０μＭストック）をｓｇＲＮＡ（１００μＭ）とともにインキュベートすることによって、ストックＲＮＰを調製した。培養されたＴ細胞を、１００μＬの緩衝液Ｐ３（Ｌｏｎｚａ、カタログＶ４ＳＰ－３９６０）中に再懸濁された１０ｅ６細胞において採取し、各々２μＭの最終濃度まで１２．５μＬのＲＮＰとともにインキュベートした。その後、Ｌｏｎｚａ　４Ｄヌクレオフェクター５を使用してＴ細胞をエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションされた細胞を収集し、表２に記載されるような培地番号１において４８時間静置させた。その後、Ｔ細胞を採取し、表２に記載されるような培地番号１において１×１０ｅ６細胞／ｍＬの密度に再懸濁し、１／１００希釈でＴ細胞ＴｒａｎｓＡｃｔ試薬（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ、カタログ１３０－１１１－１６０）により活性化した。Ｔ細胞活性化から４８時間後、Ｔ細胞を、上記のように、ＴＲＡＣを標的とするＧ０１２０８６（配列番号７０３）を含むＣａｓ９－ＲＮＰによりエレクトロポレーションした。三重編集されたＴ細胞を、表２に記載されるような培地番号１に移入して戻し、将来の分析のために拡大した。

【０４７１】
拡大後、細胞を、製造者のプロトコルに従って、ＭＨＣクラスＩ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ、カタログ１３０－１２０－４３１）、ＭＨＣクラスＩＩ （Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ、１３０－１０４－８２３）、及びＣＤ３－ビオチン（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ、カタログ１３０－０９８－６１２）の抗ビオチンマイクロビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ、カタログ１３０－０９０－４８５）プロトコルを使用して、三重ノックアウト細胞を選択するための磁気活性化細胞選別（Ｍａｇｎｅｔｉｃ－Ａｃｔｉｖａｔｅｄ Ｃｅｌｌ Ｓｏｒｔｉｎｇ、ＭＡＣＳ）枯渇プロセスに通した。陰性に選択された細胞を、フローサイトメトリー分析及びＮＧＳ分析のために収集した。これらの分析では、実施例５に記載されるプロトコルを使用した。

【０４７２】
実施例６．２．逐次かつ同時ＬＮＰ処理
ＬＮＰ処理のために、Ｔ細胞を、実施例５のように単離し、凍結保存した。解凍時に、Ｔ細胞を、製造者のプロトコルによって推奨されるようにＴ細胞ＴｒａｎｓＡｃｔ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ、カタログ１３０－１１１－１６０）により活性化し、以下に指定されるように、３７℃で２４～７２時間培養した。

【０４７３】
同時ＬＮＰ処理では、Ｔ細胞を、Ｃａｓ９ ｍＲＮＡ、並びにそれぞれＢ２Ｍ、ＴＲＡＣ、及びＣＩＩＴＡを標的とするｓｇＲＮＡ Ｇ０００５２９（配列番号７０１）、Ｇ０１２０８６（配列番号７０３）、及びＧ０１３６７４（配列番号７０２）を送達する３つのＬＮＰを用いて、活性化の７２時間後に処理した。ＬＮＰを、実施例１に記載されるように、本明細書では脂質Ｂと称されるイオン化脂質ノニル８－（（８，８－ビス（オクチルオキシ）オクチル）（２－ヒドロキシエチル）アミノ）オクタノエートとともに、５０／１０／３８．５／１．５のイオン化脂質、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧの比で製剤化した。ＬＮＰを、６％のカニクイザル血清において３７℃で５分間事前インキュベートし、１００，０００Ｔ細胞当たり１００ｎｇの総ＲＮＡカーゴで投薬した。ＬＮＰ曝露から２４時間後、細胞を洗浄し、表２に記載されるような培地番号１１に再懸濁し、３７℃で５日間培養した。

【０４７４】
逐次ＬＮＰ処理では、Ｔ細胞を、上記の同時ＬＮＰ処理について記載されるように、Ｃａｓ９ ｍＲＮＡ及びＢ２Ｍを標的とするＧ０００５２９（配列番号７０１）を送達する単一のＬＮＰを用いて、活性化の２４時間後に処理した。洗浄及び再懸濁後、Ｃａｓ９

ｍＲＮＡ及びＣＩＩＴＡを標的とするＧ０１３６７４（配列番号７０２）を送達する単一のＬＮＰを、活性化の４８時間後に添加した。最後に、洗浄及び再懸濁の後、Ｃａｓ９ｍＲＮＡ及びＴＲＡＣを標的とするＧ０１２０８６（配列番号７０３）を送達する単一のＬＮＰを、活性化の７２時間後に添加した。最後のＬＮＰへの曝露から２４時間後、細胞を洗浄し、表２に記載されるような培地番号１１に再懸濁し、３７℃で５日間培養した。

【０４７５】

ＬＮＰにより処理されたＴ細胞を、ＭＡＣＳの三重の陰性選択プロセスに通し、更なるフローサイトメトリー分析及びＮＧＳ分析を、上記のエレクトロポレーションにより処理された細胞について記載されているように、これらの試料に対して実施した。

【０４７６】

ＭＡＣＳ処理の前後の両方で実施例５に記載されるように、処理及び未処理細胞を、ＮＧＳによる編集パーセント及びフローサイトメトリーによるタンパク質発現についてアッセイした。以下のフローサイトメトリー試薬を、それぞれ、Ｂ２Ｍ、ＣＩＩＴＡ及びＴＲＡＣの遺伝子編集の表現型読み出しとして使用した。ＦＩＴＣ抗ヒトβ２－マイクログロブリン抗体（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ（登録商標）、カタログ３１６３０４）、ＡＰＣ抗ヒトＣＤ３抗体（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ（登録商標）、カタログ３００４１２）、ＰＥ抗ヒトＨＬＡ－ＤＲ、ＤＰ、ＤＱ抗体（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ（登録商標）、カタログ３６１７１６）。ＮＧＳ編集の結果を表２５及び図２３Ａ～Ｂに示す。フローサイトメトリーの結果を表２６及び図２４Ａ～Ｂに示す。ヒトＭＨＣクラスＩＩタンパク質（例えば、ＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－ＤＰ、及びＨＬＡ－ＤＲ）の低減された発現は、ＣＩＩＴＡ遺伝子の編集を示す。ＣＩＩＴＡは、ＭＨＣクラスＩＩ分子の転写調節因子である。

【表２９】

表２５．ＮＧＳによる編集分析

条件	B2M 編集%		CIITA 編集%		TRAC 編集%	
MACS	処置前	処理後	処置前	処理後	処置前	処理後
未処理	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1
同時 LNP	97.3	99.3	96.5	98.2	97.3	98.6
逐次 LNP	97.0	99.4	99.6	99.8	98.2	98.5
RNP　EP	98.0	99.1	98.7	99.4	96.7	99.4

【表３０】

表２６．フローサイトメトリー分析

条件	B2M 陰性%		HLA-DR-DP-DQ 陰性%		CD3 陰性%	
MACS	処置前	処理後	処置前	処理後	処置前	処理後
未処理	0.2	0.2	29.4	32.8	0.3	0.2
同時 LNP	87.9	98.4	56.5	95.0	91.7	98.3
逐次 LNP	93.2	97.6	67.0	91.8	89.0	97.6
RNP　EP	85.4	99.9	59.6	89.4	93.1	100

【０４７７】

実施例６．３．染色体構造再構成のためのＫｒｏｍａｔｉｄ　ｄＧＨ（商標）分析

ＫｒｏｍａＴｉＤのプロトコルに従って、ｄＧＨ手順のために、操作されたＴ細胞を調製した。簡潔に述べると、Ｔ細胞を、ＫｒｏｍａＴｉＤにより提供される５μＭのＢｒｄＵ及び１μＭのＢｒｄＣの添加により、１７時間培養した。コルセミドを更に４時間、１０μｌ／ｍｌの濃度で添加した。細胞を遠心分離によって採取し、７５ｍＭのＫＣｌ低張

溶液中で、室温で３０分間インキュベートし、３：１のメタノール対酢酸溶液中で固定した。

【０４７８】

別々の染色体上に位置する、これらのＴ細胞を操作するために使用されるガイドのゲノム標的部位をブラケットするように、３つのセットの系中での蛍光ハイブリダイゼーション（ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ ｉｎ ｓｉｔｕ ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ、ＦＩＳＨ）プローブを設計した。ＫｒｏｍａＴｉＤは、その独自のｄＧＨ ＦＩＳＨを使用して試料当たり２００の中期スプレッドをイメージングし、染色体構造再構成のスプレッドをスコア化した。染色体構造再構成を有さない細胞は、３つの一致した色の隣接する一対のＦＩＳＨシグナルを示した。「欠失」は、標的部位のゼロＦＩＳＨシグナルが細胞内で同定されたときにスコア化され、編集事象が発生したために細胞複製サイクル中にフラグメントが失われた染色体再構成を示す。「相互転座」は、隣接する色不一致ＦＩＳＨシグナルの各対についてスコア化され、２つのＣａｓ９標的切断間（例えば、Ｂ２Ｍ標的部位とＴＲＡＣ標的部位との間）の転座を示す。「オフターゲット染色体への転座」は、単一のＦＩＳＨシグナルを示し、Ｃａｓ９標的切断部位と非標識染色体部位との間の融合を示した。「複合転座」は、相互転座及びオフターゲット部位への転座に含まれないＦＩＳＨシグナルを示す。全転座は、相互転座、ゲノム内のオフターゲット染色体／部位への転座、及び複合転座の合計として計算した。表２７及び図２５は、各条件についてこの方法によって同定された染色体再構成を示す。

【表３１】

表２７．Ｋｒｏｍａｔｉｄ ｄＧＨアッセイによる転座分析

染色体再構成事象:	未処理	逐次 LNP	同時 LNP	RNP EP
全転座	1	0	7	13
相互転位	0	0	2	3
オフターゲット染色体への転座	1	0	3	9
複合転座	0	0	2	1
欠失	0	8	6	30

【０４７９】

実施例７．異なるイオン化脂質製剤によるＴ細胞へのＬＮＰ送達

異なるイオン化脂質とともに製剤化されたＬＮＰを、Ｔ細胞送達の有効性について試験した。Ｔ細胞を調製し、解凍し、実施例５のように活性化した。活性化から４８時間後、Ｔ細胞を、Ｃａｓ９ ｍＲＮＡ及びＢ２Ｍを標的とするｇＲＮＡ Ｇ０００５２９（配列番号７０１）を送達するＬＮＰを用いて処理した。ＬＮＰを、一般に実施例１のように調製した。脂質Ａ製剤を、５０／９／３８／３のイオン化脂質Ａ、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧの比で調製した。脂質Ｂ組成物を、５０／１０／３８．５／１．５のイオン化脂質ノニル８－（（８，８－ビス（オクチルオキシ）オクチル）（２－ヒドロキシエチル）アミノ）オクタノエート、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧの比で製剤化した。ＬＮＰを、３％の最終（ｖ／ｖ）においてＭ．ｆａｓｃｉｃｕｌａｒｉｓ（カニクイザル）血清（ＢｉｏｒｅｃｌａｍａｔｉｏｎＩＶＴ、ＣＹＮ１９７４５２）とともに、３７℃で約５分間事前インキュベートした。事前インキュベートしたＬＮＰを、表２８に示されるような総ＲＮＡカーゴの量でＴ細胞に添加した。ＬＮＰ曝露から２４時間後、細胞を洗浄し、２４ウェルプレートに移入した。ＬＮＰ処理から５日後、細胞を収集し、ＮＧＳ分析を、実施例１に記載されるように実施した。効率的な編集は、図２６及び表２８に示されるように、脂質Ａと脂質Ｂとの両方により製剤化された

ＬＮＰを使用して明らかであった。

【表３２】

表２８．ＮＧＳによる用量応答研究の平均編集パーセンテージ

試料	用量(ng 総 RNA)	平均編集%	SD	N
細胞のみ	0	0.1	0.1	3
血清のみ	0	0.2	0.1	3
脂質 A	25	71.1	3.5	3
	50	84.7	0.9	2
	100	94.4	0.2	3
	200	98.6	0.6	3
脂質 B	25	56.4	4.1	3
	50	73.6	6.6	2
	100	87.9	0.2	3
	200	94.9	0.4	3

【０４８０】

実施例８．ＬＮＰ操作Ｔ細胞の編集の動態

ＬＮＰ操作Ｔ細胞における最大編集のための最小ＬＮＰ曝露時間を決定するために、ＬＮＰ接触後の異なる時間点でのインデル率パーセントを決定した。

【０４８１】

ＣＤ３＋Ｔ細胞を調製し、解凍し、実施例５に記載されるように活性化した。活性化後、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びＢ２Ｍを標的とするｓｇＲＮＡ　Ｇ０００５２９（配列番号７０１）を送達するＬＮＰを、Ｔ細胞に送達した。ＬＮＰを、一般に実施例１のように調製した。脂質Ａ　ＬＮＰを、５０／９／３８／３のイオン化脂質、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧの比で調製した。脂質Ｂ　ＬＮＰを、５０／１０／３８．５／１．５のイオン化脂質Ｂ、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧの比で製剤化した。ＬＮＰを、６％のカニクイザル（ｃｙｎｏ）血清（ｖ／ｖ）とともに、３７℃で６０分間事前インキュベートした。事前インキュベートしたＬＮＰを、５０ナノグラムの総ＲＮＡカーゴでＴ細胞に対して投与した。表３１に示されるように、ＬＮＰ接触後の時間点で、Ｔ細胞のうちの２５０μＬを収集し、実施例１に記載されるようにＮＧＳにより分析した。各時間点での編集結果を、表２９及び図２７に示す。

【表３３】

表２９．編集の動態研究のＮＧＳ編集データ

試料	LNP 添加からの時間(時)	平均編集%	SD	N
脂質 A	10	27.5	1.0	3
	13	49.0	2.5	3
	24	80.3	1.2	3
	29	82.5	1.1	3
	45	87.0	2.0	3
	53	88.8	0.4	3
	70	89.9	0.3	3
	77	90.1	0.5	3
	85	90.3	0.2	3
	101	90.9	0.6	3
脂質 B	10	30.6	1.5	3
	13	47.8	4.3	3
	24	81.4	1.1	3
	29	81.6	2.5	3
	45	88.2	0.5	3
	53	90.7	0.7	3
	70	90.9	0.4	3
	77	91.0	0.3	3
	85	91.3	0.2	3
	101	91.4	1.1	3

【０４８２】

実施例９．種々の血清因子供給源を有するＴ細胞へのＬＮＰ送達

Ｔ細胞を、種々の供給源の血清又は組換えＡｐｏＥアイソフォームとともに事前インキュベートされたＬＮＰにより操作した。ヒト血清、ｃｙｎｏ血清、並びにＡｐｏＥアイソフォームのＡｐｏＥ２、ＡｐｏＥ３、及びＡｐｏＥ４を使用して、８点用量応答アッセイとして研究を実施した。Ｔ細胞を、実施例５のように調製し、凍結保存した。表２に記載されるような培地番号１における解凍時に、Ｔ細胞を、編集前にＴｒａｎｓＡｃｔ（１：１００希釈、Ｍｉｌｔｅｎｉ　Ｂｉｏｔｅｃ、カタログ番号１３０－１１１－１６０）により４８時間活性化した。

【０４８３】

活性化後、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ、並びにＴＲＡＣ（Ｇ０１３００６、配列番号７０８）を標的とするｓｇＲＮＡを送達するＬＮＰを、Ｔ細胞に送達した。ＬＮＰを、ｇＲＮＡ対ｍＲＮＡの１：２重量比により、実施例１に記載のように製剤化した。ＬＮＰを、表３０に記載されるように、異なるＡｐｏＥアイソフォームのＡｐｏＥ２（Ｂｉｏｖｉｓｉｏｎ、カタログ番号４７６０）、ＡｐｏＥ３（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ、カタログ番号４１４４－ＡＥ－５００）、及びＡｐｏＥ４（Ｎｏｖｕｓ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ、カタログ番号ＮＢＰ１－９９６３４）とともに、３７℃で約５分間事前インキュベートした。事前インキュベートしたＬＮＰを、１００ｎｇの総ＲＮＡカーゴでＴ細胞に添加した。ＬＮＰトランスフェクションから５日後、実施例５に記載されるようなフローサイトメトリー分

析のために、細胞を収集した。結果を図２８及び表３０に示す。ＭＨＣクラスＩタンパク質（例えば、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、及びＨＬＡ－Ｃ）の低減された発現は、Ｂ２Ｍ遺伝子の編集を示す。Ｂ２Ｍタンパク質は、ＭＨＣクラスＩタンパク質の構成要素であり、したがって、Ｂ２Ｍがノックアウトされた場合、ＭＨＣクラスＩタンパク質は検出されない。

【表３４】

表３０．異なる用量のＡｐｏＥアイソフォームにおける平均ＣＤ３　ＫＯ％

試料	用量(μg/mL)	平均CD3陰性細胞%	標準偏差
6%のcyno血清	n/a	82.46	0.74
未処理	0	0.00	0.00
ApoE2	1	0.70	0.16
	0.5	0.72	0.09
	0.25	0.98	0.20
	0.125	1.30	0.25
	0.0625	2.69	0.23
	0.0312	0.81	0.18
	0.015	1.26	0.03
	0.007	1.97	0.59
ApoE3	1	61.87	0.38
	0.5	56.33	1.19
	0.25	67.80	0.28
	0.125	70.50	0.29
	0.0625	70.83	2.36
	0.0312	71.77	4.37
	0.015	67.90	4.68
	0.007	69.47	4.01
ApoE4	1	47.40	1.31
	0.5	66.23	0.49
	0.25	67.50	0.86
	0.125	69.03	1.10
	0.0625	72.53	0.87
	0.0312	73.73	0.59
	0.015	64.93	3.14
	0.007	60.30	2.12

【０４８４】

実施例１０．Ｔ細胞へのリポフェクション送達のための、種々の濃度の血清を用いるリポプレックス処理

Ｔ細胞への高効率リポプレックス送達の条件を決定するために、シングルガイドＲＮＡ

とともにＳｐｙＣａｓ９をコードするｍＲＮＡを、リポフェクション試薬を使用することにより送達した。

【０４８５】

実施例１０．１．細胞培養

健康なヒトドナーＰＢＭＣ又はレウコパクを商業的（Ｈｅｍａｃａｒｅ）に入手し、Ｔ細胞を、ＭｕｌｔｉＭＡＣＳ（商標）Ｃｅｌｌ２４ Ｓｅｐａｒａｔｏｒ Ｐｌｕｓ装置の製造者のプロトコルに従って、ＳｔｒａｉｇｈｔＦｒｏｍ（登録商標）Ｌｅｕｋｏｐａｋ（登録商標）ＣＤ４／ＣＤ８ ＭｉｃｒｏＢｅａｄｓ（Ｍｉｌｔｅｎｉ Ｂｉｏｔｅｃ、カタログ番号１３０－１２２－３５２）を使用して、ＣＤ４／ＣＤ８の陽性選択によって単離した。Ｔ細胞をバイアルに等分し、将来的な使用のためにＣｒｙｏｓｔｏｒ ＣＳ１０凍結培地（カタログ番号０７９３０）に凍結保存した。その後、実験のために必要に応じてバイアルを解凍した。次いで、これらのＴ細胞を水浴中で解凍し、表２に記載されるような、予熱した培地番号５の１０ｍＬに移入した。解凍時に、Ｔ細胞を、表２に記載されるような培地番号１において、１：１００希釈のＴｒａｎｓＡｃｔ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ、カタログ１３０－１１１－１６０）の添加によって活性化した。Ｔ細胞操作処理の前に、細胞を３７℃で４８時間活性化する。

【０４８６】

実施例１０．２．ヒトＴ細胞のリポフェクション

４８時間のＴ細胞培養後、Ｔ細胞を、リポプレックスを用いて生物学的複製にて処理した。リポフェクション試薬を、実施例１に記載されるように、５０／９／３８／３の脂質Ａ、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧの比で、脂質の混合物として調製した。Ｃａｓ９ｍＲＮＡ及びＢ２Ｍを標的とするｇＲＮＡ Ｇ０００５２９（配列番号７０１）をバルク混合することにより、リポフェクション試薬を組み合わせた。約６の脂質アミン対ＲＮＡホスフェートの（Ｎ：Ｐ）モル比、及び１：２のｍＲＮＡ対ｇＲＮＡのｗ／ｗ比で、材料を組み合わせた。得られるバルク混合リポプレックス材料（脂質キット）を、Ｔ細胞に添加する前に、表２に記載されるような培地番号１において、１２％、６％、３％又は０％のｃｙｎｏ血清（Ｂｉｏｒｅｃｌａｍａｔｉｏｎ ＩＶＴ、ＣＹＮ２２０７６０）とともに１５分間事前インキュベートした。

【０４８７】

Ｔ細胞を、１００，０００個のＴ細胞当たり２００ｎｇのガイドｓｇＲＮＡを有する、１００ｎｇのＣａｓ９ ｍＲＮＡの用量で生物学的複製中でリポプレックスを用いて処理した。Ｔ細胞を、リポプレックス接触の４８時間後に洗浄し、新鮮な完全なＴ細胞培地により置き換えた。リポフェクションから４日後、ＮＧＳシークエンシングのために細胞のうちの半分を収集し、１日後、フローサイトメトリー分析のために細胞のうちの他の半分を収集した。

【０４８８】

実施例１０．３．ヒトＴ細胞のＬＮＰ処理

トランスフェクション対照のために、Ｃａｓ９ ｍＲＮＡ及びｇＲＮＡ Ｇ０００５２９（配列番号７０１）を含有するＬＮＰ製剤を、１００，０００個の活性化されたＴ細胞に添加した。ＬＮＰを、６％（ｖ／ｖ）（Ｍ．ｆａｓｃｉｃｕｌａｒｉｓ（カニクイザル）血清、ＢｉｏＲｅｃｌａｍａｔｉｏｎＩＶＴ、ＣＹＮ２２０７６０）での非ヒト霊長類血清、及び表２に記載されるような培地番号１とともに、３７℃で約１５分間事前インキュベートした。事前インキュベートしたＬＮＰを、１００ｎｇの総ＲＮＡカーゴ（Ｃａｓ９ ｍＲＮＡ及びシングルガイドの１：２ｗ／ｗの比）でＴ細胞に添加した。細胞を、ＬＮＰ処理の４８時間後に洗浄し、表２に記載されるような培地番号１により置き換えた。ＬＮＰ処理から４日後、ＮＧＳシークエンシング分析のために細胞のうちの半分を収集した。

【０４８９】

実施例１０．４．ヒトＴ細胞のエレクトロポレーション

エレクトロポレーション対照のために、ＲＮＰを、１００，０００個の活性化されたＴ

細胞にエレクトロポレーションした。Ｂ２Ｍを標的とする熱変性ｇＲＮＡ　Ｇ０００５２９（配列番号７０１）とＣａｓ９タンパク質を２：１のガイド：Ｃａｓ９比で１５分間混合することにより、２０ｕＭのストック濃度でＲＮＰを形成した。活性化から４８時間後、Ｔ細胞を採取し、遠心分離し、Ｐ３エレクトロポレーション緩衝液（Ｌｏｎｚａ）中で１０×１０ｅ６Ｔ細胞／１００ｕＬの濃度で再懸濁した。細胞懸濁液をＲＮＰと混合して、２ｕＭの最終ＲＮＰ濃度を達成した後、Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒプレートに移入し、製造者のパルスコードを使用してエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションされたＴ細胞を、表２に記載されるような、１００ｕＬの培地番号１に直ちに静置させた。ＬＮＰ処理から４日後、ＮＧＳシークエンシング分析のために細胞のうちの半分を収集した。

【０４９０】

実施例１０．５．ＮＧＳ及びフローサイトメトリー

処理から４日後、Ｔ細胞を、ＮＧＳ分析のために溶解させ、これを、実施例１に記載されるように実施した。Ｔ細胞処理から５日後、Ｔ細胞をフローサイトメトリーによって表現型解析し、Ｂ２Ｍタンパク質ノックアウトを決定した。簡潔に述べると、Ｔ細胞を、Ｂ２Ｍを標的とする抗体（抗ヒトＢ２Ｍ抗体ＦＩＴＣ標識、カタログ番号３１６３０４、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ（登録商標））中でインキュベートした。その後、細胞を洗浄し、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアパッケージを使用してＣｙｔｏＦＬＥＸ　Ｓ装置（ＢｅｃｋｍａｎＣｏｕｌｔｅｒ）にて分析した。Ｔ細胞を、サイズ、Ｂ２Ｍ　ＦＩＴＣ発現にてゲーティングした。

【０４９１】

Ｂ２Ｍタンパク質ノックアウト頻度を表３１及び図２９に示し、Ｂ２Ｍインデル頻度を表３２及び図３０に示す。

【表３５】

表３１．１００ｎｇのＣａｓ９　ｍＲＮＡ及び２００ｎＭのｇＲＮＡを有する、脂質キット処理したＴ細胞によるＢ２Ｍタンパク質ノックアウト頻度。

血清条件	タンパク質(B2M)ノックアウト頻度	
	生物学的複製1	生物学的複製2
12%の cyno 血清	0.56	0.448
6%の cyno 血清	0.196	0.177
3%の cyno 血清	0.032	0.059
エレクトロポレーション対照	0.865	0.894
LNP 対照	0.92	0.931

【表３６】

表３２．１００ｎｇのＣａｓ９　ｍＲＮＡ及び２００ｎＭのｇＲＮＡを有する、脂質キット処理したＴ細胞によるＢ２Ｍインデル頻度

血清条件	B2M インデル頻度	
	生物学的複製1	生物学的複製2
12%の cyno 血清	0.663	0.568
6%の cyno 血清	0.293	0.234
3%の cyno 血清	0.033	0.092

【０４９２】
実施例１１．活性化されたＴ細胞及び非活性されたＴ細胞における編集効率
活性化されたＴ細胞と非活性されたＴ細胞との両方への高効率ＬＮＰ送達の条件を決定するために、ディープシークエンシングを使用して、Ｃａｓ９ ｍＲＮＡ及びｓｇＲＮＡの送達後のＴ細胞における編集効率をアッセイした。Ｔ細胞を、表３３に列挙される条件下で以下のように培養した。
【０４９３】
実施例１１．１．細胞培養
健康なヒトドナーＰＢＭＣ又はレウコパクを商業的（Ｈｅｍａｃａｒｅ）に入手し、Ｔ細胞を、ＭｕｌｔｉＭＡＣＳ（商標）Ｃｅｌｌ２４ Ｓｅｐａｒａｔｏｒ Ｐｌｕｓ装置の製造者のプロトコルに従って、ＳｔｒａｉｇｈｔＦｒｏｍ（登録商標）Ｌｅｕｋｏｐａｋ（登録商標）ＣＤ４／ＣＤ８ ＭｉｃｒｏＢｅａｄｓ（Ｍｉｌｔｅｎｉ、カタログ番号１３０－１２２－３５２）を使用して、ＣＤ４／ＣＤ８の陽性選択によって単離した。Ｔ細胞をバイアルに等分し、将来的な使用のためにＣｒｙｏｓｔｏｒ ＣＳ１０凍結培地（カタログ番号０７９３０）に凍結保存した。Ｔ細胞を、表２に記載されるような培地番号５において解凍した。
【０４９４】
解凍時に、Ｔ細胞を、１：１００希釈のＴｒａｎｓＡｃｔ（Ｍｉｌｔｅｎｙ Ｂｉｏｔｅｃｈ、カタログ番号１３０－１１１－１６０）の添加によって活性化させるか、又は表２に記載されるようなＴ細胞培地において非活性化させたままにした。Ｔ細胞を、ＬＮＰ処理の前に、３７Ｃで２４～４８時間培養した。
【０４９５】
実施例１１．２．ＬＮＰ処理及び培養培地のヒトＴ細胞への効果
初期の培養から２４時間後、Ｔ細胞を、Ｃａｓ９ ｍＲＮＡ及びＴＲＢＣを標的とするガイドＧ０１６２３９（配列番号７０７）を含有するＬＮＰを用いて処理した。ＬＮＰを、ｇＲＮＡ対ｍＲＮＡの１：２重量比により調製した。ＬＮＰを、細胞上で最終３％（ｖ／ｖ）の６％（ｖ／ｖ）（Ｍ．ｆａｓｃｉｃｕｌａｒｉｓ（カニクイザル）血清、ＢｉｏｒｅｃｌａｍａｔｉｏｎＩＶＴ、ＣＹＮ２２０７６０）における非ヒト霊長類血清とともに、３７℃で約５分間事前インキュベートした。
【０４９６】
事前インキュベートしたＬＮＰを、生物学的複製において１００ｎｇの総ＲＮＡカーゴの用量でＴ細胞に添加した。細胞を、それぞれのＴ細胞培地によるＬＮＰ処理の４８時間後に洗浄し、それぞれの新鮮なＴ細胞培地により置き換えた。ＬＮＰ処理から５日後、フローサイトメトリー分析及びＮＧＳシークエンシングのために細胞を収集した。表３３は、活性化されたＴ細胞におけるＴＲＢＣ１切断部位とＴＲＢＣ２切断部位との両方での編集後のインデル頻度の結果を示す。表３４は、非活性化されたＴ細胞におけるＴＲＢＣ１切断部位とＴＲＢＣ２切断部位との両方での編集後のインデル頻度の結果である。編集に対する培地組成物の効果を、図３１及び図３２に示す。

【表３７】

表３３．活性化されたＴ細胞のインデル%に対する培地組成物の効果

培地番号(表２に記載されている通り)	編集%			
	TRBC1		TRBC2	
	複製Ａ	複製Ｂ	複製Ａ	複製Ｂ
1	95.5	94.8	96.4	95.8
2	94.4	91.8	95	94.2
3	93.5	94.2	95.5	93.8
4	90.6	92	92.4	92.7
5	88.6	89.4	91	90.9
6	95.4	95.4	96.9	96.5
7	96.5	96.3	97.1	97.6
8	96.5	95.4	97.3	97.4
9	95.3	94.9	97.1	97.9
10	94.9	94.6	97.2	96.7
11	88.2	84.4	91.4	89.2
12	86	85.4	87	89.7
13	84.9	83.7	85.7	85.3
14	84.5	83.2	87.8	88.9
15	85	82.4	86.8	84.6
16	87.3	86.1	89.8	86.5
17	94.8	94.5	97.1	96.4

【表３８】
表３４．非活性化されたＴ細胞のインデル%に対する培地組成物の効果

培地番号(表２に記載されている通り)	編集%			
	TRBC1		TRBC2	
	複製A	複製B	複製A	複製B
1	73.4	76.5	73.7	72.3
2	37.6	39.5	32.1	36.1
3	60.8	64.8	63.3	66.5
4	21.3	13	19.1	19.4
5	15.3	25.3	18.8	14.9
6	55.7	58.1	62.2	63.2
7	89	87.1	86.7	86.8
8	81.2	82.9	82	84.6
9	81.1	85.7	77.9	86.7
10	68.1	67.8	75.4	75.3
11	11.1	12	17	17.2
12	43.3	44.8	63.4	63.7
13	31.7	26.2	56.2	56.4
14	52.4	63.5	55.3	60.3
15	2.2	3	4.1	5
16				85.1
17		86.7	71.8	69.1

【０４９７】
実施例１２．リンパ芽球様細胞株へのＬＮＰ送達
Ｂ２Ｍを標的とする脂質ナノ粒子を使用して、２つのリンパ芽球様細胞株（ＬＣＬ）を編集した。ＬＣＬは、ヒトドナーからの末梢血リンパ球（ＰＢＬ）にエプスタインバールウイルス（ＥＢＶ）を感染させることによって発生する。このプロセスは、ヒト静止Ｂ細胞をインビトロで不死化し、Ｂ細胞マーカーＣＤ１９に陽性、並びにＴ細胞マーカーＣＤ３及びＮＫ細胞マーカーＣＤ５６に陰性の活発に増殖するＢ細胞集団を生じることが実証されている（Ｎｅｉｔｚｅｌ Ｈ．Ａ ｒｏｕｔｉｎｅ ｍｅｔｈｏｄ ｆｏｒ ｔｈｅ ｅｓｔａｂｌｉｓｈｍｅｎｔ ｏｆ ｐｅｒｍａｎｅｎｔ ｇｒｏｗｉｎｇ ｌｙｍｐｈ ｏｂｌａｓｔｏｉｄ ｃｅｌｌ ｌｉｎｅｓ．Ｈｕｍ Ｇｅｎｅｔ．１９８６；７３（４）：３２０－６）。
【０４９８】
リンパ芽球様細胞株ＧＭ２６２００及びＧＭ２０３４０を、Ｃｏｒｉｅｌｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｆｏｒ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ（Ｃａｍｄｅｎ，ＮＪ，ＵＳＡ）から入手した。ＬＣＬを、Ｌ－グルタミン及び１５％のＦＢＳを用いてＲＰＭＩ－１６４０中で増殖させた。ＬＮＰ接触時に、細胞を、４ｎｇ／ｍｌのＩＬ－４（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍのカタログ番号２０４－ＩＬ－０１０）、１ｎｇ／ｍｌのＩＬ－４０（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍのカタログ番号６２４５－ＣＬ－０５０）、２５ｎｇ／ｍｌのＢＡＦＦ（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍのカタログ番号２１４９－ＢＦ－０１０）により活性化した。ＬＮＰを、実施例１に記載されるように、５０／１０／３８．５／１．５のイオン化脂質Ｂ（ノニル８－（（８，８－ビス（オクチルオキシ）オクチル）（２－ヒドロキシエチル）アミ

ノ）オクタノエート）、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧの比で製剤化した。Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びＢ２Ｍを標的とするｇＲＮＡ　Ｇ０００５２９（配列番号７０１）とともに製剤化されたＬＮＰを、実施例５に記載されるように６％のカニクイザル血清（ｖ／ｖ）とともに事前プレインキュベートし、表３５及び表３６に示される用量でリンパ芽球様細胞に送達した。２日ごとに培地を交換した。ＬＮＰ処理から６日後、ＮＧＳシークエンシングのために細胞のうちの半分を収集し、１日後、フローサイトメトリー分析のために細胞のうちの他の半分を収集した。ＮＧＳ分析を、実施例１のように実施した。抗ヒトＢ２Ｍ抗体（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ（カタログ番号３１６３１２）を使用して、実施例５のようにフローサイトメトリーを実施した。表３５及び図３３は、２つのＬＣＬにおけるＬＮＰによる編集を示す。表３６及び図３４は、ＬＮＰ処理後のＢ２Ｍ陰性細胞のパーセンテージを示す。

【表３９】

表３５．ＬＣＬにおけるＢ２Ｍ編集の用量応答研究

	GM26200			GM20340		
用量(ng 総 RNA)	平均編集%	SD	N	平均編集%	SD	N
未処理	0.0%	0.0%	3	0.0%	0.0%	3
300	75.0%	0.9%	3	70.4%	2.6%	3
200	67.6%	0.6%	2	46.1%	1.5%	3
100	50.3%	2.3%	3	44.6%	0.9%	3
50	34.5%	3.3%	3	21.8%	0.2%	3
25	21.1%	5.4%	3	21.3%	1.2%	3

【表４０】

表３６．ＬＣＬにおける編集後のＢ２Ｍタンパク質発現の用量応答研究

	GM26200			GM20340		
用量(ng 総 RNA)	平均 B2M 陰性%	SD	N	平均 B2M 陰性%	SD	N
未処理	2.4	1.0	3	2.4	1.0	3
300	55.4	3.1	3	53.7	2.4	3
200	45.5	1.2	3	35.3	2.7	3
100	29.5	3.1	3	31.4	1.2	3
50	16.8	3.2	3	43.0	9.2	3
25	15.1	9.5	3	33.3	8.9	3

【０４９９】

実施例１３．複数の挿入によるＴ細胞の操作

Ｔ細胞を最初に操作して、ＴＲＢＣ遺伝子座におけるタンパク質発現をノックアウトし、続いてＴＲＡＣ遺伝子座へのｔｇＴＣＲ及びＢ２Ｍ遺伝子座へのＧＦＰの同時挿入を行った。

【０５００】

Ｔ細胞を単離し、表２に記載されるような培地番号１７において培養した。ＬＮＰを、一般に実施例１に記載されるように調製した。ＴＲＡＣ及びＴＲＢＣ　ＬＮＰを、５０／９／３９．５／１．５の脂質Ａ、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧの比で調製した。Ｂ２Ｍ　ＬＮＰを、５０／１０／３８．５／１．５の脂質Ａ、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧの比で調製した。ＬＮＰを、ｇＲＮＡ対ｍＲＮ

Ａの１：２重量比により調製した。Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びＴＲＢＣを標的とするｇＲＮＡ　Ｇ０１６２３９（配列番号７０７）を含有するＬＮＰを、１μｇ／ｍＬの濃度で組換えヒトＡｐｏＥ３（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ３５０－０２）を補充した表２に記載されるような培地番号１７において、５μｇ／ｍＬの濃度で、３７℃で１５分間事前インキュベートした。Ｔ細胞を、ＴＲＢＣを標的とするＬＮＰを用いて処理し、実施例３にてＬＮＰ　ＢＦ２．５について記載されるように活性化した。３日目に、これらの編集されたＴ細胞を、実施例３に記載されているように、２０μｇ／ｍＬの濃度で組換えヒトＡｐｏＥ３（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ３５０－０２）とともに３７℃で１５分間事前インキュベートした、ｇＲＮＡ　Ｇ０１３００６（配列番号７０８）を有するＴＲＡＣ　ＬＮＰ、及びｇＲＮＡ　Ｇ０００５２９（配列番号７０１）を有するＢ２Ｍ　ＬＮＰを用いて処理した。２つのＨＤＲＴテンプレートを、３００，０００のＭＯＩでＡＡＶ６を介して細胞に送達した。１つのＨＤＲＴ構築物は、ＴＲＡＣガイド切断部位に隣接するホモロジーアームを有するｔｇＴＣＲを標的とするＷＴ１を含有した。他のＨＤＲＴ構築物は、Ｂ２Ｍガイド切断部位に隣接するホモロジーアームを有するＧＦＰ配列を含有した。ＬＮＰ及びＡＡＶ添加から２４時間後、Ｔ細胞を洗浄し、表２に記載されるような培地番号１７に再懸濁させ、ＧＲＥＸプレート中に拡大した。処理及び増殖から６日後、Ｔ細胞を採取し、ＣＤ３（ＡＰＣ－Ｃｙ７、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ３００３１８）、Ｖｂ８（ＰＥ、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ３４８１０４）、ＨＬＡ－ＡＢＣ（ＢＶ６０５、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ３１１４３２）、ＣＤ４（ＡＰＣ、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ３００５３７）、及びＣＤ８（ＰＥ／Ｃｙ７、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ３４４７１２）を標的とする抗体を使用して、実施例１に記載されるようにフローサイトメトリーによりアッセイした。表３７及び図３５は、挿入率を示す。表３８及び図３６は、挿入後の残留内因性タンパク質を伴う処理された細胞のパーセンテージを示す。

【表４１】

表３７．ｔｇＴＣＲ挿入及びＧＦＰ率による処理された細胞のパーセンテージ

群	TCR 挿入%(平均)	TCR 挿入%(SD)	GFP 挿入%(平均)	GFP 挿入%(SD)
TRAC	74.1	0.2	該当なし	該当なし
TRAC+B2M	56.8	0.1	43.5	1.1
B2M	該当なし	該当なし	60.1	1.6

【表４２】

表３８．残留内因性ＴＣＲ又は残留ＨＬＡ－ＡＢＣ発現を伴う処理された細胞のパーセンテージ

群	残留 CD3%(平均)	残留 CD3%(SD)	残留 HLA-ABC%(平均)	残留 HLA-ABC%(SD)
TRAC	1.2	0.2	該当なし	該当なし
TRAC+B2M	3.0	1.0	8.4	0.2
B2M	該当なし	該当なし	7.1	0.4
未処理	94.5	0.5	100.0	0.1

【０５０１】

実施例１４．操作されたＴ細胞のトランスクリプトームプロファイリング

トランスクリプトームプロファイリングを使用して、Ｔ細胞トランスクリプトーム、ＮａｎｏＳｔｒｉｎｇ　ｎＣｏｕｎｔｅｒ（登録商標）ＣＡＲ－Ｔ特徴付けパネル（７８０個のヒト遺伝子を有するＴ細胞生物学の８つの本質的な構成要素を測定する）に対するエレクトロポレーション（ＥＰ）及び脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）操作方法の影響を直接比較し

た。ＣＡＲ－Ｔ特徴付けパネルに含まれる遺伝子は、活性化、枯渇、代謝、表現型、ＴＣＲ多様性、毒性、細胞型、及び持続性を含む、Ｔ細胞生物学の８つの本質的な態様の効率的な探索を可能にするために、種々の高度な分析モジュールに編成され、連結されている。ＡＡＶＳ１遺伝子座のノックアウトがＴ細胞トランスクリプトームの改変を誘発しないため、細胞をＡＡＶＳ１遺伝子座で編集した。

【０５０２】

実施例１４．１．Ｔ細胞の調製

健康なヒトドナーのアフェレーシスを商業的（Ｈｅｍａｃａｒｅ）に入手し、細胞を洗浄し、ＬＯＶＯデバイスにてＣｌｉｎｉＭＡＣＳ（登録商標）ＰＢＳ／ＥＤＴＡ緩衝液（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃのカタログ番号１３０－０７０－５２５）中で再懸濁した。Ｔ細胞を、ＥａｓｙＳｅｐ（商標）ヒトＴ細胞単離キット（ＳｔｅｍＣｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１７９５１）を使用して陰性選択により単離した。Ｔ細胞をバイアルに等分し、将来的な使用のためにＣｒｙｏｓｔｏｒ（登録商標）ＣＳ１０（ＳｔｅｍＣｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓのカタログ番号０７９３０）及びＰｌａｓｍａｌｙｔｅ Ａ（Ｂａｘｔｅｒのカタログ番号２Ｂ２５２２Ｘ）の１：１製剤で凍結保存した。

【０５０３】

解凍時に、Ｔ細胞を、ＣＴＳ ＯｐＴｍｉｚｅｒ Ｔ細胞拡大ＳＦＭ及びＴ細胞拡大サプリメント（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒのカタログＡ１０４８５０１）、５％のヒトＡＢ血清（ＧｅｍｉｎｉＢｉｏ、カタログ１００－５１２） １×ペニシリン／ストレプトマイシン、１×Ｇｌｕｔａｍａｘ、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ、２００Ｕ／ｍＬの組換えヒトインターロイキン－２（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－０２）、５ｎｇ／ｍｌの組換えヒトインターロイキン７（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－０７）、並びに５ｎｇ／ｍｌの組換えヒトインターロイキン１５（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－１５）を含有するＯｐＴｍｉｚｅｒベースの培地に、１．０ｘ１０＾６細胞／ｍＬの密度でプレーティングした。Ｔ細胞を、この培地でＴｒａｎｓＡｃｔ（商標）（１：１００希釈、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）により２４時間活性化し、その際に、それらを洗浄し、編集のために三重にプレーティングした。

【０５０４】

実施例１４．２．脂質ナノ粒子によるＴ細胞編集

ＬＮＰを、概して、実施例１に記載されるように、５０／１０／３８．５／１．５の脂質Ａ、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧの比で調製した。ＬＮＰを、ｇＲＮＡ対ｍＲＮＡの１：２重量比により調製した。Ｃａｓ９ ｍＲＮＡ及びＡＡＶＳ１を標的とするｓｇＲＮＡ Ｇ０００５６２（配列番号７１０）を含有するＬＮＰを、実施例１に記載されるように製剤化した。各ＬＮＰ調製物を、１０ｕｇ／ｍｌの組換えヒトＡｐｏＥ３（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ３５０－０２）を補充した、上記のようなサイトカインを有するＯｐＴｍｉｚｅｒベースの培地にて、３７℃で１５分間インキュベートした。活性化から２４時間後、Ｔ細胞を洗浄し、記載のようにサイトカインを有するがヒト血清を有さないＯｐＴｍｉｚｅｒ培地に懸濁した。事前インキュベートしたＬＮＰ混合物を、１００，０００個の細胞の各ウェルに添加して、２．５ｕｇ／ｍｌの最終濃度を得た。未編集Ｔ細胞（ＬＮＰなし）を含む対照群も含まれた。送達後６時間でＲＮＡ抽出のために細胞ペレットを収集した。

【０５０５】

実施例１４．３．Ｔ細胞のＲＮＰエレクトロポレーション

活性化から２４時間後にエレクトロポレーションを実施した。ｓｇＲＮＡ Ｇ０００５６２（配列番号７１０）を標的とするＡＡＶＳ１を、９５℃で２分間変性させた後、室温で１０分間冷却した。２０ｕＭのｓｇＲＮＡ及び１０ｕＭのＣａｓ９－ＮＬＳタンパク質（配列番号１６）のＲＮＰ混合物を調製し、２５℃で１０分間インキュベートした。１２．５μＬのＲＮＰ混合物を、８７．５μＬのＰ３エレクトロポレーション緩衝液（Ｌｏｎｚａ）中の１０，０００，０００細胞と組み合わせた。１００μＬのＲＮＰ／細胞混合物

を、対応するキュベットに移入した。製造者のパルスコードＥＨ１１５を用いて、細胞を二重にエレクトロポレーションした。Ｔ細胞ベース培地を、エレクトロポレーションの直後に細胞に添加した。送達後６時間及び２４時間で、ＲＮＡ抽出のために細胞ペレットを収集した。

【０５０６】

実施例１４．４　トランスクリプトームプロファイリング

メッセンジャーＲＮＡ単離を、ＲＮｅａｓｙミニキット（Ｑｉａｇｅｎ、カタログ７４１０６）を用いて実施し、転写物プロファイリングを、製造者のプロトコルに従ってｎＣｏｕｎｔｅｒヒトＣＡＲ－Ｔ特徴付けパネル（ＮａｎｏＳｔｒｉｎｇ、カタログＸＴ－ＣＳＯ－ＣＡＲＴ１－１２）を用いて実施した。簡潔に述べると、抽出したｍＲＮＡを２０ｎｇ／μｌに希釈した。試料及び希釈した標準物質を、１５μｌ反応体積においてレポーターコードセット（Ｒｅｐｏｒｔｅｒ　Ｃｏｄｅｓｅｔ）及びキャプチャーコードセット（Ｃａｐｔｕｒｅ　Ｃｏｄｅｓｅｔ）と、６５℃で少なくとも１６時間ハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーション後、試料カートリッジ、プレッププレート、及び他の消耗品を、ＮａｎｏＳｔｒｉｎｇプレップステーション（ＮａｎｏＳｔｒｉｎｇ、カタログＮＣＴ－ＰＲＥＰ－１２０）に充填した。次いで、試料をカートリッジ上で処理し、Ｄｉｇｉｔａｌ　Ａｎａｌｙｚｅｒにより走査した。

【０５０７】

スキャンされたＲＣＣファイルは、４つの品質管理（ＱＣ）チェック全てに合格した。データを、ＮａｎｏＳｔｒｉｎｇ　ｎＳｏｌｖｅｒ４．０ソフトウェアを使用して分析した。遺伝子発現ヒートマップを、Ｂａｓｉｃ　Ａｎａｌｙｓｉｓモジュールで生成した。差分遺伝子発現及び経路スコア化の統計的有意性を、ｎＳｏｌｖｅｒ４．０ソフトウェアにおけるｔ検定によって決定した。

【０５０８】

図３７は、転写物発現レベルのヒートマップを示す。本発明者らは、処理後６時間で、ＲＮＰのＥＰ媒介性送達が、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びｇＲＮＡのＬＮＰ送達（１９６遺伝子対７５遺伝子）と比較して、このＮａｎｏｓｔｒｉｎｇアレイ上に表されるほとんどのＴ細胞中心の細胞経路にわたって、より大きな遺伝子セットのＴ細胞発現を有意に改変させることを見出した（ｐ＜０．０５）。ＬＮＰ送達による摂動は、対照送達（ビヒクル）と統計的に区別できない。

【０５０９】

実施例１５．ＡＭＬモデルにおける操作されたＴ細胞のインビボでの有効性

ＷＴ１特異的ｔｇＴＣＲ－Ｔ細胞を、ＡＡＶドナーテンプレート（配列番号９を参照）を使用して操作し、Ｃａｓ９／ｓｇＲＮＡリボ核タンパク質（ＲＮＰ）のエレクトロポレーションにより、又はＣａｓ９　ｍＲＮＡ及びｓｇＲＮＡを含有するＬＮＰとのトランスフェクションにより、ＴＣＲα及びＴＲＢＣβをコードする遺伝子を標的とするＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９構成要素（それぞれ、ＴＲＡＣ及びＴＲＢＣ１／２）を導入した。

【０５１０】

実施例１５．１．Ｔ細胞の調製

健康なヒトドナーアのフェレーシスを商業的（Ｈｅｍａｃａｒｅ）に入手し、洗浄し、ＬＯＶＯデバイスにてＣｌｉｎｉＭＡＣＳ　ＰＢＳ／ＥＤＴＡ緩衝液中に再懸濁した。Ｔ細胞を、ＣｌｉｎｉＭＡＣＳ　Ｐｌｕｓ及びＣｌｉｎｉＭＡＣＳ　ＬＳ使い捨てキットを使用し、ＣＤ４及びＣＤ８磁気ビーズを使用して、陽性選択によって単離した。Ｔ細胞をバイアルに等分し、将来的な使用のために、Ｃｒｙｏｓｔｏｒ　ＣＳ１０及びＰｌａｓｍａｌｙｔｅ　Ａの１：１製剤で凍結保存した。凍結保存されたＴ細胞を解凍し、完全なＴ細胞増殖培地（ＴＣＧＭ、ＸＶＩＶＯ－１５培地又はＣＴＳ　Ｏｐｔｉｍｉｚｅｒ培地、５％のヒトＡＢ血清、２ｍＭのＬ－グルタミン、１％のペニシリン／ストレプトマイシン、１×２－メルカプトエタノール、ＩＬ－２（２００Ｕ／ｍＬ）、ＩＬ７（５ｎｇ／ｍＬ）、ＩＬ－１５（５ｎｇ／ｍＬ）を補充した）中で１．５×１０＾６細胞／ｍｌの密度で一晩静置させた。翌日、Ｔ細胞を、編集前にＴ細胞ＴｒａｎｓＡｃｔ試薬（１：１００希

釈）により４８時間活性化した。

【０５１１】

実施例１５．２．リボ核タンパク質エレクトロポレーションによるＴ細胞編集

ＲＮＰは、ＴＲＡＣ（Ｇ０１３００６）（配列番号７０８）又はＴＲＢＣ（Ｇ０１６２３９）（配列番号７０７）のいずれかを標的とする熱変性ｓｇＲＮＡとＣａｓ９－ＮＬＳタンパク質（配列番号１６）を、２：１のガイド：Ｃａｓ９重量比で１５分間混合することにより、２０μＭのストック濃度で形成した。活性化から４８時間後、Ｔ細胞を採取し、遠心分離し、Ｐ３エレクトロポレーション緩衝液（Ｌｏｎｚａ）中で２０ｘ１０＾６Ｔ細胞／１００μＬの濃度で再懸濁した。細胞懸濁液をＲＮＰと混合して、２μＭの最終ＲＮＰ濃度を達成した後、Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒキュベットに移入し、エレクトロポレーションした。エレクトロポレーションされたＴ細胞を、サイトカインなしで４００μＬのＴＣＧＭ中で１０分間直ちに静置させた。細胞を、ＷＴ１　ＴＣＲ（配列番号９）又はＭＡＲＴ１特異的ＴＣＲ（Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ．２００６．１７７（９）６５４８－６５５９）をコードする相同性指向修復テンプレートを有するＡＡＶ６を用いて、３×１０＾５ｖｇ／細胞のＭＯＩで、完全なＴＣＧＭ培地に５×１０＾６細胞／ウェル／５ｍＬの密度でプレーティングした。２４時間後、Ｔ細胞を採取し、洗浄し、完全なＴＣＧＭ培地中でＧ－Ｒｅｘ（登録商標）細胞培養システム（Ｗｉｌｓｏｎ　Ｗｏｌｆ）に添加した。Ｔ細胞を９日間培養し、隔日で培地交換を行った後、フローサイトメトリーによる拡大、ｔｇＴＣＲ挿入、及び内因性ＴＣＲノックアウトについて評価した。その後、Ｔ細胞をＣｒｙｏＳｔｏｒ（登録商標）ＣＳ１０培地に凍結保存した。

【０５１２】

実施例１５．３．脂質ナノ粒子によるＴ細胞編集

この実験では、ＬＮＰプロセスによって実施例４で操作したＴ細胞を使用した。

【０５１３】

実施例１５．４．フローサイトメトリー

操作されたＴ細胞を、抗－Ｖβ８抗体（ＷＴ１　ｔｇＴＣＲによって使用されるＴＲＢＣに結合する）又はＦＡＣＳ緩衝液中のＭＡＲＴ１四量体（ＰＢＳ　ｐＨ７．４、２％のＦＢＳ、１ｍＭのＥＤＴＡ）とともに、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８を標的とする抗体のカクテル中でインキュベートした。その後、Ｔ細胞を洗浄し、Ｃｙｔｏｆｌｅｘ装置（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）にて分析した。データ分析を、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアパッケージ（ｖ．１０．６．１）を使用して実施した。Ｔ細胞を、サイズ、ＣＤ４又はＣＤ８発現にてゲーティングし、ＷＴ１　ｔｇＴＣＲ（Ｖβ８＋ＣＤ３＋）又はＭＡＲＴ１　ｔｇＴＣＲ（ＭＡＲＴ１四量体＋及びＣＤ３＋）について分析した。

