

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-536447
(P2019-536447A)

(43) 公表日 令和1年12月19日(2019.12.19)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/09	11 O	4 B 065
C 12 N 5/10 (2006.01)	C 12 N 5/10	Z N A	4 C 084
A 61 P 35/00 (2006.01)	A 61 P 35/00		4 C 086
A 61 K 35/17 (2015.01)	A 61 K 35/17	A	4 C 087
A 61 K 48/00 (2006.01)	A 61 K 48/00		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 215 頁) 最終頁に続く

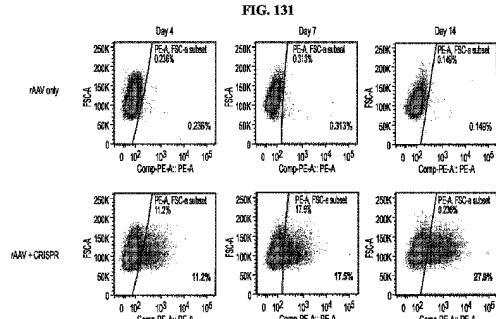
(21) 出願番号	特願2019-522944 (P2019-522944)	(71) 出願人	518032993
(86) (22) 出願日	平成29年10月26日 (2017.10.26)	インティマ バイオサイエンス, インコ	ーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	令和1年6月25日 (2019.6.25)	アメリカ合衆国 ニューヨーク 1001	9, ニューヨーク, コロンブス サー
(86) 國際出願番号	PCT/US2017/058615	クル 3	
(87) 國際公開番号	W02018/081476	(71) 出願人	305023366
(87) 國際公開日	平成30年5月3日 (2018.5.3)	リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ	オブ ミネソタ
(31) 優先権主張番号	62/413,814	アメリカ合衆国 ミネソタ 55455-	2020 ミネアポリス, オークスト
(32) 優先日	平成28年10月27日 (2016.10.27)	リートーエス・イー 200, マクナマ	ラ アラムナイ センター 600
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	62/452,081		
(32) 優先日	平成29年1月30日 (2017.1.30)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T細胞療法のウイルス法

(57) 【要約】

ウイルスまたは非ウイルスベクターを使用して遺伝子改変細胞の集団を产生する方法。遺伝子改変細胞の集団を产生するため、および/またはがんの処置のための改変ウイルスも開示される。過去50年間ににおける、がん治療法における目覚ましい進歩にも拘らず、特に、進行した病期において、化学療法、放射線療法、または生物療法に対して抵抗性であり、外科法により対処できない多くの腫瘍型が依然として存在する。近年、腫瘍上の分子標的を in vivoで認識するリンパ球の遺伝子操作が著しく進歩した結果として、標的腫瘍寛解の目覚ましい症例がもたらされている。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

遺伝子改変細胞の集団を产生する方法であって、
ヒト対象に由来する細胞の集団を提供するステップ；

クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（C R I S P R）系を使用して
サイトカイン誘導性S H 2含有タンパク質（C I S H）遺伝子中に切断を導入することによ
って細胞の前記集団中の少なくとも1個の細胞を、ex vivoで改変するステップ；および

T細胞受容体（T C R）をコードする少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を含むア
デノ随伴ウイルス（A A V）ベクターを、細胞の前記集団中の少なくとも1個の細胞に導
入して、前記外因性トランス遺伝子を、前記切断において、前記少なくとも1個の細胞の
ゲノム中に組み込むステップ

を含み；前記少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を組み込むための前記A A Vベクタ
ーの使用が、前記少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を同等の細胞に組み込むための
ミニサークルベクターの使用と比較して細胞毒性を低減する、方法。

【請求項 2】

遺伝子改変細胞の集団を产生する方法であって、
ヒト対象に由来する細胞の集団を提供するステップ；

クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（C R I S P R）系を使用して
サイトカイン誘導性S H 2含有タンパク質（C I S H）遺伝子中に切断を導入することによ
って細胞の前記集団中の少なくとも1個の細胞を、ex vivoで改変するステップ；および

T細胞受容体（T C R）をコードする少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を含むア
デノ随伴ウイルス（A A V）ベクターを、細胞の前記集団中の少なくとも1個の細胞に導
入して、前記外因性トランス遺伝子を、前記切断において、前記少なくとも1個の細胞の
ゲノム中に組み込むステップ

を含み；細胞の前記集団が、前記A A Vベクターを導入した約4日後に、蛍光活性化細胞
分取（F A C S）によって測定された場合、少なくとも約90%の生細胞を含む、方法。

【請求項 3】

遺伝子改変細胞の集団を产生する方法であって、

ヒト対象に由来する細胞の集団を提供するステップ；

ガイドポリ核酸を含むクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（C R I
S P R）系を細胞の前記集団に導入するステップであって、前記ガイドポリ核酸が細胞の
前記集団内の複数の細胞中のサイトカイン誘導性S H 2含有タンパク質（C I S H）遺伝
子に特異的に結合し、前記C R I S P R系が前記C I S H遺伝子中に切断を導入すること
によつて、前記複数の細胞中でC I S Hタンパク質機能を抑制する、ステップ；および

アデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターを前記複数の細胞に導入することによつて、遺
伝子改変細胞の集団を产生するステップであつて、前記A A Vベクターが、T細胞受容体
(T C R)をコードする少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を、前記切断において、
前記複数の細胞のゲノム中に組み込む、ステップ

を含み；遺伝子改変細胞の前記集団中の細胞の少なくとも約10%が、前記少なくとも1
個の外因性トランス遺伝子を発現する、方法。

【請求項 4】

ヒト対象におけるがんを処置する方法であつて、

治療有効量のex vivoで遺伝子改変された細胞の集団を投与するステップを含み
、前記ex vivoで遺伝子改変された細胞の少なくとも1個が、前記少なくとも1個
のex vivoで遺伝子改変された細胞中のサイトカイン誘導性S H 2含有タンパク
質（C I S H）タンパク質機能の抑制をもたらす、C I S H遺伝子中のゲノム変化を含み
、前記ゲノム変化がクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（C R I S P
R）系によって導入され；前記少なくとも1個のex vivoで遺伝子改変された細胞

10

20

30

40

50

が、T細胞受容体（TCR）をコードする外因性トランス遺伝子をさらに含み、前記外因性トランス遺伝子が、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターによって、前記CISH遺伝子中において、前記少なくとも1個の遺伝子改変細胞のゲノム中に導入され；前記投与が、前記ヒト対象におけるがんを処置するか、またはがんの少なくとも1つの症状を改善する、方法。

【請求項5】

ヒト対象における消化器がんを処置する方法であって、

治療有効量のex vivoで遺伝子改変された細胞の集団を投与するステップを含み、前記ex vivoで遺伝子改変された細胞の少なくとも1個が、前記少なくとも1個のex vivoで遺伝子改変された細胞中でのサイトカイン誘導性SH2含有タンパク質（CISH）タンパク質機能の抑制をもたらす、CISH遺伝子中のゲノム変化を含み、前記ゲノム変化がクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（CRISP-R）系によって導入され；前記少なくとも1個のex vivoで遺伝子改変された細胞が、T細胞受容体（TCR）をコードする外因性トランス遺伝子をさらに含み、前記外因性トランス遺伝子が、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターによって、前記CISH遺伝子中において、前記少なくとも1個の遺伝子改変細胞のゲノム中に導入され；前記投与が、前記ヒト対象におけるがんを処置するか、またはがんの少なくとも1つの症状を改善する、方法。

10

【請求項6】

ヒト対象におけるがんを処置する方法であって、

治療有効量のex vivoで遺伝子改変された細胞の集団を投与するステップを含み、前記ex vivoで遺伝子改変された細胞の少なくとも1個が、前記少なくとも1個のex vivoで遺伝子改変された細胞中でのT細胞受容体（TCR）タンパク質機能の抑制をもたらす、TCR遺伝子中のゲノム変化および前記少なくとも1個のex vivoで遺伝子改変された細胞中でのサイトカイン誘導性SH2含有タンパク質（CISH）タンパク質機能の抑制をもたらす、CISH遺伝子中のゲノム変化を含み、前記ゲノム変化がクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（CRISP-R）系によって導入され；前記少なくとも1個のex vivoで遺伝子改変された細胞が、T細胞受容体（TCR）をコードする外因性トランス遺伝子をさらに含み、前記外因性トランス遺伝子が、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターによって、前記CISH遺伝子中において、前記少なくとも1個の遺伝子改変細胞のゲノム中に導入され；前記投与が、前記ヒト対象におけるがんを処置するか、またはがんの少なくとも1つの症状を改善する、方法。

20

30

【請求項7】

少なくとも1個の遺伝子改変細胞中のサイトカイン誘導性SH2含有タンパク質（CISH）タンパク質機能を抑制するCISH遺伝子中の外因性ゲノム変化と、前記CISH遺伝子中における、前記少なくとも1個の遺伝子改変細胞のゲノム中への挿入のためのT細胞受容体（TCR）をコードする少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を含むアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターとを含む、ex vivoで遺伝子改変された細胞の集団。

40

【請求項8】

ex vivoで遺伝子改変された細胞の集団の少なくとも1個の遺伝子改変細胞中のサイトカイン誘導性SH2含有タンパク質（CISH）タンパク質機能を抑制するCISH遺伝子中の外因性ゲノム変化と、前記CISH遺伝子中における、前記ex vivoで遺伝子改変された細胞の集団の少なくとも1個の遺伝子改変細胞のゲノム中への挿入のためのT細胞受容体（TCR）をコードする少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を含むアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターとを含む、ex vivoで遺伝子改変された細胞の集団。

【請求項9】

少なくとも1個の遺伝子改変細胞中のサイトカイン誘導性SH2含有タンパク質（CISH）タンパク質機能を抑制するCISH遺伝子中の外因性ゲノム変化およびT細胞受容

50

体（T C R）タンパク質機能を抑制するT C R遺伝子中の外因性ゲノム変化と、前記C I S H遺伝子中における、前記少なくとも1個の遺伝子改変細胞のゲノム中への挿入のためのT細胞受容体（T C R）をコードする少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を含むアデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターとを含む、ex vivoで遺伝子改変された細胞の集団。

【請求項10】

少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を細胞に導入するための系であって、ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド、およびアデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターを含み、前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドが、少なくとも1個の細胞のサイトカイン誘導性S H 2含有タンパク質（C I S H）遺伝子中に二本鎖切断を導入し、前記A A Vベクターが前記切斷において、前記細胞のゲノム中に、T細胞受容体（T C R）をコードする少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を導入し；前記系が、ミニサークルおよび前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含む同様の系と比較して、前記ゲノム中への前記トランス遺伝子のより高い導入効率を有し、より低い細胞毒性をもたらし、前記ミニサークルが前記ゲノム中に前記少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を導入する、系。10

【請求項11】

少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を細胞に導入するための系であって、ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド、およびアデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターを含み、前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドが、少なくとも1個の細胞のサイトカイン誘導性S H 2含有タンパク質（C I S H）遺伝子およびT細胞受容体（T C R）遺伝子中に二本鎖切断を導入し、前記A A Vベクターが前記切斷において、前記細胞のゲノム中に、T細胞受容体（T C R）をコードする少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を導入し；前記系が、ミニサークルおよび前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含む同様の系と比較して、前記ゲノム中への前記トランス遺伝子のより高い導入効率を有し、より低い細胞毒性をもたらし、前記ミニサークルが前記ゲノム中に前記少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を導入する、系。20

【請求項12】

がんを処置する方法であって、30

クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（C R I S P R）系を使用して、ヒト対象に由来する細胞の集団中のサイトカイン誘導性S H 2含有タンパク質（C I S H）遺伝子をex vivoで改変するステップであって、前記C R I S P R系が、前記C I S H遺伝子中に二本鎖切断を導入して、操作細胞の集団を生成する、ステップ；

アデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターを含むアデノ随伴ウイルス遺伝子送達系を使用して、前記操作細胞の集団中にがん応答性受容体を導入して、前記二本鎖切断に少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を組み込むことによって、がん応答性細胞の集団を生成するステップ；および

治療有効量の前記がん応答性細胞の集団を前記対象に投与するステップを含む、方法。40

【請求項13】

消化器がんを処置する方法であって、

クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（C R I S P R）系を使用して、ヒト対象に由来する細胞の集団中のサイトカイン誘導性S H 2含有タンパク質（C I S H）遺伝子をex vivoで改変するステップであって、前記C R I S P R系が、前記C I S H遺伝子中に二本鎖切断を導入して、操作細胞の集団を生成する、ステップ；

アデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターを含むアデノ随伴ウイルス遺伝子送達系を使用して前記操作細胞の集団中にがん応答性受容体を導入して、前記二本鎖切断に少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を組み込むことによって、がん応答性細胞の集団を生成するステップ；および

50

20

30

40

50

治療有効量の前記がん応答性細胞の集団を前記対象に投与するステップを含む、方法。

【請求項 1 4】

遺伝子改変細胞を作製する方法であって、
宿主細胞の集団を提供するステップ；
組換えアデノ随伴ウイルス(A A V)ベクターと、ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含むクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート(C R I S P R)系とを導入するステップ
を含み；前記ヌクレアーゼがサイトカイン誘導性 S H 2 含有タンパク質(C I S H)遺伝子中に切断を導入し、前記 A A V ベクターが前記切断に外因性核酸を導入し；
前記少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を組み込むための前記 A A V ベクターの使用が、同等の細胞中で前記少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を組み込むためのミニサークルベクターの使用と比較して細胞毒性を低減し；
前記外因性核酸が、前記 C R I S P R 系と対応する野生型 A A V ベクターとが導入された同等の宿主細胞の集団と比較して、より高い効率で導入される、方法。

10

【請求項 1 5】

遺伝子改変された腫瘍浸潤リンパ球(T I L)の集団を產生する方法であって、
ヒト対象に由来する T I L の集団を提供するステップ；
前記 T I L の集団に、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート(C R I S P R)系を ex vivo で電気穿孔するステップであって、前記 C R I S P R 系が、ガイドリボ核酸(g R N A)を含むヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含み；前記 g R N A がサイトカイン誘導性 S H 2 含有タンパク質(C I S H)遺伝子と相補的な配列を含み、前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドが、前記 T I L の集団中の少なくとも 1 個の T I L の前記 C I S H 遺伝子中に二本鎖切斷を導入し；前記ヌクレアーゼが C a s 9 であるか、または前記ポリヌクレオチドが C a s 9 をコードする、ステップ；および
前記 C R I S P R 系の電気穿孔の約 1 時間～約 4 日後に前記 T I L の集団中の前記少なくとも 1 個の T I L にアデノ随伴ウイルス(A A V)ベクターを導入して、前記二本鎖切斷中に、T 細胞受容体(T C R)をコードする少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を組み込むステップ
を含む、方法。

20

【請求項 1 6】

遺伝子改変された腫瘍浸潤リンパ球(T I L)の集団を產生する方法であって、
ヒト対象に由来する T I L の集団を提供するステップ；
前記 T I L の集団に、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート(C R I S P R)系を ex vivo で電気穿孔するステップであって、前記 C R I S P R 系が、ガイドリボ核酸(g R N A)を含むヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含み；前記 g R N A がサイトカイン誘導性 S H 2 含有タンパク質(C I S H)遺伝子と相補的な配列を含み、前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドが、前記 T I L の集団中の少なくとも 1 個の T I L の前記 C I S H 遺伝子中に二本鎖切斷を導入し；前記ヌクレアーゼが C a s 9 であるか、または前記ポリヌクレオチドが C a s 9 をコードする、ステップ；および
前記 C R I S P R 系の電気穿孔の約 1 時間～約 3 日後に前記 T I L の集団中の前記少なくとも 1 個の T I L にアデノ随伴ウイルス(A A V)ベクターを導入して、前記二本鎖切斷中に、T 細胞受容体(T C R)をコードする少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を組み込むステップ
を含む、方法。

30

【請求項 1 7】

遺伝子改変された腫瘍浸潤リンパ球(T I L)の集団を產生する方法であって、
ヒト対象に由来する T I L の集団を提供するステップ；

40

50

前記 T I L の集団に、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート (C R I S P R) 系を ex vivo で電気穿孔するステップであって、前記 C R I S P R 系が、ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドと、少なくとも 1 個のガイドリボ核酸 (g R N A) とを含み；前記少なくとも 1 個の g R N A が、サイトカイン誘導性 S H 2 含有タンパク質 (C I S H) 遺伝子と相補的な配列を含む g R N A と、T 細胞受容体 (T C R) 遺伝子と相補的な配列を含む g R N A とを含み；前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドが、前記 T I L の集団中の少なくとも 1 個の T I L の前記 C I S H 遺伝子中に第 1 の二本鎖切断を導入し、前記 T C R 遺伝子中に第 2 の二本鎖切断を導入し；前記ヌクレアーゼが C a s 9 であるか、または前記ポリヌクレオチドが C a s 9 をコードする、ステップ；および

前記 C R I S P R 系の電気穿孔の約 1 時間～約 4 日後に前記 T I L の集団中の前記少なくとも 1 個の T I L にアデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターを導入して、前記第 1 の二本鎖切断または前記第 2 の二本鎖切断の少なくとも 1 つ中に、T 細胞受容体 (T C R) をコードする少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を組み込むステップを含む、方法。

【請求項 18】

遺伝子改変細胞の集団を產生する方法であって、

ヒト対象に由来する細胞の集団を提供するステップ；

ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリペプチドと、ガイドポリ核酸とを使用してサイトカイン誘導性 S H 2 含有タンパク質 (C I S H) 遺伝子中に切断を導入することによって、細胞の前記集団中の少なくとも 1 個の細胞を ex vivo で改変するステップ；および

T 細胞受容体 (T C R) をコードする少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を含むアデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターを、細胞の前記集団中の少なくとも 1 個の細胞に導入して、前記切断において、前記少なくとも 1 個の細胞のゲノム中に前記外因性トランス遺伝子を組み込むステップ

を含み；前記少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を組み込むための前記 A A V ベクターの使用が、同等の細胞中で前記少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を組み込むためのミニサークルベクターの使用と比較して細胞毒性を低減する、方法。

【請求項 19】

遺伝子改変細胞の集団を產生する方法であって、

ヒト対象に由来する細胞の集団を提供するステップ；

少なくとも 1 個のガイドポリ核酸を含むクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート (C R I S P R) 系を細胞の前記集団に導入するステップであって、前記少なくとも 1 個のガイドポリ核酸が、細胞の前記集団内の複数の細胞中で T 細胞受容体 (T C R) 遺伝子に特異的に結合するガイドポリ核酸と、サイトカイン誘導性 S H 2 含有タンパク質 (C I S H) 遺伝子に特異的に結合するガイドポリ核酸とを含み、前記 C R I S P R 系が前記 T C R 遺伝子と前記 C I S H 遺伝子中に切断を導入することによって、前記複数の細胞中での T C R タンパク質機能と C I S H タンパク質機能とを抑制する、ステップ；および

アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターを前記複数の細胞に導入するステップであって、前記 A A V ベクターが、前記切断において、前記複数の細胞のゲノム中に、T 細胞受容体 (T C R) をコードする少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を組み込むことによって、遺伝子改変細胞の集団を產生する、ステップ

を含み；遺伝子改変細胞の前記集団中の細胞の少なくとも約 10 % が前記少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を発現する、方法。

【請求項 20】

C R I S P R 系を使用して内因性 T C R 遺伝子中に切断を導入するステップをさらに含む、請求項 1 から 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

10

20

30

40

50

請求項 1 から 3 および 1 8 から 1 9 のいずれか一項に記載の方法に従って調製された遺伝子改変細胞の集団。

【請求項 2 2】

請求項 1 5 から 1 7 のいずれか一項に記載の方法に従って調製された遺伝子改変された腫瘍浸潤リンパ球の集団。

【請求項 2 3】

前記細胞または細胞の前記集団もしくは遺伝子改変細胞の前記集団が、腫瘍浸潤リンパ球または腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の集団である、請求項 1 から 6 、 1 2 から 1 4 、および 1 8 から 1 9 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 7 から 8 のいずれか一項に記載の集団、または請求項 1 0 から 1 1 のいずれか一項に記載の系。 10

【請求項 2 4】

前記 TIL が T 細胞である、請求項 1 5 から 1 7 および 2 3 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 2 3 に記載の系、または請求項 2 3 に記載の集団。

【請求項 2 5】

前記 TIL が B 細胞である、請求項 1 5 から 1 7 および 2 3 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 2 3 に記載の系、または請求項 2 3 に記載の集団。

【請求項 2 6】

前記 TIL がナチュラルキラー (NK) 細胞である、請求項 1 5 から 1 7 および 2 3 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 2 3 に記載の系、または請求項 2 3 に記載の集団。 20

【請求項 2 7】

前記細胞または細胞の前記集団もしくは遺伝子改変細胞の前記集団が、それぞれ、初代細胞または初代細胞の集団である、請求項 1 から 6 、 1 2 から 1 4 、および 1 8 から 1 9 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 7 から 8 のいずれか一項に記載の集団、または請求項 1 0 から 1 1 のいずれか一項に記載の系。

【請求項 2 8】

前記初代細胞または初代細胞の前記集団が、初代リンパ球または初代リンパ球の集団である、請求項 2 7 に記載の方法または集団または系。

【請求項 2 9】

前記初代細胞または初代細胞の前記集団が、TIL または TIL の集団である、請求項 2 7 に記載の方法または集団または系。 30

【請求項 3 0】

前記改変が、ガイドポリ核酸を使用して改変することを含む、請求項 1 から 2 および 1 2 から 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記 C R I S P R 系が、ガイドポリ核酸を含む、請求項 1 から 2 、 4 から 6 、および 1 2 から 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記方法または前記集団または前記系が、それぞれ、ガイドポリ核酸をさらに含む、請求項 1 から 2 、および 1 2 から 1 4 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 7 から 9 のいずれか一項に記載の集団、または請求項 1 0 から 1 1 のいずれか一項に記載の系。 40

【請求項 3 3】

前記ガイドポリ核酸が、前記 C I S H 遺伝子に対する相補配列を含む、請求項 3 、 1 8 、 1 9 、および 3 0 から 3 2 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 3 2 に記載の集団、または請求項 3 2 に記載の系。

【請求項 3 4】

前記ガイドポリ核酸が、前記 T C R 遺伝子に対する相補配列を含む、請求項 3 、 1 8 、 1 9 、および 3 0 から 3 2 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 3 2 に記載の集団、または請求項 3 2 に記載の系。

【請求項 3 5】

10

20

30

40

50

前記ガイドポリ核酸が、ガイドリボ核酸(g R N A)である、請求項 3 、 18 から 19 、および 30 から 34 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 32 から 34 のいずれか一項に記載の集団、または請求項 32 から 34 のいずれか一項に記載の系。

【請求項 36】

前記ガイドポリ核酸が、ガイドデオキシリボ核酸(g D N A)である、請求項 3 、 18 から 19 、および 30 から 34 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 32 から 34 のいずれか一項に記載の集団、または請求項 32 から 34 のいずれか一項に記載の系。

【請求項 37】

前記方法が、スクレアーゼまたは前記スクレアーゼをコードするポリスクレオチドをさらに含む、請求項 1 から 6 、 12 から 13 、および 19 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 38】

前記改変が、スクレアーゼまたは前記スクレアーゼをコードするポリスクレオチドを導入することを含む、請求項 1 から 2 および 12 から 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

前記スクレアーゼまたは前記スクレアーゼをコードするポリスクレオチドが、前記 C I S H 遺伝子および / または前記 T C R 遺伝子中に切断を導入する、請求項 14 から 18 および 37 から 38 のいずれか一項に記載の方法または請求項 10 から 11 のいずれか一項に記載の系。

【請求項 40】

前記スクレアーゼまたは前記スクレアーゼをコードするポリスクレオチドが、前記 C I S H 遺伝子および / または前記 T C R 遺伝子の不活性または発現の低減を含む、請求項 1 4 から 18 および 37 から 38 のいずれか一項に記載の方法または請求項 10 から 11 のいずれか一項に記載の系。 20

【請求項 41】

前記 C R I S P R 系が、スクレアーゼまたは前記スクレアーゼをコードするポリスクレオチドを含む、請求項 3 、 12 から 13 、および 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 42】

前記スクレアーゼまたは前記スクレアーゼをコードするポリスクレオチドが、 S . p y o g e n e s の C R I S P R 系に由来する、請求項 14 から 18 および 37 から 40 のいずれか一項に記載の方法または請求項 10 から 11 のいずれか一項に記載の系。 30

【請求項 43】

前記 C R I S P R 系が、ガイドポリ核酸をさらに含む、請求項 42 に記載の方法または系。

【請求項 44】

前記スクレアーゼまたは前記スクレアーゼをコードするポリスクレオチドが、 C a s 9 および C a s 9 H i F i からなる群から選択される、請求項 14 から 18 および 37 から 43 のいずれか一項に記載の方法または請求項 10 から 11 、 39 から 40 、および 42 から 43 のいずれか一項に記載の系。

【請求項 45】

前記スクレアーゼまたは前記スクレアーゼをコードするポリスクレオチドが、 C a s 9 または C a s 9 をコードするポリスクレオチドである、請求項 44 に記載の方法または系。 40

【請求項 46】

前記スクレアーゼまたは前記スクレアーゼをコードするポリスクレオチドが、触媒的に不活性である、請求項 44 に記載の方法または系。

【請求項 47】

前記スクレアーゼまたは前記スクレアーゼをコードするポリスクレオチドが、触媒的に不活性な C a s 9 (d C a s 9) または d C a s 9 をコードするポリスクレオチドである、請求項 46 に記載の方法または系。

【請求項 48】

10

20

30

40

50

前記少なくとも1個の外因性トランス遺伝子が前記ゲノム中にランダムに挿入される、請求項1から6、および18から19のいずれか一項に記載の方法、または請求項7から9のいずれか一項に記載の集団、または請求項10から11のいずれか一項に記載の系。

【請求項49】

前記少なくとも1個の外因性トランス遺伝子が、前記ゲノムのCISH遺伝子および/またはTCR遺伝子中に挿入される、請求項49に記載の方法または集団または系。

【請求項50】

前記少なくとも1個の外因性トランス遺伝子が、前記ゲノムの前記CISH遺伝子中に挿入される、請求項1から4、6、12、14、18、19、および49のいずれか一項に記載の方法、または請求項7、9、および49のいずれか一項に記載の集団、または請求項10、11、および49のいずれか一項に記載の系。
10

【請求項51】

前記少なくとも1個の外因性トランス遺伝子が、前記ゲノムの前記CISH遺伝子中に挿入されない、請求項1から4、6、12、14、18、19、および49のいずれか一項に記載の方法、または請求項7、9、および49のいずれか一項に記載の集団、または請求項10、11、および49のいずれか一項に記載の系。

【請求項52】

前記少なくとも1個の外因性トランス遺伝子が、前記ゲノムの前記CISH遺伝子中の切斷に挿入される、請求項1から4、6、12、14、18、19、49、および50のいずれか一項に記載の方法、または請求項7、9、51から54、および50のいずれか一項に記載の集団、または請求項10、12、49、および50のいずれか一項に記載の系。
20

【請求項53】

前記外因性トランス遺伝子が、TCR遺伝子中に挿入される、請求項1から4、6、12、14、18、19、および49のいずれか一項に記載の方法、または請求項7、9、および49のいずれか一項に記載の集団、または請求項10、11、および49のいずれか一項に記載の系。

【請求項54】

前記外因性トランス遺伝子が、前記TCR遺伝子中に挿入される、請求項5、6、13、19、および49のいずれか一項に記載の方法、または請求項8、9、および49のいずれか一項に記載の集団、または請求項11および49のいずれか一項に記載の系。
30

【請求項55】

前記少なくとも1個の外因性トランス遺伝子が、CISH遺伝子へと、ランダムに、かつ/または部位特異的に挿入される、請求項1から6および18から19のいずれか一項に記載の方法、または請求項7から9のいずれか一項に記載の集団、または請求項10から11のいずれか一項に記載の系。

【請求項56】

前記外因性トランス遺伝子が、前記CISH遺伝子および/または前記TCR遺伝子中の切斷と相補的な操作部位で挟まれる、請求項49に記載の方法または集団または系。

【請求項57】

細胞の前記集団または遺伝子改变細胞の前記集団または遺伝子改变されたTILの前記集団中の細胞の少なくとも約15%、または少なくとも約20%、または少なくとも約25%、または少なくとも約30%、または少なくとも約35%、または少なくとも約40%、または少なくとも約45%、または少なくとも約50%、または少なくとも約55%、または少なくとも約60%、または少なくとも約65%、または少なくとも約70%、または少なくとも約75%、または少なくとも約80%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%が、前記少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を含む、請求項1から6、12から13、15から17、および18から19のいずれか一項に記載の方法、または請求項7から8のいずれか一項に記載の集団。
40
50

【請求項 5 8】

遺伝子改变細胞の前記集団または腫瘍浸潤リンパ球の前記集団が、蛍光活性化細胞分取(F A C S)によって測定された場合、前記 A A V ベクターの導入後、約 4 日で少なくとも約 9 2 % の細胞生存率を含む、請求項 1 から 6 、 1 2 から 1 3 、および 1 5 から 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 9】

遺伝子改变細胞の前記集団が、蛍光活性化細胞分取(F A C S)によって測定された場合、前記組換え A A V ベクターの導入後、約 4 日で少なくとも約 9 2 % の細胞生存率を含む、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 6 0】

遺伝子改变細胞の前記集団または腫瘍浸潤リンパ球の前記集団が、蛍光活性化細胞分取(F A C S)によって測定された場合、前記 A A V ベクターの導入後、少なくとも約 9 0 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、 9 9 . 5 % 、または 1 0 0 % の細胞生存率を含む、請求項 1 から 6 、 1 2 から 1 3 、および 1 5 から 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 6 1】

細胞生存率が、前記 A A V ベクターの導入後、約 4 時間、 6 時間、 1 0 時間、 1 2 時間、 1 8 時間、 2 4 時間、 3 6 時間、 4 8 時間、 6 0 時間、 7 2 時間、 8 4 時間、 9 6 時間、 1 0 8 時間、 1 2 0 時間、 1 3 2 時間、 1 4 4 時間、 1 5 6 時間、 1 6 8 時間、 1 8 0 時間、 1 9 2 時間、 2 0 4 時間、 2 1 6 時間、 2 2 8 時間、 2 4 0 時間で、または 2 4 0 時間よりも後に測定される、請求項 6 0 に記載の方法。

20

【請求項 6 2】

前記細胞生存率が、前記 A A V ベクターの導入後、約 1 日、 2 日、 3 日、 4 日、 5 日、 6 日、 7 日、 8 日、 9 日、 1 0 日、 1 1 日、 1 2 日、 1 3 日、 1 4 日、 1 5 日、 1 6 日、 1 7 日、 1 8 日、 1 9 日、 2 0 日、 2 1 日、 2 2 日、 2 3 日、 2 4 日、 2 5 日、 2 6 日、 2 7 日、 2 8 日、 2 9 日、 3 0 日、 3 1 日、 4 5 日、 5 0 日、 6 0 日、 7 0 日、 9 0 日で、または 9 0 日よりも後に測定される、請求項 6 0 に記載の方法。

30

【請求項 6 3】

前記 A A V ベクターが対応する非修飾または野生型 A A V ベクターと比較して細胞毒性を低下させる、請求項 1 から 6 、 1 2 から 1 3 、および 1 5 から 1 9 のいずれか一項に記載の方法または請求項 7 から 9 のいずれか一項に記載の集団または請求項 1 0 から 1 1 のいずれか一項に記載の系。

【請求項 6 4】

治療有効量の請求項 7 から 9 および 2 1 から 2 3 のいずれか一項に記載の集団を投与するステップを含む、がんを処置する方法。

30

【請求項 6 5】

前記治療有効量の前記集団が、それぞれ、対応する非修飾もしくは野生型 A A V ベクターまたはミニサークルからもたらされる同じ治療効果を提供するのに必要とされる細胞数と比較して、より少數の細胞数を含む、請求項 6 4 に記載の方法。

40

【請求項 6 6】

前記方法または系が電気穿孔またはヌクレオフェクションを含む、請求項 1 から 6 、 1 2 から 1 4 、および 1 8 から 1 9 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 1 0 から 1 1 のいずれか一項に記載の系。

【請求項 6 7】

前記 A A V ベクターが、細胞 1 つ当たり約 $1 \times 1 0 ^ 5$ 、 $2 \times 1 0 ^ 5$ 、 $3 \times 1 0 ^ 5$ 、 $4 \times 1 0 ^ 5$ 、 $5 \times 1 0 ^ 5$ 、 $6 \times 1 0 ^ 5$ 、 $7 \times 1 0 ^ 5$ 、 $8 \times 1 0 ^ 5$ 、 $9 \times 1 0 ^ 5$ 、 $1 \times 1 0 ^ 6$ 、 $2 \times 1 0 ^ 6$ 、 $3 \times 1 0 ^ 6$ 、 $4 \times 1 0 ^ 6$ 、 $5 \times 1 0 ^ 6$ 、 $6 \times 1 0 ^ 6$ 、 $7 \times 1 0 ^ 6$ 、 $8 \times 1 0 ^ 6$ 、 $9 \times 1 0 ^ 6$ 、 $1 \times 1 0 ^ 7$ 、 $2 \times 1 0 ^ 7$ 、 $3 \times 1 0 ^ 7$ 、または最大で約 $9 \times 1 0 ^ 9$ 個のゲノムコピー / ウィルス粒子の感染多重度(M O I)で導入される、請求項 1 から 6 、 1 2 から 1 3 、および 1 5 から 1 9 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 1 0 から 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

50

1のいずれか一項に記載の系。

【請求項 6 8】

前記野生型 AAV ベクターが、細胞 1 つ当たり約 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、または最大で約 9×10^9 個のゲノムコピー／ウイルス粒子の感染多度（MOI）で導入される、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記 AAV ベクターが、前記 C R I S P R または前記ヌクレアーゼもしくは前記ヌクレアーゼをコードするポリ核酸の導入後、1～3 時間、3～6 時間、6～9 時間、9～12 時間、12～15 時間、15～18 時間、18～21 時間、21～23 時間、23～26 時間、26～29 時間、29～31 時間、31～33 時間、33～35 時間、35～37 時間、37～39 時間、39～41 時間、2 日、3 日、4 日、5 日、6 日、7 日、8 日、9 日、10 日、14 日、16 日、20 日で、または 20 日よりも後に前記細胞に導入される、請求項 3、12 から 18、19、37 から 38、および 41 から 44 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 10 から 11 および 42 から 44 のいずれか一項に記載の系。

【請求項 7 0】

前記 AAV ベクターが、前記 C R I S P R 系または前記ヌクレアーゼもしくは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドの導入の 15～18 時間後に前記細胞に導入される、請求項 6 9 に記載の方法または系。

【請求項 7 1】

前記 AAV ベクターが、前記 C R I S P R 系または前記ヌクレアーゼもしくは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドの導入の 16 時間後に前記細胞に導入される、請求項 7 0 に記載の方法または系。

【請求項 7 2】

前記 AAV ベクターによる前記少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子の組込みが、ミニサークルベクターまたは対応する非修飾もしくは野生型 AAV ベクターによる同等の細胞集団中の細胞への前記少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子の組込みと比較して細胞毒性を低減する、請求項 1 から 6、12 から 13、15 から 19 のいずれか一項に記載の方法または請求項 10 から 11 のいずれか一項に記載の系。

【請求項 7 3】

前記毒性がフローサイトメトリーによって測定される、請求項 7 2 に記載の方法または系。

【請求項 7 4】

前記毒性が、約 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または 100% 低減する、請求項 7 2 に記載の方法または系。

【請求項 7 5】

前記毒性が、前記 AAV ベクターまたは前記対応する非修飾もしくは野生型 AAV ベクターまたは前記ミニサークルの導入後、約 4 時間、6 時間、8 時間、12 時間、24 時間、36 時間、48 時間、60 時間、72 時間、84 時間、96 時間、108 時間、120 時間、132 時間、144 時間、156 時間、168 時間、180 時間、192 時間、204 時間、216 時間、228 時間、240 時間で、または 240 時間よりも後に測定される、請求項 7 2 に記載の方法または系。

【請求項 7 6】

前記毒性が、前記 AAV ベクターまたは前記対応する非修飾もしくは野生型 AAV ベクターまたは前記ミニサークルの導入後、約 1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、6 日、7 日、8 日、9 日、10 日、11 日、12 日、13 日、14 日、15 日、16 日、17 日、18 日、19 日、20 日、21 日、22 日、23 日、24 日、25 日、26 日、27 日、28

10

20

30

40

50

日、29日、30日、31日、45日、50日、60日、70日、90日で、または90日よりも後に測定される、請求項72に記載の方法または系。

【請求項77】

遺伝子改変細胞の前記集団の少なくとも約15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または最大で100%が、前記ゲノムのCISH遺伝子中の切断に前記少なくとも1個の外因性トランス遺伝子の組込みを含む、請求項7から9および52のいずれか一項に記載の集団。

【請求項78】

遺伝子改変細胞の前記集団の少なくとも約15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または最大で100%が、前記ゲノムのTCR遺伝子中の切断に前記少なくとも1個の外因性トランス遺伝子の組込みを含む、請求項7から9および52のいずれか一項に記載の集団。

【請求項79】

少なくとも1個の細胞へのAAVベクターの前記導入が、前記切断を含む細胞へのAAVベクターの導入を含む、請求項1から2および18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項80】

前記TILが自家である、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

本出願は、2016年10月27日出願の米国仮出願第62/413,814号および2017年1月30日出願の米国仮出願第62/452,081号の利益を主張し、当該出願の各々は、全ての目的について全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

背景

過去50年間における、がん治療法における目覚ましい進歩にも拘らず、特に、進行した病期において、化学療法、放射線療法、または生物療法に対して抵抗性であり、外科法により対処できない多くの腫瘍型が依然として存在する。近年、腫瘍上の分子標的を *in vivo* で認識するリンパ球の遺伝子操作が著しく進歩した結果として、標的腫瘍対応の目覚ましい症例がもたらされている。しかし、これらの成功は、主に、造血系腫瘍に限定されており、特定の腫瘍内の細胞が発現する、同定可能な分子の欠如、および腫瘍破壊を媒介するために、腫瘍標的に特異的に結合するのに使用され得る分子の欠如により、固形腫瘍へのより広範な適用は、限定的である。近年におけるいくつかの進歩は、場合によって、抗腫瘍T細胞応答を誘発する、腫瘍特異的変異の同定に焦点を当てている。例えば、これらの内因性変異は、全エクソーム・シーケンシング法を使用して同定することができる (Tran Eら、「Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer」、*Science*、344巻：641～644頁(2014年))。

参照による組込み

本明細書における全ての刊行物、特許、および特許出願は、各個別の刊行物、特許、および特許出願が、参照により組み込まれるように、具体的かつ個別に指示された場合と同じ程度に、参照により組み込まれる。万一、本明細書の用語と、組み込まれる参考文献の用語との間で齟齬が生じた場合は、本明細書の用語が優先される。

【先行技術文献】

【非特許文献】

10

20

30

40

50

【0003】

【非特許文献1】Tran Eら、「Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer」、Science、344巻：641～644頁（2014年）

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本明細書では、遺伝子改変細胞の集団を产生する方法であって、ヒト対象に由来する細胞の集団を提供するステップ；クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（C R I S P R）系を使用してサイトカイン誘導性S H 2含有タンパク質（C I S H）遺伝子中に切断を導入することによって細胞の前記集団中の少なくとも1個の細胞を、e x v i v oで改変するステップ；およびT細胞受容体（T C R）をコードする少なくとも1個の外因性トランスクレッセンス遺伝子を含むアデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターを、細胞の前記集団中の少なくとも1個の細胞に導入して、前記外因性トランスクレッセンス遺伝子を、前記切断において、前記少なくとも1個の細胞のゲノム中に組み込むステップを含み；前記少なくとも1個の外因性トランスクレッセンス遺伝子を組み込むための前記A A Vベクターの使用が、前記少なくとも1個の外因性トランスクレッセンス遺伝子を同等の細胞に組み込むためのミニサークルベクターの使用と比較して細胞毒性を低減する、方法が開示される。

10

【0005】

本明細書では、遺伝子改変細胞の集団を产生する方法であって、ヒト対象に由来する細胞の集団を提供するステップ；クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（C R I S P R）系を使用してサイトカイン誘導性S H 2含有タンパク質（C I S H）遺伝子中に切断を導入することによって細胞の前記集団中の少なくとも1個の細胞を、e x v i v oで改変するステップ；およびT細胞受容体（T C R）をコードする少なくとも1個の外因性トランスクレッセンス遺伝子を含むアデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターを、細胞の前記集団中の少なくとも1個の細胞に導入して、前記外因性トランスクレッセンス遺伝子を、前記切断において、前記少なくとも1個の細胞のゲノム中に組み込むステップを含み；細胞の前記集団が、前記A A Vベクターを導入した約4日後に、蛍光活性化細胞分取（F A C S）によって測定された場合、少なくとも約90%の生細胞を含む、方法が開示される。

20

30

【0006】

本明細書では、遺伝子改変細胞の集団を产生する方法であって、ヒト対象に由来する細胞の集団を提供するステップ；ガイドポリ核酸を含むクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（C R I S P R）系を細胞の前記集団に導入するステップであって、前記ガイドポリ核酸が細胞の前記集団内の複数の細胞中のサイトカイン誘導性S H 2含有タンパク質（C I S H）遺伝子に特異的に結合し、前記C R I S P R系が前記C I S H遺伝子中に切断を導入することによって、前記複数の細胞中でC I S Hタンパク質機能を抑制する、ステップ；およびアデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターを前記複数の細胞に導入することによって、遺伝子改変細胞の集団を产生するステップであって、前記A A Vベクターが、T細胞受容体（T C R）をコードする少なくとも1個の外因性トランスクレッセンス遺伝子を、前記切断において、前記複数の細胞のゲノム中に組み込む、ステップを含み；遺伝子改変細胞の前記集団中の細胞の少なくとも約10%が、前記少なくとも1個の外因性トランスクレッセンス遺伝子を発現する、方法が開示される。

40

【0007】

本明細書では、ヒト対象におけるがんを処置する方法であって、治療有効量のe x v i v oで遺伝子改変された細胞の集団を投与するステップを含み、前記e x v i v oで遺伝子改変された細胞の少なくとも1個が、前記少なくとも1個のe x v i v oで遺伝子改変された細胞中のサイトカイン誘導性S H 2含有タンパク質（C I S H）機能の抑制をもたらす、C I S H遺伝子中のゲノム変化を含み、前記ゲノム変化がクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（C R I S P R）系によって誘導され；前記少な

50

くとも 1 個の *e x v i v o* で遺伝子改変された細胞が、T 細胞受容体 (T C R) をコードする外因性トランス遺伝子をさらに含み、前記外因性トランス遺伝子が、アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターによって、前記 C I S H 遺伝子中において、前記少なくとも 1 個の遺伝子改変細胞のゲノム中に導入され；前記投与が、前記ヒト対象におけるがんを処置するか、またはがんの少なくとも 1 つの症状を改善する、方法が開示される。

【 0 0 0 8 】

本明細書では、ヒト対象における消化器がんを処置する方法であって、治療有効量の *e x v i v o* で遺伝子改変された細胞の集団を投与するステップを含み、前記 *e x v i v o* で遺伝子改変された細胞の少なくとも 1 個が、前記少なくとも 1 個の *e x v i v o* で遺伝子改変された細胞中のサイトカイン誘導性 S H 2 含有タンパク質 (C I S H) 機能の抑制をもたらす、C I S H 遺伝子中のゲノム変化を含み、前記ゲノム変化がクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート (C R I S P R) 系によって誘導され；前記少なくとも 1 個の *e x v i v o* で遺伝子改変された細胞が、T 細胞受容体 (T C R) をコードする外因性トランス遺伝子をさらに含み、前記外因性トランス遺伝子が、アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターによって、前記 C I S H 遺伝子中において、前記少なくとも 1 個の遺伝子改変細胞のゲノム中に導入され；前記投与が、前記ヒト対象におけるがんを処置するか、またはがんの少なくとも 1 つの症状を改善する、方法が開示される。

10

【 0 0 0 9 】

本明細書では、ヒト対象におけるがんを処置する方法であって、治療有効量の *e x v i v o* で遺伝子改変された細胞の集団を投与するステップを含み、前記 *e x v i v o* で遺伝子改変された細胞の少なくとも 1 個が、前記少なくとも 1 個の *e x v i v o* で遺伝子改変された細胞中の T 細胞受容体 (T C R) タンパク質機能の抑制をもたらす、T C R 遺伝子中のゲノム変化、および前記少なくとも 1 個の *e x v i v o* で遺伝子改変された細胞中のサイトカイン誘導性 S H 2 含有タンパク質 (C I S H) 機能の抑制をもたらす、C I S H 遺伝子中のゲノム変化を含み、前記ゲノム変化がクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート (C R I S P R) 系によって誘導され；前記少なくとも 1 個の *e x v i v o* で遺伝子改変された細胞が、T 細胞受容体 (T C R) をコードする外因性トランス遺伝子をさらに含み、前記外因性トランス遺伝子が、アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターによって、前記 C I S H 遺伝子中において、前記少なくとも 1 個の遺伝子改変細胞のゲノム中に導入され；前記投与が、前記ヒト対象におけるがんを処置するか、またはがんの少なくとも 1 つの症状を改善する、方法が開示される。

20

【 0 0 1 0 】

本明細書では、少なくとも 1 個の遺伝子改変細胞中のサイトカイン誘導性 S H 2 含有タンパク質 (C I S H) 機能を抑制する C I S H 遺伝子中の外因性ゲノム変化と、前記 C I S H 遺伝子中における、前記少なくとも 1 個の遺伝子改変細胞のゲノム中への挿入のための T 細胞受容体 (T C R) をコードする少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を含むアデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターとを含む、*e x v i v o* で遺伝子改変された細胞の集団が開示される。

30

【 0 0 1 1 】

本明細書では、*e x v i v o* で遺伝子改変された細胞の集団の少なくとも 1 個の遺伝子改変細胞中のサイトカイン誘導性 S H 2 含有タンパク質 (C I S H) 機能を抑制する C I S H 遺伝子中の外因性ゲノム変化と、前記 C I S H 遺伝子中における、前記 *e x v i v o* で遺伝子改変された細胞の集団の少なくとも 1 個の遺伝子改変細胞のゲノム中への挿入のための T 細胞受容体 (T C R) をコードする少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を含むアデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターとを含む、*e x v i v o* で遺伝子改変された細胞の集団が開示される。

40

【 0 0 1 2 】

本明細書では、少なくとも 1 個の遺伝子改変細胞中のサイトカイン誘導性 S H 2 含有タンパク質 (C I S H) 機能を抑制する C I S H 遺伝子中の外因性ゲノム変化および T 細胞受容体 (T C R) タンパク質機能を抑制する T C R 遺伝子中の外因性ゲノム変化と、前記

50

C I S H 遺伝子中における、前記少なくとも 1 個の遺伝子改変細胞のゲノム中への挿入のための T 細胞受容体 (T C R) をコードする少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を含むアデノ隨伴ウイルス (A A V) ベクターとを含む、 ex vivo で遺伝子改変された細胞の集団が開示される。

【 0 0 1 3 】

本明細書では、少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を細胞に導入するための系であって、ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド、およびアデノ隨伴ウイルス (A A V) ベクターを含み、前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドが、少なくとも 1 個の細胞のサイトカイン誘導性 S H 2 含有タンパク質 (C I S H) 遺伝子中に二本鎖切断を導入し、前記 A A V ベクターが前記切斷において、前記細胞のゲノム中に、T 細胞受容体 (T C R) をコードする少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を導入し；前記系が、ミニサークルおよび前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含む同様の系と比較して、前記ゲノム中への前記トランス遺伝子のより高い導入効率を有し、より低い細胞毒性をもたらし、前記ミニサークルが前記ゲノム中に前記少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を導入する、系が開示される。
10

【 0 0 1 4 】

本明細書では、少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を細胞に導入するための系であって、ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド、およびアデノ隨伴ウイルス (A A V) ベクターを含み、前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドが、少なくとも 1 個の細胞のサイトカイン誘導性 S H 2 含有タンパク質 (C I S H) 遺伝子および T 細胞受容体 (T C R) 遺伝子中に二本鎖切断を導入し、前記 A A V ベクターが前記切斷において、前記細胞のゲノム中に、T 細胞受容体 (T C R) をコードする少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を導入し；前記系が、ミニサークルおよび前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含む同様の系と比較して、前記ゲノム中への前記トランス遺伝子のより高い導入効率を有し、より低い細胞毒性をもたらし、前記ミニサークルが前記ゲノム中に前記少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を導入する、系が開示される。
20

【 0 0 1 5 】

本明細書では、がんを処置する方法であって、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート (C R I S P R) 系を使用してヒト対象に由来する細胞の集団中の C I S H 遺伝子を ex vivo で改変するステップであって、前記 C R I S P R 系が、サイトカイン誘導性 S H 2 含有タンパク質 (C I S H) 遺伝子中に二本鎖切断を導入して、操作細胞の集団を生成する、ステップ；アデノ隨伴ウイルス (A A V) ベクターを含むアデノ隨伴ウイルス遺伝子送達系を使用して前記操作細胞の集団中にがん応答性受容体を導入して、前記二本鎖切斷に少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を組み込むことによって、がん応答性細胞の集団を生成するステップ；および治療有効量の前記がん応答性細胞の集団を前記対象に投与するステップを含む、方法が開示される。
30

【 0 0 1 6 】

本明細書では、消化器がんを処置する方法であって、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート (C R I S P R) 系を使用してヒト対象に由来する細胞の集団中の C I S H 遺伝子を ex vivo で改変するステップであって、前記 C R I S P R 系が、サイトカイン誘導性 S H 2 含有タンパク質 (C I S H) 遺伝子中に二本鎖切断を導入して、操作細胞の集団を生成する、ステップ；アデノ隨伴ウイルス (A A V) ベクターを含むアデノ隨伴ウイルス遺伝子送達系を使用して前記操作細胞の集団中にがん応答性受容体を導入して、前記二本鎖切斷に少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を組み込むことによって、がん応答性細胞の集団を生成するステップ；および治療有効量の前記がん応答性細胞の集団を前記対象に投与するステップを含む、方法が開示される。
40

【 0 0 1 7 】

本明細書では、遺伝子改変細胞を作製する方法であって、宿主細胞の集団を提供するス

10

20

30

40

50

ステップ；組換えアデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターと、ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含むクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（C R I S P R）系とを導入するステップを含み；前記ヌクレアーゼがサイトカイン誘導性S H 2含有タンパク質（C I S H）遺伝子中に切断を導入し、前記A A Vベクターが前記切斷に外因性核酸を導入し；前記少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を組み込むための前記A A Vベクターの使用が、同等の細胞中で前記少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を組み込むためのミニサークルベクターの使用と比較して細胞毒性を低減し；前記外因性核酸が、前記C R I S P R系と対応する野生型A A Vベクターとが導入された同等の宿主細胞の集団と比較して、より高い効率で導入される、方法が開示される。

10

【0018】

本明細書では、遺伝子改変された腫瘍浸潤リンパ球（T I L）の集団を产生する方法であって、ヒト対象に由来するT I Lの集団を提供するステップ；前記T I Lの集団に、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（C R I S P R）系をex vivoで電気穿孔するステップであって、前記C R I S P R系が、ガイドリボ核酸（g RNA）を含むヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含み；前記g RNAがサイトカイン誘導性S H 2含有タンパク質（C I S H）遺伝子と相補的な配列を含み、前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドが、前記T I Lの集団中の少なくとも1個のT I Lの前記C I S H遺伝子中に二本鎖切断を導入し；前記ヌクレアーゼがCas 9であるか、または前記ポリヌクレオチドがCas 9をコードする、ステップ；および前記C R I S P R系の電気穿孔の約1時間～約4日後に前記T I Lの集団中の前記少なくとも1個のT I Lにアデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターを導入して、前記二本鎖切断中に、T細胞受容体（T C R）をコードする少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を組み込むステップを含む、方法が開示される。

20

【0019】

本明細書では、遺伝子改変された腫瘍浸潤リンパ球（T I L）の集団を产生する方法であって、ヒト対象に由来するT I Lの集団を提供するステップ；前記T I Lの集団に、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（C R I S P R）系をex vivoで電気穿孔するステップであって、前記C R I S P R系が、ガイドリボ核酸（g RNA）を含むヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含み；前記g RNAがサイトカイン誘導性S H 2含有タンパク質（C I S H）遺伝子と相補的な配列を含み、前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドが、前記T I Lの集団中の少なくとも1個のT I Lの前記C I S H遺伝子中に二本鎖切断を導入し；前記ヌクレアーゼがCas 9であるか、または前記ポリヌクレオチドがCas 9をコードする、ステップ；および前記C R I S P R系の電気穿孔の約1時間～約3日後に前記T I Lの集団中の前記少なくとも1個のT I Lにアデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターを導入して、前記二本鎖切断中に、T細胞受容体（T C R）をコードする少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を組み込むステップを含む、方法が開示される。

30

【0020】

本明細書では、遺伝子改変された腫瘍浸潤リンパ球（T I L）の集団を产生する方法であって、ヒト対象に由来するT I Lの集団を提供するステップ；前記T I Lの集団に、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（C R I S P R）系をex vivoで電気穿孔するステップであって、前記C R I S P R系が、ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドと、少なくとも1個のガイドリボ核酸（g RNA）とを含み；前記少なくとも1個のg RNAが、サイトカイン誘導性S H 2含有タンパク質（C I S H）遺伝子と相補的な配列を含むg RNAと、T細胞受容体（T C R）遺伝子と相補的な配列を含むg RNAとを含み；前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドが、前記T I Lの集団中の少なくとも1個のT I Lの前記C I S H遺伝子中に第1の二本鎖切断を導入し、前記T C R遺伝子中に第2の二本鎖切断を導入し；前記ヌクレアーゼがCas 9であるか、または前記ポリヌクレオチドがCas 9

40

50

をコードする、ステップ；および前記 C R I S P R 系の電気穿孔の約 1 時間～約 4 日後に前記 T I L の集団中の前記少なくとも 1 個の T I L にアデノ随伴ウイルス(A A V)ベクターを導入して、前記第 1 の二本鎖切断または前記第 2 の二本鎖切断の少なくとも 1 つ中に、T 細胞受容体(T C R)をコードする少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を組み込むステップを含む、方法が開示される。

【 0 0 2 1 】

本明細書では、遺伝子改変細胞の集団を產生する方法であって、ヒト対象に由来する細胞の集団を提供するステップ；ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリペプチドと、ガイドポリ核酸とを使用してサイトカイン誘導性 S H 2 含有タンパク質(C I S H)遺伝子中に切断を導入することによって、細胞の前記集団中の少なくとも 1 個の細胞を e x v i v o で改変するステップ；および T 細胞受容体(T C R)をコードする少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を含むアデノ随伴ウイルス(A A V)ベクターを、細胞の前記集団中の少なくとも 1 個の細胞に導入して、前記切断において、前記少なくとも 1 個の細胞のゲノム中に前記外因性トランス遺伝子を組み込むステップを含み；前記少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を組み込むための前記 A A V ベクターの使用が、同等の細胞中で前記少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を組み込むためのミニサークルベクターの使用と比較して細胞毒性を低減する、方法が開示される。
10

【 0 0 2 2 】

本明細書では、遺伝子改変細胞の集団を產生する方法であって、ヒト対象に由来する細胞の集団を提供するステップ；少なくとも 1 個のガイドポリ核酸を含むクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート(C R I S P R)系を細胞の前記集団に導入するステップであって、前記少なくとも 1 個のガイドポリ核酸が、細胞の前記集団内の複数の細胞中で T 細胞受容体(T C R)遺伝子に特異的に結合するガイドポリ核酸と、サイトカイン誘導性 S H 2 含有タンパク質(C I S H)遺伝子に特異的に結合するガイドポリ核酸とを含み、前記 C R I S P R 系が前記 T C R 遺伝子と前記 C I S H 遺伝子中に切断を導入することによって、前記複数の細胞中での T C R タンパク質機能と C I S H タンパク質機能とを抑制する、ステップ；およびアデノ随伴ウイルス(A A V)ベクターを前記複数の細胞に導入するステップであって、前記 A A V ベクターが、前記切断において、前記複数の細胞のゲノム中に、T 細胞受容体(T C R)をコードする少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を組み込むことによって、遺伝子改変細胞の集団を產生する、ステップを含み；遺伝子改変細胞の前記集団中の細胞の少なくとも約 10 % が前記少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を発現する、方法が開示される。
20

【 0 0 2 3 】

場合によって、本開示の方法は、C R I S P R 系を使用して内因性 T C R 遺伝子中に切断を導入するステップをさらに含み得る。場合によって、少なくとも 1 個の細胞への A A V ベクターの導入は、切断(例えば、C I S H および / または T C R 遺伝子中の切断)を含む細胞への A A V ベクターの導入を含む。
30

【 0 0 2 4 】

場合によって、本開示の方法または系は、電気穿孔および / またはヌクレオフェクションを含み得る。場合によって、本開示の方法または系は、ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリペプチドをさらに含み得る。場合によって、前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドは、C I S H 遺伝子および / または T C R 遺伝子中に切断を導入しうる。場合によって、前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドは、C I S H 遺伝子および / または T C R 遺伝子の不活性または発現の低減を含み得る。場合によって、前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドは、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート(C R I S P R)系、亜鉛フィンガー、転写アクチベーター様エフェクター(T A L E N)、および T A L リピートに対するメガヌクレアーゼ(M E G A T A L)からなる群から選択される。場合によって、前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドは、C R I S P R 系に由来する。場合によって、前記ヌクレアーゼ
40

または前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドは、S. pyogenesのCRISPR系に由来する。場合によって、CRISPR系は、ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含む。場合によって、前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドは、Cas9およびCas9HiFiからなる群から選択される。場合によって、前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドは、Cas9またはCas9をコードするポリヌクレオチドである。場合によって、前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドは、触媒的に不活性である。場合によって、前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドは、触媒的に不活性なCas9(dCas9)またはdCas9をコードするポリヌクレオチドである。

10

【0025】

場合によって、本開示の方法は、サイトカイン誘導性SH2含有タンパク質(CISH)遺伝子および/またはTCR遺伝子中に切断を導入することによって細胞の集団中の少なくとも1個の細胞をex vivoで改変するステップを含み得る(またはさらに含み得る)。場合によって、改変は、ガイドポリ核酸を使用して改変することを含む。場合によって、改変は、ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを導入することを含む。場合によって、CRISPR系は、ガイドポリ核酸を含む。場合によって、本開示の方法または系または集団は、ガイドポリ核酸をさらに含み得る。場合によって、前記ガイドポリ核酸は、前記CISH遺伝子に対する相補配列を含む。場合によって、前記ガイドポリ核酸は、前記TCR遺伝子に対する相補配列を含む。場合によって、前記ガイドポリ核酸は、ガイドリボ核酸(gRNA)である。場合によって、前記ガイドポリ核酸は、ガイドデオキシリボ核酸(gDNA)である。

20

【0026】

場合によって、細胞生存率が測定される。場合によって、細胞生存率は、蛍光活性化細胞分取(FACS)によって測定される。場合によって、遺伝子改変細胞の集団または腫瘍浸潤リンパ球の集団は、蛍光活性化細胞分取(FACS)によって測定された場合、AAVベクターの導入後に少なくとも約90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または100%の細胞生存率を含む。場合によって、細胞生存率は、AAVベクターの導入後、約4時間、6時間、10時間、12時間、18時間、24時間、36時間、48時間、60時間、72時間、84時間、96時間、108時間、120時間、132時間、144時間、156時間、168時間、180時間、192時間、204時間、216時間、228時間、240時間で、または240時間よりも後に測定される。場合によって、細胞生存率は、AAVベクターの導入後、約1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、31日、45日、50日、60日、70日、90日で、または90日よりも後に測定される。場合によって、遺伝子改変細胞の集団または腫瘍浸潤リンパ球の集団は、蛍光活性化細胞分取(FACS)によって測定された場合、AAVベクターの導入後約4日で、少なくとも約92%の細胞生存率を含み得る。場合によって、遺伝子改変細胞の集団は、蛍光活性化細胞分取(FACS)によって測定された場合、組換えAAVベクターの導入後約4日で、少なくとも約92%の細胞生存率を含み得る。

30

【0027】

場合によって、AAVベクターは、対応する非修飾または野生型AAVベクターと比較して細胞毒性を低減する。場合によって、細胞毒性が測定される。場合によって、毒性は、フローサイトメトリーによって測定される。場合によって、AAVベクターを使用する少なくとも1個の外因性トランス遺伝子の組込みは、ミニサークルまたは対応する非修飾もしくは野生型AAVベクターを使用する同等の細胞の集団中への前記少なくとも1個の外因性トランス遺伝子の組込みと比較して細胞毒性を低減する。場合によって、毒性は、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または

40

50

100%低減する。場合によって、毒性は、前記AAVベクターまたは前記対応する非修飾もしくは野生型AAVベクターまたは前記ミニサークルベクターの導入後、約4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、36時間、48時間、60時間、72時間、84時間、96時間、108時間、120時間、132時間、144時間、156時間、168時間、180時間、192時間、204時間、216時間、228時間、240時間で、または240時間よりも後に測定される。場合によって、毒性は、前記AAVベクターまたは前記対応する非修飾もしくは野生型AAVベクターまたは前記ミニサークルの導入後、約1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、31日、45日、50日、60日、70日、90日で、または90日よりも後に測定される。
10

【0028】

場合によって、遺伝子改変細胞の集団の少なくとも約15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または最大で100%が、細胞のゲノムのCISH遺伝子中の切断において、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子の組込みを含む。場合によって、遺伝子改変細胞の集団の少なくとも約15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または最大で100%が、細胞のゲノムのTCR遺伝子中の切断において、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子の組込みを含む。
20

【0029】

場合によって、遺伝子改変細胞の集団および/または遺伝子改変された腫瘍浸潤リンパ球の集団を、本開示の方法に従って調製することができる。場合によって、細胞または細胞の集団または遺伝子改変細胞の集団は、腫瘍浸潤リンパ球または腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団であり得る。場合によって、細胞の集団または遺伝子改変細胞の集団は、それぞれ、初代細胞または初代細胞の集団である。場合によって、初代細胞または初代細胞の集団は、初代リンパ球または初代リンパ球の集団である。場合によって、初代細胞または初代細胞の集団は、TILまたはTILの集団である。場合によって、TILは自家細胞である。場合によって、TILはナチュラルキラー(NK)細胞である。場合によって、TILはB細胞である。場合によって、TILはT細胞である。
30

【0030】

場合によって、AAVベクターは、細胞1つ当たり約 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、または最大で約 9×10^9 個のゲノムコピー/ウイルス粒子の感染多密度(MOI)で導入される。場合によって、野生型AAVベクターは、細胞1つ当たり約 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、または最大で約 9×10^9 個のゲノムコピー/ウイルス粒子の感染多密度(MOI)で導入される。場合によって、AAVベクターは、前記CRISPRまたは前記ヌクレアーゼもしくは前記ヌクレアーゼをコードするポリ核酸の導入後、1~3時間、3~6時間、6~9時間、9~12時間、12~15時間、15~18時間、18~21時間、21~23時間、23~26時間、26~29時間、29~31時間、31~33時間、33~35時間、35~37時間、37~39時間、39~41時間、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、14日、16日、20日で、または20日よりも後に前記細胞に導入される。場合によって、AAVベクターは、CRISPR系またはヌクレアーゼもしくは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドの導入の15~18時間後に細胞に導入される。場合によって、AAVベクターは、CRISPR系またはヌクレアーゼもしくは前記ヌク
40

レーザをコードするポリヌクレオチドの導入の 16 時間後に細胞に導入される。

【0031】

場合によって、少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子（例えば、T C R をコードする外因性トランス遺伝子）は、ゲノム中にランダムに挿入される。場合によって、少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子は、ゲノムの C I S H 遺伝子および / または T C R 遺伝子中に挿入される。場合によって、少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子は、ゲノムの C I S H 遺伝子中に挿入される。場合によって、少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子は、ゲノムの C I S H 遺伝子中に挿入されない。場合によって、少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子は、ゲノムの C I S H 遺伝子中の切断に挿入される。場合によって、トランス遺伝子（例えば、T C R をコードする少なくとも 1 個のトランス遺伝子）は、T C R 遺伝子中に挿入される。場合によって、少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子は、C I S H 遺伝子へと、ランダムに、かつ / または部位特異的に挿入される。場合によって、少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子は、C I S H 遺伝子および / または T C R 遺伝子中の切断と相補的な操作部位で挟まれる。場合によって、細胞の集団または遺伝子改変細胞の集団または遺伝子改変された T I L の集団中の細胞の少なくとも約 15%、または少なくとも約 20%、または少なくとも約 25%、または少なくとも約 30%、または少なくとも約 35%、または少なくとも約 40%、または少なくとも約 45%、または少なくとも約 50%、または少なくとも約 55%、または少なくとも約 60%、または少なくとも約 65%、または少なくとも約 70%、または少なくとも約 75%、または少なくとも約 80%、または少なくとも約 85%、または少なくとも約 90%、または少なくとも約 95%、または少なくとも約 97%、または少なくとも約 98%、または少なくとも約 99% が、少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を含む。10

【0032】

場合によって、がんを処置する方法は、治療有効量の本開示の細胞の集団を投与するステップを含み得る。場合によって、治療有効量の細胞の集団は、それぞれ、対応する非修飾もしくは野生型 A A V ベクターまたはミニサークルからもたらされる同じ治療効果を提供するのに必要とされる細胞数と比較して、より少数の細胞を含み得る。20

【0033】

本発明の新規の特色は、付属の特許請求の範囲において詳細に明示される。本発明の原理が用いられる例示的な事例と、付属の図面とを明示する、以下の詳細な記載を参照することにより、本発明の特色および利点のよりよい理解が得られるであろう。30

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図 1】図 1 は、in vitro アッセイ（例えば全エクソームシーケンシング）を使用して、がん患者から得られた試料に由来するがん関連標的配列、例えば、ネオ抗原を同定し得る方法の例を示す。方法は、標的配列を認識する第 1 の T 細胞に由来する T C R トランス遺伝子をさらに同定することができる。がん関連標的配列および T C R トランス遺伝子は、同じ患者の試料から得ることもでき、または異なる患者の試料から得ることもできる。方法は、T C R トランス遺伝子を含む核酸を、第 2 の T 細胞の膜を超えて、効果的かつ効率的に送達することができる。いくつかの場合には、第 1 および第 2 の T 細胞は、同じ患者から得ることができる。他の場合には、第 1 および第 2 の T 細胞は、異なる患者から得ることができる。他の場合には、第 1 および第 2 の T 細胞は、異なる患者から得ることができる。方法は、非ウイルス性組込み系（例えば、C R I S P R、T A L E N、トランスポゾンベース、Z E N、メガヌクレアーゼ、または M e g a - T A L ）を使用して、T C R トランス遺伝子を安全かつ効率的に T 細胞のゲノムへと組み込んで操作 T 細胞を生成することができ、したがって、T C R トランス遺伝子は、操作 T 細胞内で、信頼できる形で発現され得る。操作 T 細胞は、免疫学的効力および抗腫瘍効力を維持する状態で増殖させ、拡大することができ、がんを処置するために患者にさらに投与することができる。40

【0035】

10

20

30

40

50

【図2】図2は、T C Rトランス遺伝子の組込みおよびT C R発現のためのいくつかの例示的なトランスポゾン構築物を示す。

【0036】

【図3】図3は、in vitroにおけるmRNAの転写、および任意の細胞型（例えば、初代細胞、細胞株など）内で、相同組換（HR）基質を作製するための鋸型としてのその使用を示す。ウイルスカセットの、in vitroにおける転写のために、ウイルスゲノムの5'LTR領域の上流に、T7、T3、または他の転写開始配列を置くことができる。ウイルスベクターのセンス鎖およびアンチセンス鎖の両方をコードするmRNAを使用して、収率を改善することができる。

10

【0037】

【図4】図4は、Cas9ヌクレアーゼプラスミド、Hprt gRNAプラスミド、Amaxa EGFPmaxプラスミド、およびHprt標的ベクターを含む、4つのプラスミドの構造を示す。

【0038】

【図5】図5は、0.5kbのターゲティングアームを含む例示的なHprt標的ベクターを示す。

【0039】

【図6】図6は、例示的な遺伝子（例えば、Hprt遺伝子）をターゲティングする、3つの潜在的なT C Rトランス遺伝子ノックインデザインを示す。（1）外因性プロモーター：外因性プロモーター（「プロモーター」）により転写されるT C Rトランス遺伝子（「T C R」）；（2）SAインフレーム転写：スプライシングを介して内因性プロモーター（矢印により示される）により転写されるT C Rトランス遺伝子；および（3）融合体インフレーム翻訳：インフレーム翻訳を介して内因性プロモーターにより転写されるT C Rトランス遺伝子。3つの例示的なデザイン全てが、遺伝子機能をノックアウトし得る。例えば、Hprt遺伝子またはPd-1遺伝子を、T C Rトランス遺伝子の挿入によりノックアウトする場合、6-チオグアニン（thioguanine）選択を、選択アッセイとして使用することができる。

20

【0040】

【図7】図7は、Cas9 + gRNA + 標的プラスミドの共トランスフェクションが、バルク集団内で、良好なトランスフェクション効率をもたらしたことを示す。

30

【0041】

【図8】図8は、CD3+ T細胞についての、EGFP FACS解析の結果を示す。

【0042】

【図9】図9は、T細胞受容体の2つの種類を示す。

【0043】

【図10】図10は、2つのプラットフォームを使用する、T細胞トランスフェクション効率の達成を示す。

【0044】

【図11】図11は、T細胞数をスケールアップした場合、例えば、T細胞数を増大させた場合の、効率的トランスフェクションを示す。

40

【0045】

【図12】図12は、潜在的な標的部位において、CRISPR gRNAにより生じる遺伝子改変の%を示す。

【0046】

【図13】図13は、刺激T細胞内のCRISPR誘導性DSBを示す。

【0047】

【図14】図14は、RNA送達の最適化を示す。

【0048】

【図15】図15は、標的部位における二本鎖切断を示す。遺伝子ターゲティングは、ターゲティングされるCRISPR-Cas系を導入する前に、抗CD3および抗CD28

50

で活性化させたT細胞内の、二本鎖切断の誘導に成功した。例示を目的として述べると、免疫チェックポイント遺伝子である、PD-1、CCR5、およびCTLA4を使用して、系を検証した。

【0049】

【図16】図16は、CCR5におけるTCRの組込みを表したものと示す。CCR5に対する1kbの組換えアームを含むプラスミドターゲティングベクターの例示的なデザインである。相同組換えを使用して他の目的の遺伝子をターゲティングするためには、3kbのTCR発現トランス遺伝子を、異なる遺伝子に対する組換えアームを含む類似のベクターに挿入することができる。組換えアームの外側のプライマーを使用するPCRによる解析により、遺伝子におけるTCRの組込みの成功を示すことができる。10

【0050】

【図17】図17は、刺激T細胞内のCCR5遺伝子におけるTCRの組込みを示す。陽性PCR結果は、トランスフェクションの72時間後のCCR5遺伝子における相同組換えの成功を示す。

【0051】

【図18】図18は、プラスミドDNAのトランスフェクションに応答したT細胞の死を示す。

【0052】

【図19】図19は、T細胞を含むがこれらに限定されない、異なる細胞型内に存在する、細胞質DNAの生得的免疫センシング経路についての概略を示す。T細胞は、外来DNAを検出するために、両方の経路を発現する。細胞毒性は、ゲノム操作時における、これらの経路の活性化から生じ得る。20

【0053】

【図20】図20は、図19のインヒビターが、アポトーシスおよびピロトーシスを遮断することを示す。

【0054】

【図21】図21は、代表的なプラスミド修飾の概略を示す。標準的プラスミドは、生得的免疫センシング系を誘発し得る、細菌性メチル化を含有する。細菌性メチル化を除去することにより、標準的プラスミドにより引き起こされる毒性を低減することができる。また、ベクターが、「自己のDNA」と類似するように、細菌性メチル化を除去し、哺乳動物性メチル化を付加することもできる。修飾はまた、合成一本鎖DNAの使用も含み得る。30

【0055】

【図22】図22は、代表的な機能的操作TCR抗原受容体を示す。この操作TCRは、MART-1を発現する黒色腫細胞株に対して高度に反応性である。TCRと鎖とは、フリン切断部位、およびこれに続く2Aリボソームスキップペプチドにより連結されている。

【0056】

【図23】図23Aおよび23Bは、ガイドRNAのトランスフェクション後6日目における、PD-1、CTLA-4、PD-1、およびCTLA-2、またはCCR5、PD-1、およびCTLA-4の発現を示す。代表的ガイド：PD-1(P2、P6、P2/6)、CTLA-4(C2、C3、C2/3)、またはCCR5(CC2)である。A.は、阻害性受容体の発現パーセントを示す。B.は、対照ガイドRNAに照らして正規化した、阻害性受容体の発現を示す。40

【0057】

【図24】図24Aおよび24Bは、非染色の、ガイドを伴わない対照と比較した、CRISPR、ならびにCTLA-4特異的ガイドRNAである、ガイド#2および#3の電気穿孔の後における、初代ヒトT細胞内のCTLA-4の発現を示す。B.は、非染色の、ガイドを伴わない対照と比較した、CRISPR、ならびにPD-1特異的ガイドRNAである、ガイド#2および#6の電気穿孔の後における、初代ヒトT細胞内のPD-150

の発現を示す。

【0058】

【図25】図25は、CRISPR、ならびにマルチプレックス化させたCTLA-4ガイドRNAおよびPD-1ガイドRNAの電気穿孔の後における、初代ヒトT細胞内のCTLA-4およびPD-1の発現についてのFACS結果を示す。