【０５１４】

実施例１５．５　ＡＭＬインビボモデルにおける操作されたＴ細胞の有効性。

ＥＰ及びＬＮＰプロセスによって作製されたＷＴ１－ＴＣＲ　Ｔ細胞の有効性及び特異性を評価するために、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１＋患者から採取された初代白血病芽球を免疫不全マウスに注入した。マウスをＥＰ又はＬＮＰ操作Ｔ細胞を用いて処理し、白血病増殖をモニタリングした。図３８Ａは、操作されたＷＴ１　Ｔ細胞及び対照を用いて処理したマウスについてのインビボ実験のタイムラインを示す。図３８Ｂは、図３８Ａの四群のマウスの処理時に、血液のマイクロリットル当たりの細胞として経時的に測定されたＡＭＬ白血病芽球の増殖を示す。簡潔に述べると、ＥＰ及びＬＮＰプロセスによって作製された操作されたＷＴ１－ＴＣＲ　Ｔ細胞、無関係なＭＡＲＴ１－ＴＣＲを用いて形質導入したＴ細胞、又は任意の処理なしの別の対照（白血病芽球のみ）を用いて処理したマウスを比較した。白血病芽球の骨髄（図３８Ｃ）及び脾臓（図３８Ｄ）における増殖を、図３８Ａのようにマウスの処理時の全生細胞当たりのＡＭＬ細胞のパーセンテージとして測定した。

【０５１５】

実施例１６Ａ．ＢＣ２２ｎ：ＵＧＩの固定比を有するＴ細胞におけるＬＮＰ滴定。

活性化されたヒトＴ細胞へのＬＮＰ送達を使用して、単一標的及び多標的編集の効力を

、Ｃａｓ９又はデアミナーゼ（ＢＣ２２ｎ）のいずれかにより評価した。

【０５１６】

実施例１６．Ａ．１．Ｔ細胞の調製。

健康なヒトドナーのアフェレーシスを商業的（Ｈｅｍａｃａｒｅ）に入手し、細胞を洗浄し、ＬＯＶＯデバイスにてＣｌｉｎｉＭＡＣＳ（登録商標）ＰＢＳ／ＥＤＴＡ緩衝液（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃのカタログ番号１３０－０７０－５２５）中で再懸濁した。Ｔ細胞を、ＣｌｉｎｉＭＡＣＳ（登録商標）Ｐｌｕｓ及びＣｌｉｎｉＭＡＣＳ（登録商標）ＬＳ使い捨てキットを使用し、ＣＤ４及びＣＤ８磁気ビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃのカタログ番号１３０－０３０－４０１／１３０－０３０－８０１）を使用して、陽性選択によって単離した。Ｔ細胞をバイアルに等分し、将来的な使用のためにＣｒｙｏｓｔｏｒ（登録商標）ＣＳ１０（ＳｔｅｍＣｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓのカタログ番号０７９３０）及びＰｌａｓｍａｌｙｔｅ Ａ（Ｂａｘｔｅｒのカタログ番号２Ｂ２５２２Ｘ）の１：１製剤で凍結保存した。解凍時に、Ｔ細胞を、１×サイトカイン（２００Ｕ／ｍＬの組換えヒトインターロイキン－２、５ｎｇ／ｍＬの組換えヒトインターロイキン－７、及び５ｎｇ／ｍＬの組換えヒトインターロイキン－１５）に加えて、５％（ｖ／ｖ）のウシ胎児血清、５０μＭの２－メルカプトエタノール、１０ｍＭのＮ－アセチル－Ｌ－（＋）－システイン、１０Ｕ／ｍＬのペニシリン－ストレプトマイシンを含有する、Ｘ－ＶＩＶＯ１５（商標）無血清造血細胞培地（Ｌｏｎｚａ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）で構成されるＴ細胞基礎培地に、１．０×１０ｅ６細胞／ｍＬの密度でプレーティングした。Ｔ細胞を、ＴｒａｎｓＡｃｔ（商標）（１：１００希釈、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）により活性化した。ＬＮＰトランスフェクションの前に、細胞をＴ細胞基礎培地で７２時間拡大した。

【０５１７】

実施例１６．Ａ．２．Ｔ細胞編集

各ＲＮＡ種、すなわちＵＧＩ ｍＲＮＡ、ガイドＲＮＡ又はエディタｍＲＮＡを、実施例１に記載されるようにＬＮＰ中で別々に製剤化した。エディタｍＲＮＡは、ＢＣ２２ｎ（配列番号１８）又はＣａｓ９のいずれかをコードした。Ｂ２Ｍ（Ｇ０１５９９５）（配列番号７１１）、ＴＲＡＣ（Ｇ０１６０１７）（配列番号７１２）、ＴＲＢＣ１／２（Ｇ０１６２０６）（配列番号７１３）、及びＣＩＩＴＡ（Ｇ０１８１１７）（配列番号７１４）を標的とするガイドを、単独又は組み合わせのいずれかで使用した。ＵＧＩ（配列番号２１）をコードするメッセンジャーＲＮＡを、実験のＣａｓ９とＢＣ２２ｎとの両方のアームに送達して、脂質量を正規化した。以前の実験では、ＵＧＩ ｍＲＮＡが、Ｃａｓ９ ｍＲＮＡとともに使用される場合、総編集又は編集プロファイルに影響を及ぼさないことが確立されている。ＬＮＰを、表１２に記載のエディタｍＲＮＡ、ガイドＲＮＡ、及びＵＧＩ ｍＲＮＡについて、それぞれ６：３：２の固定総ｍＲＮＡ重量比に混合した。表３９に記載の４ガイド実験では、個々のガイドを４倍希釈して、全体の６：３のエディタｍＲＮＡ：ガイド重量比を維持し、総脂質送達に基づいて個々のガイド効力との比較を可能にした。ＬＮＰ混合物を、ウシ胎児血清を６％カニクイザル血清（Ｂｉｏｒｅｃｌａｍａｔｉｏｎ ＩＶＴ、カタログＣＹＮ２２０７６０）に置換するＴ細胞基礎培地で、３７℃で５分間インキュベートした。

【０５１８】

活性化から７２時間後、Ｔ細胞を洗浄し、基礎Ｔ細胞培地に懸濁した。事前インキュベートしたＬＮＰ混合物を、１×１０ｅ５Ｔ細胞／ウェルにより各ウェルに添加した。Ｔ細胞を、実験の期間中、５％のＣＯ２とともに３７℃でインキュベートした。Ｔ細胞培地を活性化から６日後及び８日後に変更し、活性化から１０日後、ＮＧＳ及びフローサイトメトリーによる分析のために細胞を採取した。ＮＧＳを、実施例１．４のように実施した。

【０５１９】

表３９及び図３９Ａ～Ｄは、個々のガイドを編集に使用したときのＴ細胞の編集プロファイルを説明する。総編集及びＣからＴへの編集は、ＢＣ２２ｎ ｍＲＮＡ、ＵＧＩ ｍＲＮＡ、及び試験した全てのガイドにわたるガイドの量の増加に直接的な用量応答性の関

係を示した。インデル、及びＡ又はＧへのＣ変換は、より低い用量がこれらの変異のより高いパーセンテージをもたらした用量と逆の関係にある。Ｃａｓ９により編集した試料において、総ＲＮＡ用量とともに総編集及びインデル活性が増加する。

【表４３－１】

表３９．総読み取りに対するパーセントの編集－シングルガイド送達。

ガイド	エディタ	総RNA(ng)	CからTへ%		CからA/Gへ%		インデル%		N
			平均	SD	平均	SD	平均	SD	
G015995 B2M	BC22n	0.0	0.3	0.0	1.5	0.1	0.2	0.0	2
		8.6	49.5	3.5	7.7	0.6	6.0	0.4	2
		17.2	68.5	1.7	6.7	1.3	4.3	0.1	2
		34.4	79.0	0.9	5.7	0.3	3.8	0.0	2
		68.8	88.2	0.8	4.6	0.0	2.5	0.2	2
		137.5	90.6	1.8	4.1	0.4	2.2	0.5	2
		275.0	92.6	0.8	3.7	0.3	2.2	0.3	2
		550.0	95.2	0.4	2.8	0.0	1.6	0.2	2
	Cas9	0.0	0.3	0.0	1.5	0.2	0.2	0.0	2
		8.6	0.3	0.0	1.2	0.1	23.7	2.1	2
		17.2	0.3	0.0	0.9	0.1	41.1	0.2	2
		34.4	0.3	0.0	0.6	0.0	59.4	0.6	2
		68.8	0.2	0.1	0.4	0.0	76.8	1.2	2
		137.5	0.1	0.1	0.2	0.0	88.2	2.0	2
		275.0	0.1	0.0	0.1	0.1	95.1	0.5	2
		550.0	0.1	0.0	0.1	0.0	97.5	0.3	2
G016017 TRAC	BC22n	0.0	0.2	0.0	2.2	0.1	0.2	0.1	2
		8.6	34.6	1.1	5.6	0.8	6.6	0.2	2
		17.2	51.3	0.8	5.7	0.1	6.7	1.0	2
		34.4	66.9	2.6	5.4	0.2	4.7	0.4	2
		68.8	79.0	0.6	4.4	0.7	4.5	0.9	2
		137.5	89.2	0.4	3.6	0.9	2.5	0.2	2
		275.0	92.8	0.9	2.9	0.0	2.3	0.0	2
		550.0	94.5	1.3	3.4	1.0	1.6	0.2	2
	Cas9	0.0	0.2	0.0	2.3	0.1	0.1	0.0	2
		8.6	0.2	0.0	2.1	0.2	20.7	0.5	2
		17.2	0.1	0.0	1.4	0.0	34.6	0.7	2
		34.4	0.1	0.0	1.5	0.4	49.8	0.4	2
		68.8	0.1	0.0	1.0	0.0	62.3	0.1	2
		137.5	0.1	0.0	0.6	0.1	77.0	0.1	2
		275.0	0.0	0.0	0.3	0.0	87.8	0.2	2
		550.0	0.0	0.0	0.2	0.0	93.8	0.6	2

【表４３－２】

ガイド	エディタ	総RNA(ng)	CからTへ%		CからA/Gへ%		インデル%		N
			平均	SD	平均	SD	平均	SD	
G016206 TRBC1/2	BC22n	0.0	0.4	0.1	0.6	0.1	0.1	0.1	2
		8.6	23.7	1.3	6.1	0.0	6.1	0.8	2
		17.2	42.4	2.2	6.8	0.1	6.8	0.3	2
		34.4	60.1	2.2	5.7	0.3	5.9	0.7	2
		68.8	73.2	4.2	4.3	0.1	4.7	1.1	2
		137.5	81.7	0.8	3.6	0.2	3.7	0.4	2
		275.0	91.0	1.7	2.3	0.1	2.8	0.8	2
		550.0	93.6	1.9	2.0	0.2	1.7	0.6	2
	Cas9	0.0	0.3	0.0	0.5	0.0	0.1	0.0	1
		8.6	0.3	0.2	0.5	0.1	8.1	0.2	2
		17.2	0.3	0.1	0.7	0.1	14.9	0.6	2
		34.4	0.2	0.0	0.8	0.0	24.1	0.0	1
		68.8	0.2	0.0	0.4	0.0	35.9	0.0	1
		137.5	0.2	0.0	0.5	0.0	48.6	2.1	2
		275.0	0.1	0.0	0.4	0.0	63.8	0.0	1
		550.0	アッセイされていない						
G018117 CIITA	BC22n	0.0	0.3	0.0	2.7	0.1	0.3	0.0	2
		8.6	14.5	1.5	3.8	0.3	3.5	0.3	2
		17.2	28.1	0.6	3.5	0.3	3.9	1.0	2
		34.4	45.9	0.4	3.3	0.4	3.6	0.0	2
		68.8	62.8	5.3	3.6	0.1	3.7	1.2	2
		137.5	78.9	1.3	2.7	0.1	2.7	0.7	2
		275.0	86.3	1.8	2.6	0.1	2.0	0.1	2
		550.0	92.3	1.2	2.6	0.2	1.1	0.2	2
	Cas9	0.0	0.2	0.0	2.8	0.1	0.3	0.0	2
		8.6	0.3	0.0	2.5	0.0	6.0	0.2	2
		17.2	0.2	0.0	2.4	0.1	11.2	1.6	2
		34.4	0.2	0.0	2.1	0.0	20.8	0.3	2
		68.8	0.2	0.0	1.9	0.1	33.2	0.4	2
		137.5	0.1	0.0	1.3	0.1	51.2	0.0	2
		275.0	0.1	0.0	0.9	0.2	64.5	0.9	2
		550.0	0.1	0.0	0.6	0.0	78.4	1.1	2

【０５２０】

表４０及び図４０Ａ～Ｄは、４つのガイドを編集のために同時に使用したときのＴ細胞の編集プロファイルを総読み取りに対するパーセントで説明する。実験のこのアームにおいて、各ガイドを、シングルガイド編集実験と比較して、２５％の濃度で使用した。合計で、Ｔ細胞を６つの異なるＬＮＰ（エディタｍＲＮＡ、ＵＧＩ　ｍＲＮＡ、４つのガイド）に同時に曝露した。ＢＣ２２ｎ及びトランスＵＧＩによる編集は、Ｃａｓ９による編集と比較して、各遺伝子座の最大総編集のより高いパーセンテージにつながる。

【表４４－１】

表４０．総読み取りに対するパーセンテージの編集－複数のガイド送達。

アッセイされた遺伝子座	エディタ	総 RNA(ng)	C から T へ%		C から A/G へ%		インデル%		N
			平均	SD	平均	SD	平均	SD	
G015995 B2M	BC22n	0.0	0.3	0.0	1.5	0.2	0.2	0.0	2
		8.6	27.3	0.2	3.8	0.1	2.6	0.1	2
		17.2	47.2	2.2	4.1	0.4	3.0	0.1	2
		34.4	61.2	3.0	3.9	0.1	2.6	0.3	2
		68.8	81.4	0.1	2.9	0.1	1.4	0.1	2
		137.5	90.0	1.1	2.6	0.3	1.3	0.5	2
		275.0	94.7	0.1	2.2	0.1	0.8	0.0	2
		550.0	95.9	0.9	2.9	1.0	0.4	0.3	2
	Cas9	0.0	0.3	0.0	1.4	0.1	0.2	0.0	2
		8.6	0.3	0.0	1.4	0.0	5.0	0.1	2
		17.2	0.3	0.0	1.3	0.0	10.5	0.4	2
		34.4	0.3	0.0	1.1	0.0	19.3	0.6	2
		68.8	0.3	0.0	0.9	0.0	34.4	0.1	2
		137.5	0.2	0.0	0.7	0.0	51.1	1.3	2
		275.0	0.2	0.1	0.5	0.0	68.0	0.1	2
		550.0	0.3	0.1	0.4	0.1	76.7	2.0	2
G016017 TRAC	BC22n	0.0	0.1	0.1	1.9	0.6	0.2	0.0	2
		8.6	12.1	1.3	4.3	0.2	2.4	0.2	2
		17.2	25.7	2.2	4.2	0.5	3.8	0.7	2
		34.4	44.7	1.4	4.7	1.0	3.0	0.3	2
		68.8	64.2	1.9	4.4	0.6	2.5	0.1	2
		137.5	79.3	1.1	3.6	0.4	2.1	0.1	2
		275.0	90.7	0.0	3.0	0.1	1.5	0.0	2
		550.0	93.3	0.6	2.4	0.1	0.9	0.4	2
	Cas9	0.0	0.1	0.1	2.1	0.2	0.1	0.0	2
		8.6	0.2	0.1	2.3	0.2	6.1	0.2	2
		17.2	0.1	0.0	1.8	0.2	11.5	0.5	2
		34.4	0.1	0.0	2.0	0.4	21.0	0.4	2
		68.8	0.1	0.0	1.4	0.0	33.5	0.1	2
		137.5	0.1	0.0	1.2	0.1	47.5	0.5	2
		275.0	0.1	0.0	0.9	0.1	64.8	0.2	2
		550.0	0.1	0.0	0.6	0.1	76.1	1.3	2

【表４４－２】

アッセイされた遺伝子座	エディタ	総RNA(ng)	CからTへ%		CからA/Gへ%		インデル%		N
			平均	SD	平均	SD	平均	SD	
G016206 TRBC1/2	BC22n	0.0	データなし						
		8.6	11.6	0.3	2.6	0.2	2.8	0.3	2
		17.2	23.4	0.4	3.6	0.3	2.6	0.5	2
		34.4	38.5	1.4	3.7	0.2	2.9	0.7	2
		68.8	55.6	1.7	2.3	0.4	2.4	0.0	2
		137.5	72.4	1.2	1.8	0.5	1.7	0.5	2
		275.0	85.1	1.0	1.9	0.5	1.7	0.6	2
		550.0	89.8	2.8	2.2	0.1	0.9	0.3	2
	Cas9	0.0	0.2	0.0	0.6	0.0	0.1	0.0	1
		8.6	0.2	0.1	0.7	0.1	2.3	0.3	2
		17.2	0.3	0.0	0.7	0.3	4.2	0.4	2
		34.4	0.1	0.0	0.5	0.1	6.6	0.5	2
		68.8	0.4	0.0	0.5	0.0	12.3	0.0	1
		137.5	0.2	0.0	0.5	0.0	17.8	0.0	1
		275.0	0.1	0.0	0.5	0.0	33.0	0.0	1
		550.0	0.3	0.2	0.3	0.0	43.3	1.7	2
G018117 CIITA	BC22n	0.0	0.2	0.0	2.6	0.1	0.3	0.0	2
		8.6	4.6	0.9	3.1	0.2	0.8	0.2	2
		17.2	10.5	0.2	2.9	0.1	1.1	0.2	2
		34.4	18.8	0.3	2.9	0.2	1.6	0.2	2
		68.8	35.1	0.6	2.7	0.2	1.6	0.7	2
		137.5	52.9	0.2	2.9	0.3	1.5	0.0	2
		275.0	71.9	2.4	2.5	0.3	1.3	0.1	2
		550.0	81.1	1.9	2.6	0.1	1.1	0.6	2
	Cas9	0.0	0.3	0.0	2.7	0.1	0.3	0.0	2
		8.6	0.2	0.0	2.6	0.2	1.4	0.0	2
		17.2	0.2	0.0	2.5	0.0	2.1	0.3	2
		34.4	0.3	0.0	2.5	0.0	3.9	0.1	2
		68.8	0.2	0.0	2.5	0.2	7.7	0.6	2
		137.5	0.2	0.0	2.2	0.1	13.3	0.2	2
		275.0	0.1	0.0	1.9	0.0	26.7	1.3	2
		550.0	0.1	0.0	1.7	0.1	42.3	0.3	2

【０５２１】

活性化後１０日目に、Ｔ細胞をフローサイトメトリーによって表現型解析し、編集が細胞表面タンパク質の喪失をもたらしたかどうかを決定した。簡潔に述べると、Ｔ細胞を、以下の抗体の混合物中でインキュベートした：Ｂ２Ｍ－ＦＩＴＣ（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ３１６３０４）、ＣＤ３－ＡＦ７００（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ３１７３２２）、ＨＬＡ ＤＲ ＤＱ ＤＰ－ＰＥ（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ３６１７０４）、及びＤＡＰＩ（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ４２２８０１）。未編集細胞のサブセットを、アイソタイプ対照－ＰＥ（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ（登録商標）カタログ番号４００２３４）とともにインキュベートした。その後、細胞を洗浄し、Ｃｙｔｏｆｌｅｘ装置（

Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）にて処理し、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアパッケージを使用して分析した。Ｔ細胞を、サイズ、形状、生存能、及び抗原発現に基づいてゲーティングした。

【０５２２】

表４１及び図４１Ａ～Ｈは、抗体結合に陰性である細胞のパーセントとしての表現型解析結果を報告する。抗原陰性細胞のパーセンテージは、ＢＣ２２ｎ試料とＣａｓ９試料との両方の総ＲＮＡの増加に伴い、用量応答性様式で増加した。ＢＣ２２ｎにより編集された細胞は、試験された全てのガイドについて、Ｃａｓ９により編集された細胞と比較して、同等以上のタンパク質ノックアウトを示した。多編集細胞において、トランスＵＧＩを有するＢＣ２２ｎは、トランスＵＧＩを有するＣａｓ９よりも実質的に高いパーセンテージの抗原陰性細胞を示した。例えば、５５０ｎｇの最高総ＲＮＡ用量でのＢＣ２２編集試料は、３つ全ての抗原を欠いている細胞の８４．２％を示したが、Ｃａｓ９編集は、そのような三重ノックアウト細胞がわずか４６．８％であった。１つのガイドのみによって処理した試料については、ＤＮＡ編集と抗原低減との間の相関は堅牢であった。ＢＣ２２ｎは、抗原ノックアウトに対するＣからＴへの変換を比較する場合、０．９３のＲ平方測定値を有した。Ｃａｓ９は、抗原ノックアウトに対するインデルを比較する場合、０．９５のＲ平方測定値を有した。

【表４５－１】

表４１．フローサイトメトリーデーター抗原に陰性な細胞パーセント（ｎ＝２）。

ガイド	表現型	総 RNA(ng)	BC22n		Cas9	
			平均%	SD	平均%	SD
G015995 B2M	B2M 陰性	550.0	95.7	0.1	91.3	0.6
		275.0	94.4	0.4	89.3	0.1
		137.5	91.2	0.1	82.1	3.3
		68.8	83.9	0.4	68.7	3.3
		34.4	75.7	1.4	53.4	0.2
		17.2	60.8	2.0	30.7	1.3
		8.6	44.0	2.3	13.9	2.0
		0.0	14.1	4.1	9.9	1.9
G015995 G016017 G016206 G018117	B2M 陰性	550.0	94.4	0.1	74.2	0.4
		275.0	91.3	0.1	65.2	0.1
		137.5	84.3	0.2	45.4	1.9
		68.8	72.7	0.4	24.5	0.8
		34.4	56.2	1.2	14.1	2.3
		17.2	38.5	0.2	9.9	0.8
		8.6	20.6	0.7	7.6	2.4
		0.0	14.1	4.1	9.9	1.9
G016017 TRAC	CD3 陰性	550.0	97.3	0.3	94.8	0.4
		275.0	96.0	0.2	87.0	4.9
		137.5	91.9	0.2	72.7	0.9
		68.8	85.7	0.5	65.6	0.1
		34.4	76.6	0.8	51.7	3.0
		17.2	61.8	1.7	35.7	1.1
		8.6	42.1	0.7	20.1	1.5
		0.0	1.0	0.1	0.9	0.1
G016206 TRBC1/2	CD3 陰性	550.0	97.9	0.1	86.6	0.3
		275.0	96.0	0.1	77.3	0.1
		137.5	90.4	0.8	59.4	0.4
		68.8	82.9	0.1	40.6	1.2
		34.4	71.9	1.5	27.0	1.6
		17.2	53.4	0.3	16.1	0.1
		8.6	32.6	0.6	7.9	0.4
		0.0	0.8	0.0	0.9	0.4

【表４５－２】

ガイド	表現型	総RNA(ng)	BC22n		Cas9	
			平均%	SD	平均%	SD
G015995 G016017 G016206 G018117	CD3陰性	550.0	98.3	0.2	84.2	0.1
		275.0	96.3	0.1	74.6	0.5
		137.5	90.4	0.3	57.4	1.0
		68.8	81.3	0.3	39.4	0.1
		34.4	66.3	1.6	25.6	0.8
		17.2	48.2	1.0	15.3	0.5
		8.6	27.3	0.7	8.6	0.5
		0.0	0.9	0.1	0.9	0.2
G018117 CIITA	HLA DR DP DQ陰性	550.0	95.7	0.4	72.0	0.1
		275.0	92.5	1.1	65.6	0.4
		137.5	85.2	0.6	55.5	0.6
		68.8	74.5	1.1	48.9	0.0
		34.4	65.8	3.7	40.7	0.6
		17.2	49.9	0.1	36.2	0.6
		8.6	41.6	0.8	34.2	1.3
		0.0	30.1	1.6	35.2	0.4
G015995 G016017 G016206 G018117	HLA DR DP DQ陰性	550.0	88.0	0.2	52.8	1.1
		275.0	81.2	0.2	46.4	0.4
		137.5	70.4	1.3	39.9	1.8
		68.8	60.0	0.4	39.1	3.3
		34.4	48.8	0.6	37.7	2.9
		17.2	43.0	4.2	37.5	0.6
		8.6	37.8	2.1	35.0	0.0
		0.0	33.0	1.9	37.3	2.1
G015995 G016017 G016206 G018117	B2M陰性 CD3陰性 HLA DR DP DQ陰性	550.0	84.2	0.0	46.8	1.1
		275.0	76.2	0.0	37.8	0.2
		137.5	63.0	1.3	23.4	2.4
		68.8	48.2	0.2	10.8	0.9
		34.4	31.5	1.1	3.6	0.9
		17.2	17.8	1.7	1.1	0.2
		8.6	6.4	0.0	0.4	0.1
		0.0	0.1	0.0	0.1	0.0

【０５２３】

実施例１６．Ｂ．エレクトロポレーション又はＬＮＰによる送達後の、Ｔ細胞におけるＢＣ２２ｎ又はＣａｓ９による同時四重編集

送達条件及びＣａｓ９又はベースエディタによる編集と関連する構造ゲノム変化の量を評価するために、ＲＮＰを送達するエレクトロポレーション、又は４つのガイド及びＣａｓ９若しくはＢＣ２２ｎのいずれかを送達する脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を用いて処理したＴ細胞を、細胞生存能、ＤＮＡ二本鎖切断、編集、表面タンパク質発現、及び染色体構造について分析した。

【０５２４】

実施例１６．Ｂ．１．Ｔ細胞の調製

健康なヒトドナーのアフェレーシスを商業的（Ｈｅｍａｃａｒｅ）に入手し、細胞を洗浄し、ＬＯＶＯデバイスにてＣｌｉｎｉＭＡＣＳ（登録商標）ＰＢＳ／ＥＤＴＡ緩衝液（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃのカタログ番号１３０－０７０－５２５）中で再懸濁した。Ｔ細胞を、ＥａｓｙＳｅｐ（商標）ヒトＴ細胞単離キット（ＳｔｅｍＣｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓのカタログ番号１７９５１）を使用して、陰性選択によって単離した。Ｔ細胞をバイアルに等分し、将来的な使用のためにＣｒｙｏｓｔｏｒ（登録商標）ＣＳ１０（ＳｔｅｍＣｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓのカタログ番号０７９３０）及びＰｌａｓｍａｌｙｔｅ Ａ（Ｂａｘｔｅｒのカタログ番号２Ｂ２５２２Ｘ）の１：１製剤で凍結保存した。

【０５２５】

解凍時に、Ｔ細胞を、ＣＴＳ ＯｐＴｍｉｚｅｒ Ｔ細胞拡大ＳＦＭ及びＴ細胞拡大サプリメント（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒのカタログＡ１０４８５０１）、５％のヒトＡＢ血清（ＧｅｍｉｎｉＢｉｏ、カタログ１００－５１２）１×ペニシリン／ストレプトマイシン、１×Ｇｌｕｔａｍａｘ、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ、２００Ｕ／ｍＬの組換えヒトインターロイキン－２（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－０２）、５ｎｇ／ｍｌの組換えヒトインターロイキン７（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－０７）、並びに５ｎｇ／ｍｌの組換えヒトインターロイキン１５（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－１５）を含有するＯｐＴｍｉｚｅｒベースの培地に、１．０ｘ１０＾６細胞／ｍＬの密度でプレーティングした。Ｔ細胞を、この培地でＴｒａｎｓＡｃｔ（商標）（１：１００希釈、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）により７２時間活性化し、その際に、それらを洗浄し、エレクトロポレーション又は脂質ナノ粒子のいずれかによる編集のために四重にプレーティングした。

【０５２６】

実施例１６．Ｂ．２．脂質ナノ粒子を用いる単一のｇＲＮＡ及び４つのｇＲＮＡのＴ細胞編集

ＬＮＰを、概して、単一のＲＮＡ種カーゴとともに実施例１のように製剤化した。カーゴを、ＢＣ２２ｎをコードするｍＲＮＡ、Ｃａｓ９をコードするｍＲＮＡ、ＵＧＩをコードするｍＲＮＡ、Ｂ２Ｍを標的とするｓｇＲＮＡ Ｇ０１５９９５（配列番号７１１）、ＴＲＡＣを標的とするｓｇＲＮＡ Ｇ０１６０１７（配列番号７１２）、ＴＲＢＣを標的とするｓｇＲＮＡ Ｇ０１６２００、又はＣＩＩＴＡを標的とするｓｇＲＮＡ Ｇ０１６０８６から選択した。各ＬＮＰを、２０ｕｇ／ｍｌの組換えヒトＡｐｏＥ３（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ３５０－０２）を補充した、上記のようなサイトカインを有するＯｐＴｍｉｚｅｒベースの培地にて、３７℃で１５分間インキュベートした。活性化から７２時間後、Ｔ細胞を洗浄し、ヒト血清なしでサイトカインを有するＯｐＴｍｉｚｅｒ培地に懸濁した。単一のｓｇＲＮＡ編集条件について、事前インキュベートしたＬＮＰ混合物を、１００，０００個の細胞の各ウェルに添加して、２．３μｇ／ｍＬのエディタｍＲＮＡ（ＢＣ２２ｎ又はＣａｓ９）、１．１μｇ／ｍＬのＵＧＩ、及び４．６μｇ／μＬのＧ０１６０１７（配列番号７１２）の最終濃度を得た。４プレックスｓｇＲＮＡ編集について、ＬＮＰ混合物を、１００，０００個の細胞の各ウェルに添加して、２．３μｇ／ｍＬのエディタｍＲＮＡ（ＢＣ２２ｎ又はＣａｓ９）、１．１μｇ／ｍＬのＵＧＩ、１．１５μｇ／μＬのＧ０１５９９５（配列番号７１１）、１．１５μｇ／μＬのＧ０１６０１７（配列番号７１２）、１．１５μｇ／μＬのＧ０１６２００、及び１．１５μｇ／μＬのＧ０１６０８６の最終濃度を得た。未編集Ｔ細胞（ＬＮＰなし）を含む対照群も含まれた。送達後１６時間で、細胞のサブセットを使用して細胞生存能を測定し、細胞の別のサブセットをγＨ２ＡＸフォーカスのイメージングのために処理した。残りのＴ細胞は、培養における拡大を継続した。培地を活性化から５日後及び８日後に変更し、活性化の１１日後、ＮＧＳ、フローサイトメトリー、及びＵｎＩＴによる分析のために細胞を採取した。ＮＧＳを、実施例１のように実施した。

【０５２７】

実施例１６．Ｂ．３．ｍＲＮＡエレクトロポレーションを用いる単一のｇＲＮＡ及び４つのｇＲＮＡのＴ細胞編集

活性化から７２時間後にエレクトロポレーションを実施した。Ｂ２Ｍを標的とするｓｇＲＮＡ　Ｇ０１５９９５（配列番号７１１）、ＴＲＡＣを標的とするｓｇＲＮＡ　Ｇ０１６０１７（配列番号７１２）、ＴＲＢＣを標的とするｓｇＲＮＡ　Ｇ０１６２００（配列番号７１８）、及びｓｇＲＮＡ　Ｇ０１６０８６（配列番号７１９）を９５℃で２分間変性させた後、室温で１０分間冷却した。Ｔ細胞を採取し、遠心分離し、Ｐ３エレクトロポレーション緩衝液（Ｌｏｎｚａ）中で１２．５×１０ｅ６Ｔ細胞／ｍＬの濃度で再懸濁した。単一のｓｇＲＮＡ編集条件について、１×１０ｅ５のＴ細胞を、４０ｎｇ／μＬのエディタｍＲＮＡ（ＢＣ２２ｎ又はＣａｓ９）、１０ｎｇ／μＬのＵＧＩ　ｍＲＮＡ、及び８０ｐｍｏｌのｓｇＲＮＡと、２０μＬのＰ３エレクトロポレーション緩衝液の最終体積において混合した。４プレックスｓｇＲＮＡ編集条件について、１×１０ｅ５のＴ細胞を、４０ｎｇ／μＬのエディタｍＲＮＡ（ＢＣ２２ｎ又はＣａｓ９）、１０ｎｇ／μＬのＵＧＩ　ｍＲＮＡ、及び２０ｐｍｏｌの４つの個々のｓｇＲＮＡと、２０μＬのＰ３エレクトロポレーション緩衝液の最終体積において混合した。この混合物を、９６ウェルＮｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（商標）プレートに四重に移入し、製造者のパルスコードを使用してエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションされたＴ細胞を、サイトカインを有する８０μＬのＯｐＴｍｉｚｅｒベースの培地に静置させた後、新しい平底９６ウェルプレートに移入した。未編集Ｔ細胞（ＥＰなし）を含む対照群も含まれた。送達後１６時間で、細胞のサブセットを使用して細胞生存能を測定し、細胞の別のサブセットをγＨ２ＡＸフォーカスのイメージングのために処理した。

【０５２８】

実施例１６．Ｂ．４．Ｃｅｌｌ　Ｔｉｔｅｒ　Ｇｌｏを介する相対的生存能

エレクトロポレーション又は脂質ナノ粒子送達から１６時間後、２０μＬの対照又は編集細胞を、元のプレートから取り出し、黒色の壁を有する新しい平底９６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇのカタログ３９０４）に添加した。ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）２．０（Ｐｒｏｍｅｇａのカタログ９２４１）を添加し、サンプルを製造者のプロトコルに従って処理した。相対発光単位（ＲＬＵ）を、ゲインを３６００に設定したＣＬＡＲＩｓｔａｒプラス（ＢＭＧ　Ｌａｂｔｅｃｈ）プレート読み取り器によって読み出した。表４２及び図４２に示されるような相対的生存能は、全ての試料ＲＬＵを未処理の対照ＲＬＵの平均で割ることによって計算した。全てのエレクトロポレーション条件は、未処理の対照レベルから５倍を超える生存能の低下を有したが、ＬＮＰ処理は、４つのガイドを同時に編集しても、未処理の対照試料に近いレベルで細胞生存能を維持した。

【表４６】

表４２．種々の編集及び送達条件での処理から１６時間後の相対的な細胞生存能

		EP		LNP	
エディタ	ガイド	平均	SD	平均	SD
エディタなし	ガイドなし	100.00	2.52	100.00	5.90
エディタなし	G016017	13.88	1.05	89.48	1.77
Cas9	G016017	13.25	1.18	96.43	9.82
BC22n	G016017	14.78	1.37	91.20	4.67
Cas9	４つのガイド	13.45	0.65	98.30	4.80
BC22n	４つのガイド	14.38	1.49	103.40	2.75

【０５２９】

実施例１６．Ｂ．５．γＨ２ＡＸフォーカスの染色、イメージング、及び定量化

エレクトロポレーション又は脂質ナノ粒子送達から１６時間後、Ｔ細胞を、サイトスピン４（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を使用してスライドにサイトスピンした。氷上でのＰＢＳ／０．５％のＴｒｉｏｎ　Ｘ－１００における５分間の事前抽出後、細胞を、４％のパラホルムアルデヒドに１０分間固定した。次いで、細胞をＰＢＳ中で数回洗浄し、ＰＢＳ／０．１％のＴＸ－１００／１％のＢＳＡ中で３０分間ブロックした。一次抗体（マウス抗－ホスホ－ヒストンＨ２Ａ．Ｘ（Ｓｅｒ１３９）（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅのカタログ０５－６３６）を、ブロック緩衝液中で４℃で一晩インキュベーションした。ＰＢＳ／０．０５％のＴｗｅｅｎ－２０中で３回洗浄した後、二次抗体（ヤギ抗－マウスＩｇＧ　Ａｌｅｘａ５６８（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒのカタログ Ａ３１５５６）を、ブロック緩衝液中で室温で３０分間インキュベートした。細胞をＰＢＳ／０．０５％のＴｗｅｅｎ－２０中で洗浄し、核をＨｏｅｃｈｓｔ　３３３４２により対比染色した。イメージを、Ｌｅｉｃａ　ＳＰ８との共焦点イメージングによって生成した。イメージ分析を、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　ＨＣＳ　Ｓｔｕｄｉｏ　Ｃｅｌｌ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ　Ｓｐｏｔ　Ｄｅｔｅｃｔｏｒモジュール上のカスタムプロトコルを介して実施した。表４３及び図４３は、明記された編集及び送達条件による処理後の核当たりの総γＨ２ＡＸスポット強度を示す。４つのガイド試料を有するＥＰ　Ｃａｓ９は、ＬＮＰ　Ｃａｓ９－４ガイド試料よりも、核当たりのｇＨ２ＡＸフォーカスの有意な増加を示した。

【表４７】

表４３．種々の編集及び送達条件による処理後の核当たりの平均総γＨ２ＡＸスポット強度

	エディタなし			Cas9、４つのガイド			BC22n、４つのガイド		
送達	平均	SD	N	平均	SD	N	平均	SD	N
未処理	134.33	95.78	5						
EP				21386.62	4336.69	3	実施せず		
LNP				2550.88	562.77	3	1770.11	291.97	5

【０５３０】

実施例１６．Ｂ．６．フローサイトメトリー及びＮＧＳシークエンシング

編集後８日目に、Ｔ細胞をフローサイトメトリーによって表現型解析し、Ｂ２Ｍ、ＣＤ３、及びＨＬＡ　ＩＩ－ＤＲ、ＤＰ、ＤＱタンパク質発現を決定した。簡潔に述べると、Ｔ細胞を、Ｂ２Ｍ－ＡＰＣ／Ｆｉｒｅ（商標）７５０（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ（登録商標）カタログ番号３１６３１４）、ＣＤ３－ＢＶ６０５（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ（登録商標）カタログ番号３１６３１４）、及びＨＬＡ　ＩＩ－ＤＲ、ＤＰ、ＤＱ－ＰＥ（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ（登録商標）カタログ番号３６１７１６）を標的とする抗体のカクテル中でインキュベートした。その後、細胞を洗浄し、Ｃｙｔｏｆｌｅｘフローサイトメトリー（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）にて処理し、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアパッケージを使用して分析した。Ｔ細胞を、サイズ、形状、生存能、及びＭＨＣ　ＩＩ発現に基づいてゲーティングした。実施例１に記載されるように、ＰＣＲ及びその後のＮＧＳ分析にＤＮＡ試料を供した。表４４及び図４４は、ＬＮＰによる処理後の目的の遺伝子座における編集パーセントを示す。ＬＮＰによって４つのガイドが送達された状態では、Ｃａｓ９よりもＢＣ２２ｎの方が各遺伝子座で編集パーセントが高くなっている。表４５及び図４５は、ＬＮＰ処理後の目的の表面タンパク質発現を示す。ＢＣ２２ｎによる編集は、Ｃａｓ９による編集より大きな三重ノックアウト細胞のパーセンテージをもたらした。

【表４８】

表４４．ＬＮＰ送達による明記された編集スキームでの処理後の平均編集パーセント。

			CからTへ%			CからA/Gへ%			インデル%		
エディタ	ガイド	読み出し遺伝子座	平均	SD	N	平均	SD	N	平均	SD	N
エディタなし	ガイドなし	B2M	0.20	0.00	2	0.41	0.01	2	0.13	0.01	2
		TRAC	0.05	0.07	2	0.53	0.01	2	0.09	0.01	2
		TRBC1	0.25	0.07	2	0.86	0.09	2	0.24	0.02	2
		TRBC2	0.30	0.14	2	0.85	0.04	2	0.27	0.01	2
		CIITA	0.15	0.07	2	0.26	0.03	2	0.06	0.00	2
Cas9	G016017	TRAC	0.00	0.00	2	0.05	0.00	2	96.59	0.52	2
	4つのガイド	B2M	0.30	0.14	2	0.37	0.21	2	83.61	2.72	2
		TRAC	0.00	0.00	2	0.06	0.04	2	89.45	0.25	2
		TRBC1	0.00	0.00	2	0.35	0.01	2	75.98	2.09	2
		TRBC2	0.00	0.00	2	0.38	0.03	2	78.07	1.51	2
		CIITA	0.20	0.14	2	0.38	0.04	2	55.23	0.92	2
BC22n	G016017	TRAC	93.90	0.57	2	2.29	0.29	2	2.34	0.08	2
	4つのガイド	B2M	95.65	0.07	2	1.42	0.23	2	1.07	0.16	2
		TRAC	95.00	0.57	2	1.65	0.07	2	1.44	0.43	2
		TRBC1	92.40	0.00	2	1.55	0.18	2	1.91	0.10	2
		TRBC2	92.50	0.00	2	1.62	0.02	2	1.87	0.33	2
		CIITA	91.35	0.35	2	0.93	0.04	2	0.64	0.04	2

【表４９】

表４５．ＬＮＰ送達による明記された編集スキームでの処理後に表面を発現する細胞の平均パーセンテージ。

エディタ	ガイド	表面タンパク質	平均	SD	N
エディタなし	ガイドなし	CD3-	2.30	2.12	2
		B2M-	4.00	2.26	2
		HLA DP DQ DR-	60.40	1.70	2
Cas9	G016017	CD3-	97.05	0.16	2
	4つのガイド	B2M-	77.90	4.67	2
		CD3-	94.54	1.34	2
		HLA DP DQ DR-	70.10	4.81	2
		CD3-B2M-HLA DP DQ DR-	61.58	5.42	2
BC22n	G016017	CD3-	96.20	0.13	2
	4つのガイド	B2M-	97.35	0.37	2
		CD3-	97.34	0.08	2
		HLA DP DQ DR-	93.46	0.89	2
		CD3-B2M-HLA DP DQ DR-	90.63	0.89	2

【０５３１】

実施例１６．Ｂ．７．ＵｎＩＴによる構造の変動及び転座の測定

編集後８日目に、未処理のＬＮＰ－Ｃａｓ９－４ガイド及びＬＮＰ－ＢＣ２２ｎ－４ガイド試料からのＴ細胞のサブセットを収集し、スピンダウンし、１００μＬのＰＢＳに再懸濁した。ＤＮｅａｓｙ Ｂｌｏｏｄ＆Ｔｉｓｓｕｅ Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎのカタログ６９５０４）を使用して、細胞からｇＤＮＡを単離した。ＵｎＩＴ構造バリアント特徴付けアッセイを、これらのｇＤＮＡ試料に適用した。高分子量ゲノムＤＮＡは、Ｔｎ５トランスポザーゼ、並びに部分的Ｉｌｌｕｍｉｎａ Ｐ５配列及び１２ｂｐの固有分子識別子（ＵＭＩ）を有するアダプターにより、同時にフラグメント化され、配列タグ化される（「タグ付けされる」）。試料当たり２つのＩｌｌｕｍｉｎａ適合性ＮＧＳライブラリを生成するために、Ｐ５に対するプライマー、並びにＰ７配列をＩｌｌｕｍｉｎａに付与するヘミネステッド（ｈｅｍｉ－ｎｅｓｔｅｄ）遺伝子特異的プライマー（ＧＳＰ）を使用する２つの逐次ＰＣＲ。２つのライブラリを用いるＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９標的切断部位の両方の方向にわたるシークエンシングは、ゲノム編集後のＤＮＡ修復転帰における構造バリアントの推論及び定量化を可能にする。２つのフラグメントを異なる染色体にアラインメントした場合、ＳＶを「染色体間転座」として分類した。構造の変動の結果は、表４６及び図４６に示されるように、多重編集がＢＣ２２ｎによって行われているときに、染色体間転座がバックグラウンドレベルに低減されるが、Ｃａｓ９多重編集が構造の変動の有意な増加をもたらすことを示す。

【表５０】

表４６．ＬＮＰ送達による明記された編集スキームでの処理後の総固有分子識別子間の染色体間転座の平均パーセント。

編集	遺伝子座	平均	SD	N
未処理	B2M	0.16	0.09	2
	TRAC	0.21	0.13	2
	CIITA	0.10	0.04	2
Cas9、４つのガイド	B2M	2.71	0.52	2
	TRAC	1.55	0.24	2
	CIITA	0.92	0.37	2
BC22n、４つのガイド	B2M	0.14	0.06	2
	TRAC	0.21	0.08	2
	CIITA	0.14	0.08	2

【０５３２】

実施例１７．逐次ＬＮＰ送達を伴う多編集ＷＴ１　Ｔ細胞

Ｔ細胞を、一連の遺伝子破壊及び挿入により操作した。健康なドナー細胞を４つのＬＮＰを用いて逐次的に処理し、各ＬＮＰを、Ｃａｓ９（配列番号６）をコードするｍＲＮＡ、及びＴＲＡＣ（Ｇ０１３００６）（配列番号７０８）、ＴＲＢＣ（Ｇ０１６２３９）（配列番号７０７）、ＣＩＩＴＡ（Ｇ０１３６７６）（配列番号７１５）、又はＨＬＡ－Ａ（Ｇ０１８９９５）（配列番号７１６）のいずれかを標的とするｓｇＲＮＡとともに製剤化した。ウィルムスの腫瘍抗原（ＷＴ１　ＴＣＲ）（配列番号７１７）を標的とするトランスジェニックＴ細胞受容体を、ＡＡＶを使用して相同性指向修復テンプレートを送達することによって、ＴＲＡＣ切断部位に組み込んだ。

【０５３３】

実施例１７．１．Ｔ細胞の調製

Ｔ細胞を、３つの健康なＨＬＡ－Ａ２＋ドナー（ＳＴＥＭＣＥＬＬ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）の白血球除去製品から単離した。Ｔ細胞を、製造者のプロトコルに従ってＥａｓｙＳｅｐヒトＴ細胞単離キット（ＳＴＥＭＣＥＬＬ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ１７９５１）を使用して単離し、Ｃｒｙｏｓｔｏｒ　ＣＳ１０（ＳＴＥＭＣＥＬＬ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ０７９３０）を使用して凍結保存した。Ｔ細胞編集を開始する前日に、細胞を解凍し、Ｔ細胞活性化培地（ＴＣＡＭ）：２．５％のヒトＡＢ血清（Ｇｅｍｉｎｉ、カタログ１００－５１２）、１×ＧｌｕｔａＭＡＸ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ、カタログ３５０５００６１）、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ、カタログ１５６３００８０）、２００Ｕ／ｍＬのＩＬ－２（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－０２）、ＩＬ－７（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－０７）、ＩＬ－１５（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－１５）を補充した、ＣＴＳ　ＯｐＴｍｉｚｅｒ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ、カタログＡ３７０５００１）中で一晩静止させた。

【０５３４】

実施例１７．２．ＬＮＰ処理及びＴ細胞の拡大

ＬＮＰを、概して、実施例１に記載されるように、５０／１０／３８．５／１．５の脂質Ａ、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧの比で調製した。ＬＮＰを、ｇＲＮＡ対ｍＲＮＡの１：２重量比により調製した。ＬＮＰを、ＡｐｏＥ含有培地中で毎日調製し、表４７及び以下に記載するようにＴ細胞に送達した。

【表５１】
表４７．Ｔ細胞操作の編集の順序

群	１日目	２日目	３日目	４日目
1	未編集	未編集	未編集	未編集
2	TRBC	CIITA	TRAC	HLA-A
3	TRBC	HLA-A	TRAC	CIITA
4	TRBC		TRAC	

【０５３５】
１日目に、表４７に示されるＬＮＰを、５ｕｇ／ｍＬの濃度で、５ｕｇ／ｍＬのｒｈＡｐｏＥ３（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ３５０－０２）を含有するＴＣＡＭ中でインキュベートした。一方、Ｔ細胞を採取し、洗浄し、１：５０希釈のＴ細胞ＴｒａｎｓＡｃｔ、ヒト試薬（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ、カタログ１３０－１１１－１６０）を有するＴＣＡＭ中で、２×１０^{6}細胞／ｍＬの密度で再懸濁した。Ｔ細胞及びＬＮＰ－ＡｐｏＥ培地を１：１の比で混合し、Ｔ細胞を培養フラスコ中に一晩プレーティングした。
【０５３６】
２日目に、表４７に示されるＬＮＰを、２５ｕｇ／ｍＬの濃度で、２０ｕｇ／ｍＬのｒｈＡｐｏＥ３（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ３５０－０２）を含有するＴＣＡＭ中でインキュベートした。次いで、ＬＮＰ－ＡｐｏＥ溶液を、１：１０の比で適切な培養物に添加した。
【０５３７】
３日目に、ＴＲＡＣ－ＬＮＰを、５ｕｇ／ｍＬの濃度で、１０ｕｇ／ｍＬのｒｈＡｐｏＥ３（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ３５０－０２）を含有するＴＣＡＭ中でインキュベートした。Ｔ細胞を採取し、洗浄し、ＴＣＡＭ中で１×１０^{6}細胞／ｍＬの密度で再懸濁した。Ｔ細胞及びＬＮＰ－ＡｐｏＥ培地を１：１の比で混合し、Ｔ細胞を培養フラスコ中にプレーティングした。次いで、ＷＴ１　ＡＡＶ（配列番号７１７）を、３×１０^{5}ゲノムコピー／細胞のＭＯＩで各群に添加した。
【０５３８】
４日目に、表４７に示されるＬＮＰを、５ｕｇ／ｍＬの濃度で、５ｕｇ／ｍＬのｒｈＡｐｏＥ３（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ３５０－０２）を含有するＴＣＡＭ中でインキュベートした。次いで、ＬＮＰ－ＡｐｏＥ溶液を、１：１の比で適切な培養物に添加した。
【０５３９】
５～１１日目に、Ｔ細胞拡大培地（ＴＣＥＭ）：５％のＣＴＳ免疫細胞血清代替物（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ、カタログＡ２５９６１０１）、１Ｘ　ＧｌｕｔａＭＡＸ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ、カタログ３５０５００６１）、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ、カタログ１５６３００８０）、２００Ｕ／ｍＬのＩＬ－２（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－０２）、ＩＬ－７（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－０７）、及びＩＬ－１５（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－１５）を補充した、ＣＴＳ　ＯｐＴｍｉｚｅｒ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ、カタログＡ３７０５００１）において、Ｔ細胞を２４ウェルＧＲＥＸプレート（Ｗｉｌｓｏｎ　Ｗｏｌｆ、カタログ８０１９２）に移入した。細胞を、製造者のプロトコルに従って拡大した。Ｔ細胞を、６日間拡大し、隔日培地交換を行った。Ｖｉ－ＣＥＬＬ細胞計数器（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）を使用して細胞を計数し、表４８に示されるように、細胞収率を出発物質で割ることによって倍率拡大を計算した。

【表５２】

表４８．多編集Ｔ細胞操作後の倍率拡大

群	ドナーA	ドナーB	ドナーC	平均	SD
1	331.40	362.24	533.18	408.94	108.69
2	61.82	72.15	116.13	83.37	28.84
3	64.08	76.29	157.75	99.37	50.92
4	データなし	146.78	331.67	239.22	130.74

【０５４０】

実施例１７．３．フローサイトメトリー及びＮＧＳによるＴ細胞編集の定量化

拡大後、編集されたＴ細胞をフローサイトメトリーによりアッセイして、ＨＬＡ－Ａ２発現（ＨＬＡ－Ａ$^{+}$）、ノックダウンＣＩＩＴＡ後のＨＬＡ－ＤＲ－ＤＰ－ＤＱ発現（ＭＨＣ　ＩＩ$^{+}$）、ＷＴ１－ＴＣＲ発現（ＣＤ３$^{+}$Ｖｂ８$^{+}$）、及び残留内因性ＴＣＲ（ＣＤ３$^{+}$Ｖｂ８$^{-}$）、又は誤対合ＴＣＲ（ＣＤ３$^{+}$Ｖｂ８^{低}）の発現を決定した。Ｔ細胞を、以下の分子を標的とする抗体カクテルとともにインキュベートした：ＣＤ４（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ３００５２４）、ＣＤ８（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ３０１０４５）、Ｖｂ８（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ３４８１０６）、ＣＤ３（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ３００３２７）、ＨＬＡ－Ａ２（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ３４３３０６）、ＨＬＡ－ＤＲＤＰＤＱ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ３６１７０６）、ＣＤ６２Ｌ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ３０４８４４）、ＣＤ４５ＲＯ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ３０４２３０）。その後、細胞を洗浄し、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアパッケージを使用してＣｙｔｏｆｌｅｘ　ＬＸ装置（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）にて分析した。編集及び挿入マーカーの発現を決定する前に、Ｔ細胞をサイズ及びＣＤ４／ＣＤ８状態にてゲーティングした。逐次Ｔ細胞操作後の関連する細胞表面タンパク質を発現する細胞のパーセンテージを、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞については表４９及び図４７Ａ～Ｆ、並びにＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞については表５０及び図４８Ａ～Ｆに示す。完全に編集されたＣＤ４$^{+}$又はＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞のパーセントを、ＣＤ３$^{+}$Ｖｂ８$^{+}$ＨＬＡ－Ａ$^{-}$ＭＨＣ　ＩＩ$^{-}$％としてゲーティングした。高レベルのＨＬＡ－Ａ及びＭＨＣ　ＩＩノックダウン、並びにＷＴ１－ＴＣＲ挿入及び内因性ＴＣＲ　ＫＯが、編集された試料において観察される。フローサイトメトリー分析に加えて、ゲノムＤＮＡを調製し、実施例１に記載されるようにＮＧＳ分析を実施して、各標的部位における編集率を決定した。表５１及び図４９Ａ～Ｄは、ＣＩＩＴＡ、ＨＬＡ－Ａ、及びＴＲＢＣ１／２遺伝子座における編集パーセントの結果を示し、群全体でフローサイトメトリーによって同定されたものと一致するパターンを有する。ＴＲＢＣ１／２遺伝子座は、全ての群で９０～９５％超に編集された。

【表５３】

表４９．逐次Ｔ細胞操作後の細胞表面表現型を有するＣＤ８＋細胞のパーセンテージ

ドナー	群	% HLA-A$^+$	% MHC II$^+$	ＷＴ１　ＴＣＲ％	誤対合ＴＣＲ％	残留内因性ＴＣＲ％	完全に編集された％
		HLA-A2$^+$	HLA-DR-DP-DQ$^+$	CD3$^+$Vb8$^+$	ＣＤ３$^+$Ｖｂ８^{低}	CD3$^+$Vb8$^-$	CD3$^+$Vb8$^+$ HLA-A2$^-$ HLA-DR-DP-DQ$^-$
A	１未編集	100.0	60.9	6.7	0.8	93.2	0.0
B		99.7	71.0	3.4	0.6	96.1	0.2
C		99.7	52.2	5.7	0.8	94.0	0.0
A	**2**	2.7	1.2	68.9	1.3	0.4	66.7
B		1.3	21.0	50.4	3.1	4.5	43.3
C		1.8	2.9	62.2	2.6	2.7	60.3
A	**3**	1.3	0.8	66.0	1.4	0.3	64.4
B		1.4	2.2	56.8	2.2	2.0	55.1
C		1.2	5.7	63.3	1.0	0.9	60.6
B	**4**	99.8	64.8	62.3	2.0	2.5	0.1
C		99.0	51.5	71.0	1.0	0.5	0.4

【表５４】

表５０．逐次Ｔ細胞操作後の細胞表面表現型を有するＣＤ４＋細胞のパーセンテージ

		% HLA-A$^+$	% MHC II$^+$	ＷＴ１　ＴＣＲ％	誤対合ＴＣＲ％	残留内因性ＴＣＲ％	完全に編集された％
ドナー	群	HLA-A2$^+$	HLA-DR-DP-DQ$^+$	CD3$^+$Vb8$^+$	ＣＤ３$^+$Ｖｂ８^{低}	CD3$^+$Vb8$^-$	CD3$^+$Vb8$^+$ HLA-A2$^-$ HLA-DR-DP-DQ$^-$
A	１未編集	100.0	36.3	5.4	0.4	94.5	0.0
B		98.7	27.6	5.6	0.4	94.3	0.0
C		99.3	32.3	6.2	0.3	93.6	0.1
A	**2**	2.6	0.7	62.4	2.4	1.1	60.9
B		1.8	0.5	59.7	2.2	1.0	58.5
C		1.7	3.2	58.6	1.6	1.8	55.8
A	**3**	1.3	0.8	63.0	3.4	0.8	61.7
B		1.1	1.1	61.8	2.6	0.9	60.6
C		1.1	0.4	60.9	1.7	1.0	59.9
B	**8**	99.5	25.1	61.9	1.9	5.2	0.1
C		97.9	40.1	69.5	4.7	1.9	0.8

【表５５】

表５１．逐次Ｔ細胞編集後のＣＩＩＴＡ、ＨＬＡ－Ａ、ＴＲＢＣ１及びＴＲＢＣ２におけるインデルパーセント

	CIITA(G013676)			HLA-A(G018995)			TRBC1(G016239)			TRBC2(G016239)		
群	ドナーA	ドナーB	ドナーC	ドナーA	ドナーB	ドナーC	ドナーA	ドナーB	ドナーC	ドナーA	ドナーB	ドナーC
1	0.2	0.2	0.2	6.9	3.3	2.3	0.1	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3
2	98.2	81.8	93.8	94.1	90.2	90.6	97.6	89.9	91.4	98.7	86.8	94.9
3	98.9	98.1	98.9	97.2	86.4	93.1	98.6	94.4	94.7	98.6	94.2	96.6
4	0.1	0.2	0.6	7.6	2.7	3.2	98.9	94	95	98.6	93.2	97.4

【０５４１】

実施例１８．Ｔ細胞に２つの挿入を伴う多編集

５つの異なるＣａｓ９編集を伴うＴ細胞の操作を実証するために、健康なドナー細胞を、Ｃａｓ９（配列番号６）をコードするｍＲＮＡ、及びＴＲＡＣ（Ｇ０１３００６）（配列番号７０８）、ＴＲＢＣ（Ｇ０１６２３９）（配列番号７０７）、ＣＩＩＴＡ（Ｇ０１３６７６）（配列番号７１５）、ＨＬＡ－Ａ（Ｇ０１８９９５）（配列番号７１６）、又はＡＡＶＳ１（Ｇ０００５６２）（配列番号７１０）のいずれかを標的とするｓｇＲＮＡとともに共製剤化された５つのＬＮＰを用いて逐次的に処理した。ＴＣＲを標的とするトランスジェニックＷＴ１を、ＡＡＶを使用して相同性指向修復テンプレート（配列番号７１７）を送達することによって、ＴＲＡＣ切断部位に部位特異的に組み込んだ。概念実証として、第２の相同修復テンプレート（配列番号７２０）を使用して、ＧＦＰを部位特異的にＡＡＶＳ１標的部位に組み込んだ。

【０５４２】

Ｔ細胞を、２つの健康なＨＬＡ－Ａ＊０２：０１＋ドナー（ＳＴＥＭＣＥＬＬ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）の白血球除去製品から単離した。Ｔ細胞を、製造者のプロトコルに従ってＥａｓｙＳｅｐヒトＴ細胞単離キット（ＳＴＥＭＣＥＬＬ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、１７９５１）を使用して単離し、Ｃｒｙｏｓｔｏｒ ＣＳ１０（ＳＴＥＭＣＥＬＬ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、０７９３０）を使用して凍結保存した。Ｔ細胞編集を開始する前日に、細胞を解凍し、Ｔ細胞活性化培地（ＴＣＡＭ：２．５％のヒトＡＢ血清（Ｇｅｍｉｎｉ、１００－５１２）、１×ＧｌｕｔａＭＡＸ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ、３５０５００６１）、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ、１５６３００８０）、２００Ｕ／ｍＬのＩＬ－２（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、２００－０２）、５ｎｇ／ｍＬのＩＬ７（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、２００－０７）、及び５ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１５（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、２００－１５）を補充した、ＣＴＳ ＯｐＴｍｉｚｅｒ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ、Ａ３７０５００１）中で一晩静止させた。

【０５４３】

実施例１８．１．ＬＮＰ処理及びＴ細胞の拡大

ＬＮＰを、概して、実施例１に記載されるように、それぞれ、イオン化脂質／コレステロール／ＤＳＰＣ／ＰＥＧのモル比として表される、５０／１０／３８．５／１．５の脂質組成物を用いて調製した。Ｔ細胞への曝露の直前に、ＬＮＰを、ＡｐｏＥ含有培地中で事前インキュベートした。逐次編集ステップ及び対照群の実験的設計は、表５２に見出される。

【表５６】
表５２－実験的設計

群	１日目	２日目	３日目	４日目	５日目	目的
未編集	なし	なし	なし	なし	なし	陰性対照
GFP-AAVのみ	なし	なし	なし	AAV-GFP	なし	GFPエピソーム発現の制御
TCR編集のみ	なし	なし	TRAC LNP+WT1 AAV	なし	TRBC	TCR置き換えの制御
五重編集	CIITA	HLA-A	TRAC LNP+WT1 AAV	AAVS1+AAV-GFP	TRBC	実験

【０５４４】
１日目：表５２に示されるＣＩＩＴＡを標的とするＬＮＰを、５ｕｇ／ｍＬのｒｈＡｐｏＥ３（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ　３５０－０２）を含有するＴＣＡＭ中で５ｕｇ／ｍＬの濃度でインキュベートした。Ｔ細胞を採取し、洗浄し、１：５０希釈のＴ細胞ＴｒａｎｓＡｃｔ、ヒト試薬（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ、１３０－１１１－１６０）を有するＴＣＡＭ中に、２ｘ１０＾６細胞／ｍＬの密度で再懸濁した。次いで、Ｔ細胞及びＬＮＰ－ＡｐｏＥ溶液を１：１の比で混合し、Ｔ細胞を培養フラスコ中に一晩プレーティングした。
【０５４５】
２日目：表５２に示されるＨＬＡ－Ａを標的とするＬＮＰを、２０ｕｇ／ｍＬのｒｈＡｐｏＥ３（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ　３５０－０２）を含有するＴＣＡＭ中で２５ｕｇ／ｍＬの濃度でインキュベートした。次いで、ＬＮＰ－ＡｐｏＥ溶液を、１：１０体積比で適切な培養物に添加した。
【０５４６】
３日目：ＴＲＡＣを標的とするＬＮＰを、５ｕｇ／ｍＬのｒｈＡｐｏＥ３（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ　３５０－０２）を含有するＴＣＡＭ中で５ｕｇ／ｍＬの濃度でインキュベートした。Ｔ細胞を採取し、洗浄し、ＴＣＡＭ中で１×１０＾６細胞／ｍＬの密度で再懸濁した。Ｔ細胞及びＬＮＰ－ＡｐｏＥ培地を１：１体積比で混合し、Ｔ細胞を培養フラスコ中にプレーティングした。次いで、ＷＴ１　ＡＡＶを、３×１０＾５ＧＣＵ／細胞のＭＯＩで各群に添加した。ＤＮＡ－ＰＫ阻害剤の化合物４を、０．２５μＭの濃度で各群に添加した。
【０５４７】
４日目：ＡＡＶＳ１を標的とするＬＮＰを、５ｕｇ／ｍＬのｒｈＡｐｏＥ３（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ　３５０－０２）を含有するＴＣＡＭ中で５ｕｇ／ｍＬの濃度でインキュベートした。一方、Ｔ細胞を採取し、洗浄し、ＴＣＡＭ中で１×１０＾６細胞／ｍＬの密度で再懸濁した。Ｔ細胞及びＬＮＰ－ＡｐｏＥ培地を１：１体積比で混合し、０．２５μＭの濃度で各群に添加した。
【０５４８】
５日目：表５２に示されるＴＲＢＣを標的とするＬＮＰを、５ｕｇ／ｍＬのｒｈＡｐｏＥ３（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ　３５０－０２）を含有するＴＣＡＭ中で５ｕｇ／ｍＬの濃度でインキュベートした。Ｔ細胞を採取し、洗浄し、ＴＣＡＭ中で１×１０＾６細胞／ｍＬの密度で再懸濁した。次いで、ＬＮＰ－ＡｐｏＥ溶液を、１：１体積比で適切な培養物に添加した。
【０５４９】

６～１１日目：Ｔ細胞を、Ｔ細胞拡大培地（ＴＣＥＭ：５％のＣＴＳ免疫細胞血清代替物（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ、Ａ２５９６１０１）、１ＸＧｌｕｔａＭＡＸ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ、３５０５００６１）、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ、１５６３００８０）、２００Ｕ／ｍＬのＩＬ－２（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、２００－０２）、５ｎｇ／ｍｌのＩＬ７（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、２００－０７）、５ｎｇ／ｍｌのＩＬ－１５（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、２００－１５）を補充したＣＴＳ　ＯｐＴｍｉｓｅｒ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ、Ａ３７０５００１））において、２４ウェルＧＲＥＸプレート（Ｗｉｌｓｏｎ　Ｗｏｌｆ、８０１９２）に移入し、製造者のプロトコルに従って拡大した。簡潔に述べると、Ｔ細胞を６日間拡大し、隔日培地交換を行った。

【０５５０】

実施例１８．２．フローサイトメトリー及びＮＧＳによるＴ細胞編集の定量化

拡大後、編集されたＴ細胞を、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ　３４３３０７）、ＨＬＡ－ＤＲ－ＤＰ－ＤＱ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ　３６１７１２）、ＷＴ１－ＴＣＲ（Ｖｂ８＋、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ　３４８１０４）、ＣＤ３ｅ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ　３００３２８）、ＣＤ４（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ　３１７４３４）、ＣＤ８（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ　３０１０４６）、及びＶｉａｋｒｏｍｅ８０８　Ｌｉｖｅ／Ｄｅａｄ（カタログＣ３６６２８）を標的とする抗体によって染色した。このカクテルを使用して、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１ノックアウト（ＨＬＡ－Ａ２－）、ＣＩＩＴＡノックアウト（ＨＬＡ－ＤＲＤＰＤＱ－）によるＨＬＡ－ＤＲ－ＤＰ－ＤＱノックダウン、ＷＴ１－ＴＣＲ挿入（ＣＤ３＋Ｖｂ８＋）、及び残留内因性ＴＣＲ（ＣＤ３＋Ｖｂ８－）を発現する細胞のパーセンテージを決定した。ＡＡＶＳ１部位への挿入は、ＧＦＰ発現をモニタリングすることによって追跡した。抗体インキュベート後、細胞を洗浄し、Ｃｙｔｏｆｌｅｘ　ＬＸ装置（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）にて処理し、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアパッケージを使用して分析した。編集及び挿入マーカーを調べる前に、Ｔ細胞をサイズ及びＣＤ４／ＣＤ８状態にてゲーティングした。編集及び挿入率は、それぞれ、ＣＤ８＋及びＣＤ４＋Ｔ細胞についての表５３及び５４に見出され得る。図５０Ａ～Ｆは、ＣＤ８＋Ｔ細胞における全ての標的の編集率のグラフを示す。全ての意図された編集（すなわち、ＷＴ１－ＴＣＲ及びＧＦＰの挿入、ＨＬＡ－Ａ及びＣＩＩＴＡのノックアウトと組み合わせたもの）を有するＴ細胞のパーセントを、ＣＤ３＋Ｖｂ８＋ＧＦＰ＋ＨＬＡ－Ａ－ＨＬＡ－ＤＲＤＰＤＱ－％としてゲーティングした。高レベルのＨＬＡ－Ａ及びＣＩＩＴＡノックアウト、並びにＧＦＰ及びＷＴ１－ＴＣＲ挿入は、両方のドナーからの五重に編集された試料において観察され、完全に編集されたＣＤ８＋Ｔ細胞の７５％超及び完全に編集されたＣＤ４＋Ｔ細胞の８５％超を得た。

【表５７】

表５３－ドナーＡ及びＢのＣＤ８＋Ｔ細胞における編集率

	未編集		GFP-AAV のみ		TCR 編集のみ		五重編集	
マーカー	A	B	A	B	A	B	A	B
GFP+	0.0	0.0	0.3	0.7	0.0	0.0	88.4	93.1
HLA-A2-	0.1	0.0	0.0	0.0	0.3	0.2	99.7	99.4
HLA-DRDPDQ-	31.9	29.6	30.0	32.0	40.5	56.7	99.0	98.7
CD3+Vb8-	93.3	96.4	94.1	95.8	0.2	0.3	1.0	0.8
CD3+Vb8+	6.0	3.5	5.5	4.0	92.3	94.3	86.7	92.1
CD3+Vb8+GFP+HLA-A-、HLA-DRDPDQ-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	76.7	84.8

【表５８】
表５４－ドナーＡ及びＢのＣＤ４＋Ｔ細胞における編集率

	未編集		GFP-AAV のみ		TCR 編集のみ		五重編集	
マーカー	A	B	A	B	A	B	A	B
GFP+	0.0	0.0	0.9	1.3	0.0	0.0	86.4	91.3
HLA-A2-	0.1	0.0	0.0	0.1	0.2	0.2	99.5	99.2
HLA-DRDPDQ-	77.0	73.6	71.3	75.0	93.1	96.1	99.2	99.1
CD3+Vb8-	94.6	94.6	94.8	94.2	0.3	0.4	1.3	1.3
CD3+Vb8+	5.1	5.1	4.9	5.4	86.3	90.9	80.7	91.0
Vb8+GFP+HLA-A-HLA-DRDPDQ-	0.6	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	86.1	90.6

【０５５１】
実施例１９．活性化されたＴ細胞及び非活性されたＴ細胞における種々のＡＰＯタンパク質による編集効率
編集の有効性を評価するために、ＴＲＢＣを標的とするＬＮＰを、活性化されたＴ細胞又は非活性されたＴ細胞への曝露の前に、様々な濃度でＡｐｏＥ３、ＡｐｏＥ４又はＡｐｏＡ１とともに事前インキュベートした。編集は、編集後のＣＤ３陰性細胞のパーセンテージの増加によってアッセイした。ＴＲＢＣ及びＣＤ３によってコードされるＴ細胞受容体ベータ鎖は両方とも、細胞表面におけるＴ細胞受容体複合体の必要な部分である。したがって、ゲノム編集によるＴＲＢＣ遺伝子の破壊は、Ｔ細胞の細胞表面上のＣＤ３タンパク質の喪失をもたらす。
【０５５２】
健康なヒトドナーレウコパクを商業的（Ｈｅｍａｃａｒｅ）に入手し、Ｔ細胞を、ＭｕｌｔｉＭＡＣＳ Ｃｅｌｌ２４ Ｓｅｐａｒａｔｏｒ Ｐｌｕｓ装置の製造者のプロトコルに従って、ＳｔｒａｉｇｈｔＦｒｏｍ（登録商標）Ｌｅｕｋｏｐａｋ（登録商標）ＣＤ４／ＣＤ８ ＭｉｃｒｏＢｅａｄｓ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ、カタログ、１３０－１２２－３５２）を使用して、ＣＤ４／ＣＤ８の陽性選択によって単離した。Ｔ細胞をバイアルに等分し、将来的な使用のためにＣｒｙｏｓｔｏｒ ＣＳ１０凍結培地（カタログ、０７９３０）に凍結保存した。
【０５５３】
解凍時、Ｔ細胞を完全なＴ細胞培地：５％のヒトＡＢ血清（Ｇｅｍｉｎｉ Ｂｉｏ製品、１００－５１２）、２００Ｕ／ｍＬのＩＬ－２（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、２００－０２）、５ｎｇ／ｍＬのＩＬ７（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、２００－０７）、５ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１５（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、２００－１５）を更に補充した、ＸＶＩＶＯ－１５培地（Ｆｉｓｈｅｒ、ＢＥ０２－０６０Ｑ）、１％のＰｅｎ－Ｓｔｒｅｐ（Ｃｏｒｎｉｎｇ、３０－００２－ＣＩ）、５０ｕＭのベーターメルカプトエタノール、及びＮ－アセチルＬ－システイン（Ｆｉｓｈｅｒ、ＩＣＮ１９４６０３２５）で構成されるＴ細胞ベース培地）中で培養した。この段階で、細胞の一部を、１：１００希釈のＴｒａｎｓＡｃｔ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ、カタログ番号１３０－１１１－１６０）の添加によって活性化した。全ての細胞を３７Ｃで４８時間培養した。ＬＮＰトランスフェクションの前に、１００，０００個のＴ細胞を、ヒト血清なしの完全なＴ細胞培地に１５～３０分間再懸濁した。
【０５５４】
培養の４８時間後、活性化されたＴ細胞及び非活性化されたＴ細胞を、Ｃａｓ９（配列番号６）をコードするｍＲＮＡ、及びＴＲＢＣ（Ｇ０１６２３９）（配列番号７０７）を標的とするｓｇＲＮＡを送達するＬＮＰを用いて処理した。ＬＮＰを、概して、実施例１のように、それぞれ、イオン化脂質Ａ／コレステロール／ＤＳＰＣ／ＰＥＧのモル比として表される、５０／９／３９．５／１．５の脂質組成物を用いて調製した。Ｔ細胞に曝露

する直前に、ＬＮＰを、血清なしのＴ細胞培地において、１０、５、２．５、１．２５、０．６３、０．３１、０．１６、及び０．０８ｕｇ／ｍＬの濃度にて、組換えヒトＡｐｏＥ３（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ番号３５０－０２）、組換えヒトＡｐｏＥ４（Ｎｏｖｕｓ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ、カタログ番号ＮＢＰ１－９９６３４－１０００ｕｇ）、又は組換えヒトＡｐｏＡ１（Ｎｏｖｕｓ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ、カタログ番号ＮＢＰ２－３４８６９－５００ｕｇ）とともに３７Ｃで約５～１５分間事前インキュベートした　組換えＡｐｏタンパク質とのインキュベートの５～１５分後、ＬＮＰを、１００，０００個のＴ細胞に４ｕｇ／ｍＬの総ＲＮＡカーゴ（１：２ｗ／ｗの比のＣａｓ９　ｍＲＮＡ及びシングルガイド）の用量で添加した。細胞を、洗浄のためにＬＮＰ処理の４８時間後にＴ細胞培地により洗浄し、新鮮な完全なＴ細胞培地により置き換えた。

【０５５５】

ＬＮＰ処理から５日後、Ｔ細胞をフローサイトメトリーによって表現型解析し、ＣＤ３タンパク質表面発現を決定した。簡潔に述べると、Ｔ細胞を、ＣＤ３を標的とする抗体（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、３００４４１）中でインキュベートした。その後、細胞を洗浄し、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアパッケージを使用してＣｙｔｏＦＬＥＸ　Ｓ装置（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）にて分析した。Ｔ細胞を、サイズ及びＣＤ３発現にてゲーティングした。表５５は、活性化されたＴ細胞のＬＮＰ処理後のＣＤ３陰性細胞のパーセントを示す。表５６は、非活性化されたＴ細胞のＬＮＰ処理後のＣＤ３陰性細胞のパーセントを示す。活性化されたＴ細胞と非活性化されたＴ細胞との両方において、ＡｐｏＥ３及びＡｐｏＥ４曝露は用量依存的様式で効率的な編集をもたらした。逆に、試験した濃度のＡｐｏＡ１タンパク質のいずれも、効率的な編集及びその後のＣＤ３表面発現の減少をもたらなさかった。

【表５９】

表５５．活性化されたＴ細胞を、明記されたレベルのＡｐｏタンパク質とともに事前インキュベートされたＬＮＰを用いて処理した後のＣＤ３陰性細胞パーセント。

アポタンパク質(ug/mL)	ApoE3		ApoE4		ApoA1	
	生物学的複製１	生物学的複製２	生物学的複製１	生物学的複製２	生物学的複製１	生物学的複製２
10.00	90.2	90.8	89.8	91.7	3.6	3.6
5.00	90.2	90.7	91.0	91.2	2.5	3.2
2.50	90.2	91	91.4	91.0	4.0	2.9
1.25	89.5	89.7	90.4	89.4	2.8	3.0
0.63	86.4	88.0	85.9	87.5	3.1	2.6
0.31	82.6	82.2	72.3	75.0	2.9	2.1
0.16	70.9	69.4	37.2	39.2	2.5	2.7
0.08	51.1	49.0	17.6	18.8	2.9	2.5

【表６０】

表５６．非活性化されたＴ細胞を、明記されたレベルのＡｐｏタンパク質とともに事前インキュベートされたＬＮＰを用いて処理した後のＣＤ３陰性細胞パーセント。

アポタンパク質(ug/mL)	ApoE3		ApoE4		ApoA1	
	生物学的複製１	生物学的複製２	生物学的複製１	生物学的複製２	生物学的複製１	生物学的複製２
10.00	78.7	76.8	82.8	79.9	5.4	3.8
5.00	69.0	66.5	76.3	78.9	6.1	4.8
2.50	60.3	61.6	73.6	77.4	6.8	3.9
1.25	58.4	63.5	74.3	78.5	4.7	4.2
0.63	58.3	58.4	72.2	72.5	6.5	6.0
0.31	60.6	61.8	63.5	67.0	4.4	3.8
0.16	58.5	56.6	52.7	54.5	5.2	3.8
0.08	54.7	56.3	49.9	43.4	4.2	6.2

【０５５６】

実施例２０．活性化されたＴ細胞及び非活性化されたＴ細胞における異なるイオン化脂質による編集効率

効率的な核酸送達を評価するために、活性化されたＴ細胞及び非活性化されたＴ細胞を、異なるイオン化脂質とともに製剤化されたＬＮＰを用いて処理し、Ｃａｓ９タンパク質発現又はＣＤ３陰性細胞のパーセントを測定した。

【０５５７】

Ｔ細胞を、実施例１９のように単離した。解凍時に、Ｔ細胞を、５％のヒトＡＢ血清（Ｇｅｍｉｎｉ、１００－５１２）、２００Ｕ／ｍＬのＩＬ－２（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、２０００－０２）、５ｎｇ／ｍｌのＩＬ７（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈｅ、２００－０７）、５ｎｇ／ｍｌのＩＬ－１５（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈｅ、２００－１５）を更に補充した、ＣＴＳ ＯｐＴｍｉｚｅｒ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ、Ａ１０４８５－０１）、１％のペン－ストレップ（ｐｅｎ－ｓｔｒｅｐ）（Ｃｏｒｎｉｎｇ、３０－００２－ＣＩ） １ＸＧｌｕｔａＭＡＸ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ、３５０５００６１）、１％のペン－ストレップ（Ｃｏｒｎｉｎｇ、３０－００２－ＣＩ） １ＸＧｌｕｔａＭＡＸ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ、３５０５００６１）、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ、１５６３００８０））で構成されるＴ細胞ベース培地構成の培地中で培養した。この段階で、細胞の一部を、１：１００希釈のＴｒａｎｓＡｃｔ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ、カタログ番号１３０－１１１－１６０）の添加によって活性化し、全ての細胞を３７Ｃで２４時間培養した。１０万個のＴ細胞を、ＣＴＳ ＯｐＴｍｉｚｅｒ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ、Ａ１０４８５－０１）、１％のペン－ストレップ（Ｃｏｒｎｉｎｇ、３０－００２－ＣＩ） １ＸＧｌｕｔａＭＡＸ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ、３５０５００６１）、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ、１５６３００８０））、更に補充された２００Ｕ／ｍＬのＩＬ－２（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、２００－０２）、５ｎｇ／ｍＬのＩＬ７（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、２００－０７）、５ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１５（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、２００－１５）で構成されるＴ細胞ベース培地中に、ＬＮＰトランスフェクションの前にヒト血清なしで１５～３０分間再懸濁した。

【０５５８】

実施例２０．１．活性化されたＴ細胞及び非活性化されたＴ細胞におけるＣａｓ９発現

培養の２４時間後、活性化されたＴ細胞及び非活性化されたＴ細胞を、Ｈｉｂｉｔ－Ｃａｓ９（配列番号７）をコードするｍＲＮＡを送達し、かつｓｇＲＮＡなしのＬＮＰを用

いて処理した。ＬＮＰを、概して、それぞれ、イオン化脂質／コレステロール／ＤＳＰＣ／ＰＥＧのモル比として表される、５０／１０／３８．５／１．５の脂質組成物中の表５７に示されるイオン化脂質を用いて、実施例１のように調製した。Ｔ細胞に曝露する直前に、ＬＮＰを、５％のヒトＡＢ血清（Ｇｅｍｉｎｉ、１００－５１２）、２００Ｕ／ｍＬのＩＬ－２（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、２００－０２）、５ｎｇ／ｍＬのＩＬ７（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、２００－０７）、５ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１５（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、２００－１５）を更に補充した、ＣＴＳ　ＯｐＴｍｉｚｅｒ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ、Ａ１０４８５－０１）、１％のペン－ストレップ（Ｃｏｒｎｉｎｇ、３０－００２－ＣＩ）　１ＸＧｌｕｔａＭＡＸ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ、３５０５００６１）、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ、１５６３００８０））で構成されるＴ細胞ベース培地中で、２０ｕｇ／ｍＬのＡｐｏＥ３（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ番号３５０－０２）とともに２０ｕｇ／ｍｌの総ＲＮＡカーゴのＬＮＰ濃度で３７Ｃで約５～１５分間事前インキュベートした。事前インキュベート後、ＬＮＰを、１００，０００個のＴ細胞に添加した。ＬＮＰ処理から４８時間後、Ｔ細胞をタンパク質発現のために採取した。

【０５５９】

採取したＴ細胞を、Ｎａｎｏ－Ｇｌｏ（登録商標）ＨｉＢｉＴ　Ｌｙｔｉｃアッセイ（Ｐｒｏｍｅｇａ）によって溶解させた。製造者のプロトコルに従って、Ｎａｎｏ－Ｇｌｏ（登録商標）ＨｉＢｉＴ細胞外検出システム（Ｐｒｏｍｅｇａ、カタログＮ２４２０）を使用することにより、Ｃａｓ９タンパク質レベルを決定した。Ｂｉｏｔｅｋ　Ｎｅｏ２プレート読み取り器を使用して発光を測定した。標準対照からのタンパク質数及び発光読み出しを使用して、線形回帰をＧｒａｐｈＰａｄ上でプロットし、ラインをＸ＝０、Ｙ＝０に強制的に通過させた。溶解物当たりのタンパク質の数を計算するために、Ｙ＝ａｘ＋０の式を使用した。試料を、活性化された細胞、１．２５ｕｇ／ｍｌの脂質Ａ製剤試料の平均に対して正規化した。表５７は、ｍＲＮＡが、異なるイオン化脂質により構成されるＬＮＰとともに送達される場合の、活性化された細胞及び非活性化された細胞における相対的なＣａｓ９タンパク質発現を示す。Ｃａｓ９は、両方の製剤条件下、並びに活性化された細胞及び非活性化された細胞において用量依存的様式で発現された。タンパク質発現は、試験した両方の製剤について、活性化された細胞においてより高かった。

【表６１】
表５７－相対的Ｃａｓ９タンパク質発現

細胞条件	LNP(ug/ml)	脂質A		脂質D	
		平均	SD	平均	SD
活性化	20.00	28.62	6.98	12.00	2.90
	10.00	20.73	0.29	5.92	0.32
	5.00	14.91	0.17	2.79	0.21
	2.50	6.33	1.05	0.93	0.08
	1.25	1.00	0.05	0.34	0.04
	0.63	0.19	0.04	0.15	0.01
	0.31	0.05	0.01	0.08	0.01
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
非活性化	20.00	0.81	0.12	0.23	0.00
	10.00	0.69	0.02	0.11	0.02
	5.00	0.68	0.07	0.09	0.01
	2.50	0.35	0.00	0.03	0.00
	1.25	0.08	0.01	0.01	0.00
	0.63	0.01	0.00	0.01	0.00
	0.31	0.00	0.00	0.01	0.00
	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00

【０５６０】
実施例２０．２．非活性化されたＴ細胞における時間的に別々にしたｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡの送達による編集の評価
Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びｓｇＲＮＡが別々の時間で送達されるときの編集有効性を評価するために、Ｔ細胞を、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びＴＲＡＣを標的とするｓｇＲＮＡを別々に製剤化したＬＮＰを用いて処理した。編集は、編集後のＣＤ３陰性細胞のパーセンテージの増加によってアッセイした。ＴＲＡＣによってコードされるＴ細胞受容体アルファ鎖は、Ｔ細胞受容体／ＣＤ３複合体アセンブリ及び細胞表面への転座に必要とされる。したがって、ゲノム編集によるＴＲＡＣ遺伝子の破壊は、Ｔ細胞の細胞表面上のＣＤ３タンパク質の喪失をもたらす。
【０５６１】
Ｔ細胞を単離し、実施例１９のように調製した。培養の２４時間後、非活性化されたＴ細胞を、Ｃａｓ９（配列番号７）をコードするｍＲＮＡのみを送達するＬＮＰ、又はＣａｓ９をコードするｍＲＮＡとＴＲＡＣを標的とするｓｇＲＮＡ　Ｇ０１３００６（配列番号７０８）との両方を送達するように共製剤化したＬＮＰのいずれかを用いて処理した。その後、操作されたＴ細胞を、初期のＬＮＰ処理の０時間後又は７２時間後に、ｓｇＲＮＡ　Ｇ０１３００６（配列番号７０８）のみを送達する脂質Ａ及びＰＥＧ－ＤＭＧとともに製剤化された第２のＬＮＰを用いて処理した。ＬＮＰを、概して、それぞれ、イオン化脂質Ａ／コレステロール／ＤＳＰＣ／ＰＥＧのモル比として表される、５０／１０／３８．５／１．５の脂質組成物中の表５８に示されるＰＥＧ脂質を用いて、実施例１のように調製した。表５８に示される用量でＴ細胞に曝露する直前に、ＬＮＰを、５％のヒト血清を有するＴ細胞ベース培地中で２０ｕｇ／ｍＬのＡｐｏＥ３（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ番号３５０－０２）とともに、３７Ｃで約５～１５分間事前インキュベートした。Ｔ細胞を、ＬＮＰ処理前に実施例２０．１に示すようにプレーティングした。ＬＮＰ処理後

、完全なＴ細胞培地を、各々、それぞれの時間点で４８時間ごとに交換し、ＣＤ３表面発現についてのＦｌｏｗ　Ｃｙｔｏｍｔｅｒｙ分析のために、０時間で処理した細胞のＬＮＰ処理後７日目に、かつ７２時間で処理した細胞の第２のＬＮＰ処理後４日目に収集した。

【０５６２】

表５８並びに図５２Ａ及び５２Ｂは、記載される非活性化されたＴ細胞の処理後のＣＤ３陰性細胞のパーセンテージを示す。共製剤化されたＬＮＰを用いて処理した細胞は、ｍＲＮＡのみのＬＮＰを用いて最初に処理した細胞よりも高いパーセンテージのＣＤ３陰性細胞を示した。より高いＣＤ３陰性パーセンテージが、ＰＥＧ－２ｋＤＭＧ又はＰＥＧ脂質Ｈ脂質製剤の両方とともに共製剤化されたカーゴについて見られた。用量依存的編集は、ｍＲＮＡのみのカーゴから０時間後又は７２時間後にｓｇＲＮＡのみのカーゴを送達したときに観察された。第２のｇＲＮＡのみのＬＮＰを、初期のＬＮＰ処理の２４時間後又は４８時間後に添加したときに、同様の用量依存的編集応答が、両方の第１の脂質製剤で観察された。

【表６２】

表５８．０時間での共製剤化又はｍＲＮＡのみの第１のＬＮＰ、及び０時間又は７２時間でのｇＲＮＡのみの第２のＬＮＰによる非活性化されたＴ細胞の処理後のＣＤ３陰性細胞パーセンテージ。

第１のLNP:	カーゴ	共製剤化 mRNA+gRNA				mRNA のみ			
	PEG	脂質 H		2k-DMG		脂質 H		2k-DMG	
第２のLNP	LNP(ug/mL)	生物学的複製 1	生物学的複製 2	生物学的複製 1	生物学的複製 2	生物学的複製 1	生物学的複製 2	生物学的複製 1	生物学的複製 2
0h	20.00	60.0	54.8	67.6	68.4	58.2	61.3	58.4	59.3
	10.00	67.2	58.4	61.6	62.8	59.2	54.1	57.5	55.0
	5.00	62.2	56.8	64.9	59.9	54.3	48.1	45.3	52.6
	2.50	58.8	50.4	45.9	53.0	36.8	42.7	36.8	37.8
	1.25	42.5	32.7	32.1	33.6	13.3	14.3	12.5	18.6
	0.63	16.8	11.4	9.1	11.7	3.2	4.1	3.3	5.4
	0.31	3.5	3.1	3.2	3.4	2.9	3.5	3.2	2.1
	0.00	1.2	1.9	1.8	1.5	1.6	1.4	2.2	1.6
72h	20.00	64.9	63.9	76.8	70.1	50.3	51.9	42.9	52.9
	10.00	70.7	69.4	71.6	76.7	57.4	47.6	51.5	46.3
	5.00	67.4	63.3	71.4	73.1	43.3	43.9	39.9	33.0
	2.50	75.4	70.4	65.5	62.6	20.3	27.8	18.7	22.6
	1.25	67.5	50.3	39.5	38.6	10.6	11.7	12.2	8.7
	0.63	32.5	26.6	14.2	16.9	6.6	7.4	5.0	9.7
	0.31	11.4	8.3	6.5	5.9	4.8	4.8	3.2	7.3
	0.00	7.4	7.1	5.6	7.5	8.9	4.7	4.0	5.7

【０５６３】

実施例２１．Ｔ細胞における脂質Ａ組成物スクリーニング

編集有効性を評価するために、Ｔ細胞を、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びＴＲＡＣ遺伝子を標的とするｓｇＲＮＡをカプセル化する脂質構成要素のモル比が異なるＬＮＰ組成物を用いて処理した。編集は、編集後のＣＤ３陰性細胞のパーセンテージの増加によってアッセイした。ＴＲＡＣによってコードされるＴ細胞受容体アルファ鎖は、Ｔ細胞受容体／ＣＤ３複合体アセンブリ及び細胞表面への転座に必要とされる。したがって、ゲノム編集によるＴＲＡＣ遺伝子の破壊は、Ｔ細胞の細胞表面上のＣＤ３タンパク質の喪失をもたらす。

【０５６４】

健康なヒトドナーのアフェレーシスを商業的（Ｈｅｍａｃａｒｅ）に入手した。ＥａｓｙＳｅｐヒトＴ細胞単離キット（Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ１７９５１）を使用して陰性選択によって、又は製造者の説明書に従ってＭｕｌｔｉＭＡＣＳ　Ｃｅｌｌ２４　Ｓｅｐａｒａｔｏｒ　Ｐｌｕｓ装置にて、ＳｔｒａｉｇｈｔＦｒｏｍ（登録商標）Ｌｅｕｋｏｐａｋ（登録商標）ＣＤ４／ＣＤ８　ＭｉｃｒｏＢｅａｄｓ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ、カタログ、１３０－１２２－３５２）を使用してＣＤ４／ＣＤ８陽性選択によって、Ｔ細胞を単離した。Ｔ細胞を、将来的な使用のためにＣｒｙｏｓｔｏｒ　ＣＳ１０凍結培地（カタログ０７９３０）に凍結保存した。

【０５６５】

解凍時に、活性化されるＴ細胞を、２００Ｕ／ｍｌのＩＬ－２、５ｎｇ／ｍｌのＩＬ７、及び５ｎｇ／ｍｌのＩＬ－１５、並びに２．５％のヒト血清（Ｇｅｍｉｎｉ、１００－５１２）を更に補充したＣＴＳ　ＯｐＴｍｉｚｅｒベース培地（１ＸＧｌｕｔａＭＡＸ、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ緩衝液（１０ｍＭ）、及び１％のペニシリン／ストレプトマイシンを補充したＣＴＳ　ＯｐＴｍｉｚｅｒ培地（Ｇｉｂｃｏ、Ａ３７０５００１））で構成される完全なＴ細胞増殖培地にプレーティングした。一晩静置させた後、１ｅ６／ｍＬの密度におけるＴ細胞を、示される場合にはＴ細胞ＴｒａｎｓＡｃｔ試薬（１：１００希釈、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）により活性化し、４８時間インキュベートした。インキュベート後、０．５ｅ６細胞／ｍＬの密度における活性化された細胞を編集用途に使用した。

【０５６６】

以下の例外を除いて、同じプロセスを非活性化されたＴ細胞に使用した。解凍時に、非活性化されたＴ細胞を、活性化することなく、５％ヒト血清により２４時間、ＣＴＳ完全増殖で培養した。次いで、Ｔ細胞を、編集用途のために、１００ｕＬの完全なＴ細胞増殖培地中に、１ｅ６／ｍＬの細胞密度でプレーティングした。

【０５６７】

Ｔ細胞を、イオン化脂質Ａ／コレステロール／ＤＳＰＣ／ＰＥＧのモル比として表される、表５９に示すような脂質組成とともに実施例１に記載のように製剤化したＬＮＰを用いてトランスフェクションした。ＬＮＰは、表５９に示される用量で、Ｃａｓ９（配列番号６）をコードするｍＲＮＡ及びＴＲＡＣを標的とするｓｇＲＮＡ（Ｇ０１３００６）（配列番号７０８）を送達した。ｓｇＲＮＡ対Ｃａｓ９　ｍＲＮＡのカーゴ比は、重量基準で１：２であった。特に指示がない限り、Ｎ：Ｐ比は約６であった。

【０５６８】

ＬＮＰ用量応答曲線（ＤＲＣ）トランスフェクションを、Ｈａｍｉｌｔｏｎ　Ｍｉｃｒｏｌａｂ　ＳＴＡＲ液体ハンドリングシステムにて実施した。液体ハンドラーには、以下のものが備え付けられた：（ａ）９６深ウェルプレートの最上段における４倍の所望の最高ＬＮＰ用量、（ｂ）２０ｕｇ／ｍＬで培地中で希釈されたＡｐｏＥ３、（ｃ）２００ＩＵ／ｍｌのＩＬ－２、５ｎｇ／ｍｌのＩＬ７及び５ｎｇ／ｍｌのＩＬ－１５、並びに２．５％のヒト血清（Ｇｅｍｉｎｉ、１００－５１２）を更に補充したＣＴＳ　ＯｐＴｍｉｚｅｒベース培地（１×ＧｌｕｔａＭＡＸ、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ緩衝液（１０ｍＭ）、及び１％のペニシリン／ストレプトマイシンを補充したＣＴＳ　ＯｐＴｍｉｚｅｒ培地（Ｇｉｂｃｏ、Ａ３７０５００１））で構成される完全なＴ細胞増殖培地、並びに（ｄ）９６ウェル平底組織培養プレート中で１００ｕＬにおいて１ｅ６／ｍｌ密度でプレーティングされたＴ細胞。液体ハンドラーは、最初に、深ウェルプレート中の４倍のＬＮＰ用量から始まるＬＮＰの８ポイントの２倍連続希釈を実施した。この後、等体積のＡｐｏＥ３培地

を各ウェルに添加し、ＬＮＰとＡｐｏＥ３との両方の１：１の希釈をもたらした。続いて、１００ｕＬのＬＮＰ－ＡｐｏＥ混合物を各Ｔ細胞プレートに添加した。最上位用量におけるＬＮＰの最終濃度は、５ｕｇ／ｍＬとなるように設定した。５ｕｇ／ｍＬでのＡｐｏＥ３及びＴ細胞の最終濃度は、０．５ｅ６細胞／ｍＬの最終密度にあった。プレートを、５％のCO_2とともに３７Ｃで７日間インキュベートし、次いでフローサイトメトリー分析のために採取した。

【０５６９】

フローサイトメトリーによって細胞表面タンパク質をアッセイするために、Ｔ細胞を、ＣＤ３（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ３００４４１）、ＣＤ４（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ３００５３８）、及びＣＤ８ａ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ３０１０４９）を標的とする抗体とともにインキュベートした。その後、Ｔ細胞をＣｙｔｏｆｌｅｘ装置（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）にて処理した。データ分析を、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアパッケージ（ｖ．１０．６．１又はｖ．１０．７．１）を使用して実施した。簡潔に述べると、Ｔ細胞をリンパ球にゲーティングし、続いて単一細胞にゲーティングした。これらの単一細胞を、ＣＤ４＋／ＣＤ８＋状態でゲーティングし、そこからＣＤ８＋／ＣＤ３－細胞を選択した。

【０５７０】

表５９及び図５３Ａは、示されるＬＮＰ組成物での活性化されたＴ細胞処理の後のＣＤ３陰性細胞を示す。表６０及び図５３Ｂは、示されるＬＮＰ組成物での非活性化されたＴ細胞処理の後のＣＤ３陰性細胞を示す。

【表６３－１】

表５９．示されるＬＮＰ製剤での活性化されたＴ細胞処理の後の平均ＣＤ３陰性細胞パーセント。

LNP 組成物	LNP(ug/mL)	平均	SD	N	EC50
50/10/38.5/1.5	5.00	95.3	0.5	2	1.55
	2.50	81.7	0.8	2	
	1.25	31.8	3.1	2	
	0.63	5.8	0.6	2	
	0.31	1.4	0.0	2	
	0.16	0.6	0.0	2	
	0.08	0.4	0.0	2	
	0.04	0.3	0.1	2	
50/5/43.5/1.5	5.00	88.8	0.2	2	1.41
	2.50	77.8	0.7	2	
	1.25	37.4	1.6	2	
	0.63	8.2	0.8	2	
	0.31	2.9	0.7	2	
	0.16	0.6	0.0	2	
	0.08	0.3	0.0	2	
	0.04	0.3	0.0	2	
45/15/38.5/1.5	5.00	97.1	0.2	2	1.41
	2.50	87.6	0.8	2	
	1.25	38.6	0.6	2	
	0.63	6.6	0.7	2	
	0.31	1.3	0.2	2	
	0.16	0.4	0.1	2	
	0.08	0.3	0.1	2	
	0.04	0.2	0.1	2	
45/5/48.5/1.5	5.00	90.2	1.1	2	1.42
	2.50	76.7	0.0	2	
	1.25	38.5	0.9	2	
	0.63	8.5	0.5	2	
	0.31	1.5	0.3	2	
	0.16	0.5	0.0	2	

【表６３－２】

LNP 組成物	LNP(ug/mL)	平均	SD	N	EC50
	0.08	0.5	0.1	2	
	0.04	0.5	0.2	2	
40/10/48.5/1.5	5.00	94.0	1.7	2	0.93
	2.50	89.7	1.2	2	
	1.25	66.5	0.8	2	
	0.63	24.5	0.2	2	
	0.31	6.8	0.2	2	
	0.16	2.2	0.2	2	
	0.08	0.8	0.1	2	
	0.04	0.6	0.0	2	
30/10/58.5/1.5	5.00	4.7	0.2	2	6.43
	2.50	3.1	0.8	2	
	1.25	1.6	0.3	2	
	0.63	1.1	0.0	2	
	0.31	0.7	0.1	2	
	0.16	0.6	0.0	2	
	0.08	0.3	0.0	2	
	0.04	0.3	0.0	2	
30/5/63.5/1.5	5.00	52.0	1.6	2	3.19
	2.50	34.3	2.7	2	
	1.25	26.0	0.4	2	
	0.63	15.6	0.2	2	
	0.31	7.3	0.4	2	
	0.16	2.9	0.2	2	
	0.08	1.3	0.1	2	
	0.04	0.4	0.1	2	
55/5/38.5/1.5	5.00	67.0	2.0	2	2.68
	2.50	36.7	0.5	2	
	1.25	9.8	1.1	2	
	0.63	2.6	0.1	2	
	0.31	0.6	0.2	2	
	0.16	0.4	0.1	2	

【表６３－３】

LNP 組成物	LNP(ug/mL)	平均	SD	N	EC50
	0.08	0.1	0.1	2	
	0.04	0.3	0.1	2	
55/10/33.5/1.5	5.00	89.2	0.6	2	2.30
	2.50	54.6	1.1	2	
	1.25	7.3	0.2	2	
	0.63	1.4	0.1	2	
	0.31	0.5	0.2	2	
	0.16	0.3	0.1	2	
	0.08	0.2	0.1	2	
	0.04	0.2	0.1	2	
65/5/28.5/1.5	5.00	0.2	0.1	2	0.50
	2.50	0.2	0.0	2	
	1.25	0.3	0.0	2	
	0.63	0.4	0.1	2	
	0.31	0.2	0.0	2	
	0.16	0.1	0.1	2	
	0.08	0.3	0.0	2	
	0.04	0.3	0.1	2	
50/10/38.5/1.5(N/P:5.0)	5.00	95.6	0.1	2	1.17
	2.50	90.0	1.0	2	
	1.25	53.4	1.3	2	
	0.63	16.4	1.7	2	
	0.31	4.5	0.2	2	
	0.16	1.8	0.1	2	
	0.08	0.5	0.0	2	
	0.04	0.6	0.1	2	
50/10/38.5/1.5(N/P:7.0)	5.00	97.7	0.1	2	0.90
	2.50	93.5	0.2	2	
	1.25	73.0	0.9	2	
	0.63	24.0	0.2	2	
	0.31	5.5	0.1	2	
	0.16	1.5	0.5	2	

【表６３－４】

LNP 組成物	LNP(ug/mL)	平均	SD	N	EC50
	0.08	0.9	0.3	2	
	0.04	0.6	0.1	2	

【表６４－１】

表６０．示されるＬＮＰ製剤での非活性化されたＴ細胞処理の後の平均ＣＤ３陰性細胞パーセント。

LNP 組成物	LNP 用量 (ug/mL)	平均 CD3-%	SD	N	EC50
50/10/38.5/1.5	5.00	69.7	0.9	2	1.21
	2.50	65.1	1.3	2	
	1.25	41.3	8.9	2	
	0.63	11.1	4.0	2	
	0.31	10.2	0.5	2	
	0.16	8.1	1.5	2	
	0.08	9.9	2.0	2	
	0.04	7.2	2.5	2	
50/5/43.5/1.5	5.00	47.6	3.6	2	4.71
	2.50	30.0	5.0	2	
	1.25	20.1	2.9	2	
	0.63	11.4	2.3	2	
	0.31	9.8	1.3	2	
	0.16	9.1	0.0	2	
	0.08	9.3	0.8	2	
	0.04	7.9	3.6	2	
45/15/38.5/1.5	5.00	83.1	1.5	2	1.36
	2.50	73.0	3.1	2	
	1.25	43.4	6.8	2	
	0.63	19.4	3.4	2	
	0.31	11.7	2.4	2	
	0.16	8.9	1.3	2	
	0.08	9.0	1.6	2	
	0.04	9.5	2.9	2	
45/5/48.5/1.5	5.00	49.0	1.7	2	2.99
	2.50	33.7	6.3	2	
	1.25	25.8	2.3	2	
	0.63	14.7	1.0	2	
	0.31	9.8	0.7	2	

【表６４－２】

LNP 組成物	LNP 用量 (ug/mL)	平均 CD3-%	SD	N	EC50
	0.16	11.2	3.9	2	
	0.08	10.2	1.9	2	
	0.04	9.5	2.5	2	
40/10/48.5/1.5	5.00	60.5	3.2	2	0.66
	2.50	61.6	4.4	2	
	1.25	57.9	6.7	2	
	0.63	34.0	7.9	2	
	0.31	12.1	0.8	2	
	0.16	10.4	1.2	2	
	0.08	13.7	0.4	2	
	0.04	10.4	4.7	2	
30/10/58.5/1.5	5.00	11.0	0.1	2	利用不可
	2.50	11.3	2.9	2	
	1.25	8.0	0.5	2	
	0.63	11.3	0.5	2	
	0.31	10.3	0.7	2	
	0.16	9.3	1.3	2	
	0.08	10.8	0.8	2	
	0.04	10.7	5.1	2	
30/5/63.5/1.5	5.00	26.7	1.0	2	0.37
	2.50	18.9	0.1	2	
	1.25	19.6	1.5	2	
	0.63	23.0	1.2	2	
	0.31	15.4	0.5	2	
	0.16	11.8	3.5	2	
	0.08	12.5	0.3	2	
	0.04	9.9	3.4	2	
55/5/38.5/1.5	5.00	24.6	1.0	2	2.50
	2.50	18.0	2.4	2	
	1.25	10.1	2.2	2	
	0.63	12.4	3.2	2	

【表６４－３】

LNP 組成物	LNP 用量 (ug/mL)	平均 CD3-%	SD	N	EC50
	0.31	9.5	3.2	2	
	0.16	10.4	1.3	2	
	0.08	11.4	1.5	2	
	0.04	12.4	2.7	2	
55/10/33.5/1.5	5.00	61.0	3.7	2	1.57
	2.50	53.6	6.5	2	
	1.25	26.5	7.3	2	
	0.63	12.4	2.4	2	
	0.31	13.1	5.7	2	
	0.16	9.9	2.9	2	
	0.08	0.4	1.5	2	
	0.04	10.1	3.0	2	
65/5/28.5/1.5	5.00	14.7	0.8	2	6.05
	2.50	8.6	1.6	2	
	1.25	10.9	2.9	2	
	0.63	10.7	1.1	2	
	0.31	12.0	3.8	2	
	0.16	10.4	4.8	2	
	0.08	10.6	0.6	2	
	0.04	8.9	2.2	2	
50/10/38.5/1.5 (N/P:5.0)	5.00	74.4	2.3	2	1.30
	2.50	69.6	7.9	2	
	1.25	40.5	7.2	2	
	0.63	19.5	0.3	2	
	0.31	8.9	3.2	2	
	0.16	9.3	1.1	2	
	0.08	9.9	0.2	2	
	0.04	14.3	14.3	2	
50/10/38.5/1.5 (N/P:7.0)	5.00	76.0	0.5	2	0.77
	2.50	68.4	2.1	2	
	1.25	65.4	3.8	2	

【表６４－４】

LNP 組成物	LNP 用量 (ug/mL)	平均 CD3-%	SD	N	EC50
	0.63	27.9	4.9	2	
	0.31	12.1	1.9	2	
	0.16	9.3	0.5	2	
	0.08	10.5	2.2	2	
	0.04	0.0	0.0	2	

【０５７１】

実施例２２．選択されたＬＮＰ組成物のカーゴ比評価

編集有効性を評価するために、Ｔ細胞を、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びＴＲＡＣ遺伝子を標的とするｓｇＲＮＡの比が異なるＬＮＰ組成物を用いて処理した。編集は、編集後のＣＤ３陰性細胞のパーセンテージの増加によってアッセイした。ＴＲＡＣによってコードされるＴ細胞受容体アルファ鎖は、Ｔ細胞受容体／ＣＤ３複合体アセンブリ及び細胞表面への転座に必要とされる。したがって、ゲノム編集によるＴＲＡＣ遺伝子の破壊は、Ｔ細胞の細胞表面上のＣＤ３タンパク質の喪失をもたらす。

【０５７２】

実施例２２．１．活性化されたＴ細胞におけるカーゴ比評価

ＬＮＰ組成物をインビトロで試験して、ＣＤ３＋Ｔ細胞におけるＬＮＰの編集効率に対する様々なカーゴ比の影響を評価した。ＬＮＰは、Ｃａｓ９（配列番号７）をコードするｍＲＮＡ、及びヒトＴＲＡＣ（Ｇ０１３００６）（配列番号７０８）を標的とするｓｇＲＮＡを送達した。ＬＮＰを、実施例１に記載されるように、それぞれ、イオン化脂質Ａ／コレステロール／ＤＳＰＣ／ＰＥＧのモル比として表される、５０／１０／３８／１．５又は３５／１５／４７．５／２．５の脂質組成物において製剤化した。ｓｇＲＮＡ対Ｃａｓ９　ｍＲＮＡのカーゴ比は、重量基準で１：２、１：１、２：１、又は４：１であった。