【0059】

【図26】図26Aおよび26Bは、CRISPRによる処置後における、初代ヒトT細胞内の二重ノックアウトパーセントを示す。A.は、CTLA-4ガイド#2、#3、#2および#3、PD-1ガイド#2およびCTLA-4ガイド#2、PD-1ガイド#6およびCTLA-4ガイド#3で処置したT細胞内の、CTLA-4ノックアウトパーセントであって、Zapのみ、Cas9のみ、および全てのガイドRNA対照と比較したノックアウトパーセントを示す。B.は、PD-1ガイド#2、PD-1ガイド#6、PD-1ガイド#2および#6、PD-1ガイド#2およびCTLA-4ガイド#2、PD-1ガイド#6およびCTLA-4ガイド#3で処置したT細胞内の、PD-1ノックアウトパーセントであって、Zapのみ、Cas9のみ、および全てのガイドRNA対照と比較したノックアウトパーセントを示す。

【0060】

【図27】図27は、CRISPR、およびCTLA-4、PD-1、またはこれらの組合せに特異的なガイドRNAの電気穿孔後における、T細胞の生存率を示す。

【0061】

【図28】図28は、PD-1ガイドRNAのみを導入する条件下、PD-1ガイドRNAおよびCTLA-4ガイドRNAを導入する条件下、またはCCR5ガイドRNA、PD-1ガイドRNA、およびCTLA-4ガイドRNAを導入する条件下、Zapのみによる対照条件下、またはgRNAのみによる対照条件下における、PD-1ガイドRNA#2、#6、#2および#6による切断を示す、CEL-Iアッセイの結果を示す。

【0062】

【図29】図29は、CTLA-4ガイドRNAのみを導入する条件下、PD-1ガイドRNAおよびCTLA-4ガイドRNAを導入する条件下、またはCCR5ガイドRNA、PD-1ガイドRNA、およびCTLA-4ガイドRNAを導入する条件下、Zapのみによる対照条件下、またはgRNAのみによる対照条件下における、CTLA-4ガイドRNA#2、#3、#2および#3による切断を示す、CEL-Iアッセイの結果を示す。

【0063】

【図30】図30は、Zapのみによる対照条件下、Cas9のみによる対照条件下、またはガイドRNAのみによる対照条件下と比較した、CCR5ガイドRNAを導入する条件下、CCR5ガイドRNA、PD-1ガイドRNA、またはCTLA-4ガイドRNAを導入する条件下における、CCR5ガイドRNA#2による切断を示す、CEL-Iアッセイの結果を示す。

【0064】

【図31】図31は、2'O-メチルRNA修飾を伴う、最適化されたCRISPRガイドRNAを、5マイクログラムおよび10マイクログラムで用いる、初代ヒトT細胞内の、TCRアルファのノックアウトであって、FACSにおけるCD3の発現により測定されるノックアウトを示す。

【0065】

【図32】図32は、CRISPR、およびCTLA-4へのガイドRNAによる処置後における、T細胞の生存率および表現型を測定する方法を描写する。表現型は、正常FSC/SSCプロファイルを呈する処置細胞の頻度であって、電気穿孔単独による対照の頻度に照らして正規化された頻度を定量化することにより測定した。生存率はまた、FSC/SSCゲートをかけた集団内の細胞による、Viability Dyeの除外によつても測定した。T細胞表現型は、CD3およびCD62Lにより測定する。

10

20

30

40

50

【0066】

【図33】図33は、C R I S P R、ならびにP D - 1へのガイドR N A、ならびにP D - 1およびC T L A - 4へのガイドR N Aによる処置後における、T細胞の生存率および表現型を測定する方法を示す。表現型は、正常F S C / S S Cプロファイルを呈する処置細胞の頻度であって、電気穿孔単独による対照の頻度に照らして正規化された頻度を定量化することにより測定した。生存率はまた、F S C / S S Cゲートをかけた集団内の細胞による、V i a b i l i t y D y eの除外によっても測定した。T細胞表現型は、C D 3およびC D 6 2 Lにより測定する。

【0067】

【図34】図34は、初代ヒトT細胞およびJ u r k a t 対照への、P D - 1ガイドR N AまたはC T K A - 4ガイドR N Aのトランスフェクション後4日目における、C R I S P R遺伝子編集を検出する、T 7 E 1アッセイの結果を示す。N Nとは、T 7 E 1ヌクレアーゼを伴わない対照である。

10

【0068】

【図35】図35は、T I D E (t r a c k i n g o f i n d e l s b y d e c o m p o s i t i o n) 解析の結果を示す。遺伝子編集効率パーセントを、P D - 1ガイドR N AおよびC T L A - 4ガイドR N Aについて示す。

【0069】

【図36】図36は、単一のガイドのトランスフェクションについての、T I D E (t r a c k i n g o f i n d e l s b y d e c o m p o s i t i o n) 解析の結果を示す。欠失または挿入を伴う配列のパーセントを、P D - 1ガイドR N AまたはC T L A - 1ガイドR N AおよびC R I S P Rをトランスフェクトした初代ヒトT細胞について示す。

20

【0070】

【図37】図37は、二重ターゲティングによるP D - 1配列の欠失を示す。

【0071】

【図38】図38は、二重ターゲティングによるP D - 1配列の欠失についての、P C R産物のシーケンシング結果を示す。試料6および14は、介在する135bpを切り出した、2つのg R N A配列の融合体により示される。

30

【0072】

【図39】図39は、二重ターゲティングによるC T L A - 4配列の欠失を示す。二重ガイドによりターゲティングされたC T L A - 4のシーケンシングにおいてもまた、2つのガイドR N A配列間の欠失が存在する（試料9および14）。T 7 E 1アッセイは、P C Rによる欠失を確認する。

【0073】

【図40】図40Aおよび40Bは、A . C R I S P Rのトランスフェクション後6日目における、ヒトT細胞の生存率；B . ヒトT細胞のトランスフェクション効率（G F P陽性%）についてのF A C S解析を示す。

【0074】

【図41】図41は、抗C T L A - 4 C R I S P RガイドR N Aをトランスフェクトした染色ヒトT細胞内のC T L A - 4発現についてのF A C S解析を示す。P Eは、抗ヒトC D 1 5 2 (C T L A - 4)である。

40

【0075】

【図42】図42Aおよび42Bは、抗C T L A - 4ガイドR N AおよびC R I S P Rのトランスフェクション後における、C T L A - 4陽性ヒトT細胞についてのC T L A - 4 F A C S解析を示す。B . は、抗C T L A - 4ガイドR N AおよびC R I S P Rのトランスフェクション後における、ヒトT細胞内の、パルス対照と比べた、C T L A - 4ノックアウト効率を示す。

【0076】

【図43】図43は、操作T C Rを含有するミニサークルD N Aを示す。

50

【0077】

【図44】図44は、CISH、PD-1、CTLA4、およびAAVS1のための修飾sgRNAを描写する。

【0078】

【図45】図45は、CRISPRおよび抗PD-1ガイドRNAのトランスフェクション後14日目における、PD-1KOについてのFACS結果を描写する。PerCP-Cy5.5は、マウス抗ヒトCD279(PD-1)である。

【0079】

【図46】図46Aおよび46Bは、A.は、抗PD-1CRISPR系のトランスフェクション後における、PD-1の発現パーセントを示す。B.は、Cas9のみによる対照と比較した、PD-1ノックアウト効率パーセントを示す。
10

【0080】

【図47】図47は、抗PD-1ガイド#2、抗PD-1ガイド#6、抗PD1ガイド#2および#6、または抗PD-1ガイド#2および#6および抗CTLA-4ガイド#2および#3と共に、CRISPR系をトランスフェクトしたヒトT細胞の、FSC/SSCサブセットについてのFACS解析を示す。

【0081】

【図48】図48は、CRISPRおよび抗CTLA-4ガイドRNAのトランスフェクション後6日目における、ヒトT細胞についてのFACS解析を示す。PEは、マウス抗ヒトCD152(CTLA-4)である。
20

【0082】

【図49】図49は、CRISPRならびに抗PD-1ガイドRNAおよび抗CTLA-4ガイドRNAのトランスフェクション後1日目における、ヒトT細胞および対照Jurkat細胞についてのFACS解析を示す。ヒトT細胞の生存率およびトランスフェクション効率を、トランスフェクトJurkat細胞と比較して示す。

【0083】

【図50】図50は、CRISPRおよび抗CTLA-4ガイドRNAをトランスフェクトした、CTLA-4染色ヒトT細胞についてのFACS解析による定量化データを描写する。トランスフェクション後6日目における、CTLA-4の発現パーセントおよびノックアウトパーセントについてのデータを示す。
30

【0084】

【図51】図51は、CRISPRおよび抗PD-1ガイドRNAをトランスフェクトした、PD-1染色ヒトT細胞についてのFACS解析を示す。トランスフェクション後14日目における、PD-1の発現(抗ヒトCD279 PerCP-Cy5.5)についてのデータを示す。

【0085】

【図52】図52は、CRISPRおよび抗PD-1ガイドRNAをトランスフェクトしたヒトT細胞についての、Cas9のみによる対照と比較した、PD-1の発現パーセントおよびPD-1のノックアウトパーセントを示す。

【0086】

【図53】図53は、CRISPR、抗CTLA-4、および抗PD-1ガイドRNAをトランスフェクトしたヒトT細胞の、14日目における細胞数および生存率を示す。

【0087】

【図54】図54は、CRISPR、ならびに抗PD-1ガイド#2単独、抗PD-1ガイド#2および#6、または抗CTLA-4ガイド#3単独の電気穿孔後14日目における、ヒトT細胞についてのFACSデータを示す。操作T細胞を、48時間にわたり再刺激して、CTLA-4およびPD-1の発現について評価し、ガイドRNAを伴わずに電気穿孔した対照細胞と比較した。
40

【0088】

【図55】図55は、CRISPR、ならびに抗CTLA-4ガイド#2および#3、抗

10

20

30

40

50

P D - 1 ガイド # 2 および抗 C T L A - 4 ガイド # 3、または抗 P D - 1 ガイド # 2 および # 6、抗 C T L A - 4 ガイド # 3 および # 2 の電気穿孔後 14 日目における、ヒト T 細胞についての F A C S データを示す。操作 T 細胞を、48 時間にわたり再刺激して、C T L A - 4 および P D - 1 の発現について評価し、ガイド R N A を伴わずに電気穿孔した対照細胞と比較した。

【0089】

【図 56】図 56 は、初代ヒト T 細胞内の C I S H 遺伝子座の、C R I S P R を媒介する遺伝子改変についての Surveyor アッセイの結果を描写する。

【0090】

【図 57】図 57 A、57 B、および 57 C。A . T 細胞受容体 (T C R) の概略を示す。B . キメラ抗原受容体の概略を示す。C . B 細胞受容体 (B C R) の概略を示す。 10

【0091】

【図 58】図 58 は、体細胞の変異負荷が、腫瘍型間で変動することを示す。腫瘍特異的ネオ抗原の作製および提示は理論的に、変異負荷と正比例する。

【0092】

【図 59】図 59 は、核酸に対して施し得る、シュードウリジン - 5' - 三リン酸修飾および 5 - メチルシチジン - 5' - 三リン酸修飾を示す。

【0093】

【図 60】図 60 は、C R I S P R および C I S H g R N A 1、3、4、5、または 6 をトランスフェクトした 293 T 細胞についての、T I D E および密度測定のデータ比較を示す。 20

【0094】

【図 61】図 61 は、C R I S P R および C I S H g R N A 1、3、4、5、または 6 をトランスフェクトした 293 T 細胞についての、密度測定解析の二連の実験を描写する。

【0095】

【図 62】図 62 A および 62 B は、C I S H g R N A 1 についての、二連の T I D E 解析 A . および B . を示す。

【0096】

【図 63】図 63 A および 63 B は、C I S H g R N A 3 についての、二連の T I D E 解析 A . および B . を示す。 30

【0097】

【図 64】図 64 A および 64 B は、C I S H g R N A 4 についての、二連の T I D E 解析 A . および B . を示す。

【0098】

【図 65】図 65 A および 65 B は、C I S H g R N A 5 についての、二連の T I D E 解析 A . および B . を示す。

【0099】

【図 66】図 66 A および 66 B は、C I S H g R N A 6 についての、二連の T I D E 解析 A . および B . を示す。 40

【0100】

【図 67】図 67 は、初代 T 細胞内の C R I S P R ノックアウト後における、C I S H タンパク質の喪失を示すウェスタンプロットを示す。

【0101】

【図 68】図 68 A、68 B、および 68 C は、細胞数による D N A 生存率であって、一本鎖 D N A または二本鎖 D N A のトランスフェクションの A . 1 日後、B . 2 日後、C . 3 日後における D N A 生存率を描写する。M 13 の s s / d s D N A は、7 . 25 k b である。p U C 57 は、2 . 7 k b である。G F P プラスミドは、6 . 04 k b である。

【0102】

【図 69】図 69 は、操作細胞の調製時または調製後においてモジュレートされ得る機構

50

経路を示す。

【0103】

【図70】図70Aおよび70Bは、A.3日目およびB.7日目の、C R I S P R系(15ugのCas9、10ugのgRNA)のトランスフェクション後における細胞数を示す。試料1：非処置である。試料2：パルスのみである。試料3：GFP-mRNAである。試料4：パルスのみを施したCas9である。試料5：パルスのみを施した、5マイクログラムのミニサークルドナーである。試料6：パルスのみを施した、20マイクログラムのミニサークルドナーである。試料7：プラスミドドナー(5マイクログラム)である。試料8：プラスミドドナー(20マイクログラム)である。試料9：+ガイドPD1-2/+Cas9/-ドナーである。試料10：+ガイドPD1-6/+Cas9/-ドナーである。試料11：+ガイドCTLA4-2/+Cas9/-ドナーである。試料12：+ガイドCTLA4-3/+Cas9/-ドナーである。試料13：PD1-2/5ugのドナーである。試料14：PD1(二重)/5ugのドナーである。試料15：CTLA4-3/5ugのドナーである。試料16：CTLA4(二重)/5ugのドナーである。試料17：PD1-2/20ugのドナーである。試料18：PD1(二重)/20ugのドナーである。試料19：CTLA4-3/20ugのドナーである。試料20：CTLA4(二重)/20ugのドナーである。

10

【0104】

【図71】図71Aおよび71Bは、4日目における、ドナー核酸を伴わないPD-1の、A.gRNA2、およびB.gRNA6についてのTIDE解析を示す。

20

【0105】

【図72】図72Aおよび72Bは、4日目における、ドナー核酸を伴わない、CTLA4の、A.gRNA2、およびB.gRNA3についてのTIDE解析を示す。

【0106】

【図73】図73は、対照細胞内、5マイクログラムのドナーDNA(ミニサークル)を電気穿孔した細胞内、または20マイクログラムのドナーDNA(ミニサークル)を電気穿孔した細胞内の、7日目におけるTCRベータの検出についてのFACS解析を示す。

【0107】

【図74】図74は、C R I S P R系、およびポリ核酸ドナーなし(対照)、5マイクログラムのポリ核酸ドナー(ミニサークル)、または20マイクログラムのポリ核酸ドナー(ミニサークル)のいずれかを電気穿孔した、7日目におけるT細胞の概要を示す。TCR陽性細胞のFACS解析の概要を示す。

30

【0108】

【図75】図75は、順方向におけるPD1 gRNA#2切断部位へのTCRミニサークルの組込みを示す。

【0109】

【図76】図76Aおよび76Bは、増大させる二本鎖ポリ核酸ドナー濃度で、C R I S P R、および5'修飾または3'修飾(またはこれらの両方)を伴う、PD-1 gRNAまたはC I S H gRNAをトランスフェクトしたヒトT細胞についてのGUIDE-Seq投与試験を使用する、4日目における生細胞の百分率を示す。B.は、C R I S P R、およびPD-1特異的gRNAまたはC I S H特異的gRNAをトランスフェクトしたヒトT細胞の、PD-1遺伝子座またはC I S H遺伝子座における組込み効率を示す。

40

【0110】

【図77】図77は、PD-1遺伝子部位またはC I S H遺伝子部位における、dsDNAの組込みについての、GoTaqおよびPhusionFlex解析を示す。

【0111】

【図78】図78は、C R I S P R、および外因性TCRをコードする5マイクログラムまたは20マイクログラムのミニサークルDNAをトランスフェクトしたヒトT細胞の15日目のFACS解析を示す。

【0112】

50

【図79】図79は、C R I S P R系、およびポリ核酸ドナーなし(対照)、5マイクログラムのポリ核酸ドナー(ミニサークル)、または20マイクログラムのポリ核酸ドナー(ミニサークル)のいずれかを電気穿孔した、15日目におけるT細胞の概要を示す。T C R陽性細胞のF A C S解析の概要を示す。

【0113】

【図80】図80は、C R I S P R、およびm T C R b鎖をコードするミニサークルのトランスフェクション後4日目における、デジタルP C Rコピー数データによる、R N a s e Pと比べたコピー数を示す。m T C R b鎖をコードするプラスミドドナーを、対照として使用した。

【0114】

【図81】図81Aおよび81Bは、A.外因性T C Rをコードするミニサークルの用量の増加に伴う3日目のT細胞の生存率；B.外因性T C Rをコードするミニサークルの用量の増加に伴う7日目のT細胞の生存率を示す。

【0115】

【図82】図82Aおよび82Bは、A.L o n z aヌクレオフェクションによる、T細胞への二本鎖D N Aのトランスフェクションのための最適化条件(細胞数を、G F Pをコードするプラスミドの濃度と対比する)；B.T細胞への、G F Pタンパク質をコードする二本鎖D N Aの、L o n z aヌクレオフェクションのための最適化条件を示す(遺伝子導入パーセントを、トランスフェクションのために使用されるG F Pプラスミドの濃度と対比して示す)。

10

20

【0116】

【図83】図83Aおよび83B。A.A A V T C R送達のための、p D G 6 - A A Vヘルパークリーパッケージングプラスミドを示す。B.ウイルス産生のための、293細胞のA A V一過性トランスフェクションのプロトコールの概略を示す。ウイルスは、初代ヒトT細胞への遺伝子導入のために精製および保存される。

【0117】

【図84】図84は、内因性免疫チェックポイント(C T L A 4およびP D 1を例示的な例として示す)に対する900 b pの相同性アームで挟んだ、外因性T C Rをコードするr A A Vドナーを示す。

30

【0118】

【図85】図85は、A A V S 1遺伝子に対する相同性アームで挟んだ外因性T C Rをコードするr A A V相同組換えドナーの、ゲノム組込みの概略を示す。

【0119】

【図86】図86A、86B、86C、および86Dは、A A V S 1系を使用して生じ得る、可能な組換えイベントを示す。A.は、トランス遺伝子の組込みによる、A A V S 1における、二本鎖切断の、相同性により導かれる修復を示す。B.は、A A V S 1遺伝子の一方の鎖と、A A V S 1の相補鎖の非相同末端結合性インデルとによる、相同性により導かれる修復を示す。C.は、トランス遺伝子の、A A V S 1遺伝子部位への、非相同末端結合性挿入と、A A V S 1における非相同末端結合性インデルとを示す。D.は、両方のA A V S 1位置における非相同インデルであって、トランス遺伝子の、ゲノム部位への、ランダム組込みを伴う非相同インデルを示す。

40

【0120】

【図87】図87は、外因性T C Rをコードするトランス遺伝子を免疫チェックポイント遺伝子に導入する、C R I S P Rおよびr A A Vの組合せターゲティングアプローチを示す。

【0121】

【図88】図88Aおよび88Bは、3日目のデータを示す。A.外因性T C Rをコードする7.5マイクログラムのミニサークルドナーの電気穿孔時に、カスパーぜおよびT B Kインヒビターを使用したC R I S P R電気穿孔実験を示す。生存率を、使用されるインヒビターの濃度と比較してプロットする。B.電気穿孔の効率を示す。陽性T C Rパーセ

50

ントを、使用されるインヒビターの濃度と対比して示す。

【0122】

【図89】図89は、C R I S P R、および外因性T C RをコードするミニサークルD N A(7.5マイクログラム)を電気穿孔したヒトT細胞のF A C Sデータを示す。カスパーおよびT B Kインヒビターを、電気穿孔時に添加した。

【0123】

【図90】図90Aおよび90Bは、C R I S P R、および外因性T C RをコードするミニサークルD N A(20マイクログラム)を電気穿孔したヒトT細胞のF A C Sデータを示す。A.T C R陽性細胞を、使用される免疫チェックポイント特異的ガイドと対比して示す、電気穿孔効率を示す。B.T C R陽性細胞を、使用される免疫チェックポイント特異的ガイドと対比して示す、電気穿孔効率のF A C Sデータを示す。

10

【0124】

【図91】図91は、C R I S P R、およびミニサークルの様々な濃度での、外因性T C Rをコードするミニサークルの電気穿孔後13日目のT C R発現を示す。

【0125】

【図92】図92Aおよび92Bは、C R I S P R、および外因性T C RをコードするミニサークルD N Aのトランスフェクション前に、ヒトT細胞をブレフェルジンAおよびA T Mインヒビターで前処理した、細胞死インヒビター研究を示す。A.電気穿孔後3日目におけるT細胞の生存率を示す。B.電気穿孔後7日目におけるT細胞の生存率を示す。

20

【0126】

【図93】図93Aおよび93Bは、C R I S P R、および外因性T C RをコードするミニサークルD N Aのトランスフェクション前に、ヒトT細胞をブレフェルジンAおよびA T Mインヒビターで前処理した、細胞死インヒビター研究を示す。A.電気穿孔後3日目における、T細胞におけるT C R発現を示す。B.電気穿孔後7日目における、T細胞におけるT C R発現を示す。

【0127】

【図94】図94は、外因性トランス遺伝子(例えば、T C R)の組込みを迅速に検出する、スプライスアクセプターG F Pレポーター・アッセイを示す。

【0128】

【図95】図95は、外因性トランス遺伝子(例えば、T C R)の組込みを迅速に検出する、遺伝子座特異的デジタルP C Rアッセイを示す。

30

【0129】

【図96】図96は、P G Kプロモーターまたはスプライスアクセプターのいずれかを使用する、外因性T C Rをコードする組換え(r A A V)ドナー構築物を示す。各構築物を、A A V S 1チェックポイント遺伝子に対する850塩基対の相同性アーム(H A)で挟む。

【0130】

【図97】図97は、r A A V A A V S 1-T C R遺伝子ターゲティングベクターを示す。トランスジェニックT C R発現力セットを、P P P 1 R 1 2 C遺伝子のイントロン領域内のA A V S 1「セーフハーバー」遺伝子座に挿入するのに使用される、r A A Vターゲティングベクターの概略的描示である。主要な特色を、それらのヌクレオチド数サイズ(b p)と共に示す。I T R: 内部タンデムリピート; P G K: ホスホグリセリン酸キナーゼ; m T C R: マウスT細胞受容体ベータ; S V 4 0 ポリA: サルウイルス40ポリアデニル化シグナル。

40

【0131】

【図98】図98は、修飾g R N Aによる刺激の48時間後において、G F P+トランス遺伝子を電気穿孔したT細胞を示す。g R N Aは、シュードウリジン、5'm o C、5'm e C、5'm o U、5'h m C + 5'm o U、m 6 A、または5'm o C + 5'm e Cで修飾した。

【0132】

50

【図99】図99Aおよび99Bは、修飾gRNAによる刺激の48時間後において、GFP+トランス遺伝子を電気穿孔したT細胞について、GFP発現細胞のA.生存率、およびB.MFIを描写する。gRNAは、シュードウリジン、5'moC、5'meC、5'moU、5'hmC+5'moU、m6A、または5'moC+5'meCで修飾した。

【0133】

【図100】図100Aおよび100Bは、A.修飾キャップ除去型Cas9タンパク質、またはB.非修飾Cas9タンパク質の比較についてのTIDE結果を示す。ゲノムの組込みは、Cas9 15マイクログラムおよび化学修飾gRNA 10マイクログラムで、非修飾Cas9またはキャップ除去型Cas9を電気穿孔した、T細胞のCCR5遺伝子座において測定した。
10

【0134】

【図101】図101Aおよび101Bは、逆転写酵素(RT)レポーターRNAを発現するJurkat細胞であって、Neon Transfection Systemを使用して、RTをコードするプラスミドおよびプライマー(濃度についての表を参照されたい)をトランスフェクトされ、トランスフェクション後3日目において、細胞の生存率およびGFPの発現についてアッセイされる、Jurkat細胞についてのA.生存率、およびB.逆転写酵素活性を示す。GFP陽性細胞は、RT活性を伴う細胞を表す。

【0135】

【図102】図102Aおよび102Bは、ヒトTILの刺激前および刺激後における絶対細胞数を示す。A.は、刺激前および刺激後における、RPMI培地中またはex vivo培地中で培養された、第1のドナーの細胞数を示す。B.は、刺激前および刺激後における、RPMI培地中で培養された、第2のドナーの細胞数を示す。
20

【0136】

【図103】図103Aおよび103Bは、A.自家フィーダーの添加を伴うか、またはB.自家フィーダーの添加を伴わない、PD-1遺伝子座をターゲティングするCRISPR系を電気穿孔したヒト腫瘍浸潤リンパ球(TIL)または対照細胞の細胞拡大を示す。

【0137】

【図104】図104Aおよび104Bは、CRISPR系単独(対照); GFPプラスミド(ドナー)単独(対照); ドナーおよびCRISPR系; ドナー、CRISPR、およびcFLPタンパク質; ドナー、CRISPR、およびhAd5_E1A(E1A)タンパク質; またはドナー、CRISPR、およびHPV18_E7タンパク質を電気穿孔したヒトT細胞を示す。GFPについてのFACS解析は、電気穿孔の、A.48時間後、またはB.8日間後において測定した。
30

【0138】

【図105】図105は、血清を用いてトランスフェクション後4日目における、CRISPR系を使用してスライスアクセプターGFPをコードするトランス遺伝子を含有する組換えAAV(rAAV)ベクターをトランスフェクトしたT細胞のフローサイトメトリーアンalysisを示す。示された条件は、Cas9およびgRNA、GFP mRNA、Virapur低力価ウイルス、Virapur低力価ウイルスおよびCRISPR、SA-GFP_pAAVプラスミド、SA-GFP_pAAVプラスミドおよびCRISPR、AAVancedウイルス、またはAAVancedウイルスおよびCRISPRである。
40

【0139】

【図106】図106は、血清なしでトランスフェクション後4日目における、CRISPR系を使用してスライスアクセプターGFPをコードするトランス遺伝子を含有する組換えAAV(rAAV)ベクターをトランスフェクトしたT細胞のフローサイトメトリーアンalysisを示す。示された条件は、Cas9およびgRNA、GFP mRNA、Virapur低力価ウイルス、Virapur低力価ウイルスおよびCRISPR、SA-GF
50

P p A A V プラスミド、 S A - G F P p A A V プラスミドおよび C R I S P R 、 A A V a n a n c e d ウイルス、または A A V a n c e d ウイルスおよび C R I S P R である。

【 0 1 4 0 】

【 図 1 0 7 】 図 1 0 7 A および図 1 0 7 B は、 A . 血清を用いてトランスフェクション後 7 日目における、 C R I S P R 系を使用してスプライスアクセプター G F P をコードするトランス遺伝子を含有する組換え A A V (r A A V) ベクターをトランスフェクトした T 細胞のフローサイトメトリー解析を示す。示された条件は、 S A - G F P p A A V プラスミドならびに S A - G F P p A A V プラスミドおよび C R I S P R である。 B . 血清を用いてまたは血清なしでトランスフェクション後 7 日目における、 C R I S P R 系を使用してスプライスアクセプター G F P をコードするトランス遺伝子を含有する組換え A A V (r A A V) ベクターをトランスフェクトした T 細胞のフローサイトメトリー解析を示す。示された条件は、 A A V a n c e d ウイルスのみまたは A A V a n c e d ウイルスおよび C R I S P R である。

10

【 0 1 4 1 】

【 図 1 0 8 】 図 1 0 8 は、トランスフェクション (+) 時点、血清除去およびトランスフェクション後 4 時間、または血清除去およびトランスフェクション後 16 時間ににおける、 S A - G F P p A A V プラスミドまたは S A - G F P p A A V プラスミドおよび C R I S P R のトランスフェクション後の細胞生存率を示す。

20

【 0 1 4 2 】

【 図 1 0 9 】 図 1 0 9 は、血清条件下 3 ~ 4 日、血清除去 4 時間、または血清除去 16 時間ににおける、スプライスアクセプター - G F P (S A - G F P) p A A V プラスミドのノックインの読み出しを示す。対照（非トランスフェクト）細胞を、 S A - G F P p A A V プラスミドのみ、または S A - G F P p A A V プラスミドおよび C R I S P R をトランスフェクトした細胞と比較する。

30

【 0 1 4 3 】

【 図 1 1 0 】 図 1 1 0 は、 1×10^5 M O I 、 3×10^5 M O I 、または 1×10^6 M O I の濃度でトランスフェクション後 3 日目における、 S A - G F P トランス遺伝子をコードする r A A V または r A A V および C R I S P R をトランスフェクトしたヒト T 細胞の F A C S 解析を示す。

30

【 0 1 4 4 】

【 図 1 1 1 】 図 1 1 1 は、 1×10^5 M O I 、 3×10^5 M O I 、または 1×10^6 M O I の濃度でトランスフェクション後 7 日目における、 S A - G F P トランス遺伝子をコードする r A A V または r A A V および C R I S P R をトランスフェクトしたヒト T 細胞の F A C S 解析を示す。

40

【 0 1 4 5 】

【 図 1 1 2 】 図 1 1 2 は、 1×10^5 M O I 、 3×10^5 M O I 、または 1×10^6 M O I の濃度でトランスフェクション後 3 日目における、 T C R トランス遺伝子をコードする r A A V または r A A V および C R I S P R をトランスフェクトしたヒト T 細胞の F A C S 解析を示す。

【 0 1 4 6 】

【 図 1 1 3 】 図 1 1 3 は、 1×10^5 M O I 、 3×10^5 M O I 、または 1×10^6 M O I の濃度でトランスフェクション後 7 日目における、 T C R トランス遺伝子をコードする r A A V または r A A V および C R I S P R をトランスフェクトしたヒト T 細胞の F A C S 解析を示す。

【 0 1 4 7 】

【 図 1 1 4 】 図 1 1 4 A および図 1 1 4 B は、 4 時間、 6 時間、 8 時間、 12 時間、 18 時間、および 24 時間の時点の、 A . C a s 9 および g R N A のみ、または B . r A A V 、 C R I S P R 、および S A - G F P トランス遺伝子をトランスフェクトしたヒト T 細胞の F A C S 解析を示す。

50

【0148】

【図115】図115Aおよび図115Bは、A. 刺激後4日目における時間の関数としてのrAAV遺伝子導入(%GFP+)を示す。B. は、刺激後4日目における、4時間、6時間、8時間、12時間、18時間、および24時間の時点での、rAAVのトランスフェクトまたは非トランスフェクト細胞の生細胞数を示す。

【0149】

【図116】図116は、 1×10^5 MOI、 3×10^5 MOI、 1×10^6 MOI、 3×10^6 MOI、または 5×10^6 MOIの濃度でトランスフェクション後4日目における、SA-GFPトランス遺伝子をコードするrAAVまたはrAAVおよびCRISPRをトランスフェクトしたヒトT細胞のFACS解析を示す。10

【0150】

【図117】図117Aおよび図117Bは、A. 種々の感染多重度(MOI)レベル、 $1 \sim 5 \times 10^6$ で刺激後4日目における、SA-GFPトランス遺伝子をコードするAAVベクターをトランスフェクトしたヒトT細胞のGFP陽性(GFP+ve)発現を示す。B. $0 \sim 5 \times 10^6$ のMOIレベルでSA-GFPトランス遺伝子をコードするAAVをトランスフェクトした、またはトランスフェクトしていないヒトT細胞の刺激後4日目における生細胞数を示す。

【0151】

【図118】図118は、刺激後4日目における、rAAVまたはrAAVおよびCRISPRをトランスフェクトしたヒトT細胞のFACS解析を示す。細胞は、 1×10^5 MOI、 3×10^5 MOI、 1×10^6 MOI、 3×10^6 MOI、または 5×10^6 MOIのMOIレベルでトランスフェクトした。20

【0152】

【図119】図119は、種々の感染多重度(MOI)レベル、 $1 \sim 5 \times 10^6$ で刺激後4日目における、TCRトランス遺伝子をコードするAAVベクターをトランスフェクトしたヒトT細胞のTCR陽性(TCR+ve)発現を示す。

【0153】

【図120】図120Aおよび120Bは、以下を示す。A. SA-GFPトランス遺伝子をコードするAAV、TCRトランス遺伝子をコードするAAV、CISHをターゲティングするCRISPRおよびTCRトランス遺伝子、またはCTLA-4をターゲティングするCRISPRおよびTCRトランス遺伝子をウイルスでトランスフェクトしたヒトT細胞の発現効率パーセントを示す。B. rAAV、またはrAAVおよび、CISHまたはCTLA-4遺伝子をターゲティングするCRISP gRNAをトランスフェクトした細胞の、刺激後4日目におけるTCR発現を示すFACSプロットである。30

【0154】

【図121】図121Aおよび121Bは、刺激後4日目のヒトT細胞におけるTCR発現のFACSプロットを示す。A. は、対照非トランスフェクト細胞を示す図であり、B. は、AAAS1pAAVプラスミドのみ、CISHをターゲティングするCRISPRおよびpAAV、CTLA-4をターゲティングするCRISPRおよびpAAV、NHEJミニサークルベクター、AAVS1pAAVおよびCRISPR、CISHをターゲティングするCRISPRおよびpAAV-CISHプラスミド、CTLA-4pAAVプラスミドおよびCRISPR、またはNHEJミニサークルおよびCRISPRをトランスフェクトした細胞を示す。40

【0155】

【図122】図122Aおよび122Bは、以下を示す。A. 1×10^5 MOI、 3×10^5 MOI、 1×10^6 MOIのMOIでトランスフェクション後3日目またはトランスフェクション前(対照)における、SA-GFPをコードするrAAVをトランスフェクトしたヒトT細胞のGFP陽性(GFP+)発現パーセントを示す。B. 1×10^5 MOI、 3×10^5 MOI、 1×10^6 のMOIでトランスフェクション後3日目またはトランスフェクション前(対照)の、TCRトランス遺伝子をコードするrAAVをトランス50

フェクトしたヒトT細胞におけるTCR陽性発現を示す。

【0156】

【図123】図123Aおよび123Bは、A.TCRをコードするrAAVウイルスをトランスフェクション後4～19日目の、ヒトT細胞における外因性TCRの発現を示す図；B.SA-GFPをコードするrAAVウイルスをトランスフェクション後2～19日目の、ヒトT細胞におけるSA-GFPの発現を示す。

【0157】

【図124】図124は、トランスフェクション後14日目における、各rAAVがSA-GFPトランス遺伝子をコードする、rAAVまたはrAAV+CRISPRを 1×10^5 MOI、 3×10^5 MOI、または 1×10^6 のMOIでトランスフェクトしたヒトT細胞のFACSプロットを示す。

10

【0158】

【図125】図125は、トランスフェクション後14日目における、各rAAVがTCRトランス遺伝子をコードする、rAAVまたはrAAV+CRISPRを 1×10^5 MOI、 3×10^5 MOI、または 1×10^6 のMOIでトランスフェクトしたヒトT細胞のFACSプロットを示す。

20

【0159】

【図126】図126は、トランスフェクション後19日目における、各rAAVがSA-GFPトランス遺伝子をコードする、rAAVまたはrAAV+CRISPRを 1×10^5 MOI、 3×10^5 MOI、または 1×10^6 のMOIでトランスフェクトしたヒトT細胞のFACSプロットを示す。

20

【0160】

【図127】図127は、トランスフェクション後19日目における、各rAAVがTCRトランス遺伝子をコードする、rAAVまたはrAAV+CRISPRを 1×10^5 MOI、 3×10^5 MOI、または 1×10^6 のMOIでトランスフェクトしたヒトT細胞のFACSプロットを示す。

20

【0161】

【図128】図128は、トランスフェクション後3もしくは4日目、7、14または19日目における、SA-GFPまたはTCRをコードするAAVをトランスフェクトしたヒトT細胞のFACSプロットを示す。X軸は、トランス遺伝子発現を示す。

30

【0162】

【図129】図129Aおよび129Bは、以下を示す。A.刺激後3～14日目の、TCRをコードするrAAVを 1×10^5 MOI、 3×10^5 MOI、 1×10^6 MOI、 3×10^6 MOI、または 5×10^6 のMOIでトランスフェクトしたヒトT細胞におけるTCR発現を示す。B.TCRをコードするrAAVを、CRISPRありおよびCRISPRなしで 1×10^5 MOI、 3×10^5 MOI、 1×10^6 MOI、 3×10^6 MOI、または 5×10^6 のMOIでトランスフェクトした細胞の、刺激後14日の生細胞数を示す。

【0163】

【図130】図130は、刺激後14日目における、 1×10^5 MOI、 3×10^5 MOI、 1×10^6 MOI、 3×10^6 MOI、または 5×10^6 のMOIでrAAVのみまたはrAAVおよびCRISPRをトランスフェクトした細胞のTCR発現を示す。

40

【0164】

【図131】図131は、4日目～14日目における、rAAVのみ、またはCISH遺伝子をターゲティングし、TCRをコードするrAAVおよびCRISPRをトランスフェクトした細胞のTCR発現を示す。

【0165】

【図132】図132は、4日目～14日目における、rAAVのみ、またはCTL4-4遺伝子をターゲティングし、TCRをコードするrAAVおよびCRISPRをトランスフェクトした細胞のTCR発現を示す。

50

【0166】

【図133】図133Aおよび133Bは、SA-GFPをコードするトランス遺伝子をトランスフェクトしたヒトT細胞の、刺激後3日目におけるGFP FACSデータを示す。A. 非トランスフェクト対照またはGFP mRNAトランスフェクト対照細胞を示す。B. ウイルスタンパク質なし、E4orf6のみ、E1b55K H373A、またはE4orf6+E1b55K H373Aを有する、rAAVをパルスした細胞、またはrAAVおよびCRISPRトランスフェクト細胞を示す。

【0167】

【図134】図134は、ウイルスタンパク質を利用しない、またはE4orf6およびE1b55K H373Aを利用して、パルスしたrAAVまたはrAAVおよびCRISPRで刺激後3日目における、TCRをコードするrAAVをトランスフェクトしたヒトT細胞のFACS解析を示す。AAVS1遺伝子を、TCRの組込みに利用した。

10

【0168】

【図135】図135Aおよび135Bは、ウイルスタンパク質を利用しない、またはE4orf6およびE1b55K H373Aを利用して、パルスしたrAAV、またはrAAVおよびCRISPRで刺激後3日目における、TCRをコードするrAAVをトランスフェクトしたヒトT細胞のFACS解析を示す。CTLA4遺伝子を、TCRの組込みに利用した。Bは、非トランスフェクト対照およびミニサークルのみ対照のFACSデータを示す。

20

【0169】

【図136】図136Aおよび136Bは、刺激後3日目における、TCRをコードするrAAVをトランスフェクトしたヒトT細胞の発現データを示す。A. 対照細胞(NT)と比較した、CTLA4、PD-1、AAVS1、またはCISHのゲノム修飾を有するT細胞における、TCR発現のフローサイトメトリーデータの概要を示す。B. 対照細胞(NT)と比較した、CTLA4、PD-1、AAVS1、またはCISHのゲノム修飾を有するT細胞のTCR発現のフローデータを示す。

20

【0170】

【図137】図137Aおよび137Bは、刺激後3日目および7日目における、TCRをコードするrAAVをトランスフェクトしたヒトT細胞の発現データを示す。A. 3および7日目の、対照細胞(NT)と比較した、CTLA4、PD-1、AAVS1、またはCISHのゲノム修飾を有するT細胞における、TCR発現のフローサイトメトリーデータの概要を示す図である。B. 刺激後7日目の、対照細胞(NT)と比較した、CTLA4、PD-1、AAVS1、またはCISHのゲノム修飾を有するT細胞のTCR発現のフローデータを示す。

30

【0171】

【図138】図138は、rAAVドナーデザインの概略を示す。

【0172】

【図139】図139は、rAAVを遺伝子導入後14日目のTCR発現を示す。細胞は、PD-1またはCTLA-4をノックダウンするためにCRISPRも用いて修飾する。データは、非遺伝子導入(NT)細胞と比較した操作細胞を示す。

40

【0173】

【図140】図140は、rAAVによるTCRノックイン後のPD-1およびCTLA-4発現を示す。トランスフェクション後17日目のFACSデータを示す。

【0174】

【図141】図141Aは、複数のPBMCドナーについての、CRISPRおよびrAAV操作細胞のTCR発現パーセントを示す。図141Bは、ドナー91、92、および93の一塩基多型(SNP)データを示す。

【0175】

【図142】図142は、複数のドナーについての、PD-1、AAVS1、CISH、およびCTLA-4におけるSNP頻度を示す。

50

【0176】

【図143】図143は、TCRを発現し、CISHノックアウトを有するように操作された細胞のmTORアッセイからのデータを示す。データ概要は、電気穿孔後3、7、および14日目のものである。

【0177】

【図144】図144は、CRISPRおよびrAAVを使用して外因性TCRを発現し、CISHノックアウトを有するように操作されたT細胞についての、参照対照と比較したCISHのコピー数を示す。

【0178】

【図145】図145Aは、CISH KO後3、7、14日目における、GAPDH対照と対比したmTOR1のddPCRデータを示す。図145Bは、rAAVによるCISH KOおよびTCRノックイン後3、7、14日目における、TCR発現を示す。

10

【0179】

【図146】図146Aは、PD-1におけるインデルの存在についてのオフターゲット(OT)解析の概要を示す。図146Bは、CISHにおけるインデルの存在についてのオフターゲット解析の概要を示す。

【0180】

【図147】図147Aは、組み込んだTCRと比べた、デジタルPCRプライマーおよびプローブの配置を示す。図147Bは、非処理細胞およびCRISPR CISH KO+rAAV修飾細胞についての、参照遺伝子と比べた組み込んだTCRを示すデジタルPCRデータを示す。

20

【0181】

【図148】図148Aは、CISH KO細胞における、ddPCRによるTCRの組込みパーセントを示す。図148Bは、CRISPRの電気穿孔およびrAAV遺伝子導入後3、7、および14日目における、TCRの組込みおよびタンパク質発現を示す。

【0182】

【図149】図149は、非処理細胞およびCRISPR CTLA-4 KO+rAAV修飾細胞についての、参照遺伝子と比べた組み込んだTCRを示すデジタルPCRデータを示す。

30

【0183】

【図150】図150Aは、3、7、および14日の、CTLA-4 KO細胞におけるddPCRによるTCRの組込みパーセントを示す。図150Bは、CRISPR CTLA-4 KOの電気穿孔および外因性TCRをコードするrAAVの遺伝子導入後3、7、および14日目における、TCRの組込みおよびタンパク質発現を示す。

【0184】

【図151】図151は、rAAVのトランスフェクション(2×10^5 細胞の小規模トランスフェクションおよび 1×10^6 細胞の大規模トランスフェクション)およびCRISPRの電気穿孔後3、7、および14日目における、完全なTCR発現についてのフローサイトメトリーデータを示す。

40

【0185】

【図152】図152は、CRISPR処理細胞(2×10^5 細胞)におけるrAAVを遺伝子導入後14日の、FACS解析によるTCR発現を示す。細胞に、CRISPRおよび、CTLA-4またはPD-1に対するガイドRNAの電気穿孔も行った。

【0186】

【図153】図153は、複数のPBMCドナーについての、rAAVおよび、AAVS1、PD-1、CISH、またはCTLA-4におけるCRISPR KOを遺伝子導入後14日目のTCR発現パーセントを示す。

【0187】

【図154】図154は、8pmol二本鎖(ds)または16pmol dsドナー(ODN)を利用する、CISHにおけるGUIDE-seqデータを示す。

50

【0188】

【図155】図155Aは、PD-1に対する相同性アームを有する、外因性TCRをコードするrAAVベクターについてのベクターマップを示す。図155Bは、PD-1に対する相同性アームおよびMNDプロモーターを有する、外因性TCRをコードするrAAVベクターについてのベクターマップを示す。

【0189】

【図156】図156は、溶解緩衝液を使用しないまたは溶解緩衝液を用いる、単一細胞PCRの比較を示す。細胞はCRISP Rで処理され、CISH遺伝子においてノックアウトを有する。

【0190】

【図157】図157Aは、TCRノックインを示す概略を示す。図157Bは、rAAV-TCRノックインを有する細胞のウェスタンプロットを示す。

【0191】

【図158】図158は、CRISP Rおよび抗CISHガイドRNAをトランスフェクション後28日目の、CISH遺伝子座における単一細胞PCRを示す。細胞に、外因性TCRをコードするrAAVも遺伝子導入した。

【0192】

【図159】図159Aは、外因性TCRをコードするrAAVを遺伝子導入後7日目における、TCR発現を示す。図159Bは、外因性TCRをコードするrAAVを遺伝子導入後7日目におけるウェスタンプロットを示す。

10

【0193】

【図160】図160は、HIF-1および代謝へのその関与の概略を示す。

【発明を実施するための形態】

【0194】

開示の詳細な説明

以下の記載および実施例は、本開示の実施形態を詳細に例示する。本開示は、本明細書で記載される特定の実施形態に限定されるものではなく、したがって変化し得ることを理解されたい。当業者は、その範囲内に包含される本開示の多数の変形および改変が存在することを認識するであろう。

20

【0195】

定義

「AAV」または「組換えAAV」または「rAAV」という用語は、AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、もしくはAAV-12、自己相補的AAV(scaAAV)、rh10、もしくはハイブリッドAAVなどの公知の血清型のいずれかのアデノ随伴ウイルス、またはその任意の組合せ、誘導体、もしくは変異体を指す。AAVは、小さい非エンベロープ型一本鎖DNAウイルスである。それらは非病原性パルボウイルスであり、複製のために、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、およびCMVなどのヘルパーウイルスを必要としうる。野生型AAVは、一般的な集団において共通であり、いかなる公知の病原体とも関連しない。ハイブリッドAAVは、AAVおよび異なるウイルスに由来する遺伝子素材を含むAAVである。キメラAAVは、2つまたはそれよりも多いAAV血清型に由来する遺伝子素材を含むAAVである。AAV変異体は、その親AAVと比較して、そのカプシドタンパク質中に1または複数のアミノ酸変異を含むAAVである。本明細書で使用されるAAVは、鳥類AAV、ウシAAV、イヌAAV、ウマAAV、靈長類AAV、非靈長類AAV、およびヒツジAAVを含み、ここで、靈長類AAVは、非靈長類に感染するAAVを指し、非靈長類AAVは、鳥類動物に感染する鳥類AAVなどの、非靈長類動物に感染するAAVを指す。場合によって、野生型AAVは、repおよびcap遺伝子を含有し、ここで、rep遺伝子は、ウイルス複製にとって必要とされ、cap遺伝子は、カプシドタンパク質の合成にとって必要とされる。

30

40

50

【0196】

「組換えAAVベクター」または「rAAVベクター」または「AAVベクター」という用語は、上述のAAV血清型のいずれか由来のベクターを指す。場合によって、AAVベクターは、全体または部分、例えば、*r e p*および/*c a p*遺伝子が欠失したAAV野生型遺伝子のうちの1または複数を含み得るが、遺伝子治療のためのAAVウイルスのパッケージングおよび使用に必要とされる機能エレメントを含有する。例えば、オープンリーディングフレームまたはクローニングされた外因性配列を挟む機能的なITR (*i n v e r t e d t e r m i n a l r e p e a t*) またはITR配列は、AAVビリオンの複製およびパッケージングに重要であることが公知であるが、AAVが、本明細書で記載される実施形態、例えば、遺伝子治療または遺伝子送達系のための使用に適するよう、ITR配列は、ヌクレオチドの挿入、欠失、または置換を含んで、野生型ヌクレオチド配列から修飾され得る。一部の態様では、本明細書に参照により組み込まれる、Wu, Hum Gene Ther., 2007年、18巻(2号)：171～82頁で説明される通り、自己相補的ベクター(*s c*)、例えば、ウイルス第二鎖DNA合成のための必要条件をバイパスすることができ、トランス遺伝子タンパク質の発現のより高率を引き起こし得る自己相補的AAVベクターが使用され得る。一部の態様では、AAVベクターは、最適血清型、プロモーター、およびトランス遺伝子の選択を可能にするように作製され得る。場合によって、ベクターは、免疫細胞に選択的に結合または感染するターゲティングされたベクターまたは修飾ベクターであり得る。

10

【0197】

20

「AAVビリオン」または「rAAVビリオン」という用語は、本明細書で記載されるAAVベクターをキャプシド形成する少なくとも1つのAAVカプシドタンパク質を含むカプシドを含むウイルス粒子を指し、ベクターは、一部の実施形態において異種ポリヌクレオチド配列またはトランス遺伝子をさらに含み得る。

【0198】

30

本明細書で使用される基準数値およびその文法的同等物に関する、「約」という用語およびその文法的同等物は、その値からプラスまたはマイナス10%の範囲の値を含み得る。例えば、「約10」という量は、9～11の量を含む。基準数値に関する「約」という用語はまた、その値からプラスまたはマイナス10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%の範囲の値も含み得る。

【0199】

40

本明細書で使用される「活性化」という用語およびその文法的同等物は、細胞が、休眠状態から、活性状態へと移行する過程を指す場合がある。この過程は、抗原への応答、遊走、および/*または*機能的活性状態への、表現型もしくは遺伝子的变化を含み得る。例えば、「活性化」という用語は、T細胞活性化の段階的過程を指す場合がある。例えば、T細胞は、完全に活性化するのに、少なくとも2つのシグナルを要求し得る。第1のシグナルは、抗原-MHC複合体の、TCRへの係合の後で生じることが可能であり、第2のシグナルは、共刺激性分子の係合により生じ得る。*i n v i t r o*において、抗CD3は、第1のシグナルを模倣することが可能であり、抗CD28は、第2のシグナルを模倣し得る。

【0200】

本明細書で使用される「隣接する」という用語およびその文法的同等物は、基準の対象物のすぐ隣を指す場合がある。例えば、ヌクレオチド配列の文脈における隣接するという用語は、間にヌクレオチドを伴わないことを意味し得る。例えば、ポリヌクレオチドBと隣接するポリヌクレオチドAとは、AとBとの間にヌクレオチドを伴わないABを意味し得る。

【0201】

50

本明細書で使用される「抗原」という用語およびその文法的同等物は、1または複数の受容体が結合することが可能な、1または複数のエピトープを含有する分子を指す場合がある。例えば、抗原は、宿主の免疫系を刺激して、抗原が提示されている場合の、細胞性

の抗原特異的免疫応答をもたらす場合もあり、体液性抗体応答をもたらす場合もある。抗原はまた、それ自体により、または別の分子と組み合わせて存在する場合に、細胞性応答および／または体液性応答を誘発する能力も有し得る。例えば、腫瘍細胞抗原は、T C Rにより認識され得る。

【0202】

本明細書で使用される「エピトープ」という用語およびその文法的同等物は、抗体、B細胞、T細胞、または操作細胞により認識され得る、抗原の一部を指す場合がある。例えば、エピトープは、T C Rにより認識されるがんエピトープであり得る。また、抗原内の複数のエピトープも認識することができる。エピトープはまた、変異している場合もある。

10

【0203】

本明細書で使用される「自家」という用語およびその文法的同等物は、同じ存在に由来することを指す場合がある。例えば、試料（例えば、細胞）を採取し、加工し、後に同じ対象（例えば、患者）へと戻すことができる。自家工程は、ドナーとレシピエントとが異なる対象である、同種工程と区別される。

【0204】

「～へとバーコードづけされた」という用語は、第1の分子が、第2の分子を同定するのに使用し得るバーコードを含有する場合における、分子間の関係を指す。

【0205】

本明細書で使用される「がん」という用語およびその文法的同等物は、細胞の過剰増殖であって、その固有の形質（正常な制御の喪失）が、調節されていない増殖、分化の欠如、限局的な組織浸潤、および転移を結果としてもたらす過剰増殖を指す場合がある。本発明の方法との関連で、がんは、急性リンパ球がん、急性骨髓性白血病、胞巣状横紋筋肉腫、膀胱がん、骨がん、脳腫瘍、乳がん、肛門がん、肛門管がん、直腸がん、眼がん、肝臓内胆管がん、関節がん、頸部がん、胆嚢がん、または胸膜がん、鼻がん、鼻腔がん、または中耳がん、口腔がん、外陰がん、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髓性がん、結腸がん、食道がん、子宮頸がん、線維肉腫、消化管カルチノイド腫瘍、ホジキンリンパ腫、下咽頭がん、腎臓がん、喉頭がん、白血病、液性腫瘍、肝臓がん、肺がん、リンパ腫、悪性中皮腫、マスト細胞腫、黒色腫、多発性骨髓腫、鼻咽頭がん、非ホジキンリンパ腫、卵巣がん、膵臓がん、腹膜がん、網がん、および腸間膜がん、咽頭がん、前立腺がん、直腸がん、腎臓がん、皮膚がん、小腸がん、軟組織がん、固体腫瘍、胃がん、精巣がん、甲状腺がん、尿管がん、および／または膀胱がんのうちのいずれかを含む、任意のがんであり得る。本明細書で使用される「腫瘍」という用語は、細胞または組織の異常な増殖であって、例えば、悪性型または良性型の増殖を指す。

20

【0206】

本明細書で使用される「がんネオ抗原」または「ネオ抗原」または「ネオエピトープ」という用語およびその文法的同等物は、正常な、変異していない宿主のゲノム内ではコードされない抗原を指す場合がある。「ネオ抗原」は、場合によって、腫瘍形成性のウイルスタンパク質、または体細胞変異の帰結として発生する異常なタンパク質を表し得る。例えば、ネオ抗原は、ウイルスタンパク質の活性を介する、細胞機構の破壊により発生し得る。別の例は、場合によって、体細胞変異をもたらし得る、発がん性化合物への曝露であり得る。この体細胞変異は最終的に、腫瘍／がんの形成をもたらし得る。

30

【0207】

本明細書で使用される「細胞傷害作用」という用語は、細胞の正常状態の、意図されないかまたは所望されない変化を指す。細胞の正常状態とは、細胞傷害性組成物、細胞傷害剤、および／または細胞傷害性状態への細胞の曝露の前に顕在化されるかまたは存在する状態を指す場合がある。一般に、正常状態にある細胞とは、ホメオスタシスにある細胞である。細胞の正常状態の、意図されないかまたは所望されない変化は、例えば、細胞死（例えば、プログラム細胞死）、複製の潜在能の減殺、膜の完全性などの細胞の完全性の減殺、代謝活性の減殺、発生能の減殺、または本出願で開示される細胞傷害作用のうちのい

40

50

ずれかの形態で顕在化され得る。

【0208】

「細胞傷害作用を低減すること」または「細胞傷害作用を低減する」という語句は、細胞傷害性組成物、細胞傷害剤、および／または細胞傷害性状態への曝露時における、細胞の正常状態の、意図されないかまたは所望されない変化の程度または頻度の低減を指す。語句は、細胞傷害性組成物、細胞傷害剤、および／または細胞傷害性状態へと曝露された個々の細胞内の細胞傷害作用の程度を低減することを指す場合もあり、細胞の集団を、細胞傷害性組成物、細胞傷害剤、および／または細胞傷害性状態へと曝露した場合に、細胞傷害作用を呈する集団の細胞数を低減することを指す場合もある。

【0209】

本明細書で使用される「操作された」という用語およびその文法的同等物は、核酸、例えば、生物のゲノム内の核酸の、1または複数の変化を指す場合がある。「操作された」という用語は、遺伝子の変化、付加、および／または欠失を指す場合がある。操作細胞とはまた、遺伝子を付加し、欠失させ、かつ／または変化した細胞も指す場合がある。

【0210】

本明細書で使用される「細胞」または「操作細胞」または「遺伝子改変細胞」という用語およびこれらの文法的同等物は、ヒトまたは非ヒト動物起源の細胞を指す場合がある。「操作細胞」および「遺伝子改変細胞」という用語は、本明細書で互換的に使用される。

【0211】

本明細書で使用される「チェックポイント遺伝子」という用語およびその文法的同等物は、免疫応答の振幅を調節するように作用する阻害性過程（例えば、フィードバックループ）、例えば、有害な応答の、制御されない伝播を緩和させる、免疫阻害性フィードバックループ（例えば、CTLA-4 および PD-1）に関する、任意の遺伝子を指す場合がある。これらの応答は、感染症に対する免疫応答時に生じ得る付帯的な組織損傷に対して防御する分子シールド、および／または末梢における自己寛容の維持への寄与を含み得る。チェックポイント遺伝子の非限定的な例は、拡張 CD28 ファミリーの受容体のメンバーおよびそれらのリガンド、ならびに共阻害性経路（例えば、CTLA-4 および PD-1）に関する遺伝子を含み得る。「チェックポイント遺伝子」という用語はまた、免疫チェックポイント遺伝子も指す場合がある。

【0212】

「CRISPR」、「CRISPR系」、または「CRISPRヌクレアーゼ系」、およびこれらの文法的同等物は、DNAに結合する非コードRNA分子（例えば、ガイドRNA）と、ヌクレアーゼの機能性（例えば、2つのヌクレアーゼドメイン）を伴うCasタンパク質（例えば、Cas9）とを含み得る。例えば、Sander, J.D.ら、「CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes」、Nature Biotechnology、32巻：347～355頁（2014年）を参照されたい。例えば、Hsu, P.D.ら、「Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering」、Cell、157巻（6号）：1262～1278頁（2014年）もまた、参照されたい。

【0213】

本明細書で使用される「～を破壊すること」という用語およびその文法的同等物は、例えば、切断、欠失、挿入、変異、再配列、またはこれらの任意の組合せにより遺伝子を変化する工程を指す場合がある。破壊は、タンパク質発現のノックアウトまたはノックダウンをもたらす場合がある。ノックアウトは、完全または部分的ノックアウトであり得る。例えば、遺伝子は、ノックアウトまたはノックダウンにより破壊することができる。遺伝子の破壊は、遺伝子によりコードされるタンパク質の発現を部分的に低減することの場合もあり、これを完全に抑制することの場合もある。遺伝子の破壊はまた、異なる遺伝子、例えば、下流における遺伝子の活性化も引き起こし得る。場合によって、「～を破壊すること」という用語は、抑制すること、妨害すること、または操作することなどの用語と互換的に使用することができる。

10

20

30

40

50

【0214】

本明細書で使用される「機能」という用語およびその文法的同等物は、意図される目的を果たすか、有するか、またはこれに適う能力を指す場合がある。「機能的」とは、正常機能の、ベースラインから100%までの任意のパーセントを含み得る。例えば、機能的とは、正常機能の5、10、15、20、25、30、35、40、45、50, 55、60、65、70、75、80、85、90、95、および／もしくは100%を含み得るか、またはほぼこれらの比率を含み得る。場合によって、機能的という用語は、正常機能の100%またはほぼ100%を超える、例えば、正常機能の125、150、175、200、250、300%、および／もしくはこれを上回ることを意味し得る。

【0215】

本明細書で使用される「遺伝子編集」という用語およびその文法的同等物は、ゲノムにおいて、1または複数のヌクレオチドを挿入するか、置き換えるか、または除去する遺伝子操作を指す場合がある。遺伝子編集は、ヌクレアーゼ（例えば、天然で存在するヌクレアーゼまたは人工的に操作されたヌクレアーゼ）を使用して実施することができる。

【0216】

本明細書で使用される「変異」という用語およびその文法的同等物は、ポリヌクレオチド内の、1または複数のヌクレオチドの置換、欠失、および挿入を含み得る。例えば、ポリヌクレオチド（cDNA、遺伝子）配列内またはポリペプチド配列内で、最大1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、20、25、30、40、50、またはそれよりも多い、ヌクレオチド／アミノ酸を、置換し、欠失させ、かつ／または挿入することができる。変異は、遺伝子のコード配列またはその調節配列に影響を及ぼし得る。変異はまた、ゲノム配列構造、またはコードされるmRNAの構造／安定性にも影響を及ぼし得る。

【0217】

本明細書で使用される「非ヒト動物」という用語およびその文法的同等物は、ヒト以外の全ての動物種であって、天然動物の場合もあり、遺伝子改变された非ヒト動物の場合もある、非ヒト哺乳動物を含む動物種を含み得る。「核酸」、「ポリヌクレオチド」、「ポリ核酸」、および「オリゴヌクレオチド」という用語、ならびにこれらの文法的同等物は、互換的に使用することができ、直鎖状コンフォメーションまたは環状コンフォメーションにあり、一本鎖形態または二本鎖形態にある、デオキシリボヌクレオチドポリマーまたはリボヌクレオチドポリマーを指し得る。本開示の目的では、これらの用語は、長さに関して限定的とはみなされるべきではない。用語は、天然ヌクレオチドの類似体のほか、塩基部分、糖部分、および／またはリン酸部分（例えば、ホスホロチオエート骨格）において修飾されたヌクレオチドも包含し得る。用語の変化形はまた、脱メチル化、CpGメチル化の付加、細菌性メチル化の除去、および／または哺乳動物性メチル化の付加も包含し得る。一般に、特定のヌクレオチドの類似体は、同じ塩基対合特異性を有し得る、すなわち、Aの類似体は、Tと塩基対であり得る。

【0218】

本明細書で使用される「末梢血リンパ球」（PBL）という用語およびその文法的同等物は、血液（例えば、末梢血）中を循環するリンパ球を指す場合がある。末梢血リンパ球とは、臓器へと局在化しないリンパ球を指す場合がある。末梢血リンパ球は、T細胞、NK細胞、B細胞、またはこれらの任意の組合せを含み得る。

【0219】

本明細書で使用される「表現型」という用語およびその文法的同等物は、生物の観察可能な特徴または形質の複合物であって、その形状、発生、生化学的特性または生理学的特性、生物季節学、拳動、および拳動の結果などの複合物を指す場合がある。文脈に応じて、「表現型」という用語は、ある場合には、集団の観察可能な特徴または形質の複合物を指す。

【0220】

本明細書で使用される「プロトスペーサー」という用語およびその文法的同等物は、P

10

20

30

40

50

A Mに隣接する核酸配列であって、ガイドR N Aのスペーサー配列または操作されたターゲティング部分など、ガイドR N Aの部分にハイブリダイズすることが可能な核酸配列を指す場合がある。プロトスペーサーは、遺伝子内、ゲノム内、または染色体内のヌクレオチド配列であって、ガイドR N Aにターゲティングされるヌクレオチド配列であり得る。天然状態では、プロトスペーサーは、P A M(プロトスペーサー隣接モチーフ)と隣接する。R N Aにガイドされるヌクレアーゼの切断部位は、プロトスペーサー配列内にある。例えば、ガイドR N Aが、特異的プロトスペーサーをターゲティングする場合、C a sタンパク質は、プロトスペーサー配列内で二本鎖切断を生じ、これにより、プロトスペーサーを切断するであろう。切断後、プロトスペーサーの破壊は、非相同末端結合(N H E J)または相同性により導かれる修復(H D R)を結果としてもたらし得る。プロトスペーサーの破壊は、プロトスペーサーの欠失を結果としてもたらし得る。加えて、または代替的に、プロトスペーサーの破壊は、プロトスペーサーへと挿入されるか、またはこれを置き換える外因性核酸配列を結果としてもたらし得る。

10

【0221】

本明細書で使用される「レシピエント」という用語およびその文法的同等物は、ヒトまたは非ヒト動物を指す場合がある。レシピエントはまた、それを必要とするレシピエントでもあり得る。

20

【0222】

本明細書で使用される「組換え」という用語およびその文法的同等物は、2つのポリ核酸の間の遺伝情報の交換過程を指す場合がある。本開示の目的では、「相同組換え」または「H R」とは、例えば、二本鎖切断の修復時において生じ得る、このような遺伝子交換の特化形態を指す場合がある。この過程は、例えば、標的分子(例えば、二本鎖切断を経た分子)を修復するための鋳型として、ドナー分子を使用して、ヌクレオチド配列相同性を要求する場合があり、ある場合には、非交叉型遺伝子変換またはショートトラクト型遺伝子変換として公知である。このような移入はまた、破壊される標的とドナーとの間で形成されるヘテロ二重鎖D N Aのミスマッチの是正、および/または標的の一部となりうる遺伝情報を再合成するのにドナーを使用し得る合成依存性鎖アニーリング、および/または関連する過程も伴いうる。このような特化したH Rは、ドナーポリヌクレオチドの配列の一部または全部を、標的ポリヌクレオチドへと組み込みうるように、標的分子の配列の変化を結果としてもたらし得ることが多い。場合によって、「組換えアーム」という用語と、「相同性アーム」という用語は、本明細書で互換的に使用することができる。

30

【0223】

本明細書では、「標的ベクター」という用語と、「ターゲティングベクター」という用語とを、互換的に使用する。

【0224】

本明細書で使用される「トランス遺伝子」という用語およびその文法的同等物は、生物へと移入される遺伝子または遺伝子素材を指す場合がある。例えば、トランス遺伝子は、生物へと導入される遺伝子を含有する、D N Aの連なりまたはセグメントであり得る。トランス遺伝子を生物へと移入する場合、生物を、トランスジェニック生物と称する。トランス遺伝子は、トランスジェニック生物において、R N Aまたはポリペプチド(例えば、タンパク質)を産生するその能力を保持し得る。トランス遺伝子は、異なる核酸、例えば、R N AまたはD N Aから構成され得る。トランス遺伝子は、操作T細胞受容体、例えば、T C Rトランス遺伝子をコードし得る。トランス遺伝子は、T C R配列を含み得る。トランス遺伝子は、組換えアームを含み得る。トランス遺伝子は、操作部位を含み得る。

40

【0225】

本明細書で使用される「T細胞」という用語およびその文法的同等物は、任意の由來のT細胞を指す場合がある。例えば、T細胞は、初代T細胞、例えば、自家T細胞、細胞株などであり得る。T細胞はまた、ヒトT細胞の場合もあり、非ヒトT細胞の場合もある。

【0226】

本明細書で使用される「T I L」または腫瘍浸潤リンパ球という用語およびこれらの文

50

法的同等物は、腫瘍から単離された細胞を指す場合がある。例えば、TILは、腫瘍へと遊走した細胞であり得る。TILはまた、腫瘍に浸潤した細胞でもあり得る。TILは、腫瘍内で見出される任意の細胞であり得る。例えば、TILは、T細胞、B細胞、単球、ナチュラルキラー細胞、またはこれらの任意の組合せであり得る。TILは、混合細胞の集団であり得る。TILの集団は、表現型の異なる細胞、分化程度の異なる細胞、系統の異なる細胞、またはこれらの任意の組合せを含み得る。

【0227】

「治療効果」は、処置される状態に変化が見られる場合に生じ得る。変化は、肯定的変化の場合もあり、否定的変化の場合もある。例えば、「肯定的効果」は、対象における活性化T細胞数の増大に対応し得る。別の例では、「否定的効果」は、対象における腫瘍の量またはサイズの減少に対応し得る。少なくとも10%の改善、好ましくは、少なくとも25%、より好ましくは、少なくとも50%、なおより好ましくは、少なくとも75%、および最も好ましくは、100%の改善が見られる場合に、処置される状態には「変化」が見られる。変化は、個体において処置される状態の重症度の改善に基づく場合もあり、本発明の組成物をそれと組み合わせて投与する治療用組成物による処置を伴う個体およびこれを伴わない個体の集団における、状態の改善の頻度の差違に基づく場合もある。同様に、本開示の方法は、対象へと、「治療有効」量の細胞を投与するステップを含み得る。「治療的に有効な」という用語は、「治療効果を及ぼすこと」に対応する定義を有するように理解されるべきである。

10

【0228】

本明細書で使用される「セーフハーバー」および「免疫セーフハーバー」という用語ならびにこれらの文法的同等物は、外因性核酸を組み込むために使用され得るゲノム内の場所であって、組込みが、核酸単独の添加により、宿主細胞の増殖に対して、著明な効果を引き起こさない場所を指す場合がある。セーフハーバーの非限定的な例は、Hprt、AAVS部位（例えば、AAVS1、AAVS2など）、CCR5、またはRosa26を含み得る。例えば、ヒトパルボウイルス、AAVは、ヒト染色体19q13.3-qterまたはAAVS1遺伝子座に優先的に組み込まれることが公知である。AAVS1遺伝子座での目的の遺伝子の組込みは、様々な細胞型におけるトランス遺伝子の安定な発現を支援し得る。場合によって、ヌクレアーゼを操作して、AAVS1遺伝子座での二本鎖切断の作製をターゲティングしてAAVS1遺伝子座でのトランス遺伝子の組み込みを可能にする場合もあり、AAVS1部位での外因性核酸配列、例えば、トランス遺伝子、細胞受容体、または本明細書で開示する任意の目的の遺伝子の組み込みのためにAAVS1遺伝子座での相同組換えを容易とする場合もある。場合によって、AAVウイルスベクターは、外因性ヌクレアーゼを伴うかまたは伴わないAAVS1部位での組み込みのためにトランス遺伝子を送達するために使用される。

20

30

【0229】

本明細書で使用される「配列」という用語およびその文法的同等物は、DNAの場合もあり、RNAの場合もあり；直鎖状の場合もあり、環状の場合もあり、分枝状の場合もあり；一本鎖の場合もあり、二本鎖の場合もある、ヌクレオチド配列を指す場合がある。配列は、変異させることができる。配列は、任意の長さ、例えば、2~1,000,000の間、またはそれよりも多いヌクレオチドの長さ（またはこれらの間であるか、もしくはこれらを上回る、任意の整数値）、例えば、約100~約10,000ヌクレオチドの間または約200~約500ヌクレオチドの間であり得る。

40

【0230】

「ウイルスベクター」という用語は、ウイルスに由来する遺伝子移入ベクターまたは遺伝子送達系を指す。このようなベクターは、当技術分野で公知の組換え技法を使用して構築することができる。一部の態様では、このようなベクターを派生させるためのウイルスは、アデノ随伴ウイルス（AAV）、ヘルパー依存性アデノウイルス、ハイブリッドアデノウイルス、エピスタイン・バーウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、単純ヘルペスウイルス、センダイウイルス（HVJ）、モロニーマウス白血病ウイルス、ポックス

50

ウイルス、およびHIVベースのウイルスから選択される。

【0231】

概観

本明細書では、遺伝子改変細胞の集団を产生する方法が開示される。場合によって、少なくとも1つの方法は、ヒト対象に由来する細胞の集団を提供するステップを含む。場合によって、少なくとも1つの方法は、少なくとも1個の遺伝子（例えば、サイトカイン誘導性SH2含有タンパク質（CISH）遺伝子および/またはTCR細胞受容体（TCR）遺伝子）中に少なくとも1個の切断を導入することによって細胞の前記集団中の少なくとも1個の細胞を改変すること（例えば、ex vivoで）を含む。場合によって、切断は、前記少なくとも1個の遺伝子のタンパク質機能を抑制しうる（例えば、CISHおよび/またはTCRタンパク質機能を抑制する）。場合によって、遺伝子抑制は、部分的または完全であり得る。場合によって、切断は、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（CRISPR）系および/またはガイドポリ核酸を使用して導入される。場合によって、切断は、ヌクレアーゼおよび/またはガイドポリ核酸を含むCRISPR系を使用して導入される。場合によって、切断は、ヌクレアーゼまたはヌクレアーゼおよび/もしくはガイドポリ核酸を含むポリペプチドを使用して導入される。場合によって、ガイドポリ核酸は、少なくとも1個の細胞または複数の細胞中の少なくとも1個の遺伝子（例えば、CISHおよび/またはTCR）に特異的に結合する。場合によって、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターは、細胞の前記集団中の少なくとも1個の細胞に導入される。場合によって、前記AAVは、TCR細胞受容体（TCR）をコードする少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を含む。場合によって、前記AAVは、前記外因性トランス遺伝子を、前記少なくとも1個の細胞のゲノム中に組み込む。場合によって、前記AAVは、CRISPR系および/またはガイドポリ核酸および/またはヌクレアーゼもしくはヌクレアーゼをコードするポリペプチドの後に、それと同時に、またはその前に導入される。場合によって、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を、ミニサークルベクターを使用して少なくとも1個の細胞のゲノム中に組み込むことができる。場合によって、前記少なくとも1個の外因性トランス遺伝子は、前記切断において、組み込まれる。場合によって、前記少なくとも1個の外因性トランス遺伝子は、前記ゲノム中にランダムに、および/または部位特異的に組み込まれる。場合によって、前記少なくとも1個の外因性トランス遺伝子は、前記ゲノム中に少なくとも1回組み込まれる。場合によって、AAVベクターを使用する前記少なくとも1個の外因性トランス遺伝子の組込みは、同等の細胞中でのミニサークルベクターの使用と比較して細胞毒性を低減する。場合によって、細胞の前記集団は、前記AAVベクターの導入後約4日で少なくとも約90%の生細胞を含む。場合によって、細胞生存率は、蛍光活性化細胞分取（FACS）によって測定される。場合によって、遺伝子改変細胞の前記集団中の細胞の少なくとも約10%が、前記少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を発現する。場合によって、前記AAVベクターは、修飾AAVを含む。

【0232】

本明細書では、ヒト対象におけるがんを処置する方法が開示される。1つの場合には、方法は、治療有効量のex vivoで遺伝子改変された細胞の集団を、ヒト対象に投与するステップを含む。場合によって、前記ex vivoで遺伝子改変された細胞の少なくとも1個は、少なくとも1個の遺伝子（例えば、サイトカイン誘導性SH2含有タンパク質（CISH）遺伝子および/またはTCR）中にゲノム変化を含む。場合によって、前記ゲノム変化は、前記少なくとも1個のex vivoで遺伝子改変された細胞中の前記少なくとも1個の遺伝子（例えば、CISHおよび/またはTCR）のタンパク質機能の抑制（例えば、部分的な、または完全な）をもたらす。場合によって、前記ゲノム変化は、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（CRISPR）系によって導入される。場合によって、前記少なくとも1個のex vivoで遺伝子改変された細胞は、TCR細胞受容体（TCR）をコードする外因性トランス遺伝子をさらに含む。場合によって、前記外因性トランス遺伝子は、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターによって

10

20

30

40

50

前記少なくとも 1 個の遺伝子改変細胞のゲノム中に導入される。場合によって、治療有効量の遺伝子改変細胞の前記集団の投与は、ヒト対象におけるがんを処置するか、またはがんの少なくとも 1 つの症状を改善する。場合によって、前記 AAV ベクターは、修飾 AAV を含む。

【 0 2 3 3 】

本明細書では、遺伝子改変細胞の ex vivo 集団が開示される。1 つの場合には、遺伝子改変細胞の ex vivo 集団は、少なくとも 1 個の遺伝子（例えば、サイトカイン誘導性 SH2 含有タンパク質（CISH）遺伝子および / または TCR 遺伝子）中に外因性ゲノム変化を含む。場合によって、前記ゲノム変化は、少なくとも 1 個の遺伝子改変細胞中の前記少なくとも 1 個の遺伝子（例えば、CISH および / または TCR）のタンパク質機能を抑制する。場合によって、前記集団は、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターをさらに含む。場合によって、前記集団は、AAV ベクターよりもむしろミニサークルベクターを含む。場合によって、前記 AAV ベクター（またはミニサークルベクター）は、少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を含む。場合によって、前記外因性トランス遺伝子は、前記少なくとも 1 個の遺伝子改変細胞のゲノム中への挿入のための T 細胞受容体（TCR）をコードする。場合によって、前記 AAV ベクターは、修飾 AAV を含む。場合によって、前記 AAV ベクターは、非修飾または野生型 AAV を含む。場合によって、治療有効量の前記集団は、がんを処置または改善するために対象に投与される。場合によって、前記治療有効量の前記集団は、それぞれ、対応する非修飾もしくは野生型 AAV ベクターまたはミニサークルからもたらされる同じ治療効果を提供するのに必要とされる細胞数と比較して、より少数の細胞を含む。
10

【 0 2 3 4 】

本明細書では、少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を細胞に導入するための系が開示される。場合によって、系は、ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含む。場合によって、前記系は、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターをさらに含む。場合によって、前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドは、少なくとも 1 個の細胞の少なくとも 1 個の遺伝子（例えば、サイトカイン誘導性 SH2 含有タンパク質（CISH）遺伝子および / または TCR 遺伝子）中に二本鎖切断を導入する。場合によって、前記 AAV ベクターは、少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を、前記細胞のゲノム中に導入する。場合によって、前記少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子は、T 細胞受容体（TCR）をコードする。場合によって、系は、AAV ベクターよりもむしろミニサークルベクターを含む。場合によって、前記ミニサークルベクターは、少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を、細胞のゲノム中に導入する。場合によって、前記系は、ミニサークルと、前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含む同様の系と比較して、前記ゲノム中への前記トランス遺伝子の導入のより高い効率を有し、より低い細胞毒性をもたらし、ここで、前記ミニサークルは、前記少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を前記ゲノム中に導入する。場合によって、前記 AAV ベクターは、修飾 AAV を含む。場合によって、前記 AAV ベクターは、非修飾または野生型 AAV を含む。
20

【 0 2 3 5 】

本明細書では、ヒト対象におけるがんを処置する方法が開示される。場合によって、がんを処置する方法は、ヒト対象に由来する細胞集団中の少なくとも 1 個の遺伝子（例えば、サイトカイン誘導性 SH2 含有タンパク質（CISH）遺伝子および / または TCR 遺伝子）を ex vivo で改変するステップを含む。場合によって、前記改変は、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（CRISPR）系を使用することを含む。場合によって、前記改変は、ガイドポリ核酸および / またはヌクレアーゼもしくはヌクレアーゼを含むポリペプチドを使用することを含む。場合によって、前記 CRISPR 系（または前記ガイドポリ核酸および / またはヌクレアーゼもしくはヌクレアーゼを含むポリペプチド）は、前記少なくとも 1 個の遺伝子（例えば、CISH 遺伝子および / または TCR 遺伝子）中に二本鎖切断を導入して、操作細胞の集団を生成する。場合によって、
30

10

20

30

40

50

、前記方法は、がん応答性受容体を、前記操作細胞の集団中に導入するステップをさらに含む。場合によって、前記導入は、アデノ随伴ウイルス遺伝子送達系を使用して、前記二本鎖切断に少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を組み込むことによって、がん応答性細胞の集団を生成することを含む。場合によって、前記導入は、ミニサークル非ウイルス遺伝子送達系を使用して、前記二本鎖切断に少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を組み込むことによって、がん応答性細胞の集団を生成することを含む。場合によって、前記アデノ随伴ウイルス遺伝子送達系は、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを含む。場合によって、前記方法は、治療有効量のがん応答性細胞の前記集団を、前記対象に投与するステップをさらに含む。場合によって、前記AAVベクターは、修飾AAVを含む。場合によって、前記AAVベクターは、非修飾または野生型AAVを含む。場合によって、治療有効量のがん応答性細胞の前記集団は、がんを処置または改善するために対象に投与される。場合によって、前記治療有効量のがん応答性細胞の前記集団は、それぞれ、対応する非修飾もしくは野生型AAVベクターまたはミニサークルからもたらされる同じ治療効果を提供するのに必要とされる細胞数と比較して、より少数の細胞を含む。

10

【0236】

本明細書では、遺伝子改変細胞を作製する方法が開示される。場合によって、方法は、宿主細胞の集団を提供することを含む。場合によって、方法は、修飾アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターおよびクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート(CRISPR)系を導入するステップを含む。場合によって、方法は、ミニサークルベクターおよびクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート(CRISPR)系を導入するステップを含む。場合によって、CRISPR系は、ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含む。場合によって、前記ヌクレアーゼは、少なくとも1個の遺伝子(サイトカイン誘導性SH2含有タンパク質(CISH)遺伝子および/またはTCR遺伝子)中に切断を導入する。場合によって、前記AAVベクターは、外因性核酸を導入する。場合によって、前記ミニサークルベクターは、外因性核酸を導入する。場合によって、前記外因性核酸は、前記切斷において導入される。一部の実施形態では、前記少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を組み込むための前記AAVベクターの使用は、同等の細胞中に前記少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を組み込むためのミニサークルベクターの使用と比較して細胞毒性を低減する。場合によって、前記外因性核酸は、前記CRISPR系と対応する非修飾または野生型AAVベクターとが導入された同等の宿主細胞の集団と比較して、より高い効率で導入される。

20

【0237】

本明細書では、遺伝子改変された腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を產生する方法が開示される。1つの場合には、方法は、ヒト対象に由来するTILの集団を提供するステップを含む。場合によって、方法は、前記TILの集団に、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート(CRISPR)系をex vivoで電気穿孔するステップを含む。場合によって、前記CRISPR系は、ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドと、少なくとも1個のガイドポリ核酸(例えば、ガイドリボ核酸(gRNA))とを含む。場合によって、前記CRISPR系は、ガイドリボ核酸(gRNA)を含むヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含む。場合によって、前記gRNAは、少なくとも1個の遺伝子(サイトカイン誘導性SH2含有タンパク質(CISH)遺伝子および/またはTCR)と相補的な配列を含む。場合によって、前記少なくとも1個のgRNAは、第1の遺伝子(例えば、サイトカイン誘導性SH2含有タンパク質(CISH)遺伝子)と相補的な配列を含むgRNAと、第2の遺伝子(例えば、T細胞受容体(TCR)遺伝子)と相補的な配列を含むgRNAとを含む。場合によって、前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドは、前記TILの集団中の少なくとも1個のTILの前記少なくとも1個の遺伝子(例えば、CISH遺伝子および/またはTCR)中に二本鎖切断を導入する。場合によって、前記ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドは、前記TILの集団中の少なくとも1個のTILの前記第1の遺伝子(例えば、CISH遺伝

30

40

50

子)および/または前記第2の遺伝子(例えば、TCR遺伝子)中に二本鎖切断を導入する。場合によって、前記ヌクレアーゼは、Cas9であるか、または前記ポリヌクレオチドは、Cas9をコードする。場合によって、方法は、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを、前記TILの集団中の前記少なくとも1個のTILに導入するステップをさらに含む。場合によって、前記導入は、前記CRISPR系の電気穿孔後、約1時間~約4日を含む。場合によって、前記AAVベクターは、前記CRISPR系の電気穿孔後、約1時間よりいくらか後の時間に導入される(例えば、前記CRISPR系の前記電気穿孔の10時間後、1日後、2日後、5日後、10日後、30日後、1ヶ月後、2ヶ月後など)。場合によって、前記AAVベクターは、前記CRISPR系の電気穿孔の前に導入される(例えば、前記CRISPR系の前記電気穿孔の30分前、1時間前、2時間前、5時間前、10時間前、18時間前、1日前、2日前、3日前、5日前、8日前、10日前、30日前、1ヶ月前、2ヶ月前など)。場合によって、前記導入は、少なくとも1個の外因性トランスクレオチドを、前記二本鎖切断中に、または前記二本鎖切断の少なくとも1個中に組み込む。場合によって、前記少なくとも1個の外因性トランスクレオチドは、T細胞受容体(TCR)をコードする。場合によって、前記AAVベクターは、修飾AAVを含む。場合によって、前記AAVベクターは、非修飾または野生型AAVを含む。

10

【0238】

場合によって、本明細書に開示される方法のいずれかおよび/または系のいずれかは、ヌクレアーゼまたはヌクレアーゼをコードするポリペプチドをさらに含み得る。場合によって、本明細書に開示される方法のいずれかおよび/または系のいずれかは、ガイドポリ核酸をさらに含み得る。場合によって、本明細書に開示される方法のいずれかおよび/または系のいずれかは、電気穿孔および/またはヌクレオフェクションを含み得る。

20

【0239】

細胞

本明細書に開示される組成物および方法は、細胞を用いることができる。細胞は、初代細胞であり得る。初代細胞は、初代リンパ球であり得る。初代細胞の集団は、初代リンパ球の集団であり得る。細胞は、組換え細胞であり得る。細胞は、末梢血単核細胞、骨髓、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位に由来する組織、腹水、胸水、脾臓組織、および腫瘍を含む、多数の非限定的な供給源から得ることができる。例えば、任意のT細胞株を使用することができる。代替的に、細胞は、健常ドナーに由来する場合もあり、がんを伴うと診断された患者に由来する場合もあり、感染を伴うと診断された患者に由来する場合もある。別の場合では、細胞は、異なる表現型特徴を提示する混合細胞の集団の一部であり得る。細胞はまた、細胞療法バンクから得ることもできる。免疫抑制処置に対して抵抗性の破壊された細胞を得ることができる。所望の細胞の集団はまた、改変の前に選択することもできる。選択は、磁気分離、フローサイトメトリー選択、抗生物質選択のうちの少なくとも1つを含み得る。1個または複数の細胞は、末梢血単核細胞(PBMC)、リンパ球、単球またはマクロファージなどの任意の血液細胞であり得る。1個または複数の細胞は、リンパ球、B細胞、またはT細胞などの任意の免疫細胞であり得る。細胞を、自然食品、アフェレーシス、または対象の腫瘍試料から得ることもできる。細胞は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)であり得る。場合によって、アフェレーシスは、白血球アフェレーシスであり得る。白血球アフェレーシスは、血液細胞が血液から単離される手順であり得る。白血球アフェレーシス中に、血液を対象の腕の中の針から除去し、全血を赤血球、血漿およびリンパ球に分ける機械を通して循環させた後、血漿および赤血球を、他方の腕の中の針を通して対象に戻すことができる。場合によって、細胞は、処置レジメンおよび細胞療法の投与後に単離される。例えば、アフェレーシスを、細胞投与と連続的または同時に実施することができる。場合によって、アフェレーシスは、細胞生成物の投与前および投与の最大約6週間に実施される。場合によって、アフェレーシスは、細胞生成物の投与後、-3週、-2週、-1週、0、1週、2週、3週、4週、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、または最大約10年で実施される。場

30

40

50

合によって、アフェレーシスによって獲得された細胞は、特異的溶解に関する試験、サイトカイン放出、メタボロミック試験、バイオエナジエティックス試験、サイトカイン産生の細胞内FACs、ELISA - スポットアッセイ、およびリンパ球サブセット解析を受ける。場合によって、細胞生成物またはアフェレーシス生成物の試料を、注入された細胞表現型および機能の後ろ向き解析のために凍結保存することができる。

【0240】

本明細書では、細胞内ゲノム移植を実施するために有用な、組成物および方法が開示される。ゲノム移植のための例示的な方法は、全体が参考により本明細書に組み込まれるPCT/US2016/044858に記載されている。細胞内ゲノム移植は、治療適用のために、細胞および核酸を遺伝子改変することを含み得る。全体を通して記載される組成物および方法は、操作細胞の、生理学的および免疫学的な抗腫瘍効力を改善する形で、腫瘍特異的TCRを送達するために、核酸を媒介する遺伝子操作工程を使用し得る。効果的な養子細胞移入ベースの免疫療法(ACT)は、がん(例えば、転移性がん)患者を処置するのに有用であり得る。例えば、ウイルスまたは非ウイルス法を使用して、がん細胞上の固有の変異であるネオ抗原を認識するT細胞受容体(TCR)などのトランス遺伝子を発現するように、自家末梢血リンパ球(PBL)を改変し、開示される、細胞内ゲノム移植の組成物および方法において使用することができる。ネオ抗原は、変異負荷が大きな腫瘍と関連しうる(図58)。

10

【0241】

細胞は、遺伝子改変された、または操作されたものであり得る。細胞(例えば、遺伝子改変細胞、または操作細胞)は、患者に投与されたらその性能を改善し得る条件で、増殖および拡大することができる。操作細胞は、選択することができる。例えば、細胞の拡大および操作の前に、様々な非限定的な方法により、細胞の供給源を、対象から得ることができる。細胞は、末梢血単核細胞、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位に由来する組織、腹水、胸水、脾臓組織、および腫瘍を含む、多数の非限定的な供給源から得ることができる。例えば、任意のT細胞株を使用することができる。代替的に、細胞は、健常ドナーに由来する場合もあり、がんを伴うと診断された患者に由来する場合もあり、感染を伴うと診断された患者に由来する場合もある。別の場合には、細胞は、異なる表現型特徴を提示する混合細胞の集団の一部であり得る。細胞株はまた、既に記載されている方法に従い、形質転換されたT細胞から得ることもできる。細胞はまた、細胞療法バンクから得ることもできる。免疫抑制処置に対して抵抗性の改変細胞を得ることができる。所望の細胞の集団はまた、改変の前に選択することもできる。操作細胞の集団はまた、改変の後で選択することもできる。

20

30

【0242】

場合によって、操作細胞は、自家移植において使用することができる。代替的に、操作細胞は、同種移植において使用することができる。場合によって、操作細胞は、がん関連標的配列および/またはトランス遺伝子(例えば、TCRトランス遺伝子)を同定するのにその試料が使用された同じ患者へと投与することができる。場合によって、操作細胞は、がん関連標的配列および/またはトランス遺伝子(例えば、TCRトランス遺伝子)を同定するのにその試料が使用された患者と異なる患者へと投与することができる。1または複数の相同組換えエンハンサーは、本開示の細胞と共に導入することができる。エンハンサーは、二本鎖切断の、相同性により導かれる修復を容易とし得る。エンハンサーは、トランス遺伝子(例えば、TCRトランス遺伝子)の本開示の細胞への組込みを容易とし得る。エンハンサーは、二本鎖切断の、相同性により導かれる修復が優先的に生じるように、非相同末端結合(NHEJ)を遮断し得る。

40

【0243】

1または複数のサイトカインは、本開示の細胞と共に導入することができる。サイトカインは、細胞傷害性Tリンパ球(養子移入させる腫瘍特異的細胞傷害性Tリンパ球を含む)をブーストして、腫瘍微小環境内で拡大するのに用いることができる。場合によって、IL-2を使用して、本明細書で記載される細胞の拡大を容易とすることができます。IL

50

- 15などのサイトカインもまた、利用することができる。IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21、またはこれらの任意の組合せなど、免疫療法の分野において妥当である、他のサイトカインもまた、用いることができる。場合によって、IL-2、IL-7、およびIL-15を使用して、本発明の細胞を培養する。

【0244】

場合によって、細胞は、*in vivo*細胞性能を改善するための薬剤、例えば、S-2-ヒドロキシグルタル酸塩(S-2HG)で処理することができる。S-2HGでの処理は、非処理細胞と比較して、細胞増殖および*in vivo*での持続性を改善し得る。S-2HGはまた、S-2HGで処理していない細胞と比較して、処理細胞において抗腫瘍効能を改善し得る。場合によって、S-2HGでの処理は、CD62Lの発現増大をもたらし得る。場合によって、S-2HGで処理した細胞は、非処理細胞と比較して、より高レベルのCD127、CD44、4-1BB、Eomesを発現し得る。場合によって、S-2HGで処理した細胞は、非処理細胞と比較して、PD-1の発現低減を有し得る。CD127、CD44、4-1BB、およびEomesのレベルの増大は、非処理細胞と比較して、S-2HGで処理した細胞におけるCD127、CD44、4-1BB、およびEomesの発現において約5%～約700%、例えば、約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、または最大で700%の増大であり得る。場合によって、S-2HGで処理した細胞は、非処理細胞と比較して、フローサイトメトリー解析により測定される約5%～約700%増大した細胞拡大および/または増殖、例えば、非処理細胞と比較して、フローサイトメトリー解析により測定される約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、または最大で700%増大した細胞拡大および/または増殖を有し得る。

10

20

30

30

40

50

【0245】

S-2HGで処理される細胞は、約10μM～約500μMの濃度に曝露され得る。濃度は、約10μM、20μM、30μM、40μM、50μM、60μM、70μM、80μM、90μM、100μM、150μM、200μM、250μM、300μM、350μM、400μM、450μM、または最大で500μMであり得る。

【0246】

細胞傷害作用は一般に、細胞に対して毒性である、組成物、薬剤、および/または状態(例えば、外因性DNA)の資質を指す場合がある。一部の様態では、本開示の方法は一般に、遺伝子改変時に、1または複数の細胞へと導入される、外因性DNAの細胞傷害効果を低減することに関する。場合によって、細胞傷害作用、または細胞に対して細胞傷害性である物質の効果は、DNAの切断、細胞死、オートファジー、アポトーシス、核凝縮、細胞の溶解、壊死、細胞運動性の変化、細胞硬直性の変化、細胞質タンパク質発現の変化、膜タンパク質発現の変化、所望されない細胞分化、膨張、膜完全性の喪失、代謝活性の停止、代謝活性の低下、代謝活性の亢進、反応性酸素分子種の増大、細胞質の収縮、炎症促進性サイトカイン(例えば、DNAセンシング経路の産物としての)の産生、またはこれらの任意の組合せを含み得る。炎症促進性サイトカインの非限定的な例は、インターロイキン6(IL-6)、インターフェロンアルファ(IFN)、インターフェロンベータ(IFN)、C-Cモチーフリガンド4(CCL4)、C-Cモチーフリガンド5(CCL5)、C-X-Cモチーフリガンド10(CXCL10)、インターロイキン1ベータ(IL-1)、IL-18およびIL-33を含む。場合によって、細胞傷害作用は、トランス遺伝子またはTCRなど、ポリ核酸の導入の影響を受ける場合がある。細胞傷害作用の変化を、当技術分野で公知である、多数の方式のうちのいずれかにより測定することができる。場合によって、細胞傷害作用の変化は、細胞死または所望されない細胞分化など、細胞傷害作用関連効果の発生の程度および/または頻度に基づき評価することができる。場合によって、細胞傷害作用の低減は、当技術分野で公知のアッセイであつ

て、色素除外、細胞の生存率と関連する形状特徴の検出、損傷および／または死、ならびに目的の細胞型と関連する酵素活性および／または代謝活性の測定など、標準的な検査室法を含むアッセイを使用して、細胞毒性の量を測定することにより評価する。

【0247】

場合によって、ゲノム移植を経る細胞は、組織または細胞と共に培養することにより、活性化させることもでき、拡大することもできる。細胞は、抗原提示細胞であり得る。人工抗原提示細胞（aAPC）は、T細胞受容体および共刺激性分子に対するリガンドを発現することが可能であり、場合によって、それらの効力および機能を改善しながら、移入のためのT細胞を活性化させ、拡大し得る。aAPCは、T細胞活性化のための任意の遺伝子を発現するように操作することができる。aAPCは、T細胞拡大のための任意の遺伝子を発現するように操作することができる。aAPCは、ビーズ、細胞、タンパク質、抗体、サイトカイン、またはこれらの任意の組合せであり得る。aAPCは、ゲノム移植を経る可能性のある細胞の集団へと、シグナルを送達し得る。例えば、aAPCは、シグナル1、シグナル2、シグナル3、またはこれらの任意の組合せを送達し得る。シグナル1は、抗原認識シグナルであり得る。例えば、シグナル1は、TCRへの、ペプチド-MHC複合体のライゲーション、またはCD3に対するアゴニスト抗体であって、CD3シグナル-形質導入複合体の活性化をもたらし得るアゴニスト抗体の結合であり得る。シグナル2は、共刺激性シグナルであり得る。例えば、共刺激性シグナルは、それぞれ、ICOS-L、CD70、および4-1BBLに結合する、抗CD28、誘導性共刺激因子（ICOS）、CD27、および4-1BB（CD137）であり得る。シグナル3は、サイトカインシグナルであり得る。サイトカインは、任意のサイトカインであり得る。サイトカインは、IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21、またはこれらの任意の組合せであり得る。

10

20

30

40

50

【0248】

場合によって、人工抗原提示細胞（aAPC）を使用して、細胞の集団を活性化させ、かつ／または拡大することができる。場合によって、人工抗原提示細胞は、アロ特異性を誘導しない。aAPCは場合によって、HLAを発現しない。aAPCは、活性化および／または刺激のために使用し得る遺伝子を安定的に発現するように、遺伝子改変することができる。場合によって、K562細胞を、活性化のために使用することができる。K562細胞はまた、拡大のために使用することもできる。K562細胞は、ヒト赤白血病細胞株であり得る。K562細胞は、目的の遺伝子を発現するように操作することができる。K562細胞は、HLAクラスI分子、HLAクラスII分子、またはCD1d分子を内因的に発現しえないが、ICAM-1（CD54）およびLFA-3（CD58）を発現し得る。K562は、シグナル1を、T細胞へと送達するように操作することができる。例えば、K562細胞は、HLAクラスIを発現するように操作することができる。場合によって、K562細胞は、B7、CD80、CD83、CD86、CD32、CD64、4-1BBL、抗CD3、抗CD3 mAb、抗CD28、抗CD28 mAb、CD1d、抗CD2、膜結合型IL-15、膜結合型IL-17、膜結合型IL-21、膜結合型IL-2、切断型CD19、または任意の組合せなど、さらなる分子を発現するように操作することができる。場合によって、操作K562細胞は、CD80およびCD83に加えて、抗CD3 mAbの膜形態である、クローンOKT3を発現し得る。場合によって、操作K562細胞は、CD80およびCD83に加えて、抗CD3 mAbの膜形態である、クローンOKT3、抗CD28 mAbの膜形態を発現し得る。

【0249】

aAPCは、ビーズであり得る。球形ポリスチレンビーズを、CD3およびCD28に対する抗体でコーティングし、T細胞を活性化させるために使用することができる。ビーズは、任意のサイズであり得る。場合によって、ビーズは、3および6マイクロメートルであり得るか、またはほぼこの長さであり得る。ビーズは、4.5マイクロメートルのサイズであり得るか、またはほぼこのサイズであり得る。ビーズは、任意の細胞対ビーズ比で用いることができる。例えば、1ミリメートル当たり100万個の細胞で、3対1のビ

ーズ対細胞比を使用することができる。a A P C はまた、剛性球形粒子、ポリスチレンラテックスマイクロビーズ、磁性ナノ粒子または磁性マイクロ粒子、ナノサイズ量子ドット、4、ポリ(乳酸-co-グリコール酸)(P L G A)マイクロスフェア、非球形粒子、5、カーボンナノチューブバンドル、6、橢円体のP L G Aマイクロ粒子、7、ナノワーム、流体脂質二重層含有系、8、2 D 支援型脂質二重層(2 D - S L B)、9、リポソーム、10、R A F T ソーム/マイクロドメインリポソーム、11、S L B 粒子、またはこれらの任意の組合せでもあり得る。

【0250】

場合によって、a A P C は、C D 4 T 細胞を拡大し得る。例えば、a A P C は、H L A クラスI I 拘束性C D 4 T 細胞の抗原プロセシングおよび提示経路を模倣するように操作することができる。K 5 6 2 は、H L A - D 、D P . D P 鎖、I i 、D M 、D M 、C D 8 0 、C D 8 3 、またはこれらの任意の組合せを発現するように操作することができる。例えば、操作K 5 6 2 細胞は、H L A 拘束性抗原特異的C D 4 T 細胞を拡大するために、H L A 拘束性ペプチドでパルスすることができる。

10

【0251】

場合によって、a A P C の使用は、細胞(例えばT 細胞)の活性化、拡大、または任意の組合せのために外因的に導入されるサイトカインと組み合わせることができる。細胞はまた、i n v i v o において、例えば、ゲノム移植された細胞の、対象への投与の後ににおける、対象の血液中で拡大することもできる。

20

【0252】

細胞内ゲノム移植のためのこれらの組成物および方法は、がん治療に、多くの利点をもたらし得る。例えば、これらの組成物および方法は、高効率の遺伝子の移入、発現、細胞生存率の増大、組換え誘導性二本鎖切断の効率的導入、および非相同末端結合(N H E J)機構により、相同性により導かれる修復(H D R)を優先する工程、および相同な組換え体の効率的回収および拡大をもたらし得る。

30

【0253】

細胞内ゲノム移植

細胞内ゲノム移植は、治療適用のために、細胞および核酸を遺伝子改変する方法であり得る。全体を通して記載される組成物および方法は、T 細胞の、生理学的および免疫学的な抗腫瘍効力を攪乱せずに置く方法で腫瘍特異的なT C R の発現のための、核酸を媒介する遺伝子操作工程を使用し得る。効果的な養子細胞移入ベースの免疫療法(A C T)は、がん(例えば、転移性がん)患者を処置するのに有用であり得る。例えば、非ウイルス法を使用して、がん細胞上の固有の変異であるネオ抗原を認識するT 細胞受容体(T C R)を発現するように、自家末梢血リンパ球(P B L)を改変し、開示される、細胞内ゲノム移植の組成物および方法において使用することができる。

40

【0254】

患者のがんにおける、固有の免疫原性変異を認識する、がん特異的T C R の配列を同定する、1つの例示的な方法は、P C T / U S 1 4 / 5 8 7 9 6 に記載されている。例えば、トランス遺伝子(例えば、がん特異的T C R、または外因性トランス遺伝子)を、ランダム挿入または特異的挿入を使用して、細胞(例えば、T 細胞)のゲノムへと挿入することができる。場合によって、挿入は、ウイルス挿入であり得る。場合によって、挿入は、非ウイルス挿入によるものであり得る(例えば、ミニサークルベクターを用いる)。場合によって、トランス遺伝子のウイルス挿入を、特定のゲノム部位に対してターゲティングするか、または場合によって、トランス遺伝子のウイルス挿入は、ゲノム部位へのランダム挿入であり得る。場合によって、トランス遺伝子(例えば、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子、T 細胞受容体(T C R))または核酸(例えば、少なくとも1個の外因性核酸)は、細胞のゲノム中に1回挿入される。場合によって、トランス遺伝子(例えば、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子、T 細胞受容体(T C R))または核酸(例えば、少なくとも1個の外因性核酸)は、ゲノム遺伝子座中にランダムに挿入される。場合によって、トランス遺伝子(例えば、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子、T 細胞受容

50

体（T C R）または核酸（例えば、少なくとも1個の外因性核酸）は、1つを超えるゲノム遺伝子座中にランダムに挿入される。場合によって、トランス遺伝子（例えば、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子、T細胞受容体（T C R））または核酸（例えば、少なくとも1個の外因性核酸）は、少なくとも1個の遺伝子（例えば、C I S Hおよび/またはT C R）中に挿入される。場合によって、トランス遺伝子（例えば、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子、T C R）または核酸（例えば、少なくとも1個の外因性核酸）は、遺伝子（例えば、C I S Hおよび/またはT C R）中の切断に挿入される。場合によって、1つを超えるトランス遺伝子（例えば、外因性トランス遺伝子、T C R）は、細胞のゲノム中に挿入される。場合によって、1つを超えるトランス遺伝子は、1または複数のゲノム遺伝子座中に挿入される。場合によって、トランス遺伝子（例えば、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子）または核酸（例えば、少なくとも1個の外因性核酸）は、少なくとも1個の遺伝子中に挿入される。場合によって、トランス遺伝子（例えば、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子）または核酸（例えば、少なくとも1個の外因性核酸）は、2個またはそれよりも多い遺伝子（例えば、C I S Hおよび/またはT C R）中に挿入される。場合によって、トランス遺伝子（例えば、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子）または核酸（例えば、少なくとも1個の外因性核酸）は、ランダムおよび/または特異的様式で細胞のゲノム中に挿入される。場合によって、トランス遺伝子は、外因性トランス遺伝子である。場合によって、トランス遺伝子（例えば、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子）は、遺伝子（例えば、C I S Hおよび/またはT C R）の少なくとも一部と相補的な操作部位で挟まれる。場合によって、トランス遺伝子（例えば、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子）は、遺伝子（例えば、C I S Hおよび/またはT C R）中の切断と相補的な操作部位で挟まれる。場合によって、トランス遺伝子（例えば、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子）は、遺伝子中に挿入されない（例えば、C I S Hおよび/またはT C R中に挿入されない）。場合によって、トランス遺伝子は、遺伝子中の切断（例えば、C I S Hおよび/またはT C R中の切断）に挿入されない。

【0255】

場合によって、遺伝子改変細胞の集団、または遺伝子改変されたT I Lの集団中の細胞の少なくとも約5%、または少なくとも約10%、または少なくとも約15%、または少なくとも約20%、または少なくとも約25%、または少なくとも約30%、または少なくとも約35%、または少なくとも約40%、または少なくとも約45%、または少なくとも約50%、または少なくとも約55%、または少なくとも約60%、または少なくとも約65%、または少なくとも約70%、または少なくとも約75%、または少なくとも約80%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%が、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子（例えば、外因性T C R）を含む。場合によって、本開示の方法はいずれも、遺伝子改変細胞の集団、または遺伝子改変されたT I Lの集団中の細胞の少なくとも約もしくは約5%、または少なくとも約もしくは約10%、または少なくとも約もしくは約15%、または少なくとも約もしくは約20%、または少なくとも約もしくは約25%、または少なくとも約もしくは約30%、または少なくとも約もしくは約35%、または少なくとも約もしくは約40%、または少なくとも約もしくは約45%、または少なくとも約もしくは約50%、または少なくとも約もしくは約55%、または少なくとも約もしくは約60%、または少なくとも約もしくは約65%、または少なくとも約もしくは約70%、または少なくとも約もしくは約75%、または少なくとも約もしくは約80%、または少なくとも約もしくは約85%、または少なくとも約もしくは約90%、または少なくとも約もしくは約95%、または少なくとも約もしくは約97%、または少なくとも約もしくは約98%、または少なくとも約もしくは約99%が、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子（例えば、T C R）を含むような結果をもたらすことができる。場合によって、遺伝子改変細胞の集団中の細胞の少なくとも約もしくは約3%、5%、8%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、

10

20

30

40

50

9 3 %、 9 5 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %、 9 9 . 5 %、 または 1 0 0 %が、 少なくとも 1 個の遺伝子（例えば、 C I S H および / または T C R ）中の切断に組み込まれた少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子（例えば、 T C R ）を含む。場合によって、 少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子は、 1 または複数の遺伝子（例えば、 C I S H および / または T C R ）中の切断に組み込まれる。場合によって、 遺伝子改变細胞の集団中の細胞の少なくとも約もしくは約 3 %、 5 %、 8 %、 1 0 %、 1 5 %、 2 0 %、 2 5 %、 3 0 %、 3 5 %、 4 0 %、 4 5 %、 5 0 %、 5 5 %、 6 0 %、 6 5 %、 7 0 %、 7 5 %、 8 0 %、 8 5 %、 9 0 %、 9 3 %、 9 5 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %、 9 9 . 5 %、 または 1 0 0 %が、 細胞のゲノム中に組み込まれた少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を含む。場合によって、 遺伝子改变細胞の集団中の細胞の少なくとも約もしくは約 3 %、 5 %、 8 %、 1 0 %、 1 5 %、 2 0 %、 2 5 %、 3 0 %、 3 5 %、 4 0 %、 4 5 %、 5 0 %、 5 5 %、 6 0 %、 6 5 %、 7 0 %、 7 5 %、 8 0 %、 8 5 %、 9 0 %、 9 3 %、 9 5 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %、 9 9 . 5 %、 または 1 0 0 %が、 ゲノム遺伝子座（例えば、 C I S H および / または T C R ）中に組み込まれた少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子を含む。場合によって、 組込みは、 ウィルス（例えば、 A A V もしくは修飾 A A V ）または非ウィルス（例えば、 ミニサークル）系を含む。
10

【 0 2 5 6 】

場合によって、 本開示は、 遺伝子改变細胞の集団および / または腫瘍浸潤リンパ球（例えば、 遺伝子改变された T I L ）の集団ならびに遺伝子改变細胞（例えば、 遺伝子改变された T I L ）の集団を產生する方法を提供する。場合によって、 遺伝子改变細胞の前記集団は、 少なくとも約 3 0 %、 3 5 %、 4 0 %、 4 5 %、 5 0 %、 5 5 %、 6 0 %、 6 5 %、 7 0 %、 7 5 %、 8 0 %、 8 5 %、 9 0 %、 9 5 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %、 9 9 . 5 %、 または 1 0 0 %の細胞生存率を含む（例えば、 細胞生存率は、 A A V ベクター（または非ウイルスベクター（例えば、 ミニサークルベクター））が細胞の集団に導入された後のある時点で測定される、 および / または細胞生存率は、 少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子が少なくとも 1 個の細胞のゲノム遺伝子座（例えば、 C I S H および / または T C R ）に組み込まれた後のある時点で測定される）。場合によって、 細胞生存率は、 F A C S によって測定される。場合によって、 細胞生存率は、 ウィルス（例えば、 A A V ）または非ウイルス（例えば、 ミニサークル）ベクターが細胞および / または細胞の集団に導入された、 約、 少なくとも約、 または最大で約 4 時間、 6 時間、 8 時間、 1 0 時間、 1 2 時間、 1 8 時間、 2 0 時間、 2 4 時間、 3 0 時間、 3 6 時間、 4 0 時間、 4 8 時間、 5 4 時間、 6 0 時間、 7 2 時間、 8 4 時間、 9 6 時間、 1 0 8 時間、 1 2 0 時間、 1 3 2 時間、 1 4 4 時間、 1 5 6 時間、 1 6 8 時間、 1 8 0 時間、 1 9 2 時間、 2 0 4 時間、 2 1 6 時間、 2 2 8 時間、 2 4 0 時間後、 または 2 4 0 時間後よりも後に測定される。場合によって、 細胞生存率は、 ウィルス（例えば、 A A V ）または非ウイルス（例えば、 ミニサークル）ベクターが細胞および / または細胞の集団に導入された、 約、 少なくとも約、 または最大で約 1 日、 2 日、 3 日、 4 日、 5 日、 6 日、 7 日、 8 日、 9 日、 1 0 日、 1 1 日、 1 2 日、 1 3 日、 1 4 日、 1 5 日、 1 6 日、 1 7 日、 1 8 日、 1 9 日、 2 0 日、 2 1 日、 2 2 日、 2 3 日、 2 4 日、 2 5 日、 2 6 日、 2 7 日、 2 8 日、 2 9 日、 3 0 日、 3 1 日、 4 5 日、 5 0 日、 6 0 日、 7 0 日、 9 0 日後、 または 9 0 日後よりも後に測定される。場合によって、 細胞生存率は、 少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子（例えば、 T C R ）が少なくとも 1 個の細胞のゲノム遺伝子座（例えば、 C I S H および / または T C R ）中に組み込まれた後に測定される。場合によって、 細胞生存率は、 少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子（例えば、 T C R ）が少なくとも 1 個の細胞のゲノム遺伝子座中に組み込まれた、 約、 少なくとも約、 または最大で約 4 時間、 6 時間、 8 時間、 1 0 時間、 1 2 時間、 1 8 時間、 2 0 時間、 2 4 時間、 3 0 時間、 3 6 時間、 4 0 時間、 4 8 時間、 5 4 時間、 6 0 時間、 7 2 時間、 8 4 時間、 9 6 時間、 1 0 8 時間、 1 2 0 時間、 1 3 2 時間、 1 4 4 時間、 1 5 6 時間、 1 6 8 時間、 1 8 0 時間、 1 9 2 時間、 2 0 4 時間、 2 1 6 時間、 2 2 8 時間、 2 4 0 時間後、 2 4 0 時間後よりも後に、 1 1 日、 1 2 日、 1 3 日、 1 4 日、 1 5 日、 1 6 日、 1 7 日、 1 8 日、 1 9 日、 2 0 日、 2 1 日、 2 2 日、 2 3 日、 2 4 日、 2 5 日、 2 6 日、 2 7 日、 2 8 日、 2 9 日、 3 0 日、 3 1 日、 4 5 日、 5 0 日、 6 0 日、 7 0 日、 9 0 日後よりも後に測定される。
20
30
40
50

24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、31日、45日、50日、
60日、70日、90日後、または90日後よりも後に測定される。場合によって、細胞
毒性は、ウイルスまたは非ウイルス系が細胞または細胞の集団に導入された後に測定され
る。場合によって、細胞毒性は、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子（例えば、T C
R）が少なくとも1個の細胞のゲノム遺伝子座（例えば、C I S H および / または T C R
）中に組み込まれた後に測定される。場合によって、細胞毒性は、野生型もしくは非修飾
A A V または非ウイルス系（例えば、ミニサークルベクター）が同等の細胞または同等の
細胞の集団に導入された場合よりも、修飾A A Vベクターが使用される場合に低い。場合
によって、細胞毒性は、非ウイルスベクター（例えば、ミニサークルベクター）が同等の細胞
または同等の細胞の集団に導入された場合よりも、A A Vベクターが使用される場合
に低い。場合によって、細胞毒性は、フローサイトメトリーによって測定される。場合
によって、細胞毒性は、野生型もしくは非修飾A A Vベクターまたはミニサークルベクター
を使用して少なくとも1個の外因性トランス遺伝子（例えば、T C R）を組み込む場合と
比較して、修飾A A V、または組換えA A Vベクターを使用して少なくとも1個の外因性
トランス遺伝子（例えば、T C R）を組み込む場合に、約、少なくとも約、または最大で
約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、12%、15%、
17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、
55%、60%、65%、70%、75%、80%、82%、85%、88%、90%、
92%、95%、97%、98%、99%または100%低減される。場合によって、細
胞毒性は、ミニサークルベクターまたは別の非ウイルス系を使用して少なくとも1個の外
因性トランス遺伝子を組み込む場合と比較して、A A Vベクターを使用する場合に、約、
少なくとも約、または最大で約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%
、10%、12%、15%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%
、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、82%
、85%、88%、90%、92%、95%、97%、98%、99%または100%低
減される。場合によって、A A Vは、組換えA A V(r A A V)、修飾A A V、ハイブリ
ッドA A V、自己相補的A A V(s c A A V)、およびその任意の組合せからなる群から
選択される。

【0257】

場合によって、本明細書で開示される方法は、細胞へと、1または複数の核酸（例えば
、第1の核酸および / または第2の核酸）を導入するステップを含む。当業者は、核酸は
一般に、その分子が、長鎖に連結された、多くのヌクレオチドからなる物質を指す場合が
あることを認識するであろう。核酸の非限定的な例は、人工核酸類似体（例えば、ペプチ
ド核酸、モルホリノオリゴマー、ロックト核酸、グリコール核酸、またはトレオース核酸
）、環状核酸、D N A、一本鎖D N A、二本鎖D N A、ゲノムD N A、ミニサークルD N
A、プラスミド、プラスミドD N A、ウイルスD N A、ウイルスベクター、ガンマ・レト
ロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、R N A、
短鎖ヘアピンR N A、p s i R N A、および / またはこれらのハイブリッド体もしくは組
合せを含む。場合によって、方法は、核酸を含むことが可能であり、核酸は、合成核酸で
ある。場合によって、試料は、核酸を含むことが可能であり、核酸は、断片化するこ
ができる。場合によって、核酸は、ミニサークルである。

【0258】

場合によって、核酸は、プロモーター領域、バーコード、制限部位、切断部位、エンド
ヌクレアーゼ認識部位、プライマー結合部位、選択用マーカー、固有の識別配列、耐性遺
伝子、リンカー配列、またはこれらの任意の組合せを含み得る。核酸は、細菌を使用する
ことなく作製することができる。例えば、核酸は、低減された微量の細菌性要素を有する
、または細菌性要素を完全に含まない場合がある。プラスミドベクターと比較した場合、
核酸は、P C Rによって測定して、20% ~ 40%、40% ~ 60%、60% ~ 80%、
または80% ~ 100%、プラスミドベクターよりも少ない細菌の痕跡を有し得る。プラス
ミドベクターと比較した場合、核酸は、P C Rによって測定して、20%、30%、4

10

20

30

40

50

0 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %から、または最大で100 %、プラスミドベクターよりも少ない細菌の痕跡を有し得る。一部の態様では、これらの部位は、酵素的消化、増幅、シーケンシング、結合のターゲティング、精製、耐性特性（例えば、抗生物質耐性）の付与、またはこれらの任意の組合せに有用であり得る。場合によって、核酸は、1または複数の制限部位を含み得る。制限部位は一般に、部位特異的分子（例えば、プロテアーゼ、エンドヌクレアーゼ、または酵素）が、核酸を切断し得る、特異的ペプチド配列または特異的ヌクレオチド配列を指す場合がある。一例では、核酸は、1または複数の制限部位を含むことが可能であり、この場合、制限部位における核酸の切断は、核酸を断片化する。場合によって、核酸は、少なくとも1つのエンドヌクレアーゼ認識部位を含み得る。

10

【0259】

場合によって、核酸は、別の核酸にたやすく結合し得る（例えば、核酸は、粘着末端またはヌクレオチドの突出を含む）。例えば、核酸は、核酸の第1の末端において、突出を含み得る。一般に、粘着末端または突出とは、核酸の末端における、一連の非対合ヌクレオチドを指す場合がある。場合によって、核酸は、核酸の1または複数の末端において、一本鎖突出を含み得る。場合によって、突出は、核酸の3'末端において生じ得る。場合によって、突出は、核酸の5'末端において生じ得る。突出は、任意の数のヌクレオチドを含み得る。例えば、突出は、1ヌクレオチド、2ヌクレオチド、3ヌクレオチド、4ヌクレオチド、または5もしくはそれよりも多いヌクレオチドを含み得る。場合によって、核酸は、別の核酸への結合の前に、修飾を要求し得る（例えば、核酸は、エンドヌクレアーゼによる消化を必要とし得る）。場合によって、核酸の修飾により、ヌクレオチドの突出を作製することができ、突出は、任意の数のヌクレオチドを含み得る。例えば、突出は、1ヌクレオチド、2ヌクレオチド、3ヌクレオチド、4ヌクレオチド、または5もしくはそれよりも多いヌクレオチドを含み得る。一例では、核酸は、制限部位を含むことが可能であり、この場合、核酸を、制限部位において、制限酵素（例えば、N o t I）で消化することにより、4ヌクレオチドの突出を產生する。場合によって、修飾は、核酸の1または複数の末端において、平滑末端を作製することを含む。一般に、平滑末端とは、両方の鎖が、塩基対で終結する二本鎖核酸を指す場合がある。一例では、核酸は、制限部位を含むことが可能であり、この場合、核酸を、制限部位において、制限酵素（例えば、B s a I）で消化することにより、平滑末端を產生する。

20

【0260】

プロモーターとは、RNAポリメラーゼおよび転写因子の結合を制御し、遺伝子転写の効率、遺伝子が、細胞内のどこで発現し得るのか、および／または遺伝子を、どの細胞型内で発現し得るのかに対して大きな影響を及ぼし得る核酸配列である。プロモーターの非限定的な例は、サイトメガロウイルス（cytomegalovirus）（CMV）プロモーター、伸長因子1アルファ（E F 1）プロモーター、simian vacuo lating（SV40）ウイルスプロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK 1）プロモーター、ユビキチンC（Ub c）プロモーター、ヒトベータアクチンプロモーター、CAGプロモーター、テトラサイクリン応答エレメント（T R E）プロモーター、UASプロモーター、Actin 5c（Ac 5）プロモーター、ポリヘドロンプロモーター、Ca 2+ /カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII（CaMKIIa）プロモーター、GAL1プロモーター、GAL10プロモーター、TEF1プロモーター、グリセルアルデヒド3-三リン酸（phosphoglyceraldehyde）デヒドロゲナーゼ（G D S）プロモーター、ADH1プロモーター、CaMV35Sプロモーター、Ubiプロモーター、ヒトポリメラーゼIII RNA（H1）プロモーター、U6プロモーター、またはこれらの組合せを含む。

30

【0261】

プロモーターは、CMV、U6、MND、またはEF1aであり得る（図155A）。場合によって、プロモーターは、外因性TCR配列と隣接し得る。場合によって、rAAVベクターは、スプライシングアクセプターをさらに含み得る。場合によって、スプライ

40

50

シングアクセプターは、外因性 T C R 配列と隣接し得る。プロモーター配列は、P K G プロモーターまたはM N D プロモーターであり得る(図 155B)。M N D プロモーターは、骨髓増殖性肉腫ウイルスエンハンサーを伴う修飾 M o M u L V L T R の U 3 領域を含有する合成プロモーターであり得る。

【0262】

ウイルスベクター

場合によって、ウイルスベクターを用いて、トランス遺伝子を細胞中に導入することができる。ウイルスベクターは、限定されるものではないが、レンチウイルス、レトロウイルス、またはアデノ随伴ウイルスであり得る。ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルスベクターであってよい(図 139 および図 140)。場合によって、アデノ随伴ウイルス(A A V)ベクターは、組換えA A V(r A A V)ベクター、ハイブリッドA A Vベクター、自己相補的A A V(s c A A V)ベクター、変異体A A Vベクター、およびこれらの任意の組合せであり得る。場合によって、アデノ随伴ウイルスを使用して、外因性トランス遺伝子(例えば、少なくとも 1 個の外因性トランス遺伝子)を導入することができる。ウイルスベクターは、場合によって、同質遺伝子的であり得る。場合によって、ウイルスベクターを、既知の S N P を含むゲノムの一部に組み込むことができる。他の場合、ウイルスベクターを、既知の S N P を含むゲノムの一部に組み込まなくてもよい。例えば、r A A V を対象自身のゲノム D N A と同質遺伝子的または相同であるようにデザインすることができる。場合によって、同質遺伝子的ベクターは、相同組換えの効率を改善しうる。場合によって、g R N A を、それが既知の S N P を含む領域をターゲティングしないようにデザインして、組み込まれたベクタートランス遺伝子の発現を改善することができる。P D - 1、C I S H、A A V S 1、および C T L A - 4 などの、チェックポイント遺伝子での S N P の頻度を決定することができる(図 141A、図 141B、および図 142)。

。

【0263】

アデノ随伴ウイルス(A A V)は、非病原性の一本鎖 D N A パルボウイルスであり得る。A A V は、約 26 nm のカプシド直径を有し得る。場合によって、カプシド直径はまた、約 20 nm ~ 約 50 nm であり得る。A A V 一本鎖 D N A ゲノムの各末端は I T R (inverted terminal repeat) を含有し得、これはゲノム複製およびパッケージングに必要とされる唯一のシス作用性エレメントであり得る。ゲノムは 2 つのウイルス遺伝子: r e p および c a p を保有する。ウイルスは、2 つのプロモーターおよび選択的スプライシングを用いて、複製に必要な 4 つのタンパク質(R e p 78、R e p 68、R e p 52、および R e p 40)を産生し、一方で第 3 のプロモーターは、選択的スプライシングおよび代替翻訳開始コドンの組合せを通じて、3 つのウイルスカプシド構造タンパク質 1、2、および 3(V P 1、V P 2、および V P 3)の転写物を産生する。3 つのカプシドタンパク質は、同一の C 末端 533 アミノ酸を共有し、一方で V P 2 および V P 1 は、それぞれ 65 アミノ酸および 202 アミノ酸の、追加の N 末端配列を含有する。A A V ビリオンは、T = 1 の正二十面体対称に配置されている、全部で 60 コピーの V P 1、V P 2、および V P 3 を、1 : 1 : 20 の比率で含むことができる。

【0264】

細胞レベルにおいて、A A V は、遺伝子発現を達成する前に 5 つの主要なステップを経ることができる: 1) 細胞表面受容体への結合または付着、2) エンドサイトーシス、3) 核へのトラフィッキング、4) ゲノムを放出するためのウイルスの脱コート、および 5) 一本鎖から、核内での転写のための錆型としての二本鎖 D N A へのゲノムの変換。r A A V が各個別のステップを成功裏に実行することができる累積効率により、全体の形質導入効率を決定することができる。r A A V の形質導入における律速ステップには、ウイルスの付着および内在化に必要な細胞表面受容体が存在しないまたは少量であること、リソソーム分解をもたらす非効率的なエンドソーム脱出、および一本鎖から二本鎖 D N A 錆型への遅い変換が含まれ得る。したがって、遺伝子治療のための、細胞または組織へのより効率的な、またはより特異的な形質導入を容易にするために、ゲノムおよび / またはカプ

10

20

30

40

50

シドに対する修飾を有するベクターを設計することができる。

【0265】

場合によって、ウイルスカプシドは修飾されていてもよい。修飾は、カプシド構成要素の組合せを修飾することを含み得る。例えば、モザイクカプシドA AVは、異なる血清型由来のウイルスカプシドタンパク質の混合物から構成され得るビリオンである。カプシドタンパク質は、種々の比率で混合された個別のプラスミドによる補完によって提供され得る。ウイルスのアセンブリー中、補完プラスミドの比率を化学量論的に反映したサブユニット比率で、異なる血清型のカプシドタンパク質を各ビリオンに混合することができる。モザイクカプシドは、非修飾カプシドと比較して、ある特定の細胞型に対する結合効率の増大または性能の向上をもたらすことができる。

10

【0266】

場合によって、キメラカプシドA AVを作製することができる。キメラカプシドは、別の野生型(wt)A AV配列または無関係のタンパク質のいずれかに由来する外来タンパク質配列の、カプシド遺伝子のオープンリーディングフレームへの挿入を有し得る。キメラ修飾は、特定の機能を欠いており、別のカプシド由来のDNA配列と共にトランسفェクトされるA AVカプシド配列を含み得る、天然に存在する血清型の、鑄型としての使用を含み得る。相同組換えは交叉点で起こり、新たな特色および固有の特性を有するカプシドをもたらす。他の場合には、カプシドコード配列のNまたはC末端のいずれかに融合したエピトープコード配列を使用して、遺伝子機能に影響を及ぼさずにウイルスカプシドの表面に新たなペプチドを露出させることを試みている。しかしながら、場合によって、カプシドコード配列の特定の位置へと挿入されたエピトープ配列の使用は、コード配列自体にエピトープをタグ付けする異なる手法を使用して実施することができる。キメラカプシドはまた、カプシドコード配列中の特定の位置へと挿入されたペプチドライブラリーから同定されたエピトープの使用を含み得る。スクリーニングのための遺伝子ライブラリーの使用も実施することができる。スクリーニングにより、意図通りに機能しない挿入を捕捉することができ、続いてこれを除去することができる。r A AVベクター中のキメラカプシドは、トランسفェクトすることができる細胞型の範囲を拡大することができ、形質導入の効率を増大させることができる。形質導入の増大は、非修飾カプシドを使用した形質導入と比較して、約10%の増大～約300%の増大であり得る。キメラカプシドは、縮重、組換え、シャッフルまたは他の方法で修飾されたCapタンパク質を含有し得る。例えば、VPタンパク質のN末端への受容体特異的リガンドまたは単鎖抗体の挿入のターゲティングを実施することができる。リンパ球抗体または標的のA AVへの挿入は、T細胞の結合および感染を改善するために実施することができる。

20

【0267】

場合によって、キメラA AVは、少なくとも1つのA AVカプシドタンパク質における修飾(例えば、VP1、VP2、および/またはVP3カプシドタンパク質における修飾)を有し得る。場合によって、A AVベクターは、VP1、VP2、およびVP3カプシド遺伝子配列の少なくとも1つにおける修飾を含む。場合によって、少なくとも1つのカプシド遺伝子は、A AVから除去され得る。場合によって、A AVベクターは、1または複数のカプシド遺伝子配列の欠失を含み得る。場合によって、A AVベクターは、VP1、VP2、およびVP3カプシド遺伝子配列のうちの少なくとも1つにおける少なくとも1つのアミノ酸置換、欠失、および/または挿入を有し得る。

30

【0268】

場合によって、キメラカプシド(例えば、縮重または他の方法で修飾されたCapタンパク質を含有するカプシド)を有するビリオンを作製することができる。そのようなビリオンのカプシドをさらに変化するために、例えば、リンパ球などの特定の細胞型に対する結合親和性を増強または修飾するために、さらなる変異をビリオンのカプシドへと導入することができる。例えば、適切なキメラカプシドは、特定の細胞型に対するウイルスのターゲティングを容易にするためにリガンド挿入変異を有し得る。挿入変異体、アラニンスクリーニング変異体、およびエピトープタグ変異体を含むA AVカプシド変異体の構築お

40

50

より特徴付けについては、Wuら、J. Virol. 74巻：8635～45頁、2000年に記載されている。AAVカプシド変異体を作製する方法は公知であり、部位特異的変異誘発（Wuら、J. Virol. 72巻：5919～5926頁）；分子育種、核酸、エクソン、およびDNAファミリーシャッフリング（Soongら、Nat. Genet. 25巻：436～439頁、2000年；Cocoら、Nature Biotech. 2001年；19巻：354頁；ならびに米国特許第5,837,458号；同第5,811,238号；および同第6,180,406号；KolkmanおよびStemmer、Nat. Biotech. 19巻：423～428頁、2001年；Fischら、Proceedings of the National Academy of Sciences 93巻：7761～7766頁、1996年；Christiansら、Nat. Biotech. 17巻：259～264頁、1999年）；リガンド挿入（Girodら、Nat. Med. 9巻：1052～1056頁、1999年）；カセット変異誘発（Ruedaら、Virology 263巻：89～99頁、1999年；Boyerら、J. Virol. 66巻：1031～1039頁、1992年）；ならびに短いランダムオリゴヌクレオチド配列の挿入を含む。

【0269】

場合によって、カプシド転換を実施することができる。カプシド転換は、ある血清型のAAVのITRを異なる血清型のカプシドにパッケージングすることを含むプロセスであり得る。別の場合には、AAVカプシド表面への受容体リガンドの吸着を実施することができ、AAVカプシドの表面への外来ペプチドの付加であり得る。場合によって、これは、AAV血清型が現在指向性を有していない細胞に対して特異的にターゲティングする能力を付与することができ、これは遺伝子治療ツールとしてのAAVの使用を大幅に拡大することができる。

【0270】

場合によって、rAAVベクターを修飾することができる。例えば、rAAVベクターは、挿入、欠失、化学的变化、または合成修飾などの修飾を含み得る。場合によって、単一のヌクレオチドを、rAAVベクター中に挿入する。他の場合、複数のヌクレオチドをベクター中に挿入する。挿入することができるヌクレオチドは、約1ヌクレオチド～約5kbの範囲であり得る。挿入することができるヌクレオチドは、機能的タンパク質をコードしうる。挿入することができるヌクレオチドは、ベクターを受容する対象に対して内因性または外因性であり得る。例えば、ヒト細胞は、TCRの一部などの、マウスゲノムの少なくとも一部を含有しうるrAAVベクターを受容しうる。場合によって、rAAVの挿入または欠失などの修飾は、ベクターのタンパク質コード領域または非コード領域を含み得る。場合によって、修飾は、細胞に導入された場合、ベクターの活性を改善してもよい。例えば、修飾は、ヒト細胞に導入された場合、ベクターのタンパク質コード領域の発現を改善しうる。

【0271】

場合によって、本開示は、rAAVベクター（例えば、外因性受容体配列をコードするベクター）およびキメラカプシド（例えば、縮重、組換え、シャッフルまたは他の方法で修飾されたCapタンパク質を含有するカプシド）から構成されるビリオンのストックを产生するためのAAVのRepおよびCapタンパク質をもたらすヘルパーべクターの構築を提供する。場合によって、修飾は、修飾されているAAVのCap核酸、例えば、1つより多いAAV血清型（例えば、AAV血清型1～8）に由来する配列の一部を含有するCap核酸の产生を含み得る。そのようなキメラ核酸は、いくつかの変異誘発技術によって产生することができる。キメラCap遺伝子を作製するための方法は、in vitro DNA增幅反応における縮重オリゴヌクレオチドの使用を含み得る。縮重変異（例えば、異なるAAV血清型由来の多型）の核酸配列への組込みのためのプロトコールは、Cocoら（Nature Biotechnology 20巻：1246～1250頁、2002年）において記載される。縮重ホモ二本鎖組換えとして公知の、この方法では、遺伝子ファミリー内の遺伝子由来の多型（縮重）を含有する「トップストランド」オリゴヌクレオチドが構築される。相補的縮重が、複数の架橋「足場」オリゴヌクレオチドに、操作により導入されている。アニーリング、ギャップ充填、およびライゲーションステップの単一の配列は、親

10

20

30

40

50

多型のあらゆる可能な順列を捕捉する核酸のライブラリーの產生をもたらす。カプシド遺伝子の任意の部分は、縮重ホモ二本鎖組換えなどの方法を使用して変異させることができる。しかしながら、特定のカプシド遺伝子配列が好ましい。例えば、AAV2カプシドの、その細胞表面受容体のヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)への結合を担う重要な残基がマッピングされている。585位および588位のアルギニン残基は、これらの残基内の非保存的変異がヘパリン-アガロースへの結合を排除するので、結合に重要であると思われる。AAV2およびAAV4原子構造のコンピューターによるモデリングは、アルギニン残基585および588と重複し、カプシドの表面に露出している7つの超可変領域を同定した。これらの超可変領域は、受容体結合を媒介するカプシドの表面ループとして露出していると考えられている。したがって、これらのループは、野生型ビリオンとは異なる指向性を有するキメラビリオンを产生する方法における変異誘発のための標的として使用され得る。場合によって、修飾は、AAV血清型6カプシドのものであり得る。

10

【0272】

本開示の方法において使用され得る別の変異誘発技術はDNAシャフリングである。DNAまたは遺伝子シャフリングは、遺伝子ファミリーのメンバーのランダム断片の創出およびこれらの組換えを含み、多くの新たな組合せをもたらす。AAVカプシド遺伝子をシャッフルするためには、3つのカプシドタンパク質VP1、VP2、およびVP3の関与ならびに8つの血清型間の異なる程度の相同性を含む、いくつかのパラメータを考慮することができる。細胞特異的または組織特異的指向性を有する生存可能なrcAAVベクターを得る可能性を高めるために、例えば、高い多様性および多数の順列をもたらすシャフリングプロトコールが好ましい。キメラrcAAVの作製のためのDNAシャフリングプロトコールの例は、一過性の鋳型でのランダムキメラ生成(RACHITT)である(Coccoら、Nat. Biotech. 19巻：354～358頁、2001年)。RACHITT法は、2つの異なる血清型(例えば、AAV5d AAV6)のAAVゲノム由来の2つのPCR断片を組み換えるために使用できる。例えば、85%同一であり、約1kbpにわたり、3つ全ての遺伝子(VP1、VP2、およびVP3)の開始コドンを含むセグメントであるcap遺伝子の保存領域は、in vivoシャフリングプロトコール(米国特許第5,093,257号；Volkovら、NAR 27巻：e18頁、1999年；および、Wang

20

P. L.、Dis. Markers 16巻：3～13頁2000年)を含む、RATCHITTまたは他のDNAシャフリングプロトコールを使用して、シャッフルすることができる。得られたコンビナトリアルキメラライブラリーは、WT AAVゲノムのそれぞれの断片を置き換えるために適切なAAV TR含有ベクターにクローニングすることができる。ランダムクローンは、Vector NTI 7 Suite SoftwareのAligpnXアプリケーションを使用してシーケンシングし、親ゲノムとアラインメントさせることができる。シーケンシングおよびアラインメントから、1Kbpの遺伝子当たりの組換え交叉の数を決定することができる。代替的に、AAVゲノムの可変ドメインは、本開示の方法を使用してシャッフルすることができる。例えば、変異は、VP3において粒子表面ループを形成する可能性のある、AAVの2つのアミノ酸クラスター(アミノ酸509～522および561～591)内に作製することができる。この低相同性ドメインをシャッフルするために、親の相同性と無関係である組換えプロトコール(Ostermeierら、Nat. Biotechnol. 17巻：1205～1209頁、1999年；Lutzら、Proceedings of the National Academy of Sciences 98巻：11248～11253頁、2001年；およびLutzら、NAR 29巻：E16頁、2001年)、または、低相同性のDNA断片をアニールおよび組換えするよう修飾されたRACHITTプロトコールを用いることができる。

30

【0273】

場合によって、AAVカプシド上のS/T/K残基のターゲティングされた変異を実施することができる。受容体媒介性エンドサイトーシスによるAAVの細胞内在化の後、それは細胞質ゾルを通って移動し、放出される前にエンドソーム中で酸性化を受けうる。エ

40

50

ンドソーム脱出の後、AAVは核輸送を受け、そこで、ウイルスカプシドの脱殻が起こり、そのゲノムの放出および遺伝子発現の誘導をもたらす。S/T/K残基は、カプシドタンパク質のプロテアソーム分解のための合図として働くリン酸化およびその後のポリユビキチン化のための潜在的な部位である。これは、ベクターの核への輸送を防止して、そのトランス遺伝子である外因性TCRを発現させ、低い遺伝子発現をもたらすことができる。また、プロテアソーム分解されたカプシド断片は、CD8 T細胞認識のために細胞表面上にMHC-クラスI分子によって提示されうる。これは、免疫応答をもたらし、かくして、形質導入された細胞を破壊し、さらに、持続的なトランス遺伝子発現を減少させる。S/TからAおよびKからRへの点変異は、カプシド上のリン酸化部位を防止する／減少させることができる。これは、ユビキチン化およびプロテオソーム分解の減少をもたらし、より多数の無傷ベクターが核に進入し、トランス遺伝子を発現することができる。カプシド分解全体の防止／低下はまた、T細胞への抗原提示を減少させ、ベクターに対するより低い宿主免疫応答をもたらす。

10

【0274】

一部の態様では、AAV-ITRに挟まれる目的のヌクレオチド配列を含むAAVベクターは、異種配列をAAVベクターへと直接挿入することによって構築することができる。これらの構築物は当技術分野で周知の技術を使用して設計することができる。例えば、Carter B、Adeno-associated virus vectors、Curr. Opin. Biotechnol.、3巻：533～539頁（1992年）；およびKotin RM、Prospects for the use of adenovirus-associated virus as a vector for human gene therapy、Hum Gene Ther 5巻：793～801頁（1994年）を参照されたい。

20

【0275】

場合によって、AAV発現ベクターは、治療効果を有するトランス遺伝子などの目的の異種核酸配列を含む。rAAVビリオンは、当技術分野で公知の方法を使用して構築することができる。例えば、Koerberら（2009年）Mol. Ther. 17巻：2088頁；Koerberら（2008年）Mol. Ther. 16巻：1703～1709頁；米国特許第7,439,065号および同第6,491,907号を参照されたい。例えば、外因性配列または異種性配列は、AAVゲノムへと挿入することができ、そこではその主要なAAVオープニングリーディングフレームがこれらから切り出されている。AAVゲノムの他の部分も削除することができ、ITRのある特定の部分は複製およびパッケージング機能を支援するために無傷のままである。そのような構築物は当技術分野で周知の技術を使用して設計することができる。例えば、米国特許第5,173,414号および同第5,139,941号；Lebkowskiら（1988年）Molec. Cell. Biol. 8巻：3988～3996頁を参照されたい。

30

【0276】

本出願は、細胞中で目的の1または複数のタンパク質を発現しうる組換えAAVを产生するための方法および材料を提供する。本明細書に記載されるように、本明細書に開示される方法および材料は、in vivoで治療効果を達成しうるレベルの目的のタンパク質の高い產生または產生を可能にする。目的のタンパク質の例は、外因性受容体である。外因性受容体は、TCRであり得る。

40

【0277】

一般に、rAAVビリオンもしくはrAAVウイルス粒子、またはAAV発現ベクターは、トランスフェクションによるなどの公知の技術を使用して適切な宿主細胞へと導入される。トランスフェクション技術は当技術分野で公知である。例えば、Grahamら（1973年）Virology、52巻：456頁、Sambrookら（1989年）Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York、Davisら（1986年）Basic Methods in Molecular Biology、Elsevier、およびChuら（1981年）Gene 13巻：197頁を参照されたい。適切なトランスフェクション方法には、リン酸カルシウム共沈法、直接マイクロインジェクション、電気穿孔、リポソームを媒介する遺伝子導入、および高速マイクロプロジェクトイルを使用した核酸送達が含まれ、これ

50

らは当技術分野で公知である。

【0278】

場合によって、組換えAAVを產生するための方法は、本明細書で記載されるようなAAVの5'ITR (inverted terminal repeat) および3'AAV IT Rを含むウイルス構築物、増殖性AAV感染を生じさせためのヘルパー機能、ならびにAAV cap遺伝子を有するパッケージング細胞株を提供するステップと、パッケージング細胞株の上清から組換えAAVを回収するステップとを含む。パッケージング細胞株としては様々な種類の細胞を使用することができる。例えば、使用することができるパッケージング細胞株には、ほんの数例を挙げると、HEK293細胞、HeLa細胞、およびVero細胞が含まれるが、これらに限定されない。場合によって、パッケージング細胞株の上清を、ウイルスを濃縮するためにPEG沈殿によって処理する。他の場合には、遠心分離ステップを使用してウイルスを濃縮することができる。例えば、カラムを使用して遠心分離中にウイルスを濃縮することができる。場合によって、沈殿は、約4以下(例えば、約3、約2、約1、または約1)で少なくとも約2時間、少なくとも約3時間、少なくとも約4時間、少なくとも約6時間、少なくとも約9時間、少なくとも約12時間、または少なくとも約24時間で起きる。場合によって、組換えAAVを、PEG沈殿上清から、低速遠心分離とそれに続くCsCl勾配によって単離する。低速遠心分離は、約4000rpm、約4500rpm、約5000rpm、または約6000rpmで、約20分間、約30分間、約40分間、約50分間または約60分間であり得る。場合によって、約5000rpmで約30分間の遠心分離とそれに続くCsCl勾配により、組換えAAVをPEG沈殿上清から単離する。
10

【0279】

場合によって、ヘルパー機能は、アデノウイルスヘルパー遺伝子を含む1または複数のヘルバープラスミドまたはヘルパーウイルスによって提供される。アデノウイルスヘルパー遺伝子の非限定的な例には、E1A、E1B、E2A、E4、およびVAが含まれ、これらは、AAVパッケージングにヘルパー機能を提供することができる。場合によって、AAV cap遺伝子はプラスミド中に存在し得る。プラスミドはAAV rep遺伝子をさらに含み得る。
20

【0280】

血清学は、ある血清型のウイルスカプシドタンパク質に反応する抗体が、別の血清型のこれらを中和することができないこととして規定することができる。場合によって、任意のAAV血清型(AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、およびこれらの任意の変異体または誘導体を含むが、これらに限定されない)由来のcap遺伝子および/またはrep遺伝子は、本明細書において、目的の1または複数のタンパク質を発現するための、本明細書で開示される組換えAAVを产生するのに使用することができる。アデノ随伴ウイルスは、AAV5もしくはAAV6またはこれらの変異体であり得る。場合によって、AAV cap遺伝子は、血清型1、血清型2、血清型3、血清型4、血清型5、血清型6、血清型7、血清型8、血清型9、血清型10、血清型11、血清型12、またはこれらの変異体由来のカプシドをコードし得る。場合によって、パッケージング細胞株に、ヘルバープラスミドまたはヘルパーウイルス、ウイルス構築物、およびAAV cap遺伝子をコードするプラスミドをトランスフェクトすることができ、共トランスフェクション後の様々な時点で組換えAAVウイルスを回収することができる。例えば、組換えAAVウイルスは、共トランスフェクション後、約12時間、約24時間、約36時間、約48時間、約72時間、約96時間、約120時間、またはこれら2つの時点のいずれかの間の時間で収集することができる。
30

【0281】

AAVのヘルパーウイルスは当技術分野で公知であり、例えば、アデノウイルス科およびヘルペスウイルス科に由来するウイルスが含まれる。AAVのヘルパーウイルスの例には、米国特許出願公開第20110201088号に記載されるSAdV-13ヘルパー
40
40
50

ウイルスおよびS A d V - 1 3 様ヘルパーウイルス、ヘルパーベクター p H E L P (A p p l i e d V i r o m i c s) が含まれるが、これらに限定されない。当業者は、A A Vに十分なヘルパー機能を提供することができるA A Vの任意のヘルパーウイルスまたはヘルパープラスミドを本明細書において使用できることを理解するであろう。本明細書で開示される組換えA A Vウイルスはまた、感染性組換えA A Vを產生するのに適した当技術分野で公知の任意の従来の方法を使用して產生され得る。場合によって、組換えA A Vは、A A V粒子產生のために必要な構成要素のいくつかを安定に発現する細胞株を使用することによって產生され得る。例えば、A A Vのr e pおよびc a p遺伝子、ならびにネオマイシン耐性遺伝子などの選択用マーカーを含むプラスミド(または複数のプラスミド)は、細胞(パッケージング細胞)のゲノムへと組み込むことができる。したがって、パッケージング細胞株は、ヘルパーウイルス(例えば、ヘルパー機能を提供するアデノウイルス)、ならびに5'および3' A A V I T Rおよび目的のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むウイルスベクターによって共感染することができる。別の非限定的な例では、プラスミドではなくアデノウイルまたはバキュロウイルスを使用して、パッケージング細胞へとr e pおよびc a p遺伝子を導入することができる。さらに別の非限定的な例として、5'および3' A A V I T Rを含有するウイルスベクターとr e p-c a p遺伝子を含有するウイルスベクターとの両方が產生細胞のD N Aへと安定に組み込まれ得、組換えA A Vを產生するためにヘルパー機能を野生型アデノウイルスによって提供することができる。

10

20

30

40

50

【0282】

r A A Vビリオンまたはウイルス粒子を產生するために使用することができる適切な宿主細胞としては、酵母細胞、昆虫細胞、微生物、および哺乳動物細胞が挙げられる。限定されるものではないが、293細胞などの様々な安定なヒト細胞株を使用することができる。宿主細胞を操作して、ヘルパー機能を提供し、A A V I T Rで挟まれるヌクレオチド配列を複製およびカプシドで包み、ウイルス粒子またはA A Vビリオンを產生することができる。A A Vヘルパー機能を、A A Vの複製およびパッケージングのためにトランスにA A V遺伝子産物を提供するために宿主細胞中で発現されるA A V由来コード配列によって提供することができる。A A Vウイルスを、複製可能または複製欠損にすることができる。一般に、複製欠損A A Vウイルスは、1または複数のA A Vパッケージング遺伝子を欠く。細胞を、in vitro、ex vivo、またはin vivoで、本明細書に記載のウイルスベクター、ウイルス粒子、またはウイルスと接觸させることができる。場合によって、in vitroで接觸される細胞は、対象に戻すためにex vivoで改変された、確立された細胞株もしくは対象に由来する初代細胞に由来するか、またはin vitroで培養物中で増殖させることができる。一部の態様では、ウイルスを使用して、ex vivoでウイルスベクターを初代細胞中に送達して、外因性核酸配列、トランス遺伝子、または操作細胞受容体を免疫細胞、または特に、T細胞に導入するなど、細胞を改変した後、そのような改変細胞を対象に戻す前に培養物中で拡大し、選択し、または限定回数の継代を行う。一部の態様では、そのような改変細胞を細胞ベース療法において使用して、がんなどの疾患または状態を処置する。場合によって、初代細胞は、初代リンパ球であり得る。場合によって、初代細胞の集団は、初代リンパ球の集団であり得る。場合によって、初代細胞は、腫瘍浸潤リンパ球(T I L)である。場合によって、初代細胞の集団は、T I Lの集団である。

【0283】

場合によって、組換えA A Vは、自己相補的A A V(s c A A V)ではない。A A Vを精製するために適した任意の従来の方法は、組換えA A Vを精製するために本明細書で記載される実施形態において使用され得る。例えば、組換え体は、パッケージング細胞および/またはパッケージング細胞の上清から単離および精製することができる。場合によって、A A Vは、C s C 1勾配を使用する分離方法によって精製され得る。同様に、米国特許出願公開第20020136710号は、A A V付着を媒介する人工受容体または受容体様分子が固定化されているマトリックスを含む固体支持体を使用して、試料からA A V