【０５７３】

Ｔ細胞を実施例２１に記載されるように培養し、調製し、活性化した。活性化から４８時間後、活性化されたＴ細胞を、実施例２１記載されるように事前インキュベートされたＬＮＰを用いてトランスフェクションした。トランスフェクションから７日後、Ｔ細胞を、実施例２１に記載されるようにフローサイトメトリー分析によって表現型解析した。結果を表６１及び図５４に示す。用量依存的編集は、両方の脂質製剤のＬＮＰにより処理された活性化されたＴ細胞において見られた。

【表６５－１】

表６１．様々なカーゴ比によるＬＮＰでの活性化されたＴ細胞処理の後のＣＤ３陰性細胞パーセント

脂質組成	カーゴ比	LNP(ug/mL)				
			平均	SD	N	EC50
50/10/38.5/1.5	1:2	5	95.4	0.6	2	0.98
		2.5	93.0	0.9	2	
		1.25	68.4	2.9	2	
		0.63	17.1	2.2	2	
		0.31	4.7	0.7	2	
		0.16	1.3	0.1	2	
		0.08	0.9	0.0	2	
		0.04	0.3	0.0	2	
	1:1	5	95.7	0.3	2	0.89
		2.5	92.8	1.0	2	
		1.25	74.4	1.0	2	
		0.63	22.1	2.6	2	
		0.31	5.4	0.3	2	
		0.16	1.8	0.4	2	
		0.08	0.8	0.1	2	
		0.04	0.4	0.1	2	
	2:1	5	95.4	0.6	2	0.89
		2.5	92.5	1.0	2	
		1.25	75.2	2.4	2	
		0.63	21.5	2.7	2	
		0.31	5.0	0.1	2	
		0.16	1.8	0.5	2	
		0.08	0.8	0.2	2	
		0.04	0.6	0.1	2	
	4:1	5	94.3	0.4	2	1.18
		2.5	89.2	0.2	2	
		1.25	52.4	0.2	2	
		0.63	11.3	1.2	2	
		0.31	2.4	0.2	2	
		0.16	0.7	0.1	2	

【表６５－２】

脂質組成	カーゴ比	LNP(ug/mL)	平均	SD	N	EC50
		0.08	0.7	0.2	2	
		0.04	0.4	0.1	2	
35/15/47.5/2.5	1:2	5	97.3	0.5	2	0.29
		2.5	96.3	0.3	2	
		1.25	93.8	0.6	2	
		0.63	84.7	0.8	2	
		0.31	53.8	2.3	2	
		0.16	22.2	0.4	2	
		0.08	8.6	0.2	2	
		0.04	2.6	0.0	2	
	1:1	5	97.2	0.8	2	0.19
		2.5	97.1	1.0	2	
		1.25	96.9	0.2	2	
		0.63	93.7	0.4	2	
		0.31	76.8	2.9	2	
		0.16	42.1	0.7	2	
		0.08	15.9	0.7	2	
		0.04	5.8	0.1	2	
	2:1	5	97.2	0.7	2	0.24
		2.5	97.1	0.4	2	
		1.25	96.0	0.4	2	
		0.63	92.4	0.8	2	
		0.31	67.1	1.2	2	
		0.16	25.4	1.3	2	
		0.08	7.3	0.3	2	
		0.04	2.4	0.1	2	
	4:1	5	97.6	0.3	2	0.21
		2.5	97.3	0.5	2	
		1.25	96.2	0.6	2	
		0.63	94.9	0.3	2	
		0.31	73.8	1.6	2	
		0.16	33.1	0.9	2	

【表６５－３】

脂質組成	カーゴ比	LNP(ug/mL)	平均	SD	N	EC50
		0.08	9.5	0.1	2	
		0.04	3.3	0.5	2	

【０５７４】

実施例２２．２．非活性化されたＴ細胞におけるカーゴ比評価

ＬＮＰの編集効率に対する様々なカーゴ比の影響を、非活性化されたＣＤ３＋Ｔ細胞で試験した。この研究では、実施例２２．１に記載される選択されたＬＮＰ組成物を使用した。Ｔ細胞を２人のドナーから入手し、各ドナーからの試料を実施例２１に記載のように調製した。非活性化されたＴ細胞を２４時間培養した後、それを、実施例２１に記載されるように事前インキュベートされたＬＮＰを用いてトランスフェクションした。トランスフェクションから７日後、Ｔ細胞を、実施例２１に記載されるようにフローサイトメトリー分析によって表現型解析した。

【０５７５】

編集されたＴ細胞を、実施例２１に記載されるようにフローサイトメトリーによって表現型解析し、ＬＮＰ組成物の編集効率に対する各カーゴ比の影響を評価した。結果を表６２及び図５５Ａ～Ｂに示す。用量依存的編集は、両方の脂質製剤のＬＮＰにより処理された非活性化されたＴ細胞において見られた。

【表６６－１】

表６２．様々なカーゴ比によるＬＮＰでの非活性化されたＴ細胞処理の後のＣＤ３陰性細胞パーセント

脂質組成	カーゴ比	LNP(ug/mL)	ドナー1				ドナー2			
			平均	SD	N	EC50	平均	SD	N	EC50
50/10/38.5/1.5	1:2	5	61.3	0.1	2	1.99	86.6	0.0	2	1.63
		2.5	44.1	0.1	2		70.2	0.0	2	
		1.25	13.3	0.0	2		36.7	0.0	2	
		0.63	4.9	0.0	2		11.5	0.0	2	
		0.31	2.1	0.0	2		12.3	0.1	2	
		0.16	1.5	0.0	2		13.5	0.0	2	
		0.08	1.5	0.0	2		11.4	0.0	2	
		0.04	1.6	0.0	2		7.8	0.0	2	
	1:1	5	65.5	0.0	2	1.86	84.1	0.0	2	1.70
		2.5	50.7	0.1	2		70.6	0.0	2	
		1.25	14.9	0.0	2		29.2	0.0	2	
		0.63	5.2	0.0	2		14.9	0.1	2	
		0.31	1.9	0.0	2		12.5	0.0	2	
		0.16	2.1	0.0	2		8.4	0.0	2	
		0.08	2.3	0.0	2		8.2	0.0	2	
		0.04	1.9	0.0	2		8.2	0.0	2	
	2:1	5	59.3	0.0	2	1.94	79.8	0.0	2	1.82
		2.5	43.5	0.1	2		63.1	0.1	2	
		1.25	13.9	0.0	2		25.6	0.0	2	
		0.63	2.4	0.0	2		9.8	0.0	2	
		0.31	2.4	0.0	2		7.7	0.0	2	
		0.16	2.5	0.0	2		9.9	0.0	2	
		0.08	2.1	0.0	2		10.2	0.0	2	
		0.04	3.1	0.0	2		9.7	0.0	2	
	4:1	5	42.6	0.1	2	2.96	64.1	0.0	2	2.62
		2.5	18.1	0.0	2		38.6	0.0	2	
		1.25	4.0	0.0	2		16.0	0.1	2	
		0.63	2.0	0.0	2		9.6	0.0	2	
		0.31	1.7	0.0	2		9.1	0.0	2	
		0.16	2.7	0.0	2		7.9	0.0	2	
		0.08	2.7	0.0	2		10.6	0.0	2	

【表６６－２】

脂質組成	カーゴ比	LNP(ug/mL)	ドナー1				ドナー2			
			平均	SD	N	EC50	平均	SD	N	EC50
		0.04	1.9	0.0	2		11.0	0.0	2	
35/15/47.5/2.5	1:2	5	71.4	0.0	2	0.65	91.3	0.0	2	0.51
		2.5	69.6	0.0	2		86.4	0.0	2	
		1.25	61.8	0.0	2		80.5	0.0	2	
		0.63	34.7	0.0	2		60.6	0.0	2	
		0.31	10.8	0.0	2		25.5	0.0	2	
		0.16	3.5	0.0	2		11.6	0.0	2	
		0.08	2.0	0.0	2		12.6	0.0	2	
		0.04	2.3	0.0	2		7.4	0.0	2	
	1:1	5	76.5	0.1	2	0.57	94.1	0.0	2	0.39
		2.5	80.0	0.0	2		91.4	0.0	2	
		1.25	70.9	0.0	2		90.7	0.0	2	
		0.63	45.8	0.0	2		72.4	0.0	2	
		0.31	15.9	0.0	2		40.0	0.0	2	
		0.16	5.3	0.0	2		17.9	0.0	2	
		0.08	3.9	0.0	2		9.7	0.0	2	
		0.04	2.8	0.0	2		8.8	0.0	2	
	2:1	5	69.2	0.1	2	0.66	92.6	0.0	2	0.61
		2.5	66.5	0.0	2		84.3	0.0	2	
		1.25	53.8	0.1	2		82.2	0.0	2	
		0.63	36.5	0.1	2		51.7	0.0	2	
		0.31	7.2	0.0	2		22.3	0.1	2	
		0.16	3.0	0.0	2		17.7	0.1	2	
		0.08	2.5	0.0	2		9.8	0.0	2	
		0.04	1.9	0.0	2		11.5	0.0	2	
	4:1	5	66.1	0.0	2	0.53	89.4	0.0	2	0.50
		2.5	65.0	0.1	2		87.1	0.0	2	
		1.25	58.8	0.0	2		79.9	0.0	2	
		0.63	44.4	0.1	2		64.5	0.0	2	
		0.31	7.8	0.0	2		22.8	0.1	2	
		0.16	2.9	0.0	2		9.7	0.0	2	
		0.08	2.4	0.0	2		14.5	0.1	2	
		0.04	2.9	0.0	2		10.5	0.0	2	

【０５７６】

実施例２３．脂質ナノ粒子を使用するＢ細胞における編集

実施例２３．１．Ｂ細胞活性化

遺伝子編集のための効率的な脂質トランスフェクションと適合する最適なＢ細胞培養及び活性化条件を決定するために、本発明者らは、種々の条件下で培養されたＢ細胞におけるＣＤ８６及び低密度リポタンパク質受容体（ＬＤＬＲ）の表面発現を比較した。ＣＤ８６は、Ｂ細胞が活性化されるとＢ細胞上で上方制御される共刺激受容体であり、一方でＬＤＬＲは、ＡｐｏＥ媒介性ＬＮＰ取り込みに関与することが示されている。

【０５７７】

健康なヒトドナーＰＢＭＣを商業的（Ｈｅｍａｃａｒｅ）に入手し、Ｂ細胞を、ＱｕａｄｒｏＭＡＣＳ分離器（Ｍｉｌｔｅｎｉ　Ｂｉｏｔｅｃ、カタログ、１３０－０９１－０５１）にてＬＳカラム（Ｍｉｌｔｅｎｉ　Ｂｉｏｔｅｃ、１３０－０４２－４０１）を使用し、製造者のプロトコルに従ってＣＤ１９　ＭｉｃｒｏＢｅａｄｓ（Ｍｉｌｔｅｎｉ　Ｂｉｏｔｅｃ、カタログ、１３０－０５０－３０１）を使用して、ＣＤ１９陽性選択によって単離した。

【０５７８】

実施例２３．１．１．Ｂ細胞培養培地の調製

以下で使用するＢ細胞培養培地組成物を、表６３及び６４に記載する。「ＩＭＤＭベース培地」は、１％のペニシリン／ストレプトマイシンを補充したＩＭＤＭ培地からなる。「ＳｔｅｍＳｐａｎ　ＳＦＥＭベース培地」は、１％のペニシリン／ストレプトマイシンを補充したＳｔｅｍＳｐａｎ　ＳＦＥＭ培地からなる。上述の構成要素に加えて、培地は血清、サイトカイン、及び活性化因子を含有し得る。培地構成要素を表６３に記載し、Ｂ細胞培養培地組成物を表６４に記載する。

【表６７】

表６３．培地構成要素

培地構成要素		濃度	供給業者	カタログ番号
塩基	IMDM		Corning	10-016-CV
	ペニシリン/ストレプトマイシン	1%	Corning	30-002-CI
塩基	StemSpan SFEM		StemCell Technologies	9650
	ペニシリン/ストレプトマイシン	1%	Corning	30-002-CI
血清	ウシ胎児血清(FBS)	10%	Gibco	A3840201
	ヒトAB血清(HABS)	5%	Gemini Bio-Products	100-512
サイトカイン	hIL-2	50ng/ml	Peprotech	200-02
	hIL-4	200U/ml	Stemcell	78147.1
	hIL-10	50ng/ml	Peprotech	200-10
	hIL-15	10ng/ml	Peprotech	200-15
	hIL-21	20ng/mL	Peprotech	200-21
活性化因子	BAFF	10ng/ml	R&D	2149-BF-010
	rhInsulin	5μg/ml	Sigma	91077C
	rhTransferrin	50μg/mL トランスフェリン	Sigma	T8158
	MEGACD40L	1又は10又は100ng/ml	Enzo Life Sciences	ALX-522-110-C010
	CpG ODN 2006	1μg/mL	Invivogen	TLR-2006

【表６８】
表６４．Ｂ細胞培地組成物

Ｂ細胞培地	ベース培地(+ペン/ストレップ)	サイトカイン	サプリメント及び活性化因子	血清
1	StemSpan	なし	なし	10% FBS
2	StemSpan	IL-4	BAFF	10% FBS
3	StemSpan	IL-2、IL-10、IL-15	CpG ODN	10% FBS
4	StemSpan	IL-2、IL-10、IL-15、IL-21	インスリン、トランスフェリン	10% FBS
5	IMDM	なし	なし	10% FBS
6	IMDM	IL-4	BAFF	10% FBS
7	IMDM	IL-2、IL-10、IL-15	CpG ODN	10% FBS
8	IMDM	IL-2、IL-10、IL-15、IL-21	インスリン、トランスフェリン	10% FBS
9	StemSpan	IL-2、IL-10、IL-15	CpG ODN	5% HABS

【０５７９】
ＭＡＣＳ単離後、１、１０、又は１００ｎｇ／ｍｌのＭＥＧＡＣＤ４０Ｌを補充した表６４に記載されているようなＢ細胞培地１、２、３、５、６、又は７中で、１００，０００細胞／ウェルで二重に培養することにより、Ｂ細胞を活性化した。
【０５８０】
活性化後５日目に、Ｂ細胞をフローサイトメトリーによって表現型解析し、ＣＤ８６及びＬＤＬＲの表面発現を決定した。簡潔に述べると、Ｂ細胞を、ＣＤ２０（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、３０２３２２）、ＣＤ８６（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、３７４２１６）、及びＬＤＬＲ（ＢＤ、５６５６５３）を標的とする抗体とともにインキュベートした。その後、細胞を生存性色素（ＤＡＰＩ、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、４２２８０１）により染色し、洗浄し、Ｃｙｔｏｆｌｅｘ装置（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ）にて処理し、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアパッケージを使用して分析した。Ｂ細胞をサイズ及び生存状態にてゲーティングし、続いてＣＤ２０発現を行い、続いてＣＤ２０＋細胞にＣＤ８６及びＬＤＬＲ発現を行った。表６５及び図５６Ａ～Ｄは、Ｂ細胞中のＣＤ８６＋細胞のパーセンテージ及びＬＤＬＲ＋細胞のパーセンテージを示す。
【０５８１】
ベース培地中の１００ｎｇ／ｍにおけるＭＥＧＡＣＤ４０Ｌは、追加の活性化物質又はサイトカインなしで、ＣＤ８６又はＬＤＬＲの上方制御をもたらした。ＣＤ８６＋及びＬＤＬＲ＋細胞は、ＭＥＧＡＣＤ４０Ｌの依存的様式でＩＬ－４及びＢＡＦＦを添加により増加した。ＣｐＧ ＯＤＮ、ＩＬ－２、ＩＬ－１０及びＩＬ－１５での補充は、ＣＤ４０Ｌのレベルに関係なく、高いパーセンテージのＣＤ８６＋及びＬＤＬＲ＋細胞をもたらす。これらの傾向は、ＩＭＤＭ及びＳｔｅｍＳｐａｎ培地全体で一貫していた。

【表６９】

表６５－Ｂ細胞におけるＣＤ８６及びＬＤＬＲ発現

B細胞培地	CD40L(ng/ml)	CD86+%		LDLR+%	
		平均	SD	平均	SD
番号1(StemSpan)	1	13.05	4.17	8.46	2.07
	10	18.50	0.57	13.90	0.99
	100	59.15	6.58	55.10	5.09
番号2(StemSpan+IL-4+BAFF)	1	64.65	4.60	33.90	3.11
	10	74.50	3.11	37.95	1.06
	100	84.15	7.57	57.00	5.09
番号3(StemSpan+IL-2/10/15+CpG ODN)	1	73.20	1.27	89.50	3.96
	10	77.10	4.81	83.85	12.94
	100	82.70	2.83	78.95	3.46
番号5(IMDM)	1	8.71	1.16	5.60	0.52
	10	10.87	2.45	8.23	2.14
	100	33.55	1.63	30.95	4.45
番号6(IMDM+IL-4+BAFF)	1	52.65	1.06	33.15	0.64
	10	60.35	4.74	38.80	2.69
	100	88.15	0.78	62.55	2.33
番号7(IMDM+IL-2/10/15+CpG ODN)	1	81.85	1.06	76.35	1.63
	10	80.40	0.57	74.65	0.21
	100	77.45	1.20	71.70	2.26

【０５８２】

実施例２３．２．Ｂ細胞拡大

一次活性化後、Ｂ細胞は、大量のタンパク質を分泌する能力を獲得するために、形質芽球、次いで形質細胞への分化を受けなければならない。Ｂ細胞が形質細胞に分化すると、拡大は停止する。したがって、操作プロセス中、一次Ｂ細胞活性化及び形質芽球分化（二次活性化）の段階中にＢ細胞拡大を最大化することが重要である。Ｂ細胞拡大及び形質細胞に対する分化の改善のための培地条件を決定するために、本発明者らは、Ｂ細胞を種々の培地で培養し、初期の培養の７日後及び１４日後に倍率拡大を測定した。

【０５８３】

簡潔に述べると、Ｂ細胞を、実施例２３．１に記載されるようにＰＢＭＣから単離した。ＭＡＣＳ単離後、ＣＤ１９＋Ｂ細胞を、１、１０、又は１００ｎｇ／ｍｌのＭＥＧＡＣＤ４０Ｌを補充した表６４に記載されているようなＢ細胞培地３、又はＢ細胞培地７中で、１，０００，０００細胞／ウェルで二重に培養した。形質芽球へのＢ細胞分化を誘導し、拡大を測定するために、Ｂ細胞を、１、１０、又は１００ｎｇ／ｍｌのＭＥＧＡＣＤ４０Ｌを補充したＢ細胞培地４又はＢ細胞培地８中で、１００，０００細胞／ウェルで培養した。活性化後７日目及び１４日目にＶｉ－ＣＥＬＬ細胞計数器（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）を使用して細胞を計数し、倍率拡大を、細胞収率を活性化時の開始細胞計数で割ることによって計算した。

【０５８４】

拡大結果を表６６及び６７、並びに図５７Ａ～Ｂに示す。一次拡大に関して、倍率拡大

は、表６６及び図５７Ａに見られるように、１００ｎｇ／ｍｌのＭＥＧＡＣＤ４０ＬでＳｔｅｍＳｐａｎで培養したＢ細胞において最も高かった。拡大は、培地に関係なく、より少量のＭＥＧＡＣＤ４０Ｌによって有意により低い。ＩＭＤＭ中の培養は、ＳｔｅｍＳｐａｎと比較して、試験した全ての条件にわたってより低い拡大率をもたらした。ＳｔｅｍＳｐａｎにおけるＢ細胞培養及び形質芽球分化は、より高いＭＥＧＡＣＤ４０Ｌ濃度における培養と同様に、ＩＭＤＭと比較してより高い倍率拡大をもたらした。追加の試験では、ＦＢＳの代わりにＳｔｅｍｓｐａｎベース培地及びヒト血清を使用して、およそ２０倍の拡大を達成した。

【表７０】

表６６－一次活性化後のＢ細胞倍数拡大

		Stemspan		IMDM	
伸長	CD40L(ng/ml)	複製１	複製２	複製１	複製２
一次拡大 7日目	100	21.42	24.08	5.81	5.32
	10	10.5	8.12	3.22	2.59
	1	3.5	5.04	2.87	1.96
一次拡大 14日目	100	33.81	41.58	14.21	17.5
	10	23.38	17.99	6.51	6.02
	1	8.82	10.43	2.94	2.8

【表７１】

表６７－二次活性化後のＢ細胞倍率拡大

		Stemspan		IMDM	
伸長	CD40L(ng/ml)	複製１	複製２	複製１	複製２
二次拡大 7日目	100	18.08	15.04	7.36	8.32
	10	7.68	5.76	4.8	3.52
	1	2.24	4.96	2.88	2.4
二次拡大 14日目	100	42.68	32.34	10.78	15.4
	10	13.2	15.4	3.96	5.5
	1	14.08	2.64	2.42	1.738

【０５８５】

実施例２３．３．活性化されたＢ細胞における脂質スクリーニング

異なるイオン化脂質又はＰＥＧ脂質とともに製剤化されたＬＮＰを、Ｂ細胞編集有効性について試験した。

【０５８６】

健康なヒトドナーからのレウコパクを商業的（Ｈｅｍａｃａｒｅ）に入手し、Ｂ細胞を、ＭｕｌｔｉＭＡＣＳ Ｃｅｌｌ２４ Ｓｅｐａｒａｔｏｒ Ｐｌｕｓ装置にてＳｔｒａｉｇｈｔＦｒｏｍ Ｌｅｕｋｏｐａｋ ＣＤ１９ ＭｉｃｒｏＢｅａｄキット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ、１３０－１１７－０２１）を使用して、ＣＤ１９陽性選択によって単離した。ＭＡＣＳ単離後、ＣＤ１９＋Ｂ細胞を、各々、１００ｎｇ／ｍｌのＭＥＧＡＣＤ４０Ｌを補充したＢ細胞培地３又はＢ細胞培地７中で活性化した。活性化後の２日目に、Ｂ細胞を、Ｃａｓ９ ｍＲＮＡ及びＴＲＡＣを標的とするｇＲＮＡ Ｇ０１３００６（配列番号７０８）を送達するＬＮＰを用いて処理した。ＬＮＰを、概して、それぞれ、イオン化脂質／コレステロール／ＤＳＰＣ／ＰＥＧのモル比として表される脂質組成物を用いて、表６

８に記載のイオン化脂質及びＰＥＧ脂質を使用して実施例１のように調製した。ＬＮＰを、１０％のＦＢＳ（Ｇｉｂｃｏ、Ａ３８４０２０１）を補充したＩＭＤＭ又はＳｔｅｍＳｐａｎベース培地中で、１０μｇ／ｍｌの総ＲＮＡカーゴで１μｇ／ｍｌのＡｐｏＥ３（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、３５０－０２）とともに１５分間事前インキュベートした。事前インキュベートしたＬＮＰを、Ｂ細胞に対して１：１のｖ／ｖ比で添加し、Ｂ細胞培地３又は７において、表６８に示すように、５μｇ／ｍｌの総ＲＮＡカーゴのＬＮＰ用量で１００ｎｇ／ｍｌのＭＥＧＡＣＤ４０Ｌの最終濃度を得た。

【０５８７】

ＬＮＰ処理から５日後、細胞を収集し、ＮＧＳ分析を、実施例１に記載されるように実施した。表６８及び図５８Ａ～Ｂは、種々の培地におけるＬＮＰ処理後の編集パーセントを示す。効率的な編集は、脂質Ａ、脂質Ｃ、又は脂質Ｄとともに製剤化されたＬＮＰを使用して明らかであった。脂質構造については、以下の表９０を参照のこと。編集は、ＩＭＤＭと比較して、ＳｔｅｍＳｐａｎで培養したＢ細胞においてより効率的であった。

【表７２】

表６８．記載の脂質組成物による編集後のＢ細胞における平均編集パーセント。

	LNP			5ug/ml	
培地	イオン化脂質	PEG脂質	脂質組成	平均	SD
IMDM	脂質A	2kDMG	50/10/38.5/1.5	5.50	0.71
	脂質C	2kDMG	50/10/38.5/1.5	13.00	0.00
	脂質D	2kDMG	50/10/38.5/1.5	32.00	0.00
	脂質E	2kDMG	50/10/38.5/1.5	1.00	0.00
	脂質F	2kDMG	50/10/38.5/1.5	0.50	0.71
	脂質G	2kDMG	50/10/38.5/1.5	1.00	0.00
	脂質A	2kDMG	50/9/38/3	5.50	0.71
	脂質E	2kDMG	50/9/38/3	0.00	0.00
	脂質G	2kDMG	50/9/38/3	1.00	0.00
	脂質A	脂質H	50/10/38.5/1.5	16.50	0.71
	脂質A	脂質J	50/10/38.5/1.5	7.00	0.00
	未処理			0.00	0.00
SFEM	脂質A	2kDMG	50/10/38.5/1.5	17.50	3.54
	脂質C	2kDMG	50/10/38.5/1.5	43.50	2.12
	脂質D	2kDMG	50/10/38.5/1.5	59.00	1.41
	脂質E	2kDMG	50/10/38.5/1.5	6.50	0.71
	脂質F	2kDMG	50/10/38.5/1.5	1.00	0.00
	脂質G	2kDMG	50/10/38.5/1.5	1.00	0.00
	脂質A	2kDMG	50/9/38/3	13.00	1.41
	脂質E	2kDMG	50/9/38/3	1.00	0.00
	脂質G	2kDMG	50/9/38/3	0.00	0.00
	脂質A	脂質H	50/10/38.5/1.5	30.00	1.41
	脂質A	脂質J	50/10/38.5/1.5	10.00	0.00
	未処理			0.00	0.00

【０５８８】

実施例２３．４．ＬＮＰによるＢ細胞編集のためのＡｐｏＥ条件

ＡｐｏＥ３又はＡｐｏＥ４のいずれかとともに事前インキュベートされた様々な用量のＬＮＰを使用して編集有効性を決定するために、Ｂ２Ｍタンパク質の表面発現を、Ｂ２Ｍを標的とするガイドを用いるＢ細胞での編集後に評価した。

【０５８９】

Ｂ細胞（Ｈｅｍａｃａｒｅ）を解凍し、１ｕｇ／ｍｌのＣｐＧ ＯＤＮ２００６（Ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ、カタログｔｌｒｌ－２００６－１）、５０ｎｇ／ｍｌのＩＬ－２（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－０２）、５０ｎｇ／ｍｌのＩＬ－１０（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－１０）、１０ｎｇ／ｍｌのＩＬ－１５（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－１５）、１ｎｇ／ｍｌのＭｅｇａＣＤ４０Ｌ（Ｅｎｚｏ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、カタログＡＬＸ－５２２－１１０－０００）、１％のペニシリン－ス

トレプトマイシン、及び５％のヒトＡＢ血清によりＳｔｅｍｓｐａｎ　ＳＦＥＭ培地中で活性化した。Ｂ細胞は、１ｎｇ／ｍＬのＭｅｇａＣＤ４０Ｌ（Ｅｎｚｏ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、カタログＡＬＸ－５２２－１１０－０００）及び１ｕｇ／ｍＬのＣｐＧＯＤＮ２００６（Ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ、カタログｔｌｒｌ－２００６－１）の存在下において活性化されるとみなされる。活性化後の２日目に、Ｂ細胞を、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びＢ２Ｍを標的とするｇＲＮＡ　Ｇ０００５２９（配列番号７０１）を送達するＬＮＰを用いて処理した。ＬＮＰを、概して、それぞれ、イオン化脂質／コレステロール／ＤＳＰＣ／ＰＥＧのモル比として表される、５０／１０／３８．５／１．５の脂質組成物を有する表６９に記載されるイオン化脂質を使用して、実施例１のように調製した。ＬＮＰを、表６９のＡｐｏＥ３（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ　３５０－０２）又はＡｐｏＥ４（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ　３５０－０４）のいずれかとともに、１．２５ｎｇ／ｍｌで、３７℃で約５分間事前インキュベートした。事前インキュベートしたＬＮＰを、表６９に示されるような総ＲＮＡカーゴの量でＢ細胞に添加した。ＬＮＰ処理から５日後、細胞をフローサイトメトリーによって表現型解析した。簡潔に述べると、Ｂ細胞を、Ｂ２Ｍ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ３９５８０６）、ＣＤ１９（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ３０２２０５）、ＣＤ２０（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ３０２３２２）、ＣＤ８６（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ３０５４２０）を標的とする抗体とともにインキュベートした。その後、細胞を、ＰＢＳ中で１：３７０３に希釈されたＤＡＰＩ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、カタログＤ１３０６）中で洗浄し、Ｃｙｔｏｆｌｅｘ装置（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）にて処理し、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアパッケージを使用して分析した。Ｂ細胞を、サイズ、シングレット、及び生細胞にてゲーティングした。

【０５９０】

表６９及び図５９は、ＡｐｏＥ３又はＡｐｏＥ４とともに事前インキュベートされた、脂質Ａ又は脂質Ｄにより製剤化されたＬＮＰによる編集後のＢ２Ｍ陰性Ｂ細胞パーセントを示す。脂質Ａ又は脂質Ｄイオン化脂質のいずれかとともに製剤化されたＬＮＰにより編集したＢ細胞は、Ｂ２Ｍ陰性細胞の増加したパーセンテージを示した。

【表７３】

表６９－ＡｐｏＥ３又はＡｐｏＥ４とともに事前インキュベートした異なるＬＮＰ製剤による編集後のＢ２Ｍ陰性Ｂ細胞の平均パーセント。

LNP 事前インキュベート	総 RNA　ug/ml	脂質 A		脂質 D	
		平均	SD	平均	SD
ApoE3	0	1.84	0.54	1.84	0.14
	2.5	53.50	1.56	37.00	0.42
	5	53.05	0.92	30.30	1.56
	10	50.00	0.57	20.50	1.13
ApoE4	0	1.27	0.30	1.91	0.44
	2.5	60.30	0.14	40.80	1.98
	5	51.45	3.32	27.75	2.62
	10	47.55	0.92	19.50	0.28

【０５９１】

実施例２４．脂質ナノ粒子を使用するＢ細胞における編集時間経過

Ｂ細胞の活性化とＬＮＰによる編集との間の有効間隔を決定するために、Ｂ２Ｍタンパク質の表面発現を、Ｂ２Ｍを標的とするガイドを用いるＢ細胞での編集後に評価した。

【０５９２】

Ｂ細胞（Ｈｅｍａｃａｒｅ）を解凍し、１ｕｇ／ｍｌのＣｐＧ　ＯＤＮ２００６（Ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ、カタログｔｌｒｌ－２００６－１）、５０ｎｇ／ｍｌのＩＬ－２（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－０２）、５０ｎｇ／ｍｌのＩＬ－１０（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－１０）、１０ｎｇ／ｍｌのＩＬ－１５（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、カタログ２００－１５）、１ｎｇ／ｍｌのＭｅｇａＣＤ４０Ｌ（Ｅｎｚｏ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、カタログＡＬＸ－５２２－１１０－０００）、１％のペニシリン－ストレプトマイシン、及び５％のヒトＡＢ血清によりＳｔｅｍｓｐａｎ　ＳＦＥＭ培地中で活性化した。Ｂ細胞は、１ｎｇ／ｍＬのＭｅｇａＣＤ４０Ｌ（Ｅｎｚｏ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、カタログＡＬＸ－５２２－１１０－０００）及び１ｕｇ／ｍＬのＣｐＧ　ＯＤＮ２００６（Ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ、カタログｔｌｒｌ－２００６－１）の存在下において活性化されるとみなされる。Ｂ細胞を、２つの独立した実験にわたる間隔において、Ｃａｓ９をコードするｍＲＮＡ及びＢ２Ｍを標的とするｇＲＮＡ　Ｇ０００５２９（配列番号７０１）を送達するＬＮＰを用いて処理した。第１（表７０に示される）は、解凍時（－１日目）の編集、翌日の細胞の活性化、並びに活性化後５日目までの０日目及びその後の各日の編集を含んでいた。第２（表７１に示される）は、同日（０日目）の細胞の解凍及び活性化、並びに６日目～１０日目の編集の実施を含んでいた。

【０５９３】

各編集の６日後に、フローサイトメトリー分析を別々に実施した。ＬＮＰを、概して、それぞれ、イオン化脂質／コレステロール／ＤＳＰＣ／ＰＥＧのモル比として表される、５０／１０／３８．５／１．５の脂質組成物を有する表７０～７１に記載されるイオン化脂質を使用して、実施例１のように調製した。ＬＮＰを、１．２５ｎｇ／ｍｌでのＡｐｏＥ４（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ　３５０－０４）とともに、３７℃で約５分間事前インキュベートした。事前インキュベートしたＬＮＰを、最終濃度２．５ｕｇ／ｍｌの総ＲＮＡカーゴ、及び２．５％のヒト血清の最終濃度でＢ細胞に添加した。ＬＮＰ処理から６日後、細胞をフローサイトメトリーによって表現型解析した。簡潔に述べると、Ｂ細胞を、Ｂ２Ｍ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ３９５８０６）を標的とする抗体とともに、４ｃで２０分間インキュベートした。その後、細胞を、ＰＢＳ中で希釈（３．８ｕＭ）されたＤＡＰＩ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、カタログＤ１３０６）中で洗浄し、Ｃｙｔｏｆｌｅｘ装置（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）にて処理し、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアパッケージを使用して分析した。Ｂ細胞をシングレット、及び生細胞にてゲーティングし、Ｂ２Ｍの喪失についてＬＮＰなしの陰性対照と比較した。表７０～７１及び図６０Ａ～Ｂは、ＬＮＰ処理後のＢ２Ｍ陰性細胞のパーセントを示す。有効な編集は、活性化の同じ日から編集後１０日目までのＢ細胞において観察され、３日目～６日目にピークがあった。

【表７４】

表７０－活性化の１日前～５日後の間隔における編集後の平均Ｂ２Ｍ陰性細胞

	脂質Ａ		脂質Ｄ	
時間点	平均	SD	平均	SD
-1日目	5.19	0.77	1.30	0.17
0日目	55.93	4.20	27.87	3.69
1日目	80.27	0.99	38.17	0.99
2日目	81.20	2.80	57.53	1.66
3日目	84.47	2.86	61.23	2.63
4日目	85.00	0.20	63.20	1.91
5日目	87.03	4.69	70.53	3.34

【表７５】
表７１－活性化後６～１０日間隔における編集後の平均Ｂ２Ｍ陰性細胞

時間点	平均	SD
6日目	86.10	2.55
7日目	79.77	1.70
8日目	75.07	6.82
9日目	62.03	7.17
10日目	52.47	5.15

【０５９４】
実施例２５．ＤＮＡタンパク質キナーゼ阻害剤を使用するＢ細胞における編集
Ｂ細胞における編集効率に対するＤＮＡタンパク質キナーゼ阻害剤（ＤＮＡＰＫｉ）の効果を評価した。
【０５９５】
Ｂ細胞を実施例２３．３のように単離し、必要とされるまで凍結させた。Ｂ細胞を解凍し、１ｎｇ／ｍｌのＭＥＧＡＣＤ４０Ｌを補充した表６４に記載のようなＢ細胞培地９中で培養した。培養の２日後、細胞を採取し、Ｃａｓ９（配列番号６）をコードするｍＲＮＡ及びＢ２Ｍを標的とするｇＲＮＡ　Ｇ０００５２９（配列番号７０１）を送達するＬＮＰを用いて処理する前に、Ｂ細胞培地９で使用したサイトカイン及び活性化因子カクテルの最終濃度の２倍を補充した、ヒト血清を含まないＳｔｅｍＳｐａｎベース培地中で、１００，０００細胞／１００μｌで再懸濁した。
【０５９６】
ＬＮＰを、概して、実施例１のように、それぞれ、イオン化脂質／コレステロール／ＤＳＰＣ／ＰＥＧのモル比として表される、５０／１０／３８．５／１．５の脂質組成物を用いて調製した。ＬＮＰを、５％のヒトＡＢ血清（Ｇｅｍｉｎｉ　Ｂｉｏ－Ｐｒｏｄｕｃｔｓ、１００－５１２）を補充したＳｔｅｍＳｐａｎベース培地中で、１．２５μｇ／ｍｌのＡｐｏＥ４（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、３５０－０４）とともに３７℃で約１５分間、５μｇ／ｍｌの総ＲＮＡカーゴの濃度で事前インキュベートした。事前インキュベートしたＬＮＰを、最終濃度２．５ｕｇ／ｍｌの総ＲＮＡカーゴでＢ細胞に添加し、続いて、０．２５ｕｇ／ｍｌのＤＮＡＰＫ阻害剤の化合物１、化合物３、又は化合物４を添加した。
【０５９７】
ＬＮＰ処理後７日目に、Ｂ２Ｍ表面タンパク質の存在についてＢ細胞を表現型解析した。このため、Ｂ細胞を、ＣＤ８６（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、３７４２１６）及びＢ２Ｍ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、３１６３１２）を標的とする抗体とともにインキュベートした。その後、細胞を生存性色素（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、４２２８０１）により染色し、洗浄し、Ｃｙｔｏｆｌｅｘ装置（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）にて処理し、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアパッケージを使用して分析した。Ｂ細胞を、サイズ及び生存状態でゲーティングし、続いて、全生集団にＢ２Ｍ発現を行った。Ｂ２Ｍ陰性細胞パーセントを表７２に示す。ＤＮＡＰＫｉの存在下では、ＤＮＡＰＫｉなしと比較して、Ｂ２Ｍ陰性Ｂ細胞のパーセンテージの増加が観察され、遺伝子編集の増加が示された。

【表７６】

表７２－ＤＮＡＰＫｉ及びＢ２Ｍを標的とするＬＮＰによる編集後のＢ２Ｍ陰性細胞のパーセンテージ。

	B2M-%	
試料	平均	SD
阻害剤なし	11.2	1.5
化合物１	19.2	2.3
化合物３	27.4	2.6
化合物４	24.1	1.0
編集なし	2.5	0.5

【０５９８】

実施例２５．２．ＤＮＡＰＫ阻害剤を使用する複数のドナーからのＢ細胞での編集

Ｂ細胞を、実施例２３．１に記載されるように、３人のドナーに由来するＰＢＭＣから単離した。ＭＡＣＳ単離後、ＣＤ１９＋Ｂ細胞を、１ｕｇ／ｍｌのＣｐＧ　ＯＤＮ２００６（Ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ、ＴＬＲ－２００６）、２．５％のヒトＡＢ血清（ＧｅｍｉｎｉＢｉｏ－Ｐｒｏｄｕｃｔｓ、１００－５１２）、１％のペニシリン－ストレプトマイシン（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、１５１４０１２２）、５０ｎｇ／ｍｌのＩＬ－２（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、２００－０２）、５０ｎｇ／ｍｌのＩＬ－１０（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、２００－１０）、及び１０ｎｇ／ｍｌのＩＬ－１５（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、２００－１５）、並びに１ｎｇ／ｍｌのＣＤ４０Ｌ（Ｅｎｚｏ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、ＡＬＸ－５２２－１１０－Ｃ０１０）を有するＳｔｅｍｓｐａｎベース培地で活性化した。活性化後の２日目に、Ｂ細胞を、Ｃａｓ９（配列番号６）をコードするｍＲＮＡ及びＢ２Ｍを標的とするｇＲＮＡ　Ｇ０００５２９（配列番号７０１）を送達するＬＮＰを用いて処理した。Ｂ細胞を、上記のように完全なＳｔｅｍｓｐａｎ培地中で、表７３に示されるように、ウェル当たり５０，０００個の細胞において三重にプレーティングした。

【０５９９】

ＬＮＰを、概して、実施例１のように、それぞれ、イオン化脂質／コレステロール／ＤＳＰＣ／ＰＥＧのモル比として表される、５０／１０／３８．５／１．５の脂質組成物を用いて調製した。ＬＮＰを、１ｕｇ／ｍｌのＣｐＧ　ＯＤＮ２００６、２．５％のヒトＡＢ血清、１％のペニシリン－ストレプトマイシン、５０ｎｇ／ｍｌのＩＬ－２、５０ｎｇ／ｍｌのＩＬ－１０、及び１０ｎｇ／ｍｌのＩＬ－１５、１ｎｇ／ｍｌのＣＤ４０Ｌ、並びに１．２５ｕｇ／ｍＬのＡｐｏＥ４を含有するＳｔｅｍｓｐａｎ培地で３７℃で１５分間事前インキュベートした。事前インキュベートしたＬＮＰを、最終濃度２．５ｕｇ／ｍｌの総ＲＮＡカーゴでＢ細胞に添加し、続いて、０．２５ｕｇ／ｍｌのＤＮＡＰＫ阻害剤の化合物１又は化合物４を添加した。ＬＮＰ添加の７２時間後、細胞を洗浄し、１ｕｇ／ｍｌのＣｐＧ　ＯＤＮ２００６、２．５％のヒトＡＢ血清、１％のペニシリン－ストレプトマイシン、５０ｎｇ／ｍｌのＩＬ－２、５０ｎｇ／ｍｌのＩＬ－１０、及び１０ｎｇ／ｍｌのＩＬ－１５、並びに１００ｎｇ／ｍｌのＣＤ４０Ｌを含有するＳｔｅｍｓｐａｎ培地に再懸濁し、４８ウェルプレートに移入した。

【０６００】

ＬＮＰ処理から７日後、細胞をフローサイトメトリーによって表現型解析した。簡潔に述べると、Ｂ細胞を、ＣＤ１９（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、３６３０１０Ａ）、ＣＤ２０（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、３０２３２２）、ＣＤ８６（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、３７４２１６）及びＢ２Ｍ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、３９５８０６）を標的とする抗体、続いて生存性色素ＤＡＰＩ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、４２２８０１）とともにインキュベートした。その後、細胞を洗浄し、Ｃｙｔｏｆｌｅｘ装置（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）にて処理し、Ｆ

ｌｏｗＪｏソフトウェアパッケージを使用して分析した。Ｂ細胞を、サイズ及び生存状態でゲーティングし、続いて、全生集団にＢ２Ｍ発現を行った。表７３及び図６１は、ＤＮＡＰＫ阻害剤による編集後のＢ２Ｍ陰性細胞の平均パーセントを示す。ＤＮＡＰＫ阻害剤の添加は、適度に編集効率を改善した。

【表７７】

表７３－ＤＮＡＰＫ阻害剤による編集後のＢ２Ｍ陰性細胞の平均パーセント

	未編集、阻害剤なし			阻害剤なし			化合物１			化合物４		
ドナー	平均	SD	N	平均	SD	N	平均	SD	N	平均	SD	N
ドナー150	3.74	1.62	3	50.57	1.54	3	56.41	4.39	3	59.42	4.16	3
ドナー200	5.11	0.06	2	27.60	4.16	3	36.77	1.79	3	34.88	8.44	3
ドナー340	0.70	0.43	3	45.61	3.23	3	56.28	3.01	3	57.59	3.52	3

【０６０１】

実施例２６．ＬＮＰ送達を使用するＢ細胞への挿入

ＬＮＰ及びＡＡＶ核酸送達の組み合わせを使用して、Ｂ細胞の挿入有効性を評価した。

【０６０２】

Ｂ細胞を実施例２３．３のように単離し、１ｎｇ／ｍｌのＭＥＧＡＣＤ４０Ｌを補充した、表６４に記載されるようなＢ細胞培地９中で活性化した。活性化後の２日目に、Ｂ細胞を、Ｃａｓ９（配列番号６）をコードするｍＲＮＡ及びＢ２Ｍ遺伝子座を標的とするｇＲＮＡ　Ｇ０００５２９（配列番号７０１）を送達するＬＮＰ、並びにＥＦ１αプロモーターによって駆動されるＢ２Ｍ遺伝子座（配列番号７２２）へのＧＦＰテンプレート挿入のためのＡＡＶ６を用いて処理した。ＬＮＰを、概して、イオン化脂質としての脂質Ａ及び脂質Ｄを使用して、それぞれ、イオン化脂質／コレステロール／ＤＳＰＣ／ＰＥＧのモル比として表される、５０／１０／３８．５／１．５の脂質組成物を用いて実施例１に記載されるように調製した。ＬＮＰを、１μｇ／ｍｌのＡＰＯＥ３（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、３５０－０２）とともに５％のヒトＡＢ血清（Ｇｅｍｉｎｉ　Ｂｉｏ－Ｐｒｏｄｕｃｔｓ、１００－５１２）を補充したＳｔｅｍＳｐａｎベース培地に添加し、１０万個の細胞／ウェルを、ヒト血清を有さず、上記に詳述されるサイトカイン／活性化因子カクテルの４倍の濃度でＳｔｅｍＳｐａｎベース培地中で培養した。ＬＮＰ混合物を、３７℃で１５分間インキュベートした後、Ｂ細胞と１：１ｖ／ｖに混合した。細胞及びＬＮＰを組み合わせた直後に、ＡＡＶ６を、１．５×１０＾５ゲノムコピーのＭＯＩ、Ｂ細胞－ＬＮＰ混合物と１：１ｖ／ｖで添加し、５μｇ／ｍｌのＬＮＰの最終濃度を得た。

【０６０３】

Ｂ細胞を、７日目にＧＦＰ発現について表現型解析した。フローサイトメトリーによるＢ細胞表現型解析のために、Ｂ細胞を、ＣＤ１９（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、３０２２１８）、ＣＤ２０（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、３０２３２２）、ＣＤ８６（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、３７４２１６）及びＢ２Ｍ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、３１６３１２）を標的とする抗体により染色した。その後、細胞を生存性色素（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、４２２８０１）により染色し、洗浄し、Ｃｙｔｏｆｌｅｘ装置（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）にて処理した。結果を、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアパッケージを使用して分析した。Ｂ細胞を、サイズ及び生存能に基づいてゲーティングし、続いて、全生集団にＧＦＰ発現を行った。表７４に示されるように、ＧＦＰを発現するＢ細胞のパーセンテージは、脂質Ａによる処理後７日目に２９．５％であり、脂質Ｄにより１４．５％であった。最小のＧＦＰ発現は、処理なし、ＬＮＰのみ、又はＡＡＶのみを受けた陰性対照条件で観察された。

【表７８】

表７４．ＬＮＰ及びＡＡＶ処理後のＢ２Ｍ陰性パーセント及びＧＦＰ陽性パーセント

	B2M 陰性%		GFP 陽性%	
試料	平均	SD	平均	SD
未処理	1.83	0.25	0.00	0.00
AAV のみ	1.46	0.50	2.28	0.66
脂質 A のみ	62.35	0.35	0.00	0.00
脂質 A+AAV	42.45	0.92	29.50	5.52
脂質 D のみ	58.45	0.21	0.00	0.00
脂質 D+AAV	27.05	2.76	14.25	0.07

【０６０４】

実施例２７．脂質ナノ粒子を使用するＮＫ細胞における編集

異なるイオン化脂質又はＰＥＧ脂質とともに製剤化されたＬＮＰを、ＮＫ細胞編集有効性について試験した。

【０６０５】

ＮＫ細胞を、ＥａｓｙＳｅｐヒトＮＫ細胞単離キット（ＳＴＥＭＣＥＬＬ、カタログ番号１７９５５）を使用して、製造者のプロトコルに従って、商業的に入手したレウコパクから単離した。単離後、ＮＫ細胞を、１０％のＦＢＳ、５００Ｕ／ｍＬのＩＬ－２、５ｎｇ／ｍｌのＩＬ－１５、及び１０ｎｇ／ｍｌのＩＬ－２１を有するＲＰＭＩ１６４０培地中で７日間、Ｋ５６２－４１ＢＢＬフィーダ細胞とともに１：１の比で培養した。

【０６０６】

活性化後の７日目に、ＮＫ細胞を、Ｃａｓ９　ＨｉＢｉＴ　ｍＲＮＡ及びＴＲＡＣを標的とするｇＲＮＡ　Ｇ０１３００６（配列番号７０８）を送達するＬＮＰを用いて処理した。ＬＮＰを、概して、それぞれ、イオン化脂質／コレステロール／ＤＳＰＣ／ＰＥＧのモル比として表される脂質組成物を用いて、表７５に記載のイオン化脂質及びＰＥＧ脂質を使用して実施例１のように調製した。ＬＮＰを、１０％のＦＢＳによりＲＰＭＩ１６４０中で、３７℃で約１５分間事前インキュベートした。事前インキュベートしたＬＮＰを、２．５ｕｇの総ＲＮＡカーゴで、三重にＮＫ細胞に添加した。ＬＮＰ処理から７日後、細胞を収集し、ＮＧＳ分析を、実施例１に記載されるように実施した。表７５及び図６２は、示されるＬＮＰ製剤を用いて処理したＮＫ細胞についてのインデルパーセントを示す。編集は、複数の脂質組成物によって達成された。脂質構造については、以下の表９０を参照のこと。

【表７９】

表７５．種々の脂質組成物による編集後のＮＫ細胞における平均編集パーセント。

LNP			編集%	
イオン化脂質	PEG脂質	脂質組成	平均	SD
脂質A	2kDMG	50/10/38.5/1.5	57.93	2.02
脂質C	2kDMG	50/10/38.5/1.5	34.33	3.41
脂質D	2kDMG	50/10/38.5/1.5	38.90	1.39
脂質E	2kDMG	50/10/38.5/1.5	18.50	6.45
脂質F	2kDMG	50/10/38.5/1.5	0.20	0.10
脂質G	2kDMG	50/10/38.5/1.5	0.13	0.06
脂質A	2kDMG	50/9/38/3	19.83	2.83
脂質E	2kDMG	50/9/38/3	16.10	2.77
脂質G	2kDMG	50/9/38/3	4.20	0.20
脂質A	脂質H	50/10/38.5/1.5	17.23	4.31
脂質A	脂質J	50/10/38.5/1.5	41.80	5.99
未処理			0.00	0.00

【０６０７】

実施例２８．脂質ナノ粒子を使用するＮＫ細胞での挿入時間経過による編集

ＮＫ細胞でのゲノム挿入を評価するために、細胞を、Ｃａｓ９（配列番号６）をコードするｍＲＮＡ及びＡＡＶＳ１を標的とするｇＲＮＡ　Ｇ０００５６２（配列番号７１０）を送達するＬＮＰ、続いて、ＡＡＶＳ１編集部位（配列番号７２０又は配列番号７２１）に相同性の領域に隣接するＧＦＰコード配列をコードするＡＡＶを用いて処理した。

【０６０８】

ＮＫ細胞を、実施例２７のように単離した。ドナー２については、ヒト初代ＮＫ細胞を活性化し、１０％のＦＢＳ、５００Ｕ／ｍＬのＩＬ－２、及び５ｎｇ／ｍｌのＩＬ－１５を有するＲＰＭＩ１６４０培地中で１：１の比で、フィーダ細胞としてのＫ５６２－４１ＢＢＬ細胞を使用して７日間拡大し、凍結保存し、次いで実験の時点で解凍した。ドナー３については、ＮＫ細胞を単離し、活性化し、１０％のＦＢＳ、５００Ｕ／ｍＬのＩＬ－２、及び５ｎｇ／ｍｌのＩＬ－１５を有するＲＰＭＩ１６４０培地中で１：１の比で、Ｋ５６２－４１ＢＢＬ細胞を使用して７日間拡大し、次いで編集のために直接使用した。ドナー４については、ＮＫ細胞を単離し、活性化し、５％のヒトＡＢ血清、５００Ｕ／ｍＬのＩＬ－２、及び５ｎｇ／ｍｌのＩＬ－１５を有するＯｐＴｍｉｚｅｒ培地中で１：１の比で、Ｋ５６２－４１ＢＢＬ細胞を使用して７日間拡大し、次いで編集のために直接使用した。ＮＫ細胞を、２．５％のヒトＡＢ血清、１％のペニシリン及びストレプトマイシン、５００Ｕ／ｍＬのＩＬ－２及び５ｎｇ／ｍｌのＩＬ－１５を有するＯｐＴｍｉｚｅｒ培地中で、ウェル当たり１００，０００個の細胞において三重にプレーティングした。ＲＰＭＩ１６４０培地での編集のために、ＬＮＰを、１０ｕｇ／ｍｌのＡＰＯＥ３とともに、１０％のＦＢＳ、５００Ｕ／ｍＬのＩＬ－２及び５ｎｇ／ｍｌのＩＬ－１５を有するＲＰＭＩ１６４０中で、３７℃で約１５分間事前インキュベートした。ＯｐＴｍｉｚｅｒ培地での編集のために、ＬＮＰを、１０ｕｇ／ｍｌのＡＰＯＥ３とともに、２．５％のヒトＡＢ血清、５００Ｕ／ｍＬのＩＬ－２及び５ｎｇ／ｍｌのＩＬ－１５を有するＯｐＴｍｉｚｅｒ培地中で、３７℃で約１５分間事前インキュベートした。事前インキュベートしたＬＮＰを、２．５ｕｇ／ｍｌ、５ｕｇ／ｍｌ、又は１０ｕｇ／ｍｌの総ＲＮＡカーゴの最終濃度で同じ培地中に懸濁したＮＫ細胞に三重に添加した。試料のサブセットについては、３００，０００又は６００，０００ゲノムコピーの感染多重度（ＭＯＩ）でのＡＡＶを、

編集後に添加した。細胞を最大１４日間インキュベートし、編集後６日目に新鮮な培地と置き換えた。

【０６０９】

実施例２８．１．ＮＫ細胞における編集効率

ＬＮＰ処理後、毎日、細胞を収集し、ＮＧＳ分析を、実施例１に記載されるように実施した。編集は、新鮮な細胞（ドナー３及び４）では８日目までに、凍結細胞（ドナー２）では１１日目までに、全ての３つのＬＮＰ用量で実質的にプラトーになると見られた。ＬＮＰ処理後１４日目のエンドポイント編集を表７６及び図６３に示す。

【表８０】

表７６－ＬＮＰ処理後１４日目での様々な用量のＬＮＰを用いて処理したＮＫ細胞における平均編集パーセンテージ

ドナー	条件	2.5ug/ml		5ug/ml		10ug/ml		未編集	
		平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
2	拡大、凍結	84.23	0.91	85.83	0.49	85.63	0.32	0.27	0.12
3	新鮮、拡大	94.03	0.31	96.60	0.36	96.20	0.17	0.20	0.00
4	新鮮、拡大	94.87	0.35	95.90	0.17	95.43	0.21	0.10	0.00