を単離および精製する、AAVを精製するための方法の別の非限定的な例を記載する。

【0284】

場合によって、細胞の集団に、例えば、ウイルスベクター、AAV、修飾AAV、またはrAAVを形質導入することができる。ウイルスの形質導入は、CRISPR系を用いるゲノム破壊の前、CRISPR系を用いるゲノム破壊の後、またはCRISPR系を用いるゲノム破壊と同時に行うことができる。例えば、CRISPR系を用いるゲノム破壊は、外因性ポリ核酸の、ゲノムの一部への組込みを容易としうる。場合によって、CRISPR系を使用して、免疫チェックポイント遺伝子またはセーフハーバー遺伝子座などの遺伝子を含むゲノムの一部に二本鎖切断を導入することができる。場合によって、CRISPR系を使用して、少なくとも1個の遺伝子（例えば、CISHおよび/またはTCR）中に切断を導入することができる。二本鎖切断を、場合によって、ウイルスベクター、AAVまたは修飾AAVまたはrAAVによって細胞に送達される外因性受容体配列を導入することによって修復することができる。場合によって、二本鎖切断を、前記切断中に外因性トランス遺伝子（例えば、TCR）を組み込むことによって修復することができる。AAVまたは修飾AAVまたはrAAVは、CRISPR系によって破壊される遺伝子の一部に対する組換えアームを有するポリ核酸を含み得る。場合によって、CRISPR系は、ガイドポリ核酸を含む。場合によって、ガイドポリ核酸は、ガイドリボ核酸（gRNA）および/またはガイドデオキシリボ核酸（gDNA）である。例えば、CRISPR系は、CISHおよび/またはTCR遺伝子に二本鎖切断を導入してもよい。次いで、CISHおよび/またはTCR遺伝子を、CRISPR系によって予め破壊されたゲノムの一部と相補的な領域を有する組換えアームで挟まれうるトランス遺伝子（例えば、外因性TCRをコードするトランス遺伝子）の導入によって修復することができる。ゲノム破壊およびウイルス導入を含む細胞の集団を形質導入することができる。形質導入された細胞の集団は、約5%～約100%であり得る。例えば、約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または最大で約100%の細胞の集団を形質導入することができる。10

【0285】

場合によって、ウイルス（例えば、AAVもしくは修飾AAV）および/またはウイルスベクター（例えば、AAVベクターもしくは修飾AAVベクター）、および/または非ウイルスベクター（例えば、ミニサークルベクター）を、CRISPR系の後、または又クレアーゼもしくはヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドの後、またはガイドポリ核酸を細胞もしくは細胞の集団に導入した後、約、少なくとも約、または最大で約1～3時間、3～6時間、6～9時間、9～12時間、12～15時間、15～18時間、18～21時間、21～23時間、23～26時間、26～29時間、29～31時間、31～33時間、33～35時間、35～37時間、37～39時間、39～41時間、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、14日、16日、20日で、または20日よりも後に前記細胞または細胞の前記集団に導入する。場合によって、ウイルスベクターは、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を含む（例えば、AAVベクターは、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を含む）。場合によって、非ウイルスベクターは、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を含む（例えば、ミニサークルベクターは、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を含む）。場合によって、AAVベクター（例えば、修飾AAVベクター）は、少なくとも1個の外因性核酸を含む。場合によって、AAVベクター（例えば、修飾AAVベクター）を、少なくとも1個の外因性核酸を少なくとも1個の細胞のゲノム遺伝子座に組み込むために細胞の集団中の少なくとも1個の細胞に導入する。30

【0286】

場合によって、核酸は、バーコードまたはバーコード配列を含み得る。バーコードまたはバーコード配列とは、ポリヌクレオチドにより構成される、天然または合成の核酸配列であって、前記バーコード配列を有するポリヌクレオチドにより構成される、ポリヌクレオチドおよび他の配列の一義的な識別を可能とする核酸配列に関する。例えば、バーコー40

10

20

30

40

50

ドを含む核酸は、コードされるトランス遺伝子の識別を可能とし得る。バーコード配列は、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、45、または50もしくはそれよりも多い連続ヌクレオチドの配列を含み得る。核酸は、2つまたはそれよりも多いバーコード配列またはそれらの相補体を含み得る。バーコード配列は、ランダムにアセンブルされたヌクレオチド配列を含み得る。バーコード配列は、縮重配列であり得る。バーコード配列は、公知の配列であり得る。バーコード配列は、あらかじめ規定された配列であり得る。

【0287】

場合によって、本明細書で開示される方法は、核酸（例えば、第1の核酸および／または第2の核酸）を含み得る。場合によって、核酸は、トランス遺伝子をコードし得る。一般に、トランス遺伝子とは、複数のヌクレオチドサブユニットを含む直鎖状ポリマーを指す場合がある。トランス遺伝子は、任意の数のヌクレオチドを含み得る。場合によって、トランス遺伝子は、約100未満のヌクレオチドを含み得る。場合によって、トランス遺伝子は、少なくとも約100ヌクレオチドを含み得る。場合によって、トランス遺伝子は、少なくとも約200ヌクレオチドを含み得る。場合によって、トランス遺伝子は、少なくとも約300ヌクレオチドを含み得る。場合によって、トランス遺伝子は、少なくとも約400ヌクレオチドを含み得る。場合によって、トランス遺伝子は、少なくとも約500ヌクレオチドを含み得る。場合によって、トランス遺伝子は、少なくとも約10,000ヌクレオチドを含み得る。場合によって、トランス遺伝子は、少なくとも約20,000ヌクレオチドを含み得る。場合によって、トランス遺伝子は、少なくとも約30,000ヌクレオチドを含み得る。場合によって、トランス遺伝子は、少なくとも約40,000ヌクレオチドを含み得る。場合によって、トランス遺伝子は、少なくとも約50,000ヌクレオチドを含み得る。場合によって、トランス遺伝子は、約500～約5000の間のヌクレオチドを含み得る。場合によって、トランス遺伝子は、約5000～約10,000の間のヌクレオチドを含み得る。本明細書で開示される場合のうちのいずれかでは、トランス遺伝子は、DNA、RNA、またはDNAとRNAとのハイブリッド体を含み得る。場合によって、トランス遺伝子は、一本鎖であり得る。場合によって、トランス遺伝子は、二本鎖であり得る。

10

20

30

40

【0288】

a. ランダム挿入

本明細書で記載される方法の、1または複数のトランス遺伝子は、細胞ゲノムへと、ランダムに挿入することができる。これらのトランス遺伝子は、ゲノム内のいずれの場所に挿入されても機能的であり得る。例えば、トランス遺伝子は、それ自体のプロモーターをコードする場合もあり、内因性プロモーターの制御下にある位置へと挿入される場合もある。代替的に、トランス遺伝子は、遺伝子のイントロン、遺伝子のエクソン、プロモーター、または非コード領域などの遺伝子へと挿入することができる。

【0289】

トランス遺伝子配列をコードする核酸、例えば、RNAは、細胞の染色体へと、ランダムに挿入することができる。ランダムな組込みは、核酸、例えば、RNAを、細胞へと導入する任意の方法から得ることができる。例えば、方法は、電気穿孔、超音波穿孔、遺伝子銃の使用、リポトランスフェクション、リン酸カルシウムトランスフェクション、デンドリマーの使用、マイクロインジェクション、ならびにアデノウイルスベクター、AAVベクター、およびレトロウイルスベクターを含むウイルスベクターの使用、ならびに／またはII群のリボザイムであり得るがこれらに限定されない。

【0290】

トランス遺伝子をコードするRNAはまた、レポーター遺伝子の活性化を介して、トランス遺伝子またはその発現産物の存在を検出し得るよう、レポーター遺伝子を含むようにデザインすることもできる。上記で開示したレポーター遺伝子など、任意のレポーター遺

50

伝子を使用することができる。細胞培養物中で、レポーター遺伝子が活性化した細胞を選択することにより、トランス遺伝子を含有する細胞を選択することができる。

【0291】

挿入されるトランス遺伝子は、ゲノム内の標的二本鎖切断部位と類似する操作部位で挟んで、トランス遺伝子をポリ核酸から切り出し得るので、二本鎖切断領域に挿入することができる。場合によって、トランス遺伝子は、ウイルスにより導入することができる。例えば、AAVウイルスを用いて、細胞に、トランス遺伝子を感染させることができる。AAVウイルスによって組み込まれたトランス遺伝子発現を測定するためにフローサイトメトリーを用いることができる(図107A、図107B、および図128)。AAVウイルスによるトランス遺伝子の組込みは、細胞毒性を誘導しない(図108)。場合によって、AAVウイルスを用いて操作された細胞の集団のフローサイトメトリーによって測定される細胞生存率は、約30%～100%生存可能であり得る。操作細胞の集団のフローサイトメトリーによって測定される細胞生存率は、約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%～約100%であり得る。場合によって、rAAVウイルスは、細胞のゲノムへとトランス遺伝子を導入することができる(図109、図130、図131、および図132)。組み込まれたトランス遺伝子は、ゲノム導入の直後から、操作細胞の寿命まで、操作細胞によって発現することができる。例えば、組み込まれたトランス遺伝子は、細胞のゲノムへの導入の後、約0.1分から、トランス遺伝子の細胞への最初の導入後、1時間～5時間、5時間～10時間、10時間～20時間、20時間～1日、1日～3日、3日～5日、5日～15日、15日～30日、30日～50日、50日～100日、または、1000日まで測定することができる。トランス遺伝子の発現は、3日目から検出することができる(図110、および図112)。トランス遺伝子の発現は、7日目から検出することができる(図111、および図113)。トランス遺伝子の発現は、細胞のゲノムへのトランス遺伝子の導入の後、約4時間、6時間、8時間、12時間、18時間～約24時間検出することができる(図114A、図114B、図115A、および図115B)。場合によって、ウイルス力価は、トランス遺伝子の発現のパーセントに影響を及ぼし得る(図116、図117A、図117B、図118、図119A、図120A、図120B、図121A、図121B、図122A、図122B、図123A、図123B、図124、図125、図126、図127、図129A、図129B、図130A、図130B)。

【0292】

場合によって、目的の遺伝子、または本明細書で記載されるトランス遺伝子を含有する、AAVウイルスベクターなどのウイルスベクターは、ウイルスベクターを含有するウイルス粒子による細胞のトランスフェクションに続いて、細胞のゲノムへとランダムに挿入され得る。そのような挿入のランダム部位は、二本鎖切断を有するゲノム部位を含む。レトロウイルスなどの一部のウイルスは、ウイルスベクターのランダム挿入をもたらし得るインテグラーゼなどの因子を含む。

【0293】

場合によって、修飾AAVウイルスまたは操作AAVウイルスを使用して、トランス遺伝子を、細胞へと導入することができる(図83Aおよび図83B)。修飾AAVまたは野生型AAVは、少なくとも1つのゲノム位置に対する相同性アームを含み得る(図84～図86D)。

【0294】

トランス遺伝子をコードするRNAは、電気穿孔を介して、細胞へと導入することができる。RNAはまた、リポフェクション、感染、または形質転換を介して、細胞へと導入することもできる。電気穿孔および/またはリポフェクションを使用して、初代細胞にトランスフェクトすることができる。電気穿孔および/またはリポフェクションを使用して、初代造血系細胞にトランスフェクトすることができる。場合によって、RNAは、細胞内で、DNAへと逆転写することができる。次いで、DNA基質を、相同組換え反応において使用することができる。DNAはまた、相同組換えを使用せずに、細胞ゲノムへと導

10

20

30

40

50

入することもできる。場合によって、DNAは、ゲノム内の標的二本鎖切断領域と相補的な操作部位で挟むことができる。場合によって、DNAは、ポリ核酸から切り出すことができるので、相同組換えを伴わずに、二本鎖切断領域に挿入することができる。

【0295】

トランス遺伝子の発現は、発現アッセイ、例えば、qPCRによって、またはRNAのレベルを測定することによって検証され得る。発現レベルはまた、コピー数も示し得る(図143および図144)。例えば、発現レベルが極度に高度である場合、これは、トランス遺伝子の1つを超えるコピーが、ゲノム内に組み込まれたことを指し示し得る。代替的に、高度な発現は、トランス遺伝子が、高度な転写領域内に、例えば、高度に発現するプロモーターの近傍に組み込まれたことを指し示し得る。発現はまた、ウェスタンプロット法を介するなど、タンパク質レベルを測定することにより検証することもできる。場合によって、スプライスアクセプターアッセイを、トランス遺伝子の組込みを測定するレポーター系と共に使用することができる(図94)。場合によって、トランス遺伝子がAAV系を使用してゲノムへと導入される場合、スプライスアクセプターアッセイを、トランス遺伝子の組込みを測定するレポーター系と共に使用することができる(図106)。

10

【0296】

b. 部位特異的挿入

本明細書で開示される方法のうちのいずれかにおける、1または複数のトランス遺伝子の挿入は、部位特異的であり得る。例えば、1または複数のトランス遺伝子は、プロモーターと隣接して、またはこの近傍に挿入することができる。別の例では、1または複数のトランス遺伝子は、遺伝子(例えば、CISH遺伝子および/またはTCR遺伝子)のエクソンと隣接して、この近傍に、またはこの中に挿入することができる。そのような挿入を使用して、トランス遺伝子(例えば、がん特異的TCRトランス遺伝子)をノックインしながら、同時に、別の遺伝子(例えば、CISH遺伝子および/またはTCR)を破壊することができる。別の例では、1または複数のトランス遺伝子は、遺伝子のイントロンと隣接して、この近傍に、またはこの中に挿入することができる。トランス遺伝子は、AAVウイルスベクターにより導入することができ、標的ゲノム位置へと組み込むことができる(図87)。場合によって、rAAVベクターを用いて、トランス遺伝子の、ある特定の位置への挿入を導くことができる。例えば、場合によって、トランス遺伝子を、rAAVまたはAAVベクターによって、TCR、CTL44、PD-1、AAVS1、TCR、またはCISH遺伝子の少なくとも一部に組み込むことができる(図136A、図136B、図137A、および図137B)。

20

【0297】

細胞のターゲティングされた遺伝子座の修飾は、標的遺伝子座に対する相同性を有するDNAを、細胞へと導入することによりもたらし得る。DNAは、構築物の組込みを含む細胞の選択を可能とするマーカー遺伝子を含み得る。標的ベクター内の相補的DNAは、標的遺伝子座において、染色体DNAを組み換える。マーカー遺伝子は、相補的DNA配列、3'側組換えアーム、および5'側組換えアームで挟むことができる。細胞内の複数の遺伝子座をターゲティングすることができる。例えば、複数のゲノムの修飾が、単一のステップで生じるように、1つまたは複数の標的遺伝子座に特異的な組換えアームを伴うトランス遺伝子を、一度に導入することができる。

30

【0298】

場合によって、特定のゲノム部位に対する組換えアームまたは相同性アームは、約0.2kb～約5kbの長さであり得る。組換えアームは、約0.2kb、0.4kb、0.6kb、0.8kb、1.0kb、1.2kb、1.4kb、1.6kb、1.8kb、2.0kb、2.2kb、2.4kb、2.6kb、2.8kb、3.0kb、3.2kb、3.4kb、3.6kb、3.8kb、4.0kb、4.2kb、4.4kb、4.6kb、4.8kb～約5.0kbの長さであり得る。

40

【0299】

様々な酵素が、外来DNAの、宿主ゲノムへの挿入を触媒し得る。例えば、部位特異的

50

リコンビナーゼは、顕著に異なる生化学的特性を伴う、2つのタンパク質ファミリー、すなわちチロシンリコンビナーゼ（この場合、DNAを、チロシン残基へと共有結合的に接合させる）と、セリンリコンビナーゼ（この場合共有結合的接合は、セリン残基において生じる）とへとクラスター分けすることができる。場合によって、リコンビナーゼは、Cre、fC31インテグラーーゼ（Streptomyces属ファージfC31に由来するセリンリコンビナーゼ）、またはバクテリオファージ由来の部位特異的リコンビナーゼ（F1p、ラムダインテグラーーゼ、バクテリオファージHK022リコンビナーゼ、バクテリオファージR4インテグラーーゼ、およびファージTP901-1インテグラーーゼを含む）を含み得る。

【0300】

10

構築物内では、発現制御配列もまた使用することができる。例えば、発現制御配列は、多種多様な細胞型内で発現する、構成的プロモーターを含み得る。組織特異的プロモーターもまた、使用することができ、発現を、特異的細胞系統へと導くのに使用することができる。

【0301】

部位特異的遺伝子編集は、CRISPR、TALEN（米国特許第14/193,037号を参照されたい）、トランスポゾンベースのZEN、メガスクレアーゼ、またはMegasharp、またはトランスポゾンベースの系など、非ウイルス的遺伝子編集を使用して達成することができる。例えば、PigglyBacトランスポゾン系（Moriarty, B.S.ら、「Modular assembly of transposon integratable multigene vectors using Recombinant assembly」、Nucleic Acids Research、（8号）：e92頁（2013年）を参照されたい）またはSleeping beautyトランスポゾン系（Aronovich, E.Lら、「The Sleeping beauty transposon system: a non-viral vector for gene therapy」、Hum. Mol. Genet.、20巻（R1号）：R14～R20頁（2011年）を参照されたい）を使用することができる。

20

【0302】

30

部位特異的遺伝子編集はまた、相同組換えを伴わずに達成することもできる。外因性ポリ核酸は、相同組換えを使用せずに、細胞ゲノムへと導入することができる。場合によって、トランス遺伝子は、ゲノム内の標的二本鎖切断領域と相補的な操作部位で挟むことができる。トランス遺伝子は、ポリ核酸から切り出すことができるので、相同組換えを伴わずに、二本鎖切断領域に挿入することができる。

【0303】

40

場合によって、トランス遺伝子のゲノム組込みが望まれる場合、ヌクレアーゼがゲノムDNAを切斷する部位におけるトランス遺伝子の組込みを容易にするために、外因性ヌクレアーゼまたは操作ヌクレアーゼを、トランス遺伝子を含むプラスミド、直線状ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチド、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターに加えて細胞へと導入することができる。細胞のゲノムへのトランス遺伝子の組込みは、トランス遺伝子の長期にわたる安定的な発現を可能にする。一部の態様では、ウイルスベクターを使用して、トランス遺伝子に作動可能に連結されたプロモーターを導入することができる。他の場合には、ウイルスベクターはプロモーターを含んでおらず、挿入されたトランス遺伝子を発現するために、内因性プロモーターを含む標的遺伝子座におけるトランス遺伝子の挿入を必要とする。

【0304】

50

場合によって、ウイルスベクター（図138）は、CISHおよび/またはTCRおよび/またはセーフハーバー部位などの、標的ゲノム遺伝子座へのトランス遺伝子の組込みを導く相同性アームを含む。場合によって、第1のヌクレアーゼを、特定のゲノム部位で切斷するように操作して、がん遺伝子、チェックポイントインヒビター遺伝子、またはが

んなどの疾患もしくは状態に関する遺伝子などの、有害な遺伝子を抑制する（例えば、遺伝子（例えば、C I S H および / もしくは T C R ）の部分的もしくは完全な抑制）か、または無効化する。ヌクレアーゼによってそのようなゲノム遺伝子座で二本鎖切断を生じた後、非ウイルスまたはウイルスベクター（例えば、A A V ウイルスベクター）を導入して、D N A 切断部位またはヌクレアーゼによって生じる二本鎖切断の部位での、トランス遺伝子または治療効果を有する任意の外因性核酸配列の組込みを可能にすることができる。あるいは、トランス遺伝子を、相同組換えによる部位特異的挿入、C I S H および / または T C R またはセーフハーバー遺伝子座などの、所望の挿入部位と相補的な配列を含む相同性アームの使用などの、当技術分野で公知の方法を使用して異なるゲノム部位に挿入することができる。場合によって、第2のヌクレアーゼを提供して、第1のヌクレアーゼによるD N A 切断部位とは異なる遺伝子座でのトランス遺伝子の部位特異的挿入を容易とすることができます。場合によって、A A V ウイルスまたはA A V ウイルスベクターを、T 細胞受容体などのトランス遺伝子を導入するための送達系として使用することができる。
 r A A V ドナー上の相同性アームは、500塩基対～2000塩基対であり得る。例えば、r A A V ドナー上の相同性アームは、500 b p、600 b p、700 b p、800 b p、900 b p、1000 b p、1100 b p、1200 b p、1300 b p、1400 b p、1500 b p、1600 b p、1700 b p、1800 b p、1900 b p、または最大で2000 b p の長さであり得る。相同性アームの長さは、850 b p であり得る。他の場合、相同性アームの長さは、1040 b p であり得る。場合によって、相同性アームを伸長させて、ドナーの正確な組込みを可能にする。他の場合、相同性アームを伸長させて、ドナーの組込みを改善する。場合によって、ドナーポリ核酸のサイズを傷付けることなく相同性アームの長さを増加させるために、ドナーポリ核酸の交互部分を除去することができる。場合によって、ポリAテールを減少させて、相同性アームの長さを増加させることができる。

10

20

30

40

50

【0305】

c . 目的のトランス遺伝子または核酸配列

トランス遺伝子は、内因性遺伝子を、トランス遺伝子を伴わない場合より高レベルで発現させる、例えば、過剰発現させるために有用であり得る。加えて、トランス遺伝子を使用して、バックグラウンド、すなわち、トランス遺伝子をトランスフェクトされていない細胞より高レベルで、外因性遺伝子を発現させることができる。トランス遺伝子はまた、他の種類の遺伝子、例えば、ドミナントネガティブの遺伝子も包含し得る。

30

40

50

【0306】

トランス遺伝子は、トランス遺伝子の産物を産生するように、生物、細胞、組織、または臓器へと入れることができる。ポリ核酸は、トランス遺伝子を含み得る。ポリ核酸は、外因性受容体をコードし得る（図57A、図57B、および図57C）。例えば、本明細書では、アデノシンA2a受容体、CD276、Vセッドラメイン含有T細胞活性化インヒビター1、Bリンパ球およびTリンパ球関連、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ1、キラー細胞免疫グロブリン様受容体、3ドメイン、長細胞質テール、1、リンパ球活性化遺伝子3、プログラム細胞死1、A型肝炎ウイルス細胞受容体2、T細胞活性化のVドメイン免疫グロブリンサプレッサー、またはナチュラルキラー細胞受容体2B4であるゲノム配列内のポリヌクレオチドと相補的な配列を有する、少なくとも2つの組換えアームで挟んだ、少なくとも1つの外因性T細胞受容体（T C R ）配列を含むポリ核酸が開示される。1または複数のトランス遺伝子は、1または複数の破壊と組み合わせることができる。

50

【0307】

場合によって、トランス遺伝子（例えば、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子）または核酸（例えば、少なくとも1個の外因性核酸）を、非ウイルス組込みまたはウイルス組込み法を使用して、ゲノム遺伝子座中に、および / または遺伝子（例えば、C I S H および / もしくは T C R ）中の切断に組み込むことができる。場合によって、ウイルス組込みは、A A V （例えば、A A V ベクターまたは修飾A A V ベクターまたは組換えA A V ベ

クター)を含む。場合によって、AAVベクターは、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を含む。場合によって、細胞生存率は、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子(例えば、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子)を含むAAVベクターを細胞または細胞の集団に導入した後に測定される。場合によって、細胞生存率は、トランス遺伝子を細胞の集団中の少なくとも1個の細胞のゲノム遺伝子座に組み込んだ後に測定される(例えば、ウイルスまたは非ウイルス法によって)。場合によって、細胞生存率は、蛍光活性化細胞分取(FACS)によって測定される。場合によって、細胞生存率は、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を含むウイルスまたは非ウイルスベクターを細胞または細胞の集団に導入した後に測定される。場合によって、細胞の集団中の細胞の少なくとも約、または最大で約、または約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8%、または100%が、ウイルスベクター(例えば、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を含むAAVベクター)または非ウイルスベクター(例えば、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を含むミニサークルベクター)を細胞または細胞の集団に導入した後に生存している。場合によって、細胞生存率は、ウイルス(例えば、AAV)または非ウイルス(例えば、ミニサークル)ベクターを細胞および/または細胞の集団に導入した後、約、少なくとも約、または最大で約4時間、6時間、8時間、10時間、12時間、18時間、20時間、24時間、30時間、36時間、40時間、48時間、54時間、60時間、72時間、84時間、96時間、108時間、120時間、132時間、144時間、156時間、168時間、180時間、192時間、204時間、216時間、228時間、240時間で、または240時間よりも後に測定される。場合によって、細胞生存率は、ウイルス(例えば、AAV)または非ウイルス(例えば、ミニサークル)ベクターを細胞および/または細胞の集団に導入した後、約、少なくとも約、または最大で約1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、31日、45日、50日、60日、70日、90日で、または90日よりも後に測定される。場合によって、細胞生存率は、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を細胞の集団中の少なくとも1個の細胞に導入した後に測定される。場合によって、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターは、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を含む。場合によって、細胞生存率および/または細胞毒性は、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を、非ウイルス法(例えば、ミニサークルベクター)を使用する場合と比較して、ウイルス法(例えば、AAVベクター)を使用して細胞および/または細胞の集団に組み込んだ場合に改善される。場合によって、細胞毒性は、フローサイトメトリーによって測定される。場合によって、細胞毒性は、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を含むウイルスまたは非ウイルスベクターを、細胞または細胞の集団に導入した後に測定される。場合によって、細胞毒性は、非ウイルスベクター(例えば、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を含むミニサークル)を導入する場合と比較して、ウイルスベクター(例えば、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を含むAAVベクター)を細胞または細胞の集団に導入する場合に、少なくとも約、または最大で約、または約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8%、または100%低減される。場合によって、細胞毒性は、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを細胞または細胞の集団に導入した後(例えば、細胞または細胞の集団への、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を含むAAVベクターの導入後)、約、少なくとも約、または最大で約4時間、6時間、8時間、12時間、18時間、24時間、30時間、36時間、42時間、48時間、54時間、60時間、66時間、72時間、78時間、84時間、90時間、96時間、102時間

時間、108時間、114時間、120時間、126時間、132時間、138時間、144時間、150時間、156時間、168時間、180時間、192時間、204時間、216時間、228時間、240時間で、または240時間よりも後に測定される。場合によって、細胞毒性は、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを細胞または細胞の集団に導入した後（例えば、細胞または細胞の集団への、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を含むAAVベクターの導入後または少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を含むミニサークルベクターの導入後）、約、少なくとも約、または最大で約1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、31日、45日、50日、60日、70日、90日で、または90日よりも後に測定される。場合によって、細胞毒性は、少なくとも1個の外因性トランス遺伝子を細胞の集団中の少なくとも1個の細胞に組み込んだ後に測定される。

【0308】

場合によって、トランス遺伝子を、ランダムまたは部位特異的挿入を使用して細胞（例えば、T細胞）のゲノム中に挿入することができる。場合によって、挿入は、ウイルス挿入によるものであり得る。場合によって、トランス遺伝子のウイルス挿入は、特定のゲノム部位をターゲティングしうるか、または他の場合、トランス遺伝子のウイルス挿入は、ゲノム部位へのランダム挿入であり得る。場合によって、トランス遺伝子は、細胞のゲノム中に1回挿入される。場合によって、トランス遺伝子は、ゲノム中の遺伝子座にランダムに挿入される。場合によって、トランス遺伝子は、ゲノム中の1つを超える遺伝子座にランダムに挿入される。場合によって、トランス遺伝子は、遺伝子（例えば、CISHおよび/またはTCR）中に挿入される。場合によって、トランス遺伝子は、遺伝子（例えば、CISHおよび/またはTCR）中の切断に挿入される。場合によって、1つを超えるトランス遺伝子が、細胞のゲノム中に挿入される。場合によって、1つを超えるトランス遺伝子が、ゲノム中の1または複数の遺伝子座に挿入される。場合によって、トランス遺伝子は、少なくとも1個の遺伝子に挿入される。場合によって、トランス遺伝子は、2個またはそれよりも多い遺伝子（例えば、CISHおよび/またはTCR）に挿入される。場合によって、トランス遺伝子または少なくとも1個のトランス遺伝子は、ランダムおよび/または特異的様式で細胞のゲノム中に挿入される。場合によって、トランス遺伝子は、外因性トランス遺伝子である。場合によって、トランス遺伝子は、遺伝子（例えば、CISHおよび/またはTCR）の少なくとも一部と相補的な操作部位で挟まれる。場合によって、トランス遺伝子は、遺伝子（例えば、CISHおよび/またはTCR）中の切断と相補的な操作部位で挟まれる。場合によって、トランス遺伝子は、遺伝子中に挿入されない（例えば、CISHおよび/またはTCR遺伝子中に挿入されない）。場合によって、トランス遺伝子は、遺伝子中の切断（例えば、CISHおよび/またはTCR中の切断）に挿入されない。場合によって、トランス遺伝子は、ゲノム遺伝子座中の切断と相補的な操作部位で挟まれる。

【0309】

T細胞受容体（TCR）

【0310】

T細胞は、1または複数のトランス遺伝子を含み得る。1または複数のトランス遺伝子は、抗原上の少なくとも1つのエピトープ（例えば、がんエピトープ）を認識し、これらに結合するか、または抗原上の変異エピトープに結合する、TCRアルファ鎖タンパク質、TCRベータ鎖タンパク質、TCRガンマ鎖タンパク質、および/またはTCRデルタ鎖タンパク質を発現させうる。TCRは、がんネオ抗原に結合し得る。TCRは、図22および図26に示される通り、機能的TCRであり得る。TCRは、本明細書で規定されるアルファ鎖配列またはベータ鎖配列（例えば、それぞれ、さらなるアルファ鎖またはベータ鎖と組み合わせた）のうちの1つのみを含む場合もあり、両方の鎖を含む場合もある。TCRは、本明細書で規定されるガンマ鎖配列またはデルタ鎖配列（例えば、それぞ

10

20

30

40

50

、さらなるガンマ鎖またはデルタ鎖と組み合わせた)のうちの1つのみを含む場合もあり、両方の鎖を含む場合もある。機能的TCRは、融合タンパク質内の、少なくとも実質的な生体活性を維持する。TCRのアルファ鎖および/またはベータ鎖の場合、これは、両方の鎖が、その生物学的機能、特に、TCRの特異的ペプチド-MHC複合体への結合、および/またはペプチド活性化における機能的シグナル伝達を果たす、T細胞受容体を形成する(非修飾アルファ鎖および/もしくはベータ鎖と共に、または別の融合タンパク質のアルファ鎖および/もしくはベータ鎖と共に)ことがなおも可能であることを意味する。TCRのガンマ鎖および/またはデルタ鎖の場合、これは、両方の鎖が、その生物学的機能、特に、TCRの特異的ペプチド-MHC複合体への結合、および/またはペプチド活性化における機能的シグナル伝達を果たす、T細胞受容体を形成する(非修飾ガンマ鎖および/もしくはデルタ鎖と共に、または別の融合タンパク質のガンマ鎖および/もしくはデルタ鎖と共に)ことがなおも可能であることを意味する。T細胞はまた、1または複数のTCRも含み得る。T細胞はまた、1つを超える標的に特異的な、単一のTCRも含み得る。

10

【0311】

TCRは、様々な方法を使用して同定することができる。場合によって、TCRは、全エクソームシーケンシングを使用して同定することができる。例えば、TCRは、全エクソームシーケンシングにより同定されたE805G変異を含有する、ERBB2IP(ErbB2 interacting protein)抗原をターゲティングし得る。代替的に、TCRは、自家レパートリーから同定することもでき、同種レパートリーから同定することもでき、異種レパートリーから同定することもできる。自家および同種の同定は、マルチステップの工程を伴う。自家および同種のいずれの同定においても、CD14で選択した単球から、樹状細胞(DC)を作製し、成熟の後、特異的ペプチドでパルスするか、またはこれをトランスフェクトすることができる。ペプチドでパルスしたDCを使用して、自家T細胞または同種T細胞を刺激することができる。限界希釈法により、単一細胞のペプチド特異的T細胞クローンを、これらのペプチドでパルスしたT細胞株から単離することができる。目的のTCRを、同定および単離することができる。目的のTCRの鎖および鎖は、クローニングし、コドン最適化し、ベクターまたはトランス遺伝子へとコードすることができる。TCRの一部は、置き換えることができる。例えば、ヒトTCRの定常領域は、対応するマウス領域で置き換えることができる。ヒト定常領域の、対応するマウス領域による置換を実施して、TCRの安定性を増大させることができる。TCRはまた、ex vivoにおいて、高アビディティーまたは超生理学的アビディティーで同定することもできる。

20

【0312】

腫瘍特異的TCRの作製に成功するには、適切な標的配列を同定すべきである。配列は、希少な腫瘍反応性T細胞の単離により見出すことができ、これが可能でない場合、代替的な技術を利用して、高活性の抗腫瘍T細胞抗原を作製することもできる。1つの手法は、ヒト白血球抗原(HLA)系を発現するトランスジェニックマウスを、ヒト腫瘍タンパク質で免疫化して、ヒト抗原に対するTCRを発現するT細胞を作製するステップを伴うる(例えば、Stanislawskiら、「Circumventing tolerance to a human MDM2-derived tumor antigen by TCR gene transfer」、Nature Immunology 2巻、962~970頁(2001年)を参照されたい)。代替的な手法は、腫瘍特異的T細胞を、腫瘍の寛解を経つつある患者から単離し、反応性のTCR配列を、疾患は共有するが、非応答性であり得る、別の患者に由来するT細胞へと移入し得る、同種TCR遺伝子移入であり得る(de Witte, M. A. ら、「Targeting self-antigens through allogeneic TCR gene transfer」、Blood、108巻、870~877頁(2006年))。最後に、in vitro技術を利用して、TCRの配列を変化し、反応性の弱い腫瘍特異的TCRの、標的抗原との相互作用(アビディティー)の強度を増大させることに

30

40

50

より、それらの腫瘍殺滅活性を増強することができる (Schmid, D. A. ら、「Evidence for a TCR affinity threshold eliminating maximal CD8 T cell function」、J. Immunol.、184巻、4936~4946頁(2010年))。代替的に、TCRは、全エクソームシーケンシングを使用して同定することができる。

【0313】

本機能的TCR融合タンパク質は、MHCにより提示されたエピトープに対しするものとすることができる。MHCは、クラスI分子、例えば、HLA-Aであり得る。MHCは、クラスII分子であり得る。本機能的TCR融合タンパク質はまた、抗原をターゲティングするために、ペプチドベースの機能またはペプチドにガイドされる機能も有し得る。本機能的TCRは、連結することができ、例えば、本機能的TCRは、2A配列と連結することができる。本機能的TCRはまた、図26に示される通り、フリン-V5-SGSGF2Aと連結することもできる。本機能的TCRはまた、哺乳動物性構成要素も含有し得る。例えば、本機能的TCRは、マウス定常領域を含有し得る。本機能的TCRはまた、場合によって、ヒト定常領域も含有し得る。ペプチドにガイドされる機能は、原理的に、ペプチド配列を、TCRへと導入し、これらのペプチド配列により、腫瘍をターゲティングすることにより達成することができる。これらのペプチドは、ファージディスプレイライブリーや合成ペプチドライブリーや由来し得る(例えば、Arap, W. ら、「Cancer Treatment by Targeted Drug Delivery to Tumor Vasculature in a Mouse Model」、Science、279巻、377~380頁(1998年); Scott, C.P. ら、「Structural requirements for the biosynthesis of backbone cyclic peptide libraries」、8巻:801~815頁(2001年)を参照されたい)。とりわけ、乳癌、前立腺癌、および結腸癌に特異的なペプチドのほか、血管新生に特異的なペプチドも、既に単離に成功しており、本開示で使用することができる(Samoylova, T. I. ら、「Peptide Phage Display: Opportunities for Development of Personalized Anti-Cancer Strategies」、Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry、6巻(1号):9~17頁(9)(2006年))。本機能的TCR融合タンパク質は、変異させたがんエピトープまたは変異させたがん抗原に対するものとすることができる。

【0314】

使用することが可能であり、具体的に想定されるトランス遺伝子は、本明細書で開示される遺伝子、例えば、TCR遺伝子に対する、一定の同一性および/または相同性を呈する遺伝子を含み得る。したがって、遺伝子は、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性、または少なくともほぼこれらの比率の相同性(核酸レベルまたはタンパク質レベルで)を呈する場合、トランス遺伝子として使用し得ることが想定される。また、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性、または少なくともほぼこれらの比率の同一性(核酸レベルまたはタンパク質レベルで)を呈する遺伝子は、トランス遺伝子として使用し得ることも想定される。場合によって、トランス遺伝子は、機能的であり得る。

【0315】

トランス遺伝子は、細胞へと組み込むことができる。例えば、トランス遺伝子は、生物の生殖細胞系列へと組み込むことができる。細胞へと挿入されると、トランス遺伝子は、メッセンジャーRNA(mRNA)のコピーである、相補的DNA(cDNA)セグメン

10

20

30

40

50

トの場合もあり、ゲノムDNA（インtronを伴うかまたは伴わない）の、その元の領域内に存在する遺伝子自体の場合もある。Xタンパク質のトランス遺伝子とは、Xタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むトランス遺伝子を指す場合がある。場合によって、本明細書で使用される、Xタンパク質をコードするトランス遺伝子は、Xタンパク質のアミノ酸配列の100%または約100%をコードするトランス遺伝子であり得る。他の場合には、Xタンパク質をコードするトランス遺伝子は、Xタンパク質のアミノ酸配列のうちの、少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、もしくは1%、または少なくともほぼこれらの比率のアミノ酸配列をコードするトランス遺伝子であり得る。トランス遺伝子の発現は最終的に、機能的タンパク質、例えば、部分的に、完全に、または過剰に機能的なタンパク質を結果としてもたらし得る。上記で論じた通り、部分配列を発現させる場合、最終結果は、非機能的タンパク質またはドミナントネガティブのタンパク質であり得る。非機能的タンパク質またはドミナントネガティブのタンパク質はまた、機能的（内因性または外因性）タンパク質と競合する場合もある。トランス遺伝子はまた、mRNA（例えば、mRNA、shRNA、siRNA、またはマイクロRNA）もコードし得る。場合によって、トランス遺伝子が、mRNAをコードする場合、これを、ポリペプチド（例えば、タンパク質）へと翻訳することができる。したがって、トランス遺伝子は、タンパク質をコードし得ることが想定される。場合によって、トランス遺伝子は、タンパク質をコードする場合もあり、タンパク質の部分をコードする場合もある。加えて、タンパク質は、野生型ポリペプチドと比較して、1または複数の変異（例えば、欠失、挿入、アミノ酸の置換、または再配列）を有し得る。タンパク質は、天然ポリペプチドの場合もあり、人工ポリペプチド（例えば、組換えポリペプチド）の場合もある。トランス遺伝子は、2つまたはそれよりも多いポリペプチドにより形成される融合タンパク質をコードし得る。T細胞は、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、もしくはそれよりも多いトランス遺伝子を含むか、またはほぼこれらの数のトランス遺伝子を含み得る。例えば、T細胞は、TCR遺伝子を含む、1または複数のトランス遺伝子を含み得る。

【0316】

トランス遺伝子（例えば、TCR遺伝子）は、セーフハーバー遺伝子座内に挿入することができる。セーフハーバーは、トランス遺伝子が、内因性活性を搅乱されずに、組み込まれ、機能する、ゲノム位置を含み得る。例えば、1または複数のトランス遺伝子は、HPRT、AAVS部位（例えば、AAVS1、AAVS2など）、CCR5、hROSA26のうちのいずれか1つ、および／またはこれらの任意の組合せへと挿入することができる。トランス遺伝子（例えば、TCR遺伝子）はまた、内因性免疫チェックポイント遺伝子内に挿入することもできる。内因性免疫チェックポイント遺伝子は、刺激性チェックポイント遺伝子の場合もあり、阻害性チェックポイント遺伝子の場合もある。トランス遺伝子（例えば、TCR遺伝子）はまた、CD27、CD40、CD122、OX40、GITR、CD137、CD28、またはICOSなど、刺激性チェックポイント遺伝子内に挿入することもできる。免疫チェックポイント遺伝子の位置は、Genome Reference Consortium Human Build 38 patch release 2 (GRCh38.p2)アセンブリーを使用して提示する。トランス遺伝子（例えば、TCR遺伝子）はまた、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、VISTA、TCR、またはCISHなど、内因性阻害性チェックポイント遺伝子内に挿入することもできる。例えば、1または複数のトランス遺伝子は、CD27、CD40、CD122、OX40、GITR、CD137、CD28、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、VISTA、HPRT、AAVS部位（例えば、AAVS1、AAVS2など）、PHD1、PHD2、PHD3、CCR5、TCR、CISH、PPP1R12Cのうちのいずれか1つ

10

20

30

40

50

、および／またはこれらの任意の組合せへと挿入することができる。トランス遺伝子は、内因性 T C R 遺伝子内に挿入することができる。トランス遺伝子は、コードゲノム領域内に挿入することができる。トランス遺伝子はまた、非コードゲノム領域内に挿入することもできる。トランス遺伝子は、相同組換えを伴わずに、ゲノムへと挿入することができる。トランス遺伝子の挿入は、細胞内ゲノム移植のステップを含み得る。トランス遺伝子は、P D - 1 遺伝子に挿入することができる（図 4 6 A および図 4 6 B）。場合によって、1つを超えるガイドは、免疫チェックポイントをターゲティングし得る（図 4 7）。他の場合には、トランス遺伝子は、C T L A - 4 遺伝子に組み込むことができる（図 4 8 および図 5 0）。他の場合には、トランス遺伝子は、C T L A - 4 遺伝子およびP D - 1 遺伝子に組み込むことができる（図 4 9）。トランス遺伝子はまた、A A V S 1などのセーフハーバーへと組み込むこともできる（図 9 6 および図 9 7）。トランス遺伝子は、C I S H 遺伝子へと挿入することができる。トランス遺伝子は、T C R 遺伝子へと挿入することができる。トランス遺伝子は、A A V 組込み部位へと挿入することができる。場合によって、A A V 組込み部位は、セーフハーバーであり得る。第 5 染色体上のA A V S 2 または第 3 染色体上のA A V S 3 など、代替的なA A V 組込み部位も存在し得る。A A V S 2 、A A V S 3 、A A V S 4 、A A V S 5 、A A V S 6 、A A V S 7 、A A V S 8 など、さらなるA A V 組込み部位もまた、T C R などの外因性受容体のための、可能な組込み部位と考えられる。本明細書で使用されるA A V S とは、A A V S 1 ならびに類縁のアデノ随伴ウイルス（A A V S ）組込み部位を指す場合がある。

10

20

30

40

【0317】

キメラ抗原受容体は、細胞外抗原認識ドメイン、膜貫通ドメイン、およびT細胞の活性化を制御するシグナル伝達領域から構成され得る。細胞外抗原認識ドメインは、マウスマノクローナル抗体に由来する場合もあり、ヒト化モノクローナル抗体に由来する場合もあり、完全ヒトモノクローナル抗体に由来する場合もある。具体的には、細胞外抗原認識ドメインは、モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖の可変領域であって、一本鎖可変断片（s c F v）の形態でクローニングされ、ヒンジドメインおよび膜貫通ドメインを介して、T細胞受容体（T C R）複合体の細胞内シグナル伝達分子および少なくとも1つの共刺激性分子へと結合した可変領域からなる。場合によって、共刺激性ドメインは使用しない。

【0318】

本開示のC A Rは、真核細胞、例えば、哺乳動物細胞の細胞膜内に存在することができる、この場合、適する哺乳動物細胞は、細胞傷害性細胞、Tリンパ球、幹細胞、幹細胞の子孫細胞、前駆細胞、前駆細胞の子孫細胞、およびN K 細胞を含むがこれらに限定されない。真核細胞の細胞膜内に存在する場合、C A Rは、それが結合する標的の存在下で活性であり得る。標的は、膜上で発現し得る。標的はまた、可溶性でもあり得る（例えば、細胞に結合していない場合もある）。標的は、標的細胞など、細胞の表面上に存在し得る。標的は、脂質二重層など、固体表面上に提示することができる。標的は、可溶性抗原など、可溶性であり得る。標的は、抗原であり得る。抗原は、標的細胞など、細胞の表面上に存在し得る。抗原は、脂質二重層など、固体表面上に提示することができる。場合によって、標的は、抗原のエピトープであり得る。場合によって、標的は、がんネオ抗原であり得る。

近年におけるいくつかの進歩は、場合によって、抗腫瘍T細胞応答を誘発する、腫瘍特異的変異の同定に焦点を当てている。例えば、これらの内因性変異は、全エクソーム・シークエンシング法を使用して同定することができる（Tran Eら、「Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer」、Science、344巻：641～644頁（2014年））。したがって、C A Rは、腫瘍特異的ネオ抗原を標的とするs c F vから構成され得る。

【0319】

方法は、in vitro アッセイ（例えば、全エクソームシークエンシング）を使用して、がん患者から得られた試料に由来する、がん関連標的配列を同定し得る。方法はさら

50

に、標的配列を認識する第1のT細胞に由来するTCRトランス遺伝子も同定し得る。がん関連標的配列およびTCRトランス遺伝子は、同じ患者の試料から得ることもでき、異なる患者の試料から得ることもできる。がん関連標的配列を、CARトランス遺伝子上にコードして、CARを、標的配列に特異的とし得る。方法は、CARトランス遺伝子を含む核酸を、T細胞の膜を越えて、効率的に送達し得る。場合によって、第1のT細胞と、第2のT細胞とは、同じ患者から得ることができる。他の場合には、第1のT細胞と、第2のT細胞とは、異なる患者から得ることができる。他の場合には、第1のT細胞と、第2のT細胞とは、異なる患者から得ることができる。方法は、非ウイルス性組込み系またはウイルス性組込み系を使用して、CARトランス遺伝子を、安全かつ効率的に、T細胞のゲノムへと組み込んで操作T細胞を生成することが可能であり、したがって、CARトランス遺伝子を、操作T細胞内で、信頼できる形で発現させることができる。

10

【0320】

T細胞は、1または複数の遺伝子の破壊、および1または複数のトランス遺伝子を含み得る。例えば、それらの発現が破壊される、1または複数の遺伝子は、CD27、CD40、CD122、OX40、GITR、CD137、CD28、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、PHD1、PHD2、PHD3、VISTA、TCR、CISH、PPP1R12C、TCRのうちのいずれか1つ、および/またはこれらの任意の組合せを含み得る。例えば、多様な組合せを例示するためだけに述べると、それらの発現が破壊される、1または複数の遺伝子は、PD-1を含むことが可能であり、1または複数のトランス遺伝子は、TCRを含む。例えば、多様な組合せを例示するためだけに述べると、それらの発現が破壊される、1または複数の遺伝子は、CISHを含むことが可能であり、1または複数のトランス遺伝子は、TCRを含む。例えば、多様な組合せを例示するためだけに述べると、それらの発現が破壊される、1または複数の遺伝子は、TCRを含む。別の例では、それらの発現が破壊される、1または複数の遺伝子はまた、CTLA-4を含むことが可能であり、1または複数のトランス遺伝子は、TCRを含む。破壊は、破壊される遺伝子またはその一部のゲノム転写物のコピー数の減少をもたらしうる。例えば、破壊することができる遺伝子は、破壊されていない細胞中の同じ遺伝子と比較して転写物量が減少していくてもよい。破壊は、145コピー/μL、140コピー/μL、135コピー/μL、130コピー/μL、125コピー/μL、120コピー/μL、115コピー/μL、110コピー/μL、105コピー/μL、100コピー/μL、95コピー/μL、190コピー/μL、185コピー/μL、80コピー/μL、75コピー/μL、70コピー/μL、65コピー/μL、60コピー/μL、55コピー/μL、50コピー/μL、45コピー/μL、40コピー/μL、35コピー/μL、30コピー/μL、25コピー/μL、20コピー/μL、15コピー/μL、10コピー/μL、5コピー/μL、1コピー/μL、または0.05コピー/μL未満の破壊結果をもたらしうる。場合によって、破壊は、100コピー/μL未満をもたらしうる。

20

30

【0321】

T細胞は、1または複数の遺伝子の抑制、および1または複数のトランス遺伝子を含み得る。例えば、それらの発現が抑制される、1または複数の遺伝子は、CD27、CD40、CD122、OX40、GITR、CD137、CD28、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、PHD1、PHD2、PHD3、VISTA、CISH、PPP1R12C、TCRのうちのいずれか1つ、および/またはこれらの任意の組合せを含み得る。例えば、多様な組合せを例示するためだけに述べると、それらの発現が抑制される、1または複数の遺伝子は、PD-1を含むことが可能であり、1または複数のトランス遺伝子は、TCRを含む。例えば、多様な組合せを例示するためだけに述べると、それらの発現が抑制される、1または複数の遺伝子は、CISHを含むことが可能であり、1または複数のトランス遺伝子は、TCRを含む。例えば、多様な組合せを例示するためだけに述べる

40

50

と、それらの発現が抑制される、1または複数の遺伝子は、T C R を含むことが可能であり、1または複数のトランス遺伝子は、T C R を含む。別の例では、それらの発現が抑制される、1または複数の遺伝子はまた、C T L A - 4 を含むことが可能であり、1または複数のトランス遺伝子は、T C R を含む。

【0322】

T 細胞はまた、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、もしくはそれよりも多いドミナントネガティブのトランス遺伝子も含み得るか、または、ほぼこれらの数のドミナントネガティブのトランス遺伝子も含み得る。ドミナントネガティブのトランス遺伝子の発現は、ドミナントネガティブのトランス遺伝子の野生型対応物の発現および／または機能を抑制しうる。したがって、例えば、ドミナントネガティブのトランス遺伝子Xを含むT細胞は、その発現が抑制されるX 遺伝子を含む、異なるT細胞と比較して、類似の表現型を有し得る。1または複数のドミナントネガティブのトランス遺伝子は、ドミナントネガティブのC D 2 7、ドミナントネガティブのC D 4 0、ドミナントネガティブのC D 1 2 2、ドミナントネガティブのO X 4 0、ドミナントネガティブのG I T R、ドミナントネガティブのC D 1 3 7、ドミナントネガティブのC D 2 8、ドミナントネガティブのI C O S、ドミナントネガティブのA 2 A R、ドミナントネガティブのB 7 - H 3、ドミナントネガティブのB 7 - H 4、ドミナントネガティブのB T L A、ドミナントネガティブのC T L A - 4、ドミナントネガティブのI D O、ドミナントネガティブのK I R、ドミナントネガティブのL A G 3、ドミナントネガティブのP D - 1、ドミナントネガティブのT I M - 3、ドミナントネガティブのV I S T A、ドミナントネガティブのP H D 1、ドミナントネガティブのP H D 2、ドミナントネガティブのP H D 3、ドミナントネガティブのC I S H、ドミナントネガティブのT C R、ドミナントネガティブのC C R 5、ドミナントネガティブのH P R T、ドミナントネガティブのA A V S 部位（例えば、A A V S 1、A A V S 2など）、ドミナントネガティブのP P P 1 R 1 2 C、またはこれらの任意の組合せであり得る。

【0323】

また、遺伝子発現を抑制し得る、例えば、遺伝子をノックダウンし得る、1または複数の核酸をコードする、1または複数のトランス遺伝子を含むT細胞も提示される。遺伝子発現を抑制するR N Aは、s h R N A、s i R N A、R N A i、およびマイクロR N Aを含むがこれらに限定されない。例えば、s i R N A、R N A i、および／またはマイクロR N Aを、T細胞へと送達して、遺伝子発現を抑制することができる。さらに、T細胞は、s h R N Aをコードする、1または複数のトランス遺伝子を含み得る。s h R N Aは、特定の遺伝子に特異的であり得る。例えば、s h R N Aは、本出願で記載される任意の遺伝子であって、C D 2 7、C D 4 0、C D 1 2 2、O X 4 0、G I T R、C D 1 3 7、C D 2 8、I C O S、A 2 A R、B 7 - H 3、B 7 - H 4、B T L A、C T L A - 4、I D O、K I R、L A G 3、P D - 1、T I M - 3、V I S T A、H P R T、A A V S 部位（例えば、A A V S 1、A A V S 2など）、P H D 1、P H D 2、P H D 3、C C R 5、T C R、C I S H、P P P 1 R 1 2 C、および／またはこれらの任意の組合せを含むがこれらに限定されない遺伝子に特異的であり得る。

【0324】

1または複数のトランス遺伝子は、異なる種に由来し得る。例えば、1または複数のトランス遺伝子は、ヒト遺伝子、マウス遺伝子、ラット遺伝子、ブタ遺伝子、ウシ遺伝子、イヌ遺伝子、ネコ遺伝子、サル遺伝子、チンパンジー遺伝子、またはこれらの任意の組合せを含み得る。例えば、トランス遺伝子は、ヒト遺伝子的配列を有するヒトに由来し得る。1または複数のトランス遺伝子は、ヒト遺伝子を含み得る。場合によって、1または複数のトランス遺伝子は、アデノウイルス遺伝子ではない。

【0325】

トランス遺伝子は、上記で記載した通り、T細胞のゲノムへと、ランダムに挿入することもでき、部位特異的に挿入することもできる。例えば、トランス遺伝子は、T細胞のゲ

10

20

30

40

50

ノム内のランダムな遺伝子座へと挿入することができる。これらのトランス遺伝子は、機能的、例えば、ゲノム内のいずれの場所に挿入されても完全に機能的であり得る。例えば、トランス遺伝子は、それ自体のプロモーターをコードする場合もあり、内因性プロモーターの制御下にある位置へと挿入される場合もある。代替的に、トランス遺伝子は、遺伝子のイントロンもしくは遺伝子のエクソン、プロモーター、または非コード領域などの遺伝子へと挿入することができる。トランス遺伝子は、挿入が、遺伝子、例えば、内因性チェックポイントを破壊するように挿入することができる。トランス遺伝子の挿入は、内因性チェックポイント領域を含み得る。トランス遺伝子の挿入は、トランス遺伝子を挟みうる組換えアームでガイドすることができる。

【0326】

10

ある場合には、トランス遺伝子の1つを超えるコピーを、ゲノム内の、1つを超えるランダムな遺伝子座へと挿入することができる。例えば、複数のコピーを、ゲノム内のランダムな遺伝子座へと挿入することができる。これは、トランス遺伝子を、ランダムに、1回挿入する場合と比較した、全発現の増大をもたらし得る。代替的に、トランス遺伝子のコピーを、ある遺伝子へと挿入し、トランス遺伝子の別のコピーを、異なる遺伝子へと挿入することもできる。トランス遺伝子は、T細胞のゲノム内の特異的遺伝子座へと挿入され得るようにターゲティングすることができる。

【0327】

20

トランス遺伝子の発現は、1または複数のプロモーターにより制御することができる。プロモーターは、遍在性プロモーター、構成的プロモーター（関連遺伝子の連続的転写を可能とする非調節性プロモーター）、組織特異的プロモーター、または誘導性プロモーターであり得る。プロモーターと隣接して、またはこの近傍に挿入されるトランス遺伝子の発現は、調節することができる。例えば、トランス遺伝子は、遍在性プロモーターの近傍に、またはこの隣に挿入することができる。一部の遍在性プロモーターは、CAGGSプロモーター、hCMVプロモーター、PGKプロモーター、SV40プロモーター、またはROSA26プロモーターであり得る。

【0328】

30

プロモーターは、内因性プロモーターの場合もあり、外因性プロモーターの場合もある。例えば、1または複数のトランス遺伝子は、内因性または外因性のROSA26プロモーターと隣接して、またはこれらの近傍に挿入することができる。さらに、プロモーターは、T細胞に特異的であり得る。例えば、1または複数のトランス遺伝子は、ブタROS A26プロモーターと隣接して、またはこれらの近傍に挿入することができる。

【0329】

40

組織特異的プロモーターまたは細胞特異的プロモーターを使用して、発現の位置を制御することができる。例えば、1または複数のトランス遺伝子は、組織特異的プロモーターと隣接して、またはこれらの近傍に挿入することができる。組織特異的プロモーターは、FABPプロモーター、Lckプロモーター、CamKIIプロモーター、CD19プロモーター、ケラチンプロモーター、アルブミンプロモーター、aP2プロモーター、インスリンプロモーター、MCKプロモーター、MyHCプロモーター、WAPプロモーター、またはCol2Aプロモーターであり得る。

【0330】

組織特異的プロモーターまたは細胞特異的プロモーターを使用して、発現の位置を制御することができる。例えば、1または複数のトランス遺伝子は、組織特異的プロモーターと隣接して、またはこれらの近傍に挿入することができる。組織特異的プロモーターは、FABPプロモーター、Lckプロモーター、CamKIIプロモーター、CD19プロモーター、ケラチンプロモーター、アルブミンプロモーター、aP2プロモーター、インスリンプロモーター、MCKプロモーター、MyHCプロモーター、WAPプロモーター、またはCol2Aプロモーターであり得る。

【0331】

50

誘導性プロモーターも同様に、使用することができる。これらの誘導性プロモーターは

、所望の場合、誘導剤を添加または除去することにより、オンにすることもでき、オフにすることもできる。誘導性プロモーターは、Lac、tac、trc、trp、araB
A D、phoA、recA、proU、cst-1、tetA、cadA、nar、PL
、cspA、T7、VHB、Mx、および/またはTrexであり得るがこれらに限定されないことが想定される。

【0332】

細胞は、内因性遺伝子をノックアウトするように操作することができる。ノックアウトされ得る内因性遺伝子は、免疫チェックポイント遺伝子を含み得る。免疫チェックポイント遺伝子は、刺激性チェックポイント遺伝子の場合もあり、阻害性チェックポイント遺伝子の場合もある。免疫チェックポイント遺伝子の位置は、Genome Reference Consortium Human Build 38 patch release 2 (GRCh38.p2)アセンブリーを使用して提示することができる。
10

【0333】

ノックアウトされる遺伝子は、データベースを使用して選択することができる。場合によって、ある特定の内因性遺伝子は、ゲノム操作により適する。データベースは、エピジエネティクスにより許容性の標的部位を含み得る。データベースは、場合によって、ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) (<http://www.genome.gov/10005107>) であり得る。データベースは、ゲノム操作の許容性がより大きい可能性がある、オープンクロマチンを伴う領域を同定し得る。
20

【0334】

T細胞は、1または複数の遺伝子の破壊を含み得る。例えば、それらの発現が破壊される、1または複数の遺伝子は、アデノシンA2a受容体(ADORA)、CD276、Vセットドメイン含有T細胞活性化インヒビター1(VTCN1)、Bリンパ球およびTリンパ球関連(BTLA)、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4(CTLA4)、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ1(IDO1)、KIR3DL1(キラー細胞免疫グロブリン様受容体、3ドメイン、長細胞質テール、1)、リンパ球活性化遺伝子3(LAG3)、プログラム細胞死1(PD-1)、A型肝炎ウイルス細胞受容体2(HAVCR2)、VISTA(T細胞活性化のVドメイン免疫グロブリンサブレッサー)、ナチュラルキラー細胞受容体2B4(CD244)、CISH(サイトカイン誘導性SH2含有タンパク質)、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ1(HPRT)、アデノ随伴ウイルス組込み部位(AAVS部位(例えば、AAVS1、AAVS2など))、またはケモカイン(C-Cモチーフ)受容体5(遺伝子/偽遺伝子)(CCR5)、CD160分子(CD160)、TIGIT(IgおよびITIMドメインを有するT細胞免疫受容体)、CD96分子(CD96)、CRTAM(細胞傷害性および制御性T細胞分子)、白血球関連免疫グロブリン様受容体1(LAIR1)、シアル酸結合Ig様レクチン7(SIGLEC7)、シアル酸結合Ig様レクチン9(SIGLEC9)、腫瘍壞死因子受容体スーパーファミリーメンバー10b(TNFRSF10B)、腫瘍壞死因子受容体スーパーファミリーメンバー10a(TNFRSF10A)、カスパーぜ8(CASP8)、カスパーぜ10(CASP10)、カスパーぜ3(CASP3)、カスパーぜ6(CASP6)、カスパーぜ7(CASP7)、FADD(Fas関連細胞死ドメイン)、Fas細胞表面細胞死受容体(FAS)、形質転換増殖因子ベータ受容体II(TGFBRII)、形質転換増殖因子ベータ受容体I(TGFBR1)、SMADファミリーメンバー2(SMAD2)、SMADファミリーメンバー3(SMAD3)、SMADファミリーメンバー4(SMAD4)、SKIがん原遺伝子(SKI)、SKI様がん原遺伝子(SKIL)、TGIF1(TGFB誘導因子ホメオボックス1)、インターロイキン10受容体サブユニットアルファ(IL10RA)、インターロイキン10受容体サブユニットベータ(IL10RB)、HMOX2(ヘムオキシゲナーゼ2)、インターロイキン6受容体(IL6R)、IL6ST(インターロイキン6シグナル伝達因子)、c-srcチロシンキナーゼ(CSK)、PAG1(グリコスフィンゴ脂質ミクロドメイン)によ
30
40
50

り膜アンカーされるリソタンパク質 1)、 S I T 1 (シグナル閾値調節膜貫通アダプター 1)、 F O X P 3 (フォークヘッドボックス P 3)、 P R ドメイン 1 (P R D M 1)、 塩基性ロイシンジッパー転写因子、 A T F 様 (B A T F)、 可溶型グアニル酸シクラーゼ 1 アルファ 2 (G U C Y 1 A 2)、 可溶型グアニル酸シクラーゼ 1 アルファ 3 (G U C Y 1 A 3)、 可溶型グアニル酸シクラーゼ 1 ベータ 2 (G U C Y 1 B 2)、 可溶型グアニル酸シクラーゼ 1 ベータ 3 (G U C Y 1 B 3)、 C I S H (サイトカイン誘導性 S H 2 含有タンパク質)、 タンパク質のプロリルヒドロキシラーゼドメイン (P H D 1 、 P H D 2 、 P H D 3) ファミリー、 T C R のうちのいずれか 1 つ、 またはこれらの任意の組合せを含み得る。場合によって、 内因性 T C R もまた、 ノックアウトすることができる。 例えば、 多様な組合せを例示するためだけに述べると、 それらの発現が破壊される、 1 または複数の遺伝子は、 P D - 1 、 C T L A - 4 、 T C R 、 および C I S H を含み得る。

10

20

30

40

50

【 0 3 3 5 】

T 細胞は、 1 または複数の遺伝子の抑制を含み得る。 例えば、 それらの発現が抑制される、 1 または複数の遺伝子は、 アデノシン A 2 a 受容体 (A D O R A) 、 C D 2 7 6 、 V セットドメイン含有 T 細胞活性化インヒビター 1 (V T C N 1) 、 B リンパ球および T リンパ球関連 (B T L A) 、 細胞傷害性 T リンパ球関連タンパク質 4 (C T L A 4) 、 インドールアミン 2 , 3 - ジオキシゲナーゼ 1 (I D O 1) 、 T C R 、 K I R 3 D L 1 (キラー細胞免疫グロブリン様受容体、 3 ドメイン、 長細胞質テール、 1) 、 リンパ球活性化遺伝子 3 (L A G 3) 、 プログラム細胞死 1 (P D - 1) 、 A 型肝炎ウイルス細胞受容体 2 (H A V C R 2) 、 T 細胞活性化の V ドメイン免疫グロブリンサプレッサー (V I S T A) 、 ナチュラルキラー細胞受容体 2 B 4 (C D 2 4 4) 、 C I S H (サイトカイン誘導性 S H 2 含有タンパク質) 、 ヒポキサンチンホスホリボシルトランスクフェラーゼ 1 (H P R T) 、 アデノ随伴ウイルス組込み部位 (A A V S 1) 、 またはケモカイン (C - C モチーフ) 受容体 5 (遺伝子 / 偽遺伝子) (C C R 5) 、 C D 1 6 0 分子 (C D 1 6 0) 、 T I G I T (I g および I T I M ドメインを有する T 細胞免疫受容体) 、 C D 9 6 分子 (C D 9 6) 、 C R T A M (細胞傷害性および制御性 T 細胞分子) 、 白血球関連免疫グロブリン様受容体 1 (L A I R 1) 、 シアル酸結合 I g 様レクチン 7 (S I G L E C 7) 、 シアル酸結合 I g 様レクチン 9 (S I G L E C 9) 、 腫瘍壞死因子受容体スーパーファミリーメンバー 1 0 b (T N F R S F 1 0 B) 、 腫瘍壞死因子受容体スーパーファミリーメンバー 1 0 a (T N F R S F 1 0 A) 、 カスパーゼ 8 (C A S P 8) 、 カスパーゼ 1 0 (C A S P 1 0) 、 カスパーゼ 3 (C A S P 3) 、 カスパーゼ 6 (C A S P 6) 、 カスパーゼ 7 (C A S P 7) 、 F A D D (F a s 関連細胞死ドメイン) 、 F a s 細胞表面細胞死受容体 (F A S) 、 形質転換増殖因子ベータ受容体 I I (T G F B R I I) 、 形質転換増殖因子ベータ受容体 I (T G F B R 1) 、 S M A D ファミリーメンバー 2 (S M A D 2) 、 S M A D ファミリーメンバー 3 (S M A D 3) 、 S M A D ファミリーメンバー 4 (S M A D 4) 、 S K I がん原遺伝子 (S K I) 、 S K I 様がん原遺伝子 (S K I L) 、 T G I F 1 (T G F B 誘導因子ホメオボックス 1) 、 インターロイキン 1 0 受容体サブユニットアルファ (I L 1 0 R A) 、 インターロイキン 1 0 受容体サブユニットベータ (I L 1 0 R B) 、 H M O X 2 (ヘムオキシゲナーゼ 2) 、 インターロイキン 6 受容体 (I L 6 R) 、 I L 6 S T (インターロイキン 6 シグナル伝達因子) 、 c - s r c チロシンキナーゼ (C S K) 、 P A G 1 (グリコスフィンゴ脂質ミクロドメインにより膜アンカーされるリソタンパク質 1) 、 S I T 1 (シグナル閾値調節膜貫通アダプター 1) 、 F O X P 3 (フォークヘッドボックス P 3) 、 P R ドメイン 1 (P R D M 1) 、 塩基性ロイシンジッパー転写因子、 A T F 様 (B A T F) 、 可溶型グアニル酸シクラーゼ 1 アルファ 2 (G U C Y 1 A 2) 、 可溶型グアニル酸シクラーゼ 1 アルファ 3 (G U C Y 1 A 3) 、 可溶型グアニル酸シクラーゼ 1 ベータ 2 (G U C Y 1 B 2) 、 可溶型グアニル酸シクラーゼ 1 ベータ 3 (G U C Y 1 B 3) 、 タンパク質のプロリルヒドロキシラーゼドメイン (P H D 1 、 P H D 2 、 P H D 3) ファミリー、 C I S H (サイトカイン誘導性 S H 2 含有タンパク質) のうちのいずれか 1 つ、 またはこれらの任意の組合せを含み得る。 例えば、 多様な組合せを例示するためだけに述べると、 それらの発現が抑制される、 1 または複数の遺伝子は、 P D - 1 、 C

T L A - 4、T C R、および／またはC I S Hを含み得る。

【0336】

d. がん標的

操作細胞は、抗原をターゲティングし得る。操作細胞はまた、エピトープもターゲティングし得る。抗原は、腫瘍細胞抗原であり得る。エピトープは、腫瘍細胞エピトープであり得る。このような腫瘍細胞エピトープは、変異から生じる腫瘍に由来する抗原（ネオ抗原またはネオエピトープ）、共通の腫瘍特異的抗原、分化抗原、および腫瘍内で過剰発現する抗原など、多種多様な腫瘍抗原に由来し得る。これらの抗原は、例えば、少数を挙げれば、アルファ-アクチニン-4、ARTC1、BCR-ABL融合タンパク質(b3a2)、B-RAF、CASp-5、CASp-8、ベータ-カテニン、Cd c 27、CDK4、CDKN2A、COA-1、dek-can融合タンパク質、EFTUD2、伸長因子2、ETV6-AML1融合タンパク質、FLT3-ITD、FN1、GPNMB、LDLR-フコシルトランスフェラーゼ融合タンパク質、HLA-A2d、HLA-A1 1d、hsp70-2、KIAAO205、MART2、ME1、MUM-1f、MUM-2、MUM-3、neo-PAP、ミオシンクラスI、NFYC、OGT、OS-9、p53、pml-RARアルファ融合タンパク質、PRDX5、PTPRK、Kras、N-ras、RBAF600、SIRT2、SNRPD1、SYT-SSX1融合タンパク質またはSYT-SSX2融合タンパク質、TGF-ベータRII、トリオースリンサンイソメラーゼ、BAGE-1、GAGE-1、2、8、Gage 3、4、5、6、7、GnTVf、HERV-K-MEL、KK-LC-1、KM-HN-1、LAGE-1、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A12、MAGE-C2、mucin、NA-88、NY-ESO-1/LAGE-2、SAGE、Sp17、SSX-2、SSX-4、TAG-1、TAG-2、TRAG-3、TRP2-INT2g、XAGE-1b、CEA、gp100/Pmel17、カリクレイン4、マンマグロビンA、Melan-A/MART-1、NY-BR-1、OA1、PSA、RAB38/NY-MEL-1、TRP-1/gp75、TRP-2、チロシナーゼ、adipophilin、AIM-2、ALDH1A1、BCLX(L)、BCMA、BING-4、CPSE、サイクリンD1、DKK1、ENAH(hMena)、EP-CAM、EphA3、EZH2、FGF5、G250/MN/CAIX、HER-2/neu、IL13Rアルファ2、腸カルボキシリエステラーゼ、アルファフェトタンパク質、M-CSFT、MCS-P、mdm-2、MMP-2、MUC1、p53、PBF、PRAME、PSMA、RAGE-1、RGS5、RNF43、RU2AS、セセルニン1、SOX10、STEAP1、スルビシン、テロメラーゼ、VEGF、および／またはWT1に由来し得る。腫瘍関連抗原は、宿主が正常では発現しない抗原の場合もあり；変異しているか、切断されているか、ミスフォールディングしているか、または他の形で、宿主が正常では発現しない分子の異常な兆候の場合もあり；正常でも発現するが、異常な高レベルで発現する分子と同一な場合もあり；異常な関連または環境で発現する場合もある。腫瘍関連抗原は、例えば、タンパク質もしくはタンパク質断片、複合体炭水化物、ガングリオシド、ハプテン、核酸、他の生物学的分子、またはこれらの任意の組合せであり得る。

【0337】

場合によって、標的は、ネオ抗原またはネオエピトープである。例えば、ネオ抗原は、ERBB2IP内のE805G変異であり得る。場合によって、ネオ抗原およびネオエピトープは、全エクソームシーケンシングにより同定することができる。場合によって、ネオ抗原標的およびネオエピトープ標的は、消化器がん細胞が発現し得る。ネオ抗原およびネオエピトープは、上皮癌において発現し得る。

【0338】

e. 他の標的

エピトープは、間質エピトープであり得る。このようなエピトープは、腫瘍微小環境の間質上にあり得る。抗原は、間質抗原であり得る。このような抗原は、腫瘍微小環境の間

10

20

30

40

50

質上にあり得る。これらの抗原およびこれらのエピトープは、少数を挙げれば、例えば、腫瘍内皮細胞、腫瘍血管系、腫瘍線維芽細胞、腫瘍周皮細胞、腫瘍間質、および／または腫瘍間葉細胞において存在し得る。これらの抗原は、例えば、CD34、MCSF、FA
P、CD31、PCNA、CD117、CD40、MMMP4、および／またはテネイシンを含み得る。

【0339】

f. 遺伝子の破壊

トランス遺伝子の挿入は、遺伝子の破壊を伴って行うこともでき、これを伴わずに行うこともできる。トランス遺伝子を、CD27、CD40、CD122、OX40、GITR、CD137、CD28、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、VISTA、Hprt、AAVS部位（例えば、AAVS1、AAVS2など）、CCR5、PPP1R12C、TCR、またはCISHなどの遺伝子と隣接して、これらの近傍に、またはこれらの中に挿入して、遺伝子の活性または発現を低減するかまたは消失させることができる。例えば、がん特異的TCRトランス遺伝子を、遺伝子（例えば、CISHおよび／またはTCR）と隣接して、この近傍に、またはこの中に挿入して、遺伝子の活性または発現を低減するかまたは消失させることができる。トランス遺伝子の挿入は、内因性TCR遺伝子において行うことができる。

【0340】

遺伝子の破壊は、任意の特定の遺伝子の破壊であり得る。本出願内の遺伝子の遺伝子相 同体（例えば、遺伝子の任意の哺乳動物形）を対象とすることが想定される。例えば、破壊される遺伝子は、本明細書で開示される遺伝子、例えば、CD27、CD40、CD122、OX40、GITR、CD137、CD28、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、VISTA、Hprt、CCR5、AAVS部位（例えば、AAVS1、AAVS2など）、PPP1R12C、TCR、および／またはCISHに対する、一定の同一性および／または相同性を呈し得る。したがって、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を呈するか、またはほぼこれらの比率の相同性（核酸レベルまたはタンパク質レベルで）を呈する遺伝子は、破壊し得ることが想定される。また、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性を呈するか、またはほぼこれらの比率の同一性（核酸レベルまたはタンパク質レベルで）を呈する遺伝子は、破壊し得ることも想定される。当技術分野では、一部の遺伝子相 同体は公知であるが、場合によって、相同体は公知ではない。しかし、哺乳動物の間で相同な遺伝子は、NCBIのBLASTなど、公表されているデータベースを使用して、核酸（DNAまたはRNA）配列またはタンパク質配列を比較することにより見出すことができる。

【0341】

破壊され得る遺伝子は、遺伝子ファミリーのメンバーであり得る。例えば、破壊され得る遺伝子は、がん免疫療法の治療可能性を改善し得る。場合によって、遺伝子は、CISHであり得る。CISH遺伝子は、SOCS（suppressor of cytokine signaling）タンパク質ファミリーまたはSTAT誘導性STATインヒビター（SSI）タンパク質ファミリーとしてもまた公知である、サイトカイン誘導性STATインヒビター（CIS）タンパク質ファミリーのメンバーであり得る（例えば、Palmerら、Cish actively silences TCR signaling in CD8+ T cells to maintain tumor tolerance.、The Journal of Experimental Me

10

20

30

40

50

dicine、202巻(12号)、2095~2113頁(2015年)を参照されたい)。遺伝子は、サイトカインによるシグナル伝達を調節し得る、古典的な負のフィードバック系の一部を形成し得る、SOCSタンパク質ファミリーの一部であり得る。破壊される遺伝子は、CISHであり得る。CISHは、エリスロポエチン、プロラクチン、またはインターロイキン3(IL-3)受容体など、JAK-STAT5経路を介してシグナル伝達するサイトカインの負の調節に関与し得る。遺伝子は、そのチロシンリン酸化を抑制することにより、STAT5のトランス活性化を阻害し得る。CISHファミリーメンバーは、サイトカインによるシグナル伝達の、サイトカイン誘導性の負の調節因子であることが公知である。遺伝子の発現は、造血系細胞内のIL2、IL3、GM-CSF、またはEPOにより誘導することができる。プロテアソームを媒介する、遺伝子のタンパク質の分解は、エリスロポエチン受容体の不活化に関与し得る。場合によって、ターゲティングされる遺伝子は、腫瘍特異的T細胞内で発言し得る。ターゲティングされる遺伝子は、破壊されると、操作細胞の、抗原に関連する腫瘍への浸潤を増大させることができる。場合によって、ターゲティングされる遺伝子は、CISHであり得る。

10

【0342】

破壊され得る遺伝子は、TCRシグナル伝達、機能的アビディティー、またはがんに対する免疫の減衰に関与し得る。場合によって、破壊される遺伝子は、TCRが刺激されると、上方調節される。遺伝子は、細胞の拡大、機能的アビディティー、またはサイトカインの多機能性の阻害に関与し得る。遺伝子は、細胞によるサイトカインの産生を負に調節することに関与し得る。例えば、遺伝子は、例えば、エフェクターサイトカイン、IFN-ガンマ、および/またはTNFの産生の阻害に関与し得る。遺伝子はまた、TCRの刺激の後で、IL-2など、補助的サイトカインの発現の阻害にも関与し得る。このような遺伝子は、CISHであり得る。

20

【0343】

遺伝子の抑制はまた、多数の方式で行うこともできる。例えば、遺伝子の発現は、ノックアウトにより抑制することもでき、遺伝子のプロモーターを変化することにより抑制することもでき、かつ/または干渉性RNAを投与することにより抑制することもできる。これは、生物レベルで行うこともでき、組織レベル、臓器レベル、および/または細胞レベルで行うこともできる。細胞内、組織内、および/または臓器内で、1または複数の遺伝子をノックダウンする場合、1または複数の遺伝子は、RNA干渉性試薬、例えば、siRNA、shRNA、またはマイクロRNAを投与することにより抑制することができる。例えば、shRNAを発現させうる核酸を、細胞へと、安定的にトランسفェクトして、発現をノックダウンすることができる。さらに、shRNAを発現させうる核酸を、T細胞のゲノムへと挿入し、これにより、T細胞内の遺伝子をノックダウンすることもできる。

30

【0344】

破壊法はまた、ドミナントネガティブのタンパク質を過剰発現させるステップも含み得る。この方法は、機能的な野生型遺伝子の機能の、全体的な減殺を結果としてもたらし得る。加えて、ドミナントネガティブの遺伝子を発現させるステップは、ノックアウトおよび/またはノックダウンの表現型と類似の表現型を結果としてもたらし得る。

40

【0345】

ある場合には、終止コドンを、1または複数の遺伝子内に、挿入または創出(例えば、ヌクレオチドの置換により)することができ、これは、非機能的転写物または非機能的タンパク質を結果としてもたらし得る(ある場合には、ノックアウトと称する)。例えば、終止コドンを、1または複数の遺伝子の中央部において創出する場合、結果として得られる転写および/またはタンパク質は切断される可能性があり、非機能的であり得る。しかし、場合によって、切断は、活性(部分的に活性であるか、または過剰に活性の)タンパク質をもたらし得る。タンパク質が過剰に活性である場合、これは、ドミナントネガティブのタンパク質を結果としてもたらし得る。

【0346】

50

このドミナントネガティブのタンパク質は、任意のプロモーターの制御下にある核酸内で発現させうる。例えば、プロモーターは、遍在性プロモーターであり得る。プロモーターはまた、誘導性プロモーター、組織特異的プロモーター、細胞特異的プロモーター、および／または発生特異的プロモーターでもあり得る。

【0347】

次いで、ドミナントネガティブのタンパク質をコードする核酸を、細胞へと挿入することができる。任意の方法を使用することができる。例えば、安定的なトランスフェクションを使用することができる。加えて、ドミナントネガティブのタンパク質をコードする核酸は、T細胞のゲノムへも挿入することができる。

【0348】

T細胞内の1または複数の遺伝子は、任意の方法を使用して、ノックアウトまたは破壊することができる。例えば、1または複数の遺伝子のノックアウトは、1または複数の遺伝子を、T細胞のゲノムから欠失させることを含み得る。ノックアウトはまた、遺伝子配列の全部または一部を、T細胞から除去することも含み得る。また、ノックアウトは、T細胞のゲノム内の遺伝子の全部または一部を、1または複数のヌクレオチドで置き換えることを含み得ることも想定される。1または複数の遺伝子のノックアウトはまた、配列を、1または複数の遺伝子内に挿入し、これにより、1または複数の遺伝子の発現を破壊することも含み得る。例えば、配列の挿入は、終止コドンを、1または複数の遺伝子の中央部に作製し得る。配列の挿入はまた、1または複数の遺伝子のオープンリーディングフレームもシフトさせうる。

10

20

30

40

50

【0349】

ノックアウトは、任意の細胞内、臓器内、および／または組織内、例えば、T細胞内、造血幹細胞内、骨髄中、および／または胸腺内で行うことができる。例えば、ノックアウトは、全身におけるノックアウトであることが可能であり、例えば、1または複数の遺伝子の発現が、ヒトの全ての細胞内で抑制される。ノックアウトはまた、ヒトの、1または複数の細胞、組織、および／または臓器に特異的でもあり得る。これは、1または複数の遺伝子の発現を、1または複数の臓器、組織、または細胞型において選択的に抑制する、条件的ノックアウトにより達成することができる。条件的ノックアウトは、creを、細胞特異的プロモーター、組織特異的プロモーター、および／または臓器特異的プロモーターの制御下で発現させる、Cre - 1ox系により実施することができる。例えば、1または複数の遺伝子を、1または複数の組織内または臓器内でノックアウトし得る（または発現を抑制し得る）が、この場合、1または複数の組織または臓器は、脳、肺、肝臓、心臓、脾臓、膀胱、小腸、大腸、骨格筋、平滑筋、皮膚、骨、脂肪組織、毛髪、甲状腺、気管、胆嚢、腎臓、尿管、膀胱、大動脈、静脈、食道、横隔膜、胃、直腸、副腎、気管支、耳、眼、網膜、生殖器、視床下部、喉頭、鼻、舌、脊髄、または尿管、子宮、卵巣、精巣、および／またはこれらの任意の組合せを含み得る。また、1つの細胞型内の、1または複数の遺伝子も、ノックアウトし得る（または発現を抑制し得る）が、この場合、1または複数の細胞型は、毛胞、角化細胞、性腺刺激物質産生細胞、副腎皮質刺激ホルモン産生細胞（corticotropin）、甲状腺刺激ホルモン産生細胞、ソマトトロピン産生細胞、プロラクチン産生細胞、クロム親和性細胞、傍濾胞細胞、グロムス細胞、メラニン細胞、母斑細胞、メルケル細胞、象牙芽細胞、セメント芽細胞、角膜実質細胞、網膜ミュラー細胞、網膜色素上皮細胞、ニューロン、グリア（例えば、希突起膠細胞、星状細胞）、脳室上衣細胞、松果体細胞、肺細胞（例えば、I型肺細胞およびII型肺細胞）、クララ細胞、杯細胞、G細胞、D細胞、腸管クロム親和性細胞、胃主細胞、壁細胞、胃小窩細胞、K細胞、D細胞、I細胞、杯細胞、パネット細胞、腸細胞、M細胞、肝細胞、肝星細胞（例えば、中胚葉に由来するクッパー細胞）、胆囊細胞、腺房中心細胞、胰星細胞、胰細胞、胰細胞、胰細胞、胰F細胞、胰細胞、甲状腺（例えば、濾胞細胞）、副甲状腺（例えば、上皮小体主細胞）、好酸性細胞、尿路上皮細胞、骨芽細胞、骨細胞、軟骨芽細胞、軟骨細胞、線維芽細胞、線維細胞、筋芽細胞、筋細胞、筋サテライト細胞、腱細胞、心筋細胞、脂肪芽細胞、脂肪細胞、カハール介在細胞、血管芽細胞、内皮細胞、メサ

ンギウム細胞（例えば、糸球体内メサンギウム細胞および糸球体外メサンギウム細胞）、傍糸球体細胞、緻密斑細胞、間質細胞（stromal cell）、間質細胞（interstitial cell）、テロサイト、単純上皮細胞、有足細胞、腎近位尿細管刷子縁細胞、セルトリ細胞、ライディッヒ細胞、顆粒膜細胞、非纖毛性上皮細胞、胚細胞、精子、卵子、リンパ球、骨髓性細胞、内皮前駆細胞、内皮幹細胞、血管芽細胞、中胚葉性血管芽細胞、周皮細胞、壁細胞、および／またはこれらの任意の組合せを含む。

【0350】

場合によって、本開示の方法は、1または複数の細胞を、対象から得るステップを含み得る。細胞は一般に、膜内に封入された、細胞質、タンパク質、核酸、および／または細胞小器官を含む、任意の生物学的構造を指す場合がある。場合によって、細胞は、哺乳動物細胞であり得る。場合によって、細胞とは、免疫細胞を指す場合がある。細胞の非限定的な例は、B細胞、好塩基球、樹状細胞、好酸球、ガンマデルタT細胞、顆粒球、ヘルパーT細胞、ラングルハンス細胞、リンパ系細胞、生得的リンパ系細胞（ILC）、マクロファージ、マスト細胞、巨核球、メモリーT細胞、単球、骨髓細胞、ナチュラルキラーT細胞、好中球、前駆体細胞、形質細胞、前駆細胞、調節性T細胞、T細胞、胸腺細胞、これらの任意の分化細胞もしくは脱分化細胞、またはこれらの任意の細胞の混合物もしくは組合せを含み得る。

10

【0351】

場合によって、細胞は、ILCであることが可能であり、ILCは、群1 ILC、群2 ILC、または群3 ILCである。群1 ILCは一般に、T-bet転写因子により制御され、細胞内の病原体に応答して、IFN-ガンマおよびTNF-アルファなど、1型サイトカインを分泌する細胞として記載することができる。群2 ILCは一般に、GATA-3転写因子およびROR-アルファ転写因子に依拠し、細胞外の寄生虫感染症に応答して、2型サイトカインを産生する細胞として記載することができる。群3 ILCは一般に、ROR-ガンマ転写因子により制御され、IL-17および／またはIL-22を産生する細胞として記載することができる。

20

【0352】

場合によって、細胞は、所与の因子について陽性の細胞の場合もあり、所与の因子について陰性の細胞の場合もある。場合によって、細胞は、CD3+細胞、CD3-細胞、CD5+細胞、CD5-細胞、CD7+細胞、CD7-細胞、CD14+細胞、CD14-細胞、CD8+細胞、CD8-細胞、CD103+細胞、CD103-細胞、CD11b+細胞、CD11b-細胞、BDCA1+細胞、BDCA1-細胞、L-セレクチン+細胞、L-セレクチン-細胞、CD25+、CD25-細胞、CD27+、CD27-細胞、CD28+細胞、CD28-細胞、CD44+細胞、CD44-細胞、CD56+細胞、CD56-細胞、CD57+細胞、CD57-細胞、CD62L+細胞、CD62L-細胞、CD69+細胞、CD69-細胞、CD45RO+細胞、CD45RO-細胞、CD127+細胞、CD127-細胞、CD132+細胞、CD132-細胞、IL-7+細胞、IL-7-細胞、IL-15+細胞、IL-15-細胞、レクチン様受容体G1陽性細胞、レクチン様受容体G1陰性細胞、またはこれらの分化細胞もしくは脱分化細胞であり得る。細胞が発現する因子の例は、限定的であることを意図するものではなく、当業者は、細胞が、当技術分野で公知の任意の因子について陽性の場合もあり、陰性の場合もあることを察知するであろう。場合によって、細胞は、2つまたはそれよりも多い因子について陽性であり得る。例えば、細胞は、CD4+およびCD8+であり得る。場合によって、細胞は、2つまたはそれよりも多い因子について陰性であり得る。例えば、細胞は、CD25-、CD44-、およびCD69-であり得る。場合によって、細胞は、1または複数の因子について陽性であり得、かつ、1または複数の因子について陰性であり得る。例えば、細胞は、CD4+およびCD8-であり得る。次いで、選択した細胞を、対象へと注入することができる。場合によって、細胞を、1または複数の所与の因子を有するかまたは有さないことについて選択することができる（例えば、細胞を、1または複数の因子の有無に基づき分離することができる）。分離効率は、細胞の生存率と、トランス

30

40

50

遺伝子を、細胞のゲノムへと組み込み、かつ／または発現させ得る効率とに影響を及ぼし得る。場合によって、選択した細胞はまた、*in vitro*で拡大することもできる。選択した細胞は、注入の前に、*in vitro*で拡大することができる。本明細書で開示される方法のうちのいずれかにおいて使用される細胞は、本明細書で開示される細胞のうちのいずれかの混合物（例えば、2つまたはそれよりも多い異なる細胞）であり得ることを理解されたい。例えば、本開示の方法は、細胞を含むことが可能であり、細胞は、CD4+細胞と、CD8+細胞との混合物である。別の例では、本開示の方法は、細胞を含むことが可能であり、細胞は、CD4+細胞と、ナイーブ細胞との混合物である。

【0353】

ナイーブ細胞は、本明細書で開示される方法に特に有用であり得る、いくつかの特性を保持する。例えば、ナイーブ細胞は、*in vitro*における拡大およびT細胞受容体トランス遺伝子の発現がたやすく可能であり、少数の末端分化マーカーを呈し（細胞の注入後におけるより大きな効能と関連し得る資質）、増殖のより大きな潜在的 possibility を示唆する、長いテロメアを保持する（Hinrichs, C.S.ら、「Human effector CD8+ T cells derived from naive rather than memory subsets possess superior traits for adoptive immunotherapy」、Blood、117巻（3号）：808～14頁（2011年））。本明細書で開示される方法は、ナイーブ細胞に特異的なマーカーの選択または負の選択を含み得る。場合によって、細胞は、ナイーブ細胞であり得る。ナイーブ細胞は一般に、抗原へと曝露されていない、任意の細胞を指す場合がある。本開示における任意の細胞は、ナイーブ細胞であり得る。一例では、細胞は、ナイーブT細胞であり得る。ナイーブT細胞は一般に、骨髄中で分化し、胸腺内の中権性選択の正の過程および負の過程を経ることに成功し、かつ／または特異的マーカーの発現もしくは非存在（例えば、L-セレクチンの表面発現、活性化マーカーである、CD25、CD44、またはCD69の非存在、メモリーCD45ROアイソフォームの非存在）によって特徴付けられ得る細胞であると記載することができる。

【0354】

場合によって、細胞は、細胞株（例えば、不死化細胞株）を含み得る。細胞株の非限定的な例は、ヒトB C - 1 細胞、ヒトB J A B 細胞、ヒトI M - 9 細胞、ヒトJ i y o y e 細胞、ヒトK - 5 6 2 細胞、ヒトL C L 細胞、マウスM P C - 1 1 細胞、ヒトR a j i 細胞、ヒトR a m o s 細胞、マウスR a m o s 細胞、ヒトR P M I 8 2 2 6 細胞、ヒトR S 4 - 1 1 細胞、ヒトS K W 6 . 4 細胞、ヒト樹状細胞、マウスP 8 1 5 細胞、マウスR B L - 2 H 3 細胞、ヒトH L - 6 0 細胞、ヒトN A M A L W A 細胞、ヒトマクロファージ細胞、マウスR A W 2 6 4 . 7 細胞、ヒトK G - 1 細胞、マウスM 1 細胞、ヒトP B M C 細胞、マウスB W 5 1 4 7 (T 2 0 0 - A) 5 . 2 細胞、ヒトC C R F - C E M 細胞、マウスE L 4 細胞、ヒトJ u r k a t 細胞、ヒトS C I D . a d h 細胞、ヒトU - 9 3 7 細胞、またはこれらの細胞の任意の組合せを含む。

【0355】

幹細胞は、様々な体細胞をもたらすことが可能であり、したがって、原理的に、事実上任意の種類の治療用細胞の、無限の供給源として用いられる潜在的 possibility を有し得る。幹細胞の再プログラム能力はまた、再プログラム細胞の治療的価値を増強するように、さらなる操作も可能とする。本開示の方法のうちのいずれかにおいて、1または複数の細胞は、幹細胞に由来し得る。幹細胞の非限定的な例は、胚性幹細胞、成体幹細胞、組織特異的幹細胞、神経幹細胞、同種幹細胞、全能性幹細胞、複能性幹細胞、多能性幹細胞、人工多能性幹細胞、造血幹細胞、表皮幹細胞、臍帯幹細胞、上皮幹細胞、または脂肪由来幹細胞を含む。一例では、細胞は、造血幹細胞由來のリンパ系前駆細胞であり得る。別の例では、細胞は、胚性幹細胞由來のT細胞であり得る。さらに別の例では、細胞は、人工多能性幹細胞（iPSC）由來のT細胞であり得る。

【0356】

条件的ノックアウトは、例えば、テトラサイクリン誘導性プロモーター、発生特異的プロモーターを使用することによる、誘導性ノックアウトであり得る。これは、任意の時点

10

20

30

40

50

または特異的時点において、遺伝子 / タンパク質の発現を消失させるか、または抑制することを可能とし得る。例えば、テトラサイクリン誘導性プロモーターの場合、テトラサイクリンは、生後任意の時点において、T 細胞へ与えることができる。c r e / l o x 系はまた、発生特異的プロモーターの制御下も可能である。例えば、一部のプロモーターは、生後なおまたは思春期の開始後にオンとなる。これらのプロモーターは、c r e 発現を制御するのに使用することができ、したがって、発生特異的ノックアウトにおいて使用することができる。

【 0 3 5 7 】

また、ノックアウト技術の任意の組合せを実行し得ることも想定される。例えば、組織特異的ノックアウトまたは細胞特異的ノックアウトを、誘導技術と組み合わせ、組織特異的または細胞特異的な誘導性ノックアウトを創出することができる。さらに、発生特異的プロモーターなどの他の系を、組織特異的プロモーターおよび / または誘導性ノックアウトと組み合わせて使用することもできる。

10

【 0 3 5 8 】

ノックアウト技術はまた、遺伝子編集も含み得る。例えば、遺伝子編集は、C R I S P R 関連タンパク質 (C a s タンパク質、例えば、C a s 9) 、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ (Z F N) 、転写アクチベーター様エフェクタースクレアーゼ (T A L E N) 、およびメガスクレアーゼを含むスクレアーゼを使用して実施することができる。スクレアーゼは、天然で存在するスクレアーゼの場合もあり、遺伝子改変スクレアーゼの場合もあり、かつ / または組換えスクレアーゼの場合もある。遺伝子編集はまた、トランスポゾンベースの系 (例えば、P i g g y B a c 、S l e e p i n g b e a u t y) を使用して実施することができる。例えば、遺伝子編集は、トランスポザーゼを使用して実施することができる。

20

【 0 3 5 9 】

場合によって、スクレアーゼまたはスクレアーゼをコードするポリペプチドは、少なくとも 1 個の遺伝子 (例えば、C I S H および / または T C R) 中に切断を導入する。場合によって、スクレアーゼまたはスクレアーゼをコードするポリペプチドは、少なくとも 1 個の遺伝子 (例えば、C I S H および / または T C R) の不活性化または発現の低減を含む、および / またはもたらす。場合によって、遺伝子は、C I S H 、T C R 、アデノシン A 2 a 受容体 (A D O R A) 、C D 2 7 6 、V セットドメイン含有 T 細胞活性化インヒビタ - 1 (V T C N 1) 、B リンパ球および T リンパ球関連 (B T L A) 、インドールアミン 2 , 3 - ジオキシゲナーゼ 1 (I D O 1) 、K I R 3 D L 1 (k i l l e r c e l l i m m u n o g l o b u l i n - l i k e r e c e p t o r , t h r e e d o m a i n s , l o n g c y t o p l a s m i c t a i l 1) 、リンパ球活性化遺伝子 3 (L A G 3) 、A 型肝炎ウイルス細胞受容体 2 (H A V C R 2) 、V I S T A (T 細胞活性化の V ドメイン免疫グロブリンサプレッサー) 、ナチュラルキラー細胞受容体 2 B 4 (C D 2 4 4) 、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ 1 (H P R T) 、アデノ随伴ウイルス組込み部位 1 (A A V S 1) 、またはケモカイン (C - C モチーフ) 受容体 5 (遺伝子 / 偽遺伝子) (C C R 5) 、C D 1 6 0 分子 (C D 1 6 0) 、T I G I T (I g および I T I M ドメインを有する T 細胞免疫受容体) 、C D 9 6 分子 (C D 9 6) 、C R T A M (細胞傷害性および制御性 T 細胞分子) 、白血球関連免疫グロブリン様受容体 1 (L A I R 1) 、シアル酸結合 I g 様レクチン 7 (S I G L E C 7) 、シアル酸結合 I g 様レクチン 9 (S I G L E C 9) 、腫瘍壞死因子受容体スーパーファミリーメンバー 1 0 b (T N F R S F 1 0 B) 、腫瘍壞死因子受容体スーパーファミリーメンバー 1 0 a (T N F R S F 1 0 A) 、カスパーーゼ 8 (C A S P 8) 、カスパーーゼ 1 0 (C A S P 1 0) 、カスパーーゼ 3 (C A S P 3) 、カスパーーゼ 6 (C A S P 6) 、カスパーーゼ 7 (C A S P 7) 、F A D D (F a s 関連細胞死ドメイン) 、F a s 細胞表面細胞死受容体 (F A S) 、形質転換増殖因子ベータ受容体 I I (T G F B R I I) 、形質転換増殖因子ベータ受容体 I (T G F B R 1) 、S M A D ファミリーメンバー 2 (S M A D 2) 、S M A D ファミリーメンバー 3 (S M A D 3) 、S M A D ファミリーメンバー 4 (S M A D 4) 、S K I が

30

40

50

ん原遺伝子（S K I）、S K I 様がん原遺伝子（S K I L）、T G I F 1（T G F B 誘導因子ホメオボックス1）、プログラム細胞死1（P D - 1）、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（C T L A 4）、インターロイキン10受容体サブユニットアルファ（I L 1 0 R A）、インターロイキン10受容体サブユニットベータ（I L 1 0 R B）、H M O X 2（ヘムオキシゲナーゼ2）、インターロイキン6受容体（I L 6 R）、I L 6 S T（インターロイキン6シグナル伝達因子）、c - s r c チロシンキナーゼ（C S K）、P A G 1（グリコスフィンゴ脂質ミクロドメインにより膜アンカーされるリンタンパク質1）、S I T 1（シグナル閾値調節膜貫通アダプター1）、F O X P 3（フォークヘッドボックスP 3）、P R ドメイン1（P R D M 1）、塩基性ロイシンジッパー転写因子、A T F 様（B A T F）、可溶型グアニル酸シクラーゼ1アルファ2（G U C Y 1 A 2）、可溶型グアニル酸シクラーゼ1アルファ3（G U C Y 1 A 3）、可溶型グアニル酸シクラーゼ1ベータ2（G U C Y 1 B 2）、タンパク質のプロリルヒドロキシラーゼドメイン（P H D 1、P H D 2、P H D 3）ファミリー、または可溶型グアニル酸シクラーゼ1ベータ3（G U C Y 1 B 3）、T細胞受容体アルファ遺伝子座（T R A）、T細胞受容体ベータ遺伝子座（T R B）、e g l - 9 ファミリーの低酸素症誘導性因子1（E G L N 1）、e g l - 9 ファミリーの低酸素症誘導性因子2（E G L N 2）、e g l - 9 ファミリーの低酸素症誘導性因子3（E G L N 3）、P P P 1 R 1 2 C（タンパク質ホスファターゼ1調節サブユニット12C）、およびこれらの任意の組合せまたは誘導体からなる群から選択される。

10

20

【0360】

C R I S P R 系

本明細書で記載される方法は、C R I S P R 系を利用し得る。少なくとも5つの種類のC R I S P R 系が存在し、これらは全て、R N A タンパク質およびC a s タンパク質を包含する。I型、I I I型、およびI V型は、c r R N A と相補的な核酸を切断する可能な、多C a s タンパク質複合体をアセンブルする。I型およびI I I型はいずれも、プロセシングされたc r R N A を、多C a s タンパク質複合体へとアセンブリングする前に、プレc r R N A のプロセシングを要求する。I I型およびV型のC R I S P R 系は、少なくとも1つのガイドR N A と複合化させた、単一のC a s タンパク質を含む。

30

【0361】

C R I S P R 系の一般的な機構および近年における進歩については、C o n g , L . ら、「M u l t i p l e x genome engineering using C R I S P R systems」、S c i e n c e 、3 3 9巻(6 1 2 1号)：8 1 9 ~ 8 2 3頁(2 0 1 3年)；F u , Y . ら、「H i g h - f r e q u e n c y o f f - t a r g e t mutagenesis induced by C R I S P R - C a s n u c l e a s e s i n h u m a n c e l l s」、N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 、3 1巻、8 2 2 ~ 8 2 6頁(2 0 1 3年)；C h u , V T ら、「I n c r e a s i n g t h e e f f i c i e n c y o f h o m o l o g y - d i r e c t e d repair for C R I S P R - C a s 9 - i n d u c e d p r e c i s e gene editing i n m a m m a l i a n c e l l s」、N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 、3 3巻、5 4 3 ~ 5 4 8頁(2 0 1 5年)；S h m a k o v , S . ら、「D i s c o v e r y a n d f u n c t i o n a l c h a r a c t e r i z a t i o n o f d i v e r s e C l a s s 2 C R I S P R - C a s s y s t e m s」、M o l e c u l a r C e l l 、6 0巻、1 ~ 1 3頁(2 0 1 5年)；M a k a r o v a , K S ら、「A n u p d a t e d e v o l u t i o n a r y c l a s s i f i c a t i o n o f C R I S P R - C a s s y s t e m s」、N a t u r e R e v i e w s M i c r o b i o l o g y 、1 3巻、1 ~ 1 5頁(2 0 1 5年)において論じられている。標的D N Aの部位特異的切断は、1) ガイドR N A と標的D N A (また、プロトスペーサーとも呼ばれる)との塩基対合相補性、および2) プロトスペーサー隣接モチーフ(P A M)と称する、標的D N A内の短いモチーフの両方により決定される位置において生じる。例えば、操作細胞は、C R I S P R 系、例えば、

40

50

II型CRISPR系を使用して作製することができる。本明細書で開示される方法において使用されるCas酵素は、DNAの切断を触媒するCas9であり得る。Streptococcus pyogenesに由来するCas9、または任意の近縁のCas9による酵素作用により、20ヌクレオチドのガイド配列にハイブリダイズし、20ヌクレオチドの標的配列に後続してプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)を有する標的部位配列において、二本鎖切断を生じることができる。

【0362】

CRISPR系は、任意の手段を使用して細胞または細胞の集団へと導入することができる。場合によって、CRISPR系は、電気穿孔またはヌクレオフェクションによって導入し得る。電気穿孔は、例えば、Neon(登録商標)Transfection System(ThermoFisher Scientific)を使用して実施することができ、またはMAXA(登録商標)Nucleofector(MAXA(登録商標)Biosystems)もまた、細胞への核酸の送達のために使用することができる。電気穿孔パラメータは、トランスフェクション効率および/または細胞生存率を最適化するように調整することができる。電気穿孔デバイスは、指數関数的減衰、時定数、および方形波など、複数の電気波形パルスの設定項目を有し得る。あらゆる細胞型は、適用されるパルスパラメータ(例えば、電圧、キャパシタンス、および抵抗)に依存する、固有の最適電界強度(E)を有する。最適電界強度の適用は、膜貫通電圧の誘導による電気透過化であって、核酸が細胞膜を通過することを可能とする電気透過化を引き起こす。場合によって、電気穿孔パルスの電圧、電気穿孔パルス幅、パルス数、細胞密度、およびチップ型は、トランスフェクション効率および/または細胞生存率を最適化するように調整することができる。

10

20

30

40

50

【0363】

a. Casタンパク質

ベクターは、Casタンパク質(CRISPR関連タンパク質)など、CRISPR酵素をコードする、酵素コード配列に作動可能に連結することができる。場合によって、ヌクレアーゼまたはヌクレアーゼをコードするポリペプチドはCRISPR系に由来する(例えば、CRISPR酵素)。Casタンパク質の比限定期的な例は、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9(Csn1またはCsx12としてもまた公知である)、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csα5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsαX、Csx3、Csx1、Csx1S、Csf1、Csf2、CsO、Csf4、Cpf1、c2c1、c2c3、Cas9HiFi、それらの相同体、またはそれらの修飾形を含み得る。場合によって、触媒不活性なCasタンパク質を使用することができる(例えば、触媒不活性なCas9(dCas9))。Cas9などの非修飾のCRISPR酵素は、DNA切断活性を有し得る。場合によって、ヌクレアーゼはCas9である。場合によって、ポリペプチドはCas9をコードする。場合によって、ヌクレアーゼまたはヌクレアーゼをコードするポリペプチドは、触媒不活性である。場合によって、ヌクレアーゼは、触媒不活性なCas9(dCas9)である。場合によって、ポリペプチドは、触媒不活性なCas9(dCas9)をコードする。CRISPR酵素は、標的配列内および/または標的配列の相補体内などの、標的配列の一方または両方の鎖の切断を導くことができる。例えば、CRISPR酵素は、標的配列の最初または最後のヌクレオチドから、塩基対内の、または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50、100、200、500もしくはそれより多くの塩基対内の方または両方の鎖の切断を導くことができる。変異体CRISPR酵素が標的配列を含有する標的ポリヌクレオチドの一方または両方の鎖を切断する能力を欠くように、対応する野生型酵素と比べて変異させたCRISPR酵素をコードするベクターを使用することができる。Casタンパク質は、Cas9HiFiなど、高忠実度のCasタンパク質で

あり得る。

【0364】

1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10を超えるNLS、またはほぼこれらの数を超えるNLSなど、1または複数の核局在化配列(NLS)を含むCRISPR酵素をコードするベクターを使用することができる。例えば、CRISPR酵素は、アミノ末端において、またはこの近傍に、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10を超えるNLS、またはほぼこれらの数を超えるNLSを含む場合もあり、カルボキシル末端において、またはこの近傍に、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10を超えるNLS、またはほぼこれらの数を超えるNLSを含む場合もあり、これらの任意の組合せ(例えば、アミノ末端における1または複数のNLSと、カルボキシル末端における1または複数のNLSとの組合せ)を含む場合もある。1つを超えるNLSが存在する場合、単一のNLSが、1つを超えるコピーで、かつ/または1もしくは複数のコピーで存在する、他の1もしくは複数のNLSと組み合わせて存在し得るように、各NLSは、他のNLSから独立に選択することができる。10

【0365】

Cas9とは、例示的な野生型のCas9ポリペプチド(例えば、*S. pyogenes*に由来するCas9)に対して、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、100%の配列同一性および/もしくは配列類似性、または少なくともほぼこれらの比率の配列同一性および/もしくは配列類似性を伴うポリペプチドを指す場合がある。Cas9とは、例示的な野生型のCas9ポリペプチド(例えば、*S. pyogenes*に由来する)に対して、最大で50%、60%、70%、80%、90%、100%の配列同一性および/もしくは配列類似性、または最大でほぼこれらの比率の配列同一性および/もしくは配列類似性を伴うポリペプチドを指す場合がある。Cas9とは、Cas9タンパク質の野生型形態を指す場合もあり、欠失、挿入、置換、変異体、変異、融合、キメラ、またはこれらの任意の組合せなどのアミノ酸変化を含み得る、Cas9タンパク質の修飾形態を指す場合もある。20

【0366】

ヌクレアーゼまたはエンドヌクレアーゼ(例えば、Cas9などのCasタンパク質)をコードするポリヌクレオチドは、真核細胞など、特定の細胞内の発現のために、コドンを最適化することができる。この種の最適化は、同一のタンパク質をコードしながら、意図される宿主生物または宿主細胞のコドン優先性を模倣するように、外来由来の(例えば、組換え)DNAの変異を伴い得る。30

【0367】

方法において使用されるCRISPR酵素は、NLSを含み得る。NLSは、ポリペプチド鎖内の任意の位置、例えば、N末端またはC末端の近傍に位置し得る。例えば、NLSは、N末端またはC末端から、ポリペプチド鎖に沿って、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、40、50アミノ酸以内であるか、またはほぼこれらの数のアミノ酸以内であり得る。ある場合には、NLSは、N末端またはC末端から、50アミノ酸もしくはそれよりも多い数のアミノ酸、例えば、100、200、300、400、500、600、700、800、900、もしくは1000アミノ酸以内であるか、またはほぼこれらの数のアミノ酸以内であり得る。40

【0368】

ヌクレアーゼまたはエンドヌクレアーゼは、例示的な野生型の部位指向型ポリペプチド(例えば、*S. pyogenes*に由来するCas9)のヌクレアーゼドメインに対して、少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、もしくは100%のアミノ酸配列同一性、または少なくともほぼこれらの比率のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。

【0369】

S. pyogenes Cas9(SpCas9)(表11)を一般に、ゲノム操作のためのCRISPRエンドヌクレアーゼとして使用するが、どの標的切出し部位にも最良50

のエンドヌクレアーゼではない場合もある。例えば、*S p C a s 9* のための P A M 配列 (5' N G G 3') は、ヒトゲノム全体を通して夥多であるが、N G G 配列は、修飾に所望される遺伝子を適正にターゲティングするように位置しない場合がある。場合によって、異なるエンドヌクレアーゼを使用して、ある特定のゲノム標的をターゲティングすることができる。場合によって、N G G 以外の P A M 配列を伴う、合成 *S p C a s 9* 由来の変異体を使用することができる。加えて、多様な種に由来する、他の C a s 9 オーソログも同定されており、これらの「非 *S p C a s 9*」は、様々な P A M 配列に結合し、これらもまた、本開示に有用であり得るだろう。例えば、*S p C a s 9* の比較的大きなサイズ (約 4 k b のコード配列) は、*S p C a s 9* c D N A を保有するプラスミドは、細胞内で効率的に発現しえないことを意味する。逆に、*S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s C a s 9* (*S a C a s 9*) のコード配列はおよそ、*S p C a s 9* より 1 キロベース短く、おそらく、細胞内の効率的な発現を可能とする。*S p C a s 9* と同様に、*S a C a s 9* エンドヌクレアーゼも、i n v i t r o の哺乳動物細胞内、およびマウスのi n v i v o において、標的遺伝子を修飾することが可能である。

10

【 0 3 7 0 】

S . p y o g e n e s C a s 9 への代替法は、C p f 1 ファミリーに由来する、R N A にガイドされるエンドヌクレアーゼであって、哺乳動物細胞内の切断活性を提示するエンドヌクレアーゼを含み得る。C a s 9 ヌクレアーゼと異なり、C p f 1 を媒介するD N A の切断の結果は、短い 3' 突出を伴う二本鎖切断である。C p f 1 の付着末端型切断パターンは、従来の制限酵素クローニングと類似する指向性遺伝子移入であって、遺伝子編集の効率を増大させる指向性遺伝子移入の可能性を開きうる。上記で記載したC a s 9 の変異体およびオーソログと同様に、C p f 1 もまた、C R I S P R により、*S p C a s 9* が優先するN G G P A M 部位を欠く、A T リッチ領域またはA T リッチゲノムへとターゲティングし得る部位の数を拡大し得る。

20

【 0 3 7 1 】

任意の機能的濃度のC a s タンパク質を、細胞へと導入することができる。例えば、1 5マイクログラムのC a s m R N A を、細胞へと導入することができる。他の場合には、0 . 5マイクログラム ~ 1 0 0マイクログラムのC a s m R N A を導入することができる。0 . 5、5、1 0、1 5、2 0、2 5、3 0、3 5、4 0、4 5、5 0、5 5、6 0、6 5、7 0、7 5、8 0、8 5、9 0、9 5、または1 0 0マイクログラムのC a s m R N A を導入することができる。

30

【 0 3 7 2 】

場合によって、二重ニカーゼ法を使用して、二本鎖切断またはゲノム切断を導入することができる。C a s タンパク質は、いずれかのヌクレアーゼドメイン内の公知のアミノ酸において変異させ、これにより、1つのヌクレアーゼドメインの活性を消失させ、一本鎖切断を生じることが可能な、ニカーゼC a s タンパク質を作製することができる。2つの顕著に異なるガイドR N A ターゲティング逆鎖を伴うニカーゼは、標的部位内で二本鎖切断 (D S B) を生成するのに使用することができる（「二重ニック」C R I S P R 系または「二重ニカーゼ」C R I S P R 系と称することが多い）。この手法は、2つのオフターゲットニックが、D S B を引き起こすのに十分に近接して作製される可能性は小さいので、標的特異性を増大させ得る。

40

【 0 3 7 3 】

b . ガイディングポリ核酸 (例えは、g R N A またはg D N A)

ガイディングポリ核酸 (またはガイドポリ核酸) は、D N A またはR N A であり得る。ガイディングポリ核酸は、一本鎖または二本鎖であり得る。場合によって、ガイディングポリ核酸は、一本鎖領域と二本鎖領域との領域を含有し得る。ガイディングポリ核酸はまた、二次構造を形成し得る。場合によって、ガイディングポリ核酸は、ホスホロチオエートであり得るヌクレオチド間連結を含有し得る。任意の数のホスホロチオエートが存在し得る。例えは、1 ~ 約 1 0 0 のホスホロチオエートが、ガイディングポリ核酸配列内に存在し得る。場合によって、1 ~ 1 0 のホスホロチオエートが存在する。場合によって、0

50

、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20のホスホロチオエートがガイドィングポリ核酸配列内に存在する。

【0374】

本明細書で使用される「ガイドRNA(gRNA)」という用語、およびその文法的同等物は、標的DNAに特異的であることが可能であり、Casタンパク質などのヌクレアーゼと複合体を形成し得るRNAを指す場合がある。ガイドRNAは、標的部位を指定し、RNA/Cas複合体を、切断のために指定される標的DNAへとガイドする、ガイド配列またはスペーサー配列を含み得る。例えば、図15は、ガイドRNAが、CRISPR複合体を、3つの遺伝子へとターゲティングし、ターゲティングされた二本鎖切断を実施し得ることを裏付ける。標的DNAの部位特異的切断は、1)ガイドRNAと標的DNAとの塩基対合相補性(また、プロトスペーサーとも呼ばれる)、および2)プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)と称する、標的DNA内の短いモチーフの両方により決定される位置において生じる。同様に、ガイドRNA(「gDNA」)は、標的DNAに特異的であり得、ヌクレアーゼと複合体を形成して、その核酸切断活性を導くことができる。

10

【0375】

本明細書で開示される方法はまた、細胞もしくは胚または細胞の集団へと、少なくとも1つのガイドポリ核酸(例えば、ガイドDNA、もしくはガイドRNA)または核酸(例えば、少なくとも1つのガイドRNAをコードするDNA)を導入するステップを含み得る。ガイドRNAは、RNAにガイドされるエンドヌクレアーゼまたはヌクレアーゼと相互作用して、エンドヌクレアーゼまたはヌクレアーゼを、ガイドRNAの5'末端が染色体配列内の特異的プロトスペーサー配列と塩基対合する特異的標的部位へと導きうる。場合によって、ガイドポリ核酸は、gRNAおよび/またはgDNAであり得る。場合によって、ガイドポリ核酸は、少なくとも1個の遺伝子(例えば、CISHおよび/またはTCR)に対する相補配列を有しうる。場合によって、CRISPR系は、ガイドポリ核酸を含む。場合によって、CRISPR系は、ガイドポリ核酸および/またはヌクレアーゼもしくはヌクレアーゼをコードするポリペプチドを含む。場合によって、本開示の方法または系は、ガイドポリ核酸および/またはヌクレアーゼもしくはヌクレアーゼをコードするポリペプチドをさらに含む。場合によって、ガイドポリ核酸は、ヌクレアーゼまたはヌクレアーゼをコードするポリペプチドが細胞または細胞の集団に導入されるのと同時に、その前に、またはその後に導入される。場合によって、ガイドポリ核酸は、ウイルス(例えば、AAV)ベクターまたは非ウイルス(例えば、ミニサークル)ベクターが細胞または細胞の集団に導入されるのと同時に、その前に、またはその後に導入される(例えば、ガイドポリ核酸は、少なくとも1個の外因性トランスクレアーゼを含むAAVベクターが細胞または細胞の集団に導入されるのと同時に、その前に、またはその後に導入される)。

20

30

【0376】

ガイドRNAは、2つのRNA、例えば、CRISPR RNA(crRNA)およびトランスクレアーゼ活性化crRNA(tracrRNA)を含み得る。ガイドRNAは、ある場合には、crRNAおよびtracrRNAの部分(例えば、機能的な部分)の融合により形成される、単一のガイドRNA(sgRNA)を含み得る。ガイドRNAはまた、crRNAおよびtracrRNAを含む二重RNAでもあり得る。ガイドRNAは、crRNAを含むことが可能であり、tracrRNAを欠きうる。さらに、crRNAは、標的DNAまたはプロトスペーサー配列とハイブリダイズし得る。

40

【0377】

上記で論じた通り、ガイドRNAは、発現産物であり得る。例えば、ガイドRNAをコードするDNAは、ガイドRNAをコードする配列を含むベクターであり得る。ガイドRNAは、細胞または生物に、ガイドRNAをコードする配列およびプロモーターを含む単離ガイドRNAまたは単離プラスミドDNAをトランスクレアートすることにより、細胞または生物へと移入させることができる。ガイドRNAはまた、ウイルスを媒介する遺伝子

50

送達を使用するなど、他の形で、細胞または生物へと移入させることもできる。

【0378】

ガイドRNAは、単離ガイドRNAであり得る。例えば、ガイドRNAは、単離RNAの形態で、細胞または生物へとトランスフェクトすることができる。ガイドRNAは、任意のin vitro転写系を使用する、in vitro転写により調製することができる。ガイドRNAは、細胞へと、ガイドRNAのコード配列を含むプラスミドの形態ではなく、単離RNAの形態で移入させることができる。

【0379】

ガイドRNAは、DNAターゲティングセグメントおよびタンパク質結合性セグメントを含み得る。DNAターゲティングセグメント（またはDNAターゲティング配列、またはスペーサー配列）は、標的DNA内の特異的配列（例えば、プロトスペーサー）と相補的であり得るヌクレオチド配列を含む。タンパク質結合性セグメント（またはタンパク質結合性配列）は、部位指向型修飾性ポリペプチド、例えば、Casタンパク質など、RNAにガイドされるエンドヌクレアーゼと相互作用し得る。「セグメント」とは、分子のセグメント／区画／領域、例えば、RNA内のヌクレオチドの連続的連なりを意味する。セグメントはまた、セグメントが、1つを超える分子の領域を含み得るように、複合体の領域／区画も意味する。例えば、場合によって、DNAターゲティングRNAのタンパク質結合性セグメントは、1つのRNA分子およびタンパク質結合性セグメントであり、したがって、このRNA分子の領域を含む。他の場合には、DNAターゲティングRNAのタンパク質結合性セグメントは、相補性領域に沿ってハイブリダイズさせた、2つの個別の分子を含む。

10

20

30

40

【0380】

ガイドRNAは、2つの個別のRNA分子を含む場合もあり、单一のRNA分子を含む場合もある。例示的な单一分子のガイドRNAは、DNAターゲティングセグメントおよびタンパク質結合性セグメントの両方を含む。

【0381】

例示的な2分子型DNAターゲティングRNAは、crrNA様（「CRISPR RNA」または「ターゲターRNA」または「crrRNA」または「crrRNAリピート」）分子および対応するtracrRNA様（「トランス活性化CRISPR RNA」または「アクチベーターRNA」または「tracrRNA」）分子を含み得る。第1のRNA分子は、DNAターゲティングセグメント（例えば、スペーサー）を含み得るcrrNA様分子（ターゲターRNA）と、ガイドRNAのタンパク質結合性セグメントを含む二本鎖RNA（dsRNA）による二重鎖の半分を形成し得る、ヌクレオチドの連なりとあり得る。第2のRNA分子は、ガイドRNAのタンパク質結合性セグメントのdsRNA二重鎖の他の半分を形成し得る、ヌクレオチドの連なりを含み得る、対応するtracrRNA様分子（アクチベーターRNA）であり得る。言い換えれば、crrRNA様分子のヌクレオチドの連なりは、tracrRNA様分子のヌクレオチドの連なりと相補的であることが可能であり、これとハイブリダイズして、ガイドRNAのタンパク質結合性ドメインのdsRNA二重鎖を形成し得る。したがって、各crrRNA様分子は、対応するtracrRNA様分子を有することができる。加えて、crrRNA様分子は、一本鎖DNAターゲティングセグメントまたはスペーサー配列ももたらし得る。したがって、crrRNA様分子と、tracrRNA様分子（対応する対としての）とは、ハイブリダイズして、ガイドRNAを形成し得る。対象の2分子型ガイドRNAは、任意の対応する、crrRNAとtracrRNAとの対を含み得る。

40

【0382】

ガイドRNAのDNAターゲティングセグメントまたはスペーサー配列は、ガイドRNAのDNAターゲティングセグメントが、標的部位またはプロトスペーサーと塩基対合し得るように、染色体配列内の標的部位における配列、例えば、プロトスペーサー配列と相補的であり得る。場合によって、ガイドRNAのDNAターゲティングセグメントは、10ヌクレオチドまたはほぼこの数のヌクレオチド～25もしくはほぼこの数のヌクレオチ

50

ドまたはそれよりも多いヌクレオチドを含み得る。例えば、ガイドRNAの第1の領域と、染色体配列内の標的部位との塩基対合の領域は、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、23、24、25、もしくは25を超えるヌクレオチドの長さであり得るか、またはほぼこの長さであり得る。ある場合には、ガイドRNAの第1の領域は、19、20、もしくは21ヌクレオチドの長さであり得るか、またはほぼこの長さであり得る。

【0383】

ガイドRNAは、20ヌクレオチドの核酸配列をまたはほぼこの長さの核酸配列をターゲティングし得る。標的核酸は、20ヌクレオチド未満またはほぼこの長さ未満であり得る。標的核酸は、少なくとも5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、もしくはそれよりも多いヌクレオチド、または少なくともほぼこの長さであり得る。標的核酸は、最大で、5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、もしくはそれよりも多いヌクレオチド、または最大でこの長さであり得る。標的核酸配列は、PAMの最初のヌクレオチドのすぐの5'側の20塩基であり得るか、またはほぼこの長さであり得る。ガイドRNAは、核酸配列をターゲティングし得る。場合によって、ガイドRNAなどのガイディングポリ核酸は、約1塩基対～約20塩基対、PAMから離れたゲノム領域に結合し得る。ガイドは、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または最大約20塩基対、PAMから離れたゲノム領域に結合し得る。

10

20

【0384】

ガイド核酸、例えば、ガイドRNAは、別の核酸、例えば、細胞ゲノム内の標的核酸またはプロトスペーサーにハイブリダイズし得る核酸を指す場合がある。ガイド核酸は、RNAであり得る。ガイド核酸は、DNAであり得る。ガイド核酸は、核酸部位の配列に特異的に結合するように、プログラムまたはデザインすることができる。ガイド核酸は、ポリヌクレオチド鎖を含むことが可能であり、単一のガイド核酸と呼ばれる。ガイド核酸は、2つのポリヌクレオチド鎖を含むことが可能であり、二重ガイド核酸と呼ばれる。

【0385】

ガイド核酸は、核酸に新たな特色または増強された特色をもたらす、1または複数の修飾を含み得る。ガイド核酸は、核酸アフィニティータグを含み得る。ガイド核酸は、合成ヌクレオチド、合成ヌクレオチド類似体、ヌクレオチド誘導体、および/または修飾ヌクレオチドを含み得る。

30

【0386】

ガイド核酸は、例えば、5'末端もしくは3'末端において、またはこの近傍に、標的核酸内の配列（例えば、プロトスペーサー）にハイブリダイズし得るヌクレオチド配列（例えば、スペーサー）を含み得る。ガイド核酸のスペーサーは、ハイブリダイゼーション（すなわち、塩基対合）を介して、配列特異的に、標的核酸と相互作用し得る。スペーサー配列は、プロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）の5'側または3'側に位置する標的核酸にハイブリダイズし得る。スペーサー配列の長さは、少なくとも5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、もしくはそれよりも多いヌクレオチド、または少なくともほぼこの長さであり得る。スペーサー配列の長さは、最大で5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、もしくはそれよりも多いヌクレオチド、または最大でほぼこの長さであり得る。

40

【0387】

ガイドRNAはまた、二次構造を形成するdsRNA二重鎖領域も含み得る。例えば、ガイドRNAにより形成される二次構造は、ステム（またはヘアピン）およびループを含み得る。ループおよびステムの長さは、変動し得る。例えば、ループは、約3～約10ヌクレオチドの長さの範囲であることが可能であり、ステムは、約6～約20塩基対の長さの範囲であり得る。ステムは、1～約10ヌクレオチドの、1または複数のバルジを含み

50

得る。第2の領域の全長は、約16～約60ヌクレオチドの長さの範囲であり得る。例えば、ループは、4ヌクレオチドの長さであり得るか、またはほぼこの長さであることが可能であり、ステムは、12塩基対であり得るか、またはほぼこの長さであり得る。d s R N A二重鎖領域は、R N Aにガイドされるエンドヌクレアーゼ、例えば、C a sタンパク質など、R N A結合性タンパク質と複合体を形成し得る、タンパク質結合性セグメントを含み得る。

【0388】

ガイドR N Aはまた、5'末端または3'末端において、本質的に一本鎖であり得るテール領域も含み得る。例えば、テール領域は、ある場合には、目的の細胞内の任意の染色体配列と相補性ではなく、ある場合には、ガイドR N Aの残余部分と相補性ではない。さらに、テール領域の長さは、変動し得る。テール領域は、4ヌクレオチドの長さを超えるか、またはほぼこの長さを超える。例えば、テール領域の長さは、5または約5～60または約60ヌクレオチドの長さの範囲であり得る。

10

【0389】

ガイドR N Aは、細胞または胚へと、R N A分子として導入することができる。例えば、R N A分子は、in vitroで転写することもでき、かつ／または化学的に合成することもできる。次いで、ガイドR N Aは、細胞または胚へと、R N A分子として導入することができる。ガイドR N Aはまた、細胞または胚へと、R N A以外の核酸分子、例えば、D N A分子の形態で導入することもできる。例えば、ガイドR N AをコードするD N Aは、目的の細胞内または胚内のガイドR N Aの発現のためのプロモーター制御配列に作動可能に連結することができる。R N Aコード配列は、R N AポリメラーゼI I I (P o l I I I)により認識されるプロモーター配列に作動可能に連結することができる。

20

【0390】

ガイドR N AをコードするD N A分子はまた、直鎖状でもあり得る。ガイドR N AをコードするD N A分子はまた、環状でもあり得る。

【0391】

ガイドR N AをコードするD N A配列はまた、ベクターの一部でもあり得る。ベクターの一部の例は、プラスミドベクター、ファージミド、コスミド、人工／ミニ染色体、トランスポゾン、およびウイルスベクターを含み得る。例えば、R N AにガイドされるエンドヌクレアーゼをコードするD N Aは、プラスミドベクター内に存在する。適切なプラスミドベクターの、他の非限定的な例は、p U C、p B R 3 2 2、p E T、p B l u e s c r i p t、およびこれらの変異体を含む。さらに、ベクターは、さらなる発現制御配列（例えば、エンハンサー配列、K o z a k 配列、ポリアデニル化配列、転写終結配列など）、選択用マーカー配列（例えば、抗生物質耐性遺伝子）、複製起点などを含み得る。

30

【0392】

R N AにガイドされるエンドヌクレアーゼおよびガイドR N Aの両方を、細胞へと、D N A分子として導入する場合、各々は、個別の分子（例えば、融合タンパク質のコード配列を含有する1つのベクターと、ガイドR N Aのコード配列を含有する第2のベクターと）の一部の場合もあり、同じ分子（例えば、融合タンパク質およびガイドR N Aの両方のコード（および調節）配列を含有する1つのベクター）の一部の場合もある。

40

【0393】

C a s 9タンパク質またはその任意の誘導体などのC a sタンパク質は、リボ核タンパク質(R N P)複合体を形成するように、ガイドR N Aと、あらかじめ複合体化させることができる。R N P複合体は、初代免疫細胞へと導入することができる。R N P複合体の導入は、時限的であり得る。細胞は、細胞周期のG 1期、S期、および／またはM期において、他の細胞と同期し得る。R N P複合体は、H D Rを増強するような細胞期において送達することができる。R N P複合体は、相同性により導かれる修復を容易とし得る。

【0394】

ガイドR N Aはまた、修飾することもできる。修飾は、化学的变化、合成修飾、ヌクレオチド付加、および／またはヌクレオチド控除を含み得る。修飾はまた、C R I S P Rゲ

50

ノムの操作も増強し得る。修飾は、gRNAのキラリティーを変化し得る。場合によって、キラリティーは、修飾後において、一様または立体的に純粹であり得る。ガイドRNAは、合成したものであり得る。合成ガイドRNAは、CRISPRゲノムの操作を増強し得る。ガイドRNAはまた、切断型でもあり得る。切断を使用して、所望されないオフターゲットの変異誘発を低減することができる。切断は、任意の数のヌクレオチド欠失を含み得る。例えば、切断は、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、40、50、またはそれよりも多いヌクレオチドを含み得る。ガイドRNAは、任意の長さの標的相補性領域を含み得る。例えば、標的相補性領域は、20ヌクレオチド未満の長さであり得る。標的相補性領域は、20ヌクレオチドを超える長さであり得る。標的相補性領域は、PAM配列に直接近接した約5bp～約20bpをターゲティングし得る。標的相補性領域は、PAM配列に直接近接した約13bpをターゲティングし得る。

10

【0395】

場合によって、GUIDE-Seq解析を実施して、操作ガイドRNAの特異性を決定することができる。CRISPR系ヌクレアーゼによる、オフターゲット切断についての、GUIDE-Seqプロファイリングの一般的な機構およびプロトコールについては、Tsai, S.ら、「GUIDE-Seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR system nucleases」、Nature、33巻：187～197頁（2015年）において論じられている。

20

【0396】

gRNAは、任意の機能的な濃度で導入することができる。例えば、gRNAは、細胞へと、10マイクログラムで導入することができる。他の場合には、gRNAは、0.5マイクログラム～100マイクログラムで導入することができる。gRNAは、0.5、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100マイクログラムで導入することができる。

【0397】

場合によって、方法は、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Cas5、Casn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CasX、Csx3、Csx1、Csx1S、Csf1、Csf2、CsO、Csf4、Cpf1、c2c1、c2c3、Cas9HiFi、その相同体またはその修飾形からなる群から選択されるヌクレアーゼまたはエンドヌクレアーゼを含み得る。Casタンパク質は、Cas9であり得る。場合によって、方法は、少なくとも1個のガイドRNA(gRNA)をさらに含み得る。gRNAは、少なくとも1個の修飾を含み得る。外因性TCRは、がんネオ抗原に結合しうる。

30

【0398】

本明細書では、少なくとも1個の外因性T細胞受容体(TCR)受容体配列をコードする少なくとも1個のポリ核酸を導入するステップ；少なくとも1個の修飾を含む少なくとも1個のガイドRNA(gRNA)を導入するステップ；および少なくとも1個のエンドヌクレアーゼを導入するステップを含み；gRNAが少なくとも1個の内因性ゲノムと相補的な少なくとも1個の配列を含む、操作細胞を生成する方法が開示される。場合によって、修飾は、5'末端上の修飾、3'末端上の修飾、5'末端～3'末端における修飾、単一塩基の修飾、2' - リボース修飾、またはこれらの任意の組合せである。修飾は、塩基の置換、挿入、欠失、化学修飾、物理修飾、安定化、精製、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択することができる。

40

【0399】

場合によって、修飾は、化学修飾である。修飾は、5'アデニル酸、5'グアノシン三

50

リン酸カップ、5'N7-メチルグアノシン三リン酸カップ、5'三リン酸カップ、3'リン酸、3'チオリン酸、5'リン酸、5'チオリン酸、Cis-Synチミジン二量体、三量体、C12スペーサー、C3スペーサー、C6スペーサー、dSpacer、PCスペーサー、rSpacer、Spacer 18、Spacer 9、3'-3'修飾、5'-5'修飾、脱塩基、アクリジン、アゾベンゼン、ビオチン、ビオチンBB、ビオチンTEG、コレステリルTEG、デスチオビオチンTEG、DNP-TEG、DNP-X、DOTA、dT-ビオチン、二重ビオチン、PCビオチン、ソラーレンC2、ソラーレンC6、TINA、3'DABCYL、Black Hole Quencher 1、Black Hole Quencher 2、DABCYL SE、dT-DABCYL、IRDye QC-1、QSY-21、QSY-35、QSY-7、QSY-9、カルボキシルリンカー、チオールリンカー、2'デオキシリボヌクレオシド類似体プリン、2'デオキシリボヌクレオシド類似体ピリミジン、リボヌクレオシド類似体、2'-O-メチルリボヌクレオシド類似体、糖修飾類似体、ゆらぎ/ユニバーサル塩基、蛍光色素標識、2'フルオロRNA、2'O-メチルRNA、メチルホスホネート、ホスホジエステルDNA、ホスホジエステルRNA、ホスホチオエート(phosphothioate)DNA、ホスホロチオエートRNA、UNA、シュードウリジン-5'-三リン酸、5'-メチルシチジン-5'-三リン酸、2-O-メチル3ホスホロチオエート、またはこれらの任意の組合せから選択することができる。修飾は、図98に示される、シュードウリジン(pseudouridine)修飾であり得る。場合によって、修飾は、生存率に影響を及ぼさなくてもよい(図99Aおよび図99B)。

【0400】

場合によって、修飾は、2-O-メチル3ホスホロチオエート付加である。2-O-メチル3ホスホロチオエート付加は、1塩基~150塩基において実施することができる。2-O-メチル3ホスホロチオエート付加は、1塩基~4塩基において実施することができる。2-O-メチル3ホスホロチオエート付加は、2つの塩基上で実施することができる。2-O-メチル3ホスホロチオエート付加は、4つの塩基上で実施することができる。修飾はまた、切断でもあり得る。切断は、5つの塩基の切断であり得る。

【0401】

場合によって、5つの塩基の切断(truncation)は、Casタンパク質による切断(cut)の実施を防止し得る。エンドヌクレアーゼまたはヌクレアーゼまたはヌクレアーゼをコードするポリペプチドは、CRISPR系、TALEN、亜鉛フィンガー、トランスポゾンベース、ZEN、メガヌクレアーゼ、Mega-TAL、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択することができる。場合によって、エンドヌクレアーゼまたはヌクレアーゼまたはヌクレアーゼをコードするポリペプチドは、CRISPR系に由来するものであり得る。エンドヌクレアーゼまたはヌクレアーゼまたはヌクレアーゼをコードするポリペプチドは、CasまたはCasをコードするポリペプチドであり得る。場合によって、エンドヌクレアーゼまたはヌクレアーゼまたはヌクレアーゼをコードするポリペプチドは、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csα5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csβ1、Csβ2、Csβ3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsαX、Csx3、Csx1、Csx1S、Csf1、Csf2、CsO、Csf4、Cpf1、c2c1、c2c3、Cas9HiFi、その相同体、またはその修飾形からなる群から選択することができる。Casの修飾形は、図100Aおよび100Bにおいて示される、カップ除去型Casであり得る。Casタンパク質は、Cas9であり得る。Cas9は、前記少なくとも1つの内因性ゲノム内で、二本鎖切断を創出し得る。場合によって、エンドヌクレアーゼまたはヌクレアーゼまたはヌクレアーゼをコードするポリペプチドは、Cas9またはCas9をコードするポリペプチドであり得る。場合によって、エンドヌクレアーゼまたはヌクレアーゼまたはヌクレアーゼをコードするポリペ

10

20

30

40

50

チドは、触媒的に不活性であってもよい。場合によって、エンドヌクレアーゼまたはヌクレアーゼまたはヌクレアーゼをコードするポリペプチドは、触媒的に不活性な Cas 9 または触媒的に不活性な Cas 9 をコードするポリペプチドであり得る。場合によって、内因性ゲノムは、少なくとも 1 個の遺伝子を含む。遺伝子は、CISH、TCR、TRA、TRB、またはこれらの組合せであり得る。場合によって、二本鎖切断は、相同性により導かれる修復 (HR)、非相同末端結合 (NHEJ)、マイクロ相同性媒介型末端結合 (MMEJ)、またはこれらの任意の組合せもしくは誘導体を使用して修復することができる。TCR は、二本鎖切断へと組み込むことができる。

【0402】

c. トランス遺伝子

10

トランス遺伝子の挿入（例えば、外因性配列）は、例えば、ポリペプチドを発現させるために使用することもでき、変異体遺伝子を是正するために使用することもでき、野生型遺伝子の発現を増大させるために使用することもできる。トランス遺伝子は、それが置かれるゲノム配列とは同一でないことが典型的である。ドナートランス遺伝子は、目的の場所において、効率的 HDR を可能とするように、相同性である 2 つの領域で挟んだ非相同配列を含有し得る。加えて、トランス遺伝子配列は、細胞内クロマチンの、目的の領域と相同ではない配列を含有するベクター分子を含み得る。トランス遺伝子は、細胞内クロマチンと相同性である、いくつかの不連続領域を含有し得る。例えば、目的の領域内に正常では存在しない配列のターゲティング挿入のために、配列は、ドナー核酸分子内に存在することが可能であり、目的の領域内の配列に対して相同性の領域で挟むことができる。

20

【0403】

トランス遺伝子のポリ核酸は、DNA または RNA、一本鎖または二本鎖であることが可能であり、細胞へと、直鎖状形態または環状形態で導入することができる。トランス遺伝子配列は、細胞へと、環状形態または直鎖状形態で導入され得る、DNA ミニサークル内に含有され得る。直鎖状形態で導入する場合、トランス遺伝子配列の末端を、任意の方法で保護する（例えば、エキソヌクレアーゼ分解から）ことができる。例えば、1 または複数のジデオキシヌクレオチド残基を、直鎖状分子の 3' 末端へと付加することもでき、かつ / または自己相補的オリゴヌクレオチドを、一方または両方の末端へとライゲーションすることもできる。外因性ポリヌクレオチドを、分解から保護するためのさらなる方法は、末端アミノ基の付加、ならびに、例えば、ホスホロチオエート残基、ホスホルアミダイト残基、および O-メチルリボース残基またはデオキシリボース残基など、修飾ヌクレオチド間連結の使用を含むがこれらに限定されない。

30

【0404】

トランス遺伝子は、組換えアームで挟むことができる。場合によって、組換えアームは、トランス遺伝子を、所望の組込み部位へとターゲティングする、相補的領域を含み得る。トランス遺伝子はまた、挿入が、内因性遺伝子を破壊するように、ゲノム領域へと組み込むこともできる。トランス遺伝子は、任意の方法、例えば、非組換え末端結合および / または組換え指向修復により組み込むことができる。トランス遺伝子はまた、二本鎖切断を修復する組換えイベント時に組み込むこともできる。トランス遺伝子はまた、相同組換えエンハンサーを使用することにより組み込むこともできる。例えば、エンハンサーは、相同性により導かれる修復を実施して、二本鎖切断を修復するように、非相同末端結合を遮断し得る。

40

【0405】

トランス遺伝子は、組換えアームで挟むことができ、この場合、アームと、その相補的配列との相同性の程度は、2 つの間の相同組換えを可能とするのに十分である。例えば、アームと、その相補的配列との相同性の程度は、50% またはこれを超えうる。2 つの相同的な非同一配列は、任意の長さであることが可能であり、それらの非相同性の程度は、単一のヌクレオチドという低度の場合（例えば、ターゲティングされた相同組換により、ゲノムの点変異を是正する場合）もあり、10 キロベースまたはそれよりも多いという高度な場合（例えば、染色体内の所定の異所性部位に遺伝子を挿入する場合）もある。相同な

50

非同一配列を含む、2つのポリヌクレオチドは、同じ長さである必要がない。例えば、C C R 5に対する組換えアームを伴う、代表的なトランス遺伝子を、図16に示す。他の任意の遺伝子、例えば、本明細書で記載される遺伝子を使用して、組換えアームを作製することができる。

【0406】

トランス遺伝子は、ゲノム内の標的二本鎖切断領域と相補的な操作部位で挟むことができる。場合によって、操作部位は、組換えアームではない。操作部位は、二本鎖切断領域に対する相同性を有し得る。操作部位は、遺伝子に対する相同性を有し得る。操作部位は、ゲノムコード領域に対する相同性を有し得る。操作部位は、ゲノム非コード領域に対する相同性を有し得る。場合によって、トランス遺伝子は、ポリ核酸から切り出すことができるので、相同組換えを伴わずに、二本鎖切断領域に挿入することができる。トランス遺伝子は、相同組換えを伴わずに、二本鎖切断へと組み込むことができる。

10

【0407】

ポリヌクレオチドは、細胞へと、例えば、複製起点、プロモーター、および抗生物質耐性をコードする遺伝子など、さらなる配列を有するベクター分子の一部として導入することができる。さらに、トランス遺伝子のポリヌクレオチドは、ネイキッド核酸として導入することもでき、リボソームまたはポロキサマーなどの薬剤と複合体化させた核酸として導入することもでき、ウイルス（例えば、アデノウイルス、A A V、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、およびインテグラーゼ欠損レンチウイルス（I D L V））により送達することもできる。トランス遺伝子を送達し得るウイルスは、A A Vウイルスであり得る。

20

【0408】

トランス遺伝子は一般に、その発現が、組込み部位における内因性プロモーター、すなわち、トランス遺伝子が挿入される内因性遺伝子（例えば、A A V S 部位（例えば、A A V S 1、A A V S 2など）、C C R 5、H P R T）の発現を駆動するプロモーターにより駆動されるように挿入する。トランス遺伝子は、プロモーターおよび／またはエンハンサー、例えば、構成的プロモーターもしくは誘導性プロモーターまたは組織／細胞特異的プロモーターを含み得る。ミニサークルベクターは、トランス遺伝子をコードし得る。

【0409】

非コード核酸配列の挿入のターゲティングもまた達成することができる。アンチセンスRNA、R N A i、s h R N A、およびマイクロRNA（m i R N A）をコードする配列もまた、挿入のターゲティングに使用することができる。

30

【0410】

トランス遺伝子は、内因性遺伝子の全て、一部を発現させるように、内因性遺伝子へと挿入することもでき、内因性遺伝子を発現させないように内因性遺伝子へと挿入することもできる。例えば、本明細書で記載されるトランス遺伝子は、内因性配列のうちの一部（トランス遺伝子に対するN末端側および／またはC末端側）を、例えば、トランス遺伝子との融合体として発現させるように、内因性遺伝子座へと挿入することもでき、内因性配列を、例えば、トランス遺伝子との融合体として発現させないように、内因性遺伝子座へと挿入することもできる。他の場合には、トランス遺伝子（例えば、内因性遺伝子などの、さらなるコード配列を伴うかまたは伴わない）を、任意の内因性遺伝子座、例えば、セーフハーバー遺伝子座へと組み込む。例えば、T C Rトランス遺伝子は、内因性T C R遺伝子へと挿入することができる。例えば、図17は、トランス遺伝子を、内因性C C R 5遺伝子へと挿入し得ることを示す。トランス遺伝子は、任意の遺伝子、例えば、本明細書で記載される遺伝子へと挿入することができる。

40

【0411】

内因性配列をトランス遺伝子と共に（内因性配列またはトランス遺伝子の一部を）発現させる場合、内因性配列は、全長配列（野生型または変異体）の場合もあり、部分配列の場合もある。内因性配列は、機能的であり得る。これらの全長配列または部分配列の機能の非限定的な例は、トランス遺伝子（例えば、治療用遺伝子）が発現するポリペプチドの

50

血清半減期を延長すること、および／または担体として作用することを含む。

【0412】

さらに、発現には要求されないが、外因性配列はまた、転写調節配列または翻訳調節配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、インシュレーター、内部リボソーム進入部位、2Aペプチドおよび／またはポリアデニル化シグナルをコードする配列も含み得る。

【0413】

場合によって、外因性遺伝子（例えば、トランス遺伝子）は、目的のタンパク質の融合体と、その融合パートナーとして、融合タンパク質を細胞の表面に位置させる、膜タンパク質の細胞外ドメインとを含む。場合によって、トランス遺伝子は、TCRをコードするが、この場合、TCRを発現させるように、TCRコード配列を、セーフハーバーへと挿入する。場合によって、TCRコード配列を、CISH遺伝子座および／またはTCR遺伝子座へと挿入する。他の場合には、TCRを、ランダム挿入のために、レンチウイルスにより、細胞へと送達するが、CISHおよび／またはTCR特異的ヌクレアーゼを、mRNAとして供給することができる。場合によって、TCRを、レトロウイルス、AAV、またはアデノウイルスなどのウイルスベクター系を介して、セーフハーバー（例えば、AAVS部位（例えば、AAVS1、AAVS2など）、CCR5、アルブミン、またはHprt）に特異的なヌクレアーゼをコードするmRNAと共に送達する。細胞はまた、PD1特異的なヌクレアーゼおよび／またはCTLA-4特異的なヌクレアーゼをコードするmRNAで処置することもできる。場合によって、TCRをコードするポリヌクレオチドを、ウイルス送達系を介して、Hprt特異的ヌクレアーゼおよびPD1特異的ヌクレアーゼまたはCTLA-4特異的ヌクレアーゼをコードするmRNAと併せて供給する。Hprt遺伝子座に組み込んだ、TCRをコードするヌクレオチドを含む細胞は、細胞の停止を結果としてもたらす場合もあり、かつ／または細胞内でアポトーシスを惹起する場合もある、6-チオグアニン、グアニン類似体を、無傷Hprt遺伝子と共に使用して選択することができる。本開示の方法および組成物と共に使用され得るTCRは、これらのキメラタンパク質の全ての種類であって、第1世代、第2世代、および第3世代のデザインを含む種類を含む。本開示ではまた、受容体、リガンド、および操作ポリペプチドに由来する特異性ドメインも想定され得るが、抗体に由来する特異性ドメインを含むTCRが、特に有用であり得る。細胞間シグナル伝達ドメインは、ゼータ鎖、ならびに鎖およびE鎖など、CD3複合体の他のメンバーなどのTCR鎖に由来し得る。場合によって、TCRは、CD28、CD137(4-1BBとしてもまた公知である)、またはCD134に由来する細胞間ドメインなど、さらなる共刺激性ドメインを含み得る。なおさらなる場合には、2つの種類の共刺激因子ドメインを同時に使用することもできる（例えば、CD28+CD137と共に使用されるCD3ゼータ）。

【0414】

場合によって、操作細胞は、CD45RO(-)、CCR7(+)、CD45RA(+)、CD62L+(L-セレクチン)、CD27+、CD28+、およびIL-7R⁺から構成される、ステムメモリー(stem memory)T_{scM}細胞であることが可能であり、ステムメモリー細胞はまた、CD95、IL-2R、CXCR3、およびLFA-1も発現することが可能であり、ステムメモリー細胞特有の、多数の機能的な属性を示す。操作細胞はまた、L-セレクチンおよびCCR7を含む、セントラルメモリー細胞であるT_{cM}細胞でもあることが可能であり、この場合、セントラルメモリー細胞は、例えば、IL-2を分泌し得るが、IFN_γまたはIL-4は分泌しえない。操作細胞はまた、L-セレクチンまたはCCR7を含む、エフェクターメモリー細胞であるT_{EM}細胞でもあることが可能であり、例えば、IFN_γおよびIL-4など、エフェクターサイトカインを産生し得る。場合によって、細胞の集団を、対象へと導入することができる。例えば、細胞の集団は、T細胞とNK細胞との組合せであり得る。他の場合には、集団は、ナイーブ細胞とエフェクター細胞との組合せであり得る。

【0415】

相同組換えHRエンハンサーの送達

10

20

30

40

50

場合によって、相同組換え H R エンハンサーを使用して、非相同末端結合 (N H E J) を抑制することができる。非相同末端結合は、二本鎖切断部の末端におけるヌクレオチドの喪失を結果としてもたらすことが可能であり、非相同末端結合はまた、フレームシフトも結果としてもたらし得る。したがって、相同性により導かれる修復は、遺伝子をノックインする場合に使用するのに、より魅力的な機構であり得る。非相同末端結合を抑制するために、H R エンハンサーを送達することができる。場合によって、1つを超える H R エンハンサーを送達することができる。H R エンハンサーは、非相同末端結合に関与するタンパク質、例えば、K U 7 0 、K U 8 0 、および / または D N A リガーゼ I V を阻害し得る。場合によって、S c r 7 などのリガーゼ I V インヒビターを送達することができる。場合によって、H R エンハンサーは、L 7 5 5 5 0 7 であり得る。場合によって、異なるリガーゼ I V インヒビターを使用することができる。場合によって、H R エンハンサーは、4型アデノウイルスのタンパク質、例えば、E 1 B 5 5 K および / または E 4 o r f 6 であり得る。場合によって、化学的インヒビターを使用することができる。

10

20

30

40

50

【 0 4 1 6 】

K U 7 0 、K U 8 0 、および / または D N A リガーゼ I V などの非相同末端結合分子は、様々な方法を使用することにより抑制することができる。例えば、K U 7 0 、K U 8 0 、および / または D N A リガーゼ I V などの非相同末端結合分子は、遺伝子サイレンシングにより抑制することができる。例えば、非相同末端結合分子である、K U 7 0 、K U 8 0 、および / または D N A リガーゼ I V は、因子の転写または翻訳時において、遺伝子サイレンシングにより抑制することができる。非相同末端結合分子である、K U 7 0 、K U 8 0 、および / または D N A リガーゼ I V はまた、因子の分解により抑制することもできる。非相同末端結合分子である、K U 7 0 、K U 8 0 、および / または D N A リガーゼ I V はまた、阻害することもできる。K U 7 0 、K U 8 0 、および / または D N A リガーゼ I V のインヒビターは、E 1 B 5 5 K および / または E 4 o r f 6 を含み得る。非相同末端結合分子である、K U 7 0 、K U 8 0 、および / または D N A リガーゼ I V はまた、封鎖により阻害することもできる。遺伝子の発現は、ノックアウトにより抑制することもでき、遺伝子のプロモーターを変化することにより抑制することもでき、かつ / または因子に対する干渉性 R N A を投与することにより抑制することもできる。