【０６１０】

実施例２８．２．ＮＫ細胞における挿入効率

ＬＮＰ処理から７日後、細胞をフローサイトメトリーによりアッセイして、ＧＦＰの挿入率を測定した。簡潔に述べると、ＮＫ細胞を、ＣＤ３（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ番号３１７３３６）及びＣＤ５６（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ番号３１８３１０）を標的とする抗体とともにインキュベートした。その後、細胞を洗浄し、Ｃｙｔｏｆｌｅｘ装置（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）にて処理し、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアパッケージを使用して分析した。ＮＫ細胞を、サイズ、ＣＤ３／ＣＤ５６状態、及びＧＦＰ発現にてゲーティングした。高ＧＦＰ発現細胞を、ＡＡＶＳ１遺伝子座における標的化ＧＦＰ挿入としてゲーティングし、低ＧＦＰ発現細胞を、エピソーム保持としてゲーティングした。表７７及び図６４は、標的化挿入を示す、高ＧＦＰ発現を有するＮＫ細胞のパーセントを示す。更なるアッセイでは、ＬＮＰを使用して、ＮＫ細胞において逐次遺伝子破壊及び配列挿入編集を達成した。

【表８１】

表７７－ＬＮＰ及びＡＡＶによる編集から７日後の高ＧＦＰ発現を有するＮＫ細胞のパーセント。

ドナー	条件	平均	SD	N
2	AAV なし	0.00	0.00	3
	AAV のみ、LNP なし	1.47	0.41	3
	300K MOI	40.03	2.05	3
	600K MOI	40.63	3.91	3
3	AAV なし	0.00	0.00	2
	AAV のみ、LNP なし	1.24	0.48	2
	300K MOI	53.77	0.85	3
	600K MOI	58.40	0.92	3
4	AAV なし	0.00	0.00	3
	AAV のみ、LNP なし	1.63	0.18	3
	300K MOI	63.20	0.87	3
	600K MOI	67.13	1.55	3

【０６１１】

実施例２９．ＤＮＡＰＫ阻害剤を使用するＮＫ細胞への挿入

ＮＫ細胞を、インデル及び挿入率に対するＤＮＡタンパク質キナーゼ阻害剤（ＤＮＡＰＫｉ）の影響について評価した。ＮＫ細胞を、ＤＮＡタンパク質キナーゼ阻害剤の存在下で、Ｃａｓ９（配列番号６）をコードするｍＲＮＡ及びＡＡＶＳ１を標的とするｇＲＮＡＧ０００５６２（配列番号７１０）を送達するＬＮＰを用いて処理した。試料のサブセットもまた、ＡＡＶＳ１編集部位（配列番号７２１）と相同性の領域に隣接するＧＦＰコード配列をコードするＡＡＶを用いて処理した。

【０６１２】

ＮＫ細胞を、実施例２７のように単離した。ヒト初代ＮＫ細胞を活性化し、５％のヒトＡＢ血清、５００Ｕ／ｍＬのＩＬ－２、及び５ｎｇ／ｍｌのＩＬ－１５を有するＯｐＴｍｉｚｅｒ培地中で、フィーダ細胞としてのＫ５６２－４１ＢＢＬ細胞を使用して３日間拡大した。ＮＫ細胞を、表７８及び７９に示される濃度でＤＮＡＰＫｉを用いて上記のように補充したＯｐＴｍｉｚｅｒ培地中で、ウェル当たり５０，０００個の細胞において三重にプレーティングした。ＬＮＰを、１０ｕｇ／ｍｌのＡＰＯＥ３とともに、２．５％のヒトＡＢ血清、５００Ｕ／ｍＬのＩＬ－２及び５ｎｇ／ｍｌのＩＬ－１５を有するＯｐＴｍｉｚｅｒ培地中で、３７℃で約１５分間事前インキュベートした。事前インキュベートしたＬＮＰを、１０ｕｇ／ｍｌの総ＲＮＡカーゴの最終濃度で同じ培地中に懸濁したＮＫ細胞に三重に添加した。試料のサブセットについては、ＡＡＶＳ１編集部位に相同な領域に隣接するＧＦＰをコードするＡＡＶを、編集後の６００，０００ゲノムコピーの感染多重度（ＭＯＩ）において添加した。ＬＮＰ処理から７日後に、細胞を、実施例２８に記載されるようにフローサイトメトリーによって表現型解析し、実施例１に記載されるようにＮＧＳ分析のために収集した。

【０６１３】

表７８及び７９、並びに図６５Ａ及び６５Ｂは、ＬＮＰ、ＡＡＶ、並びに様々な濃度のＤＮＡＰＫ阻害剤の化合物１及び化合物４による処理後の編集パーセントを示す。ＤＮＡＰＫ阻害剤の存在下において、インデル形成と挿入との両方が増加した。

【表８２】
表７８－様々な用量のＤＮＡＰＫｉによるＡＡＶＳ１での平均編集パーセント

	0uM		0.125uM		0.25uM		0.5uM	
試料	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
未編集	0.67	0.60						
DNAPKi なし	93.17	0.12						
化合物１			96.10	1.01	96.97	0.21	98.13	0.65
化合物４			96.77	0.67	97.37	0.06	97.67	1.55

【表８３】
表７９－ＬＮＰ、ＡＡＶ及びＤＮＡＰＫｉによる編集から７日後の高ＧＦＰ発現を有するＮＫ細胞のパーセント。

	0uM		0.125uM		0.25uM		0.5uM	
試料	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
AAV のみ	2.68	0.37						
DNAPKi なし	74.93	4.09						
化合物１			85.47	2.48	90.23	1.66	92.30	1.66
化合物４			88.10	1.00	90.63	1.01	90.27	3.09

【０６１４】
実施例３０．脂質ナノ粒子送達後のマクロファージ細胞におけるＣａｓ９発現
異なるイオン化脂質又はＰＥＧ脂質とともに製剤化されたＬＮＰを、マクロファージ細胞送達有効性について試験した。
【０６１５】
健康なヒトドナーＰＢＭＣを、商業的（Ｈｅｍａｃａｒｅ）に入手し、単球を、製造者のプロトコルに従って、ＣＤ１４　ＭｉｃｒｏＢｅａｄｓ、ヒト（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ、カタログ１３０－０５０－２０１）を使用して、ＣＤ１４陽性選択によって単離した。単離後、ＣＤ１４＋単球細胞を培養し、組織培養プレート（Ｆａｌｃｏｎ、３５３０７２）において１０ｎｇ／ｍＬのＧＭ－ＣＳＦ（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ、７８１４０．１）を有するＲＰＭＩ－１６４０培地中で、１００，０００細胞／ウェルで、マクロファージ細胞に三重に分化した。
【０６１６】
分化後の５日目に、細胞を、ＨｉｂｉｔタグＣａｓ９（配列番号７）をコードするｍＲＮＡ及びＴＲＡＣを標的とするｇＲＮＡ　Ｇ０１３００６（配列番号７０８）を送達するＬＮＰを用いて処理した。ＬＮＰを、概して、それぞれ、イオン化脂質／コレステロール／ＤＳＰＣ／ＰＥＧのモル比として表される脂質組成物を用いて、表８０に記載のイオン化脂質及びＰＥＧ脂質を使用して実施例１のように調製した。ＬＮＰを、１０％のＦＢＳ及び１０ｕｇ／ｍＬのＡｐｏＥ３を含有するＲＰＭＩ培地中で、５ｕｇ／ｍＬ濃度において３７℃で約１５分間事前インキュベートした。細胞プレート中の培地を慎重に除去し、１０％のＦＢＳ、１ｘＧｌｕｔａｍａｘ、１ｘＨＥＰＥＳ、１％のペニシリン／ストレプトマイシン、及び１０ｎｇ／ｍＬのＧＭ－ＣＳＦを補充した新鮮なＲＰＭＩ培地と置き換えた。事前インキュベートしたＬＮＰを、１：１ｖ／ｖの比でマクロファージ細胞に三重に添加し、２．５ｕｇ／ｍＬの総ＲＮＡカーゴの最終ＬＮＰ用量を得た。細胞を、ＬＮＰ処理の２４時間後に採取し、Ｃａｓ９タンパク質レベルを、製造者の指示に従って、Ｎａｎｏ－Ｇｌｏ（登録商標）ＨｉＢｉＴ　Ｌｙｔｉｃ検出システム（Ｐｒｏｍｅｇａ、カタログＮ３０３０）を使用して決定した。Ｂｉｏｔｅｋ　Ｎｅｏ２プレート読み取り器を使

用して発光を測定した。標準対照からのタンパク質数及び発光読み出しを使用して、線形回帰をＧｒａｐｈＰａｄ上でプロットし、ラインをＸ＝０、Ｙ＝０に強制的に通過させた。細胞溶解物当たりのタンパク質の数を計算するために、Ｙ＝ａｘ＋０の式を使用した。表８０及び図６６は、１．５％のＰＥＧ　２ｋＤＭＧ組成物を有する脂質Ａに対して、種々の脂質組成物を用いてトランスフェクションしたマクロファージ細胞におけるＣａｓ９タンパク質発現を示す。編集は、マクロファージ細胞内の複数の脂質組成物によって達成された。脂質構造については、以下の表９０を参照のこと。

【表８４】

表８０．脂質Ａ、１．５％の２ｋＤＭＧ　ＰＥＧ組成物に対する種々の脂質組成物による編集後の、マクロファージ細胞における細胞当たりのＣａｓ９タンパク質の平均分子。

LNP			相対的な分子/細胞	
イオン化脂質	PEG 脂質	脂質組成	平均	SD
脂質 A	2kDMG	50/10/38.5/1.5	1.00	n/a
脂質 C	2kDMG	50/10/38.5/1.5	0.23	0.12
脂質 D	2kDMG	50/10/38.5/1.5	2.14	0.10
脂質 E	2kDMG	50/10/38.5/1.5	0.52	0.08
脂質 F	2kDMG	50/10/38.5/1.5	1.10	0.07
脂質 G	2kDMG	50/10/38.5/1.5	1.01	0.03
脂質 A	2kDMG	50/9/38/3	0.88	0.43
脂質 E	2kDMG	50/9/38/3	0.39	0.10
脂質 G	2kDMG	50/9/38/3	0.99	0.22
脂質 A	脂質 H	50/10/38.5/1.5	2.43	0.91
脂質 A	脂質 J	50/10/38.5/1.5	2.12	0.37

【０６１７】

実施例３１．マクロファージ及び単球における編集

ＬＮＰ編集効率を決定するために、単球由来マクロファージ細胞の編集の時間を調査した。Ｂ２Ｍタンパク質の表面発現を、Ｂ２Ｍを標的とするガイドを用いて、分化の開始、それによる０日目の単球の編集時に、又は５日目のマクロファージへの分化の終了に向かって評価した。

【０６１８】

ＣＤ１４＋細胞を、ＭｕｌｔｉＭＡＣＳ（商標）Ｃｅｌｌ２４　Ｓｅｐａｒａｔｏｒ Ｐｌｕｓ装置にて製造者のプロトコルに従って、ＳｔｒａｉｇｈｔＦｒｏｍ（登録商標）Ｌｅｕｋｏｐａｋ（登録商標）ＣＤ１４　ＭｉｃｒｏＢｅａｄキット、ヒト（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ、カタログ、１３０－１１７－０２０）を使用して、商業的（Ｈｅｍａｃａｒｅ）に入手したレウコパクから単離した。ＭＡＣＳ単離後、ＣＤ１４＋細胞を、０日目に編集するための組織培養プレート（Ｆａｌｃｏｎ、３５３０７２）、又はＣＤ１４＋単離後５日目に編集するための非組織培養プレート（Ｆａｌｃｏｎ、３５１１７２）上で、１００，０００細胞／ウェルで、１０ｎｇ／ｍＬのＧＭ－ＣＳＦ（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ、７８１４０．１）を有するＲＰＭＩ－１６４０培地中で三重に培養した。分化及び成熟化プロセスを通じてマクロファージのプレート付着が増加したため、非組織培養プレートを、脱離の容易さのためにマクロファージ試料に使用した。これは、更なるフロー分析のために必要である。

【０６１９】

細胞を、単離の日又はＣＤ１４＋細胞単離後５日目に、Ｃａｓ９（配列番号６）をコー

ドするｍＲＮＡ、Ｂ２Ｍを標的とするｓｇＲＮＡ　Ｇ００５２９（配列番号７０１）を送達するＬＮＰを用いて処理した。ＬＮＰを、概して、実施例１に記載されるように、それぞれ、イオン化脂質／コレステロール／ＤＳＰＣ／ＰＥＧのモル比として表される、５０／１０／３８．５／１．５の脂質組成物を用いて調製した。ＬＮＰを１．２５～１０ｕｇ／ｍＬの最終濃度範囲まで連続的に希釈し、ＡｐｏＥ３（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ　３５０－０２）とともに１０ｕｇ／ｍｌで３７℃で１５分間事前インキュベートした。事前インキュベートしたＬＮＰを、表８１に示される総ＲＮＡカーゴ用量で細胞に添加した。

【０６２０】

ＬＮＰ処理から５日後、細胞をフローサイトメトリーによって表現型解析した。簡潔に述べると、単球由来マクロファージを、細胞を０．０５％のトリプシン及び０．５３ｍＭのＥＤＴＡ（Ｃｏｒｎｉｎｇ、２５－０５１－ＣＩ）とともに、３７Ｃで３０分間、又は顕微鏡検証によって目視により決定されるように細胞がプレートから剥離されるまでインキュベートすることによって、培養プレートから剥離した。剥離した細胞を新しいプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、３７９９）に移入し、ＰＢＳ及び培地により洗浄して、トリプシンを不活性化した。細胞を、暗所で室温で１５分間、ＰＢＳ中のＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ　Ｖｉｏｌｅｔ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｌ３４９５５）により更に染色した。細胞を洗浄し、氷上にて暗所でＣＤ１１ｂ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、３０１３０６）、Ｂ２Ｍ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、３１６３１２）及びＣＤ８６（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、３０５４２０）を標的とする抗体とともに、３０分間インキュベートした。細胞を洗浄し、固定し、細胞を、最初に試薬Ａ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、ＧＡＳ００１Ｓ１００）とともに室温で２０分間インキュベートし、続いて、細胞を、ＣＤ６８（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、３３３８０６）を標的とする抗体を含有する試薬Ｂ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、ＧＡＳ００２Ｓ１００）とともに、暗所で室温で３０分間インキュベートすることによって、透過化処理した。その後、細胞を洗浄し、ＦＡＣＳ緩衝液中で再懸濁し、Ｃｙｔｏｆｌｅｘ装置（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）にて処理し、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアパッケージを使用して分析した。細胞を、サイズ、ＣＤ１１ｂ／ＣＤ６８陽性状態、及びＢ２Ｍ陰性集団にてゲーティングした。表８１及び図６７は、ＬＮＰを用いて処理した細胞におけるＢ２Ｍ陰性細胞集団の増加したパーセンテージを示し、単球とマクロファージとの両方において編集が有効であることを示す。マクロファージと比較して、単球では、これらの条件下で編集が増加する。単球及びマクロファージにおける編集は、細胞又はＬＮＰのいずれかを血清により調製したときにも観察された。

【表８５】

表８１－ＬＮＰによる編集後の平均Ｂ２Ｍ陰性細胞

総最終RNA(ug/ml)	単球		マクロファージ	
	平均	SD	平均	SD
0	2.27	2.20	6.36	2.43
1.25	89.71	1.17	60.02	1.68
2.5	91.23	1.50	68.99	2.00
5	93.34	0.41	77.84	2.36

【０６２１】

実施例３２．脂質ナノ粒子を使用する単球由来マクロファージにおける編集時間経過

この研究では、マクロファージへの単球分化の異なる日における編集効率を、２つの血清条件（無血清及び５％のヒト血清、最終的な２．５％のヒト血清濃度に達する）を利用してモニタリングした。

【０６２２】

ＣＤ１４＋細胞を実施例３１に記載されるように単離し、後の使用のために凍結した。

ＣＤ１４＋細胞を解凍し、非組織培養プレート（Ｆａｌｃｏｎ、３５１１７２）上で、１００，０００細胞／ウェルで、表２に記載されるようなＯｐＴｍｉｚｅｒベース培地、１０ｎｇ／ｍＬのＧＭ－ＣＳＦ（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ、７８１４０．１）中で２．５％のヒトＡＢ血清の有無にかかわらず、三重に培養した。細胞を、解凍日から解凍後８日までの範囲の間隔で、かつ無血清又は最終的な２．５％のヒトＡＢ血清含有培地のいずれかで、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びＢ２Ｍを標的とするｇＲＮＡ　Ｇ０００５２９（配列番号７０１）を送達するＬＮＰを用いて処理した。ＬＮＰを、概して、実施例１に記載されるように、それぞれ、イオン化脂質／コレステロール／ＤＳＰＣ／ＰＥＧのモル比として表される、５０／１０／３８．５／１．５の脂質組成物を用いて調製した。ＬＮＰを、１０ｕｇ／ｍｌでのＡｐｏＥ３（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ　３５０－０２）とともに、３７℃で１５分間事前インキュベートした。事前インキュベートしたＬＮＰを、５ｕｇ／ｍｌの総ＲＮＡカーゴで細胞に添加した。

【０６２３】

各ＬＮＰ処理から６日後、細胞を収集し、ＮＧＳ分析を、実施例１に記載されるように実施した。表８２及び図６８に示すように、マクロファージの分化及び成熟化を通じて、ＣＤ１４＋細胞の解凍後０日～８日に観察された編集によって、堅牢な編集が達成された。編集は、ヒト血清の有無にかかわらず、培地を使用して有効であった。

【表８６】

表８２－解凍後の間隔でのＬＮＰ処理による平均編集パーセント

時間点(日)	無血清		2.5%ヒト血清	
	平均	SD	平均	SD
0	75.80	1.31	96.27	0.21
1	94.03	2.47	96.27	1.10
2	89.43	0.64	93.10	1.35
3	77.90	0.99	93.13	2.41
4	88.63	1.07	92.80	3.91
5	87.03	3.00	94.17	1.31
6	90.40	1.15	93.33	0.97
7	85.73	4.50	92.90	0.26
8	81.00	1.37	89.17	1.11

【０６２４】

実施例３３．脂質ナノ粒子を使用するマクロファージ細胞における連続編集

本研究では、ＣＩＩＴＡ又はＢ２Ｍを標的とするガイドを有するＬＮＰを使用して、単球を分化させる連続編集能力を実証した。単離されたＣＤ１４＋単球を、ＣＩＩＴＡ又はＢ２Ｍ　ＬＮＰ製剤のいずれかによって、解凍後の１日目及び２日目に編集した。結果を、フローサイトメトリーによって分析した。

【０６２５】

ＣＤ１４＋細胞を実施例３１に記載されるように単離し、後の使用のために凍結した。試験の０日目に、凍結細胞を解凍し、非組織培養プレート（Ｆａｌｃｏｎ、３５１１７２）にて１０ｎｇ／ｍＬのＧＭ－ＣＳＦ（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ、７８１４０．１）を有するＸ－ＶＩＶＯ１５培地で、１００，０００細胞／ウェルで三重のウェル中で培養した。細胞を、表８３に示されるように解凍後１日目に、Ｃａｓ９（配列番号６）をコードするｍＲＮＡ、及びＢ２Ｍを標的とするｓｇＲＮＡ　Ｇ０００５２９（配列番号７０１）、又はＣＩＩＴＡを標的とするｓｇＲＮＡ　Ｇ０１３６７４（配列番号７０２）のいずれかを送達するＬＮＰを用いて処理した。解凍の２日後、細胞を洗浄し、表８３に示されるように、Ｃａｓ９（配列番号６）をコードするｍＲＮＡ、及びＢ２Ｍを標的とするｓｇＲＮＡ　Ｇ

０００５２９（配列番号７０１）、又はＣＩＩＴＡを標的とするｓｇＲＮＡ　Ｇ０１３６７４（配列番号７０２）のいずれかを送達する第２のＬＮＰを用いて処理した。ＬＮＰを、概して、実施例１のように、それぞれ、イオン化脂質／コレステロール／ＤＳＰＣ／ＰＥＧのモル比として表される、５０／１０／３８．５／１．５の脂質組成物を用いて調製した。５ｕｇ／ｍＬの総ＲＮＡカーゴにおけるＬＮＰを、無血清又は５％のヒト血清培地のいずれかにおいて、１０ｕｇ／ｍｌのＡｐｏＥ３（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ　３５０－０２）とともに、３７℃で１５分間事前インキュベートした。事前インキュベートしたＬＮＰを細胞に添加し、２．５ｕｇ／ｍＬの最終的な総ＲＮＡカーゴ濃度、及び０％又は２．５％の最終的な血清濃度を得た。

【０６２６】

解凍の８日後、細胞をフローサイトメトリーによって表現型解析した。簡潔に述べると、単球由来マクロファージを、細胞を０．０５％のトリプシン及び０．５３ｍＭのＥＤＴＡ（Ｃｏｒｎｉｎｇ、２５－０５１－ＣＩ）とともに、３７Ｃで３０分間、又は顕微鏡検証によって決定されるように細胞がプレートから剥離されるまでインキュベートすることによって、培養プレートから剥離した。剥離した細胞を新しいプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、３７９９）に移入し、洗浄して、トリプシンを不活性化した。細胞を、氷上にて暗所でＣＤ１１ｂ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、３０１３０６）、Ｂ２Ｍ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、３１６３１２）及びＨＬＡ－ＤＲ、ＤＰ、ＤＱ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、３６１７０６）を標的とする抗体とともに、３０分間インキュベートした。その後、細胞を洗浄し、Ｃｙｔｏｆｌｅｘ装置（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）にて処理し、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアパッケージを使用して分析した。細胞を、サイズ、生存能、ＣＤ１１ｂ＋集団、続いてＢ２Ｍ陰性又はＨＬＡ－ＤＲ、ＤＰ、ＤＱ陰性集団にてゲーティングした。サイトメトリーデータを表８３及び図６９Ａ～Ｂに示す。ＨＬＡ－ＤＲ、ＤＰ、ＤＱ陰性細胞とＢ２Ｍ陰性細胞との両方の実質的な集団が、無血清培地条件と５％のヒト血清培地条件との両方での２つのＬＮＰによる編集後に観察されたので、デュアル編集が成功した。

【表８７】

表８３－連続ＬＮＰ処理後のＢ２Ｍ陰性細胞又はＨＬＡ－ＤＲ、ＤＰ、ＤＱ陰性細胞の平均パーセント

			B2M 陰性%		HLA-DR、DP、DQ 陰性%	
血清	編集１日目	編集２日目	平均	SD	平均	SD
無血清培地	0	0	1.95	1.84	11.28	5.12
	B2M	0	85.56	3.18	18.36	1.94
	CIITA	0	0.22	0.15	89.56	2.18
	B2M	CIITA	82.27	3.00	72.60	8.33
	CIITA	B2M	57.10	10.06	91.85	1.53
2.5%ヒト血清	0	0	0.51	0.52	8.16	2.05
	B2M	0	81.42	0.87	28.75	9.31
	CIITA	0	0.00	0.00	77.75	4.39
	B2M	CIITA	86.77	1.65	54.88	3.62
	CIITA	B2M	63.56	2.93	69.04	4.44

【０６２７】

実施例３４．選択イオン化脂質を用いる単球及びマクロファージにおける編集

選択されたイオン化脂質とともに製剤化されたＬＮＰを使用して編集の有効性を評価するために、単球及びマクロファージにおいてＮＧＳ及びフローサイトメトリーによって編集を評価した。

【０６２８】

ＣＤ１４＋細胞を実施例３１のように単離し、将来的な使用のために凍結した。ＣＤ１４＋細胞を解凍し、非組織培養プレート（Ｆａｌｃｏｎ、３５１１７２）上で、１０ｎｇ／ｍＬのＧＭ－ＣＳＦ（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ、７８１４０．１）を有する表２に記載されるようなＯｐＴｍｉｚｅｒベース培地中で、１００，０００細胞／ウェルで三重に培養し、剥離を容易にした。細胞を、Ｃａｓ９（配列番号６）をコードするｍＲＮＡ及びＢ２Ｍを標的とするｇＲＮＡ　Ｇ０００５２９（配列番号７０１）を送達するＬＮＰを用いて処理した。単球については、組織培養プレート上のプレーティングと同日にＬＮＰ添加が行われた。マクロファージについては、非組織培養プレート（Ｆａｌｃｏｎ、３５１１７２）上で５日間インキュベートした後にＬＮＰ添加が行われた。ＬＮＰを、概して、それぞれ、イオン化脂質／コレステロール／ＤＳＰＣ／ＰＥＧのモル比として表される、５０／１０／３８．５／１．５の脂質組成物を有する表８４及び８５に示されるイオン化脂質を使用して、実施例１のように調製した。ＬＮＰを、１０ｕｇ／ｍｌでのＡｐｏＥ３（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ　３５０－０２）とともに、３７℃で１５分間事前インキュベートした。事前インキュベートしたＬＮＰを、１：１ｖ／ｖの比で細胞に添加し、２．５ｕｇ／ｍＬ又は５ｕｇ／ｍＬの最終的な総ＲＮＡカーゴ用量を得た。

【０６２９】

ＬＮＰ処理から６日後に、単球操作細胞を、フローサイトメトリーによって表現型解析し、単球操作細胞とマクロファージ操作細胞との両方を、実施例１に記載されるようにＮＧＳのために収集した。簡潔に述べると、細胞を、実施例３１に概して記載されるように、ＣＤ６８、ＣＤ１１ｂ及びＨＬＡ－ＡＢＣ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、３１１４３２）を標的とする抗体とともにインキュベートした。Ｂ２Ｍの代わりにＨＬＡ－ＡＢＣ標的化抗体を使用した。その後、細胞を洗浄し、Ｃｙｔｏｆｌｅｘ装置（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）にて処理し、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアパッケージを使用して分析した。細胞を、サイズ、ＣＤ６８＋、ＣＤ１１ｂ＋、続いてＨＬＡ－ＡＢＣ－集団にてゲーティングした。表８４及び図７０に、サイトメトリーデータを示す。ＮＧＳ編集データを表８５に示す。脂質Ａと脂質Ｄとの両方の製剤は、解凍後０日目及び５日目に有効な編集を示した。編集は、細胞をＲＰＭＩ又はＸＶＩＶＯ－１５培地で培養したときにも観察された。

【表８８】

表８４－様々なイオン化脂質を有するＬＮＰを用いて単球を編集した後の細胞における表面タンパク質ノックアウトを示す細胞の平均パーセンテージ

イオン化脂質	総RNA(ug/ml)	CD68+CD11b+HLA-ABC-%	
		平均	SD
未編集	0	3.07	1.02
脂質A	2.5	80.08	3.14
脂質A	5	80.23	9.81
脂質D	2.5	58.48	11.52
脂質D	5	71.57	11.82

【表８９】
表８５－様々なイオン化脂質を有するＬＮＰを用いて処理した後の細胞における平均編集パーセンテージ

		編集０日目		編集５日目	
イオン化脂質	総RNA(ug/mL)	平均	SD	平均	SD
脂質A	2.5	85.70	3.51	93.13	3.15
脂質A	5	87.03	5.14	96.90	0.42
脂質D	2.5	81.77	1.50	77.77	3.23
脂質D	5	89.37	0.50	84.13	1.61

【０６３０】
実施例３５．脂質ナノ粒子を使用するｉＰＳＣにおける編集
ＬＮＰを介する編集有効性を決定するために、誘導多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）を、Ｃａｓ９をコードするｍＲＮＡ及びＢ２Ｍを標的とするｓｇＲＮＡを送達するＬＮＰを用いて処理する。
【０６３１】
ＴＲＢＣ１／２遺伝子座で編集されたヒトｉＰＳＣ細胞を、商業的に入手する。ＴＲＢＣ編集細胞を解凍し、洗浄し、培地に再懸濁させる。細胞を、毎日新しくした培地を用いてＧｅｌｔｒｅｘ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）コーティングプレート上で培養する。解凍から５日後、ｉＰＳＣ細胞を解離し、Ｇｅｌｔｒｅｘコーティング９６ウェルプレートに再プレーティングする。再プレーティングの２４時間後、細胞を洗浄し、培地に再懸濁させる。Ｃａｓ９をコードするｍＲＮＡ及びＢ２Ｍを標的とするｓｇＲＮＡを送達するＬＮＰを、ＡｐｏＥ３とともに３７Ｃで１５分間事前インキュベートすることによって調製する。事前インキュベートしたＬＮＰ混合物をｉＰＳＣ細胞に移入する。細胞を、初期のＬＮＰ曝露の２４時間後に洗浄し、培地を、その後毎日新しくする。ＬＮＰ編集の３、５、及び７日後に細胞を収集し、Ｂ２Ｍ遺伝子座におけるゲノム編集のためにＮＧＳによって分析する。
【０６３２】
実施例３６．血清培地条件で評価したＬＮＰ組成物活性
ＬＮＰ編集有効性を評価するために、ＬＮＰ組成物を、ＣＤ３陽性Ｔ細胞における挿入効率に対する代替培地条件の効果を評価した。Ｔ細胞を、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びＴＲＡＣ遺伝子を標的とするｓｇＲＮＡをカプセル化する脂質構成要素のモル比が異なるＬＮＰ組成物を用いて処理した。ＡＡＶ６ウイルス構築物は、ＴＲＡＣ遺伝子座（Ｖｉｇｅｎｅ；配列番号８）への部位特異的組み込みのために、ホモロジーアームに隣接するＧＦＰレポーターをコードする相同性指向修復テンプレート（ＨＤＲＴ）を送達した。ＴＲＡＣ遺伝子破壊は、Ｔ細胞受容体表面タンパク質の喪失についてフローサイトメトリーによって評価した。挿入は、ＧＦＰ発光について、フローサイトメトリーによって評価した。
【０６３３】
ＬＮＰを、概して、実施例１に記載されるように、それぞれ、イオン化脂質Ａ／コレステロール／ＤＳＰＣ／ＰＥＧのモル比として表される、表８６に示される脂質組成物を用いて調製した。ＬＮＰは、Ｃａｓ９（配列番号６）をコードするｍＲＮＡ及びヒトＴＲＡＣを標的とするｓｇＲＮＡ　Ｇ０１３００６を送達した。ｓｇＲＮＡ対Ｃａｓ９　ｍＲＮＡのカーゴ比は、重量基準で１：２であった。ＬＮＰを、実施例２１のようにＡｐｏＥ３とともに事前インキュベートした。
【０６３４】
以下の培地修飾を用いて、実施例２１に記載のように単一のドナーからのＴ細胞を調製

した。Ｔ細胞を、２．５％のヒトＡＢ血清（ＨＡＢＳ）、２．５％のＣＴＳ免疫細胞ＳＲ（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号Ａ２５９６１－０１）血清代替物（ＳＲ）、５％の血清代替物（ＳＲ）、又は２．５％のヒトＡＢ血清及び２．５％の血清代替物の組み合わせのいずれかを補充した培地によりプレーティングした。Ｔ細胞を、実施例２１に記載されるように、解凍後２４時間で活性化した。活性化から２日後、Ｔ細胞を、実施例２１に記載されるようなＬＮＰを用いて、０．３１μｇ／ｍｌ、０．６３μｇ／ｍｌ、１．２５μｇ／ｍｌ、及び２．５μｇ／ｍｌのＬＮＰ濃度でトランスフェクションした。ＴＲＡＣ遺伝子座（Ｖｉｇｅｎｅ；配列番号８）への部位特異的組み込みのためのホモロジーアームに隣接するＧＦＰレポーターをコードするＡＡＶ６を、３×１０ｅ５ウイルス粒子／細胞の感染多重度（ＭＯＩ）で各ウェルに添加した。ＤＮＡ依存性タンパク質キナーゼの小分子阻害剤である化合物４を０．２５ｕＭで添加した。２４時間後、全ての細胞を５％のＨＡＢＳを含有する培地に分割した。

【０６３５】

トランスフェクションから５日後、Ｔ細胞を、実施例２１に記載されるようにフローサイトメトリー分析によって表現型解析し、ＬＮＰ組成物の挿入効率を評価した。表８６は、ＣＤ３陰性細胞のパーセントを示す。ＴＲＡＣによってコードされるＴ細胞受容体アルファ鎖は、Ｔ細胞受容体／ＣＤ３複合体アセンブリ及び細胞表面への転座に必要とされる。したがって、ゲノム編集によるＴＲＡＣ遺伝子の破壊は、Ｔ細胞の細胞表面上のＣＤ３タンパク質の喪失をもたらす。各培地条件におけるＧＦＰ陽性Ｔ細胞の平均パーセンテージを表８７に示す。ＧＦＰタンパク質を発現する細胞は、ゲノムへの挿入に成功したことを示す。

【表９０】

表８６－ＡＡＶ及び示されるＬＮＰ製剤を用いる活性化されたＴ細胞の処理後のＣＤ３陰性Ｔ細胞パーセント。

組成物	LNP(ug/ml)	2.5%HABS		2.5%SR		5%SR		2.5%HABS及び2.5%SR	
		平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
50/10/38.5/1.5	2.5	94.55	0.07	99.00	0.14	97.95	0.07	99.25	0.07
	1.25	92.25	0.35	96.05	1.20	92.10	2.55	95.95	0.21
	0.63	76.55	0.21	76.60	3.11	63.55	2.47	74.70	1.27
	0.31	48.35	1.34	25.95	1.20	16.55	2.47	41.55	1.20
35/15/47.5/2.5	2.5	99.40	0.00	98.80	0.42	98.65	0.07	98.70	0.14
	1.25	98.85	0.07	98.95	0.64	98.50	0.14	97.25	0.35
	0.63	94.10	0.28	96.80	0.42	95.25	0.35	84.60	1.41
	0.31	75.20	0.14	68.75	9.97	64.20	0.57	50.30	1.56

【表９１】

表８７－ＡＡＶ及び示されるＬＮＰ製剤を用いる活性化されたＴ細胞の処理後のＧＦＰ＋細胞パーセント。

組成物	LNP(ug/mL)	2.5%HABS		2.5%SR		5%SR		2.5%HABS及び2.5%SR	
		平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
50/10/38.5/1.5	2.5	94.6	0.0	95.4	0.4	93.7	0.6	90.0	0.1
	1.25	92.3	0.3	92.3	0.5	87.7	1.8	75.1	1.1
	0.63	76.6	0.1	76.3	1.3	63.1	1.8	31.2	2.6
	0.31	48.4	0.9	30.5	1.0	19.5	2.5	5.0	0.7
35/15/47.5/2.5	2.5	95.6	0.0	96.3	0.5	95.6	0.1	94.7	0.4
	1.25	94.8	0.5	96.0	1.4	95.6	0.0	91.1	0.2
	0.63	89.6	0.6	93.3	0.5	91.1	0.2	78.8	1.0
	0.31	74.7	0.1	75.0	0.0	64.4	0.4	48.8	1.2

【０６３６】

実施例３７．脂質ナノ粒子を用いるｉＰＳＣの編集

ＬＮＰを介する編集有効性を決定するために、誘導多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）を、Ｃａｓ９をコードするｍＲＮＡ及びＢ２Ｍを標的とするｓｇＲＮＡを送達するＬＮＰを用いて処理した。

【０６３７】

ガイドＧ０１４８３２（配列番号７２３）を使用するＣａｓ９　ＲＮＰによるエレクトロポレーションによって、ＴＲＢＣ１及びＴＲＢＣ２遺伝子座で編集されたヒトｉＰＳＣ細胞（Ａｌｓｔｅｍ、ｉＰＳ１１）を、Ｃｅｎｔｒｅ　ｆｏｒ　Ｃｏｍｍｅｒｃｉａｌｉｚａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｒｅｇｅｎｅｒａｔｉｖｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅにより産生した。Ｇｅｌｔｒｅｘ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、Ａ１４１３３０２）を一晩解凍し、ＤＭＥＭ／Ｆ－１２（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、１１３３００３２）により１：１００希釈し、６ウェルプレート（Ｆａｌｃｏｎ、１４０６７５）の１ｍＬ／ウェルで適用した。Ｇｅｌｔｒｅｘ処理プレートを３７℃で１時間インキュベートし、使用前に洗浄した。

【０６３８】

ＴＲＢＣ編集されたｉＰＳＣを、解凍し、洗浄し、室温のＥｓｓｅｎｔｉａｌ８（Ｅ８）培地（Ｔｈｅｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、Ａ１５１７００１）に再懸濁し、Ｇｅｌｔｒｅｘコーティング６ウェルプレートのうちの２つのウェル中で３７℃で培養した。培地を、室温のＥ８により毎日新しくした。

【０６３９】

解凍から５日後、細胞を分割する３時間前に細胞培地を新しくした。ｉＰＳＣを、２ｍＬ／ウェルのＰＢＳ（Ｃｏｒｎｉｎｇ、２１－０４０－ＣＭ）により洗浄した。Ｇｅｎｔｌｅ　Ｃｅｌｌ　Ｄｉｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ　Ｒｅａｇｅｎｔ（ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、０７１７４）を０．５ｍＬ／ウェルで添加し、均一に分布させた。細胞を３７℃で１２分間インキュベートし、プレートをしっかりと叩いて細胞を解離し、細胞を１ｍＬの室温のＥ８培地に再懸濁させた。細胞を、上下にピペッティングすることによってプレートから収集した。プレートを洗浄し、全ての細胞を回収するために、追加の１ｍＬの培地を使用した。全細胞計数は、血球計によって得られた。９６ウェルプレート（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、３５３０７２）を、６０ｕＬ／ウェルで希釈したＧｅｌｔｒｅｘを使用して、上記のように調製した。細胞を２００Ｇで３分間遠心分離し、１５，０００細胞／ウェルの細胞密度で、１０ｕＭのＲｏｃｋ阻害剤Ｙ－２７６３２ジ

ヒドロクロリド（Ｔｏｃｒｉｓ、１２５４）を有する８０ｕＬの室温のＥ８培地中で、Ｇｅｌｔｒｅｘコーティング９６ウェルプレートにプレーティングした。３７℃で２４時間インキュベートした後、細胞を洗浄し、４０ｕＬの室温のＥ８培地に再懸濁させた。

【０６４０】

細胞を、Ｃａｓ９（配列番号６）をコードするｍＲＮＡ及びＢ２Ｍを標的とするｇＲＮＡ　Ｇ０００５２９（配列番号７０１）を送達するＬＮＰを用いて処理した。ＬＮＰを、概して、実施例１のように、それぞれ、イオン化脂質／コレステロール／ＤＳＰＣ／ＰＥＧのモル比として表される、５０／１０／３８．５／１．５の脂質組成物を用いて調製した。ＬＮＰを、ｇＲＮＡ対ｍＲＮＡの１：２重量比により調製した。ＬＮＰを、１０ｕｇ／ｍＬのＡｐｏＥ３とともに、５ｕｇ／ｍＬにおいて３７Ｃで１５分間事前インキュベートした。ＬＮＰ混合物をｉＰＳＣ細胞に移入し、ウェル当たりの最終用量２．５ｕｇ／ｍＬの総ＲＮＡカーゴを得た。細胞を、ＬＮＰ添加の２４時間後に洗浄し、培地を、その後毎日新しくした。ＬＮＰ添加の３、５、及び７日後に細胞を採取し、実施例１に記載されるようにＮＧＳによって分析した。表８８に示すＬＮＰ処理後のｉＰＳＣにおける平均編集パーセンテージ。

【表９２】

表８８－ＬＮＰによるｉＰＳＣ処理後の示される時間点での編集パーセント。

	未編集細胞		2.5ug/mL　LNP		
日	平均	SD	平均	SD	N
3日目	0.07	0.06	96.03	1.46	3
5日目	0.03	0.06	95.10	1.47	3
7日目	0.20	0.26	98.60	0.44	3

【０６４１】

表８９．配列のリスト

以下の表において、及び全体を通して、「ｍＡ」、「ｍＣ」、「ｍＵ」、又は「ｍＧ」という用語は、２’－Ｏ－Ｍｅにより修飾されているヌクレオチドを表すために使用される。

【０６４２】

以下の表において、ａ「＊」は、ＰＳ修飾を示すために使用される。本出願では、用語Ａ＊、Ｃ＊、Ｕ＊、又はＧ＊を使用して、ＰＳ結合で隣りの（例えば３’）ヌクレオチドに結合されているヌクレオチドを示すことができる。

【０６４３】

ＤＮＡ配列（Ｔを含む）が、ＲＮＡに関して参照される場合、Ｔは、Ｕで置き換えられるべきであり（文脈に応じて、修飾又は非修飾であり得る）、逆もまた同様であることが理解される。

【０６４４】

以下の表において、単一アミノ酸の文字コードを使用して、ペプチド配列を提供する。

【表９３－１】

説明	配列番号	配列
gRNA G000529	701	mG*mG*mC*CACGGAGCGAGACAUCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
gRNA G013674	702	mU*mU*mC*UAGGGGCCCCAACUCCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
gRNA G012086	703	mA*mG*mA*GUCUCUCAGCUGGUACAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
gRNA G016239	707	mG*mG*mC*CUCGGCGCUGACGAUCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
gRNA G013006	708	mC*mU*mC*UCAGCUGGUACACGGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
gRNA G012738	709	mG*mG*mC*CACGGAGCGAGACAUCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
gRNA G000562	710	mC*mC*mA*AUAUCAGGAGACUAGGAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
gRNA G015995	711	mU*mU*mA*CCCCACUUAACUAUCUUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
gRNA G016017	712	mC*mC*mA*CUCUGCCCCAUGGGCUCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
gRNA G016206	713	mC*mG*mC*UGUCAAGUCCAGUUCUAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
gRNA G018117	714	mG*mC*mG*UCCACAUCCUGCAAGGGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

【表９３－２】

説明	配列番号	配列
gRNA G013676	715	mU*mG*mG*UCAGGGCAAGAGCUAUUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
gRNA G018995	716	mA*mC*mA*GCGACGCCGCGAGCCAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
pINT1405、ITR を含む HD1　TCR 挿入	717	ttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtc gcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagag ggagtggccaactccatcactaggggttcctagatcttgccaacataccataaacct cccattctgctaatgcccagcctaagttggggagaccactccagattccaagatgta cagtttgctttgctgggccttttcccatgcctgcctttactctgccagagttatat tgctggggttttgaagaagatcctattaaataaaagaataagcagtattattaagta gccctgcatttcaggtttccttgagtggcaggccaggcctggccgtgaacgttcact gaaatcatggcctcttggccaagattgatagcttgtgcctgtccctgagtcccagtc catcacgagcagctggtttctaagatgctatttcccgtataaagcatgagaccgtga cttgccagccccacagagccccgcccttgtccatcactggcatctggactccagcct gggttggggcaaagagggaaatgagatcatgtcctaaccctgatcctcttgtcccac agatatccagaaccctgaccctgccgctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcaca tcgcccacagtccccgagaagttgggggggaggggtcggcaattgaaccggtgcctag agaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgccttttt cccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttctttt cgcaacgggtttgccgccagaacacaggtaagtgccgtgtgtggttcccgcgggcct ggcctctttacgggttatggcccttgcgtgccttgaattacttccacgccctggct gcagtacgtgattcttgatcccgagcttcgggttggaagtgggtgggagagttcgag gccttgcgcttaaggagccccttcgcctcgtgcttgagttgaggcctggcttgggcg ctggggccgccgcgtgcgaatctggtggcaccttcgcgcctgtctcgctgctttcga taagtctctagccatttaaaatttttgatgacctgctgcgacgctttttttctggca agatagtcttgtaaatgcgggccaagatgtgcacactggtatttcggttttggggc cgcgggcggcgacggggcccgtgcgtcccagcgcacatgttcggcgaggcggggcct gcgagcgcggccaccgagaatcggacgggggtagtctcaagctggccggcctgctct ggtgcctggcctcgcgccgccgtgtatcgccccgccctgggcggcaaggctggcccg gtcggcaccagttgcgtgagcggaaagatggccgcttcccggccctgctgcagggag ctcaaaatggaggacgcggcgctcgggagagcgggcgggtgagtcacccacacaaag gaaaagggcctttccgtcctcagccgtcgcttcatgtgactccacggagtaccgggc

【表９３－３】

説明	配列番号	配列
		gccgtccaggcacctcgattagttctcgagcttttggagtacgtcgtctttaggttg
		gggggagggttttatgcgatggagtttccccacactgagtgggtggagactgaagt
		taggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaatttgccctttttgagtttgg
		atcttggttcattctcaagcctcagacagtggttcaaagttttttttcttccatttca
		ggtgtcgtgatgcggccgccaccatgggatcttggacactgtgttgcgtgtccctgt
		gcatcctggtggccaagcacacagatgccggcgtgatccagtctcctagacacgaag
		tgaccgagatgggccaagaagtgaccctgcgctgcaagcctatcagcggccacgatt
		acctgttctggtacagacagaccatgatgagaggcctggaactgctgatctacttca
		acaacaacgtgcccatcgacgacagcggcatgcccgaggatagattcagcgccaaga
		tgcccaacgccagcttcagcaccctgaagatccagcctagcgagcccagagatagcg
		ccgtgtacttctgcgccagcagaaagacaggcggctacagcaatcagccccagcact
		ttggagatggcacccggctgagcatcctggaagatctgaagaacgtgttcccacctg
		aggtggccgtgttcgagccttctgaggccgagatcagccacacacagaaagccacac
		tcgtgtgtctggccaccggcttctatcccgatcacgtggaactgtcttggtgggtca
		acggcaaagaggtgcacagcggcgtcagcaccgatcctcagcctctgaaagagcagc
		ccgctctgaacgacagcagatactgcctgagcagcagactgagagtgtccgccacct
		tctggcagaaccccagaaaccacttcagatgccaggtgcagttctacggcctgagcg
		agaacgatgagtggacccaggatagagccaagcctgtgacacagatcgtgtctgccg
		aagcctggggcagagccgattgtggctttaccagcgagagctaccagcagggcgtgc
		tgtctgccacaatcctgtacgagatcctgctgggcaaagccactctgtacgccgtgc
		tggtgtctgccctggtgctgatggccatggtcaagcggaaggatagcaggggcggct
		ccggtgccacaaacttctccctgctcaagcaggccggagatgtggaagagaaccctg
		gccctatggaaaccctgctgaaggtgctgagcggcacactgctgtggcagctgacat
		gggtccgatctcagcagcctgtgcagtctcctcaggccgtgattctgagagaaggcg
		aggacgccgtgatcaactgcagcagctctaaggccctgtacagcgtgcactggtaca
		gacagaagcacggcgaggcccctgtgttcctgatgatcctgctgaaaggcggcgagc
		agaagggccacgagaagatcagcgccagcttcaacgagaagaagcagcagtccagcc
		tgtacctgacagccagccagctgagctacagcggcacctacttttgtggcaccgcct
		ggatcaacgactacaagctgtctttcggagccggcaccacagtgacagtgcgggcca
		atattcagaaccccgatcctgccgtgtaccagctgagagacagcaagagcagcgaca
		agagcgtgtgcctgttcaccgacttcgacagccagaccaacgtgtcccagagcaagg
		acagcgacgtgtacatcaccgataagactgtgctggacatgcggagcatggacttca
		agagcaacagcgccgtggcctggtccaacaagagcgatttcgcctgcgccaacgcct
		tcaacaacagcattatccccgaggacacattcttcccaagtcctgagagcagctgcg

【表９３－４】

説明	配列番号	配列
		acgtgaagctggtggaaaagagcttcgagacagacaccaacctgaacttccagaacc tgagcgtgatcggcttcagaatcctgctgctcaaggtggccggcttcaacctgctga tgaccctgagactgtggtccagctaacctCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATC TGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGT CCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTAT TCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAG GCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGcttctgaggcggaaagaaccagctgggg ctctaggggtatccccactagtcgtgtaccagctgagagactctaaatccagtgac aagtctgtctgcctattcaccgattttgattctcaaacaaatgtgtcacaaagtaag gattctgatgtgtatatcacagacaaaactgtgctagacatgaggtctatggacttc aagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgcc ttcaacaacagcattattccagaagacaccttcttccccagcccaggtaagggcagc tttggtgccttcgcaggctgtttccttgcttcaggaatggccaggttctgcccagag ctctggtcaatgatgtctaaaactcctctgattggtggtctcggccttatccattgc caccaaaaccctcttttactaagaaacagtgagccttgttctggcagtccagagaa tgacacgggaaaaaagcagatgaagagaaggtggcaggagagggcacgtggcccagc ctcagtctctagatctaggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgc gctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttggt cgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaa
gRNA G016200	718	mC*mC*mA*CACCCAAAAGGCCACACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
gRNA G016086	719	mC*mG*mC*CCAGGUCCUCACGUCUGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
AAVS1 用 AAV6-1008 GFP インサート	720	tgcatcatcaccgtttttctggacaaccccaaagtaccccgtctccctggctttagc cacctctccatcctcttgctttctttgcctggacaccccgttctcctgtggattcgg gtcacctctcactcctttcatttgggcagctcccctaccccccttacctctctagtc tgtgctagctcttccagccccctgtcatggcatcttccaggggtccgagagctcagc tagtcttcttcctccaacccgggcccctatgtccacttcaggacagcatgtttgctg cctccagggatcctgtgtccccgagctgggaccaccttatattcccagggccggtta atgtggctctggttctgggtacttttatctgtcccctccaccccacagtggggccac tagggacaggattggtgacagaaaagccccatccttaggcctcctccttccgagtaa ttcatacaaaaggactcgcccctgccttggggaatcccagggaccgtcgttaaactc

【表９３－５】

説明	配列番号	配列
		ccactaacgtagaacccagagatcgctgcgttcccgccccctcacccgcccgctctc gtcatcactgaggtggagaagagcatgcgtgaggctccggtgcccgtcagtgggcag agcgcacatcgcccacagtccccgagaagttgggggggaggggtcggcaattgaaccg gtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctcc gccttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacg ttctttttcgcaacgggtttgccgccagaacacaggtaagtgccgtgtgtggttccc gcgggcctggcctctttacgggttatggcccttgcgtgccttgaattacttccacgc ccctggctgcagtacgtgattcttgatcccgagcttcgggttggaagtgggtgggag agttcgaggccttgcgcttaaggagccccttcgcctcgtgcttgagttgaggcctgg cttgggcgctggggccgccgcgtgcgaatctggtggcaccttcgcgcctgtctcgct gctttcgataagtctctagccatttaaaatttttgatgacctgctgcgacgcttttt ttctggcaagatagtcttgtaaatgcgggccaacatctgcacactggtatttcggtt tttggggccgcgggcggcgacggggcccgtgcgtcccagcgcacatgttcggcgagg cggggcctgcgagcgcggccaccgagaatcggacgggggtagtctcaagctggccgg cctgctctggtgcctggcctcgcgccgccgtgtatcgccccgccctgggcggcaagg ctggcccggtcggcaccagttgcgtgagcggaaagatggccgcttcccggccctgct gcagggagctcaaaatggaggacgcggcgctcgggagagcgggcgggtgagtcaccc acacaaaggaaaagggcctttccgtcctcagccgtcgcttcatgtgactccacggag taccgggcgccgtccaggcacctcgattagttctcgagcttttggagtacgtcgtct ttaggttgggggagggttttatgcgatggagtttccccacactgagtgggtggag actgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaatttgccctttt gagtttggatcttggttcattctcaagcctcagacagtggttcaaagttttttcctt ccatttcaggtgtcgtgacgctagcgctaccggactcaatctcgagctcaagcttcg aattctgcagtcgacggtaccgcgggcccgggatccaccggtcgccaccatggtgAG CAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGA CGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGG CAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCAC CCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACAT GAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCAC CATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGG CGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAA CATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGC CGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGA CGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCC

【表９３－６】

説明	配列番号	配列
		CGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCC CAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCAC TCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGtaatagcggccgcgactctagatcataatcag ccataccacatttgtagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctcccct gaacctgaaacataaaatgaatgcaattgttgttgttaacttgtttattgcagctta taatggttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttc actgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttaaggcgttagtct cctgatattgggtctaacccccacctcctgttaggcagattccttatctggtgacac acccccatttcctggagccatctctctccttgccagaacctctaaggtttgcttacg atggagccagagaggatcctgggagggagagcttggcaggggtgggagggaagggg gggatgcgtgacctgcccggttctcagtggccaccctgcgctaccctctcccagaac ctgagctgctctgacgcggccgtctggtgcgtttcactgatcctggtgctgcagctt ccttacacttcccaagaggagaagcagtttggaaaaacaaaatcagaataagttggt cctgagttctaactttggctcttcacctttctagtccccaatttatattgttcctcc gtgcgtcagttttacctgtgagataaggccagtagccagccccgt
AAVS1 用 AAV6-231 GFP インサート	721	gaccactttgagctctactggcttctgcgccgcctctggcccactgtttcccttcc caggcaggtcctgctttctctgacctgcattctctcccctgggcctgtgccgctttc tgtctgcagcttgtggcctgggtcacctctacggctggcccagatccttccctgccg cctccttcaggttccgtcttcctccactccctcttcccttgctctctgctgtgttg ctgcccaaggatgctctttccggagcacttccttctcggcgctgcaccacgtgatgt cctctgagcggatcctccccgtgtctgggtcctctccgggcatctctcctccctcac ccaaccccatgccgtcttcactcgctgggttccctttccttctccttctggggcct gtgccatctctcgtttcttaggatggccttctccgacggatgtctcccttgcgtccc gcctcccccttcttgtaggcctgcatcatcaccgtttttctggacaaccccaaagtac cccgtctccctggctttagccacctctccatcctcttgctttctttgcctggacacc ccgttctcctgtggattcgggtcacctctcactcctttcatttgggcagctccccta ccccccttacctctctagtctgtgctagctcttccagccccctgtcatggcatcttc caggggtccgagagctcagctagtcttcttcctccaacccgggcccctatgtccact tcaggacagcatgtttgctgcctccagggatcctgtgtccccgagctgggaccacct tatattcccagggccggttaatgtggctctggttctgggtacttttatctgtcccct ccaccccacagtggggccactagggacaggattggtgacagaaaagccccatcctta ggcctcctccttagttattaatgagtaattcatacaaaaggactcgcccctgccttg gggaatcccagggaccgtcgttaaactcccactaacgtagaacccagagatcgctgc gttccgccccctcacccgcccgctctcgtcatcactgaggtggagaagagcatgcg