【 0 4 1 7 】

非相同末端結合を抑制する H R エンハンサーは、プラスミド D N A により送達することができる。ある場合には、プラスミドは、二本鎖 D N A 分子であり得る。プラスミド分子はまた、一本鎖 D N A でもあり得る。プラスミドはまた、少なくとも1つの遺伝子も保有し得る。プラスミドはまた、1つを超える遺伝子も保有し得る。少なくとも1つのプラスミドもまた、使用することができる。1つを超えるプラスミドもまた、使用することができる。非相同末端結合を抑制する H R エンハンサーは、プラスミド D N A により、C R I S P R - C a s 、プライマー、および / または修飾剤化合物と共に送達することができる。修飾剤化合物は、プラスミド D N A の細胞毒性を低減することが可能であり、細胞生存率を改善し得る。H R エンハンサーおよび修飾剤化合物は、ゲノム操作の前に、細胞へと導入することができる。H R エンハンサーは、低分子であり得る。場合によって、H R エンハンサーは、T 細胞懸濁液へと送達することができる。H R エンハンサーは、二本鎖 D N A をトランスフェクトされた細胞の生存率を改善し得る。場合によって、二本鎖 D N A の導入は、毒性であり得る（図 8 1 A および図 8 1 B ）。

【 0 4 1 8 】

非相同末端結合を抑制する H R エンハンサーは、組み込まれる H R 基質と共に送達することができる。基質は、ポリ核酸であり得る。ポリ核酸は、T C R トランス遺伝子を含み得る。ポリ核酸は、m R N A として送達することができる（図 1 0 および図 1 4 を参照されたい）。ポリ核酸は、T C R トランス遺伝子の組込みのための、ゲノムの内因性領域に対する組換えアームを含み得る。ポリ核酸は、ベクターでありうる。ベクターは、センスまたはアンチセンスの配向性で、別のベクター（例えば、ウイルスベクター）へと挿入することができる。ウイルスカセットの、in vitro における転写のために、ウイル

スゲノムの 5'LTR 領域の上流に、T7、T3、または他の転写開始配列を置くことができる（図3を参照されたい）。次いで、このベクターカセットを、in vitroにおけるmRNAの転写のための鋳型として使用することができる。例えば、このmRNAを、任意の細胞へと、そのコグネイトの逆転写酵素と共に送達する場合、また、mRNAまたはタンパク質としても送達する場合、トランスクレッセイブを、ゲノム内の意図される標的部位に組み込むのに所望される、相同組換えイベントのためのHR基質として使用され得る、二本鎖DNA(dsDNA)の形態で、数百～数千コピーを作製するための鋳型として、一本鎖mRNAカセットを使用することができる。この方法は、CRISPRを媒介する相同組換えのための、毒性のプラスミドDNAの送達への必要性を回避し得る。加えて、各mRNA鋳型は、数百または数千コピーのdsDNAへとなるので、細胞内で利用可能な相同組換え鋳型の量は、極めて高量であり得る。高量の相同組換え鋳型は、所望の相同組換えイベントを駆動し得る。さらに、mRNAはまた、一本鎖DNAも作製し得る。一本鎖DNAはまた、例えば、組換えAAV(rAAV)による遺伝子ターゲティングと共に、相同組換えのための鋳型として使用することもできる。mRNAは、in situにおいて、DNA相同組換えのためのHRエンハンサーへと逆転写することができます。この戦略により、毒性のプラスミドDNAの送達を避けることができる。加えて、mRNAにより、相同組換え基質を、プラスミドDNAより高レベルへと増幅することもでき、かつ／または相同組換えの効率を改善することもできる。

10

【0419】

非相同末端結合を抑制するHRエンハンサーは、化学的インヒビターとして送達することができる。例えば、HRエンハンサーは、リガーゼIV-DNA間結合に干渉することにより作用し得る。HRエンハンサーはまた、内因性アポトーシス経路も活性化させうる。HRエンハンサーはまた、リガーゼIVインヒビターのペプチド模倣剤でもあり得る。HRエンハンサーはまた、Cas9系と共に共発現させることもできる。HRエンハンサーはまた、E1B55Kおよび／またはE4orf6など、ウイルスタンパク質と共に共発現させることもできる。HRエンハンサーはまた、SCR7、L755507、またはこれらの任意の誘導体もあり得る。HRエンハンサーは、外因性DNAの挿入の毒性を低減する化合物と共に送達することができる。

20

【0420】

万一、細胞内で、一本鎖DNAの頑健な逆転写のみが生じる場合は、ウイルスベクターのセンス鎖およびアンチセンス鎖の両方をコードするmRNAを導入することができる（図3を参照されたい）。この場合、両方のmRNA鎖を、細胞内で逆転写して、dsDNAを作製することもでき、かつ／または自然にアニールさせて、dsDNAを作製することもできる。

30

【0421】

HRエンハンサーは、初代細胞へと送達することができる。相同組換えHRエンハンサーは、任意の適する手段により送達することができる。相同組換えHRエンハンサーはまた、mRNAとして送達することもできる。相同組換えHRエンハンサーはまた、プラスミドDNAとして送達することもできる。相同組換えHRエンハンサーはまた、免疫細胞へと、CRISPR-Casと共に送達することもできる。相同組換えHRエンハンサーはまた、免疫細胞へと、CRISPR-Cas、TCR配列を含むポリ核酸、および／または外因性DNAの挿入の毒性を低減する化合物と共に送達することもできる。

40

【0422】

相同組換えHRエンハンサーは、任意の細胞、例えば、免疫細胞へと送達することができる。例えば、相同組換えHRエンハンサーは、初代免疫細胞へと送達することができる。相同組換えHRエンハンサーはまた、T細胞株を含むがこれらに限定されないT細胞および初代T細胞へと送達することもできる。相同組換えHRエンハンサーはまた、CD4+細胞、CD8+細胞、および／または腫瘍浸潤細胞(TIL)へと送達することもできる。相同組換えHRエンハンサーはまた、免疫細胞へと、CRISPR-Casと共に送達することもできる。

50

【 0 4 2 3 】

場合によって、相同組換え H R エンハンサーを使用して、非相同末端結合を抑制することができる。場合によって、相同組換え H R エンハンサーを使用して、相同性により導かれる修復を促進することができる。場合によって、相同組換え H R エンハンサーを使用して、C R I S P R - C a s による二本鎖切断の後における、相同性により導かれる修復を促進することができる。場合によって、相同組換え H R エンハンサーを使用して、C R I S P R - C a s による二本鎖切断の後における、1または複数の遺伝子の、相同性により導かれる修復、ならびにノックインおよびノックアウトを促進することができる。ノックインされる遺伝子は、T C R であり得る。ノックアウトされる遺伝子はまた、任意の数の内因性チェックポイント遺伝子でもあり得る。例えば、内因性チェックポイント遺伝子は、A 2 A R 、B 7 - H 3 、B 7 - H 4 、B T L A 、C T L A - 4 、I D O 、K I R 、L A G 3 、P D - 1 、T I M - 3 、V I S T A 、A A V S 部位（例えば、A A V S 1 、A A V S 2 など）、C C R 5 、H P R T 、P P P 1 R 1 2 C 、T C R 、および / または C I S H からなる群から選択することができる。場合によって、遺伝子は、C I S H であり得る。場合によって、遺伝子は、T C R であり得る。場合によって、遺伝子は、内因性 T C T であり得る。場合によって、遺伝子は、コード領域を含み得る。場合によって、遺伝子は、非コード領域を含み得る。

10

【 0 4 2 4 】

H R エンハンサーによる H R 効率の増大は、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%であり得るか、またはほぼこの比率であり得る。

20

【 0 4 2 5 】

H R エンハンサーによる N H E J の減少は、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%であり得るか、またはほぼこの比率であり得る。

【 0 4 2 6 】**低毒性の細胞操作**

外因性ポリ核酸への細胞毒性を緩和して、T 細胞を含む細胞の操作を改善することができる。例えば、細胞毒性は、ポリ核酸への細胞応答を変化することにより低減することができる。

30

【 0 4 2 7 】

ポリ核酸は、細胞と接触させることができる。次いで、ポリ核酸を、細胞へと導入することができる。場合によって、ポリ核酸を用いて、細胞ゲノムを変化する。ポリ核酸の挿入の後、細胞は、死滅する場合がある。例えば、ポリ核酸の挿入は、図18に示される通り、細胞のアポトーシスを引き起こし得る。ポリ核酸に誘導される毒性は、修飾剤化合物を使用することにより低減することができる。

【 0 4 2 8 】

例えば、修飾剤化合物は、細胞の免疫センシング応答を破壊し得る。修飾剤化合物はまた、細胞のアポトーシスおよびピロトーシスも低減し得る。状況に応じて、修飾剤化合物は、アクチベーターの場合もあり、インヒビターの場合もある。修飾剤化合物は、図19に示される経路の任意の構成要素に作用し得る。例えば、修飾剤化合物は、カスパーゼ1、T B K 1 、I R F 3 、S T I N G 、D D X 4 1 、D N A - P K 、D A I 、I F I 1 6 、M R E 1 1 、c G A S 、2' 3' - c G A M P 、T R E X 1 、A I M 2 、A S C 、またはこれらの任意の組合せに作用し得る。修飾剤は T B K 1 修飾剤であり得る。修飾剤はカスパーゼ1修飾剤であり得る。修飾剤化合物はまた、生得的シグナル伝達系にも作用する場合があり、したがって、生得的シグナル伝達修飾剤であり得る。場合によって、外因性核酸は、細胞に対して毒性であり得る。細胞の生得的免疫センシング応答を阻害する方法は、操作細胞生成物の細胞生存率を改善し得る。修飾化合物は、ブレフェルジンAおよび / または A T M 経路のインヒビターであり得る（図92A、図92B、図93A、および図93B）。

40

50

【0429】

外因性ポリ核酸への毒性の低減は、化合物と細胞とを接触させることにより実施することができる。場合によって、細胞は、ポリ核酸と接触させる前に、化合物で前処置することができる。場合によって、化合物とポリ核酸とを、細胞へと、同時に導入（例えば、同時に導入）する。修飾化合物は、ポリ核酸内に含ませることができる。場合によって、ポリ核酸は修飾化合物を含む。場合によって、化合物は、ポリ核酸、HRエンハンサー、および／またはCRISPR-Casを含むカクテルとして導入することができる。本明細書で開示される、組成物および方法は、効率的かつ低毒性の方法であって、それにより、細胞療法、例えば、がん特異的細胞療法を案出し得る方法をもたらし得る。

【0430】

本明細書で記載される方法および／または系および／または組成物において使用され得る化合物は、以下の特徴のうちの1または複数を有することが可能であり、本明細書で記載される機能のうちの1または複数を有し得る。その1または複数の機能にも拘らず、本明細書で記載される化合物は、外因性ポリヌクレオチドの毒性を減少させうる。例えば、化合物は、外因的に導入されたポリ核酸に由来する毒性を結果としてもたらす経路をモジュレートし得る。場合によって、ポリ核酸は、DNAであり得る。ポリ核酸はまた、RNAでもあり得る。ポリ核酸は、一本鎖であり得る。ポリ核酸はまた、二本鎖もあり得る。ポリ核酸は、ベクターであり得る。ポリ核酸はまた、ネイキッドポリ核酸もあり得る。ポリ核酸は、タンパク質をコードし得る。ポリ核酸はまた、任意の数の修飾も有し得る。ポリ核酸の修飾は、脱メチル化、CpGメチル化の付加、細菌性メチル化の除去、および／または哺乳動物性メチル化の付加であり得る。ポリ核酸はまた、細胞へと、さらなるポリ核酸、任意の数のHRエンハンサー、および／またはCRISPR-Casを含む試薬カクテルとして導入することもできる。ポリ核酸はまた、トランス遺伝子も含み得る。ポリ核酸は、TCR配列を有するトランス遺伝子を含み得る。

【0431】

化合物はまた、外因性DNAへの毒性の惹起に関与する経路もモジュレートし得る。経路は、任意の数の因子を含有し得る。例えば、因子は、DAI (IFN調節因子のDNA依存性アクチベーター)、IFN誘導性タンパク質16 (IFI16)、DEADボックスポリペプチド41 (DDX41)、AIM2 (absent in melanoma 2)、DNA依存性タンパク質キナーゼ、環状グアノシン一リン酸-アデノシン一リン酸シナーゼ (cGAS)、STING (IFN遺伝子の刺激因子)、TANK結合性キナーゼ (TBK1)、インターロイキン1 (IL-1)、MRE11 (減数分裂組み換え11)、TreX1、アスパルテート特異性を有するシステインプロテアーゼ (カスパーゼ1)、3'修復エキソヌクレアーゼ、DAI (DNA-dependent activator of IRF)、IFI16、DDX41、DNA依存性タンパク質キナーゼ (DNA-PK)、MRE11 (減数分裂組み換え11) 相同体A、および／またはIFN調節因子 (IRF) 3もしくは7、および／またはこれらの任意の誘導体を含み得る。

【0432】

場合によって、DNAセンシング経路は一般に、細胞内核酸の検出に関する、1または複数のタンパク質（例えば、DNAセンシングタンパク質）を含む、任意の細胞シグナル伝達経路を指す場合があり、場合によって、外因性核酸を指す場合がある。場合によって、DNAセンシング経路は、インターフェロン (STING) の刺激因子を含み得る。場合によって、DNAセンシング経路は、DAI (DNA-dependent activator of IFN-regulatory factor) を含み得る。DNAセンシングタンパク質の非限定的な例は、3'修復エキソヌクレアーゼ1 (TreX1)、DEADボックスヘリカーゼ41 (DDX41)、DAI (DNA-dependent activator of IFN-regulatory factor)、Z型DNA結合性タンパク質1 (ZBP1)、インターフェロンガンマ誘導性タンパク質16 (IFI16)、LRRKIP1 (leucine rich repeat (In

10

20

30

40

50

F L I I) interacting protein 1)、DEAHボックスヘリカーゼ9 (DHX9)、DEAHボックスヘリカーゼ36 (DHX36)、Ku70 (Lupus Ku autoantigen protein p70)である、XRCC6 (X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6)、STING (stimulator of interferon gene)、膜貫通タンパク質173 (TMEM173)、TRIM32 (tripartite motif containing 32)、TRIM56 (tripartite motif containing 56)、-カテニン (CTNNB1)、MyD88 (myeloid differentiation primary response 88)、AIM2 (absent in melanoma 2)、ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD)、プロカスパーゼ1 (pro-CASP1)、カスパーゼ1 (CASP1)、プロインターロイキン1ベータ (pro-IL-1 β)、プロインターロイキン18 (pro-IL-18)、インターロイキン1ベータ (IL-1 β)、インターロイキン18 (IL-18)、インターフェロン調節因子1 (IRF1)、インターフェロン調節因子3 (IRF3)、インターフェロン調節因子7 (IRF7)、ISRE7 (interferon-stimulated response element 7)、ISRE1/7 (interferon-stimulated response element 1/7)、NF-B (nuclear factor kappa B)、RNAポリメラーゼIII (RNA Pol III)、黒色腫分化関連タンパク質5 (MDA-5)、LGP2 (Laboratory of Genetics and Physiology 2)、レチノイン酸誘導性遺伝子1 (RIG-I)、IPS-1 (mitochondrial antiviral-signaling protein)、TNF受容体関連因子3 (TRAF3)、TANK (TRAF family member associated NFKB activator)、NAP1 (nucleosome assembly protein 1)、TANK結合キナーゼ1 (TBK1)、Atg9a (autophagy related 9A)、腫瘍壞死因子アルファ (TNF-)、インターフェロンラムダ1 (IFN-1)、環状GMP-AMPシンターゼ (cGAS)、AMP、GMP、環状GMP-AMP (cGAMP)、これらのタンパク質のリン酸化形態、またはこれらの任意の組合せもしくは誘導体を含む。DNAセンシング経路の一例では、DAIは、I型インターフェロンおよび他のサイトカインの産生をもたらす、IRFおよびNF-B転写因子を活性化させる。DNAセンシング経路の別の例では、外因性の細胞内DNAを感知すると、AIM2は、インフラマソームのアセンブリーを誘発し、インターロイキンの成熟およびピロトーシスに至る。DNAセンシング経路のさらに別の例では、Pol IIIのRNAは、外因性DNAを、RNAセンサーであるRIG-Iによる認識のために、RNAへと転換し得る。

【0433】

一部の態様では、本開示の方法は、1または複数の細胞へと、少なくとも1つの抗DNAセンシングタンパク質をコードする、第1のトランス遺伝子を含む核酸を導入するステップを含む。

【0434】

抗DNAセンシングタンパク質は一般に、DNAセンシング経路（例えば、DNAセンシングタンパク質）に対応するタンパク質の活性または発現レベルを変化する、任意のタンパク質を指す場合がある。場合によって、抗DNAセンシングタンパク質は、1または複数のDNAセンシングタンパク質を分解し得る（例えば、これらの全タンパク質レベルを低減し得る）。場合によって、抗DNAセンシングタンパク質は、1または複数のDNAセンシングタンパク質を完全に阻害し得る。場合によって、抗DNAセンシングタンパク質は、1または複数のDNAセンシングタンパク質を部分的に阻害し得る。場合によって、抗DNAセンシングタンパク質は、少なくとも1つのDNAセンシングタンパク質の

活性を、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 6 5 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 5 5 %、少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 4 5 %、少なくとも約 4 0 %、少なくとも約 3 5 %、少なくとも約 3 0 %、少なくとも約 2 5 %、少なくとも約 2 0 %、少なくとも約 1 5 %、少なくとも約 1 0 %、または少なくとも約 5 % 阻害し得る。場合によって、抗 D N A センシングタンパク質は、少なくとも 1 つの D N A センシングタンパク質の量を、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 6 5 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 5 5 %、少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 4 5 %、少なくとも約 4 0 %、少なくとも約 3 5 %、少なくとも約 3 0 %、少なくとも約 2 5 %、少なくとも約 2 0 %、少なくとも約 1 5 %、少なくとも約 1 0 %、または少なくとも約 5 % 減少させうる。
10

【 0 4 3 5 】

細胞生存率は、ゲノム操作手順中に、外因性 D N A を検出する細胞の能力を阻害し得るウイルスタンパク質を導入することにより増大させることができる。場合によって、抗 D N A センシングタンパク質は、1 または複数の D N A センシングタンパク質の翻訳を促進し得る（例えば、これらの全タンパク質レベルを上昇させうる）。場合によって、抗 D N A センシングタンパク質は、1 または複数の D N A センシングタンパク質を保護するか、またはこれらの活性を増大させうる。場合によって、抗 D N A センシングタンパク質は、少なくとも 1 つの D N A センシングタンパク質の活性を、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 6 5 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 5 5 %、少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 4 5 %、少なくとも約 4 0 %、少なくとも約 3 5 %、少なくとも約 3 0 %、少なくとも約 2 5 %、少なくとも約 2 0 %、少なくとも約 1 5 %、少なくとも約 1 0 %、または少なくとも約 5 % 増大させうる。場合によって、抗 D N A センシングタンパク質は、少なくとも 1 つの D N A センシングタンパク質の量を、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 6 5 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 5 5 %、少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 4 5 %、少なくとも約 4 0 %、少なくとも約 3 5 %、少なくとも約 3 0 %、少なくとも約 2 5 %、少なくとも約 2 0 %、少なくとも約 1 5 %、少なくとも約 1 0 %、または少なくとも約 5 % 増大させうる。場合によって、抗 D N A センシングインヒビターは、1 または複数の D N A センシングタンパク質の、競合的インヒビターまたはアクチベーターであり得る。場合によって、抗 D N A センシングインヒビターは、D N A センシングタンパク質の、非競合的インヒビターまたはアクチベーターであり得る。
20
30

【 0 4 3 6 】

本開示の場合によって、抗 D N A センシングタンパク質はまた、D N A センシングタンパク質（例えば、T R E X 1）でもあり得る。抗 D N A センシングタンパク質の非限定的な例は、c - F L i P (c e l l u l a r F L I C E - i n h i b i t o r y p r o t e i n)、ヒトサイトメガロウイルステグメントタンパク質 (H C M V p U L 8 3)、デングウイルス特異的 N S 2 B - N S 3 (D E N V N S 2 B ~ N S 3)、18型ヒトパピローマウイルス E 7 タンパク質 (H P V 1 8 E 7)、h A d 5 E 1 A、単純ヘルペスウイルス即初期タンパク質 I C P 0 (H S V 1 I C P 0)、ワクシニアウイルス B 1 3 (V A C V B 1 3)、ワクシニアウイルス C 1 6 (V A C V C 1 6)、3' 修復エキソヌクレアーゼ 1 (T R E X 1)、ヒトコロナウイルス N L 6 3 (H C o V - N L 6 3)、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス (S A R S - C o V)、B 型肝炎ウイルス D N A ポリメラーゼ (H B V P o l)、ブタ伝染性下痢症ウイルス (P E D V)、アデノシンデアミナーゼ (A D A R 1)、E 3 L、p 2 0 2、これらのタンパク質のリン酸化形態、およびこれらの任意の組合せまたは誘導体を含む。場合によって、H C M V p U L 8 3 は、パイリンドメインである I F I 1 6 (例えは、核内の I F I 1 6) と相互作用し
40
50

、そのオリゴマー化、および後続の下流における活性化を遮断することにより、S T I N G - T B K 1 - I R F 3 経路の活性化を阻害することにより、D N A センシング経路を破壊し得る。場合によって、D E N V N s 2 B - N S 3 は、S T I N G を分解することにより、D N A センシング経路を破壊し得る。場合によって、H P V 1 8 E 7 は、S T I N G に結合することにより、c G A S / S T I N G 経路シグナル伝達を遮断することにより、D N A センシング経路を破壊し得る。場合によって、h A d 5 E 1 A は、S T I N G に結合することにより、c G A S / S T I N G 経路シグナル伝達を遮断することにより、D N A センシング経路を破壊し得る。例えば、図 1 0 4 A および図 1 0 4 B は、C R I S P R 系、外因性ポリ核酸、および h A d 5 E 1 A タンパク質または H P V 1 8 E 7 タンパク質をトランスフェクトされた細胞を示す。場合によって、H S V 1 I C P 0 は、I F I 1 6 の分解により、かつ／またはウイルスゲノムへの I F I 1 6 の動員を遅延させることにより、D N A センシング経路を破壊し得る。場合によって、V A C V B 1 3 は、カスパーゼ 1 依存性のインフラマソームの活性化およびカスパーゼ 8 依存性の外因性アボトーシスを遮断することにより、D N A センシング経路を破壊し得る。場合によって、V A C V C 1 6 は、D N A に対する生得的免疫応答を遮断し、サイトカイン発現の低下をもたらすことにより、D N A センシング経路を破壊し得る。
10

【 0 4 3 7 】

化合物は、インヒビターであり得る。化合物はまた、アクチベーターでもあり得る。化合物は、第 2 の化合物と組み合わせることができる。化合物はまた、少なくとも 1 つの化合物と組み合わせることができる。場合によって、1 または複数の化合物は、相乗作用的に挙動し得る。例えば、1 または複数の化合物は、図 2 0 に示される通り、細胞へと一度に導入されると、細胞毒性を低減し得る。
20

【 0 4 3 8 】

化合物は、汎カスパーゼインヒビターである Z - V A D - F M K 、および／または Z - V A D - F M K であり得る。化合物は、外因性 D N A への毒性の惹起に関する経路をモジュレートする、任意の数の公知の化合物の誘導体であり得る。化合物はまた、修飾することもできる。化合物は、任意の数の手段により修飾することができ、例えば、化合物への修飾は、重水素化、脂質化、グリコシリ化、アルキル化、P E G 化、酸化、リン酸化、硫酸化、アミド化、ビオチニル化、シトルリン化、異性体化、ユビキチン化、プロトン化、低分子のコンジュゲーション、還元、脱リン酸化、ニトロシリ化、および／またはタンパク質分解を含み得る。修飾はまた、翻訳後修飾でもあり得る。修飾は、翻訳前修飾であり得る。修飾は、顕著に異なるアミノ酸側鎖またはペプチド連結において生じる場合があり、酵素的活性により媒介され得る。
30

【 0 4 3 9 】

修飾は、化合物の合成内の任意のステップにおいて生じ得る。例えば、タンパク質内では、適正な化合物のフォールディングもしくは安定性を媒介するか、または新生化合物を、顕著に異なる細胞的コンパートメントへと導くように、翻訳が進行中であるかまたは完了した直後に、多くの化合物が修飾される。他の修飾は、触媒活性を活性化もしくは不活性化させるか、または化合物の生体活性に他の形で影響を及ぼすように、フォールディングおよび局在化が完了した後で生じる。化合物はまた、分解のために化合物をターゲティングするタグへと、共有結合的に連結することもできる。単一の修飾のほかに、化合物は、翻訳後切断と、化合物の成熟または活性化の段階的機構を介する官能基の付加との組合せを介して修飾されることが多い。
40

【 0 4 4 0 】

化合物は、I 型インターフェロン (I F N) 、例えば、I F N - および／または I F N - の産生を低減し得る。化合物はまた、腫瘍壞死因子 - (T N F -) および／またはインターロイキン - 1 (I L - 1) など、炎症促進性サイトカインの産生も低減し得る。化合物はまた、J a n u s キナーゼ (J A K) - シグナル伝達兼転写アクチベーター (S T A T) 経路のモジュレーションを介して、抗ウイルス遺伝子の誘導もモジュレートし得る。化合物はまた、転写因子である、N F - B (n u c l e a r f a c t o
50

r - light-chain enhancer of activated B cells)、ならびにIFN調節因子のIRF3およびIRF7もモジュレートし得る。化合物はまた、例えば、IBキナーゼ(ICK)複合体によるIBのリン酸化を修飾して、NF-Bの活性化もモジュレートし得る。化合物はまた、IBのリン酸化をモジュレートする場合もあり、IBのリン酸化を防止する場合もある。化合物はまた、IRF3および/またはIRF7の活性化もモジュレートし得る。例えば、化合物は、IRF3および/またはIRF7の活性化をモジュレートし得る。化合物は、TBK1および/またはICKを活性化させうる。化合物はまた、TBK1および/またはICKも阻害し得る。化合物は、IRF3、IRF7、NF-B、およびI型IFN遺伝子の転写をオンにする他の転写因子から構成される、エンハンセオソーム複合体の形成を防止し得る。修飾化合物は、TBK1化合物および少なくとも1つのさらなる化合物であり得る(図88Aおよび図88B)。場合によって、TBK1化合物およびカスパーーゼインヒビター化合物を使用して、二本鎖DNAの毒性を低減することができる(図89)。

【0441】

化合物は、細胞のアポトーシスおよび/またはピロトーシスを防止し得る。化合物はまた、インフラマソームの活性化も防止し得る。インフラマソームは、タンパク質分解酵素カスパーーゼ1の活性化およびIL-1の成熟を媒介する、細胞内多タンパク質複合体であり得る。化合物はまた、AIM2(absent in melanoma 2)もモジュレートし得る。例えば、化合物は、AIM2が、アダプタータンパク質であるASC(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD)と会合することを防止し得る。化合物はまた、PYD:PYD間同型相互作用もモジュレートし得る。化合物はまた、CARD:CAR間同型相互作用もモジュレートし得る。化合物は、カスパーーゼ1をモジュレートし得る。例えば、化合物は、カスパーーゼ1が、IL-1およびIL-18の不活性の前駆体を、成熟サイトカインへと変換する過程を阻害し得る。

【0442】

化合物は、GMP適合性細胞療法を作製するためのプラットフォームの構成要素であり得る。化合物を使用して、細胞療法を改善することができる。化合物は、試薬として使用することができる。化合物は、組合せ療法として組み合わせることができる。化合物は、ex vivoで用いることができる。化合物は、免疫療法のために使用することができる。化合物は、それを必要とする患者のためのT細胞療法を作製する工程の一部であり得る。

【0443】

場合によって、毒性を低減するのに、化合物を使用しない。場合によって、ポリ核酸を修飾してまた、毒性も低減することができる。例えば、ポリ核酸を修飾して、ポリ核酸、例えば、外因性ポリ核酸の検出を低減することができる。ポリ核酸を修飾してまた、細胞毒性も低減することができる。例えば、ポリ核酸は、図21に描示される方法のうちの1または複数により修飾することができる。ポリ核酸はまた、in vitroで修飾することもでき、in vivoで修飾することもできる。

【0444】

化合物または修飾剤化合物は、プラスミドDNAの細胞毒性を、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、もしくは100%、またはほぼこれらの比率だけ低減し得る。修飾剤化合物は、細胞生存率を、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、もしくは100%、またはほぼこれらの比率だけ改善し得る。

【0445】

非メチル化ポリ核酸もまた、毒性を低減し得る。例えば、少なくとも1つのゲノム領域と相補的な、少なくとも2つの組換えアームで挟んだ、少なくとも1つの操作抗原受容体を含む、非メチル化ポリ核酸を使用して、細胞毒性を低減することができる。ポリ核酸はまた、ネイキッドポリ核酸でもあり得る。ポリ核酸はまた、哺乳動物性メチル化も有する

10

20

30

40

50

ことが可能であり、場合によって、これも同様に、毒性を低減するであろう。場合によって、ポリ核酸はまた、細菌性メチル化を除去し、哺乳動物性メチル化を導入するよう修飾することもできる。本明細書で記載される修飾のうちのいずれかを、本明細書で記載されるポリ核酸のうちのいずれかへと適用することができる。

【0446】

ポリ核酸の修飾は、脱メチル化、CpGメチル化の付加、細菌性メチル化の除去、および／または哺乳動物性メチル化の付加を含み得る。修飾は、二本鎖ポリ核酸の、一本鎖ポリ核酸への転換であり得る。また、一本鎖ポリ核酸を、二本鎖ポリ核酸へと転換することもできる。

【0447】

ポリ核酸は、メチル化（例えば、ヒト性メチル化）させて、細胞毒性を低減することができる。修飾ポリ核酸は、TCR配列またはキメラ抗原受容体（CAR）を含み得る。ポリ核酸はまた、操作細胞外受容体も含み得る。

【0448】

少なくとも1つの操作抗原受容体を含む、哺乳動物性メチル化ポリ核酸を使用して、細胞毒性を低減することができる。ポリ核酸は、哺乳動物性メチル化を含むように修飾することができる。ポリ核酸は、細胞により外来として認識されないように、哺乳動物性メチル化によるメチル化であり得る。

【0449】

ポリ核酸の修飾はまた、培養工程の一部として実施することもできる。ポリ核酸の脱メチル化は、ゲノム修飾された細菌培養物であって、細菌性メチル化を導入しない細菌培養物によりもたらすことができる。これらのポリ核酸は、哺乳動物性メチル化、例えば、ヒト性メチル化を含有するように、後で修飾することができる。

【0450】

毒性はまた、ゲノム操作手順時に、ウイルスタンパク質を導入することにより低減することもできる。例えば、ウイルスタンパク質を使用して、DNAセンシングを遮断し、外因性TCRまたはCRISPR系をコードするドナー核酸の毒性を低減することができる。DNAセンシングを遮断するように、ウイルスにより利用される逃避戦略は、ウイルス核酸の封鎖もしくは修飾；PRRもしくはそれらのアダプタータンパク質の特異的翻訳後修飾への干渉；パターン認識受容体（PRR）もしくはそれらのアダプタータンパク質の分解もしくは切断；PRRの封鎖もしくは再局在化、またはこれらの任意の組合せであり得る。場合によって、ウイルスにより利用される逃避戦略のうちのいずれかにより、DNAセンシングを遮断し得る、ウイルスタンパク質を導入することができる。

【0451】

場合によって、ウイルスタンパク質は、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）、デングウイルス（DENV）、ヒトパピローマウイルス（HPV）、1型単純ヘルペスウイルス（HSV1）、ワクシニアウイルス（VACV）、ヒトコロナウイルス（HCoVs）、重症急性呼吸器症候群（SARS）コロナウイルス（SARS-CoV）、B型肝炎ウイルス、ブタ伝染性下痢症ウイルス、またはこれらの任意の組合せなどのウイルスであり得るか、またはこれらに由来し得る。

【0452】

導入されるウイルスタンパク質は、細胞膜により密閉され得る、特異的複製コンパートメントの形成を誘導することにより、または、他の場合には、小胞体、ゴルジ装置、ミトコンドリア、またはこれらの任意の組合せなどの細胞小器官上で複製されるように、RIG-I様受容体（RLR）が、ウイルスRNAに接近することを防止し得る。例えば、本開示のウイルスは、RLRによる検出を防止するか、またはRLRの活性化を妨げる修飾を有し得る。他の場合には、RLRシグナル伝達経路を阻害し得る。例えば、Ly63結合型RIG-Iのユビキチン化を阻害または遮断して、RIG-Iシグナル伝達の活性化を防止することができる。他の場合には、ウイルスタンパク質は、RIG-Iのユビキチン化の一因となり得る、細胞内E3ユビキチンリガーゼをターゲティングし得る。ウイ

10

20

30

40

50

ルスタンパク質はまた、RIG-Iのユビキチン化も除去し得る。さらに、ウイルスは、細胞内マイクロRNAの存在度をモジュレートすることにより、またはRNA-タンパク質間相互作用を介して、タンパク質間相互作用とは独立に、RIG-Iのユビキチン化（例えば、Lys63結合型）を阻害し得る。

【0453】

場合によって、RIG-Iの活性化を防止するために、ウイルスタンパク質が、ウイルスRNA内の5'-三リン酸部分をプロセシングする場合もあり、ウイルス的ヌクレアーゼが、遊離二本鎖RNA(dsRNA)を消化する場合もある。さらに、ウイルスタンパク質は、ウイルスRNAに結合して、RIG-Iによる病原体関連分子パターン(PAMP)の認識も阻害し得る。一部のウイルスタンパク質は、RIG-Iおよび/またはMDA5の特異的翻訳後修飾を操り、これにより、これらのシグナル伝達能を遮断し得る。例えば、ウイルスは、ウイルス性脱ユビキチン化酵素(DUB)をコードすることにより、Lys63結合型RIG-Iのユビキチン化を防止し得る。他の場合には、ウイルスタンパク質は、細胞内E3ユビキチナーゼ、TRIM25(*tripartite motif protein 25*)、および/またはRippletをアンタゴナイズすることが可能であり、これにより、また、RIG-Iのユビキチン化も阻害し、したがって、その活性化も阻害し得る。さらに、他の場合には、ウイルスタンパク質は、TRIM25に結合して、持続的なRIG-Iシグナル伝達も遮断し得る。MDA5の活性化を抑制するために、ウイルスタンパク質は、PP1を媒介するかまたはPP1を媒介する、MDA5の脱リン酸化を防止し、MDA5を、そのリン酸化不活性状態に保つことができる。例えば、中東呼吸器症候群コロナウイルス(MERS-CoV)は、プロテインキナーゼRアクチベーター(PACT)をターゲティングして、RIG-Iをアンタゴナイズし得る。DENVウイルスに由来するNS3タンパク質は、トラフィッキング因子である14-3-3をターゲティングして、ミトコンドリアのMAVSへの、RIG-Iの転移を防止し得る。場合によって、ウイルスタンパク質は、RIG-I、MDA5、および/またはMAVSを切断し得る。細胞内の分解経路を壊滅させて、RLR-MAVS依存性シグナル伝達を阻害するように、他のウイルスタンパク質を導入することもできる。例えば、B型肝炎ウイルス(HBV)に由来するXタンパク質と、重症急性呼吸器症候群(SARS)関連コロナウイルス(SARS-CoV)に由来する9bタンパク質とは、MAVSのユビキチン化および分解を促進し得る。

【0454】

場合によって、導入されるウイルスタンパク質は、cGAS、IFI16、STING、またはこれらの任意の組合せの免疫逃避を可能とし得る。例えば、環状GMP-AMPシンターゼ(cGAS)の活性化を防止するため、ウイルスタンパク質は、逆転写された過剰なウイルスDNAを分解するのに、細胞内3'修復エキソヌクレアーゼ1(TREX1)を使用し得る。加えて、ウイルスカプシドは、逆転写されたDNAの、cGASによるセンシングを防止し得る、シクロフィリンA(CYPA)など、宿主コード因子を動員し得る。さらに、導入されるウイルスタンパク質は、ウイルスDNAおよびcGASの両方に結合して、cGASの活性を阻害し得る。他の場合には、STING(*stimulator of interferon(IFN) genes*)の活性化をアンタゴナイズするために、例えば、B型肝炎ウイルス(HBV)のポリメラーゼ(Pol)、およびヒトコロナウイルスNL63(HCoV-NL63)、重症急性呼吸器症候群(SARS)関連コロナウイルス(SARS-CoV)のパピイン様プロテアーゼ(PLP)は、STINGのLys63結合型ユビキチン化を防止または除去する。導入されるウイルスタンパク質はまた、STINGに結合し、その活性化を阻害することもでき、STINGを切断して、それを不活性化させることもできる。場合によって、IFI16を不活性化させることができる。例えば、ウイルスタンパク質は、プロテアソーム分解のためにIFI16をターゲティングすることもでき、IFI16に結合して、そのオリゴマー化を防止し、これにより、その活性化を防止することもできる。

【0455】

10

20

30

40

50

例えば、導入されるウイルスタンパク質は、HCMV pUL83、DENV NS2B～NS3、HPV18 E7、hAd5 E1A、HSV1 ICP0、VACV B13、VACV C16、TREX1、HCoV-NL63、SARS-CoV、HBV Pol、PEDV、またはこれらの任意の組合せであるか、またはこれらに由来し得る。ウイルスタンパク質は、アデノウイルスタンパク質であり得る。アデノウイルスタンパク質は、4型アデノウイルスのE1B55Kタンパク質、E4orf6タンパク質であり得る。ウイルスタンパク質は、B13ワクチンウイルスタンパク質であり得る。導入されるウイルスタンパク質は、細胞質DNAの認識、センシング、またはこれらの組合せを阻害し得る。場合によって、細胞を操作する場合、ウイルスタンパク質を利用してウイルス組込み生物学の条件を再現することができる。CRISPRを利用して、トランス遺伝子組込みまたはゲノム修飾の間にウイルスタンパク質を細胞へと導入することができる（図133A、図133B、図134、図135Aおよび図135B）。

【0456】

場合によって、RIP経路を阻害し得る。他の場合には、c-FLIP (cellular FLICE (FADD-like IL-1β-converting enzyme)-inhibitory protein) 経路を、細胞へと導入することができる。c-FLIPは、ヒト細胞内で、長型スプライス変異体(c-FLIPL)、短型スプライス変異体(c-FLIPS)、およびc-FLIPRスプライス変異体として発現し得る。c-FLIPは、スプライス変異体として発現し得る。c-FLIPはまた、Casper、iFLICE、FLAME-1、CASH、CLARP、MRIT、またはusurpinとしても公知であり得る。c-FLIPは、FADDおよび/またはカスパーぜ8もしくはカスパーぜ10およびTRAIL受容体5(DR5)に結合し得る。この相互作用は、DISC (Death-Inducing Signaling Complex) の形成と、後続するカスパーぜカスケードの活性化とを防止する。c-FLIPLおよびc-FLIPSはまた、多様なシグナル伝達経路のほか、Akt、ERK、およびNF-Bを含むいくつかの細胞保護性および生存促進性のシグナル伝達タンパク質の活性化および/または上方調節においても、多機能性の役割を有することが公知である。場合によって、c-FLIPを、細胞へと導入して、生存率を増大させることができる。

【0457】

他の場合には、STINGを阻害し得る。場合によって、カスパーぜ経路を阻害する。DNAセンシング経路は、サイトカインベースの炎症経路および/またはインターフェロンアルファ発現経路であり得る。場合によって、少なくとも1つのDNAセンシング経路インヒビターを細胞へと導入する、多モード法を取る。場合によって、DNAセンシングのインヒビターは、細胞死を低減することが可能であり、外因性TCRトランス遺伝子の組込みの改善を可能とする。多モード法は、TBKインヒビターと組み合わせた、STING/カスパーぜインヒビターであり得る。

【0458】

正確な遺伝子改变の挿入を可能とするHDRを増強するために、本発明者らは、遺伝子サイレンシング、リガーゼIVインヒビターSCR7、または4型アデノウイルスE1B55Kタンパク質およびE4orf6タンパク質の共発現により、NHEJのカギとなる分子である、KU70、KU80、またはDNAリガーゼIVを抑制した。

【0459】

導入されるウイルスタンパク質は、プラスミドDNAの細胞毒性を、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、もしくは100%、またはほぼこれらの比率だけ低減し得る。ウイルスタンパク質は、細胞生存率を、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、もしくは100%、またはほぼこれらの比率だけ改善し得る。

【0460】

場合によって、gRNAを使用して、毒性を低減することができる。例えば、gRNA

10

20

30

40

50

は、ベクターのフィラー領域内に結合するように操作することができる。ベクターは、ミニサークルDNAベクターであり得る。場合によって、ミニサークルベクターは、ウイルスタンパク質と共に使用することができる。他の場合には、ミニサークルベクターは、ウイルスタンパク質、および少なくとも1つのさらなる毒性低減剤と共に使用することができる。場合によって、二本鎖DNAなど、外因性DNAと関連する毒性を低減することにより、ゲノム破壊を、より効率的に実施することができる。

【0461】

場合によって、酵素を使用して、DNAの毒性を低減することができる。例えば、DpnIなどの酵素を用いて、DNAベクター上またはトランス遺伝子上のメチル化標的を除去することができる。電気穿孔の前に、ベクターまたはトランス遺伝子を、DpnIで前処理することができる。DpnIなどのIIM型制限エンドヌクレアーゼは、メチル化DNAを認識および切断することができる。場合によって、ミニサークルDNAを、DpnIで処理する。天然の制限エンドヌクレアーゼは、4つの群(I型、II型、III型、およびIV型)へと類別される。場合によって、DpnIなどの制限エンドヌクレアーゼ、またはCRISPR系エンドヌクレアーゼを用いて、操作細胞を調製する。

10

【0462】

本明細書では、操作細胞を作製する方法であって、少なくとも1つの操作アデノウイルスタンパク質またはその機能的部分を導入するステップと;少なくとも1つの外因性受容体配列をコードする、少なくとも1つのポリ核酸を導入するステップと;少なくとも1つのゲノムを、少なくとも1つのエンドヌクレアーゼまたはその部分で、ゲノム的に破壊するステップとを含む方法が開示される。場合によって、アデノウイルスタンパク質またはその機能的部分は、E1B55K、E4orf6、Scr7、L755507、NS2B3、HPV18 E7、hAd5 E1A、またはこれらの組合せである。アデノウイルスタンパク質は、血清型1～57から選択することができる。場合によって、アデノウイルスタンパク質の血清型は、血清型5である。

20

【0463】

場合によって、操作アデノウイルスタンパク質またはその部分は、少なくとも1個の修飾を有する。修飾は、前記アデノウイルスタンパク質の配列の、置換、挿入、欠失、または修飾であり得る。修飾は、挿入であり得る。挿入は、AGIPAの挿入であり得る。場合によって、修飾は、置換である。置換は、タンパク質配列のアミノ酸373位における、HからAへの置換であり得る。ポリ核酸は、DNAの場合もあり、RNAの場合もある。ポリ核酸は、DNAであり得る。DNAは、ミニサークルDNAであり得る。場合によって、外因性受容体配列は、T細胞受容体(TCR)、B細胞受容体(BCR)、キメラ抗原受容体(CAR)、およびこれらの任意の部分または誘導体の配列からなる群から選択することができる。外因性受容体配列は、TCR配列であり得る。エンドヌクレアーゼは、CRISPR、TALEN、トランスポゾンベース、ZEN、メガヌクレアーゼ、Meg-a-TAL、およびこれらの任意の部分または誘導体からなる群から選択することができる。エンドヌクレアーゼは、CRISPRであり得る。CRISPRは、少なくとも1つのCasタンパク質を含み得る。Casタンパク質は、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Cas5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、Csax、Csx3、Csx1、Csx1S、Csf1、Csf2、CsO、Csf4、Cpf1、c2c1、c2c3、Cas9HiFi、これらの相同体、またはこれらの修飾形からなる群から選択することができる。Casタンパク質は、Cas9であり得る。

30

【0464】

場合によって、CRISPRは、ゲノム内に、二本鎖切断を創出する。ゲノムは、少なくとも1つの遺伝子を含み得る。場合によって、外因性受容体配列を、少なくとも1つの

40

50

遺伝子へと導入する。導入は、少なくとも1つの遺伝子を破壊し得る。遺伝子は、CIS H、TCR、TRA、TRB、またはこれらの組合せであり得る。細胞は、ヒト細胞であり得る。ヒト細胞は、免疫細胞であり得る。免疫細胞は、CD3+、CD4+、CD8+、またはこれらの任意の組合せであり得る。方法は、細胞を拡大するステップをさらに含み得る。

【0465】

本明細書では、操作細胞を作製する方法であって、少なくとも1つの外因性T細胞受容体（TCR）配列をコードする、少なくとも1つのポリ核酸を、ウイルスにより導入するステップと；少なくとも1つの遺伝子を、少なくとも1つのエンドヌクレアーゼまたはその機能的な部分によりゲノム破壊するステップとを含む方法が開示される。場合によって、ウイルスは、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、またはこれらの任意の誘導体から選択することができる。ウイルスは、アデノ随伴ウイルス（AAV）であり得る。AAVは、血清型5であり得る。AAVは、血清型6であり得る。AAVは、少なくとも1つの修飾を含み得る。修飾は、化学修飾であり得る。ポリ核酸は、DNA、RNA、またはこれらの任意の修飾体であり得る。ポリ核酸は、DNAであり得る。場合によって、DNAは、ミニサークルDNAである。場合によって、ポリ核酸は、TCR配列を挟む、少なくとも1つの相同性アームをさらに含み得る。相同性アームは、少なくとも1つの遺伝子において、相補配列を含み得る。遺伝子は、内因性遺伝子であり得る。内因性遺伝子は、チェックポイント遺伝子であり得る。

10

【0466】

場合によって、本開示の任意の実施形態による方法または系は、少なくとも1つの毒性低減剤をさらに含み得る。場合によって、AAVベクターは、少なくとも1つのさらなる毒性低減剤と共に使用することができる。他の場合には、ミニサークルベクターは、少なくとも1つのさらなる毒性低減剤と共に使用することができる。毒性低減剤は、ウイルスタンパク質、または細胞質DNAセンシング経路のインヒビターであり得る。ウイルスタンパク質は、E1B55K、E4orf6、Scr7、L755507、NS2B3、HPV18 E7、hAd5 E1A、またはこれらの組合せであり得る。方法は、細胞の拡大をさらに含み得る。場合によって、細胞質DNAセンシング経路のインヒビターを使用することができ、それは、c-FLIP (cellular FLICE (FADD-like IL-1-converting enzyme)-inhibitory protein) であり得る。

20

30

【0467】

細胞生存率、および/または1もしくは複数の細胞のゲノムへのトランス遺伝子の組込みの効率は、当技術分野で公知の任意の方法を使用して測定することができる。場合によって、細胞生存率および/または組込みの効率は、トリパンブルー排除、terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)、所与の細胞表面マーカー（例えば、CD4またはCD8）の有無、テロメアの長さ、蛍光活性化細胞分取（FACS）、リアルタイムPCR、またはDroplet Digital PCRを使用して測定することができる。例えば、FACSを使用して、電気穿孔後における、トランス遺伝子の組込みの効率を検出することができる。別の例では、アポトーシスは、TUNELを使用して測定することができる。場合によって、毒性は細胞のゲノム操作によって起こり得る（D.R. Senら、Science 10.1126/science.aae0491 (2016年)）。毒性は、腫瘍標的に対する細胞の細胞傷害性に影響を及ぼし得る細胞の疲弊をもたらし得る。場合によって、疲弊したT細胞は、機能的メモリーT細胞とは異なる分化状態を占め得る。場合によって、変化した細胞状態を同定すること、およびそれをベースラインに戻す方法は、本明細書中の方法によって記載され得る。例えば、疲弊したT細胞における状態特異的エンハンサーのマッピングは、養子T細胞療法のための改善されたゲノム編集を可能にし得る。場合によって、T細胞を疲弊に耐性にするためのゲノム編集は、養子T細胞療法を改善し得る。場合によって、疲弊したT細胞は、機能的メモリーT細胞と比較した場合、変化したクロマチ

40

50

ンランドスケープを有し得る。クロマチンランドスケープの変化には、エピジェネティックな変化が含まれ得る。

【0468】

ベクターの細胞膜への送達

ヌクレアーゼおよび転写因子、これらをコードするポリヌクレオチド、ならびに／または任意のトランス遺伝子のポリヌクレオチド、ならびに本明細書で記載されるタンパク質および／またはポリヌクレオチドを含む組成物は、任意の適切な手段により、標的細胞へと送達することができる。

【0469】

適切な細胞は、真核細胞および／または真核細胞株、ならびに原核細胞および／または原核細胞株を含み得るがこれらに限定されない。このような細胞、またはこのような細胞から作製された細胞株の非限定的な例は、COS、CHO(例えば、CHO-S、CHO-K1、CHO-DG44、CHO-DUXB11、CHO-DUKX、CHOK1SV)、VERO、MDCK、WI38、V79、B14AF28-G3、BHK、HaK、NSO、SP2/0-Ag14、HeLa、HEK293(例えば、HEK293-F、HEK293-H、HEK293-T)、およびperC6細胞のほか、Spodoptera frugiperda(Sf)などの昆虫細胞、またはSaccharomyces属、Pichia属、およびSchizosaccharomyces属などの真菌細胞を含む。場合によって、細胞株は、CHO-K1細胞株、MDCK細胞株、またはHEK293細胞株である。場合によって、細胞または細胞の集団は、初代細胞または初代細胞の集団である。場合によって、初代細胞または初代細胞の集団は、初代リンパ球または初代リンパ球の集団である。場合によって、適切な初代細胞は、末梢血単核細胞(PBMC)、末梢血リンパ球(PBL)、およびT細胞、ナチュラルキラー細胞、单球、ナチュラルキラー-T細胞、单球前駆細胞、造血幹細胞、または非多能性幹細胞などであるがこれらに限定されない、他の血液細胞サブセットを含む。場合によって、細胞は、CD3+T細胞、CD4+T細胞、CD8+T細胞などの腫瘍浸潤細胞(TIL)、または他の任意の種類のT細胞など、任意のT細胞を含む、任意の免疫細胞であり得る。T細胞はまた、メモリー-T細胞、メモリーステムT細胞、またはエフェクター-T細胞も含み得る。T細胞はまた、バルク集団から選択することもでき、例えば、T細胞を、全血液から選択することもできる。T細胞はまた、バルク集団から拡大することもできる。T細胞はまた、特定の集団および表現型に偏る場合もある。例えば、T細胞は、CD45RO(-)、CCR7(+)、CD45RA(+)、CD62L(+)、CD27(+)、CD28(+)、および／またはIL-7R(+)を表現型的に含むように、偏り得る。CD45RO(-)、CCR7(+)、CD45RA(+)、CD62L(+)、CD27(+)、CD28(+)、および／またはIL-7R(+)を含むリストから選択される、1または複数のマーカーを含む、適切な細胞を選択することができる。適切な細胞はまた、例示を目的として述べると、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、造血幹細胞、神経幹細胞、および間葉幹細胞などの幹細胞も含み得る。適切な細胞は、ヒト細胞、非ヒト細胞、および／またはマウス細胞など、任意の数の初代細胞を含み得る。適切な細胞は、前駆細胞であり得る。適切な細胞は、処置される対象(例えば、患者)に由来し得る。適切な細胞は、ヒトドナーに由来し得る。適切な細胞は、CD45RO(-)、CCR7(+)、CD45RA(+)、CD62L+(L-セレクチン)、CD27+、CD28+、およびIL-7R+から構成される、ステムメモリー-T_{scM}細胞であることが可能であり、ステムメモリー細胞はまた、CD95、IL-2R、CXCR3、およびLFA-1も発現することが可能であり、ステムメモリー細胞固有の、多数の機能的な属性を示す。適切な細胞は、L-セレクチンおよびCCR7を含む、セントラルメモリー細胞であるT_{cM}細胞であることが可能であり、セントラルメモリー細胞は、例えば、IL-2を分泌し得るが、IFNまたはIL-4は分泌し得ない。適切な細胞はまた、L-セレクチンまたはCCR7を含む、エフェクターメモリー細胞であるT_{EM}細胞でもあることが可能であり、例えば、IFNおよびIL-4など、エフェクターサイトカインを産生し得る。場合によつ

10

20

30

40

50

て、初代細胞は初代リンパ球であり得る。場合によって、初代細胞の集団は、リンパ球集団であり得る。

【0470】

適切な細胞を獲得する方法は、細胞を選択するステップを含み得る。場合によって、細胞は、細胞に対して選択され得るマーカーを含み得る。例えば、このようなマーカーは、GFP、耐性遺伝子、細胞表面マーカー、内因性タグを含み得る。細胞は、任意の内因性マーカーを使用して選択することができる。適切な細胞は、任意の技術を使用して選択することができる。このような技術は、フローサイトメトリーおよび／または磁気カラムを含み得る。次いで、選択した細胞を、対象へと注入することができる。選択した細胞はまた、大きな個数へと拡大することもできる。選択した細胞は、注入の前に拡大することができる。

10

【0471】

本明細書で記載される転写因子およびヌクレアーゼは、例えば、タンパク質のうちの1または複数をコードする配列を含有するベクターを使用して送達することができる。トランス遺伝子をコードするポリヌクレオチドも、同様に送達することができる。プラスミドベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ポックスウイルスベクター；ヘルペスウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルスベクターなどを含むがこれらに限定されない、任意のベクター系を使用することができる。さらに、これらのベクターのうちのいずれかは、1または複数の転写因子、ヌクレアーゼ、および／またはトランス遺伝子も含み得る。したがって、1または複数の、CRISPR、TALEN、トランスポゾンベースのZEN、メガヌクレアーゼ、もしくはMega-TAL分子、および／またはトランス遺伝子を、細胞へと導入する場合、CRISPR、TALEN、トランスポゾンベースのZEN、メガヌクレアーゼ、もしくはMega-TAL分子、および／またはトランス遺伝子は、同じベクター上に保有される場合もあり、異なるベクター上に保有される場合もある。複数のベクターを使用する場合、各ベクターは、1または複数の、CRISPR、TALEN、トランスポゾンベースのZEN、メガヌクレアーゼ、もしくはMega-TAL分子、および／またはトランス遺伝子をコードする配列を含み得る。

20

【0472】

従来型のウイルスベースの遺伝子導入法および非ウイルスベースの遺伝子移入法を使用して、操作されたCRISPR分子、TALEN分子、トランスポゾンベースのZEN分子、メガヌクレアーゼ分子、もしくはMega-TAL分子、および／またはトランス遺伝子をコードする核酸を、細胞（例えば、哺乳動物細胞）内および標的組織内に導入することができる。このような方法はまた、CRISPR分子、TALEN分子、トランスポゾンベースのZEN分子、メガヌクレアーゼ分子、もしくはMega-TAL分子、および／またはトランス遺伝子をコードする核酸を、in vitroで、細胞へと投与するに使用することもできる。一部の例では、CRISPR分子、TALEN分子、トランスポゾンベースのZEN分子、メガヌクレアーゼ分子、もしくはMega-TAL分子、および／またはトランス遺伝子をコードする核酸を、in vivoまたはex vivoにおける免疫療法への使用のために投与することができる。非ウイルスベクター送達系は、DNAプラスミド、ネイキッド核酸、およびリポソームまたはポロキサマーなど、送達媒体と複合体化させた核酸を含み得る。ウイルスベクター送達系は、エピソームゲノム、または細胞への送達の後で組み込まれたゲノムを有する、DNAウイルスおよびRNAウイルスを含み得る。

30

【0473】

核酸のウイルスまたは非ウイルスの送達法は、電気穿孔、リポフェクション、ヌクレオフェクション、金ナノ粒子送達、マイクロインジェクション、遺伝子銃、ウィロソーム、リポソーム、イムノリポソーム、ポリカチオンまたは脂質：核酸コンジュゲート、ネイキッドDNA、mRNA、人工ビリオン、および薬剤増強型DNA取込みを含む。核酸を送達するために、例えば、Sonitron 2000システム（Rich-Mar）を使

40

50

用する超音波穿孔もまた、使用することができる。

【0474】

さらなる例示的な核酸送達系は、AMAXA(登録商標) Biosystems(Cologne, Germany)、Life Technologies(Frederick, Md.)、MAXCYTE, Inc. (Rockville, Md.)、BTX Molecular Delivery Systems(Holliston, Mass.)、およびCopernicus Therapeutics Inc.(例えば、米国特許第6,008,336号を参照されたい)により提供されている核酸送達系を含む。リポフェクション試薬は、市販されている(例えば、TRANSFECTAM(登録商標)およびLIPOFECTIN(登録商標))。送達は、細胞への送達(ex vivo投与)の場合もあり、標的組織への送達(in vivo投与)の場合もある。さらなる送達法は、送達される核酸の、EnGeneIC送達媒体(EDV)へのパッケージングの使用を含む。これらのEDVは、抗体の1つのアームが、標的組織に対する特異性を有し、他のアームがEDVに対する特異性を有する、二特異性抗体を使用して、標的組織へと特異的に送達される。抗体により、EDVは、標的細胞の表面に至り、次いで、EDVは、エンドサイトーシスにより、細胞内に至る。

10

【0475】

操作されたCRISPR分子、TALEN分子、トランスポゾンベースのZEN分子、メガヌクレアーゼ分子、もしくはMega-TAL分子、トランスポゾン、および/またはトランス遺伝子をコードする核酸を含有する、ウイルスベクターおよび非ウイルスベクターを含むベクターもまた、in vivoにおける細胞への形質導入のために、生物へと、直接投与することができる。代替的に、ネイキッドDNAまたはmRNAも投与することができる。投与は、分子を、血液または組織細胞と、最終的に接触させるために通常使用される経路であって、注射、注入、局所適用、および電気穿孔を含むがこれらに限定されない経路のうちのいずれかによる。1つを超える経路を使用して、特定の組成物を投与することができる。薬学的に許容される担体は、投与される特定の組成物、ならびに組成物を投与するのに使用される特定の方法により、部分的に決定される。

20

【0476】

場合によって、外因性TCRをコードするベクターは、細胞内ヌクレアーゼへとシャトリングすることができる。例えば、ベクターは、核局在化配列(NLS)を含有し得る。ベクターはまた、タンパク質またはタンパク質複合体によりシャトリングすることもできる。場合によって、Cas9は、ミニサークルベクターをシャトリングする手段として使用することができる。Casは、NLSを含み得る。場合によって、ベクターは、電気穿孔の前に、Casタンパク質とあらかじめ複合体化させることができる。シャトリングのために使用され得るCasタンパク質は、ヌクレアーゼ欠損Cas9(dCas9)タンパク質であり得る。シャトリングのために使用され得るCasタンパク質は、ヌクレアーゼコンピテントCas9であり得る。場合によって、Casタンパク質は、ガイドRNA、および外因性TCRをコードするプラスミドと、あらかじめ混合することができる。

30

【0477】

本明細書で開示される、ある特定の態様は、ベクターを用いる。例えば、使用され得るベクターは、細菌用:pBS、pQE-9(Qiagen)、phagescript、PsiX174、pBlue-script SK、pBSKS、pNH8a、pNH16a、pNH18a、pNH46a(Stratagene); pTrc99A、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5(Pharmacia)。真核細胞用:pWL-neo、pSV2cat、pOG44、pXT1、pSG(Stratagene)pSVK3、pBpV、pMSG、pSVL(Pharmacia)を含むがこれらに限定されない。それらが、選択された宿主内で、複製可能であり、生存する限りにおいて、他の任意のプラスミドおよびベクターもまた、使用することができる。任意のベクターおよび市販のベクター(およびこれらの変異体または誘導体)は、方法における使用のための、1または複数の組換え部位を含むように操作することができる。この

40

50

のようなベクターは、例えば、Vector Laboratories Inc.、Invitrogen、Promega、Novagen、NEB、Clontech、Boehringer Mannheim、Pharmacia、EpiCenter、Origene Technologies Inc.、Stratagene、PerkinElmer、Pharmingen、およびResearch Geneticsから得ることができる。目的の他のベクターは、pFastBac、pFastBacHT、pFastBacDUAL、pSFV、およびpTet-Splice(Invitrogen)、pEUK-C1、pPUR、pMAM、pMAMneo、pBI101、pBI121、pDR2、pCMVEBNA、およびpYACneo(Clontech)、pSVK3、pSVL、pMSG、pCH110、およびpKK232-8(Pharmacia, Inc.)、p3'SS、pXT1、pSG5、pPbac、pMbac、pMC1neo、およびpOG44(Stratagene, Inc.)、およびpYES2、pAC360、pBlueBa-chis A、B、およびC、pVL1392、pBlueBac111、pCDM8、pcDNA1、pZeosV、pcDNA3 pREP4、pCEP4、およびpEBVHis(Invitrogen, Corp.)、ならびにこれらの変異体または誘導体などの真核細胞用発現ベクターを含む。他のベクターは、pUC18、pUC19、pBlueScript、pSPORT、コスミド、ファージミド、YAC(酵母人工染色体)、BAC(細菌的人工染色体)、P1(Escherichia coliファージ)、pQE70、pQE60、pQE9(Quagana)、pBSベクター、Phage Scriptベクター、Blue Scriptベクター、pNH8A、pNH16A、pNH18A、pNH46A(Stratagene)、pcDNA3(Invitrogen)、pGEX、pTrsfus、pTrc99A、pET-5、pET-9、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5(Pharmacia)、pSPORT1、pSPORT2、pCMVSPORT2.0およびpSYSPORT1(Invitrogen)、ならびにこれらの変異体または誘導体を含む。さらなる目的のベクターはまた、Invitrogen製のpTrxFus、pThioHis、pLEX、pTrcHis、pTrcHis2、pRSET、pBlueBa-chis2、pcDNA3.1/His、pcDNA3.1(-)/Myc-His、pSectag、pEBVHis、pPIC9K、pPIC3.5K、pA081S、pPICZ、pPICZA、pPICZB、pPICZC、pGAPZA、pGAPZB、pGAPZC、pBlue-Bac4.5、pBlueBacHis2、pMelBac、pSinRep5、pSinHis、pIND、pIND(SP1)、pVgRXR、pcDNA2.1、pYES2、pZero1.1、pZero2.1、pCR-Blunt、pSE280、pSE380、pSE420、pVL1392、pVL1393、pCDM8、pcDNA1.1、pcDNA1.1/Amp、pcDNA3.1、pcDNA3.1/Zeo、pSe、SV2、pRc/CMV2、pRc/RSV、pREP4、pREP7、pREP8、pREP9、pREP10、pCEP4、pEBVHis、pCR3.1、pCR2.1、pCR3.1-Uni、およびpCRBac; Pharmacia製のX-Excel1、X-gt11、pTrc99A、pKK223-3、pGEX-1X-T、pGEX-2T、pGEX-2TK、pGEX-4T-1、pGEX-4T-2、pGEX-4T-3、pGEX-3X、pGEX-5X-1、pGEX-5X-2、pGEX-5X-3、pEZ218、pRIT2T、pMC1871、pSVK3、pSVL、pMSG、pCH110、pKK232-8、pSL1180、pNEO、およびpUC4K; Novagen製のpSCREEN-1b(+)、pT7Blue(R)、pT7Blue-2、pCITE-4-abc(+)、pOCUS-2、pTAG、pET-32L1C、pET-30LIC、pBAC-2c p-LIC、pBACgus-2 cp-LIC、pT7Blue-2 LIC、pT7Blue-2、X SCREEN-1、X BlueSTAR、pET-3abcd、pET-7abc、pET9abcd、pET11 abcd、pET12abc、pET-14b、pET-15b、pET-16b、pET-17b-pET-17xb、pE 10
20
30
40
50

T - 19 b、pET - 20 b (+)、pET - 21 abc d (+)、pET - 22 b (+)、pET - 23 abc d (+)、pET - 24 abc d (+)、pET - 25 b (+)、pET - 26 b (+)、pET - 27 b (+)、pET - 28 abc (+)、pET - 29 abc (+)、pET - 30 abc (+)、pET - 31 b (+)、pET - 32 abc (+)、pET - 33 b (+)、pBAC - 1、pBACgus - 1、pBAC4x - 1、pBACgus4x - 1、pBAC - 3 cp、pBACgus - 2 cp、pBACsurf - 1、p1g、Signal p1g、pYX、Selecta Vecta - Neo、Selecta Vecta - Hyg、およびSelecta Vecta - Gpt；Clontech製のpLexA、pB42AD、pGBT9、pAS2 - 1、pGAD424、pACT2、pGAD GL、pGAD GH、pGAD10、pGilda、pEZM3、pEGFP、pEGFP - 1、pEGFPN、pEGFP - C、pEBFP、pGFPuv、pGFP、p6xHis - GFP、pSEAP2 - Basic、pSEAP2 - Contral、pSEAP2 - Promoter、pSEAP2 - Enhancer、pI3gal - Basic、pI3gal - Control、pI3gal - Promoter、pI3gal - Enhancer、pCMV、pTet - Off、pTet - On、pTK - Hyg、pRetro - Off、pRetro - On、pIRES1neo、pIRES1hyg、pLXSN、pLNCX、pLAPS N、pMAMneo、pMAMneo - CAT、pMAMneo - LUC、pPUR、pSV2neo、pYEX4T - 1 / 2 / 3、pYEX - S1、pBacPAK - His、pBacPAK8 / 9、pAcUW31、BacPAK6、pTripleX、2Xgt 10、Xgt11、pWE15、およびX TripleX；Stratagene製のLambda ZAP II、pBK - CMV、pBK - RSV、pBluescript II KS + / -、pBluescript II SK + / -、pAD - GAL4、pBD - GAL4 Cam、pSurfscript、Lambda FIX II、Lambda DASH、Lambda EMBL3、Lambda EMBL4、SuperCos、pCR - Script Amp、pCR - Script Cam、pCR - Script Direct、pBS + / -、pBC KS + / -、pBC SK + / -、Phag - escript、pCAL - n - EK、pCAL - n、pCAL - c、pCAL - k c、pET - 3abcd、pET - 11abcd、pSPUTK、pESP - 1、pCMVLacI、pOPRSVI / MCS、pOPI3 CAT、pXT1、pSG5、pPbac、pMbac、pMC1neo、pMC1neo Poly A、pOG44、pOG45、pFRTI3GAL、pNE0I3GAL、pRS403、pRS404、pRS405、pRS406、pRS413、pRS414、pRS415、およびpRS416；pPC86、pDBLeu、pDBTrp、pPC97、p2.5、pGAD1 - 3、pGAD10、pACT、pACT2、pGADGL、pGADGH、pAS2 - 1、pGAD424、pGBT8、pGBT9、pGAD - GAL4、pLexA、pBD - GAL4、pHISi、pHISi - 1、placZi、pB42AD、pDG202、pJK202、pJG4 - 5、pNLexA、pYESTrp、ならびにこれらの変異体または誘導体も含み得る。

【0478】

これらのベクターを使用して、目的の遺伝子、例えば、トランス遺伝子、または目的の遺伝子の部分を発現させることができる。遺伝子の部分または遺伝子は、任意の方法を使用することにより挿入することができる。例えば、方法は、制限酵素ベースの技法であり得る。

【0479】

ベクターは、下記で記載される通り、in vivoにおいて、個別の患者への投与により、典型的に、全身投与（例えば、静脈内注入、腹腔内注入、筋内注入、皮下注入、または頭蓋内注入）または局所適用により送達することができる。代替的に、ベクターは、ex vivoにおいて、個別の患者から外植された細胞（例えば、リンパ球、T細胞、骨髄吸引物、組織生検）などの細胞へと送達することもできるが、通例、ベクターを組み

10

20

30

40

50

込んだ細胞についての選択の後、患者への細胞の再移植がこれに続く。選択の前に、または選択の後で、細胞は、拡大することができる。ベクターは、ミニサークルベクターであり得る(図43)。

【0480】

細胞に、ミニサークルベクターおよびC R I S P R系をトランスフェクトすることができる。場合によって、ミニサークルベクターは、C R I S P R系ならびに／またはヌクレアーゼもしくはヌクレアーゼをコードするポリペプチドを細胞または細胞の集団へと導入するのと同時に、その前に、またはその後に、細胞または細胞の集団へと導入される。ミニサークルベクターの濃度は、0.5ナノグラム～50マイクログラムであり得る。場合によって、電気穿孔により細胞へと導入され得る核酸(例えば、s s D N A、d s D N A、R N A)の量を変動させて、トランスフェクション効率および／または細胞生存率を最適化することができる。場合によって、約100ピコグラム未満の核酸を、各細胞試料(例えば、電気穿孔される、1または複数の細胞)へと添加することができる。場合によって、少なくとも約100ピコグラム、少なくとも約200ピコグラム、少なくとも約300ピコグラム、少なくとも約400ピコグラム、少なくとも約500ピコグラム、少なくとも約600ピコグラム、少なくとも約700ピコグラム、少なくとも約800ピコグラム、少なくとも約900ピコグラム、少なくとも約1マイクログラム、少なくとも約1.5マイクログラム、少なくとも約2マイクログラム、少なくとも約2.5マイクログラム、少なくとも約3マイクログラム、少なくとも約3.5マイクログラム、少なくとも約4マイクログラム、少なくとも約4.5マイクログラム、少なくとも約5マイクログラム、少なくとも約5.5マイクログラム、少なくとも約6マイクログラム、少なくとも約6.5マイクログラム、少なくとも約7マイクログラム、少なくとも約7.5マイクログラム、少なくとも約8マイクログラム、少なくとも約8.5マイクログラム、少なくとも約9マイクログラム、少なくとも約9.5マイクログラム、少なくとも約10マイクログラム、少なくとも約11マイクログラム、少なくとも約12マイクログラム、少なくとも約13マイクログラム、少なくとも約14マイクログラム、少なくとも約15マイクログラム、少なくとも約20マイクログラム、少なくとも約25マイクログラム、少なくとも約30マイクログラム、少なくとも約35マイクログラム、少なくとも約40マイクログラム、少なくとも約45マイクログラム、または少なくとも約50マイクログラムの核酸を、各細胞試料(例えば、電気穿孔される、1または複数の細胞)へと添加することができる。例えば、1マイクログラムのd s D N Aを、電気穿孔のために、各細胞試料へと添加することができる。場合によって、最適のトランスフェクション効率および／または細胞生存率に要求される核酸(例えば、d s D N A)の量は、細胞型に特異的であり得る。場合によって、各試料のために使用される核酸(例えば、d s D N A)の量は、トランスフェクション効率および／または細胞生存率に直接対応し得る。例えば、ミニサークルトランスフェクションの濃度範囲を、図70A、図70B、および図73に示す。5および20マイクログラムの濃度でトランスフェクトされた、ミニサークルベクターの組込みの効率についての概要について描示する、代表的なフローサイトメトリー実験を、図74、図78、および図79に示す。ミニサークルベクターによりコードされるトランス遺伝子は、細胞ゲノムへと組み込まれ得る。場合によって、ミニサークルベクターによりコードされるトランス遺伝子の組込みは、順方向でなされる(図75)。他の場合には、ミニサークルベクターによりコードされるトランス遺伝子の組込みは、逆方向でなされる。場合によって、非ウイルス系(例えば、ミニサークル)は、細胞または細胞の集団へと、C R I S P R系、またはヌクレアーゼもしくはヌクレアーゼをコードするポリ核酸を前記細胞または前記細胞の集団へと導入した後、約1～3時間、3～6時間、6～9時間、9～12時間、12～15時間、15～18時間、18～21時間、21～23時間、23～26時間、26～29時間、29～31時間、31～33時間、33～35時間、35～37時間、37～39時間、39～41時間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、14日間、16日間、20日間、または20日間よりも長い期間、ほぼこれらの期間から、少なくともほぼこれらの期間、または最大で、導入

10

20

30

40

50

する。

【0481】

本明細書で記載される核酸送達プラットフォーム、例えば、ヌクレオフェクションまたは電気穿孔のうちのいずれかによる、細胞のトランスフェクション効率は、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、もしくは99.9%を超えるか、またはほぼこれらの比率であり得る。

【0482】

例えば、Neon (登録商標) Transfection System (Thermo Fisher Scientific) またはAMAXA (登録商標) Nucleofector (AMAXA (登録商標) Biosystems) を使用する電気穿孔もまた、細胞への核酸の送達のために使用することができる。電気穿孔パラメータは、トランスフェクション効率および/または細胞生存率を最適化するように調整することができる。電気穿孔デバイスは、指数関数的減衰、時定数、および方形波など、複数の電気波形パルスの設定項目を有し得る。あらゆる細胞型は、適用されるパルスパラメータ（例えば、電圧、キャパシタンス、および抵抗）に依存する、固有の最適電界強度（E）を有する。最適電界強度の適用は、膜貫通電圧の誘導による電気透過化であって、核酸が細胞膜を通過することを可能とする電気透過化を引き起こす。場合によって、電気穿孔パルスの電圧、電気穿孔パルス幅、パルス数、細胞密度、およびチップ型は、トランスフェクション効率および/または細胞生存率を最適化するように調整することができる。
10