【表９３－７】

説明	配列番号	配列
		tgaggctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaag ttgggggagggtcggcaattgaaccggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaac tgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgccttttcccgagggtgggggagaaccg tatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgcaacgggtttgccgccaga acacaggtaagtgccgtgtgtggttcccgcgggcctggcctctttacgggttatggc ccttgcgtgccttgaattacttccacgcccctggctgcagtacgtgattcttgatcc cgagcttcgggttggaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagcccc ttcgcctcgtgcttgagttgaggcctggcttgggcgctggggccgccgcgtgcgaat ctggtggcaccttcgcgcctgtctcgctgctttcgataagtctctagccatttaaaa ttttgatgacctgctgcgacgctttttttctggcaagatagtcttgtaaatgcgggg ccaaCatctgcacactggtatttcggttttggggccgcgggcggcgacggggcccg tgcgtcccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccgagaat cggacgggggtagtctcaagctggccggcctgctctggtgcctggcctcgcgccgcc gtgtatcgccccgccctgggcggcaaggctggcccggtcggcaccagttgcgtgagc ggaaagatggccgcttcccggccctgctgcagggagctcaaaatggaggacgcggcg ctcgggagagcgggcgggtgagtcacccacacaaaggaaaagggcctttccgtcctc agccgtcgcttcatgtgactccacggagtaccgggcgccgtccaggcacctcgatta gttctcgagcttttggagtacgtcgtctttaggttgggggagggttttatgcgat ggagtttccccacactgagtgggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgat gtaattctccttggaatttgccctttttgagtttggatcttggttcattctcaagcc tcagacagtggttcaaagtttttttcttccatttcaggtgtcgtgacgctagcgcta ccggactcaatctcgagctcaagcttcgaattctgcagtcgacggtaccgcgggccc gggatccaccggtcgccaccATGgtgAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGG TGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCG GCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCA CCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGC AGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCA TGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACA AGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGA AGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACT ACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGA ACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACC AGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGA GCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGC

【表９３－８】

説明	配列番号	配列
		TGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAt agcggccgcgactctagatcataatcagccataccacatttgtagaggttttacttg ctttaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattg ttgttgttaacttgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatagcatca caaatttcacaaataaagcatttttttcactgcattctagttgtggtttgtccaaac tcatcaatgtatcttaaggcgtgtctaaccccccacctcctgttaggcagattcctta tctggtgacacacccccatttcctggagccatctctctccttgccagaacctctaag gtttgcttacgatggagccagagaggatcctgggagggagagcttggcaggggggtgg gagggaaggggggggatgcgtgacctgcccggttctcagtggccaccctgcgctaccc tctcccagaacctgagctgctctgacgcggccgtctggtgcgtttcactgatcctgg tgctgcagcttccttacacttcccaagaggagaagcagtttggaaaaacaaaatcag aataagttggtcctgagttctaactttggctcttcacctttctagtccccaatttat attgttcctccgtgcgtcagttttacctgtgagataaggccagtagccagccccgtc ctggcagggctgtggtgaggaggggggtgtccgtgtggaaaactccctttgtgagaa tggtgcgtcctaggtgttcaccaggtcgtggccgcctctactccctttctctttctc catccttctttccttaaagagtccccagtgctatctgggacatattcctccgcccag agcagggtcccgcttccctaaggccctgctctgggcttctgggtttgagtccttggc aagcccaggagaggcgctcaggcttccctgtccccctttcctcgtccaccatctcatg cccctggctctcctgcccccttccctacaggggttcctggctctgctcttcagactga gccccgttcccctgcatcccccgttcccctgcatcccccttcccctgcatcccccaga ggccccaggccacctacttggcctggaccccacgagaggccaccccagccctgtcta ccaggctgccttttgggtggattctcctccaa
B2M 用 AAV6-1018 GFP インサート	722	agatcttaatcttctgggtttccgttttctcgaatgaaaaatgcaggtccgagcagt taactggctggggcaccattagcaagtcacttagcatctctgggggccagtctgcaaa gcgaggggggcagccttaatgtgcctccagcctgaagtcctagaatgagcgcccggtg tcccaagctggggcgcgcaccccagatcggagggcgccgatgtacagacagcaaact cacccagtctagtgcatgccttcttaaacatcacgagactctaagaaaaggaaactg aaaacgggaaagtccctctctctaacctggcactgcgtcgctggcttggagacaggt gacggtccctgcgggccttgtcctgattggctgggcacgcgtttaatataagtggag gcgtcgcgctggcgggcattcctgaagctgacagcattcgggccgagaGGCTCCGGT GCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGG GTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGAT GTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCA GTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGT

【表９３－９】

説明	配列番号	配列
		GCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCT TGAATTACTTCCACGCCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGT TGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGC TTGAGTTGAGGCCTGGCTTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCT TCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACC TGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATgTGCA CACTGGTATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCG CACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTA GTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCC GCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCC GCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCG GGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTC ATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTT TTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCA CACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTT GGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGT TCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGAcggCCGGCCCCGCCACCatggtg AGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGC GACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC GGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCC ACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCAC ATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGC ACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAG GGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGC AACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATG GCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAG GACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGC CCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGAC CCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATC ACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAATCTAGAcctCGACTGTGCCTTCTAGTT GCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCA CTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGT GTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAG ACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGcttctgaggcggaaagaa

【表９３－１０】

説明	配列番号	配列
		ccagctggggctctaggggtatccccACTAGTtgtctcgctccgtggccttagctg tgctcgcgctactctctctttctggcctggaggctatccagcgtgagtctctcctac cctcccgctctggtccttcctctcccgctctgcaccctctgtggccctcgctgtgct ctctcgctccgtgacttcccttctccaagttctccttggtggcccgccgtggggcta gtccagggctggatctcggggaagcggcggggtggcctgggagtggggaaggggtg cgcacccgggacgcgcgctacttgccccctttcggcggggagcaggggagacctttgg cctacggcgacgggagggtcgggacaaagtttagggcgtcgataagcgtcagagcgc cgaggttgggggagggtttctcttccgctctttcgcggggcctctggctcccccagc gcagctggagtgggggacgggtaggct
G014832	723	mG*mG*mC*UCUCGGAGAAUGACGAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
Sp. Cas9 をコードするORF	配列番号1	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGCA GTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACA GACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCGACAGCGGAGAA ACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAG AACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGAC AGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAA AGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCG ACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGA CTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAA GGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCCAG ACATACAACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAG GCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAG CTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGA CTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTG AGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAG TACGCAGACCTGTTCCTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGAC ATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAG AGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAG CTGCCGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGA TACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTG GAAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTG AGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAA

10 20 30 40 50

【表９３－１１】

説明	配列番号	配列
		CTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCCTGAAGGACAACAGA
		GAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCA
		AGAGGAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCG
		TGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGA
		ATGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACAGCCTG
		CTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAA
		GGAATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTG
		CTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAG
		AAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCA
		AGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGAC
		AACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTCGAA
		GACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTCGACGACAAG
		GTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAG
		CTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAG
		AGCGACGGATTCGCAAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACA
		TTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAA
		CACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTC
		AAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTC
		ATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAA
		AGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAA
		CACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAG
		AACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTAC
		GACGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAG
		GTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAA
		GTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACA
		CAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGAC
		AAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTC
		GCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATC
		AGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGAC
		TTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACTACCACCACGCACACGACGCATAC
		CTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAA
		TTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAA
		CAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTC
		TTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAA

【表９３－１２】

説明	配列番号	配列
		ACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTC AGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACA GGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCA AGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCA TACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGC GTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCG ATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAG CTGCCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGC GCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTC CTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAG AAGCAGCTGTTCGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATC AGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGC GCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCAC CTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACA ATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCAC CAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGAC GGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAG
Sp. Cas9 をコードするORF	配列番号2	ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCCGTGGGCTGGGCC GTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCTCCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACC GACCGGCACTCCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCGACTCCGGCGAG ACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAG AACCGGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCTCCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGAC TCCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGTCCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAG CGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCC ACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACTCCACCGACAAGGCCGACCTGCGG CTGATCTACCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAG GGCGACCTGAACCCCGACAACTCCGACGTGGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTGCAG ACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCTCCGGCGTGGACGCCAAG GCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTCCAAGTCCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAG CTGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTCGGCAACCTGATCGCCCTGTCCCTGGGC CTGACCCCCAACTTCAAGTCCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTG TCCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGACCAG TACGCCGACCTGTTCCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGTCCGAC ATCCTGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGTCCGCCTCCATGATCAAG

【表９３－１３】

説明	配列番号	配列
		CGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAG
		CTGCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAACGGCTACGCCGGC
		TACATCGACGGCGGCGCCTCCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTG
		GAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTG
		CGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCTCCATCCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAG
		CTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAACCGG
		GAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCC
		CGGGGCAACTCCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAAGTCCGAGGAGACCATCACCCCC
		TGGAACTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCTCCGCCCAGTCCTTCATCGAGCGG
		ATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACTCCCTG
		CTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAG
		GGCATGCGGAAGCCCGCCTTCCTGTCCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTG
		CTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAG
		AAGATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCC
		TCCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGAC
		AACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCTGACCCTGTTCGAG
		GACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGCCCACCTGTTCGACGACAAG
		GTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGGAAG
		CTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAG
		TCCGACGGCTTCGCCAACCGGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACC
		TTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTCCCTGCACGAG
		CACATCGCCAACCTGGCCGGCTCCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTG
		AAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTG
		ATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACTCCCGGGAG
		CGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCCAGATCCTGAAGGAG
		CACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAG
		AACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTAC
		GACGTGGACCACATCGTGCCCCAGTCCTTCCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAG
		GTGCTGACCCGGTCCGACAAGAACCGGGGCAAGTCCGACAACGTGCCCTCCGAGGAG
		GTGGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACC
		CAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGTCCGAGCTGGAC
		AAGGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTG
		GCCCAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATC
		CGGGAGGTGAAGGTGATCACCCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGACTTCCGGAAGGAC

【表９３－１４】

説明	配列番号	配列
		TTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACTACCACCACGCCCACGACGCCTAC CTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAG TTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGTCCGAG CAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACTCCAACATCATGAACTTC TTCAAGACCGAGATCACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCCTGATCGAG ACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTG CGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACC GGCGGCTTCTCCAAGGAGTCCATCCTGCCCAAGCGGAACTCCGACAAGCTGATCGCC CGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACTCCCCCACCGTGGCC TACTCCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGTCCAAGAAGCTGAAGTCC GTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCCTCCTTCGAGAAGAACCCC ATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAG CTGCCCAAGTACTCCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCTCC GCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCTCCAAGTACGTGAACTTC CTGTACCTGGCCTCCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGACAACGAGCAG AAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATC TCCGAGTTCTCCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGTCC GCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATCATCCAC CTGTTCACCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGACACCACC ATCGACCGGAAGCGGTACACCTCCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCAC CAGTCCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGTCCCAGCTGGGCGGCGAC GGCGGCGGCTCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGTGA
Hibit タグを有するCas9 のためのオープンリーディングフレーム	配列番号3	AUGGACAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGGACAUCGGCACCAACUCCGUGGGCUGGGCC GUGAUCACCGACGAGUACAAGGUGCCCUCCAAGAAGUUCAAGGUGCUGGGCAACACC GACCGGCACUCCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGCGCCCUGCUGUUCGACUCCGGCGAG ACCGCCGAGGCCACCCGGCUGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGUACACCCGGCGGAAG AACCGGAUCUGCUACCUGCAGGAGAUCUUCUCCAACGAGAUGGCCAAGGUGGACGAC UCCUUCUUCCACCGGCUGGAGGAGUCCUUCCUGGUGGAGGAGGACAAGAAGCACGAG CGGCACCCCAUCUUCGGCAACAUCGUGGACGAGGUGGCCUACCACGAGAAGUACCCC ACCAUCUACCACCUGCGGAAGAAGCUGGUGGACUCCACCGACAAGGCCGACCUGCGG CUGAUCUACCUGGCCCUGGCCCACAUGAUCAAGUUCCGGGGCCACUUCCUGAUCGAG GGCGACCUGAACCCCGACAACUCCGACGUGGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUGCAG ACCUACAACCAGCUGUUCGAGGAGAACCCCAUCAACGCCUCCGGCGUGGACGCCAAG GCCAUCCUGUCCGCCCGGCUGUCCAAGUCCCGGCGGCUGGAGAACCUGAUCGCCCAG

【表９３－１５】

説明	配列番号	配列
		CUGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCUGUUCGGCAACCUGAUCGCCCUGUCCCUGGGC
		CUGACCCCCAACUUCAAGUCCAACUUCGACCUGGCCGAGGACGCCAAGCUGCAGCUG
		UCCAAGGACACCUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCCCAGAUCGGCGACCAG
		UACGCCGACCUGUUCCUGGCCGCCAAGAACCUGUCCGACGCCAUCCUGCUGUCCGAC
		AUCCUGCGGGUGAACACCGAGAUCACCAAGGCCCCCCUGUCCGCCUCCAUGAUCAAG
		CGGUACGACGAGCACCACCAGGACCUGACCCUGCUGAAGGCCCUGGUGCGGCAGCAG
		CUGCCCGAGAAGUACAAGGAGAUCUUCUUCGACCAGUCCAAGAACGGCUACGCCGGC
		UACAUCGACGGCGGCGCCUCCCAGGAGGAGUUCUACAAGUUCAUCAAGCCCAUCCUG
		GAGAAGAUGGACGGCACCGAGGAGCUGCUGGUGAAGCUGAACCGGGAGGACCUGCUG
		CGGAAGCAGCGGACCUUCGACAACGGCUCCAUCCCCCACCAGAUCCACCUGGGCGAG
		CUGCACGCCAUCCUGCGGCGGCAGGAGGACUUCUACCCCUUCCUGAAGGACAACCGG
		GAGAAGAUCGAGAAGAUCCUGACCUUCCGGAUCCCCUACUACGUGGGCCCCCUGGCC
		CGGGGCAACUCCCGGUUCGCCUGGAUGACCCGGAAGUCCGAGGAGACCAUCACCCCC
		UGGAACUUCGAGGAGGUGGUGGACAAGGGCGCCUCCGCCCAGUCCUUCAUCGAGCGG
		AUGACCAACUUCGACAAGAACCUGCCCAACGAGAAGGUGCUGCCCAAGCACUCCCUG
		CUGUACGAGUACUUCACCGUGUACAACGAGCUGACCAAGGUGAAGUACGUGACCGAG
		GGCAUGCGGAAGCCCGCCUUCCUGUCCGGCGAGCAGAAGAAGGCCAUCGUGGACCUG
		CUGUUCAAGACCAACCGGAAGGUGACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACUUCAAG
		AAGAUCGAGUGCUUCGACUCCGUGGAGAUCUCCGGCGUGGAGGACCGGUUCAACGCC
		UCCCUGGGCACCUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGAC
		AACGAGGAGAACGAGGACAUCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACCCUGUUCGAG
		GACCGGGAGAUGAUCGAGGAGCGGCUGAAGACCUACGCCCACCUGUUCGACGACAAG
		GUGAUGAAGCAGCUGAAGCGGCGGCGGUACACCGGCUGGGGCCGGCUGUCCCGGAAG
		CUGAUCAACGGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGCAAGACCAUCCUGGACUUCCUGAAG
		UCCGACGGCUUCGCCAACCGGAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACUCCCUGACC
		UUCAAGGAGGACAUCCAGAAGGCCCAGGUGUCCGGCCAGGGCGACUCCCUGCACGAG
		CACAUCGCCAACCUGGCCGGCUCCCCCGCCAUCAAGAAGGGCAUCCUGCAGACCGUG
		AAGGUGGUGGACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACAUCGUG
		AUCGAGAUGGCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACUCCCGGGAG
		CGGAUGAAGCGGAUCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGCUCCCAGAUCCUGAAGGAG
		CACCCCGUGGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAG
		AACGGCCGGGACAUGUACGUGGACCAGGAGCUGGACAUCAACCGGCUGUCCGACUAC
		GACGUGGACCACAUCGUGCCCCAGUCCUUCCUGAAGGACGACUCCAUCGACAACAAG
		GUGCUGACCCGGUCCGACAAGAACCGGGGCAAGUCCGACAACGUGCCCUCCGAGGAG

10 20 30 40 50

【表９３－１６】

説明	配列番号	配列
		GUGGUGAAGAAGAUGAAGAACUACUGGCGGCAGCUGCUGAACGCCAAGCUGAUCACC CAGCGGAAGUUCGACAACCUGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCUGUCCGAGCUGGAC AAGGCCGGCUUCAUCAAGCGGCAGCUGGUGGAGACCCGGCAGAUCACCAAGCACGUG GCCCAGAUCCUGGACUCCCGGAUGAACACCAAGUACGACGAGAACGACAAGCUGAUC CGGGAGGUGAAGGUGAUCACCCUGAAGUCCAAGCUGGUGUCCGACUUCCGGAAGGAC UUCCAGUUCUACAAGGUGCGGGAGAUCAACAACUACCACCACGCCCACGACGCCUAC CUGAACGCCGUGGUGGGCACCGCCCUGAUCAAGAAGUACCCCAAGCUGGAGUCCGAG UUCGUGUACGGCGACUACAAGGUGUACGACGUGCGGAAGAUGAUCGCCAAGUCCGAG CAGGAGAUCGGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCUUCUACUCCAACAUCAUGAACUUC UUCAAGACCGAGAUCACCCUGGCCAACGGCGAGAUCCGGAAGCGGCCCCUGAUCGAG ACCAACGGCGAGACCGGCGAGAUCGUGUGGGACAAGGGCCGGGACUUCGCCACCGUG CGGAAGGUGCUGUCCAUGCCCCAGGUGAACAUCGUGAAGAAGACCGAGGUGCAGACC GGCGGCUUCUCCAAGGAGUCCAUCCUGCCCAAGCGGAACUCCGACAAGCUGAUCGCC CGGAAGAAGGACUGGGACCCCAAGAAGUACGGCGGCUUCGACUCCCCCACCGUGGCC UACUCCGUGCUGGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAGCUGAAGUCC GUGAAGGAGCUGCUGGGCAUCACCAUCAUGGAGCGGUCCUCCUUCGAGAAGAACCCC AUCGACUUCCUGGAGGCCAAGGGCUACAAGGAGGUGAAGAAGGACCUGAUCAUCAAG CUGCCCAAGUACUCCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCCGGAAGCGGAUGCUGGCCUCC GCCGGCGAGCUGCAGAAGGGCAACGAGCUGGCCCUGCCCUCCAAGUACGUGAACUUC CUGUACCUGGCCUCCCACUACGAGAAGCUGAAGGGCUCCCCCGAGGACAACGAGCAG AAGCAGCUGUUCGUGGAGCAGCACAAGCACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUC UCCGAGUUCUCCAAGCGGGUGAUCCUGGCCGACGCCAACCUGGACAAGGUGCUGUCC GCCUACAACAAGCACCGGGACAAGCCCAUCCGGGAGCAGGCCGAGAACAUCAUCCAC CUGUUCACCCUGACCAACCUGGGCGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUCGACACCACC AUCGACCGGAAGCGGUACACCUCCACCAAGGAGGUGCUGGACGCCACCCUGAUCCAC CAGUCCAUCACCGGCCUGUACGAGACCCGGAUCGACCUGUCCCAGCUGGGCGGCGAC GGCGGCGGCUCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGUCCGAGUCCGCCACCCCCGAGUCC GUGUCCGGCUGGCGGCUGUUCAAGAAGAUCUCCUGA
未使用	配列番号4	
未使用	配列番号5	

【表９３－１７】

説明	配列番号	配列
Cas9の配列番号1～3によってコードされるアミノ酸配列	配列番号6	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGE TAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHE RHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIE GDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQ LPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQ YADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQ LPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLL RKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLA RGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSL LYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFK KIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFE DREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLK SDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTV KVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKE HPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNK VLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELD KAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKD FQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSE QEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATV RKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVA YSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIK LPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQ KQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIH LFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD GGGSPKKKRKV*
Sp Cas9-Hibit融合のためのアミノ酸配列	配列番号7	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGE TAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHE RHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIE GDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQ LPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQ YADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQ LPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLL RKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLA RGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSL

【表９３－１８】

説明	配列番号	配列
		LYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFK KIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFE DREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLK SDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTV KVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKE HPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNK VLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELD KAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKD FQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSE QEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATV RKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVA YSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIK LPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQ KQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIH LFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD GGGSPKKKRKVSESATPESVSGWRLFKKIS
HDRT 用 GFP インサート-GFP:P00894	配列番号 8	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTG GACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCC ACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCC TGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCC GACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAG GAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAG TTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAG GACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTAT ATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAAC ATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGC GACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGC AAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC GGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA
完全な HDRT テンプレート-トランスジェニック WT1 TCR 及	配列番号 9	tgccaacataccataaacctcccattctgctaatgcccagcctaagttggggagacc actccagattccaagatgtacagtttgctttgctgggccttttttcccatgcctgcct ttactctgccagagttatattgctggggttttgaagaagatcctattaaataaaaga ataagcagtattattaagtagccctgcatttcaggtttccttgagtggcaggccagg cctggccgtgaacgttcactgaaatcatggcctcttggccaagattgatagcttgtg

【表９３－１９】

説明	配列番号	配列
びTRACホモロジーアーム		cctgtccctgagtcccagtccatcacgagcagctggtttctaagatgctatttcccg tataaagcatgagaccgtgacttgccagccccacagagccccgcccttgtccatcac tggcatctggactccagcctgggttggggcaaagagggaaatgagatcatgtcctaa ccctgatcctcttgtcccacagATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGGCTCCGGTGCCC GTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCG GCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCG TGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAG TCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCG TGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAA TTACTTCCACGCCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGA AGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGA GTTGAGGCCTGGCTTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGC GCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCT GCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATgTGCACACT GGTATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACA TGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCT CAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCC TGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTT CCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCG GGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGT GACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGG AGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACT GAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAA TTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAA AGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGAtGCGGCCGCCACCATGGGATCTTGGAC ACTGTGTTGCGTGTCCCTGTGCATCCTGGTGGCCAAGCACACAGATGCCGGCGTGAT CCAGTCTCCTAGACACGAAGTGACCGAGATGGGCCAAGAAGTGACCCTGCGCTGCAA GCCTATCAGCGGCCACGATTACCTGTTCTGGTACAGACAGACCATGATGAGAGGCCT GGAACTGCTGATCTACTTCAACAACAACGTGCCCATCGACGACAGCGGCATGCCCGA GGATAGATTCAGCGCCAAGATGCCCAACGCCAGCTTCAGCACCCTGAAGATCCAGCC TAGCGAGCCCAGAGATAGCGCCGTGTACTTCTGCGCCAGCAGAAAGACAGGCGGCTA CAGCAATCAGCCCCAGCACTTTGGAGATGGCACCCGGCTGAGCATCCTGGAAGATCT GAAGAACGTGTTCCCACCTGAGGTGGCCGTGTTCGAGCCTTCTGAGGCCGAGATCAG CCACACACAGAAAGCCACACTCGTGTGTCTGGCCACCGGCTTCTATCCCGATCACGT

【表９３－２０】

説明	配列番号	配列
		GGAACTGTCTTGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCAGCACCGATCC TCAGCCTCTGAAAGAGCAGCCCGCTCTGAACGACAGCAGATACTGCCTGAGCAGCAG ACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCAGAAACCACTTCAGATGCCAGGT GCAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGATGAGTGGACCCAGGATAGAGCCAAGCCTGT GACACAGATCGTGTCTGCCGAAGCCTGGGGCAGAGCCGATTGTGGCTTTACCAGCGA GAGCTACCAGCAGGGCGTGCTGTCTGCCACAATCCTGTACGAGATCCTGCTGGGCAA AGCCACTCTGTACGCCGTGCTGGTGTCTGCCCTGGTGCTGATGGCCATGGTCAAGCG GAAGGATAGCAGGGGCGGCTCCGGTGCCACAAACTTCTCCCTGCTCAAGCAGGCCGG AGATGTGGAAGAGAACCCTGGCCCTATGGAAACCCTGCTGAAGGTGCTGAGCGGCAC ACTGCTGTGGCAGCTGACATGGGTCCGATCTCAGCAGCCTGTGCAGTCTCCTCAGGC CGTGATTCTGAGAGAAGGCGAGGACGCCGTGATCAACTGCAGCAGCTCTAAGGCCCT GTACAGCGTGCACTGGTACAGACAGAAGCACGGCGAGGCCCCTGTGTTCCTGATGAT CCTGCTGAAAGGCGGCGAGCAGAAGGGCCACGAGAAGATCAGCGCCAGCTTCAACGA GAAGAAGCAGCAGTCCAGCCTGTACCTGACAGCCAGCCAGCTGAGCTACAGCGGCAC CTACTTTTGTGGCACCGCCTGGATCAACGACTACAAGCTGTCTTTCGGAGCCGGCAC CACAGTGACAGTGCGGGCCAATATTCAGAACCCCGATCCTGCCGTGTACCAGCTGAG AGACAGCAAGAGCAGCGACAAGAGCGTGTGCCTGTTCACCGACTTCGACAGCCAGAC CAACGTGTCCCAGAGCAAGGACAGCGACGTGTACATCACCGATAAGACTGTGCTGGA CATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACAAGAGCGA TTTCGCCTGCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTTCCC AAGTCCTGAGAGCAGCTGCGACGTGAAGCTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACAGACAC CAACCTGAACTTCCAGAACCTGAGCGTGATCGGCTTCAGAATCCTGCTGCTCAAGGT GGCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCCTGAGACTGTGGTCCAGCTAACCTCGACTGTG CCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTG GAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGT CTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAG GATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAG GCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACTAGTCGTGTACCAGCTGA GAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAA CAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAACTGTGCTAG ACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTG ACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCC CCAGCCCAGgtaagggcagctttggtgccttcgcaggctgtttccttgcttcaggaa tggccaggttctgcccagagctctggtcaatgatgtctaaaactcctctgattggtg

【表９３－２１】

説明	配列番号	配列
		gtctcggccttatccattgccaccaaaaccctcttttttactaagaaacagtgagcct tgttctggcagtccagagaatgacacgggaaaaaagcagatgaagagaaggtggcag gagagggcacgtggcccagcctcagtctct
TCRβ鎖 pINT1066	配列番号 10	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQT MMRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASR KTGGYSNQPQHFGDGTRLSILEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF YPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNH FRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYE ILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG
TCRα鎖 pINT1066	配列番号 11	METLLKVLSGTLLWQLTWVRSQQPVQSPQAVILREGEDAVINCSSSKALYSVHWYRQ KHGEAPVFLMILLKGGEQKGHEKISASFNEKKQQSSLYLTASQLSYSGTYFCGTAWI NDYKLSFGAGTTVTVRANIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDS DVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDV KLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS*
TCRβ-リンカー-α構成 pINT1066	配列番号 12	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQT MMRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASR KTGGYSNQPQHFGDGTRLSILEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF YPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNH FRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYE ILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRGGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMETLLK VLSGTLLWQLTWVRSQQPVQSPQAVILREGEDAVINCSSSKALYSVHWYRQKHGEAP VFLMILLKGGEQKGHEKISASFNEKKQQSSLYLTASQLSYSGTYFCGTAWINDYKLS FGAGTTVTVRANIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITD KTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKS FETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS*
完全なHDRテンプレート-GFP　T2Aインサート GFP:P00894	配列番号 13	GAGGGCCGCGGCAGCCTGCTGACCTGCGGCGACGTGGAGGAGAAtCCCGGCCCCATG gtgAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGAC GGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACC TACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGG CCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGAC CACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAG CGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTC GAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGAC GGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATC

【表９３－２２】

説明	配列番号	配列
		ATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATC GAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGAC GGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAA GACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGG ATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAcctCGACTGTGCCTTCTAGTTGCC AGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTC CCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTC ATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACA ATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGcttctgaggcggaaagaacca gctggggctctaggggtatccccACTAGTCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATC CAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTCACA AAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAACTGTGCTAGACATGAGGTCTAT GGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGC AAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGgtaa gggcagctttggtgccttcgcaggctgtttccttgcttcaggaatggccaggttctg cccagagctctggtcaatgatgtctaaaactcctctgattggtggtctcggccttat ccattgccaccaaaaccctcttttactaagaaacagtgagccttgttctggcagtc cagagaatgacacgggaaaaaagcagatgaagagaaggtggcaggagagggcacgtg gcccagcctcagtctct
eGFP ORF GFP:P00894、GFP P01018	配列番号14	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTG GACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCC ACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCC TGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCC GACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAG GAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAG TTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAG GACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTAT ATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAAC ATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGC GACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGC AAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC GGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

【表９３－２３】

説明	配列番号	配列
完全なHDRテンプレート-B2Mホモロジーアームを有するGFP GFP:P01018	配列番号15	agatcttaatcttctgggtttccgttttctcgaatgaaaaatgcaggtccgagcagt taactggctggggcaccattagcaagtcacttagcatctctgggggccagtctgcaaa gcgagggggcagccttaatgtgcctccagcctgaagtcctagaatgagcgcccggtg tcccaagctggggcgcgcaccccagatcggagggcgccgatgtacagacagcaaact cacccagtctagtgcatgccttcttaaacatcacgagactctaagaaaaggaaactg aaaacgggaaagtccctctctctaacctggcactgcgtcgctggcttggagacaggt gacggtccctgcgggccttgtcctgattggctgggcacgcgtttaatataagtggag gcgtcgcgctggcgggcattcctgaagctgacagcattcgggccgagaGGCTCCGGT GCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGG GTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGAT GTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCA GTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGT GCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCT TGAATTACTTCCACGCCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGT TGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGC TTGAGTTGAGGCCTGGCTTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCT TCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACC TGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATgTGCA CACTGGTATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCG CACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTA GTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCC GCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCC GCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCG GGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTC ATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTT TTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCA CACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTT GGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGT TCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGAcggCCGGCCCCGCCACCatggtg AGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGC GACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC GGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCC ACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCAC ATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGC

50

【表９３－２４】

説明	配列番号	配列
		ACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAG GGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGC AACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATG GCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAG GACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGC CCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGAC CCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATC ACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAATCTAGAcctCGACTGTGCCTTCTAGTT GCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCA CTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGT GTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAG ACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGcttctgaggcggaaagaa ccagctggggctctaggggtatccccACTAGTgtctcgctccgtggccttagctg tgctcgcgctactctctctttctggcctggaggctatccagcgtgagtctctcctac cctcccgctctggtccttcctctcccgctctgcaccctctgtggccctcgctgtgct ctctcgctccgtgacttcccttctccaagttctccttggtggcccgccgtggggcta gtccagggctggatctcggggaagcggcggggtggcctgggagtggggaaggggtg cgcacccgggacgcgcgctacttgccccttcggcggggagcaggggagacctttgg cctacggcgacgggagggtcgggacaaagtttagggcgtcgataagcgtcagagcgc cgaggttgggggagggtttctcttccgctctttcgcggggcctctggctcccccagc gcagctggagtgggggacgggtaggct
RNP のための Cas9 アミノ酸配列 この配列における「*」は、終止コドンを示す	配列番号16	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGE TAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHE RHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIE GDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQ LPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQ YADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQ LPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLL RKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLA RGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSL LYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFK KIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFE DREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLK SDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTV

【表９３－２５】

説明	配列番号	配列
		KVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKE HPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNK VLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELD KAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKD FQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSE QEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATV RKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVA YSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIK LPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQ KQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIH LFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD GGGSPKKKRKV*
Hibit タグを有する BC22n をコードする mRNA	配列番号 17	GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGCCACCAUGGAGGCCUCCC CCGCCUCCGGCCCCCGGCACCUGAUGGACCCCCACAUCUUCACCUCCAACUUCAACA ACGGCAUCGGCCGGCACAAGACCUACCUGUGCUACGAGGUGGAGCGGCUGGACAACG GCACCUCCGUGAAGAUGGACCAGCACCGGGGCUUCCUGCACAACCAGGCCAAGAACC UGCUGUGCGGCUUCUACGGCCGGCACGCCGAGCUGCGGUUCCUGGACCUGGUGCCCU CCCUGCAGCUGGACCCCGCCCAGAUCUACCGGGUGACCUGGUUCAUCUCCUGGUCCC CCUGCUUCUCCUGGGGCUGCGCCGGCGAGGUGCGGGCCUUCCUGCAGGAGAACACCC ACGUGCGGCUGCGGAUCUUCGCCGCCCGGAUCUACGACUACGACCCCCUGUACAAGG AGGCCCUGCAGAUGCUGCGGGACGCCGGCGCCCAGGUGUCCAUCAUGACCUACGACG AGUUCAAGCACUGCUGGGACACCUUCGUGGACCACCAGGGCUGCCCCUUCCAGCCCU GGGACGGCCUGGACGAGCACUCCCAGGCCCUGUCCGGCCGGCUGCGGGCCAUCCUGC AGAACCAGGGCAACUCCGGCUCCGAGACCCCCGGCACCUCCGAGUCCGCCACCCCCG AGUCCGACAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGGCCAUCGGCACCAACUCCGUGGGCUGGG CCGUGAUCACCGACGAGUACAAGGUGCCCUCCAAGAAGUUCAAGGUGCUGGGCAACA CCGACCGGCACUCCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGCGCCCUGCUGUUCGACUCCGGCG AGACCGCCGAGGCCACCCGGCUGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGUACACCCGGCGGA AGAACCGGAUCUGCUACCUGCAGGAGAUCUUCUCCAACGAGAUGGCCAAGGUGGACG ACUCCUUCUUCCACCGGCUGGAGGAGUCCUUCCUGGUGGAGGAGGACAAGAAGCACG AGCGGCACCCCAUCUUCGGCAACAUCGUGGACGAGGUGGCCUACCACGAGAAGUACC CCACCAUCUACCACCUGCGGAAGAAGCUGGUGGACUCCACCGACAAGGCCGACCUGC GGCUGAUCUACCUGGCCCUGGCCCACAUGAUCAAGUUCCGGGGCCACUUCCUGAUCG AGGGCGACCUGAACCCCGACAACUCCGACGUGGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUGC

10 20 30 40 50

【表９３－２６】

説明	配列番号	配列
		AGACCUACAACCAGCUGUUCGAGGAGAACCCCAUCAACGCCUCCGGCGUGGACGCCA
		AGGCCAUCCUGUCCGCCCGGCUGUCCAAGUCCCGGCGGCUGGAGAACCUGAUCGCCC
		AGCUGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCUGUUCGGCAACCUGAUCGCCCUGUCCCUGG
		GCCUGACCCCCAACUUCAAGUCCAACUUCGACCUGGCCGAGGACGCCAAGCUGCAGC
		UGUCCAAGGACACCUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCCCAGAUCGGCGACC
		AGUACGCCGACCUGUUCCUGGCCGCCAAGAACCUGUCCGACGCCAUCCUGCUGUCCG
		ACAUCCUGCGGGUGAACACCGAGAUCACCAAGGCCCCCCUGUCCGCCUCCAUGAUCA
		AGCGGUACGACGAGCACCACCAGGACCUGACCCUGCUGAAGGCCCUGGUGCGGCAGC
		AGCUGCCCGAGAAGUACAAGGAGAUCUUCUUCGACCAGUCCAAGAACGGCUACGCCG
		GCUACAUCGACGGCGGCGCCUCCCAGGAGGAGUUCUACAAGUUCAUCAAGCCCAUCC
		UGGAGAAGAUGGACGGCACCGAGGAGCUGCUGGUGAAGCUGAACCGGGAGGACCUGC
		UGCGGAAGCAGCGGACCUUCGACAACGGCUCCAUCCCCCACCAGAUCCACCUGGGCG
		AGCUGCACGCCAUCCUGCGGCGGCAGGAGGACUUCUACCCCUUCCUGAAGGACAACC
		GGGAGAAGAUCGAGAAGAUCCUGACCUUCCGGAUCCCCUACUACGUGGGCCCCCUGG
		CCCGGGGCAACUCCCGGUUCGCCUGGAUGACCCGGAAGUCCGAGGAGACCAUCACCC
		CCUGGAACUUCGAGGAGGUGGUGGACAAGGGCGCCUCCGCCCAGUCCUUCAUCGAGC
		GGAUGACCAACUUCGACAAGAACCUGCCCAACGAGAAGGUGCUGCCCAAGCACUCCC
		UGCUGUACGAGUACUUCACCGUGUACAACGAGCUGACCAAGGUGAAGUACGUGACCG
		AGGGCAUGCGGAAGCCCGCCUUCCUGUCCGGCGAGCAGAAGAAGGCCAUCGUGGACC
		UGCUGUUCAAGACCAACCGGAAGGUGACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACUUCA
		AGAAGAUCGAGUGCUUCGACUCCGUGGAGAUCUCCGGCGUGGAGGACCGGUUCAACG
		CCUCCCUGGGCACCUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGG
		ACAACGAGGAGAACGAGGACAUCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACCCUGUUCG
		AGGACCGGGAGAUGAUCGAGGAGCGGCUGAAGACCUACGCCCACCUGUUCGACGACA
		AGGUGAUGAAGCAGCUGAAGCGGCGGCGGUACACCGGCUGGGGCCGGCUGUCCCGGA
		AGCUGAUCAACGGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGCAAGACCAUCCUGGACUUCCUGA
		AGUCCGACGGCUUCGCCAACCGGAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACUCCCUGA
		CCUUCAAGGAGGACAUCCAGAAGGCCCAGGUGUCCGGCCAGGGCGACUCCCUGCACG
		AGCACAUCGCCAACCUGGCCGGCUCCCCCGCCAUCAAGAAGGGCAUCCUGCAGACCG
		UGAAGGUGGUGGACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACAUCG
		UGAUCGAGAUGGCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACUCCCGGG
		AGCGGAUGAAGCGGAUCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGCUCCCAGAUCCUGAAGG
		AGCACCCCGUGGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAGCUGUACCUGUACUACCUGC
		AGAACGGCCGGGACAUGUACGUGGACCAGGAGCUGGACAUCAACCGGCUGUCCGACU

【表９３－２７】

説明	配列番号	配列
		ACGACGUGGACCACAUCGUGCCCCAGUCCUUCCUGAAGGACGACUCCAUCGACAACA
		AGGUGCUGACCCGGUCCGACAAGAACCGGGGCAAGUCCGACAACGUGCCCUCCGAGG
		AGGUGGUGAAGAAGAUGAAGAACUACUGGCGGCAGCUGCUGAACGCCAAGCUGAUCA
		CCCAGCGGAAGUUCGACAACCUGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCUGUCCGAGCUGG
		ACAAGGCCGGCUUCAUCAAGCGGCAGCUGGUGGAGACCCGGCAGAUCACCAAGCACG
		UGGCCCAGAUCCUGGACUCCCGGAUGAACACCAAGUACGACGAGAACGACAAGCUGA
		UCCGGGAGGUGAAGGUGAUCACCCUGAAGUCCAAGCUGGUGUCCGACUUCCGGAAGG
		ACUUCCAGUUCUACAAGGUGCGGGAGAUCAACAACUACCACCACGCCCACGACGCCU
		ACCUGAACGCCGUGGUGGGCACCGCCCUGAUCAAGAAGUACCCCAAGCUGGAGUCCG
		AGUUCGUGUACGGCGACUACAAGGUGUACGACGUGCGGAAGAUGAUCGCCAAGUCCG
		AGCAGGAGAUCGGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCUUCUACUCCAACAUCAUGAACU
		UCUUCAAGACCGAGAUCACCCUGGCCAACGGCGAGAUCCGGAAGCGGCCCCUGAUCG
		AGACCAACGGCGAGACCGGCGAGAUCGUGUGGGACAAGGGCCGGGACUUCGCCACCG
		UGCGGAAGGUGCUGUCCAUGCCCCAGGUGAACAUCGUGAAGAAGACCGAGGUGCAGA
		CCGGCGGCUUCUCCAAGGAGUCCAUCCUGCCCAAGCGGAACUCCGACAAGCUGAUCG
		CCCGGAAGAAGGACUGGGACCCCAAGAAGUACGGCGGCUUCGACUCCCCCACCGUGG
		CCUACUCCGUGCUGGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAGCUGAAGU
		CCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUCACCAUCAUGGAGCGGUCCUCCUUCGAGAAGAACC
		CCAUCGACUUCCUGGAGGCCAAGGGCUACAAGGAGGUGAAGAAGGACCUGAUCAUCA
		AGCUGCCCAAGUACUCCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCCGGAAGCGGAUGCUGGCCU
		CCGCCGGCGAGCUGCAGAAGGGCAACGAGCUGGCCCUGCCCUCCAAGUACGUGAACU
		UCCUGUACCUGGCCUCCCACUACGAGAAGCUGAAGGGCUCCCCCGAGGACAACGAGC
		AGAAGCAGCUGUUCGUGGAGCAGCACAAGCACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGA
		UCUCCGAGUUCUCCAAGCGGGUGAUCCUGGCCGACGCCAACCUGGACAAGGUGCUGU
		CCGCCUACAACAAGCACCGGGACAAGCCCAUCCGGGAGCAGGCCGAGAACAUCAUCC
		ACCUGUUCACCCUGACCAACCUGGGCGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUCGACACCA
		CCAUCGACCGGAAGCGGUACACCUCCACCAAGGAGGUGCUGGACGCCACCCUGAUCC
		ACCAGUCCAUCACCGGCCUGUACGAGACCCGGAUCGACCUGUCCCAGCUGGGCGGCG
		ACGGCGGCGGCUCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGUCCGAGUCCGCCACCCCCGAGU
		CCGUGUCCGGCUGGCGGCUGUUCAAGAAGAUCUCCUGACUAGCACCAGCCUCAAGAA
		CACCCGAAUGGAGUCUCUAAGCUACAUAAUACCAACUUACACUUUACAAAAUGUUGU
		CCCCCAAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCUAAUAAAAAGAAAGUUUCUUCACAUU
		CUCUCGAGAAAAAAAAAAAAAUGGAAAAAAAAAAAAACGGAAAAAAAAAAAAAGGUAAAA
		AAAAAAAAUAUAAAAAAAAAAAACAUAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAACGUAA

【表９３－２８】

説明	配列番号	配列
		AAAAAAAAAACUCAAAAAAAAAAAAAGAUAAAAAAAAAAAAACCUAAAAAAAAAAAAAUG UAAAAAAAAAAAAAGGGAAAAAAAAAAAACGCAAAAAAAAAAAAACACAAAAAAAAAAA AUGCAAAAAAAAAAAAAUCGAAAAAAAAAAAAAUCUAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAA AAACCCAAAAAAAAAAAAAGACAAAAAAAAAAAAAUAGAAAAAAAAAAAAAGUUAAAAAA AAAAAACUGAAAAAAAAAAAAAUUUAAAAAAAAAAAAAUCUAG
Hibit タグを有する BC22n のためのオープンリーディングフレーム	配列番号 18	AUGgaggccucccccgccuccggcccccggcaccugauggaccccccacaucuucacc uccAACUUCAACAACggcAUCggccggCACAAGaccUACCUGUGCUACgagguggag cggCUGGACAACggcaccuccgugAAGAUGGACCAGCACCgggggcUUCCUGCACAAC CAGgccAAGAACCUGCUGUGCggcUUCUACggccggCACgccgagCUGcggUUCCUG GACCUGgugcccuccCUGCAGCUGGACcccgccCAGAUCUACcgggugaccUGGUUC AUCuccUGGucccccUGCUUCuccUGGggcUGCgccggcgaggugcgggccUUCCUG CAGgagAACaccCACgugcggCUGcggAUCUUCgccgcccggAUCUACGACUACGAC cccCUGUACAAGgaggccCUGCAGAUGCUGcggGACgccggcgccCAGguguccAUC AUGaccUACGACgagUUCAAGCACUGCUGGGACaccUUCgugGACCACCAGggcUGC cccUUCCAGcccUGGGACggcCUGGACgagCACuccCAGgccCUGuccggccggCUG cgggccAUCCUGCAGAACCAGggcAACuccggcuccgagacccccggcaccuccgag uccgccacccccgaguccgacaagaaguacuccaucggccuggCcaucggcaccaac uccgugggcugggccgugaucaccgacgaguacaaggugcccuccaagaaguucaag gugcugggcaacaccgaccggcacuccaucaagaagaaccugaucggcgcccugcug uucgacuccggcgagaccgccgaggccacccggcugaagcggaccgcccggcggcgg uacacccggcggaagaaccggaucugcuaccugcaggagaucuucuccaacgagaug gccaagguggacgacuccuucuuccaccggcuggaggaguccuuccugguggaggag gacaagaagcacgagcggcaccccaucuucggcaacaucguggacgagguggccuac cacgagaaguaccccaccaucuaccaccugcggaagaagcugguggacuccaccgac aaggccgaccugcggcugaucuaccuggcccuggcccacaugaucaaguuccggggc cacuuccugaucgagggcgaccugaaccccgacaacuccgacguggacaagcuguuc auccagcuggugcagaccuacaaccagcuguucgaggagaaccccaucaacgccucc ggcguggacgccaaggccauccuguccgcccggcuguccaagucccggcggcuggag aaccugaucgcccagcugcccggcgagaagaagaacggccuguucggcaaccugauc gcccuguccuggccugaccccaacuucaaguccaacuucgaccuggccgaggac gccaagcugcagcuguccaaggacaccuacgacgacgaccuggacaaccugcuggcc cagaucggcgaccaguacgccgaccuguuccuggccgccaagaaccuguccgacgcc auccugcuguccgacauccugcgggugaacaccgagaucaccaaggccccccugucc gccuccaugaucaagcgguacgacgagcaccaccaggaccugacccugcugaaggcc

【表９３－２９】

説明	配列番号	配列
		cuggugcggcagcagcugcccgagaaguacaaggagaucuucuucgaccaguccaag
		aacggcuacgccggcuacaucgacggcggcgccucccaggaggaguucuacaaguuc
		aucaagcccauccuggagaagauggacggcaccgaggagcugcuggugaagcugaac
		cgggaggaccugcugcggaagcagcggaccuucgacaacggcuccaucccccaccag
		auccaccugggcgagcugcacgccauccugcggcggcaggaggacuucuaccccuuc
		cugaaggacaaccgggagaagaucgagaagauccugaccuuccggauccccuacuac
		gugggccccuggcccggggcaacucccgguucgccuggaugacccggaaguccgag
		gagaccaucacccccuggaacuucgaggaggugguggacaagggcgccuccgcccag
		uccuucaucgagcggaugaccaacuucgacaagaaccugcccaacgagaaggugcug
		cccaagcacucccugcuguacgaguacuucaccguguacaacgagcugaccaaggug
		aaguacgugaccgagggcaugcggaagcccgccuuccuguccggcgagcagaagaag
		gccaucguggaccugcuguucaagaccaaccggaaaggugaccgugaagcagcugaag
		gaggacuacuucaagaagaucgagugcuucgacuccguggagaucuccggcguggag
		gaccgguucaacgccucccugggcaccuaccacgaccugcugaagaucaucaaggac
		aaggacuuccuggacaacgaggagaacgaggacauccuggaggacaucgugcugacc
		cugacccuguucgaggaccgggagaugaucgaggagcggcugaagaccuacgcccac
		cuguucgacgacaaggugaugaagcagcugaagcggcggcgguacaccggcuggggc
		cggcugucccggaagcugaucaacggcauccgggacaagcaguccggcaagaccauc
		cuggacuuccugaaguccgacggcuucgccaaccggaacuucaugcagcugauccac
		gacgacucccugaccuucaaggaggacauccagaaggcccagguguccggccagggc
		gacucccugcacgagcacaucgccaaccuggccggcucccccgccaucaagaagggc
		auccugcagaccgugaaggugguggacgagcuggugaaggugaugggccggcacaag
		cccgagaacaucgugaucgagauggcccgggagaaccagaccacccagaagggccag
		aagaacucccgggagcggaugaagcggaucgaggagggcaucaaggagcugggcucc
		cagauccugaaggagcaccccguggagaacacccagcugcagaacgagaagcuguac
		cuguacuaccugcagaacggccgggacauguacguggaccaggagcuggacaucaac
		cggcuguccgacuacgacguggaccacaucgugccccaguccuuccugaaggacgac
		uccaucgacaacaaggugcugacccgguccgacaagaaccggggcaaguccgacaac
		gugcccuccgaggagguggugaagaagaugaagaacuacuggcggcagcugcugaac
		gccaagcugaucacccagcggaaguucgacaaccugaccaaggccgagcggggcggc
		cuguccgagcuggacaaggccggcuucaucaagcggcagcugguggagacccggcag
		aucaccaagcacguggcccagauccuggacucccggaugaacaccaaguacgacgag
		aacgacaagcugauccgggaggugaaggugaucacccugaaguccaagcuggugucc
		gacuuccggaaggacuuccaguucuacaaggugcgggagaucaacaacuaccaccac

【表９３－３０】

説明	配列番号	配列
		gcccacgacgccuaccugaacgccgugguggggcaccgcccugaucaagaaguaccccaagcuggaguccgaguucguguacggcgacuacaagguguacgacgugcggaagaugaucgccaaguccgagcaggagaucggcaaggccaccgccaaguacuucuucuacuccaacaucaugaacuucuucaagaccgagaucacccuggccaacggcgagauccggaagcggccccugaucgagaccaacggcgagaccggcgagaucgugugggacaagggccgggacuucgccaccgugcggaaggugcuguccaugccccaggugaacaucgugaagaagaccgaggugcagaccggcggcuucuccaaggaguccauccugcccaagcggaacuccgacaagcugaucgcccggaagaaggacugggaccccaagaaguacggcggcuucgacucccccaccguggccuacuccgugcuggugguggccaagguggagaagggcaaguccaagaagcugaaguccgugaaggagcugcugggcaucaccaucauggagcgguccuccuucgagaagaaccccaucgacuuccuggaggccaagggcuacaaggaggugaagaaggaccugaucaucaagcugcccuacuaccccuguucgagcuggagaacggccggaagcggaugcuggccuccgccggcgagcugcagaagggcaacgagcuggcccugcccuccaaguacgugaacuuccuguaccuggccucccacuacgagaagcugaagggcuccccgaggacaacgagcagaagcagcuguucguggagcagcacaagcacuaccuggacgagaucaucgagcagaucuccgaguucuccaagcgggugauccuggccgacgccaaccugacaaggugcuguccgccuacaacaagcaccgggacaagcccauccgggagcaggccgagaacaucauccaccuguucacccugaccaaccuggggcgcccccgccgccuucaaguacuucgacaccaccaucgaccggaagcgguacaccuccaccaaggaggugcuggacgccacccugauccaccaguccaucaccggccuguacgagacccggaucgaccugucccagcugggcggcgacggcggcggcucccccaagaagaagcggaagguguccgaguccgccacccccgaguccguguccggcuggcggcuguucaagaagaucuccUgA
Hibit タグを有する BC22n のためのアミノ酸配列	配列番号 19	MEASPASGPRHLMDPHIFTSNFNNGIGRHKTYLCYEVERLDNGTSVKMDQHRGFLHNQAKNLLCGFYGRHAELRFLDLVPSLQLDPAQIYRVTWFISWSPCFSWGCAGEVRAFLQENTHVRLRIFAARIYDYDPLYKEALQMLRDAGAQVSIMTYDEFKHCWDTFVDHQGCPFQPWDGLDEHSQALSGRLRAILQNQGNSGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSE

【表９３－３１】

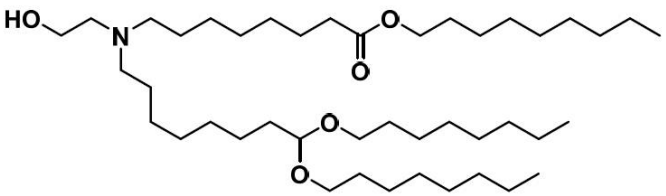
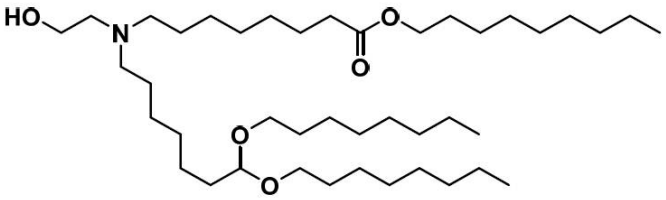
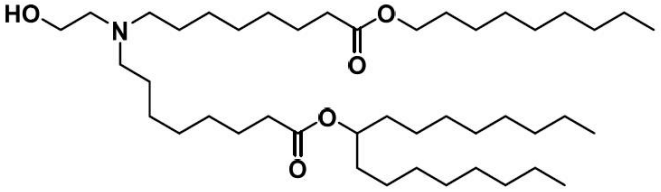
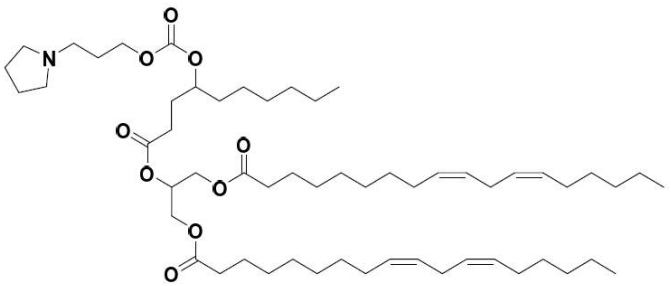
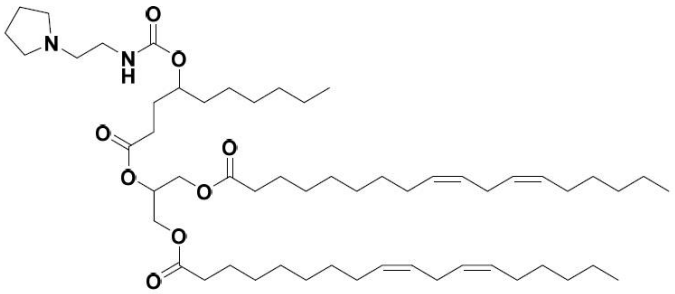
説明	配列番号	配列
		ETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKV KYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVE DRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAH LFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIH DDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLY LYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDN VPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQ ITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHH AHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYS NIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKK TEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKS KKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRK RMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDE IIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFK YFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKVSES ATPESVSGWRLFKKIS
UGI をコードする mRNA	配列番号 20	GGGAGACCCAAGCUGGCUAGCUCCCGCAGUCGGCGUCCAGCGGCUCUGCUUGUUCGU GUGUGUGUCGUUGCAGGCCUUAUUCGGAUCCGCCACCAUGGGACCGAAGAAGAAGAG AAAGGUCGGAGGAGGAAGCACAAACCUGUCGGACAUCAUCGAAAAGGAAACAGGAAA GCAGCUGGUCAUCCAGGAAUCGAUCCUGAUGCUGCCGGAAGAAGUCGAAGAAGUCAU CGGAAACAAGCCGGAAUCGGACAUCCUGGUCCACACAGCAUACGACGAAUCGACAGA CGAAAACGUCAUGCUGCUGACAUCGGACGCACCGGAAUACAAGCCGUGGGCACUGGU CAUCCAGGACUCGAACGGAGAAAACAAGAUCAAGAUGCUGUGAUAGUCUAGACAUCA CAUUUAAAAGCAUCUCAGCCUACCAUGAGAAUAAGAGAAAGAAAAUGAAGAUCAAUA GCUUAUUCAUCUCUUUUUCUUUUUCGUUGGUGUAAAGCCAACACCCUGUCUAAAAAA CAUAAAUUUCUUUAAUCAUUUUGCCUCUUUUCUCUGUGCUUCAAUUAAUAAAAAAUG GAAAGAACCUCGAGUCUAG
UGI のためのオープンリーディングフレーム	配列番号 21	AUGGGACCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGGAGGAGGAAGCACAAACCUGUCGGACAUC AUCGAAAAGGAAACAGGAAAGCAGCUGGUCAUCCAGGAAUCGAUCCUGAUGCUGCCG GAAGAAGUCGAAGAAGUCAUCGGAAACAAGCCGGAAUCGGACAUCCUGGUCCACACA GCAUACGACGAAUCGACAGACGAAAACGUCAUGCUGCUGACAUCGGACGCACCGGAA UACAAGCCGUGGGCACUGGUCAUCCAGGACUCGAACGGAGAAAACAAGAUCAAGAUG CUGUGA

【表９３－３２】

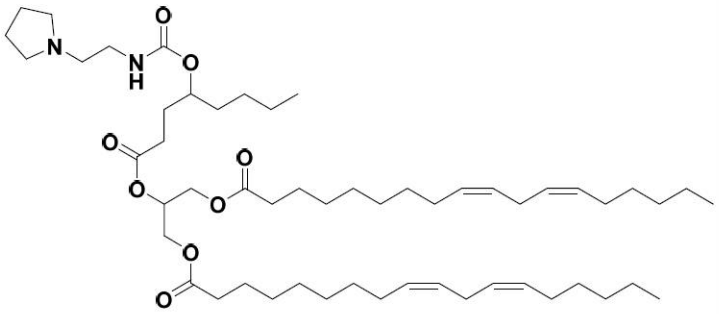
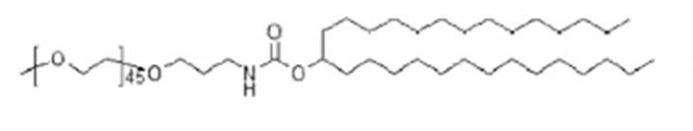
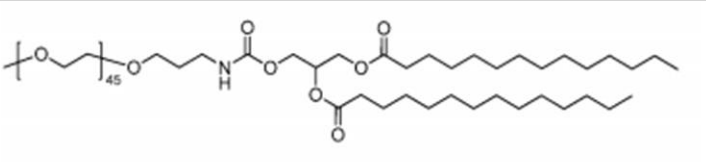
説明	配列番号	配列
UGI のためのアミノ酸配列	配列番号 22	MTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVML LTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSKRTADGSEFESPKKKRKVE

【表９４－１】

表９０－脂質のリスト

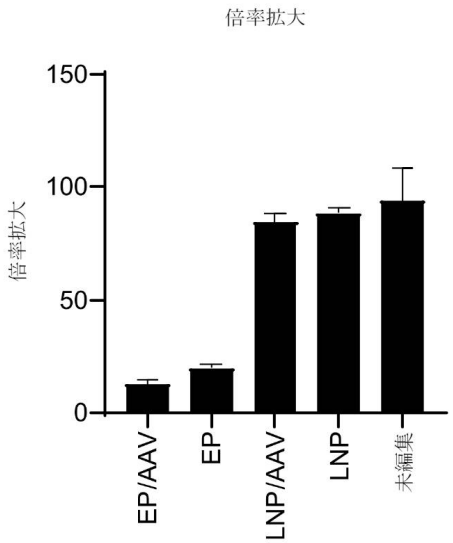
脂質ID	ファイリング	化合物ID	構造
脂質B	WO2020/072605 A1	化合物1	
脂質C	WO2020/072605 A1	化合物10	
脂質D	WO2020/072605 A1	化合物18	
脂質E	WO2020/118041 A1	化合物45	
脂質F	WO2020/118041 A1	化合物50	

【表９４－２】

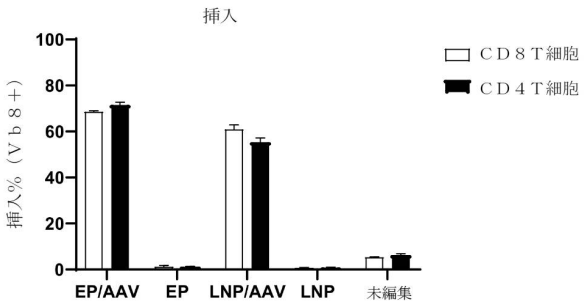
脂質ID	ファイリング	化合物ID	構造
脂質G	WO2020/118041 A1	化合物85	
脂質H	WO2015/095340 A1	S024	
脂質J	WO2015/095340 A1	S029	