【0483】

場合によって、電気穿孔パルスの電圧を変動させて、トランスフェクション効率および/または細胞生存率を最適化することができる。場合によって、電気穿孔電圧は、約500ボルト未満であり得る。場合によって、電気穿孔電圧は、少なくとも約500ボルト、少なくとも約600ボルト、少なくとも約700ボルト、少なくとも約800ボルト、少なくとも約900ボルト、少なくとも約1000ボルト、少なくとも約1100ボルト、少なくとも約1200ボルト、少なくとも約1300ボルト、少なくとも約1400ボルト、少なくとも約1500ボルト、少なくとも約1600ボルト、少なくとも約1700ボルト、少なくとも約1800ボルト、少なくとも約1900ボルト、少なくとも約2000ボルト、少なくとも約2100ボルト、少なくとも約2200ボルト、少なくとも約2300ボルト、少なくとも約2400ボルト、少なくとも約2500ボルト、少なくとも約2600ボルト、少なくとも約2700ボルト、少なくとも約2800ボルト、少なくとも約2900ボルト、または少なくとも約3000ボルトであり得る。場合によって、最適のトランスフェクション効率および/または細胞生存率に要求される電気穿孔パルスの電圧は、細胞型に特異的であり得る。例えば、1900ボルトの電気穿孔電圧は、マクロファージ細胞に最適であり得る（例えば、最高の生存率および/またはトランスフェクション効率をもたらし得る）。別の例では、約1350ボルトの電気穿孔電圧は、Jurkat細胞、またはT細胞などの初代ヒト細胞に最適であり得る（例えば、最高の生存率および/またはトランスフェクション効率をもたらし得る）。場合によって、電気穿孔電圧の範囲は、所与の細胞型に最適であり得る。例えば、約1000ボルト～約1300ボルトの間の電気穿孔電圧は、ヒト578T細胞に最適であり得る（例えば、最高の生存率および/またはトランスフェクション効率をもたらし得る）。場合によって、初代細胞は初代リンパ球であり得る。場合によって、初代細胞の集団は、リンパ球集団であり得る。
20
30

【0484】

場合によって、電気穿孔パルス幅を変動させて、トランスフェクション効率および/または細胞生存率を最適化することができる。場合によって、電気穿孔パルス幅は、約5ミリ秒未満であり得る。場合によって、電気穿孔幅は、少なくとも約5ミリ秒、少なくとも約6ミリ秒、少なくとも約7ミリ秒、少なくとも約8ミリ秒、少なくとも約9ミリ秒、少

なくとも約10ミリ秒、少なくとも約11ミリ秒、少なくとも約12ミリ秒、少なくとも約13ミリ秒、少なくとも約14ミリ秒、少なくとも約15ミリ秒、少なくとも約16ミリ秒、少なくとも約17ミリ秒、少なくとも約18ミリ秒、少なくとも約19ミリ秒、少なくとも約20ミリ秒、少なくとも約21ミリ秒、少なくとも約22ミリ秒、少なくとも約23ミリ秒、少なくとも約24ミリ秒、少なくとも約25ミリ秒、少なくとも約26ミリ秒、少なくとも約27ミリ秒、少なくとも約28ミリ秒、少なくとも約29ミリ秒、少なくとも約30ミリ秒、少なくとも約31ミリ秒、少なくとも約32ミリ秒、少なくとも約33ミリ秒、少なくとも約34ミリ秒、少なくとも約35ミリ秒、少なくとも約36ミリ秒、少なくとも約37ミリ秒、少なくとも約38ミリ秒、少なくとも約39ミリ秒、少なくとも約40ミリ秒、少なくとも約41ミリ秒、少なくとも約42ミリ秒、少なくとも約43ミリ秒、少なくとも約44ミリ秒、少なくとも約45ミリ秒、少なくとも約46ミリ秒、少なくとも約47ミリ秒、少なくとも約48ミリ秒、少なくとも約49ミリ秒、または少なくとも約50ミリ秒であり得る。場合によって、最適のトランスフェクション効率および/または細胞生存率に要求される電気穿孔パルス幅は、細胞型に特異的であり得る。例えば、30ミリ秒の電気穿孔パルス幅は、マクロファージ細胞に最適であり得る(例えば、最高の生存率および/またはトランスフェクション効率をもたらし得る)。別の例では、約10ミリ秒の電気穿孔幅は、Jurrkat細胞に最適であり得る(例えば、最高の生存率および/またはトランスフェクション効率をもたらし得る)。場合によって、電気穿孔幅の範囲は、所与の細胞型に最適であり得る。例えば、約20ミリ秒～約30ミリ秒の間の電気穿孔幅は、ヒト578T細胞に最適であり得る(例えば、最高の生存率および/またはトランスフェクション効率をもたらし得る)。

【0485】

場合によって、電気穿孔パルスの数を変動させて、トランスフェクション効率および/または細胞生存率を最適化することができる。場合によって、電気穿孔は、単一のパルスを含み得る。場合によって、電気穿孔は、1つを超えるパルスを含み得る。場合によって、電気穿孔は、2つのパルス、3つのパルス、4つのパルス、5つのパルス6つのパルス、7つのパルス、8つのパルス、9つのパルス、または10もしくはそれよりも多いパルスを含み得る。場合によって、最適のトランスフェクション効率および/または細胞生存率に要求される電気穿孔パルスの数は、細胞型に特異的であり得る。例えば、単一のパルスによる電気穿孔は、マクロファージ細胞に最適であり得る(例えば、最高の生存率および/またはトランスフェクション効率をもたらし得る)。別の例では、3つのパルスによる電気穿孔は、初代細胞に最適であり得る(例えば、最高の生存率および/またはトランスフェクション効率をもたらし得る)。場合によって、電気穿孔幅の範囲は、所与の細胞型に最適であり得る。例えば、約1つ～約3つの間のパルスによる電気穿孔は、ヒト細胞に最適であり得る(例えば、最高の生存率および/またはトランスフェクション効率をもたらし得る)。

【0486】

場合によって、電気穿孔のための出発細胞密度を変動させて、トランスフェクション効率および/または細胞生存率を最適化することができる。場合によって、電気穿孔のための出発細胞密度は、細胞約 1×10^5 個未満であり得る。場合によって、電気穿孔のための出発細胞密度は、細胞少なくとも約 1×10^5 個、細胞少なくとも約 2×10^5 個、細胞少なくとも約 3×10^5 個、細胞少なくとも約 4×10^5 個、細胞少なくとも約 5×10^5 個、細胞少なくとも約 6×10^5 個、細胞少なくとも約 7×10^5 個、細胞少なくとも約 8×10^5 個、細胞少なくとも約 9×10^5 個、細胞少なくとも約 1×10^6 個、細胞少なくとも約 1.5×10^6 個、細胞少なくとも約 2×10^6 個、細胞少なくとも約 2.5×10^6 個、細胞少なくとも約 3×10^6 個、細胞少なくとも約 3.5×10^6 個、細胞少なくとも約 4×10^6 個、細胞少なくとも約 4.5×10^6 個、細胞少なくとも約 5×10^6 個、細胞少なくとも約 5.5×10^6 個、細胞少なくとも約 6×10^6 個、細胞少なくとも約 6.5×10^6 個、細胞少なくとも約 7×10^6 個、細胞少なくとも約 7.5×10^6 個、細胞少なくとも約 8×10^6 個、細胞少なくとも約 8.5×10^6 個、

10

20

30

40

50

細胞少なくとも約 9×10^6 個、細胞少なくとも約 9.5×10^6 個、細胞少なくとも約 1×10^7 個、細胞少なくとも約 1.2×10^7 個、細胞少なくとも約 1.4×10^7 個、細胞少なくとも約 1.6×10^7 個、細胞少なくとも約 1.8×10^7 個、細胞少なくとも約 2×10^7 個、細胞少なくとも約 2.2×10^7 個、細胞少なくとも約 2.4×10^7 個、細胞少なくとも約 2.6×10^7 個、細胞少なくとも約 2.8×10^7 個、細胞少なくとも約 3×10^7 個、細胞少なくとも約 3.2×10^7 個、細胞少なくとも約 3.4×10^7 個、細胞少なくとも約 3.6×10^7 個、細胞少なくとも約 3.8×10^7 個、細胞少なくとも約 4×10^7 個、細胞少なくとも約 4.2×10^7 個、細胞少なくとも約 4.4×10^7 個、細胞少なくとも約 4.6×10^7 個、細胞少なくとも約 4.8×10^7 個、または細胞少なくとも約 5×10^7 個であり得る。場合によって、最適のトランسفエクション効率および／または細胞生存率に要求される電気穿孔のための出発細胞密度は、細胞型に特異的であり得る。例えば、電気穿孔のための出発細胞密度は、マクロファージ細胞に最適であり得る（例えば、最高の生存率および／またはトランسفエクション効率をもたらし得る）。別の例では、電気穿孔のための出発細胞密度は、細胞 5×10^6 個の出発細胞密度は、ヒト細胞に最適であり得る（例えば、最高の生存率および／またはトランسفエクション効率をもたらし得る）。場合によって、電気穿孔のための出発細胞密度の範囲は、所与の細胞型に最適であり得る。例えば、電気穿孔のための出発細胞密度は、細胞 5.6×10^6 ～ 5×10^7 個の間の出発細胞密度は、T細胞などのヒト細胞に最適であり得る（例えば、最高の生存率および／またはトランسفエクション効率をもたらし得る）。

10

20

20

30

【0487】

例えば、C R I S P R 系による、外因性 T C R をコードする核酸配列の、細胞ゲノムへの組込みの効率は、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、もしくは99.9%を超えるか、またはほぼこれらの比率であり得る。

【0488】

T C R など、外因性ポリ核酸の組込みは、任意の技法を使用して測定することができる。例えば、組込みは、フローサイトメトリー、Surveyor ヌクレアーゼアッセイ（図56）、TIDE (tracking of indels by decomposition)（図71および図72）、ジャンクションPCR、またはこれらの任意の組合せにより測定することができる。代表的なTIDE解析を、P D - 1ガイドRNAおよびCTL A - 4ガイドRNAについて示される、遺伝子編集効率パーセントについて示す（図35および図36）。CISHガイドRNAについての代表的なTIDE解析を、図62～図67Aおよび67Bにより示す。他の場合には、トランス遺伝子の組込みは、PCRにより測定することができる（図77、図80、および図95）。また、TIDE解析を、rAAV形質導入、次いで、内因性チェックポイント遺伝子のC R I S P R によるノックアウトによって、外因性T C R を発現するように操作された細胞上で実施することができる（図146Aおよび図146B）。

40

40

【0489】

診断法、研究、または遺伝子治療のために、ex vivo における細胞へのトランسفエクション（例えば、トランسفエクトされた細胞の、宿主生物への再注入を介する）もまた、使用することができる。場合によって、細胞は、対象生物から単離し、核酸（例えば、遺伝子またはcDNA）をトランسفエクトし、対象生物（例えば、患者）へと再注入し戻すことができる。

【0490】

患者において治療的に有効であるのに必要な細胞の量は、細胞の生存率と、細胞を遺伝子改変した効率（例えば、トランス遺伝子が1または複数の細胞へと組み込まれた効率）とに応じて変動し得る。場合によって、遺伝子改変後における細胞の生存率と、トランス遺伝子の組込みの効率との積（例えば、乗算の結果）は、対象への投与に利用可能な細胞

50

の治療用アリコートに対応し得る。場合によって、遺伝子改変後における細胞生存率の増大は、患者において治療的に有効な投与に必要な細胞の量の減少に対応し得る。場合によって、トランス遺伝子が1または複数の細胞へと組み込まれた効率の増大は、患者において治療的に有効な投与に必要な細胞の量の減少に対応し得る。場合によって、治療的に有効であるのに必要な細胞の量の決定は、細胞生存率の、時間経過にわたる変化に対応する関数の決定を含み得る。場合によって、治療的に有効であるのに必要な細胞の量の決定は、トランス遺伝子を1または複数の細胞へと組み込みうる効率の、時間依存的な変数（例えば、細胞の培養時間、電気穿孔時間、細胞の刺激時間）に対する変化に対応する関数の決定を含み得る。

【0491】

本明細書で記載される、rAAVなどのウイルス粒子を使用して、目的の遺伝子またはトランス遺伝子を含むウイルスベクターを、ex vivoまたはin vivoの細胞へと送達することができる（図105）。場合によって、本明細書で開示されるウイルスベクターは、pfu（plaques形成単位）として測定され得る。場合によって、本開示の組成物および方法の組換えウイルスまたはウイルスベクターのpfuは、約 10^8 ～約 5×10^{10} pfuであり得る。場合によって、本開示の組換えウイルスは、少なくとも約 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、および 5×10^{10} pfuである。場合によって、本開示の組換えウイルスは、最大で約 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、および 5×10^{10} pfuである。一部の態様では、本開示のウイルスベクターは、ベクターゲノムとして測定され得る。場合によって、本開示の組換えウイルスは、 1×10^{10} ～ 3×10^{12} ベクターゲノム、または 1×10^9 ～ 3×10^{13} ベクターゲノム、または 1×10^8 ～ 3×10^{14} ベクターゲノム、または少なくとも約 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1×10^{13} 、 1×10^{14} 、 1×10^{15} 、 1×10^{16} 、 1×10^{17} 、および 1×10^{18} ベクターゲノムであるか、または 1×10^8 ～ 3×10^{14} ベクターゲノムであるか、または最大で約 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1×10^{13} 、 1×10^{14} 、 1×10^{15} 、 1×10^{16} 、 1×10^{17} 、および 1×10^{18} ベクターゲノムである。

【0492】

場合によって、本開示のウイルスベクター（例えば、AAVまたは修飾AAV）は、感染多度（MOI）を使用して測定され得る。場合によって、MOIは、ベクターまたはウイルスゲノムの、核が送達され得る細胞に対する比率または倍数を指し得る。場合によって、MOIは 1×10^6 であり得る。場合によって、MOIは 1×10^5 ～ 1×10^7 であり得る。場合によって、MOIは 1×10^4 ～ 1×10^8 であり得る。場合によって、本開示の組換えウイルスは、少なくとも約 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1×10^{13} 、 1×10^{14} 、 1×10^{15} 、 1×10^{16} 、 1×10^{17} 、および 1×10^{18} MOIである。場合によって、本開示の組換えウイルスは、 1×10^8 ～ 3×10^{14} MOIであるか、または最大で約 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1×10^{13} 、 1×10^{14} 、 1×10^{15} 、 1×10^{16} 、 1×10^{17} 、および 1×10^{18} MOIである。場合によって、AAVおよび/または修飾AAVベクターは、約 1×10^5 、 2×10^5 、

10

20

30

40

50

3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 から、または細胞当たり最大で約 9×10^9 ゲノムコピー／ウイルス粒子の感染多重度(MOI)で、導入される。

【0493】

一部の態様では、非ウイルスベクターまたは核酸は、ウイルスを使用することなく送達され得、核酸の量に従って測定され得る。一般に、核酸の任意の適切な量が、本開示の組成物および方法と共に使用され得る。場合によって、核酸は、少なくとも約1 pg、10 pg、100 pg、1 pg、10 pg、100 pg、200 pg、300 pg、400 pg、500 pg、600 pg、700 pg、800 pg、900 pg、1 ng、10 ng、100 ng、200 ng、300 ng、400 ng、500 ng、600 ng、700 ng、800 ng、900 ng、10 mg、100 mg、200 mg、300 mg、400 mg、500 mg、600 mg、700 mg、800 mg、900 mg、1 g、2 g、3 g、4 g、または5 gであり得る。場合によって、核酸は、最大で約1 pg、10 pg、100 pg、1 pg、10 pg、100 pg、200 pg、300 pg、400 pg、500 pg、600 pg、700 pg、800 pg、900 pg、1 μg、10 μg、100 μg、200 μg、300 μg、400 μg、500 μg、600 μg、700 μg、800 μg、900 μg、1 ng、10 ng、100 ng、200 ng、300 ng、400 ng、500 ng、600 ng、700 ng、800 ng、900 ng、1 mg、10 mg、100 mg、200 mg、300 mg、400 mg、500 mg、600 mg、700 mg、800 mg、900 mg、1 g、2 g、3 g、4 g、または5 gであり得る。

【0494】

場合によって、ウイルス(AAVまたは修飾AAV)または非ウイルスベクターは、細胞または細胞の集団へと導入される。場合によって、細胞毒性は、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターが細胞または細胞の集団へと導入された後に測定される。場合によって、細胞毒性は、野生型AAVまたは非ウイルスベクター(例えば、ミニサークル)が、同等の細胞または同等の細胞の集団へと導入される場合より、修飾AAVベクターが使用される場合に低い。場合によって、細胞毒性は、フローサイトメトリーによって測定される。場合によって、細胞毒性は、野生型または非修飾AAVまたはミニサークルと比較して、修飾AAVが使用される場合、約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、12%、15%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、82%、85%、88%、90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくは100%、少なくともほぼこれらの比率、または最大でほぼこれらの比率だけ低減される。場合によって、細胞毒性は、ミニサークルベクターまたは非ウイルスベクターが使用される場合と比較して、AAVベクターが使用される場合、約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、12%、15%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、82%、85%、88%、90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくは100%、少なくともほぼこれらの比率、または最大でほぼこれらの比率だけ低減される。

【0495】

a. 機能的移植

移植前、移植後、および/または移植時における細胞(例えば、操作細胞または操作された初代T細胞)は、機能的であり得る。例えば、移植された細胞は、移植後、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、6、27、28、29、30

10

20

30

40

50

、40、50、60、70、80、90、もしくは100日間、または少なくともほぼこれらの期間にわたり機能的であり得る。移植された細胞は、移植後、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、もしくは12カ月間、または少なくともほぼこれらの期間にわたり機能的であり得る。移植された細胞は、移植後、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、もしくは30年間、または少なくともほぼこれらの期間にわたり機能的であり得る。場合によって、移植された細胞は、最長でレシピエントの生涯にわたり機能的であり得る。

【0496】

さらに、移植された細胞は、その意図される正常な働きの100%で機能し得る。移植された細胞はまた、その意図される正常な働きの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%でも機能し得る。

10

【0497】

移植された細胞はまた、その意図される正常な働きの100%を超えて機能し得る。例えば、移植された細胞は、その意図される正常な働きの110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1000%、またはそれよりも多く機能し得る。

20

【0498】

医薬組成物および医薬製剤

全体を通して記載される組成物は、医薬への製剤化であることが可能であり、それを必要とするヒトまたは哺乳動物であって、疾患、例えば、がんを伴うと診断されたヒトまたは哺乳動物を処置するのに使用することができる。これらの医薬は、1または複数のT細胞（例えば、操作T細胞）と共に、1または複数の化学療法剤または化学療法化合物と併せて、ヒトまたは哺乳動物へと投与することができる。

30

【0499】

本明細書で使用される「化学療法剤」または「化学療法化合物」およびこれらの文法的同等物は、がんの処置において有用な化合物であり得る。開示されるT細胞と組み合わせて使用され得るがん化学療法剤は、有糸分裂インヒビター（ビンカアルカロイド）を含むがこれらに限定されない。これらは、ビンクリスチン、ビンプラスチン、ビンデシン、およびNavelbine（商標）（ビノレルビン；5'-ノルアンヒドロプラスチン）を含む。さらに他の場合には、がん化学療法剤は、カンプトテシン化合物などのトポイソメラーゼIインヒビターを含む。本明細書で使用される「カンプトテシン化合物」は、Camptosar（商標）（イリノテカンHCL）、Hycamptin（商標）（トポテカンHCL）、ならびにカンプトテシンおよびその類似体に由来する他の化合物を含む。本明細書で開示される方法および組成物において使用され得るがん化学療法剤の別の類別は、エトポシド、テニポシド、およびミトポドジドなどのポドフィロトキシン誘導体である。本開示はさらに、アルキル化剤として公知の、他のがん化学療法剤であって、腫瘍細胞内の遺伝子素材をアルキル化するがん化学療法剤も包含する。これらは、限定なしに、シスプラチニン、シクロホスファミド、窒素マスター、トリメチレンチオホスホルアミド、カルムスチン、ブスルファン、クロラムブシル、ベルスチン、ウラシルマスター、クロマファジン、およびダカルバジンを含む。本開示は、化学療法剤としての代謝拮抗剤を包含する。これらの種類の薬剤の例は、シトシンアラビノシド、フルオロウラシル、メトレキサート、メルカプトプリン、アザチオプリン、およびプロカルバジンを含む。本明細書で開示される方法および組成物において使用され得るがん化学療法剤のさらなる類別は

40

50

、抗生物質を含む。例は、限定なしに、ドキソルビシン、ブレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ミトラマイシン、マイトイマイシン、マイトイマイシンC、およびダウノマイシンを含む。これらの化合物のために、多数のリポソーム製剤が市販されている。本開示はさらに、限定なしに、抗腫瘍抗体、ダカルバジン、アザシチジン、アムサクリン、メルファラン、イホスファミド、およびミトキサンtronを含む、他のがん化学療法剤も包含する。

【0500】

本明細書で開示されるT細胞は、細胞傷害剤／抗新生物剤および抗血管新生剤を含む、他の抗腫瘍剤と組み合わせて投与することができる。細胞傷害剤／抗新生物剤は、がん細胞を攻撃し、死滅させる薬剤と規定することができる。一部の細胞傷害剤／抗新生物剤は

10

、腫瘍細胞内の遺伝子素材をアルキル化するアルキル化剤、例えば、シスプラチン、シクロホスファミド、窒素マスター、トリメチレンチオホスホルアミド、カルムスチン、ブスルファン、クロラムブシル、ベルスチン、ウラシルマスター、クロマファジン、およびダカルバジン (d a c a b a z i n e) であり得る。他の細胞傷害剤／抗新生物剤は、腫瘍細胞のための代謝拮抗剤、例えば、シトシンアラビノシド、フルオロウラシル、メトレキサート、メルカプトプリン、アザチオプリン、およびプロカルバジンであり得る。他の細胞傷害剤／抗新生物剤は、抗生物質、例えば、ドキソルビシン、ブレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ミトラマイシン、マイトイマイシン、マイトイマイシンC、およびダウノマイシンであり得る。これらの化合物のために、多数のリポソーム製剤が市販されている。さらに他の細胞傷害剤／抗新生物剤は、有糸分裂インヒビター（ビンカアルカリオイド）であり得る。これらは、ビンクリスチン、ビンプラスチン、およびエトポシドを含む。種々の細胞傷害剤／抗新生物剤は、タキソールおよびその誘導体、L-アスパラギナーゼ、抗腫瘍抗体、ダカルバジン、アザシチジン、アムサクリン、メルファラン、VM-26、イホスファミド、ミトキサンtron、およびビンデシンを含む。

20

【0501】

抗血管新生剤もまた、使用することができる。開示される方法および組成物における使用に適する抗血管新生剤は、ヒト化抗体およびキメラ抗体を含む抗VEGF抗体、抗VEGFアプタマー、ならびにアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。他の血管新生インヒビターは、アンジオスタチン、エンドスタチン、インターフェロン、インターロイキン1（およびを含む）、インターロイキン12、レチノイン酸、ならびにTIMP-1およびTIMP-2 (tissue inhibitors of metalloproteinase-1およびtissue inhibitors of metalloproteinase-2) を含む。抗血管新生活性を伴うトポイソメラーゼIIインヒビターである、ラゾキサンなどのトポイソメラーゼインヒビターを含む低分子もまた使用することができる。

30

【0502】

開示されるT細胞と組み合わせて使用され得る他の抗がん剤は、アシビシン；アクラルビシン；アコダゾール塩酸塩；アクロニン；アドゼレシン；アデルスロイキン；アルトレタミン；アンボマイシン；アメタントロン酢酸塩；アミノグルテチミド；アムサクリン；アナストロゾール；アントラマイシン；アスパラギナーゼ；アスペルリン；アバスチン；アザシチジン；アゼテパ；アゾトマイシン；バチマstatt；ベンゾデパ；ビカルタミド；ビサントレン塩酸塩；ビスナフィドジメシレート；ビゼレシン；ブレオマイシン硫酸塩；ブレキナルナトリウム；ブロピリミン；ブスルファン；カクチノマイシン；カルステロン；カラセミド；カルベチマー；カルボプラチニン；カルムスチン；カルビシン塩酸塩；カルゼレシン；セデфинゴール；クロラムブシル；シロレマイシン；シスプラチニン；クラドリビン；メシル酸クリスナトール；シクロホスファミド；シタラビン；ダカルバジン；ダクチノマイシン；ダウノルビシン塩酸塩；デシタビン；デキソルマプラチニン；デザグアニン；メシル酸デザグアニン；ジアジコン；ドセタキセル；ドキソルビシン；ドキソルビシン塩酸塩；ドロロキシフェン；ドロロキシフェンクエン酸塩；プロピオン酸ドロモスタノロン；ズアゾマイシン；エダトレキサート；エフロルニチニン塩酸塩；エルサミトルシン

40

50

; エンロプラチン ; エンプロメート ; エピプロピジン ; エピルビシン塩酸塩 ; エルブロゾール ; エソルビシン塩酸塩 ; エストラムスチン ; エストラムスチンリン酸エステルナトリウム ; エタニダゾール ; エトポシド ; エトポシドリン酸塩 ; エトプリン ; ファドロゾール塩酸塩 ; ファザラビン ; フエンレチニド ; フロクスウリジン ; フルダラビンリン酸エステル ; フルオロウラシル ; フルロシタビン ; フオスキドン ; フォストリエシンナトリウム ; ゲムシタビン ; ゲムシタビン塩酸塩 ; ヒドロキシ尿素 ; イダルビシン塩酸塩 ; イホスファミド ; イルモフォシン ; インターロイキン I I (組換えインターロイキン I I または r I L 2 を含む) 、インターフェロンアルファ - 2 a ; インターフェロンアルファ - 2 b ; インターフェロンアルファ - n 1 ; インターフェロンアルファ - n 3 ; インターフェロンベータ - I a ; インターフェロンガンマ - I b ; イプロプラチン ; イリノテカン塩酸塩 ; ランレオチド酢酸塩 ; レトロゾール ; ロイプロリド酢酸塩 ; リアロゾール塩酸塩 ; ロメトレキソールナトリウム ; ロムスチン ; ロソキサントロン塩酸塩 ; マソプロコール ; メイタンシン ; メクロレタミン塩酸塩 ; メゲストロール酢酸塩 ; メレンゲストロール酢酸エステル ; メルファラン ; メノガリル ; メルカプトブリン ; メトトレキサート ; メトトレキサートナトリウム ; メトプリン ; メツレデパ ; ミチンドミド ; マイトカルシン ; マイトクロミン ; マイトギリン ; マイトマルシン ; マイトマイシン ; マitousペル ; ミトタン ; ミトキサントロン塩酸塩 ; ミコフェノール酸 ; ノコダゾール ; ノガラマイシン ; オルマプラチン ; オキシスラン ; パクリタキセル ; ペガスパルガーゼ ; ベリオマイシン ; ペンタムスチン ; ペプロマイシン硫酸塩 ; ペルホスファミド ; ピポプロマン ; ピポスルファン ; ピロキサントロン塩酸塩 ; プリカマイシン ; プロメスタン ; ポルフィマーナトリウム ; ポルフィロマイシン ; プレドニムスチン ; プロカルバジン塩酸塩 ; ピューロマイシン ; ピューロマイシン塩酸塩 ; ピラゾフリン ; リボブリン ; ログレチミド ; サフィンゴール ; サフィンゴール塩酸塩 ; セムスチン ; シムトラゼン ; スバルホセートナトリウム ; スバルソマイシン ; スピロゲルマニウム塩酸塩 ; スピロムスチン ; スピロプラチン ; ストレプトニグリン ; ストレプトゾシン ; スロフェヌル ; タリソマイシン ; テコガランナトリウム ; テガフル ; テロキサントロン塩酸塩 ; テモポルフィン ; テニポシド ; テロキシロン ; テストラクトン ; チアミプリン ; チオグアニン ; チオテパ ; チアゾフリン ; チラバザミン ; トレミフェンケン酸塩 ; 酢酸トレストロン ; リン酸トリシリビン ; トリメトレキサート ; グルクロン酸トリメトレキサート ; トリブトレリン ; ツブロゾール塩酸塩 ; ウラシルマスター ; ウレデパ ; バブレオチド ; ベルテポルフィン ; ビンプラスチン硫酸塩 ; ビンクリスチン硫酸塩 ; ビンデシン ; ビンデシン硫酸塩 ; ビネピジン硫酸塩 ; 硫酸ビングリシネット ; 硫酸ビンレウロシン ; ビノレルビン酒石酸塩 ; 硫酸ビンロシジン ; ビンゾリジン硫酸塩 ; ボロゾール ; ゼニプラチン ; ジノスタチン ; ゾルビシン塩酸塩を含むがこれらに限定されない。他の抗がん薬は、20 - epi - 1 , 25ジヒドロキシビタミン D 3 ; 5 - エチニルウラシル ; アビラテロン ; アクラルビシン ; アシルフルベン ; アデシペノール ; アドゼレシン ; アデルスロイキン ; A L L - T K アンタゴニスト ; アルトレタミン ; アンバムスチン ; アミドックス ; アミホスチン ; アミノレブリン酸 ; アムルビシン ; アムサクリン ; アナグレリド ; アナストロゾール ; アンドログラホリド ; 血管新生インヒビター ; アンタゴニスト D ; アンタゴニスト G ; アントラレリックス ; ADMP (anti - d o r s a l i z i n g morphogenetic protein) - 1 ; 前立腺癌用の抗アンドロゲン ; 抗エストロゲン ; 抗ネオプラスチック ; アンチセンスオリゴヌクレオチド ; アフィジコリングリシネット ; アポトーシス遺伝子モジュレーター ; アポトーシス調節剤 ; アプリン酸 ; ara - CDP - DL - PTBA ; アルギニンデアミナーゼ ; アスラクリン ; アタメスタン ; アトリムスチン ; アキシナスタチン 1 ; アキシナスタチン 2 ; アキシナスタチン 3 ; アザセトロン ; アザトキシン ; アザチロシン ; バッカチン I I I 誘導体 ; バラノール ; バチマstatt ; B C R / A B L アンタゴニスト ; ベンゾクロリン ; ベンゾイルスタウロスボリン ; ベータラクタム誘導体 ; ベータ - アレチン ; ベータクラマイシン B ; ベツリソ酸 ; bFGF インヒビター ; ビカルタミド ; ビサントレン ; ビサジリジニルスペルミン ; ビスナフィド ; ビストラテン A ; ビゼレシン ; ブレフレート ; ブロピリミン ; ブドチタン ; ブチオニンスルホキシミン ; カルシポトリオール ; カルホスチン C ; カンプトテシン

10

20

30

40

50

誘導体；カナリポックス I L - 2；カペシタビン；カルボキサミド-アミノ-トリアゾール；カルボキサミドトリアゾール；Carrest M3；CARN 700；軟骨由来インヒビター；カルゼレシン；カゼインキナーゼインヒビター(icos)；カスタノスペルミン；セクロピンB；セトロレリックス；クロリン；クロロキノキサリンスルホンアミド；シカプロスト；cis-ポルフィリン；クラドリビン；クロミフェン類似体；クロトリマゾール；コリスマイシンA；コリスマイシンB；コンプレタスタチンA4；コンプレタスタチン類似体；コナゲニン；クランベシジン816；クリスナトール；クリプトフィシン8；クリプトフィシンA誘導体；クラシンA；シクロペントアントラキノン；シクロプラタム；シベマイシン；シタラビンオクホスフェート；細胞溶解因子；サイトスタチン；ダクリキシマブ；デシタビン；デヒドロジデムニンB；デスロレリン；デキサメタゾン；デキシホスファミド；デキスラゾキサン；デクスペラパミル；ジアジコン；ジデムニンB；ジドックス；ジエチルノルスペルミン；ジヒドロ-5-アザシチジン；9-ジヒドロタキソール；ジオキサマイシン；ジフェニルスピロムスチン；ドセタキセル；ドコサノール；ドラセトロン；ドキシフルリジン；ドロロキシフェン；ドロナビノール；デュオカルマイシンSA；エプセレン；エコムスチン；エデルフォシン；エドレコロマブ；エフロルニチン；エレメン；エミテフル；エピルビシン；エプリステリド；エストラムスチン類似体；エストロゲンアゴニスト；エストロゲンアンタゴニスト；エタニダゾール；エトポシドリン酸塩；エキセメスタン；ファドロゾール；ファザラビン；フェンレチニド；フィルグラスチム；フィナステリド；フラボピリドール；フレゼラスチン；フルアステロン；フルダラビン；フルオロダウノルニシン塩酸塩；フォルフェニメックス；ホルメスタン；フォストリエシン；ホテムスチン；ガドリニウムテキサフィリン；硝酸ガリウム；ガロシタбин；ガニレリックス；ゼラチナーゼインヒビター；ゲムシタビン；グルタチオンインヒビター；ヘプスルファム；ヘレグリン；ヘキサメチレンビスアセトアミド；ヒペリシン；イバンドロン酸；イダルビシン；イドキシフェン；イドラマントン；イルモフォシン；イロマstattt；イミダゾアクリドン；イミキモド；免疫刺激ペプチド；インスリン様成長因子1受容体インヒビター；インターフェロンアゴニスト；インターフェロン；インターロイキン；イオベングアン；ヨードドキソルビシン；4-イボメアノール；イロプラクト；イルソグラジン；イソベンガゾール；イソホモハリコンドリンB；イタセトロン；ジャスプラキノリド；カハラリドF；ラメラリンNトリアセテート；ランレオチド；レイナマイシン；レノグラスチム；レンチナン硫酸塩；レプトルスタチン；レトロゾール；白血病阻害性因子；白血球アルファインターフェロン；ロイポロリド+エストロゲン+プロゲステロン；リュープロレリン；レバミゾール；リアロゾール；直鎖状ポリアミン類似体；親油性二糖ペプチド；親油性白金化合物；リソクリナミド7；ロバプラチン；ロンブリシン；ロメトレキソール；ロニダミン；ロソキサントロン；ロバスタチン；ロキソリビン；ルルトテカン；ルテチウムテキサフィリン；リソフィリン；溶解性ペプチド；メイタンシン；マンノスタチンA；マリマstattt；マソプロコール；マスピン；マトリリシンインヒビター；マトリックスマタロプロティナーゼインヒビター；メノガリル；メルバロン；メテレリン；メチオニナーゼ；メトクロプラミド；MIFインヒビター；ミフェブリストン；ミルテホシン；ミリモスチム；ミスマッチニ本鎖RNA；ミトグアゾン；ミトラクトール；マイトイシン類似体；ミトナファイド；マイトイシンである線維芽細胞成長因子-サボリン；ミトキサントロン；モファロテン；モルグラモスチム；ヒト絨毛性ゴナドトロピンに対するモノクローナル抗体；モノホスホリルリピドA+ミオバクテリウム細胞壁sk；モピダモール；多剤耐性遺伝子インヒビター；multiple tumor suppressor 1ベースの治療；マスターD系抗がん剤；ミカペロキシドB；マイコバクテリア細胞壁抽出物；ミリアポロン；N-アセチルジナリン；N置換ベンザミド；ナファレリン；ナグレスチップ；ナロキソン+ペンタゾシン；ナバピン；ナフェルピン；ナルトグラスチム；ネダプラチン；ネモルビシン；ネリドロン酸；中性エンドペプチダーゼ；ニルタミド；ニサマイシン；一酸化窒素モジュレーター；窒素酸化物による抗酸化剤；ニトルリン；O6-ベンジルグアニン；オクトレオチド；オキセノン；オリゴヌクレオチド；オナプリストン；オンダンセトロン；オンダンセトロン；オラシン；経口サイトカイ

10

20

30

40

50

ン誘導剤；オルマプラチン；オサテロン；オキサリプラチン；オキサウノマイシン；パクリタキセル；パクリタキセル類似体；パクリタキセル誘導体；パラウアミン；パルミトイ
ルリゾキシン；パミドロン酸；パナキシトリオール；パノミフェン；パラバクチン；パゼ
リブチン；ペガスパルガーゼ；ペルデシン；ポリ硫酸ペントサンナトリウム；ペントスタ
チン；ペントロゾール；ペルフルブロン；ペルホスファミド；ペリリルアルコール；フェ
ナジノマイシン；酢酸フェニル；ホスファターゼインヒビター；ピシバニール；ピロカル
ピン塩酸塩；ピラルビシン；ピリトレキシム；プラセチンA；プラセチンB；プラスミノ
ーゲンアクチベーターインヒビター；白金複合体；白金化合物；白金-トリアミン複合体
；ポルフィマーナトリウム；ポルフィロマイシン；プレドニゾン；プロピルビス-アクリ
ドン；プロスタグランジンJ2；プロテアソームインヒビター；プロテインAベースの免
疫モジュレーター；プロテインキナーゼCインヒビター；小型藻類のプロテインキナーゼ
Cインヒビター；プロテインチロシンホスファターゼインヒビター；プリンヌクレオシド
ホスホリラーゼインヒビター；ブルブリン；ピラゾロアクリジン；ピリドキシル化ヘモグ
ロビンポリオキシエチレンコンジュゲート；r a f アンタゴニスト；ラルチトレキセド；
ラ

10

モセトロン；r a s ファルネシルプロテイントランスフェラーゼインヒビター；r a s イ
ンヒビター；r a s - G A P インヒビター；脱メチル化レティリブチン；レニウム（R e 1
8 6 ）エチドロネート；リゾキシン；リボザイム；R I I レチナミド；ログレチミド；ロ
ヒツキン；ロムルチド；ロキニメックス；ルビジノンB1；ルボキシル；サフィンゴール
；サントピン；S a r C N U ；サルコフィトールA；サルグラモスチム；S d i 1 模倣
体；セムスチン；老齢由来インヒビター1；センスオリゴヌクレオチド；シグナル伝達イ
ンヒビター；シグナル伝達モジュレーター；単鎖抗原結合性タンパク質；シゾフィラン；
ソブゾキサン；ボロカプテートナトリウム；フェニル酢酸ナトリウム；ソルベロール；ソ
マトメジン結合性タンパク質；ソネルミン；スバルホス酸；スピカマイシンD；スピロム
スチン；スプレノベンチン；スponギスタチン1；スクアラミン；幹細胞インヒビター；
幹細胞分裂インヒビター；スチニアミド；ストロメリシンインヒビター；スルフィノシン
；過活動血管作動性腸管ペプチドアンタゴニスト；スラジスタ；スラミン；スワインソニ
ン；合成グリコサミノグリカン；タリムスチン；タモキシフェンメチオジド；タウロムス
チン；タザロテン；テコガランナトリウム；テガフル；テルラピリリウム；テロメラ
ーゼインヒビター；テモポルフィン；テモゾロミド；テニポシド；テトラクロロデカオキシ
ド；テトラゾミン；タリプラスチン；チロコラリン；トロンボポエチン；トロンボポエチ
ン模倣体；チマルファシン；チモポエチン受容体アゴニスト；チモトリナン；甲状腺刺激
性ホルモン；エチルエチオブルブリンすず；チラバザミン；チタノセンジクロリド；トプ
センチン；トレミフェン；全能性幹細胞因子；翻訳インヒビター；トレチノイン；トリア
セチルウリジン；トリシリビン；トリメトレキサート；トリプトレリン；トロピセトロン
；ツロステリド；チロシンキナーゼインヒビター；チルホスチン；U B C インヒビター；
ウベニメクス；尿生殖洞由来成長阻害因子；ウロキナーゼ受容体アンタゴニスト；バブレ
オチド；バリオリンB；赤血球遺伝子治療のためのベクター系；ベラレソール；ベラミン
；ベルジン；ベルテポルフィン；ビノレルビン；ビンキサルチン；ビタキシン；ボロゾ
ル；ザノテロン；ゼニプラチン；ジラスコルブ；およびジノスタチスマラマーを含む
がこれらに限定されない。場合によって、抗がん薬は、5 - フルオロウラシル、タキソ
ル、またはロイコボリンである。

20

【 0 5 0 3 】
場合によって、例えば、がんを処置する組成物、製剤、および方法において、投与され
る組成物または製剤の単位投与量は、5、10、15、20、25、30、35、40、
45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100 m
g であり得る。場合によって、投与される組成物または製剤の総量は、0 . 1、0 . 2、
0 . 3、0 . 4、0 . 5、0 . 6、0 . 7、0 . 8、0 . 9、1、1 . 5、2、2 . 5、
30

40

50

3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90、または100gであり得る。

【0504】

場合によって、本開示は、T細胞を含む医薬組成物であって、単独で、または薬学的に許容される担体または賦形剤と併せて、任意の経路により投与され得る医薬組成物を提供するが、このような投与は、単回投与および複数回投与の両方で実行することができる。より特定すると、医薬組成物は、多様な薬学的に許容される不活性の担体であって、錠剤、カプセル、薬用ドロップ、トローチ、ハンドキャンディー、粉剤、スプレー、水性懸濁液、注射用溶液、エリキシル剤、シロップなどの形態の担体と組み合わせることができる。このような担体は、固体の希釈剤または充填剤、滅菌水性媒体、および多様な非毒性有機溶媒などを含む。さらに、このような経口医薬製剤は、このような目的で一般に利用される多様な種類の薬剤により、適切に甘味および/または芳香添加することができる。

【0505】

例えば、細胞は、患者へと、任意の数の妥当な処置モダリティーアドアで、抗ウイルス療法であるシドフォビルおよびインターロイキン2またはシタラビン（ARA-Cとしてもまた公知である）などの薬剤による処置を含むがこれらに限定されないモダリティーと共に（例えば、これらの前に、これらと同時に、またはこれらの後で）投与することができる。場合によって、操作細胞は、化学療法、放射線、シクロスボリンなどの免疫抑制剤、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノレート、およびFK506、抗体、またはCAMPATHなど、他の免疫除去剤、抗CD3抗体または他の抗体療法、細胞毒素（cytotoxin）、フルダラビン、シクロスボリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸（mycophenolic acid）、ステロイド、FR901228、サイトカイン、および放射線照射と組み合わせて使用することができる。操作細胞組成物はまた、患者へと、骨髄移植、フルダラビンなどの化学療法剤、外部ビーム放射線療法（XRT）、シクロホスファミド、またはOKT3もしくはCAMPATHなどの抗体を使用するT細胞除去療法と共に（例えば、これらの前に、これらと同時に、またはこれらの後で）投与することもできる。場合によって、本開示の操作細胞組成物は、CD20と反応する薬剤、例えば、RituxanなどのB細胞除去療法の後で投与することができる。例えば、対象は、高用量化学療法による標準的な処置に続き、末梢血幹細胞移植を経る場合がある。ある特定の場合には、移植後、対象は、本開示の操作細胞、例えば、拡大された操作細胞の注入を受けることができる。加えて、拡大された操作細胞は、手術の前に投与することもでき、手術の後で投与することもできる。本開示の特定の態様では、それを必要とする患者を、宿主対移植片（HvG）拒絶および移植片対宿主病（GvHD）に対して処置するために、本明細書で記載される方法のうちのいずれか1つにより得られる操作細胞を使用することができる。したがって、それを必要とする患者を、宿主対移植片（HvG）拒絶および移植片対宿主病（GvHD）に対して処置する方法であって、患者へと、有効量の操作細胞であり、不活性TCRアルファ遺伝子および/または不活性TCRベータ遺伝子を含む操作細胞を投与することにより患者を処置するステップを含む方法が想定される。

【0506】

使用法

細胞は、本明細書で記載される通り、ヒトから抽出することができる。細胞は、*ex vivo*において遺伝子的に変化し、状況に応じて使用することができる。これらの細胞は、細胞ベースの治療のために使用することができる。これらの細胞を使用して、レシピエント（例えば、ヒト）における疾患を処置することができる。例えば、これらの細胞を使用して、がんを処置することができる。

【0507】

本明細書では、レシピエントにおける疾患（例えば、がん）を処置する方法であって、レシピエントへの、操作細胞を含む、1または複数の細胞（臓器および/または組織を含

10

20

30

40

50

む)の移植を含む方法について記載される。細胞内ゲノム移植により調製される細胞を使用して、がんを処置することができる。

【 0 5 0 8 】

本明細書では、レシピエントにおける疾患（例えば、がん）を処置する方法であって、レシピエントへの、操作細胞を含む、1または複数の細胞（臓器および／または組織を含む）の移植を含む方法について記載される。場合によって、細胞 5×10^{10} 個を、患者へと投与する。他の場合には、細胞 5×10^{11} 個を、患者へと投与する。

【 0 5 0 9 】

場合によって、細胞約 5×10^{10} 個を、対象へと投与する。場合によって、細胞約 5×10^{10} 個は、対象へと投与される細胞の量の中央値を表す。場合によって、細胞約 5×10^{10} 個は、対象において、治療応答をもたらすのに必要である。場合によって、細胞少なくとも約 1×10^7 個、細胞少なくとも約 2×10^7 個、細胞少なくとも約 3×10^7 個、細胞少なくとも約 4×10^7 個、細胞少なくとも約 5×10^7 個、細胞少なくとも約 6×10^7 個、細胞少なくとも約 6×10^7 個、細胞少なくとも約 8×10^7 個、細胞少なくとも約 9×10^7 個、細胞少なくとも約 1×10^8 個、細胞少なくとも約 2×10^8 個、細胞少なくとも約 3×10^8 個、細胞少なくとも約 4×10^8 個、細胞少なくとも約 5×10^8 個、細胞少なくとも約 6×10^8 個、細胞少なくとも約 6×10^8 個、細胞少なくとも約 8×10^8 個、細胞少なくとも約 9×10^8 個、細胞少なくとも約 1×10^9 個、細胞少なくとも約 2×10^9 個、細胞少なくとも約 3×10^9 個、細胞少なくとも約 4×10^9 個、細胞少なくとも約 5×10^9 個、細胞少なくとも約 6×10^9 個、細胞少なくとも約 6×10^9 個、細胞少なくとも約 9×10^9 個、細胞少なくとも約 1×10^{10} 個、細胞少なくとも約 2×10^{10} 個、細胞少なくとも約 3×10^{10} 個、細胞少なくとも約 4×10^{10} 個、細胞少なくとも約 5×10^{10} 個、細胞少なくとも約 6×10^{10} 個、細胞少なくとも約 6×10^{10} 個、細胞少なくとも約 8×10^{10} 個、細胞少なくとも約 9×10^{10} 個、細胞少なくとも約 1×10^{11} 個、細胞少なくとも約 2×10^{11} 個、細胞少なくとも約 3×10^{11} 個、細胞少なくとも約 4×10^{11} 個、細胞少なくとも約 5×10^{11} 個、細胞少なくとも約 6×10^{11} 個、細胞少なくとも約 6×10^{11} 個、細胞少なくとも約 9×10^{11} 個、または細胞少なくとも約 1×10^{12} 個である。例えば、細胞約 5×10^{10} 個を、対象へと投与することができる。別の例では、細胞 3×10^6 個で始めて、細胞を、細胞約 5×10^{10} 個へと拡大し、対象へと投与することができる。場合によって、細胞は、治療に十分な数へと拡大する。例えば、細胞 5×10^7 個は急速な拡大を経て、治療的使用に十分な数を作製することができる。場合によって、治療的使用に十分な数は、 5×10^{10} 個であり得る。任意の数の細胞を、治療的使用のために注入することができる。例えば、患者に、端点を含む、 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^{12}$ 個の間の数の細胞を注入することができる。患者に、患者のために作製し得るだけの数の細胞を注入することができる。場合によって、患者へと注入される細胞は、全てが操作細胞であるわけではない。例えば、患者へと注入される細胞のうちの、少なくとも90%は、操作細胞であり得る。他の場合には、患者へと注入される細胞のうちの、少なくとも40%は、操作細胞であり得る。

【 0 5 1 0 】

も約30%、少なくとも約25%、少なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%は、生細胞である。一部の場合、対象において治療的応答をもたらすために、対象へと投与される細胞は、細胞ゲノムへの、1または複数のトランス遺伝子の組込みに成功した細胞であり得る。場合によって、対象において治療的応答をもたらすために、細胞のうちの、少なくとも約95%、少なくとも約90%、少なくとも約85%、少なくとも約80%、少なくとも約75%、少なくとも約70%、少なくとも約65%、少なくとも約60%、少なくとも約55%、少なくとも約50%、少なくとも約45%、少なくとも約40%、少なくとも約35%、少なくとも約30%、少なくとも約25%、少なくとも約20%、少なくとも約15%、少なくとも約10%は、細胞ゲノムへの、1または複数のトランス遺伝子の組込みに成功している。

10

【0511】

本明細書で開示される方法を、がん、心血管疾患、肺疾患、肝臓疾患、皮膚疾患、または神経疾患を含むがこれらに限定されない疾患を処置または予防するために使用することができる。

【0512】

移植は、任意の種類の移植による移植であり得る。部位は、肝臓被膜下腔、脾臓被膜下腔、腎臓被膜下腔、網、胃または腸粘膜下層、小腸の血管セグメント、静脈嚢、精巣、脳、脾臓、または角膜を含み得るがこれらに限定されない。例えば、移植は、被膜下移植であり得る。移植はまた、筋内移植でもあり得る。移植は、門脈内移植であり得る。

20

【0513】

移植は、ヒトに由来する1または複数の細胞の移植であり得る。例えば、1または複数の細胞は、脳、心臓、肺、眼、胃、膵臓、腎臓、肝臓、腸、子宮、膀胱、皮膚、毛髪、爪、耳、腺、鼻、口腔、口唇、脾臓、歯茎、歯、舌、唾液腺、扁桃腺、咽頭、食道、大腸、小腸、直腸、肛門、甲状腺、胸腺、骨、軟骨、腱、韌帯、腎上体、骨格筋、平滑筋、血管、血液、脊髄、気管、尿管、尿道、視床下部、下垂体、幽門、副腎、卵巣、卵管、子宮、膣、乳腺、精巣、精嚢、陰茎、リンパ、リンパ節、またはリンパ管であり得る臓器に由来し得る。1または複数の細胞はまた、脳、心臓、肝臓、皮膚、腸、肺、腎臓、眼、小腸、または膵臓にも由来し得る。1または複数の細胞は、膵臓、腎臓、眼、肝臓、小腸、肺、または心臓に由来し得る。1または複数の細胞は、膵臓に由来し得る。1または複数の細胞は、膵島細胞、例えば、膵細胞であり得る。1または複数の細胞は、末梢血単核細胞(PBMC)、リンパ球、単球、またはマクロファージなど、任意の血液細胞であり得る。1または複数の細胞は、リンパ球、B細胞、またはT細胞など、任意の免疫細胞であり得る。

30

【0514】

本明細書で開示される方法はまた、1または複数の細胞を移植するステップも含むことが可能であり、この場合、1または複数の細胞は、任意の細胞型であり得る。例えば、1または複数の細胞は、上皮細胞、線維芽細胞、神経細胞、角化細胞、造血系細胞、メラニン細胞、軟骨細胞、リンパ球(Bリンパ球およびTリンパ球)、マクロファージ、単球、単核細胞、心筋細胞(cardiac muscle cell)、他の筋肉細胞、顆粒膜細胞、卵丘細胞、表皮細胞、内皮細胞、膵島細胞、血液細胞、血液前駆体細胞、骨細胞、骨前駆体細胞、神経幹細胞、始原幹細胞、肝細胞、角化細胞、臍帯静脈内皮細胞、大動脈内皮細胞、細小血管内皮細胞、線維芽細胞、肝星細胞、大動脈平滑筋細胞、心筋細胞(cardiac myocyte)、ニューロン、クッパー細胞、平滑筋細胞、シュワン細胞、および上皮細胞、赤血球、血小板、好中球、リンパ球、単球、好酸球、好塩基球、脂肪細胞、軟骨細胞、膵島細胞、甲状腺細胞、副甲状腺細胞、耳下腺細胞、腫瘍細胞、グリア細胞、星状細胞、赤血球、白血球、マクロファージ、上皮細胞、体細胞、下垂体細胞、副腎細胞、毛髪細胞、膀胱細胞、腎細胞、網膜細胞、杆体細胞、錐体細胞、心臓細胞、ペースメーカー細胞、脾臓細胞、抗原提示細胞、メモリー細胞、T細胞、B細胞、形質細胞、筋肉細胞、卵巣細胞、子宮細胞、前立腺細胞、腔上皮細胞、精子細胞、精巣細胞、胚細胞、卵細胞、ライディッヒ細胞、精管周囲細胞、セルトリ細胞、黄体細胞、子宮頸部細

40

50

胞、子宮内膜細胞、乳腺細胞、濾胞細胞、粘膜細胞、纖毛細胞、非角化上皮細胞、角化上皮細胞、肺細胞、杯細胞、円柱上皮細胞、ドーパミン作動性 (dopameric) 細胞、扁平上皮上皮細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、ドーパミン作動性細胞、胚性幹細胞、線維芽細胞、および胎児線維芽細胞であり得る。さらに、1または複数の細胞は、膵島細胞および/または膵細胞、膵細胞、膵細胞、膵F細胞(例えば、PP細胞)、もしくは膵細胞を含むがこれらに限定されない細胞クラスターなどであり得る。1つの場合には、1または複数の細胞は、膵細胞であり得る。別の場合には、1または複数の細胞は、膵細胞であり得る。

【0515】

ドナーは、胎児、新生児、若齢者、および成年者を含むがこれらに限定されない、任意の発生段階にあり得る。例えば、ドナーティ細胞は、成体ヒトから単離することができる。ドナーヒトT細胞は、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1歳未満であり得る。例えば、T細胞は、6歳未満のヒトから単離することができる。T細胞はまた、3歳未満のヒトから単離することもできる。ドナーは、10歳より高齢であり得る。

10

【0516】

a. 移植

本明細書で開示される方法は、移植を含み得る。移植は、自家移植、同種移植、異種移植、または他の任意の移植であり得る。例えば、移植は、異種移植であり得る。移植はまた、同種移植もあり得る。

20

【0517】

本明細書で使用される「異種移植 (xenotransplantation)」およびその文法的同等物は、細胞、組織、または臓器の、レシピエントへの、移植、植込み、または注入を伴う任意の手順であって、レシピエントとドナーとが異なる種である手順を包含し得る。本明細書で記載される、細胞、臓器、および/または組織の移植は、ヒトへの異種移植 (xenotransplantation)のために使用することができる。異種移植 (xenotransplantation)は、血管化異種移植 (xenotransplant)、部分血管化異種移植 (xenotransplant)、非血管化異種移植 (xenotransplant)、異種ドレッシング、異種バンデッジ、および異種構造を含むがこれらに限定されない。

30

【0518】

本明細書で使用される「同種移植 (allograft transplantation)」およびその文法的同等物(例えば、同種移植 (allogenic transplantation))は、細胞、組織、または臓器の、レシピエントへの、移植、植込み、または注入を伴う任意の手順であって、レシピエントとドナーとが同じ種であるが異なる個体である手順を包含し得る。本明細書で記載される、細胞、臓器、および/または組織の移植は、ヒトへの同種移植 (allograft transplantation)のために使用することができる。同種移植 (allograft transplantation)は、血管化同種移植 (allograft)、部分血管化同種移植 (allograft)、非血管化同種移植 (allograft)、同種ドレッシング、同種バンデッジ、および同種構造を含むがこれらに限定されない。

40

【0519】

本明細書で使用される「自家移植 (autotransplantation)」およびその文法的同等物(例えば、自家移植 (autologous transplantation))は、細胞、組織、または臓器の、レシピエントへの、移植、植込み、または注入を伴う任意の手順であって、レシピエントとドナーとが同じ個体である手順を包含し得る。本明細書で記載される、細胞、臓器、および/または組織の移植は、ヒトへの自家移植 (autotransplantation)のために使用することができる。自家移植 (autotransplantation)は、血管化自家移植 (autotransplantation)、部分血管化自家移植 (autotransplantation)、非血管化自家移植 (autotransplantation)、自家ドレ

50

ッシング、自家バンデッジ、および自家構造を含むがこれらに限定されない。

【0520】

処置（例えば、本明細書で開示される処置のうちのいずれか）の後、移植片拒絶は、1または複数の野生型細胞を、レシピエントへと移植する場合と比較して、改善され得る。例えば、移植片拒絶は、超急性拒絶であり得る。移植片拒絶はまた、急性拒絶でもあり得る。他の種類の拒絶は、慢性拒絶を含み得る。移植片拒絶はまた、細胞を媒介する拒絶またはT細胞を媒介する拒絶でもあり得る。移植片拒絶はまた、ナチュラルキラー細胞を媒介する拒絶でもあり得る。

【0521】

本明細書で使用される「～を改善すること」およびその文法的同等物は、当業者により認識される、任意の改善を意味し得る。例えば、移植の改善とは、超急性拒絶の減少であって、所望されない影響または症状の減殺、減少、または減弱を包含し得る減少を意味し得る。

10

【0522】

移植後、移植された細胞は、レシピエントにおいて機能的であり得る。機能性は、場合によって、移植が成功したのかどうかを決定し得る。例えば、移植された細胞は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10日間、もしくはそれよりも多い期間、または少なくともほぼこれらの期間にわたり機能的であり得る。これは、移植が成功したことを探し示し得る。これはまた、移植された細胞、組織、および／または臓器の拒絶が、見られないことも探し示す。

20

【0523】

ある特定の場合には、移植された細胞は、少なくとも1日間にわたり機能的であり得る。移植された細胞はまた、少なくとも7日間にわたり機能的でもあり得る。移植された細胞は、少なくとも14日間にわたり機能的であり得る。移植された細胞は、少なくとも21日間にわたり機能的であり得る。移植された細胞は、少なくとも28日間にわたり機能的であり得る。移植された細胞は、少なくとも60日間にわたり機能的であり得る。

【0524】

移植の成功的別の指標は、レシピエントが免疫抑制療法を要求しない日数であり得る。例えば、本明細書で提供される処置（例えば、移植）の後、レシピエントは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10日間、もしくはそれよりも多い期間、または少なくともほぼこれらの期間にわたり、免疫抑制療法を要求しなくてもよい。これは、移植が成功したことを探し示し得る。これはまた、移植された細胞、組織、および／または臓器の拒絶が、見られないことも探し示す。

30

【0525】

場合によって、レシピエントは、少なくとも1日間にわたり、免疫抑制療法を要求しなくてもよい。レシピエントはまた、少なくとも7日間にわたり、免疫抑制療法を要求しなくてもよい。レシピエントは、少なくとも14日間にわたり、免疫抑制療法を要求しなくてもよい。レシピエントは、少なくとも21日間にわたり、免疫抑制療法を要求しなくてもよい。レシピエントは、少なくとも28日間にわたり、免疫抑制療法を要求しなくてもよい。レシピエントは、少なくとも60日間にわたり、免疫抑制療法を要求しなくてもよい。さらに、レシピエントは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10年間、またはそれよりも多い期間にわたり、免疫抑制療法を要求しなくてもよい。

40

【0526】

移植の成功的別の指標は、レシピエントが、低減された免疫抑制療法を要求する日数であり得る。例えば、本明細書で提供される処置の後、レシピエントは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10日間、またはそれよりも多い期間にわたり、低減された免疫抑制療法を要求する場合がある。これは、移植が成功したことを探し示し得る。これはまた、移植された細胞、組織、および／または臓器の拒絶が、見られないか、または見られても最小限であることを探し示し得る。

【0527】

50

場合によって、レシピエントは、少なくとも 1 日間にわたり、免疫抑制療法を要求しなくてよい。レシピエントはまた、少なくともまたは少なくとも約 7 日間にわたり、免疫抑制療法を要求しなくてよい。レシピエントは、少なくともまたは少なくとも約 14 日間にわたり、免疫抑制療法を要求しなくてよい。レシピエントは、少なくともまたは少なくとも約 21 日間にわたり、免疫抑制療法を要求しなくてよい。レシピエントは、少なくともまたは少なくとも約 28 日間にわたり、免疫抑制療法を要求しなくてよい。レシピエントは、少なくともまたは少なくとも約 60 日間にわたり、免疫抑制療法を要求しなくてよい。さらに、レシピエントは、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 年間、もしくはそれよりも多い期間、または少なくともほぼこれらの期間にわたり、免疫抑制療法を要求しなくてよい。

10

【0528】

移植の成功の別の指標は、レシピエントが、低減された免疫抑制療法を要求する日数であり得る。例えば、本明細書で提供される処置の後、レシピエントは、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 日間、もしくはそれよりも多い期間、または少なくともほぼこれらの期間にわたり、低減された免疫抑制療法を要求する場合がある。これは、移植が成功したことを指し示し得る。これはまた、移植された細胞、組織、および／または臓器の拒絶が、見られないか、または見られても最小限であることも指し示し得る。

【0529】

本明細書で使用される「低減された」およびその文法的同等物は、1 または複数の野生型細胞を、レシピエントへと移植する場合に要求される免疫抑制療法と比較して、低用量の免疫抑制療法を指す場合がある。

20

【0530】

免疫抑制療法は、免疫系を抑制する任意の処置をさらに含み得る。免疫抑制療法は、レシピエントにおける移植片拒絶を軽減するか、最小化するか、または消失させる一助となりうる。例えば、免疫抑制療法は、免疫抑制薬を含み得る。移植前、移植時、および／または移植後に使用され得る免疫抑制薬は、MMF (ミコフェノール酸モフェチル (C e l l c e p t))、ATG (抗胸腺細胞グロブリン)、抗CD154 (CD40L)、抗CD40 (2C10、ASKP1240、CCFZ533X2201)、アレムツズマブ (Campath)、抗CD20 (リツキシマブ)、抗IL-6R抗体 (トリリズマブ；Actemra)、抗IL-6抗体 (サリルマブ、オロキズマブ)、CTLA4-Ig (Abatacept / Orenca)、ベラタセプト (LEA29Y)、シロリムス (Rapimune)、エベロリムス、タクロリムス (Prograf)、ダクリズマブ (Zenapax)、バシリキシマブ (Simulect)、インフリキシマブ (Remicade)、シクロスボリン、デオキシスパガリン、可溶性補体受容体 1、コブラ毒因子、コンプスタチン、抗C5抗体 (エクリズマブ / Soliris)、メチルプレドニゾロン、FTY720、エベロリムス、レフルノミド、抗IL-2R-Ab、ラバマイシン、抗CXCR3抗体、抗ICOS抗体、抗OX40抗体、および抗CD122抗体を含むがこれらに限定されない。さらに、1つまたは1つを超える免疫抑制剤／薬物を、併せて使用することもでき、逐次的に使用することもできる。1つまたは1つを超える免疫抑制剤／薬物は、誘導療法のために使用することもでき、維持療法のために使用することもできる。同じ薬物または異なる薬物を、誘導期に使用することもでき、維持期に使用することもできる。場合によって、ダクリズマブ (Zenapax) は、誘導療法のために使用することができ、タクロリムス (Prograf) およびシロリムス (Rapimune) は、維持療法のために使用することができる。ダクリズマブ (Zenapax) はまた、誘導療法のために使用することもでき、低用量タクロリムス (Prograf) および低用量シロリムス (Rapimune) は、維持療法のために使用することができる。免疫抑制はまた、全身放射線照射、胸腺放射線照射、ならびに脾臓全摘出および／または脾臓部分摘出を含むがこれらに限定されない非薬物レジメンを使用して達成することもできる。これらの技法はまた、1 または複数の免疫抑制薬と組み合わせて使用することもできる。

30

40

50

【実施例】

【0531】

(実施例1)

種々の核酸送達プラットフォームのトランスフェクション効率の決定

Leukopakからの末梢血単核細胞(PBMC)の単離

本実施例では、正常末梢血から回収された、Leukopakを使用した。血液細胞を、冷却した1倍濃度のPBSで、3対1に希釈した。希釈した血液を、50mLの三角フラスコ内の15mLのLYMPHOPREP(Stem Cell Technologies)上に、滴下により(例えば、極めてゆっくりと)添加した。細胞を、ブレーキなし、400×Gで、25分間にわたりスピinnした。バフィーコートを、ゆっくりと除去し、滅菌三角フラスコに入れた。細胞を、冷却した1倍濃度のPBSで洗浄し、400×Gで、10分間にわたりスピinnした。上清を除去し、細胞を、培地中に再懸濁させ、カウントし、凍結培地(45mLの熱不活化FBSおよび5mLのDMSO)中で、生存可能な状態で凍結させた。

10

【0532】

CD3+T細胞の単離

PBMCを融解させ、培養培地(RPMI-1640(フェノールレッドを伴わない)、20%のFBS(熱不活化させた)、および1倍濃度のGluta-MAX)中、1~2時間にわたり播種した。細胞を回収し、カウントし、細胞密度を、 5×10^7 個/mLへと調整し、14mLの滅菌ポリスチレン丸底試験管へと移した。EasySep Human CD3 cell Isolation Kit(Stem Cell Technologies)を使用して、50uL/mLのIsolation Cocktailを、細胞へと添加した。混合物を、ピペットイングにより混合し、室温で5分間にわたりインキュベートした。インキュベーション後、RapidSpheresを、30秒間にわたりボルテックスし、50uL/mLで、試料へと添加し、ピペットイングにより混合した。混合物を、4mL未満の試料について、5mLまで満たすか、または4mLを超える試料について、10mLまで満たした。滅菌ポリスチレン試験管を、「Big Easy」磁石へと添加し、室温で3分間にわたりインキュベートした。磁石および試験管を、滑らかな動きで倒立させ、濃縮された細胞懸濁液を、未使用の滅菌試験管へと注ぎ込んだ。

20

30

【0533】

CD3+T細胞の活性化および刺激

単離されたCD3+T細胞をカウントし、24ウェルプレート内、細胞 2×10^6 個/mLの密度で播種した。Dynamagnetを使用して、0.2%BSAを伴う、1倍濃度のPBSで洗浄した後、Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 beads(Gibco, Life Technologies)を、3:1(ビーズ:細胞)で、細胞へと添加した。IL-2(Peprotech)を、300IU/mLの濃度で添加した。細胞を、48時間にわたりインキュベートし、次いで、Dynamagnetを使用して、ビーズを除去した。細胞を、電気穿孔または又クレオフェクションに先立って、さらに6~12時間にわたり培養した。

40

【0534】

CD3+T細胞のAmaxaトランスフェクション

Amaxa Human T Cell Nucleofector Kit(Lonza, Switzerland)を使用して、非刺激T細胞または刺激T細胞に又クレオフェクトした(図82Aおよび図82B)。細胞をカウントし、室温のAmaxa緩衝液100uL中に、細胞 $1 \sim 8 \times 10^6$ 個の密度で再懸濁させた。1~15ugのmRNAまたはプラスミドを、細胞混合物へと添加した。U-014プログラムを使用して、細胞を又クレオフェクトした。又クレオフェクション後、細胞を、6ウェルプレート内の培養培地2mL中に播種した。

40

【0535】

50

CD3+ T細胞のNeonトランスフェクション

Neon Transfection System (10 uL Kit, Invitrogen, Life Technologies) を使用して、非刺激T細胞または刺激T細胞に電気穿孔した。細胞をカウントし、10 uLのT緩衝液中に、細胞 2×10^5 個の密度で再懸濁させた。1 ug の GFP プラスミドまたは mRNA または 1 ug の Cas9 および 1 ug の gRNA プラスミドを、細胞混合物へと添加した。細胞に、1400 V、10 ミリ秒間ずつ、3つのパルスで電気穿孔した。トランスフェクション後、細胞を、48 ウェルプレート内の培養培地 200 uL 中に播種した。

【0536】

リポフェクションによる、CD3+ T細胞への、RNAおよびプラスミドDNAのトランスフェクション

非刺激T細胞を、24 ウェルプレート内、1 mL 当たり細胞 5×10^5 個の密度で播種した。RNA トランスフェクションのために、製造元のプロトコールに従い、TransIT-mRNA Transfection Kit (Mirus Bio) を使用して、T細胞に、500 ng の mRNA をトランスフェクトした。プラスミドDNAのトランスフェクションのために、製造元のプロトコールに従い、TransIT-X2 Dynamic Delivery System (Mirus Bio) を使用して、T細胞に、500 ng のプラスミドDNAをトランスフェクトした。細胞を、37 度 48 時間にわたりインキュベートしてから、フローサイトメトリーで解析した。

【0537】

CD3+ T細胞による、金ナノ粒子である Smart Flare の取り込み

非刺激T細胞または刺激T細胞を、培養培地 200 uL 中の 48 ウェルプレート内ウェル 1 つ当たり細胞 $1 \sim 2 \times 10^5$ 個の密度で播種した。Cy5 または Cy3 (Millipore, Germany) へと複合体化させた金ナノ粒子である、Smart Flare を、30 秒間にわたりボルテックスしてから、細胞へと添加した。1 uL の金ナノ粒子である Smart Flared を、各ウェルの細胞へと添加した。プレートを、1 分間にわたりロッキングし、37 度 24 時間にわたりインキュベートしてから、フローサイトメトリーにより、Cy5 または Cy3 の発現について解析した。

【0538】

フローサイトメトリー

電気穿孔およびヌクレオフェクトされたT細胞を、トランスフェクションの 24 ~ 48 時間後、フローサイトメトリーにより、GFP の発現について解析した。0.5% FBS を伴う、1倍濃度の冷却 PBS で洗浄することにより、細胞を調製し、APC anti-human CD3 (eBiosciences, San Diego) および Fixable Viability Dye eFlour 780 (eBiosciences, San Diego) で染色した。細胞は、LSR II (BD Biosciences, San Jose) および FlowJo v.9 を使用して解析した。

【0539】

結果

表 2 に示す通り、4つの例示的なトランスフェクションプラットフォームを使用して、細胞とDNA / RNAとの合計 6 つの組合せについて調べた。細胞とDNA / RNAとの 6 つの組合せは、EGFP プラスミドDNAの、非刺激 PBMC への添加；EGFP プラスミドDNAの、非刺激 T 細胞への添加；EGFP プラスミドDNAの、刺激 T 細胞への添加；EGFP mRNA の、非刺激 PBMC への添加；EGFP mRNA の、非刺激 T 細胞への添加；および EGFP mRNA の、刺激 T 細胞への添加であった。4つの例示的なトランスフェクションプラットフォームは、AMAXA ヌクレオフェクション、NEON 電気穿孔、脂質ベースのトランスフェクション、および金ナノ粒子の送達であった。種々の条件下における、トランスフェクション効率(トランスフェクト細胞の%)結果を、表 1 に列挙するが、AMAXA プラットフォームを使用して、mRNA の、刺激 T 細胞への添加が、最高の効率をもたらした。

10

20

30

40

50

【表2】

表2. 多様な核酸送達プラットフォームのトランスフェクション効率

核酸送達プラットフォーム					
細胞型	DNA または RNA	Amaxa	NEON	脂質ベース	金ナノ粒子
PBMC にロード (非刺激)	EGFP プラスミド	8.1% (CD3 T 細胞)			
T 細胞にロード (非刺激)	EGFP プラスミド	28.70%	>0.1%	>0.1% (DNA)	>0.1% (RNA) 54.8%の Cy5 陽性
T 細胞にロード (刺激、 CD3/CD28)	EGFP プラスミド		32.10%	>0.1% (DNA)	>0.1% (RNA)
PBMC にロード (非刺激)	EGFP mRNA	28.1% (CD3 T 細胞)			
T 細胞にロード (非刺激)	EGFP mRNA	29.80%			
T 細胞にロード (刺激、 CD3/CD28)	EGFP mRNA	90.30%	81.40%		29.1%の Cy5 陽性

【0540】

将来的には、類似の方法を使用して、エクソソームを媒介するトランスフェクションを含む、他のトランスフェクション条件についても調べる。加えて、また、類似の方法を使用して、DNA Cas9 / DNA gRNA、mRNA Cas9 / DNA gRNA、タンパク質Cas9 / DNA gRNA、DNA Cas9 / gRNA のPCR 産物、DNA Cas9 / gRNA のPCR 産物、mRNA Cas9 / gRNA のPCR 産物、タンパク質Cas9 / gRNA のPCR 産物、DNA Cas9 / 修飾gRNA、mRNA Cas9 / 修飾gRNA、およびタンパク質Cas9 / 修飾gRNA を含む他の送達組合せについても調べる。本明細書で開示される方法では、送達効率の高い組合せを使用することができる。

【0541】

(実施例2)

T細胞内の、GFP プラスミドのトランスフェクション効率の決定

GFP プラスミドを使用する、Amaxa ヌクレオフェクションによる、初代 T 細胞のトランスフェクション効率である。図4は、この実験のために調製された4つのプラスミド：Cas9 ヌクレアーゼプラスミド、Hprt gRNA プラスミド（ヒト Hprt 遺伝子をターゲティングする CRISPR gRNA）、Amaxa EGFPmax プラスミド、および Hprt 標的ベクターの構造を示した。Hprt 標的ベクターは、0.5 kb のターゲティングアームを有した（図5）。試料の調製、フローサイトメトリー、および他の方法は、実験1と同様であった。プラスミドは、エンドトキシン非含有キット（Qiagen）を使用して調製した。細胞数およびプラスミドの組合せを含む、異なる条件（表3に示す）について調べた。

10

20

30

40

【表3】

表3. 実験で使用した異なる条件

試料のID	PBMC 数	プラスミド	GFP'(ug)	Cas9'(ug)	gRNA'(ug)	標的(ug)
1	5×10 ⁶	GFP	5	0	0	0
2	2×10 ⁷	Cas9	0.1	20	0	0
3	2×10 ⁷	Cas9+gRNA	0.1	10	10	0
4	2×10 ⁷	Cas9+gRNA+標的	0.1	5	5	10
5	2×10 ⁷	Cas9+gRNA+標的	0.1	2.5	2.5	15
6	2×10 ⁷	GFP	5	0	0	0

10

【0542】

結果

図7は、Cas9+gRNA+標的プラスミド共トランスフェクションが、バルク集団内で、良好なトランスフェクション効率をもたらすことを裏付けた。図8は、CD3+T細胞についての、EGFP FACS解析の結果を示した。上記条件を使用して、異なるトランスフェクション効率を裏付けた。図40Aおよび図40Bは、CRISPRによる、ドナートランス遺伝子によるトランスフェクションの6日後における、生存率およびトランスフェクション効率(GFP + %)を示す。

【0543】

20

(実施例3)

各遺伝子部位において、二本鎖切断(DSB)誘導が最高度であるgRNAを同定する。ガイドRNAのデザインおよび構築:

CRISPR Design Program (Zhang Lab, MIT 2015)を使用して、所望の遺伝子領域へのガイドRNA(gRNA)をデザインした。オフターゲット位置により決定される、最高のランク付け値に基づき、gRNAを作製するための複数のプライマー(表4に示す)を選び出した。gRNAは、オリゴヌクレオチド対:5'-CACCG- gRNA配列 - 3'および5'-AAAC- 逆相補体gRNA配列-C-3'により注文した(オリゴヌクレオチド対の配列を、表4に列挙する)。