【図面】

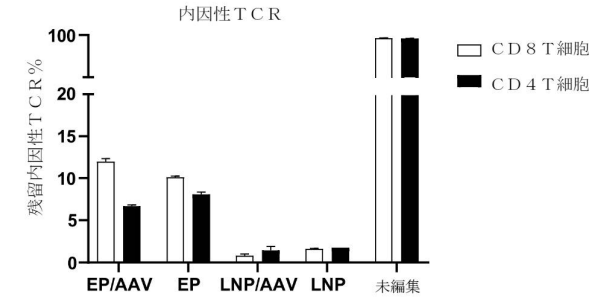
【図１】



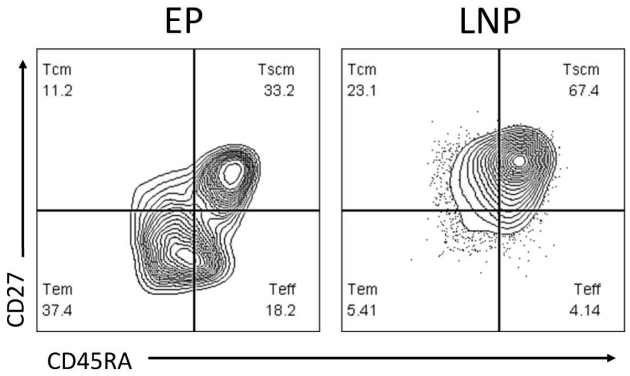
【図２】



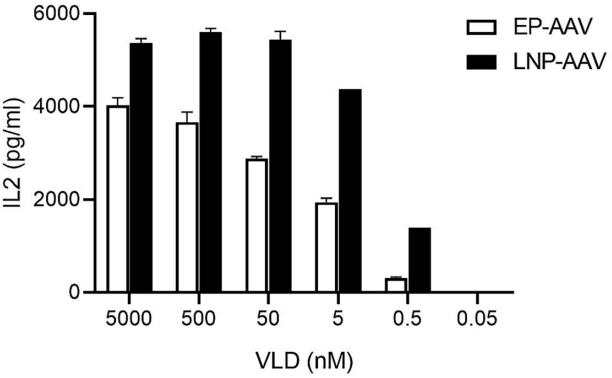
【図３】



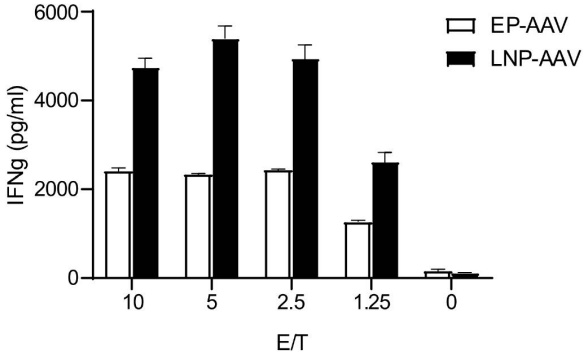
【図４】



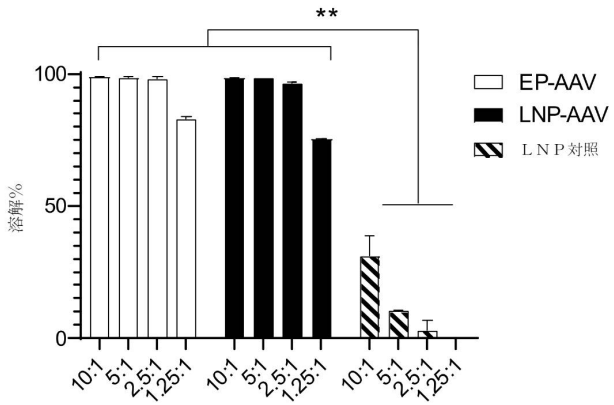
【図５】



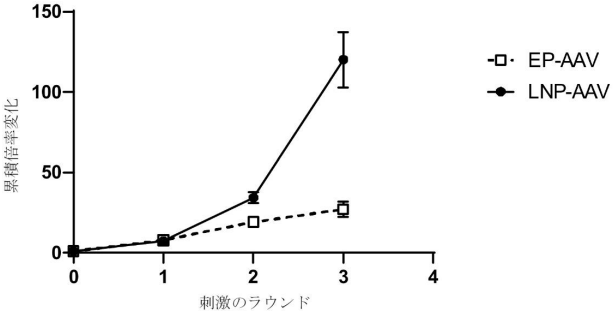
【図６】



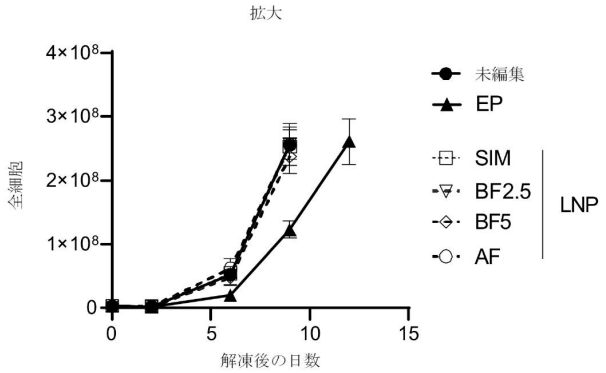
【図７】



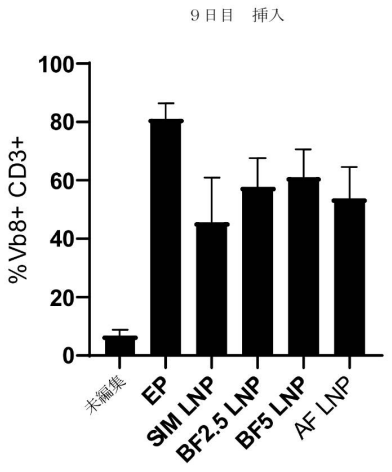
【図８】



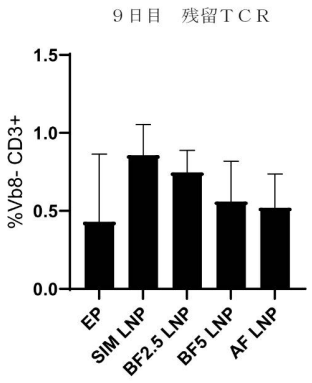
【図９】



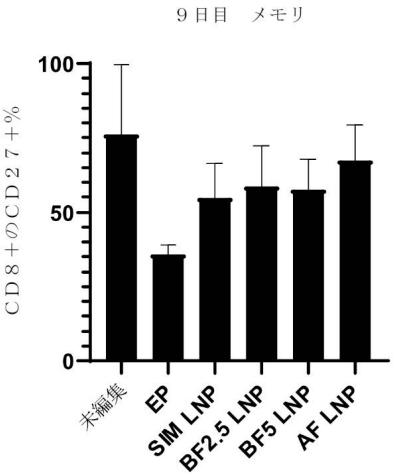
【図１０】



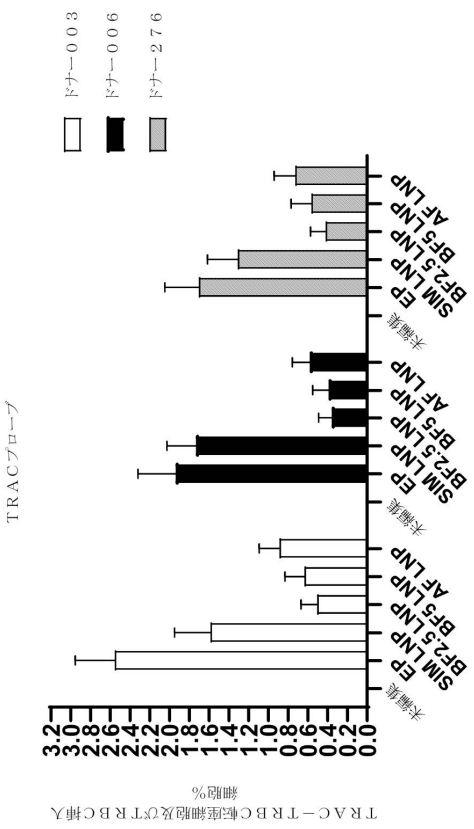
【図１１】



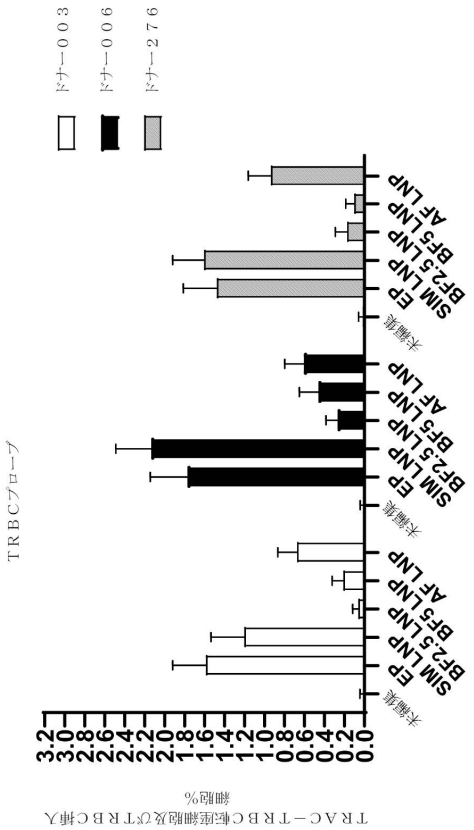
【図１２】



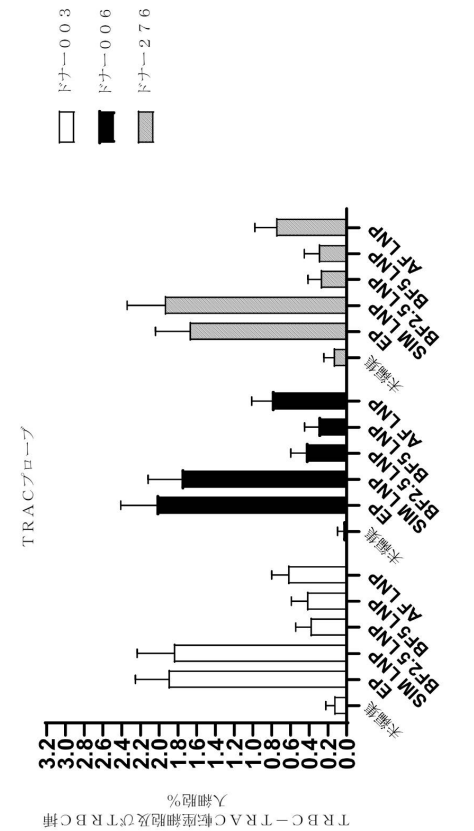
【図１３Ａ】



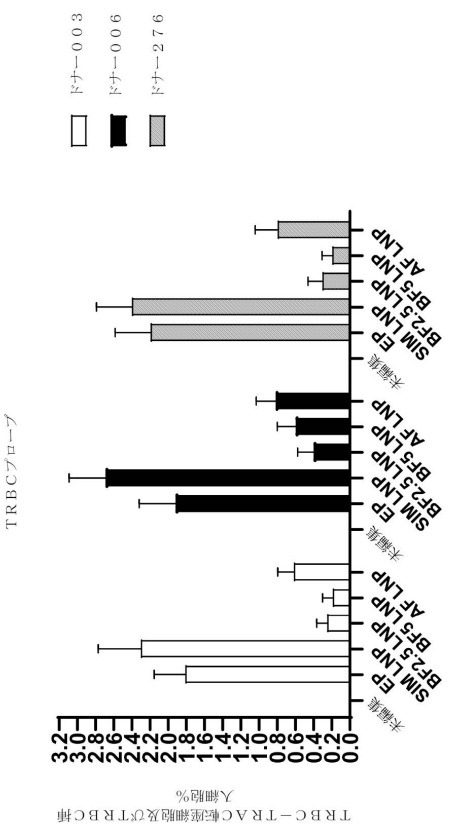
【図１３Ｂ】



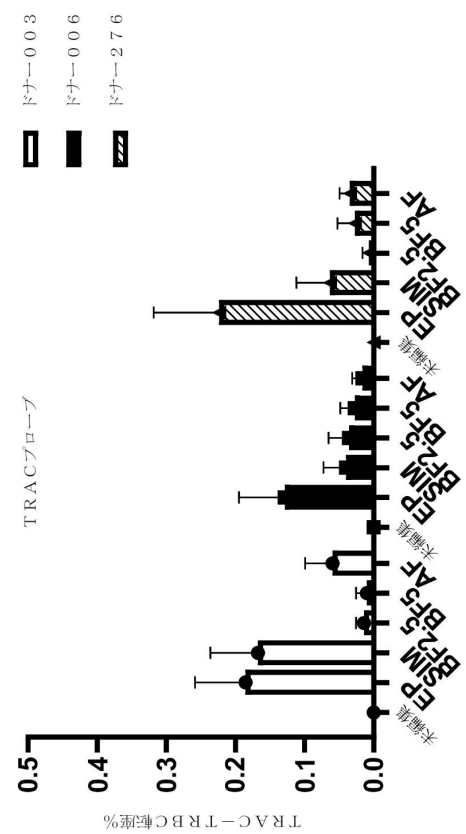
【図１４Ａ】



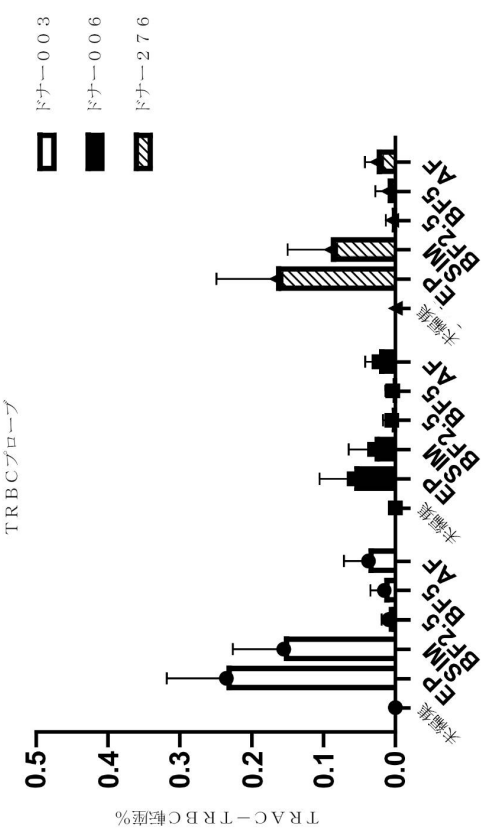
【図１４Ｂ】



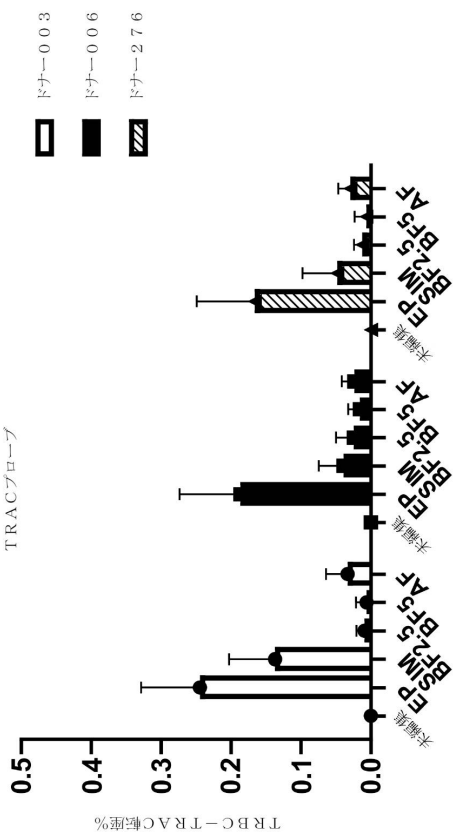
【図１４Ｃ】



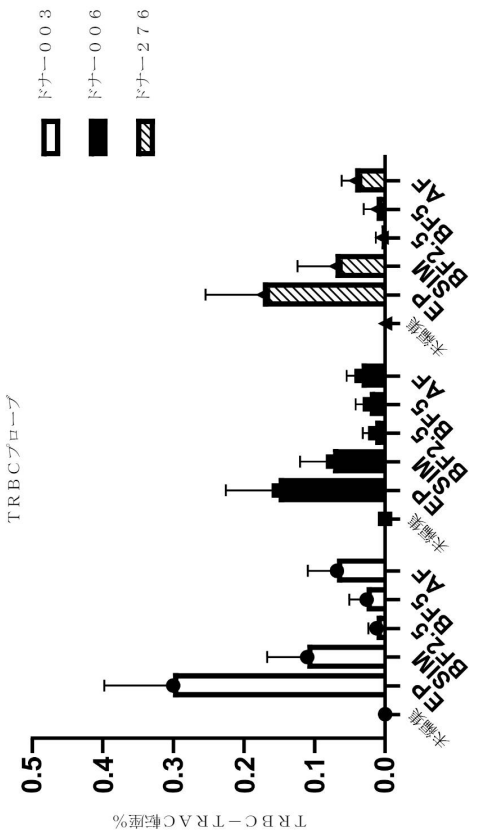
【図１４Ｄ】



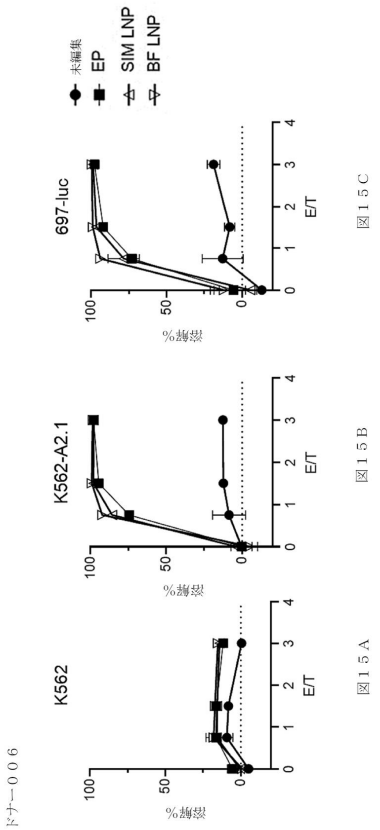
【図１４Ｅ】



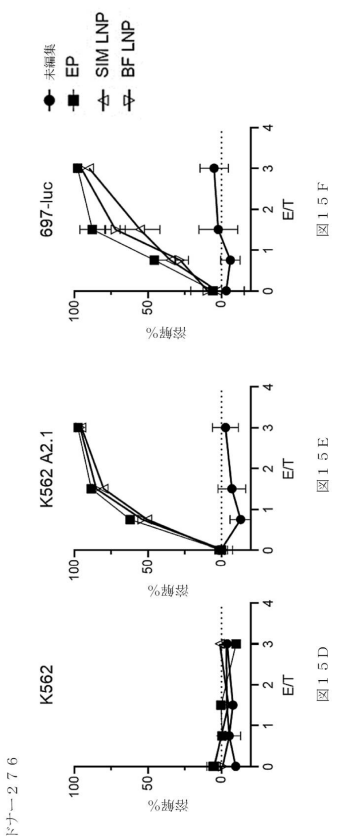
【図１４Ｆ】



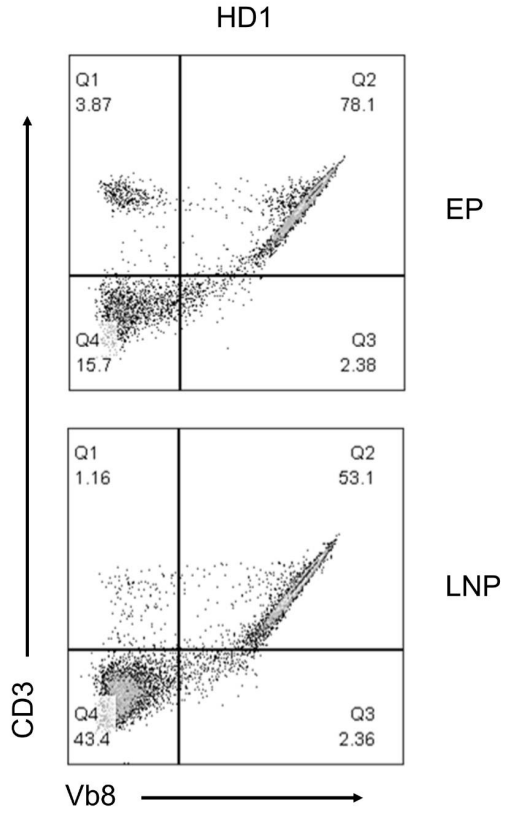
【図１５Ａ－Ｃ】



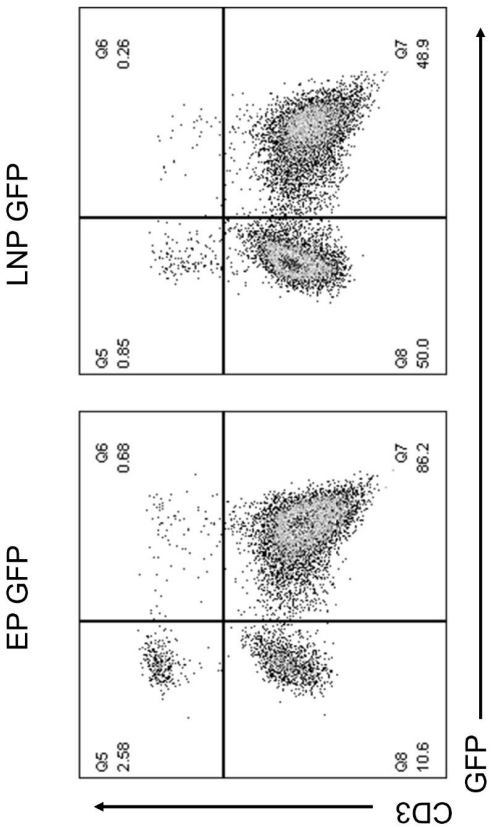
【図１５Ｄ－Ｆ】



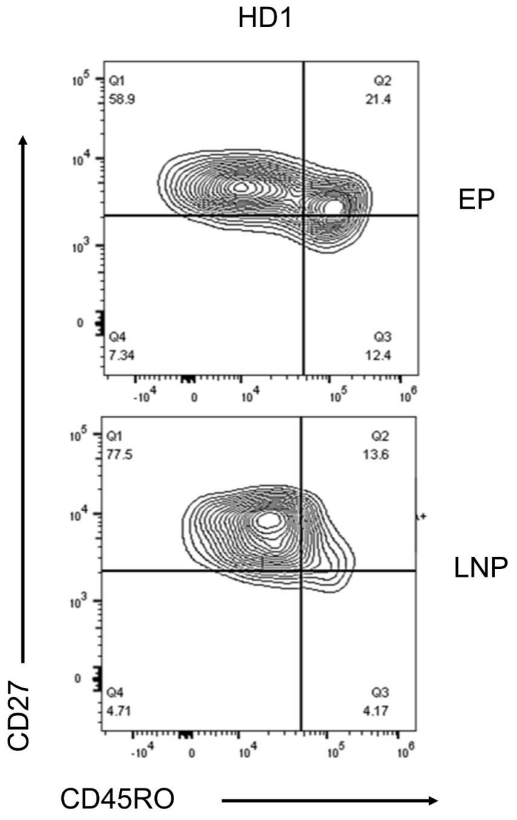
【図１６】



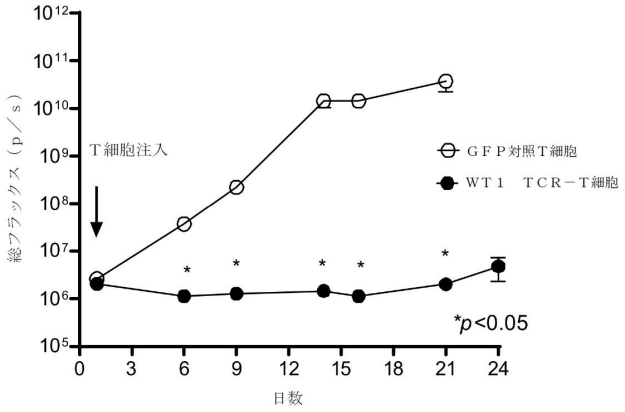
【図１７】



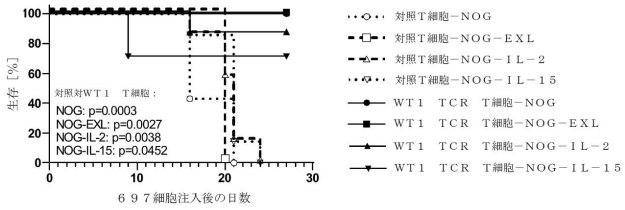
【図１８】



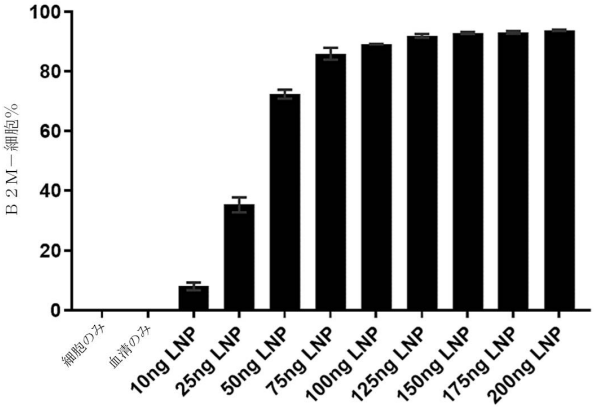
【図１９】



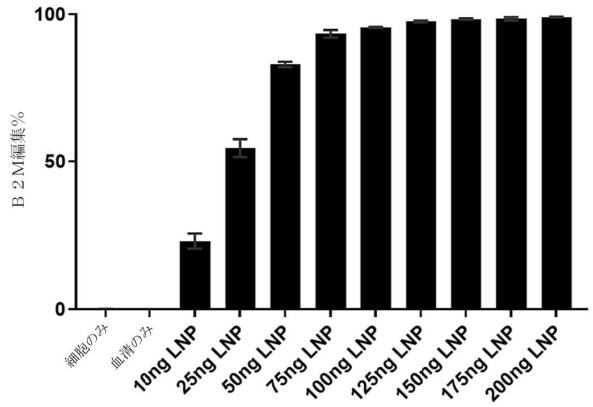
【図２０】



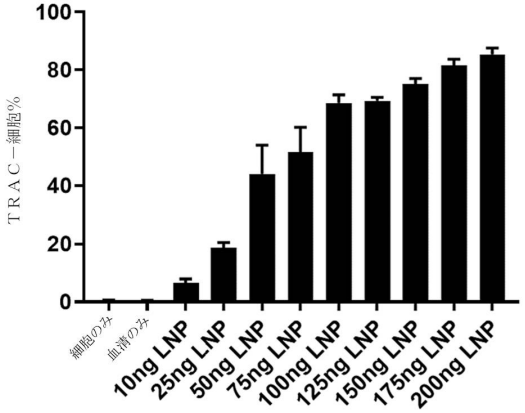
【図２１Ａ】



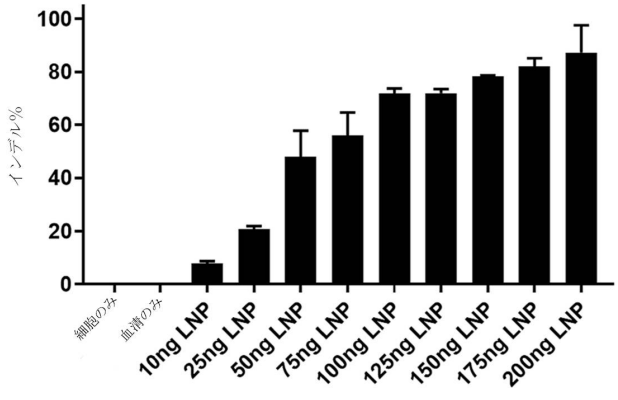
【図２１Ｂ】



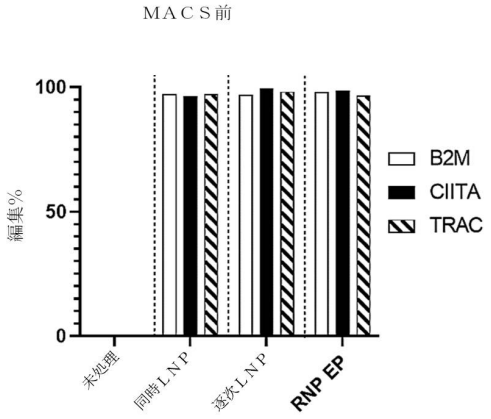
【図２２Ａ】



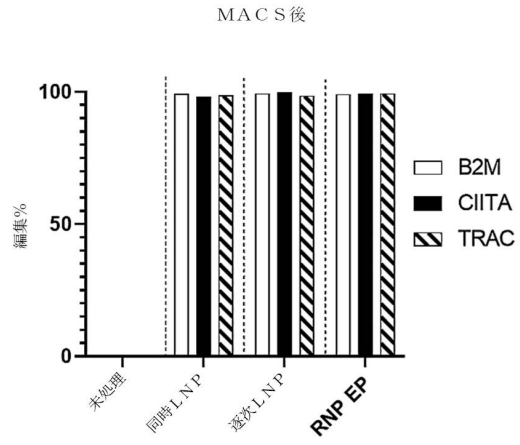
【図２２Ｂ】



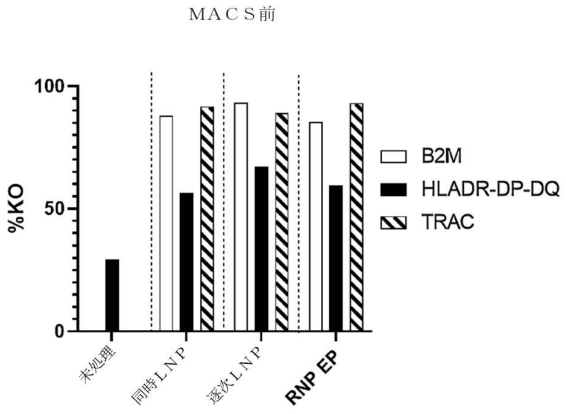
【図２３Ａ】



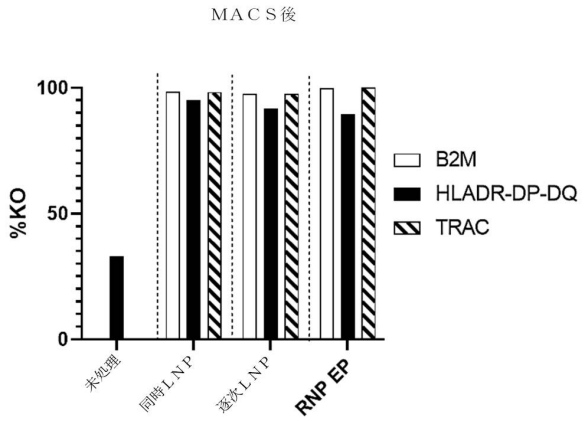
【図２３Ｂ】



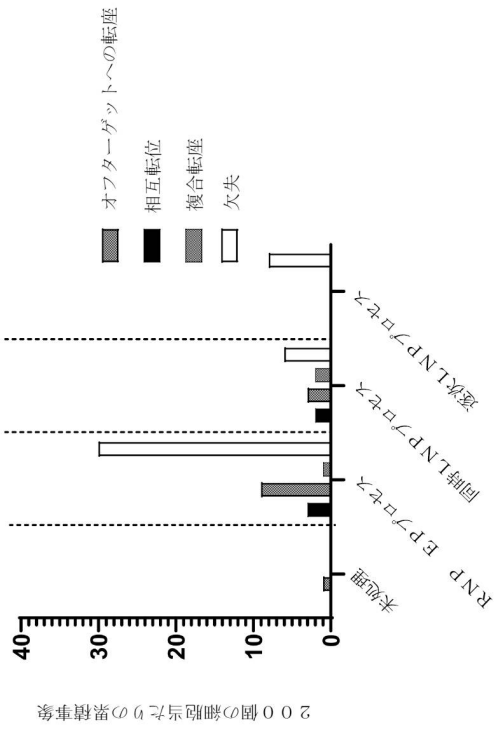
【図２４Ａ】



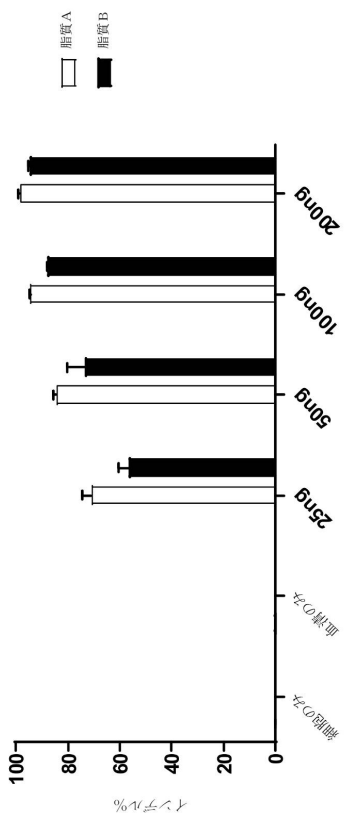
【図２４Ｂ】



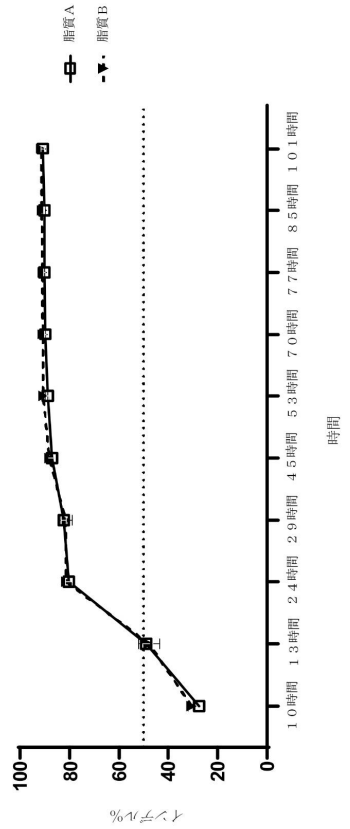
【図２５】



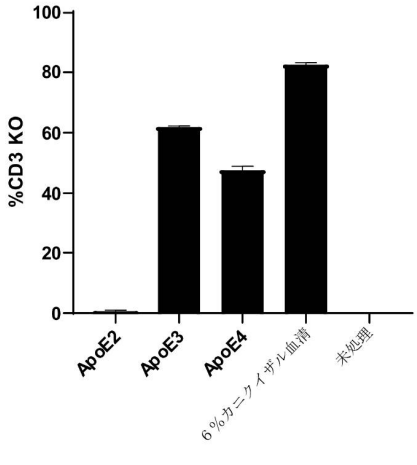
【図２６】



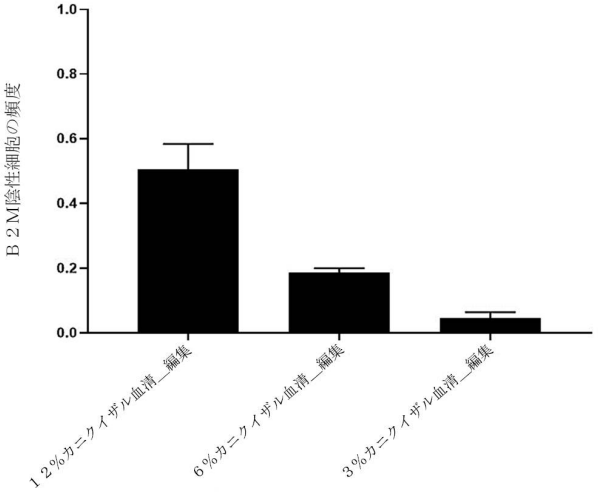
【図２７】



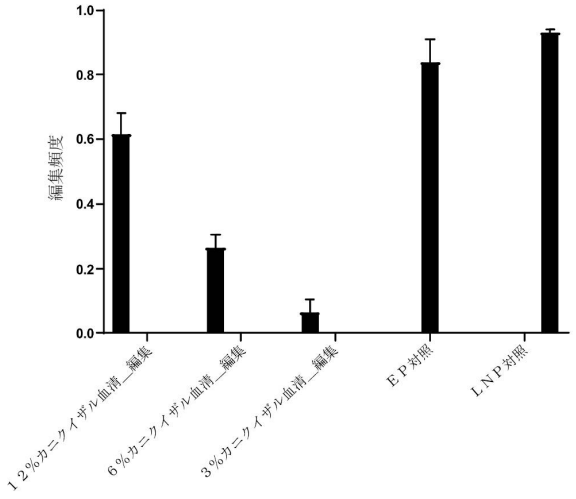
【図２８】



【図２９】



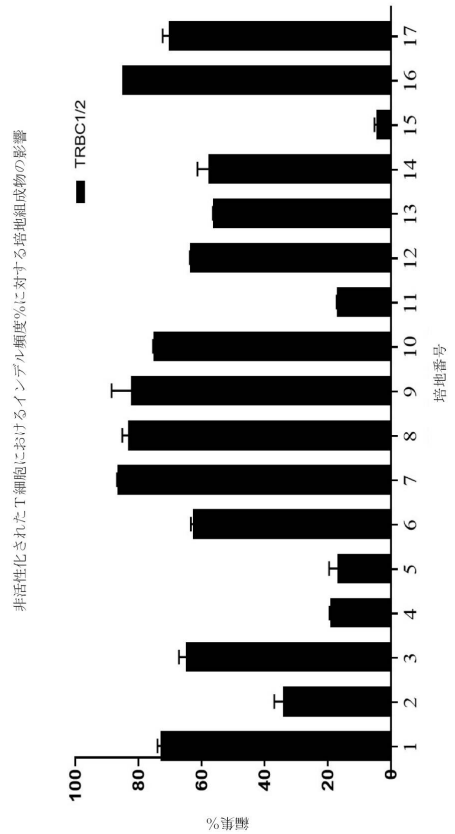
【図３０】



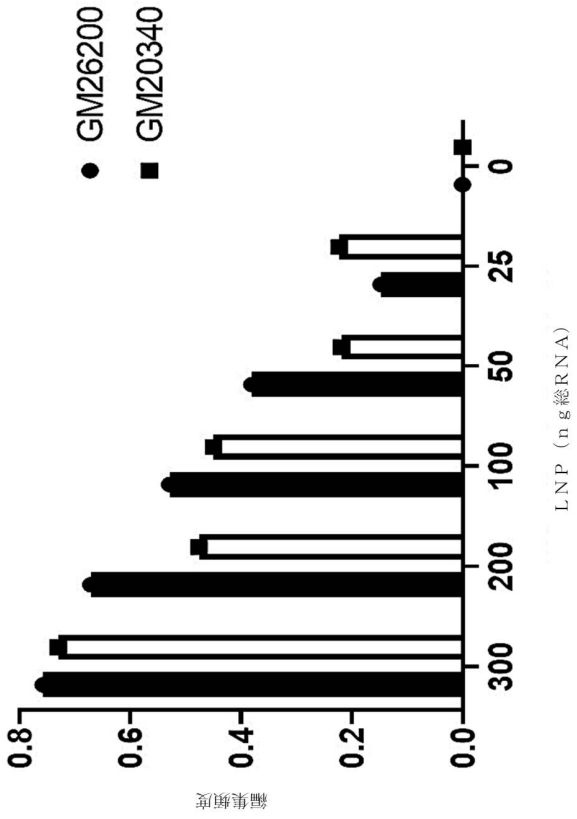
【図３１】



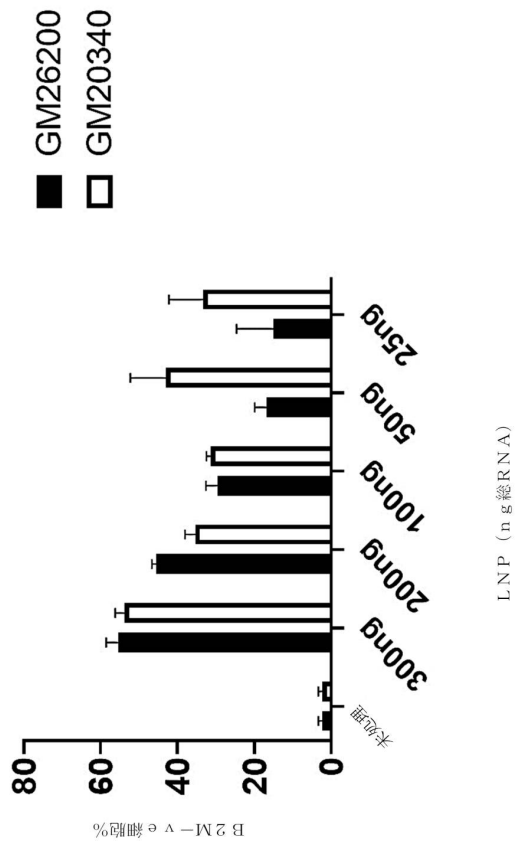
【図３２】



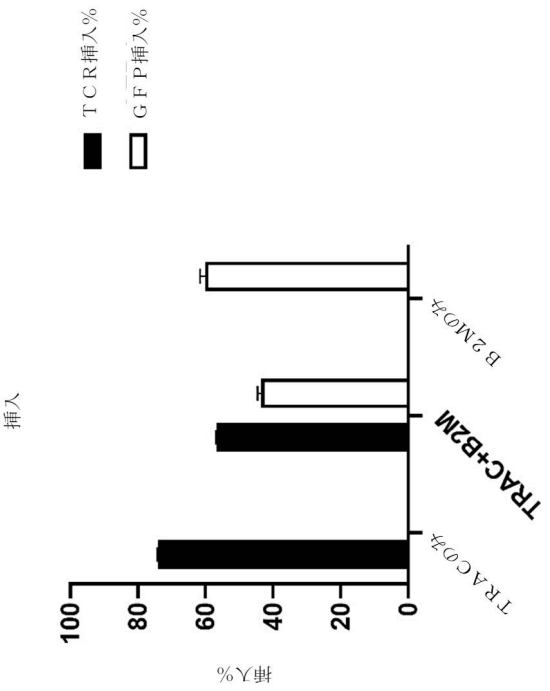
【図３３】



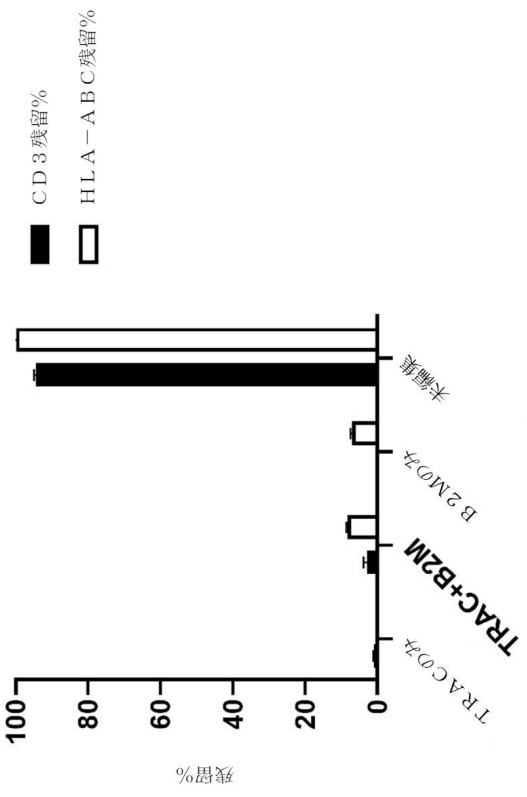
【図３４】



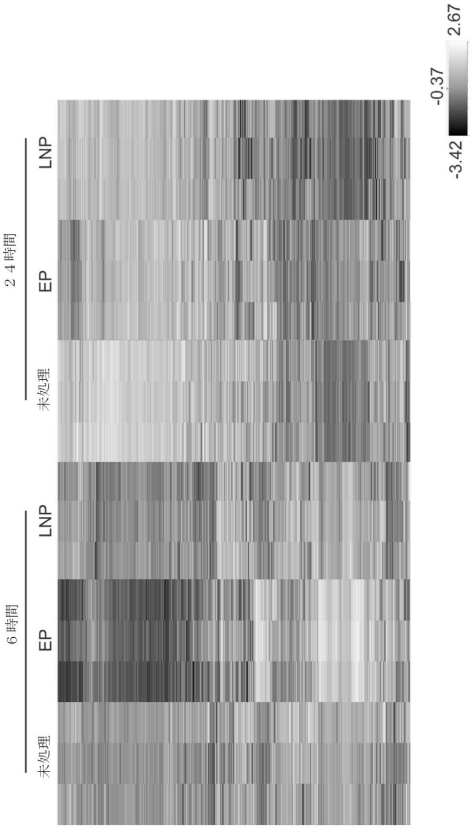
【図３５】



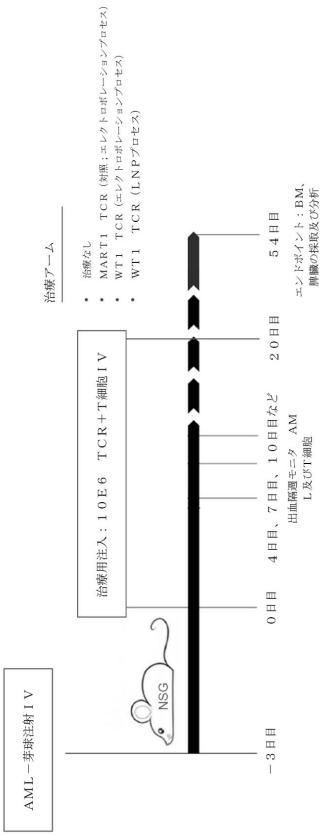
【図３６】



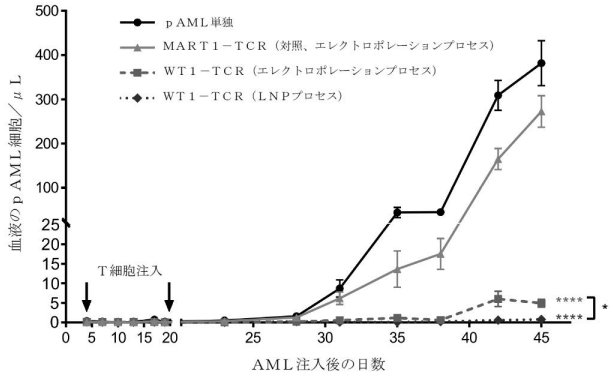
【図３７】



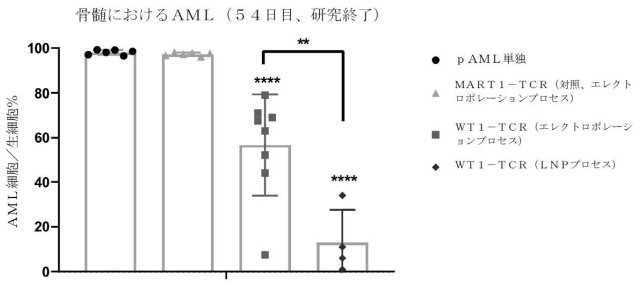
【図３８Ａ】



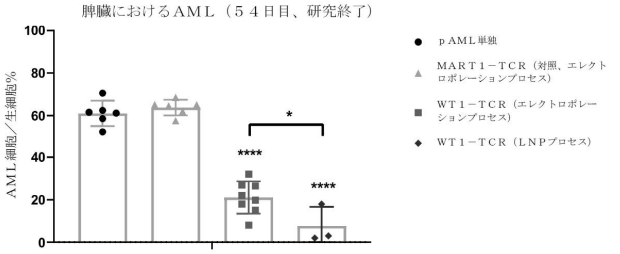
【図３８Ｂ】



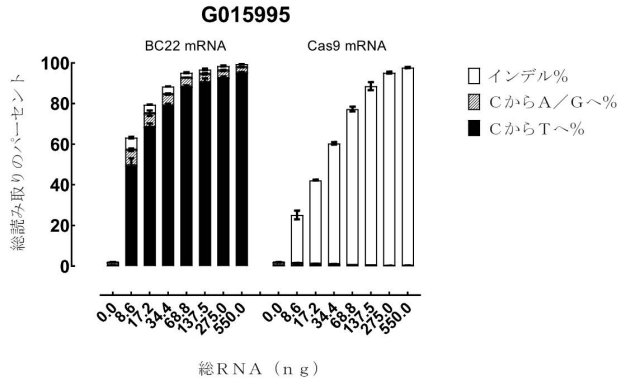
【図３８Ｃ】



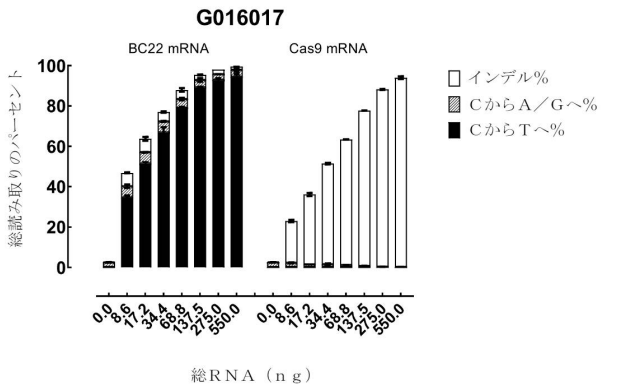
【図３８Ｄ】



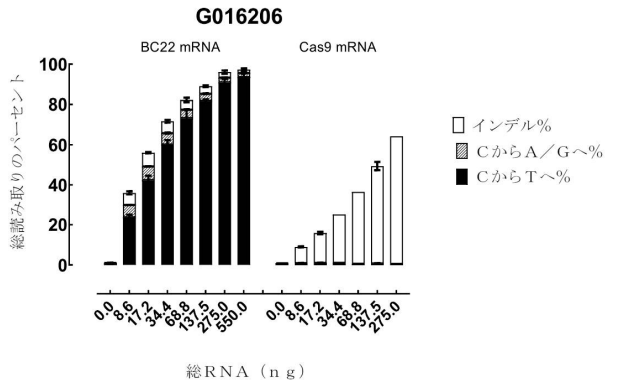
【図３９Ａ】



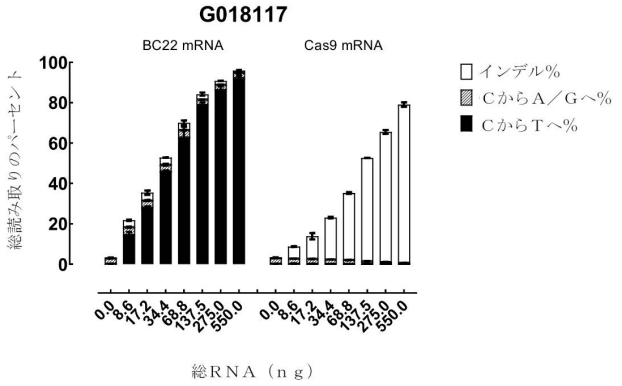
【図３９Ｂ】



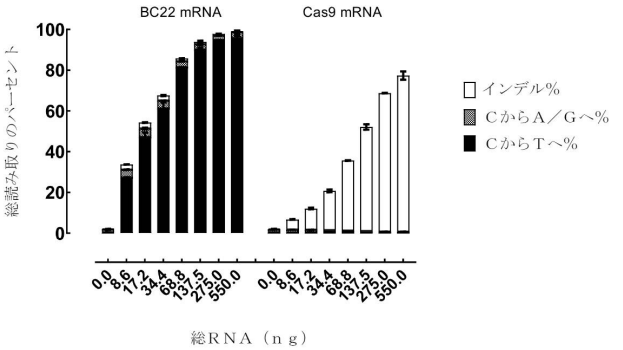
【図３９Ｃ】



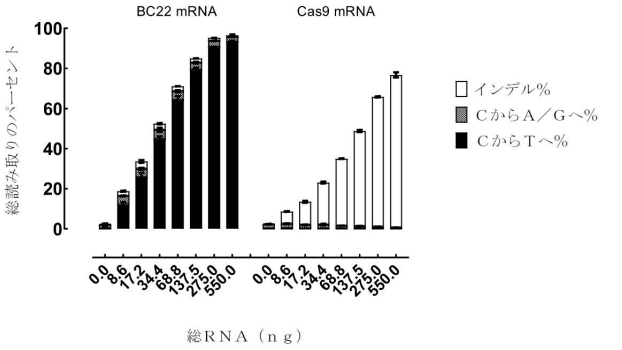
【図３９Ｄ】



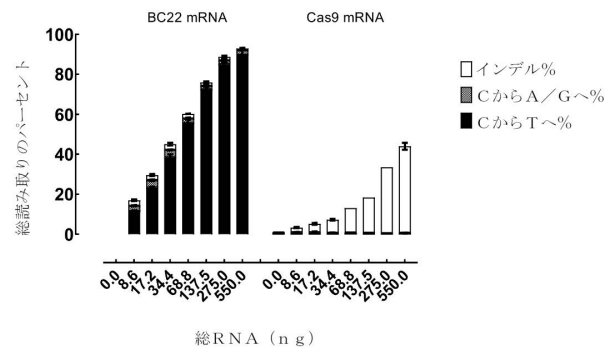
【図４０Ａ】



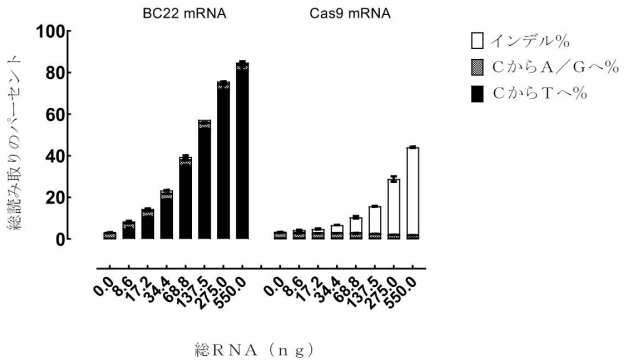
【図４０Ｂ】



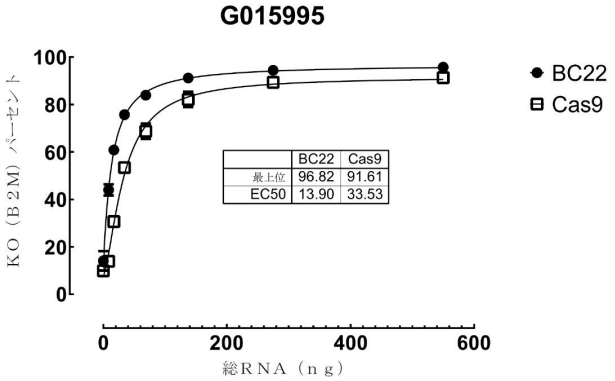
【図４０Ｃ】



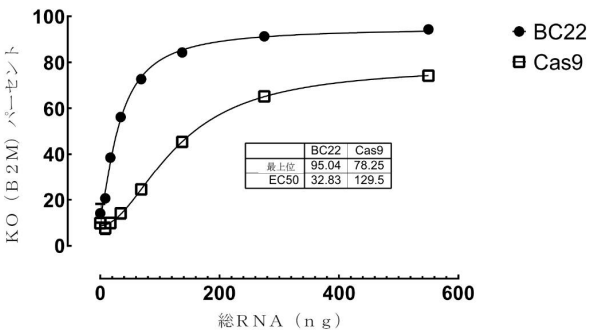
【図４０Ｄ】



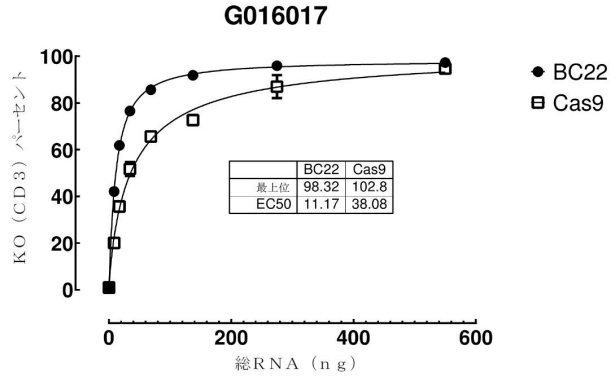
【図４１Ａ】



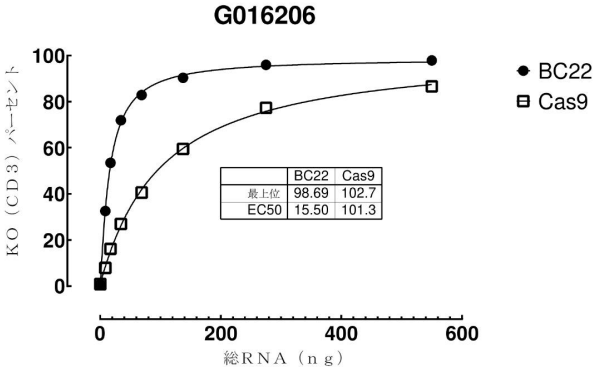
【図４１Ｂ】



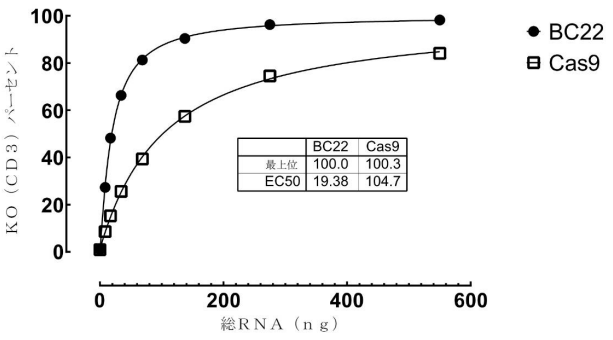
【図４１Ｃ】



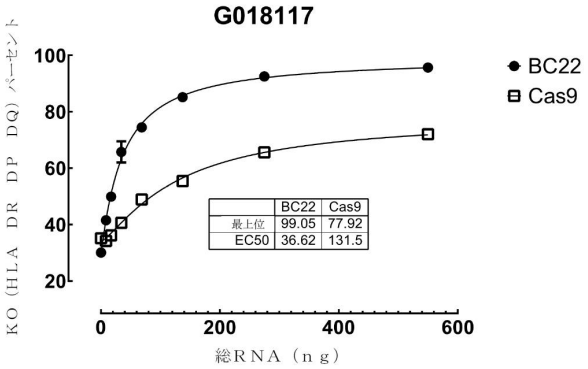
【図４１Ｄ】



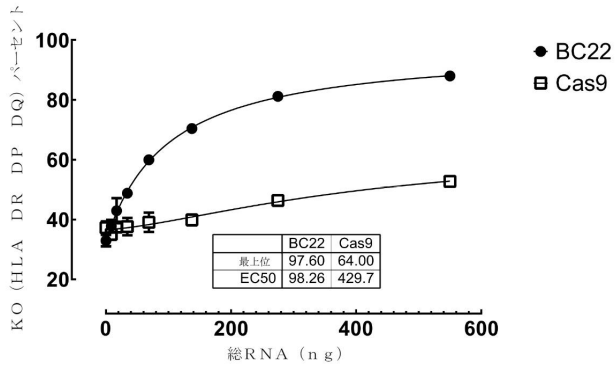
【図４１Ｅ】



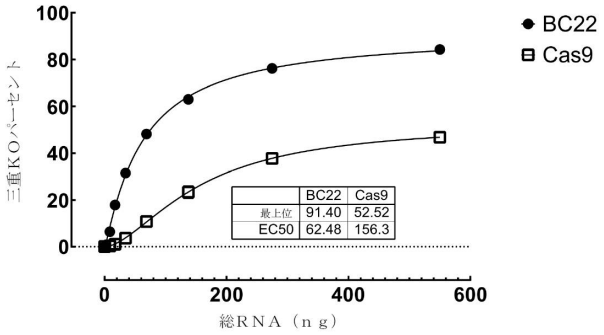
【図４１Ｆ】



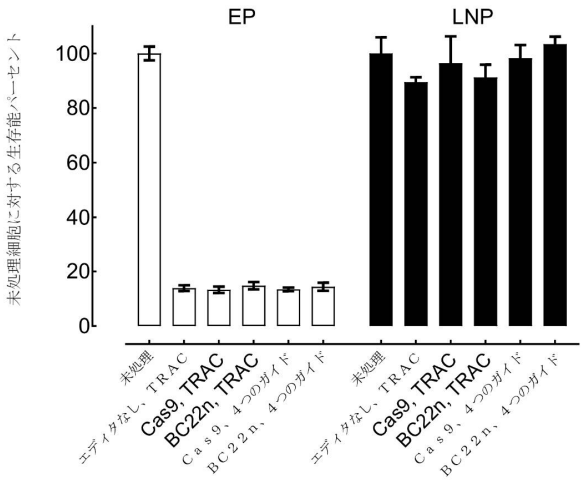
【図４１Ｇ】



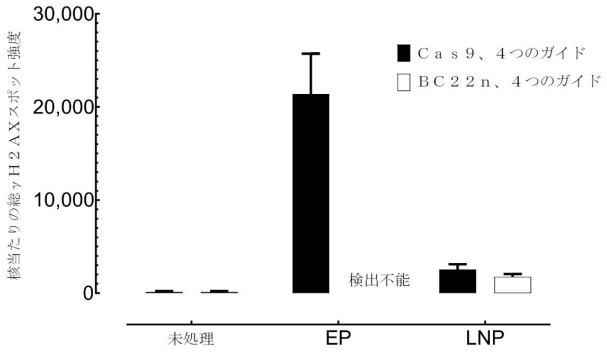
【図４１Ｈ】



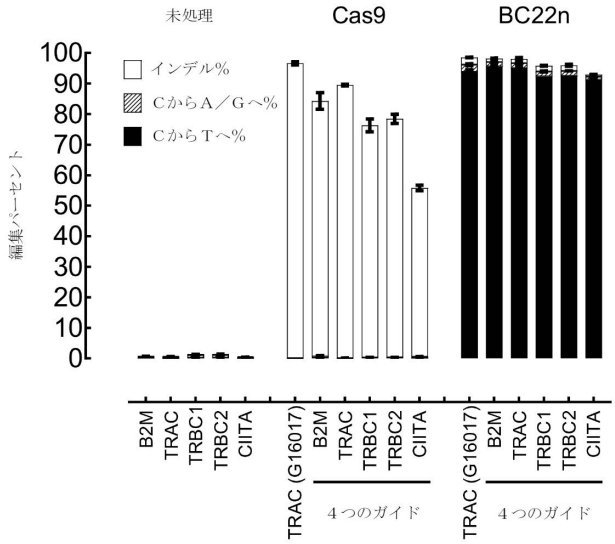
【図４２】



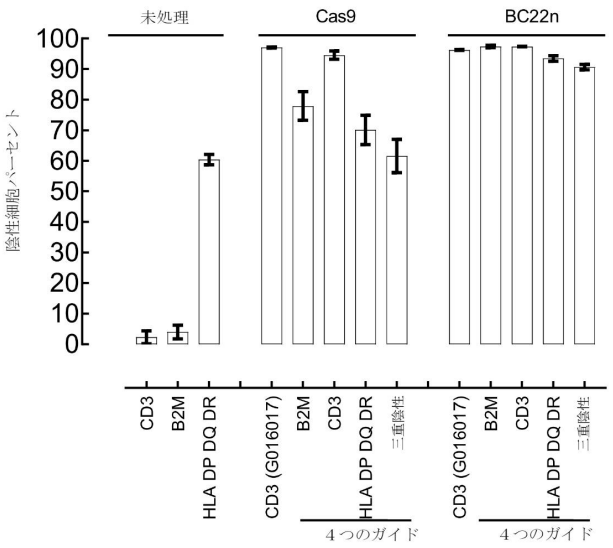
【図４３】



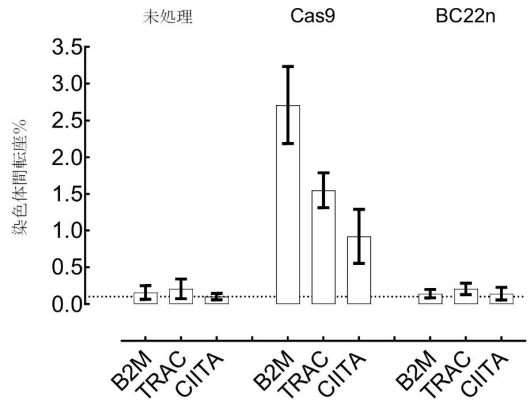
【図４４】



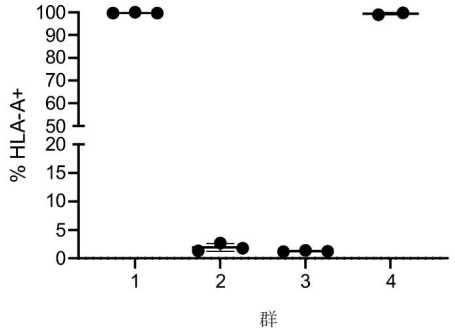
【図４５】



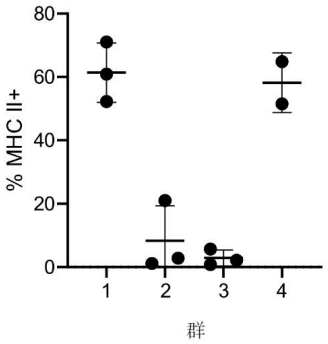
【図４６】



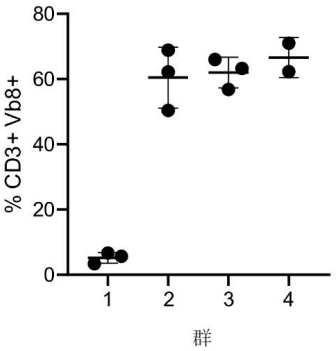
【図４７Ａ】



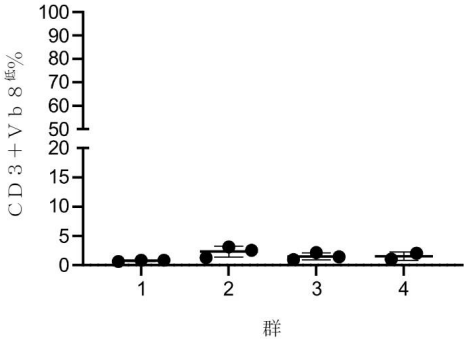
【図４７Ｂ】



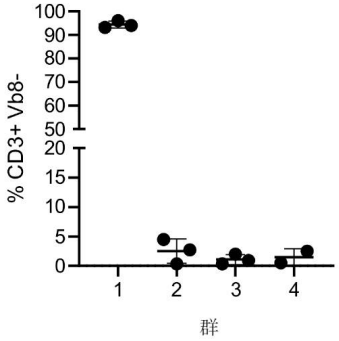
【図４７Ｃ】



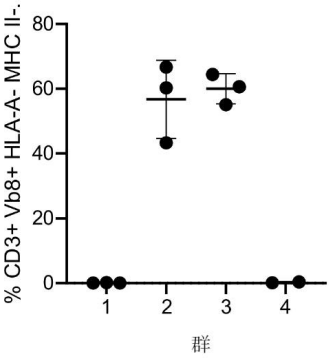
【図４７Ｄ】



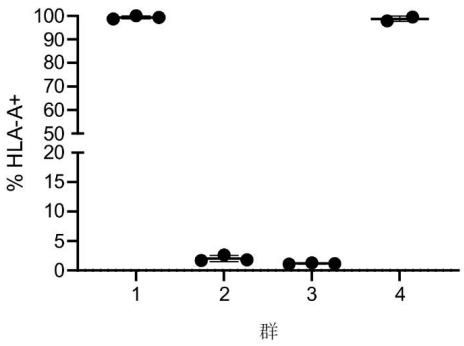
【図４７Ｅ】



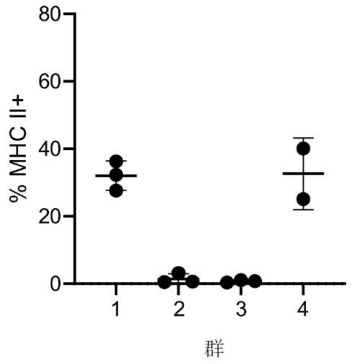
【図４７Ｆ】



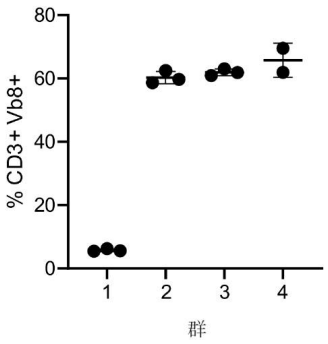
【図４８Ａ】



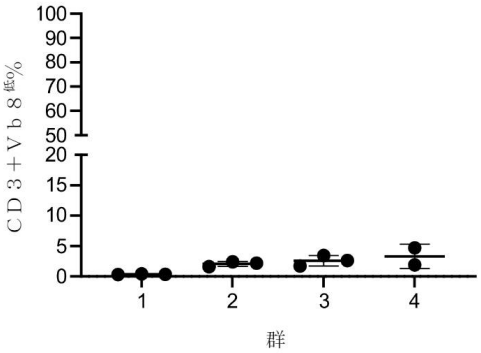
【図４８Ｂ】



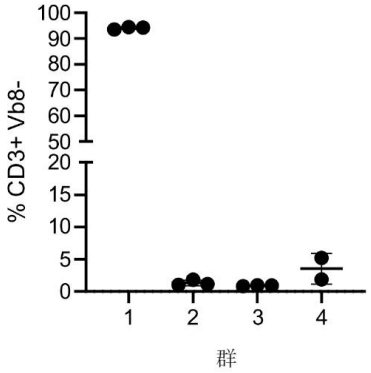
【図４８Ｃ】



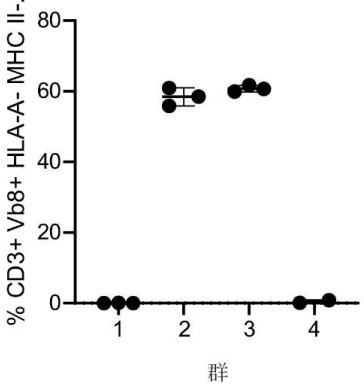
【図４８Ｄ】



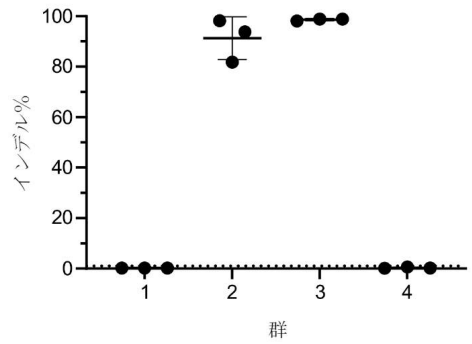
【図４８Ｅ】



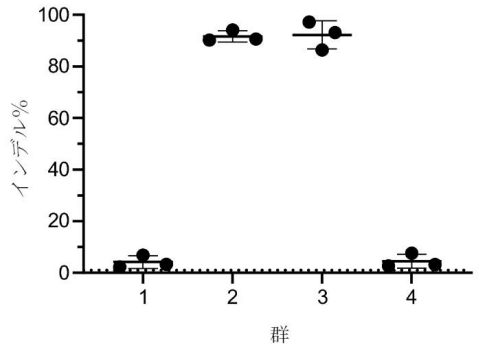
【図４８Ｆ】



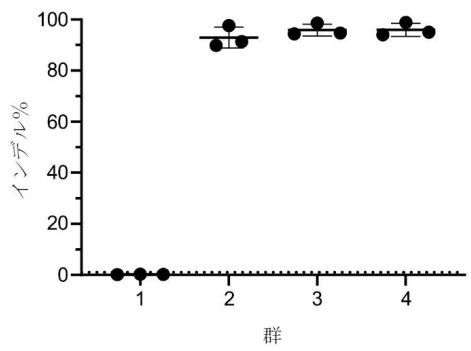
【図４９Ａ】



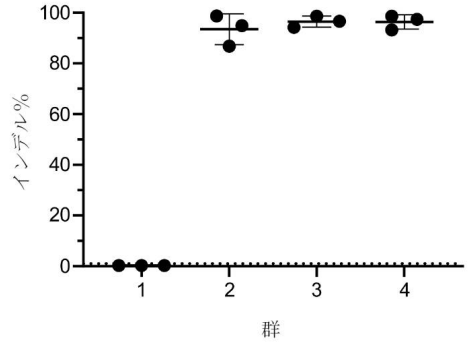
【図４９Ｂ】



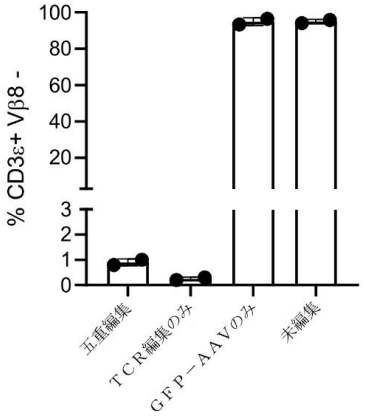
【図４９Ｃ】



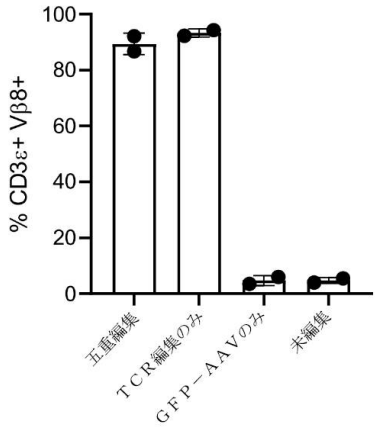
【図４９Ｄ】



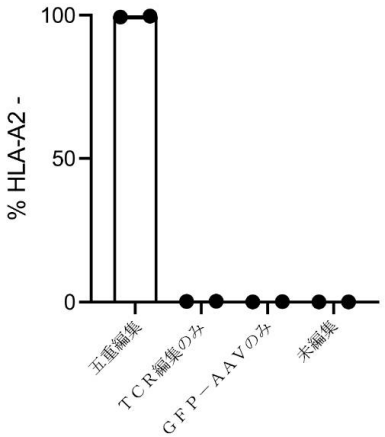
【図５０Ａ】



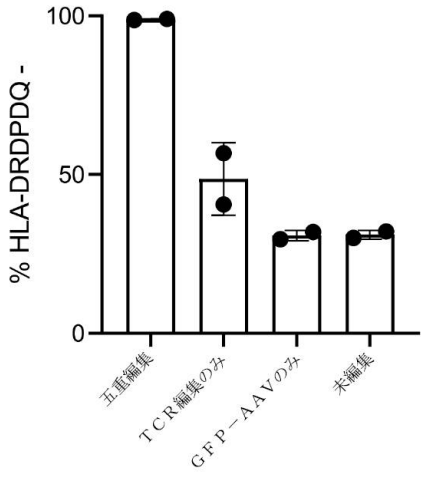
【図５０Ｂ】



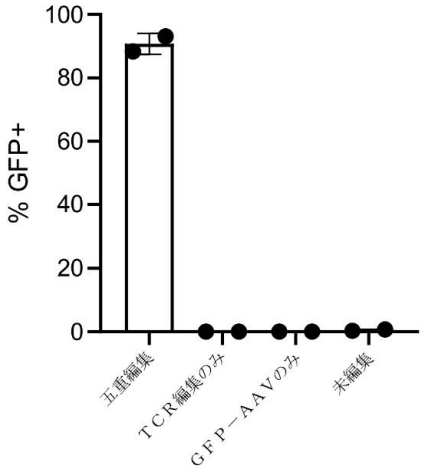
【図５０Ｃ】



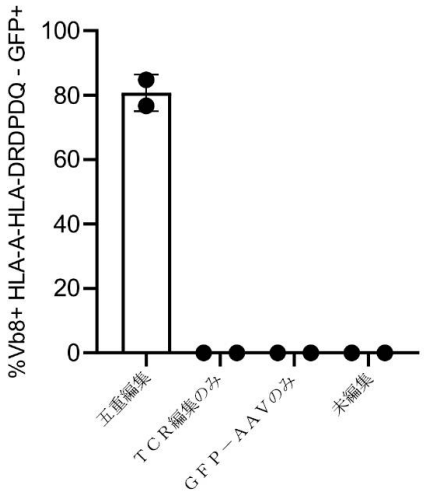
【図５０Ｄ】



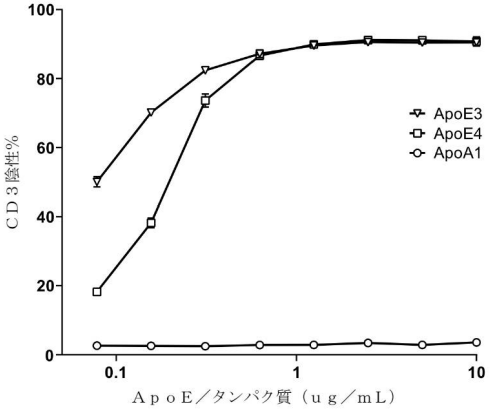
【図５０Ｅ】



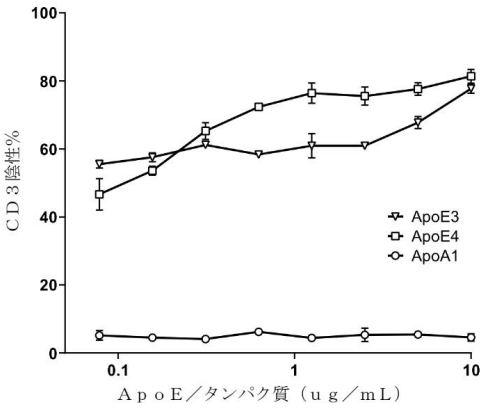
【図５０Ｆ】



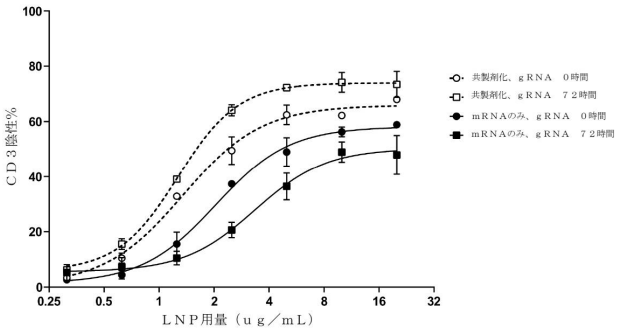
【図５１Ａ】



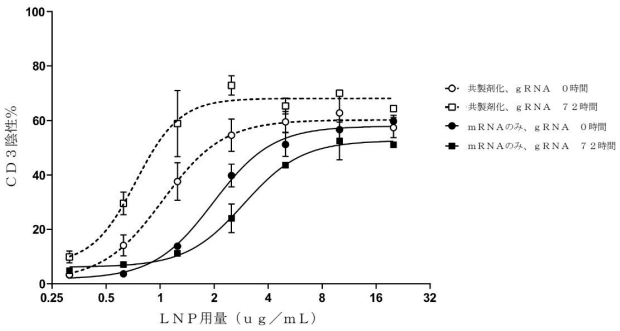
【図５１Ｂ】



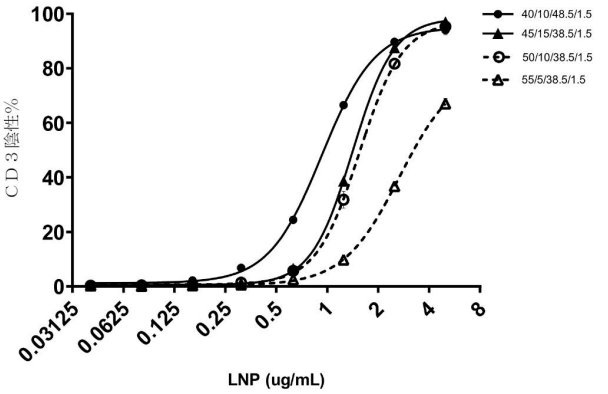
【図５２Ａ】



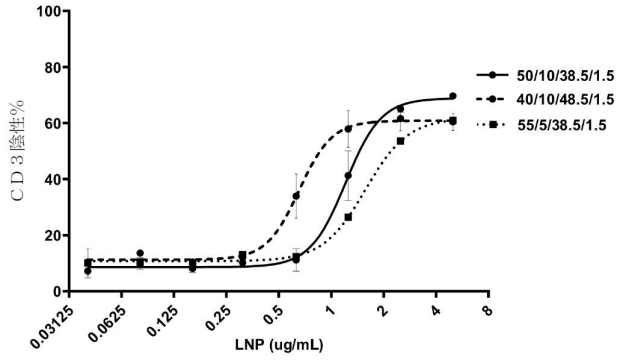
【図５２Ｂ】



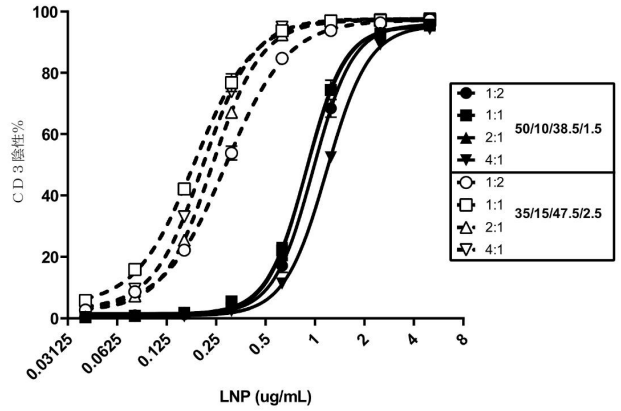
【図５３Ａ】



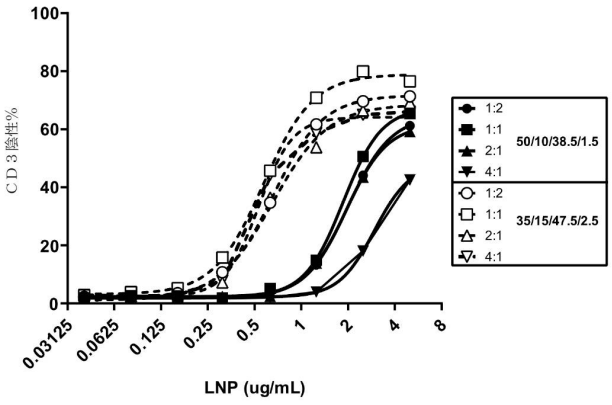
【図５３Ｂ】



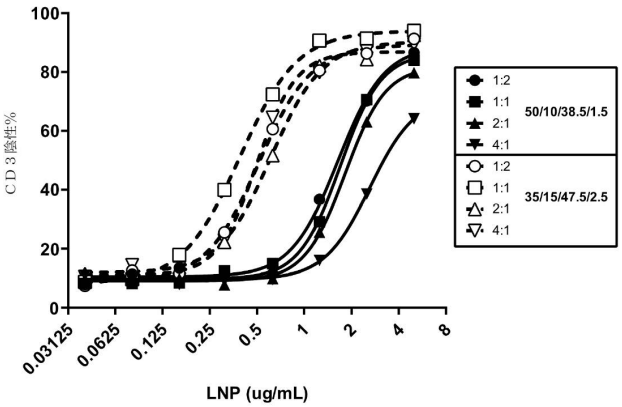
【図５４】



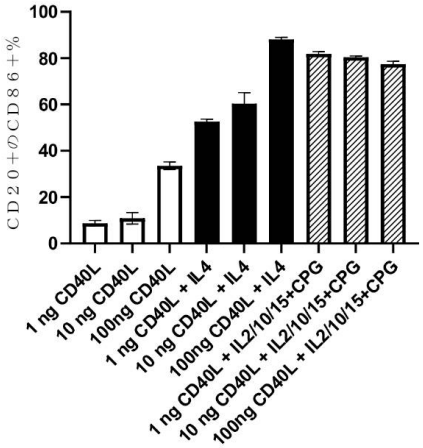
【図５５Ａ】



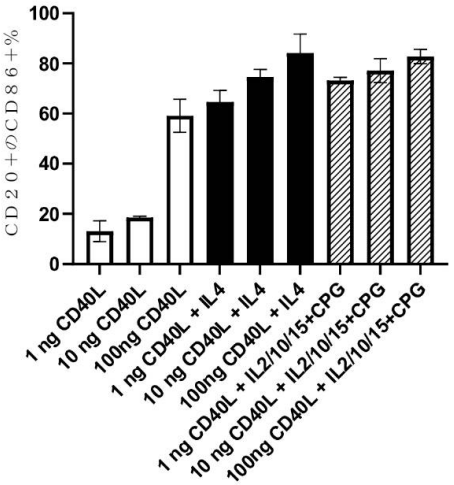
【図５５Ｂ】



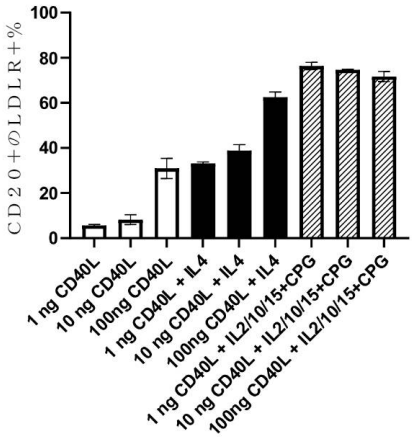
【図５６Ａ】



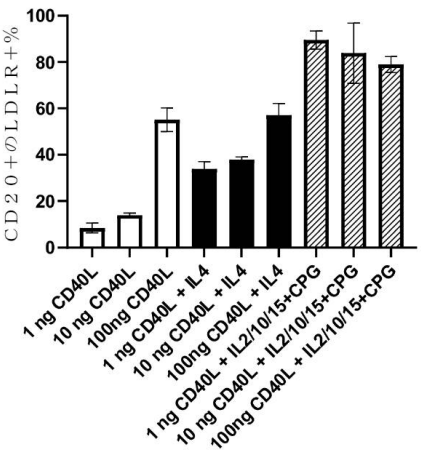
【図５６Ｂ】



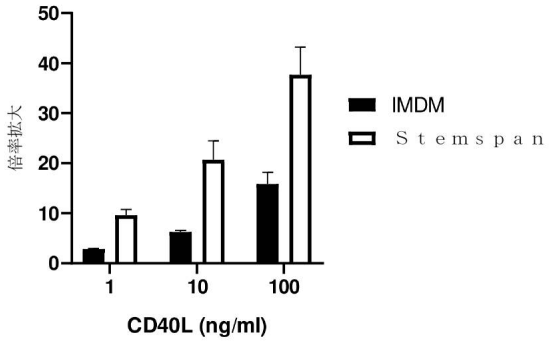
【図５６Ｃ】



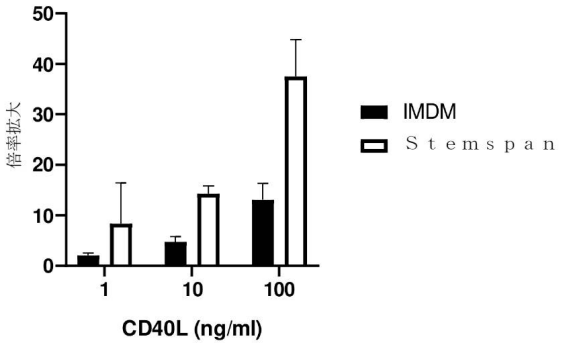
【図５６Ｄ】



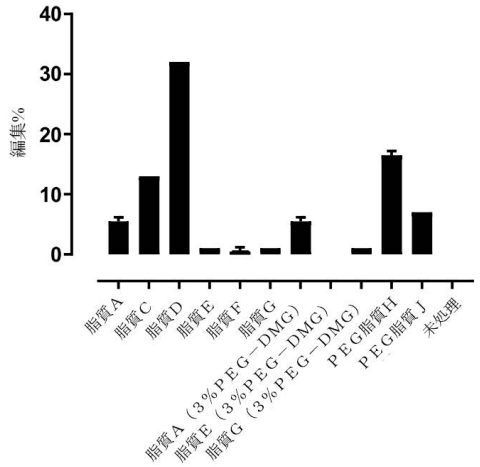
【図５７Ａ】



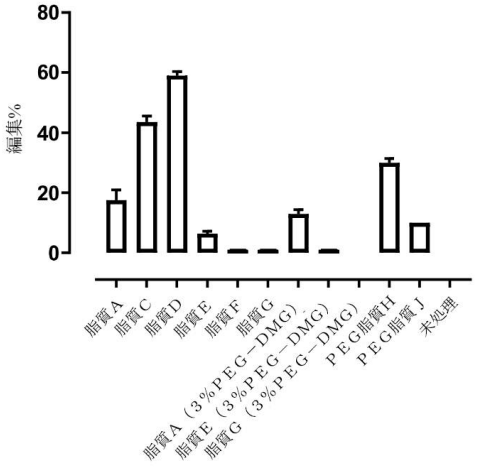
【図５７Ｂ】



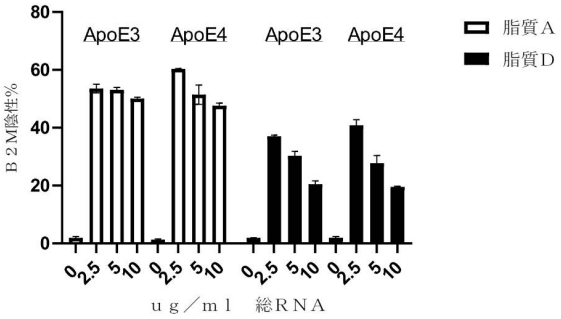
【図５８Ａ】



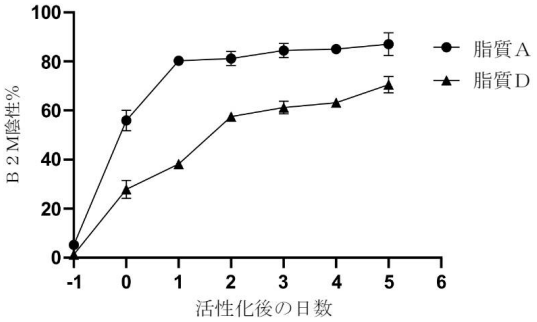
【図５８Ｂ】



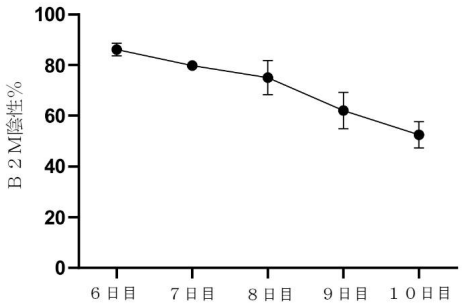
【図５９】



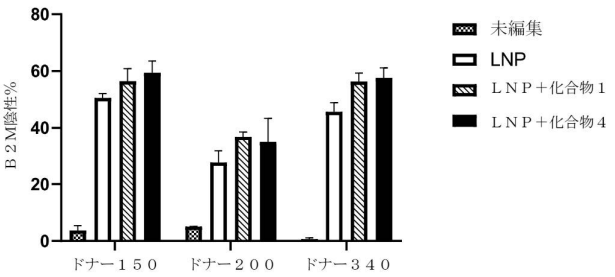
【図６０Ａ】



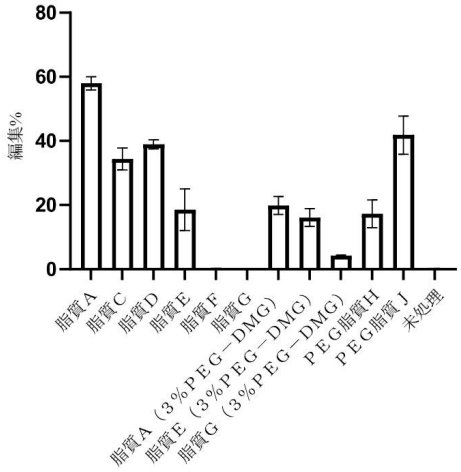
【図６０Ｂ】



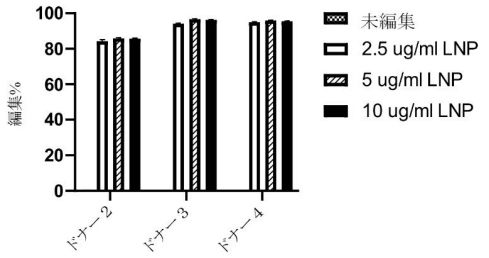
【図６１】



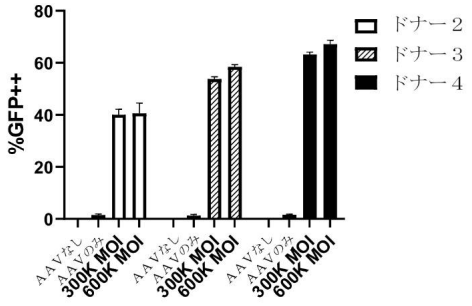
【図６２】



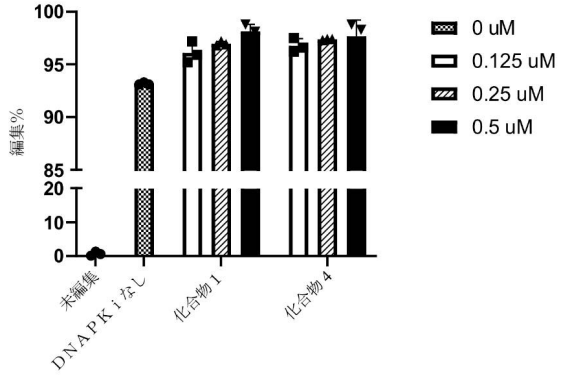
【図６３】



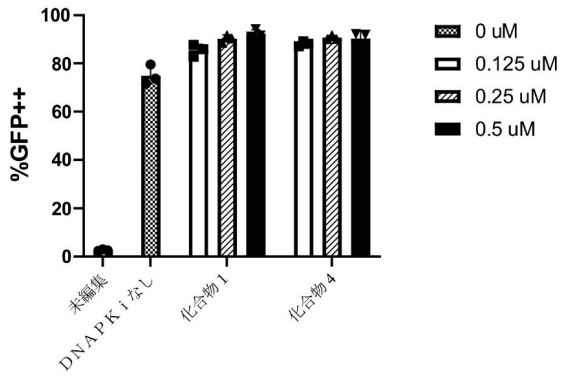
【図６４】



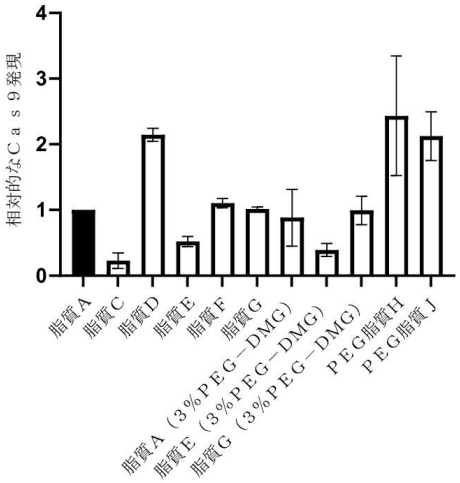
【図６５Ａ】



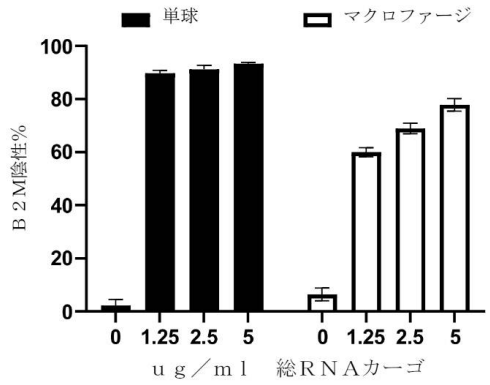
【図６５Ｂ】



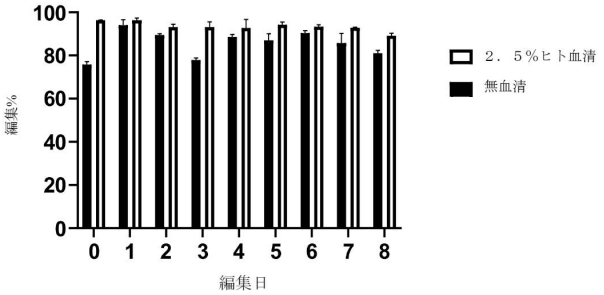
【図６６】



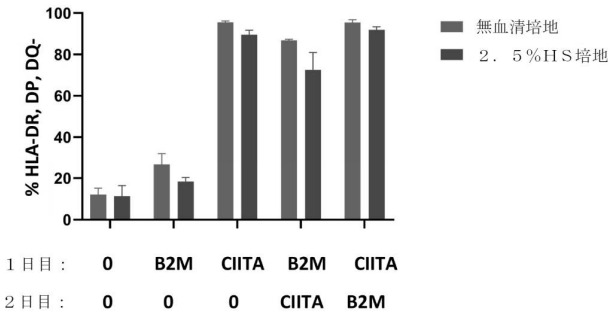
【図６７】



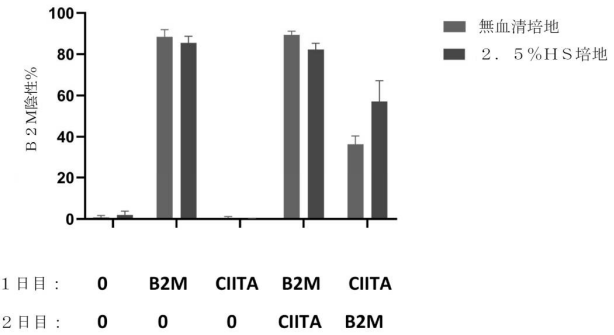
【図６８】



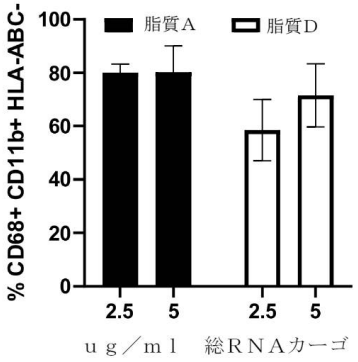
【図６９Ａ】



【図６９Ｂ】



【図７０】



【配列表】

<u>２０２３５２４６６６０００００１．ａｐｐ</u>

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	*35/30 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/30		
Ａ６１Ｋ	*35/545 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/545		
Ａ６１Ｋ	*35/12 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/12		
Ａ６１Ｋ	*35/17 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/17		
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｐ	*37/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/02		
Ａ６１Ｐ	*43/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１０５	
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		
Ｃ１２Ｎ	*15/09 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/09	１１０	
Ｃ１２Ｎ	*15/864 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/864	１００Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/867 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/867	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/12 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/12		

(32)優先日　令和2年12月11日(2020.12.11)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/130,100
(32)優先日　令和2年12月23日(2020.12.23)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/165,619
(32)優先日　令和3年3月24日(2021.3.24)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/176,221
(32)優先日　令和3年4月17日(2021.4.17)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＴＷＥＥＮ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３９，ケンブリッジ，エリー ストリート ４０
(72)発明者　バーンズ，シーン マイケル
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３９，ケンブリッジ，エリー ストリート ４０
(72)発明者　グティエレス マルティネス，パウラ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３９，ケンブリッジ，エリー ストリート ４０
(72)発明者　カンジョリア，アルティ マヘンドラ プラカシュ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３９，ケンブリッジ，エリー ストリート ４０
(72)発明者　モンティ，アンソニー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３９，ケンブリッジ，エリー ストリート ４０
(72)発明者　プロデウス，アーロン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３９，ケンブリッジ，エリー ストリート ４０

(72)発明者　アレドゥアニ，モハメッド シモ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３９，ケンブリッジ，エリー ストリート ４０
(72)発明者　キリク，オズガン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３９，ケンブリッジ，エリー ストリート ４０
(72)発明者　ラリヴィエール，リード ウォーカー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３９，ケンブリッジ，エリー ストリート ４０
(72)発明者　シャルマ，パーラク スシル
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３９，ケンブリッジ，エリー ストリート ４０
(72)発明者　スタンプローグルー，エレニ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３９，ケンブリッジ，エリー ストリート ４０
(72)発明者　チャン，チンジャン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３９，ケンブリッジ，エリー ストリート ４０

Ｆターム（参考）　4B065　AA94X AB01 AC14 AC20 BA01 BD39 BD50 CA44
4C084　AA13 NA14 ZB071 ZB211 ZB261
4C087　AA01 AA02 AA03 BB37 BB44 BB45 BB64 BB65 CA04 CA12
NA14 ZB07 ZB21 ZB26