【表4-1】

30

表4. gRNAを作製するのに使用されるプライマー(クローニングの目的で、配列CACCGを、センス鎖へと付加し、AAACを、アンチセンス鎖へと付加する)。

配列番号	プライマーネーム	5'~3'の配列
5	HPRT gRNA 1 センス鎖	CACCGCACGTGTGAACCAACCCGCC
6	HPRT gRNA 1 アンチセンス鎖	AAACGGCGGGTTGGTCACACGTGC
7	HPRT gRNA 2 センス鎖	CACCGAAACAACAGGCCGGCGGGT
8	HPRT gRNA 2 アンチセンス鎖	AAACACCCGCCGGCCTGTTGTTTC
9	HPRT gRNA 3 センス鎖	CACCGACAAAAAAATTAGCCGGGTG
10	HPRT gRNA 3 アンチセンス鎖	AAACCACCCGGCTAATTTTTGT

40

【表4-2】

配列番号	プライマー名	5'～3'の配列
11	HPRT gRNA 4 センス鎖	CACCGTAAATTCTCTGATAGACTA
12	HPRT gRNA 4 アンチセンス鎖	AAACTAGTCTATCAGAGAAATTAC
13	HPRT gRNA 5 センス鎖	CACCGTCTTCATGAGAGCATTAC
14	HPRT gRNA 5 アンチセンス鎖	AAACGTAATGCTCTCATTGAAACAC
15	HPRT gRNA 6 センス鎖	CACCGTCTCGAACTCCTGAGCTC
16	HPRT gRNA 6 アンチセンス鎖	AAACGAGCTCAGGAGTTCGAGACC
17	HPRT Cell フォワード	AGTGAAGTGGCGCATTCTTG
18	HPRT Cell リバース	CACCCTTCCAATCCTCAGC
19	AAVS1 gRNA 1 センス鎖	CACCGTGGGGTTAGACCCAATATC
20	AAVS1 gRNA 1 アンチセンス鎖	AAACGATATTGGGTCTAACCCCCAC
21	AAVS1 gRNA 2 センス鎖	CACCGACCCCACAGTGGGCCACTA
22	AAVS1 gRNA 2 アンチセンス鎖	AAACTAGTGGCCCCACTGTGGGTC
23	AAVS1 gRNA 3 センス鎖	CACCGAGGGCCGTTAATGTGGCTC
24	AAVS1 gRNA 3 アンチセンス鎖	AAACGAGGCCACATTAACCGGCCCTC
25	AAVS1 gRNA 4 センス鎖	CACCGTCACCAATCCTGTCCCTAG
26	AAVS1 gRNA 4 アンチセンス鎖	AAACCTAGGGACAGGATTGGTGAC
27	AAVS1 gRNA 5 センス鎖	CACCGCCGCCCTGGGAATATAAGG
28	AAVS1 gRNA 5 アンチセンス鎖	AAACCCATTATTCAGGGCCGGC
29	AAVS1 gRNA 6 センス鎖	CACCGCGGGCCCTATGTCCACTTC
30	AAVS1 gRNA 6 アンチセンス鎖	AAACGAAGTGGACATAGGGGCCGC
31	AAVS1 Cell フォワード	ACTCTTTCATTTGGGCAGC
32	AAVS1 Cell リバース	GGTTCTGGCAAGGAGAGAGA
33	PD-1 gRNA 1 センス鎖	CACCGCGGAGAGCTTCGTGCTAAC
34	PD-1 gRNA 1 アンチセンス鎖	AAACGTTAGCACCGAAGCTCTCCGC
35	PD-1 gRNA 2 センス鎖	CACCGCCTGCTCGTGGTACCGAAG
36	PD-1 gRNA 2 アンチセンス鎖	AAACCTTCGGTACACCACGAGCAGGC
37	PD-1 gRNA 3 センス鎖	CACCGCAGCAACCAGACGGACAAGC
38	PD-1 gRNA 3 アンチセンス鎖	AAACGCTTGTCCGCTGGTTGCTGC
39	PD-1 gRNA 4 センス鎖	CACCGAGGCCAGCTTGCCGTC
40	PD-1 gRNA 4 アンチセンス鎖	AAACGACGGACAAGCTGGCCGCTC
41	PD-1 gRNA 5 センス鎖	CACCGCGTTGGCAGTTGTGACA
42	PD-1 gRNA 5 アンチセンス鎖	AAACTGTCACACAACACTGCCAACGC
43	PD-1 gRNA 6 センス鎖	CACCGACGGAAGCGGCAGTCCTGGC
44	PD-1 gRNA 6 アンチセンス鎖	AAACGCCAGGACTGCCGCTTCCGTC
45	PD-1 Cell フォワード	AGAAGGAAGAGGCTCTGCAG
46	PD-1 Cell リバース	CTCTTGATCTGCGCCTTGG
47	CTLA4 gRNA 1 センス鎖	CACCGCCGGGTGACAGTGTTCGGC
48	CTLA4 gRNA 1 アンチセンス鎖	AAACGCCGAAGCACTGTACCCGGC
49	CTLA4 gRNA 2 センス鎖	CACCGTGGCAACCTACATGATG
50	CTLA4 gRNA 2 アンチセンス鎖	AAACCATCATGTAGGTTGCCAC
51	CTLA4 gRNA 3 センス鎖	CACCGCTAGATGATTCCATCTGCAC
52	CTLA4 gRNA 3 アンチセンス鎖	AAACGTGCAGATGGAATCATCTAGC
53	CTLA4 gRNA 4 センス鎖	CACCGAGGTTCACTGATTCCAC
54	CTLA4 gRNA 4 アンチセンス鎖	AAACGTGAAATCAAGTGAACCTC
55	CTLA4 gRNA 5 センス鎖	CACCGCCGCACAGACTTCAGTCACC
56	CTLA4 gRNA 5 アンチセンス鎖	AAACGGTGAATGAGCTGTGCGGC
57	CTLA4 gRNA 6 センス鎖	CACCGCTGGCGATGCCCTGGCTGC
58	CTLA4 gRNA 6 アンチセンス鎖	AAACGCAGCCGAGGCATGCCAGC
59	CTLA4 Cell フォワード	TGGGGATGAAGCTAGAAGGC
60	CTLA4 Cell リバース	AATCTGGGTTCCGTTGCCTA
61	CCR5 gRNA 1 センス鎖	CACCGACAATGTGTCAACTCTTGAC
62	CCR5 gRNA 1 アンチセンス鎖	AAACGTCAAGAGTTGACACATTGTC
63	CCR5 gRNA 2 センス鎖	CACCGTCATCCTCCGACAATCGAT
64	CCR5 gRNA 2 アンチセンス鎖	AAACATCGATTGTCAAGGAGGATGAC
65	CCR5 gRNA 3 センス鎖	CACCGTGACAAGTGTGATCACTT
66	CCR5 gRNA 3 アンチセンス鎖	AAACAAAGTGTACACACTTGTCAACC

10

20

30

40

【表4-3】

配列番号	プライマー名	5'~3'の配列
67	CCR5 gRNA 4 センス鎖	CACCGACACAGCATGGGACGACAGCC
68	CCR5 gRNA 4 アンチセンス鎖	AAACGGCTGTCGTCCATGCTGTGTC
69	CCR5 gRNA 5 センス鎖	CACCGATCTGGTAAAGATGATTCC
70	CCR5 gRNA 5 アンチセンス鎖	AAACGGAATCATCTTACCAAGATCCCAC
71	CCR5 gRNA 6 センス鎖	CACCGTTGTATTCCAAGTCCCAC
72	CCR5 gRNA 6 アンチセンス鎖	AAACGTGGGACTTTGAAATACAAC
73	CCR5 Cell フォワード	CTAACACCTGGCCATCTCTGA
74	CCR5 Cell リバース	CCCGAGTAGCAGATGACCAT

10

【0544】

標的配列クローニングプロトコール (Zhang Lab, MIT) を使用して、gRNAを、併せてクローニングした。略述すると、以下のプロトコール：37で30分間、95で5分間、次いで、5/分で、25へと降下することにより、サーモサイクラー内で、T4 PNK (NEB) および10倍濃度のT4 Ligation Buffer (NEB) を使用して、オリゴヌクレオチド対を、併せてリン酸化およびアニールさせた。pENTR1-U6-Stubuffer-gRNAベクター（社内で作製した）を、FastDigest BbsI (Fermentas) で消化し、FastAP (Fermentas) および10倍濃度のFast Digest Bufferを、ライゲーション反応のために使用した。T4 DNA Ligase and Buffer (NEB) を使用して、消化されたpENTR1ベクターを、前のステップによる、リン酸化およびアニールさせたオリゴニ重鎖（希釈率を1:200とする）と併せてライゲーションした。ライゲーション物を、室温で1時間にわたりインキュベートし、次いで、形質転換し、その後、GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) を使用して、Miniprepした。プラスミドをシーケンシングして、適正な挿入を確認した。

20

【表5】

表5 操作CISHガイドRNA(gRNA)の標的配列

配列番号	gRNA番号	エクソン	標的、5'-3'
75	1	2	TTGCTGGCTGTGGAGCGGCAC
76	2	2	GACTGGCTGGGCAGTTCCA
77	3	2	TGCTGGGGCCTTCCTCGAGG
78	4	2	CCGAAGGTAGGAGAAGGTCT
79	5	2	ATGCACAGCAGATCCTCCTC
80	6	2	AGAGAGTGAGGCCAAAGGTGC
81	1	3	GCCATACTCAATGCGTACAT
82	2	3	GGGTTCATTACGGCCAGCG
83	3	3	AAGGCTGACCACATCCGGAA
84	4	3	TGCCGACTCCAGCTTCCGTC
85	5	3	CTGTCAGTGAAAACCACTCG
86	6	3	CGTACTAAGAACGTGCCTTC

30

40

【0545】

操作gRNAによりターゲティングされるゲノム配列を、表5および表6に示す。図4Aおよび図4Bは、修飾gRNAによる、CISH遺伝子のターゲティングを示す。

【表6】

表6 AAVS1 gRNAの標的配列

配列番号	遺伝子	gRNA配列(5'~3')
87	AAVS1	GTCACCAATCCTGTCCCTAG-

50

【0546】

gRNAの検証

HEK293T細胞を、24ウェルプレート内、ウェル1つ当たりの細胞 1×10^5 個の密度で播種した。150uLのOpti-MEM培地を、1.5ugのgRNAプラスミド、1.5ugのCas9プラスミドと組み合わせた。別の150uLのOpti-MEM培地を、5uLのLipofectamine 2000 Transfection試薬(Invitrogen)と組み合わせた。溶液を、併せて組み合わせ、室温で15分間にわたりインキュベートした。DNA-脂質複合体を、滴下により、24ウェルプレートのウェルへと添加した。細胞を、37℃で3日間にわたりインキュベートし、GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific)を使用して、ゲノムDNAを回収した。gRNAの活性を、Surveyor消化、ゲル電気泳動、および密度測定により定量化した(図60および図61)(Guschin, D. Y.ら、「A Rapid and General Assay for Monitoring Endogenous Gene Modification」、Methods in Molecular Biology、649巻：247～256頁(2010年))。

10

【0547】

プラスミドターゲティングベクターの構築

標的組込み部位の配列は、データベースの総体から収集した。Primer3ソフトウェアを使用して、これらの配列に基づき、1kb、2kb、および4kbのサイズの長さを保有するターゲティングベクターを作製するように、PCRプライマーをデザインした。次いで、製造元の指示書に従い、Accuprime Taq HiFi(Invitrogen)を使用して、ターゲティングベクターアームをPCRにより増幅した。次いで、TOPO-PCR-Blunt IIクローニングキット(Invitrogen)を使用して、結果として得られるPCR産物をサブクローニングし、配列を検証した。代表的なターゲティングベクター構築物を、図16に示す。

20

【0548】

結果

異なるgRNA配列を一助とする、二本鎖切断(DSB)の創出におけるCas9の効率を、表7に列挙した。表7中の百分率数は、試料中の遺伝子変換のパーセントを指し示した。

30

【表7】

表7. 各標的遺伝子部位において、二本鎖切断(DSB)を創出するときの、Cas9/gRNA対の効率。

	HPRT	AAVS1	CCR5	PD1	CTLA4
gRNA#1	27.85%	32.99%	21.47%	10.83%	40.96%
gRNA#2	30.04%	27.10%	>60%	>60%	56.10%
gRNA#3	<1%	39.82%	55.98%	37.42%	39.33%
gRNA#4	<5%	25.93%	45.99%	20.87%	40.13%
gRNA#5	<1%	27.55%	36.07%	30.60%	15.90%
gRNA#6	<5%	39.62%	33.17%	25.91%	36.93%

40

【0549】

5つ全ての被験標的遺伝子部位において、DSBを創出した。これらのうちで、CCR5、PD1、およびCTLA4が、最高のDSB効率をもたらした。本明細書で記載される方法と同じ方法を使用して、hRosa26を含む、他の標的遺伝子部位についても調べる。

【0550】

異なるgRNA配列と共に二本鎖切断を創出する際の、Cas9による比率を、図15に示す。ドナー対照およびCas9のみによる対照と比較した、二本鎖切断のパーセントを列挙する。3つの代表的な標的遺伝子部位(すなわち、CCR5、PD1、およびCTLA4)について調べた。

50

【0551】

(実施例4)

免疫チェックポイント遺伝子もまた破壊する、操作TCRを含むT細胞の作製

免疫チェックポイント遺伝子もまた破壊する操作TCRを発現するT細胞の集団を生成するために、CRISPR、TALEN、トランスポゾンベース、ZEN、メガヌクレアーゼ、またはMega-TAL遺伝子編集法を使用する。PD-1および他の内因性チェックポイントの概要を、表9に示す。細胞（例えば、PBMC、T細胞、例えばTIL、CD4+またはCD8+細胞など）を、がん患者（例えば、転移性黒色腫）から精製し、標準的な手順に従い培養および/または拡大する。細胞を、刺激する（例えば、抗CD3および抗CD28ビーズを使用して）、または刺激せずにおく。細胞に、TCRトランス遺伝子を有する標的ベクターをトランسفェクトする。例えば、MBVb22のTCRトランス遺伝子配列を得て、IDTによりgBLOCKとして合成する。フランкиングat t B配列を有するgBLOCKをデザインし、製造元の指示書に従い、LR cloning反応（Invitrogen）を介してpENTR1にクローニングし、配列を検証する。3つの異なる方法でTCRトランス遺伝子を発現する3つの異なるトランス遺伝子構成（図6を参照されたい）を調べる：1)外因性プロモーター：TCRトランス遺伝子は、外因性プロモーターにより転写される；2)SAインフレーム転写：TCRトランス遺伝子は、スプライシングを介して内因性プロモーターにより転写される；および3)融合体インフレーム翻訳：TCRトランス遺伝子は、インフレーム翻訳を介して内因性プロモーターにより転写される。

10

20

30

【0552】

CRISPR遺伝子編集法を使用する場合、Cas9ヌクレアーゼプラスミドおよびgRNAプラスミド（図4に示すプラスミドと類似のプラスミド）にもまた、TCRトランス遺伝子を保有する標的ベクターを伴うDNAプラスミドをトランسفェクトする。マイクログラムのgRNAおよび15マイクログラムのCas9 mRNAを用いることができる。gRNAは、Cas9ヌクレアーゼを、組込み部位、例えば、PD-1などの内因性チェックポイント遺伝子へとガイドする。代替的に、gRNAのPCR産物または修飾RNA（Hendzel、Nature biotechnology、2015年により裏付けられている）も使用する。Cas9ヌクレアーゼ遺伝子およびgRNAの両方を伴う、別のプラスミドもまた調べる。プラスミドは、併せて、または別個にトランسفェクトする。代替的に、Cas9ヌクレアーゼまたはCas9ヌクレアーゼをコードするmRNAを使用して、Cas9ヌクレアーゼプラスミドを置き換える。

【0553】

CRISPR遺伝子編集法を使用して、組み込まれるTCRトランス遺伝子への相同組換え率を最適化するために、0.5kb p、1kb p、および2kb pを含む、異なる長さの標的ベクターアームについて調べる。例えば、アームの長さを0.5kb pとするターゲティングベクターを、図5に示す。加えて、SCR7薬およびDNAリガーゼIVインヒビター（例えば、アデノウイルスタンパク質）など、いくつかのCRISPRエンハンサーの効果についてもまた調べる。

40

【0554】

プラスミドを使用して、トランス遺伝子を保有する相同組換えHRエンハンサーを送達することに加えて、mRNAの使用についてもまた調べる。mRNA相同組換えHRエンハンサーの、DNAへの、in situにおける、高効率の転換が可能な、最適の逆転写プラットフォームを同定する。造血幹細胞および初代T細胞を操作するための逆転写プラットフォームもまた、最適化および実現する。

【0555】

トランスポゾンベースの遺伝子編集法（例えば、Piggly Bac、Sleeping Beauty）を使用する場合は、トランスポザーゼプラスミドにもまた、TCRトランス遺伝子を保有する標的ベクターを伴うDNAプラスミドをトランسفェクトする。図2は、TCRトランス遺伝子の組込みおよび発現のためのトランスポゾンベースの構築物

50

のうちの一部について例示する。

【0556】

次いで、操作細胞を、P D 1 特異的ヌクレアーゼをコードするm R N Aで処理し、集団を、C e l - I アッセイにより解析して(図28～図30)、P D 1 の破壊およびT C R トランス遺伝子の挿入について検証する。次いで、検証の後、操作細胞を、i n v i t r oにおいて、増殖させ、拡大する。T 7 エンドヌクレアーゼI(T 7 E 1)アッセイを使用して、培養細胞内の、オントーゲットのC R I S P Rイベントを検出することができる(図34および図39)。二重シーケンシングによる欠失を、図37および図38に示す。

【0557】

一部の操作細胞は、自家移植において使用する(例えば、操作細胞を作製するのにその細胞が使用されるがん患者へと投与し戻す)。一部の操作細胞は、同種移植において使用する(例えば、異なるがん患者へと投与し戻す)。患者の処置における、T 細胞の効能および特異性を決定する。遺伝子操作された細胞は、内因性チェックポイント遺伝子の発現を駆動するように、抗原または抗C D 3 および抗C D 2 8 で再刺激することができる(図90Aおよび図90B)。

結果

操作T C R によるT 細胞の作製、および免疫チェックポイント遺伝子の破壊についての代表的な例を、図17に示す。陽性のP C R 結果は、C C R 5 遺伝子における、組換えの成功を裏付ける。免疫チェックポイントノックアウトの効率を、図23A、図23B、図24A、および図24Bにおける代表的な実験に示す。フローサイトメトリーデータを、図25における代表的な実験について示す。図26Aおよび図26Bは、C R I S P R による処置後における、初代ヒトT 細胞内の二重ノックアウトパーセントを示す。C R I S P R および抗P D - 1 ガイドR N A のトランスフェクション後14日目における、フローサイトメトリー結果の代表例を、図45、図51、および図52に示す。トランスフェクションの14日後における細胞生存率および遺伝子編集効率を、C R I S P R 系と、C T L A - 4 およびP D - 1 をターゲティングするg R N A とをトランスフェクトした細胞について、図53、図54、および図55に示す。

【0558】

(実施例5)

T 細胞内の相同組換えの検出

遺伝子もまた破壊する操作T C R を発現する操作T 細胞の集団を生成するために、C R I S P R 、T A L E N 、トランスポゾンベース、Z E N 、メガヌクレアーゼ、またはM e g a - T A L 遺伝子編集法を使用する。相同組換えエンハンサーの使用により、相同組換えが容易になるかどうかを決定するために、以下の例では代表的な実験を具体化する。N E O N トランスフェクションシステム(I n v i t r o g e n)を使用して、刺激C D 3 + T 細胞に電気穿孔した。細胞をカウントし、1 0 0 u L のT 緩衝液中に1 . 0 ~ 3 . 0 × 1 0 ⁶ 細胞の密度で再懸濁させた。1 5 u g m R N A C a s 9 (T r i L i n k B i o T e c h n o l o g i e s)、1 0 u g m R N A g R N A (T r i L i n k B i o T e c h n o l o g i e s)、および1 0 u g の相同組換え(H R)ターゲティングベクターを、H R を調べるために使用した。1 0 u g のH R ターゲティングベクター単独、または1 5 u g C a s 9 を1 0 u g m R N A g R N A と一緒に、対照として使用した。電気穿孔の後、細胞を4つの条件：1) D M S O のみ(媒体対照)、2) S C R 7 (1 u M)、3) L 7 5 5 5 0 7 (5 u M)、ならびに4) S C R 7 およびL 7 5 5 5 0 7 に分けて、H R を促進することが示唆される2つの薬物を調べた。C o u n t e s s I I A u t o m a t e d C e l l C o u n t e r (T h e r m o F i s h e r)を使用して、3日ごとに細胞をカウントして、これらの多様な条件下における増殖をモニタリングした。H R についてモニタリングするために、細胞をフローサイトメトリーにより解析し、P C R により調べた。フローサイトメトリーのために、細胞を毎週1回、3週間にわたり解析した。T 細胞は、A P C 抗マウスT C R (e B i o s c i e n c e s

10

20

30

40

50

) および Fixable Viability Dye eFluor 780 (eBiosciences) で染色した。細胞を、 LSR II (BD Biosciences) および FlowJo v. 9 を使用して解析した。PCRによりHRについて調べるために、gDNAをT細胞から単離し、AccuPrime Taq DNA polymerase, high fidelity (Thermo Fisher) を使用するPCRにより増幅した。CCR5遺伝子の両方およびHRターゲティングベクターの両方の末端に対するプライマーをデザインして、5'末端および3'末端の両方における適正な相同組換えを探査した。

【0559】

(実施例6)

10

外因性プラスミドDNAにより誘導される毒性の防止

外因性プラスミドDNAは、T細胞内で毒性を誘導する。毒性が生じる機構は、図19および図69の生得的免疫センシング経路により説明される。外因性ポリ核酸に対する応答を修飾する化合物の付加により、細胞毒性を低減し得るのかどうかを決定するために、以下の代表的な実験を完遂した。NEONトランスフェクションシステム(Invitrogen)を使用して、CD3+ T細胞に、量を増大させるプラスミドDNA(0.1 ug ~ 40 ug)を電気穿孔した(図91)。電気穿孔の後、細胞を4つの条件：1) DMSOのみ(媒体対照)、2) BX795(1 uM, Invivogen)、3) Z-VAD-FMK(50 uM, R&D Systems)、ならびに4) BX795およびZ-VAD-FMKへと分けて、二本鎖DNAにより誘導されるアポトーシスを遮断することが可能な、2つの薬物について調べた。細胞は、48時間後において、フローサイトメトリーにより解析した。T細胞は、Fixable Viability Dye eFluor 780 (eBiosciences) およびFlowJo v. 9 を使用して解析した。

20

【0560】

結果

プラスミドDNAをトランスフェクトしたT細胞が被る毒性の代表的な例を、図18、図27、図32、および図33に示す。細胞数による生存率を、図86に示す。生得的免疫経路インヒビターを添加した後で、死を経るT細胞のパーセントは低減される。例示を目的として述べると、図20は、2つの異なるインヒビターで処理されたT細胞培養物のアポトーシスの低減を表したものを見ます。

30

【0561】

(実施例7)

30

ゲノム領域に対する組換えアームを伴う、少なくとも1つの操作抗原受容体を含む、非メチル化ポリ核酸

ポリ核酸に対する修飾は、図21に示される通りに実施することができる。非メチル化ポリ核酸が、外因性プラスミドDNAにより誘導される毒性を低減し、ゲノム操作を改善し得るのかどうかを決定するために、以下の実施例を利用することができます。MaxiPrepを開始するために、相同組換えターゲティングベクターを含有する細菌コロニーを採取し、カナマイシン(1:1000)を伴う、5mLのLB培養液中に接種し、37で、4~6時間にわたり増殖させた。次いで、出発培養物を、カナマイシンを伴う、250mLのLB培養液による大容量の培養物へと添加し、SssI酵素の存在下、37で12~16時間にわたり増殖させた。1つの例外を除き、製造元のプロトコールに従い、Hi Speed Plasmid Maxi Kit (Qiagen) を使用して、MaxiPrepを調製した。MaxiPrepの溶解および中性化の後、2.5mLの内毒素除去緩衝液を、MaxiPrepへと添加し、氷上で45分間にわたりインキュベートした。MaxiPrepは、無菌性を維持するように、クリーンベンチ内で終えた。MaxiPrepの濃度は、Nanodropを使用して決定した。

40

【0562】

(実施例8)

50

GUIDE - Seqライブラリの調製

固相可逆性固定化磁気ビーズ (A g e n c o u r t D N A d v a n c e) を使用して、ゲノムDNAを、トランスフェクトした、対照の（非トランスフェクト細胞および外因性T C R（表10）を保有するミニサークルDNAをトランスフェクトしたC R I S P R細胞）単離ヒトT細胞から単離し、C o v a r i s S 2 0 0 装置により、末端修復され、A テールである、平均長5 0 0 b pへとせん断処理し、8 ヌクレオチドのランダム分子指標が組み込まれた半機能的アダプターへとライゲーションした。標的濃縮のために、オリゴタグと相補的なプライマーによる、2ラウンドのネステッドアンカードP C Rを使用した。末端修復サーモサイクルプログラム：1 2 で1 5分間、3 7 で1 5分間；7 2 で1 5分間；4 で保持する。

10

[0 5 6 3]

ゲノムにマッピングし戻されたGUIDE-Seqリードの開始部位は、DSBの位置特定を数塩基対以内で可能とする。製造元の指示書に従い、Illumina Library Quantification kit用のKapa Biosystems kitを使用してライプラリーを定量する。各試料についてqPCRランにより与えられる、 $1 \mu\text{L}$ 当たりの分子数の推定量の平均を使用して、次にライプラリーの全セットを $1 \cdot 2 \times 10^{10}$ 分子に正規化するように進め、シーケンシングのために一緒にプールされるライプラリー数で除する。これは、各試料についての分子ごとのインプットを与え、およびまた、各試料についての容量ごとのインプットも与える。本発明者らがGUIDE-Seqにより評価した、切断gRNAにより誘導される3つのRGNのオントーゲットおよびオフターゲット部位のマッピングリードを示す。全ての場合において、標的部位配列をx軸の左側のプロトスペーサー配列および右側のPAM配列と共に示す。Illumina Miseq Reagent Kit V2によるシーケンシングのためのIlluminaの標準的なプロトコールに従い(300サイクル(2×150 bpのペアエンド))、ライプラリーを変性させ、Miseqにロードする。図76Aおよび図76Bは、代表的なGUIDE-Seq実験のデータを示す。

20

[0 5 6 4]

(実施例 9)

アデノウイルス血清型 5 変異体タンパク質の作製

Integrated DNA technologies (IDT)により、変異体cDNA(表8)をコドン最適化し、gBlock断片として合成した。in vitro mRNA合成のために、合成断片をmRNA産生ベクターにサブクローニングした。

30

【表8-1】

表8:アデノウイルスタンパク質の変異体cDNA配列

配列番号	変異	名称	配列(5'~3')
88	なし	アデノウイルス 血清型 5 E4orf6	atgacaacaagtggcgccattcgcatgacttgcgcac gagatcacgactgtcgccgaactccctacagccggatcgac tccctcccttgagactgaaacacggcacgatactcgaggac caccacttcgtccggagtgtAACACCTGacgtcataacgtta gctatgtgagaggctccctgttctgtcggttacccttattcaag agtgggtcggtggcatggtttcacgagagaggagctc gttatcctgagaaaatgtatgcacgttttgttgcgtcaaatata gatataatgacttctatgtatgattcatggtacgaatctggcc gcactgccaattgttagcagtctggccctccaatgeatcgccgg aggccaattctcgcttccctggtttagaatggcgatggagc aatgtcaaccacgcgtttatctgttatcgcgaggtagtcaactata atatgccgaaggaggatgtttatgtctatgtgttcatgcgaggg agacatttgatttacgttagactgtggatgtggccatgtggaaag cgttagttccggcgatgtccctcggttactccgcattgcattgtgg atttgaataacatcggttacttgttgcataactgcgcgcgatctgt cagaaataagggtacgtcgtcgccacggcaacccggaggt catgtgagaggcgatcgataatcgctgaagaaacgcacagcaa tgttgttcatgcgcaactgaaaggcgacggcaacagttatacg cgcactctgcgaccacaggcgatctgtatgcgtactacg atgcactccgatgttag
89	アミノ酸373 におけるH→A	アデノウイルス 血清型 5 H373A 変異体	atggagagaaggaaatccatgtgagagggagtgcccgg ttttctggcacgcctccgtggatccggatgtgagactcaggag ccccccgcaccgtgggttccgcaccaggagacaacactga cggtggcgccggcgatgtcgccggatgtggaaagccaagccgc tgctggggcccgagccgatggaaacccgaatcccgacccgg tctggcatgaacgttgcgttgcggatgttgcggatgttgc cgccaggatctgacaatcacggaggacggccaggccctcaagg gagtgaagagagagagagggcttgtgaggccactgaggaa ctcgcaatctggcggttcatgtatgcacaaggcacaggccgg gcattacattcaacagattaaggacaactgcgcaacagagctc gatctctggcccagaagtatgcacgtggatgttgc tggctgcagccggcgacgtttgaagaggccatccgcgtgt cgccaaagggtggccctgcgaccctgactgcaaatataagg actggtaacatccgaaatgttgttatattgtggaaatggcg aagtggagattgacacagaggatcgacgcgttccgggtct tgcataacatgtggcccggtgtctggcatggatggcgtagt ttatgaatgtgagggttacccggacctaatttagcg ctggcaaacactaatctgtatctgcatggagtttctatggatt aataacacactgttgtgaagcttgccggacgtgcgggttagagg gtgtgttttatgtgttgttgcgtggaaaggcgctgtgttag agtagagcttctatcaagaatgcgttgtcggatgttgc gcattctcgtgttgttgttgttgttgttgttgttgttgt cgttgcacatgttgttgttgttgttgttgttgttgttgt ttgcgaggccattctcggaaggccctggccagtttcgc cctgcacgcgtgtgtgttgttgttgttgttgttgttgt cctgcacatgttgttgttgttgttgttgttgttgttgttgt ccagaatctatgatgttgttgttgttgttgttgttgttgt ccatgttgttgttgttgttgttgttgttgttgttgttgttgt ggtgttgttgttgttgttgttgttgttgttgttgttgttgt acccgttgttgttgttgttgttgttgttgttgttgttgttgt ctgggttgttgttgttgttgttgttgttgttgttgttgttgt aagacactgttgttgttgttgttgttgttgttgttgttgttgt
90			atggagagaaggaaatccatgtgagagggagtgcccgg

10

20

30

40

【表 8 - 2】

【 0 5 6 5 】

(实施例 10)

P D - 1、C T L A - 4、およびC I S Hをノックアウトするための、T I Lのゲノム操作

適切な腫瘍を、適格性の病期であるⅠⅡⅢc - Ⅳ期のがん患者から切除し、3~5mm²の小さな断片へと切り刻み、増殖培地および高用量(HD)IL-2を伴う培養プレートまたは小型培養フラスコに入れた。まず、TILを、この「前急速拡大プロトコール」(前REP)期中の3~5週間にわたり、少なくとも細胞 50×10^6 個へと拡大する。Neon Transfection System(100uL Kitまたは10uL Kit; Invitrogen、Life Technologies)を使用して、TILを電気穿孔する。TILをペレット化させ、T緩衝液で1回洗浄する。TILを、10uLのチップには、10uLのT緩衝液中の細胞 2×10^5 個の密度で再懸濁させ、100uLチップには、100uLT緩衝液中の細胞 3×10^6 個の密度で再懸濁させる。次いで、15ugのCas9 mRNA、ならびに10~50ugのPD-1、CTLA-4、およびCISH gRNA-RNA(100mc1のチップ)を用いて、TILを、1400V、10ミリ秒間ずつ、3つのパルスで電気穿孔する。トランスフェクション後、TILを、抗生素質非含有培養培地中、細胞1000個/uLで播種し、5%のCO₂中、30℃で24時間にわたりインキュベートする。回収の24時間後、TILを、抗生素質含有培地へと移し、5%のCO₂中、37℃で培養することができる。

10

20

30

40

50

【 0 5 6 6 】

次いで、PBM C フィーダー細胞および IL - 2 の存在下で、抗 CD 3 を使用して、TIL を刺激することにより、細胞を、2 週間にわたり、急速拡大プロトコール (REP) にかけた。拡大された TIL (ここでは、細胞数十億個) を洗浄し、プールし、患者へと注入し、1 または 2 サイクルの HD - IL - 2 療法が続いた。TIL を移入させる前に、TIL の存続を容易するために、シクロホスファミド (Cyt) およびフルダラビン (fludarabine) (Flu) を使用する準備レジメンであって、宿主リンパ球を一過性に枯渇させ、注入される TIL に「場所を空け」、サイトカインシンクおよび調節性 T 細胞を除去する準備レジメンで、患者を処置することができる。対象は、対象自身の修飾 TIL 細胞の注入を、30 分間にわたり受け、処置から回復するまで、院内にとどまって、有害事象についてモニタリングされる。図 102A および図 102B は、2 例の異なる対象の TIL の細胞拡大を示す。図 103A および図 103B は、CRISP R 系および抗 PD - 1 ガイドを電気穿孔され、フィーダーの添加を伴う (A) か、またはフィーダーの添加を伴わずに (B) 培養された TIL の細胞拡大を示す。

【表9-1】

表9. 内因性チェックポイントの概要

配列番号	遺伝子記号	略称	名称	NCBI番号 (GRCh38.p2) *AC010327.8 **GRCh38.p7	元の始点	元の終点	ゲノム内の位置
91	ADORA2A	A2aR; RDC8; ADORA2	アデノシンA2a受容体	135	24423597	24442360	22q11.23
92	CD276	B7H3; B7-H3; B7RP-2; 4Ig-B7-H3	CD276 分子	80381	73684281	73714518	15q23-q24
93	VTCN1	B7X; B7H4; B7S1; B7-H4; B7h.5; VCTN1; PRO1291	Vセットドメイン含有T細胞活性化インヒビター1	79679	117143587	117270368	1p13.1
94	BT LA	BT LA1; CD272	Bリンパ球およびTリンパ球関連	151888	112463966	112499702	3q13.2
95	CTLA4	GSE; GRD4; ALPS5; CD152; CTLA-4; IDDM12; CELIAC3	細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4	1493	203867788	203873960	2q33
96	IDO1	IDO; INDO; IDO-1	インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ1	3620	39913809	39928790	8p12-p11
97	KIR3DL1	KIR; NKB1; NKAT3; NKB1B; NKAT-3; CD158E1; KIR3DL2; KIR3DL1/S1	キラー細胞免疫グロブリン様受容体、3ドメイン、長細胞質テール、1	3811	54816438	54830778	19q13.4
98	LAG3	LAG3; CD223	リンパ球活性化遺伝子3	3902	6772483	6778455	12p13.32
99	PDCD1	PD1; PD-1; CD279; SLEB2; hPD-1; hPD-l; hSLE1	プログラム細胞死1	5133	241849881	241858908	2q37.3
100	HAVCR2	TIM3; CD366; KIM-3; TIMD3; Tim-3; TIMD-3; HAVcr-2	A型肝炎ウイルス細胞受容体2	84868	157085832	157109237	5q33.3

10

20

30

40

【表9-2】

配列番号	遺伝子記号	略称	名称	NCBI番号 (GRCh38.p2) *AC010327.8 ** GRCh38.p7	元の始点	元の終点	ゲノム内の位置
101	VISTA	C10orf54、 ESC-1 の分化 (Dies1); 血小板 受容体 Gi24 前 駆体; PD1 ホモ ログ(PD1H) B7H5; GI24; B7-H5; SISP1; PP2135	T 細胞活性 化の V ドメイ ン免疫グロブリ ンサブレッサ ー	64115	71747556	71773580	10q22.1
102	CD244	2B4; 2B4; NAIL; Nmrk; NKR2B4; SLAMF4	CD244 分 子、ナチュ ラルキラー 細胞受容体 2B4	51744	16083015 8	16086290 2	1q23.3
103	CISH	CIS; G18; SOCS; CIS-1; BACTS2	サイトカイン 誘導性 SH2 含有タ ンパク質	1154	50606454	50611831	3p21.3
104	HPRT1	HPRT; HGPRT	ヒポキサン チンホスホ リボシルト ランスフェ ラーゼ 1	3251	13445284 2	13450066 8	Xq26.1
105	AAV*SI	AAV	アデノ随伴 ウイルス組 込み部位 1	14	7774	11429	19q13
106	CCR5	CKR5; CCR-5; CD195; CKR-5; CCCKR5; CMKBR5; IDDM22; CC- CKR-5	ケモカイン (C-C モチ ーフ)受容 体 5(遺伝 子/偽遺伝 子)	1234	46370142	46376206	3p21.31
107	CD160	NK1; BY55; NK28	CD160 分 子	11126	14571943 3	14573928 8	1q21.1
108	TIGIT	VSIG9; VSTM3; WUCAM	Ig および ITIM ドメ インを有す る T 細胞 免疫受容体	201633	11429398 6	11431028 8	3q13.31
109	CD96	TACTILE	CD96 分子	10225	11154207 9	11166599 6	3q13.13- q13.2
110	CRTAM	CD355	細胞傷害性 および制御 性 T 細胞 分子	56253	12283843 1	12287264 3	11q24.1
111	LAIR1	CD305; LAIR-1	白血球関連 免疫グロブ リン様受容 体 1	3903	54353624	54370556	19q13.4

10

20

30

40

【表9-3】

配列番号	遺伝子記号	略称	名称	NCBI番号 (GRCh38.p2) *AC010327.8 **GRCh38.p7	元の始点	元の終点	ゲノム内の位置
112	SIGLEC7	p75; QA79; AIRM1; CD328; CDw328; D-siglec; SIGLEC-7; SIGLECP2; SIGLEC19P; p75/AIRM1	シアル酸結合 Ig 様レクチン 7	27036	51142294	51153526	19q13.3
113	SIGLEC9	CD329; CDw329; FOAP-9; siglec-9; OBBP-LIKE	シアル酸結合 Ig 様レクチン 9	27180	51124880	51141020	19q13.41
114	TNFRSF10B	DR5; CD262; KILLER; TRICK2; TRICKB; ZTNFR9; TRAILR2; TRICK2A; TRICK2B; TRAIL-R2; KILLER/DR5	腫瘍壊死因子受容体スープーファミリーメンバー10b	8795	23006383	23069187	8p22-p21
115	TNFRSF10A	DR4; APO2; CD261; TRAILR1; TRAILR-1	腫瘍壊死因子受容体スープーファミリーメンバー10a	8797	23191457	23225167	8p21
116	CASP8	CAP4; MACH; MCH5; FLICE; ALPS2B; Casp-8	カスパーーゼ8	841	201233443	201287711	2q33-q34
117	CASP10	MCH4; ALPS2; FLICE2	カスパーーゼ10	843	201182898	201229406	2q33-q34
118	CASP3	CPP32; SCA-1; CPP32B	カスパーーゼ3	836	184627696	184649475	4q34
119	CASP6	MCH2	カスパーーゼ6	839	109688628	109713904	4q25
120	CASP7	MCH3; CMH-1; LICE2; CASP-7; ICE-LAP3	カスパーーゼ7	840	113679162	113730909	10q25
121	FADD	GIG3; MORT1	Fas 関連細胞死ドメイン	8772	70203163	70207402	11q13.3
122	FAS	APT1; CD95; FAS1; APO-1; FASTM; ALPS1A; TNFRSF6	Fas 細胞表面細胞死受容体	355	88969801	89017059	10q24.1

10

20

30

40

【表9-4】

配列番号	遺伝子記号	略称	名称	NCBI番号 (GRCh38.p2) *AC010327.8 ** GRCh38.p7	元の始点	元の終点	ゲノム内の位置
123	TGFBRI I	AAT3; FAA3; LDS2; MFS2; RIIC; LDS1B; LDS2B; TAAD2; TGFR-2; TGFbeta-RII	形質転換増殖因子ベータ受容体 II	7048	30606493	30694142	3p22
124	TGFBR1	AAT5; ALK5; ESS1; LDS1; MSSE; SKR4; ALK-5; LDS1A; LDS2A; TGFR-1; ACVRLK4; tbetaR-I	形質転換増殖因子ベータ受容体 I	7046	99104038	99154192	9q22
125	SMAD2	JV18; MADH2; MADR2; JV18-1; hMAD-2; hSMAD2	SMAD ファミリーメンバー2	4087	47833095	47931193	18q21.1
126	SMAD3	LDS3; LDS1C; MADH3; JV15-2; HSPC193; HsT17436	SMAD ファミリーメンバー3	4088	67065627	67195195	15q22.33
127	SMAD4	JIP; DPC4; MADH4; MYHRS	SMAD ファミリーメンバー4	4089	51030213	51085042	18q21.1
128	SKI	SGS; SKV	SKI がん原遺伝子	6497	2228695	2310213	1p36.33
129	SKIL	SNO; SnoA; SnoI; SnoN	SKI 様がん原遺伝子	6498	17035767 8	17039684 9	3q26
130	TGIF1	HPE4; TGIF	TGFB 誘導因子ホメオボックス1	7050	3411927	3458411	18p11.3
131	IL10RA	CD210; IL10R; CD210a; CDW210A; HIL-10R; IL-10R1	インターロイキン10受容体サブユニットアルファ	3587	11798639 1	11800148 3	11q23
132	IL10RB	CRFB4; CRF2-4; D21S58; D21S66; CDW210B; IL-10R2	インターロイキン10受容体サブユニットベータ	3588	33266360	33297234	21q22.11
133	HMOX2	HO-2	ヘムオキシゲナーゼ2	3163	4474703	4510347	16p13.3
134	IL6R	IL6Q; gp80; CD126; IL6RA; IL6RQ; IL-6RA; IL-6R-1	インターロイキン6受容体	3570	15440519 3	15446945 0	1q21

10

20

30

40

【表9-5】

配列番号	遺伝子記号	略称	名称	NCBI番号 (GRCh38.p2) *AC010327.8 ** GRCh38.p7	元の始点	元の終点	ゲノム内の位置
135	IL6ST	CD130; GP130; CDW130; IL-6RB	インターロイキン6シグナル伝達因子	3572	55935095	55994993	5q11.2
136	CSK	CSK	c-src チロシンキナーゼ	1445	74782084	74803198	15q24.1
137	PAG1	CBP; PAG	グリコスフィンゴ脂質ミクロドメインにより膜アンカーされるリンタンパク質1	55824	80967810	81112068	8q21.13
138	SIT1	SIT1	シグナル閾値調節膜貫通アダプター-1	27240	35649298	35650950	9p13-p12
139	FOXP3	JM2; AIID; IPEX; PIDX; XPID; DIETER	フォークヘッドボックスP3	50943	49250436	49269727	Xp11.23
140	PRDM1	BLIMP1; PRDI-BF1	PRドマイシン1	639	106086320	106109939	6q21
141	BATF	SFA2; B-ATF; BATF1; SFA-2	塩基性ロイシンジッパー転写因子、ATF様	10538	75522441	75546992	14q24.3
142	GUCY1A2	GC-SA2; GUC1A2	可溶型グアニル酸シクラーゼ1、アルファ2	2977	106674012	107018445	11q21-q22
143	GUCY1A3	GUCA3; MYMY6; GC-SA3; GUC1A3; GUCSA3; GUCY1A1	可溶型グアニル酸シクラーゼ1、アルファ3	2982	155666568	155737062	4q32.1
144	GUCY1B2	GUCY1B2	可溶型グアニル酸シクラーゼ1、ベータ2(偽遺伝子)	2974	50994511	51066157	13q14.3
145	GUCY1B3	GUCB3; GC-SB3; GUC1B3; GUCSB3; GUCY1B1; GC-S-beta-1	可溶型グアニル酸シクラーゼ1、ベータ3	2983	155758973	155807642	4q31.3-q33

10

20

30

40

【表9-6】

配列番号	遺伝子記号	略称	名称	NCBI番号 (GRCh38.p2) *AC010327.8 ** GRCh38.p7	元の始点	元の終点	ゲノム内の位置
146	TRA	IMD7; TCRA; TCRD; TRAalpha; TRAC	T細胞受容体アルファ遺伝子座	6955	21621904	22552132	14q11.2
147	TRB	TCRB; TRBbeta	T細胞受容体ベータ遺伝子座	6957	14229901 1	14281328 7	7q34
148	EGLN1	HPH2; PHD2; SM20; ECYT3; HALAH; HPH-2; HIFPH2; ZMYND6; Clorf12; HIF-PH2	egl-9 ファミリー低酸素症誘導性因子 1	54583	23136375 1	23142504 4	1q42.1
149	EGLN2	EIT6; PHD1; HPH-1; HPH-3; HIFPH1; HIF-PH1	egl-9 ファミリー低酸素症誘導性因子 2	112398	40799143	40808441	19q13.2
150	EGLN3	PHD3; HIFPH3; HIFP4H3	egl-9 ファミリー低酸素症誘導性因子 3	112399	33924215	33951083	14q13.1
151	PPP1R12C**	p84; p85; LENG3; MBS85	タンパク質ホスファターゼ 1 調節サブユニット 12C	54776	55090913	55117600	19q13.42

10

20

30

【表10】

表10 操作T細胞受容体(TCR)

配列番号	5'~3'の配列
152	atggccttggtaacctataactgtgctgctcagtctcggtatggagatgtaagactactcagcctaatagttatggaaagt aataggaggaggccgtccacctgcctgtaatcacttaccataagcggacagattacatacatattgttatccgcagctcccttc acaagggtccagagtatgtgattcatggcctcacatcaaatgtgaacaatcgatggctcttgccattgcagaggatcgaaaaaa gctcaacactcatcctgcatagggcgacactcagagatcgccgcgtttatta

【表11】

表11 Streptococcus pyogenesのCas9(SpCas9)

40

配列番号	5'~3'の配列
153	atggactataaggaccacgacggagactacaaggatcatgatattgattacaaagacgatgacgataagatggcccaaagaag aagcggaaaggctgttatccacggagtcggcagccgacaagaagtacagcatcgccctggacatcgccaccaactctgtgg gctggccgtatcaccgacg

【0567】

(実施例11)

gRNAの修飾

修飾ガイドRNAのデザインおよび構築：

CRISPR Design Program (Zhang Lab, MIT 2011)を使用して、遺伝子の所望の領域へのガイドRNA(gRNA)をデザインした。オ

50

フターゲット位置により決定される、最高のランク付け値に基づき、複数のgRNA（表12に示す）を選び出した。PD-1、CTLA-4、およびCISHの遺伝子配列をターゲティングするgRNAを、2'-O-メチル3'ホスホロチオエート付加を含有するように修飾した（図44および図59）。

【0568】

（実施例12）

rAAVターゲティングベクターの構築およびウイルス產生

図138に記載されているターゲティングベクターは、相同性アームのDNA合成およびmTCR発現カセットのPCR増幅により作製した。合成断片およびmTCRカセットを、制限酵素消化およびAAV-2 ITR配列の2コピー間のpAAV-MCS骨格プラスミド（Agilent）へのライゲーションによりクローニングして、ウイルスパッケージングを促進した。ライゲートしたプラスミドを、One Shot TOP10 Chemically Competent E.coli (Thermo fisher) に形質転換した。EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) を使用して、ベクターごとに1mgのプラスミドDNAを細菌から精製し、感染性rAAVの產生のためにVigene Biosciences, MD USAへ送った。1ml当たり 1×10^{13} ウイルスゲノムコピーを上回る精製ウイルスの力価を決定し、凍結ストックを作製した。

10

【0569】

（実施例13）

rAAVによるT細胞感染

ヒトT細胞を、1細胞当たり 1×10^6 ゲノムコピー／ウイルス粒子の感染多重度（MOI）で精製rAAVに感染させた。適切な容量のウイルスを、10%ヒトAB血清（Sigma）、300単位/m1ヒト組換えIL-2、5ng/m1ヒト組換えIL-7、および5ng/m1ヒト組換えIL-15（Peprotech）を含有するX-VIVO15培養培地（Lonza）に希釈した。希釈したウイルスを、CRISP R試薬による電気穿孔の2時間後に、6ウェルディッシュ中のT細胞に添加した。細胞を、5%CO₂の加湿インキュベーターで30、約18時間インキュベートした後、ウイルス含有培地を、ウイルスなしの上記のような新鮮な培地で置き換えた。T細胞を戻して37でさらに14日間培養した。この間、細胞を一定の時点で解析して、フローサイトメトリーによりmTCR発現（図151、図152、図153）、およびデジタルドロップレットPCR（ddPCR）によりmTCR発現カセットのT細胞DNAへの組込み（図145A、図145B、図147A、図147B、図148A、図148B、図149、図150A、および図150B）を測定した。

20

30

【0570】

（実施例14）

mTCRカセットのヒトT細胞へのddPCR検出

mTCR発現カセットのT細胞標的遺伝子座への挿入は、mTCRカセット内に位置するフォワードプライマー、およびゲノムDNA領域内の右の相同性アームの外側に位置するリバースプライマーを使用してddPCRにより検出し、定量化した。全てのPCR反応は、ddPCR supermix (BIO-RAD、カタログ番号#186-3024) を用いて製造元により指定された条件を使用して行った。PCR反応は、20μl合計容量の液滴内で、以下のPCRサイクル条件：96、10分間の1サイクル；96、30秒間、55～61、30秒間、72、240秒間の40サイクル；98、10分間の1サイクルを使用して行った。デジタルPCRデータは、Quantasoft (BIO-RAD) を使用して解析した。

40

【0571】

（実施例15）

単一細胞RT-PCR

培養液中の単一リンパ球におけるTCRノックイン発現を、単一細胞リアルタイムR

50

T - P C R により評価した。C R I S P R (C I S H K O) / r A A V 操作細胞からの単一細胞内容物を回収した。略述すると、予め滅菌したガラス電極に、A m b i o n S i n g l e C e l l - t o - C T k i t (L i f e T e c h n o l o g i e s , G r a n d I s l a n d , N Y) からの溶解緩衝液を充填し、次いで、培養液中のリンパ球の全細胞パッチを得るために使用した。細胞内内容物（約 4 ~ 5 μ l）を、陰圧を加えてパッチピペットの先端に吸引し、次いで、R N a s e / D N a s e フリーチューブに移した。各チューブの容量を、S i n g l e C e l l D N a s e I / S i n g l e C e l l L y s i s s o l u t i o n を添加して 10 μ l に増やし、次いで、内容物を室温で 5 分間インキュベートした。サーマルサイクラーで逆転写を行なって（25、10 分間、42、60 分間、および 85、5 分間）c D N A 合成後、T C R 遺伝子発現プライマーを、キットからの指示書に基づき前増幅反応ミックスと混合した（95、10 分間、ならびに 95、15 秒間、60、4 分間、および 60、4 分間の 14 サイクル）。前増幅段階からの産物を、リアルタイム R T - P C T 反応に使用した（50、2 分間、95、10 分間、ならびに 95、5 秒間、および 60、1 分間の 40 サイクル）。リアルタイム R T - P C R からの産物を、1 μ l / m l 臭化エチジウムを含有する 3 % アガロースゲルでの電気泳動により分離した。
10

【 0 5 7 2 】

結果

単一細胞 R T - P C R データは、C R I S P R および r A A V 修飾後、T リンパ球が、電気穿孔および遺伝子導入後 7 日目に（図 156、図 157A、図 157B、図 158、および図 159B）、25 % で（図 159A）外因性 T C R を発現したことを示した。
20

【 0 5 7 3 】

（実施例 16）

G U I D E - S e q ライブライアリーアダプター調製

ゲノム D N A を、トランスフェクト対照（非トランスフェクトおよび外因性 T C R を有する r A A V との C R I S P R トランスフェクト細胞から単離した。8 p m d s T C R ドナーまたは 16 p m o l d s T C R ドナーを利用する遺伝子導入を比較した。固相可逆性固定化磁気ビーズ（A g e n c o u r t D N A d v a n c e ）を使用して単離したヒト T 細胞を、C o v a r i s S 2 0 0 装置で 5 0 0 b p の平均長にせん断し、末端修復し、A テール付加し、8 - n t ランダム分子指標を組み込む半機能的アダプターにライゲートした。オリゴタグに相補的なプライマーによる 2 ラウンドのネステッドアンカ - P C R を、標的濃縮のために使用した。末端修復サーモサイクルプログラム：12、15 分間、37、15 分間；72、15 分間；4 で保持する。
30

【 0 5 7 4 】

ゲノムにマッピングし戻された G U I D E - S e q リードの開始部位は、D S B の位置特定を数塩基対内で可能にする。製造元の指示書に従い、I l l u m i n a L i b r a r y Q u a n t i f i c a t i o n k i t 用の K a p a B i o s y s t e m s k i t を使用してライブライアリーアダプターを定量する。各試料について q P C R ランにより与えられる、1 u L 当たりの分子数の推定量の平均を使用して、次にライブライアリーアダプターの全セットを 1.2 \times 10¹⁰ 分子に正規化するように進め、シーケンシングのために一緒にプールされるライブライアリーアダプター数で除する。これは、各試料についての分子ごとのインプットを与え、およびまた、各試料についての容量ごとのインプットも与えた。本発明者らが G U I D E - S e q により評価した、切断 g R N A により誘導される 3 つの R G N のオンターゲットおよびオフターゲット部位のマッピングリードを示す。全ての場合において、標的部位配列を x 軸の左側のプロトスペーサー配列および右側の P A M 配列と共に示す。I l l u m i n a M i s e q R e a g e n t K i t V 2 によるシーケンシングのための I l l u m i n a の標準的なプロトコールに従い（300 サイクル（2 \times 150 b p のペアエンド）、ライブライアリーアダプターを変性させ、M i s e q にロードする。図 154 は、代表的な G U I D E - S e q 実験のデータを示す。
40

【表12】

表12. PD-1、CTLA-4、AAVS1、またはCISH遺伝子をターゲティングする修飾gRNAの配列表

配列番号	gRNA	5'～3'の配列
154	PD-1 gRNA #2	gcctgctcggtgaccgaagguuuuagagcuagaaauagcaaguuaa aauaaggcuaguccguuaucacuugaaaaaguggcaccgagucgg ugcuuuu
155	PD-1 gRNA #6	gacggaagcggcagtcctggcguuuuagagcuagaaauagcaaguua aauaaggcuaguccguuaucacuugaaaaaguggcaccgagucg gugcuuuu
156	CTLA4 gRNA #3	gctagatgattccatctgcacguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaa auaaggcuaguccguuaucacuugaaaaaguggcaccgagucgg gcuuuu
157	CTLA4 gRNA #2	gtcgccaaacctacatgatgguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaa auaaggcuaguccguuaucacuugaaaaaguggcaccgagucgg gcuuuu
158	CISH gRNA #2	gggttccattacggccagcgguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaa auaaggcuaguccguuaucacuugaaaaaguggcaccgagucgg gcuuuu
159	AAVS1	gtcaccaatcctgtcccttagguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaa uaaggcuaguccguuaucacuugaaaaaguggcaccgagucggug cuiuuu

10

20

【表13-1】

表13. ベクター構築物

配列番号	構築物	5'～3'の配列

【表 1 3 - 2】

【表 1 3 - 3】

【表 1 3 - 4】

【表 1 3 - 5】

【表 1 3 - 6】

【表 1 3 - 7】

【表 1 3 - 8】

【表 1 3 - 9】

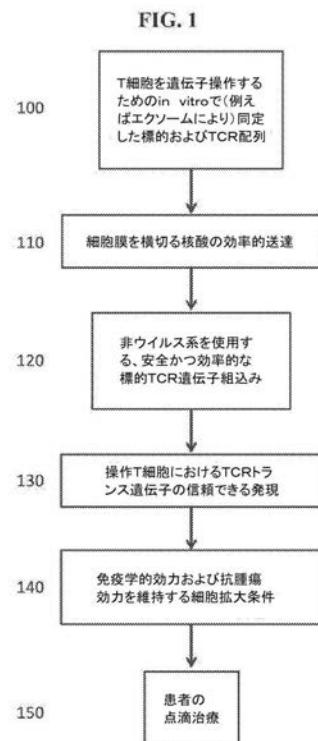
【表 13-10】

【表 13-11】

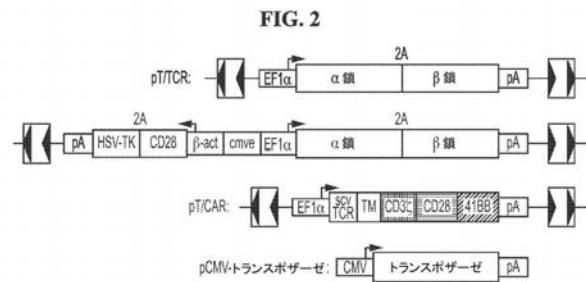
【表 13-12】

【表 13-13】

【図1】

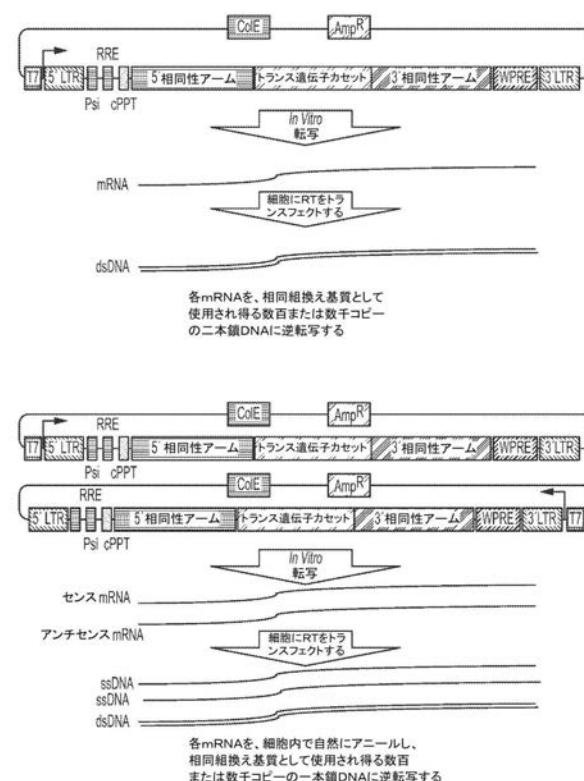


【図2】

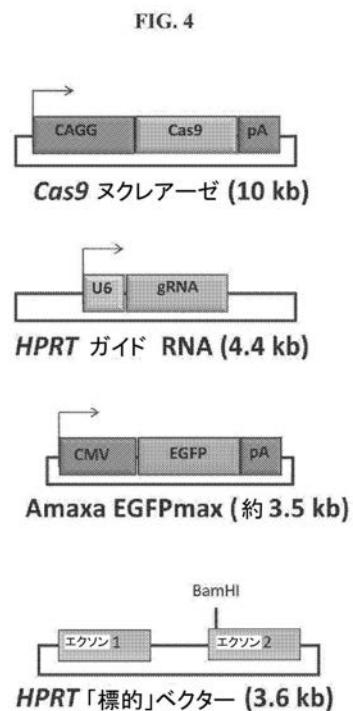


【図3】

FIG. 3

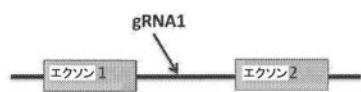
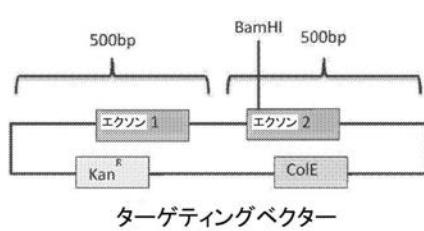


【図4】



【図5】

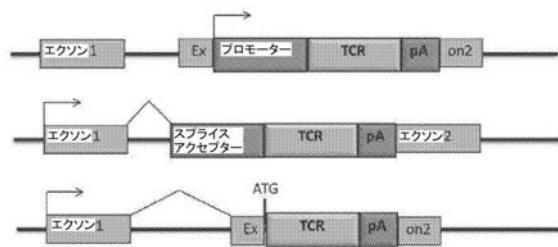
FIG. 5



HPRT ゲノム領域

【図6】

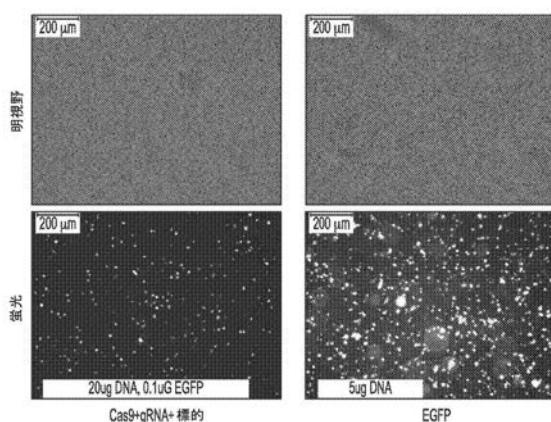
FIG. 6



- (1) 外因性プロモーターにより転写されるTCRトランス遺伝子
- (2) スプライシングを介して内因性プロモーターにより転写されるTCRトランス遺伝子
- (3) インフレーム翻訳を介して内因性プロモーターにより転写されるTCRトランス遺伝子

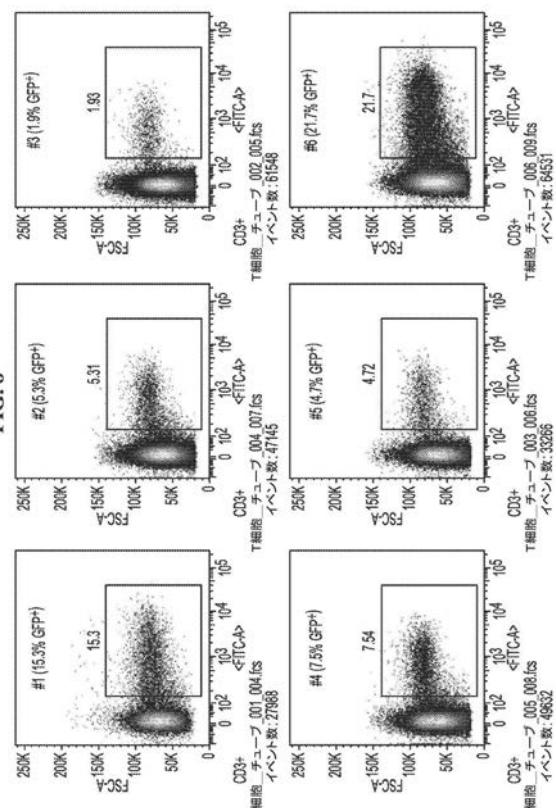
【図7】

FIG. 7



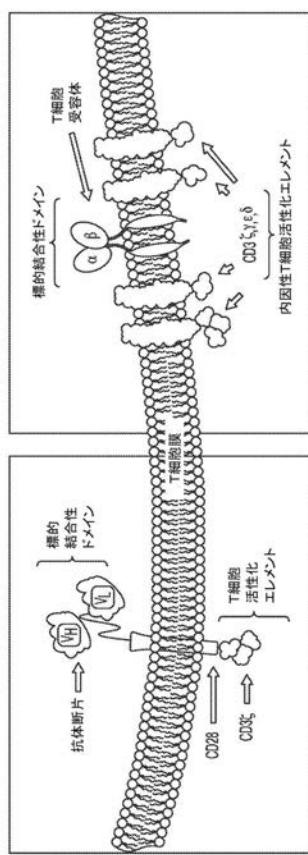
【図8】

FIG. 8



【図 9】

FIG. 9



【図 10】

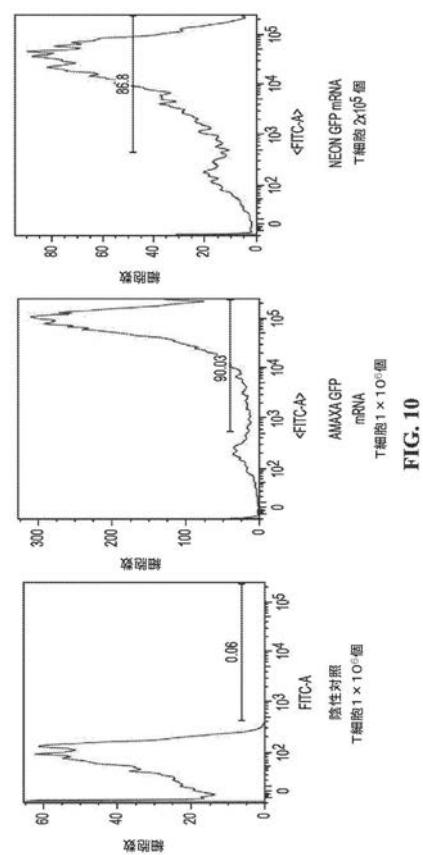
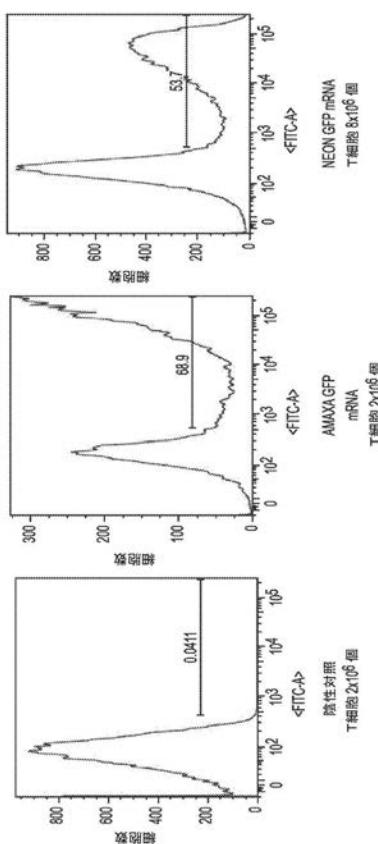


FIG. 10

【図 11】

FIG. 11



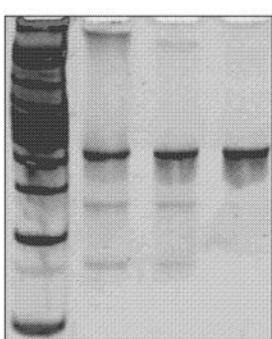
【図 12】

	HPRT	AV/SI	CCR5	PD1	CTLA4
gRNA#1	27.65%	32.99%	21.47%	10.83%	40.96%
gRNA#2	<1%	30.04%	27.10%	>60%	56.10%
gRNA#3	<1%	39.82%	55.98%	37.42%	39.33%
gRNA#4	<5%	25.89%	45.99%	20.87%	40.13%
gRNA#5	<1%	27.55%	36.07%	30.60%	15.90%
gRNA#6	<5%	39.62%	33.17%	25.91%	36.93%

FIG. 12

【図 1 3】

FIG. 13



レーン 1: ラダー
レーン 2: Cas9+gRNA
レーン 3: Cas9+gRNA
レーン 4: Cas9 単独对照

【図 1 4】

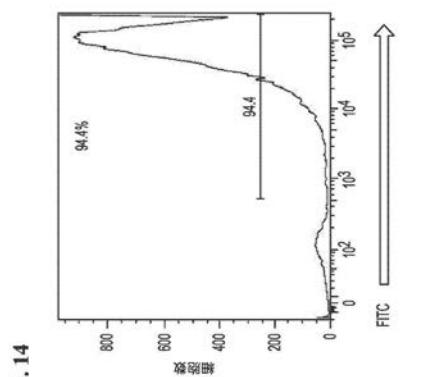
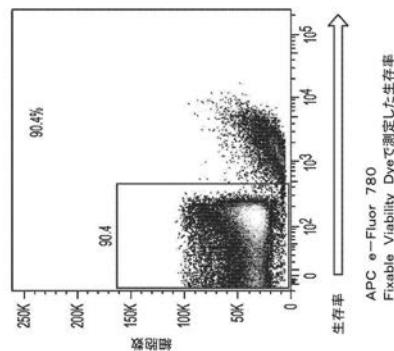


FIG. 14



APC-eFluor 780
Fixable Viability Dyeで測定した生存率

【図 1 5】

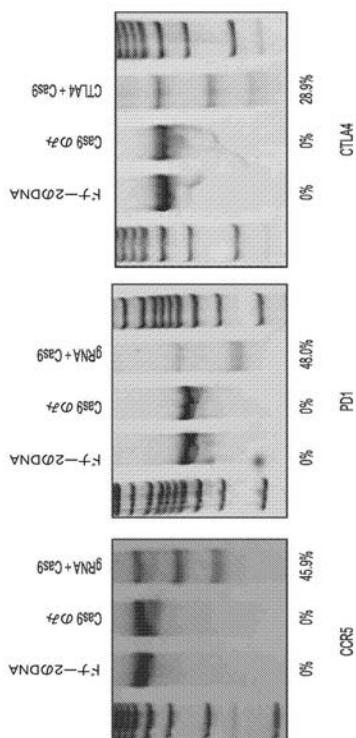


FIG. 15

【図 1 6】

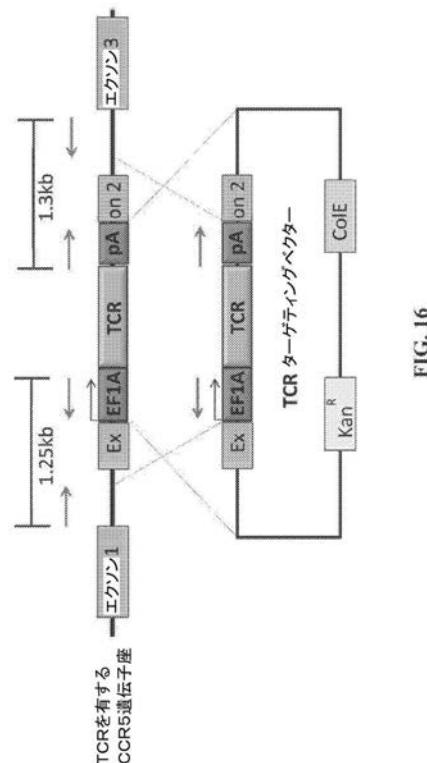


FIG. 16

【図 17】

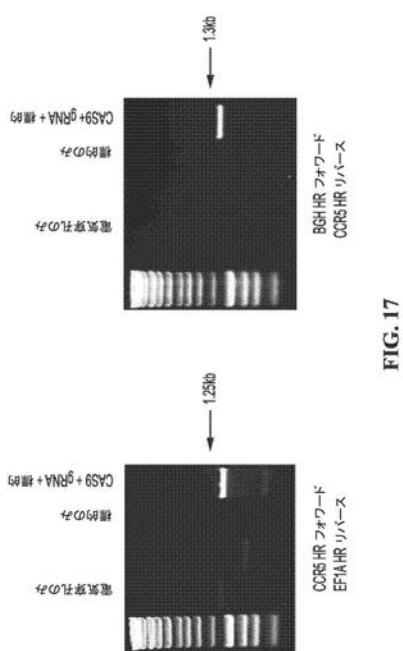
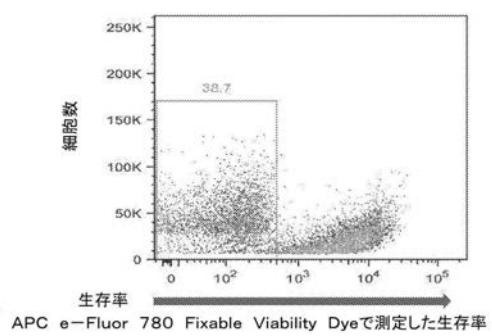


FIG. 17

【図 18】

FIG. 18



APC e-Fluor 780 Fixable Viability Dyeで測定した生存率

【図 19】

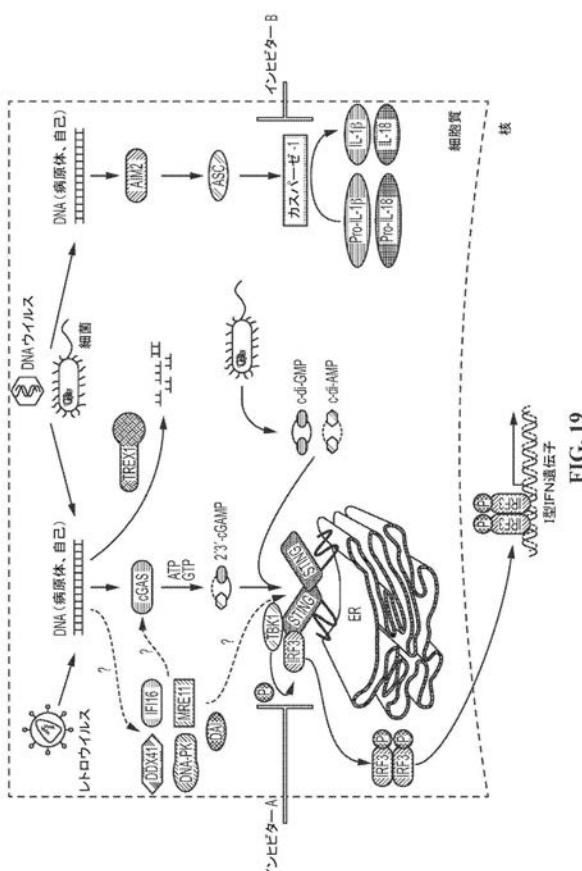
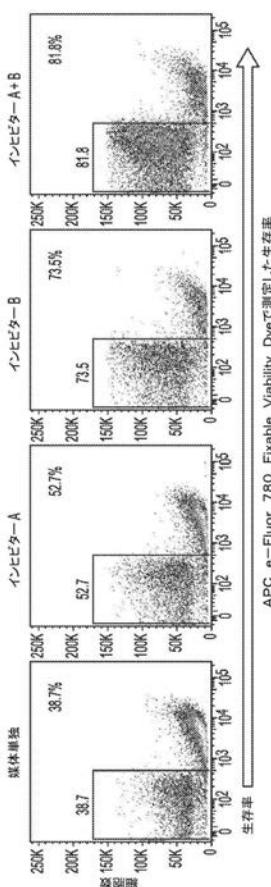


FIG. 19

【図 20】

FIG. 20



APC e-Fluor 780 Fixable Viability Dyeで測定した生存率

【図 2 1】

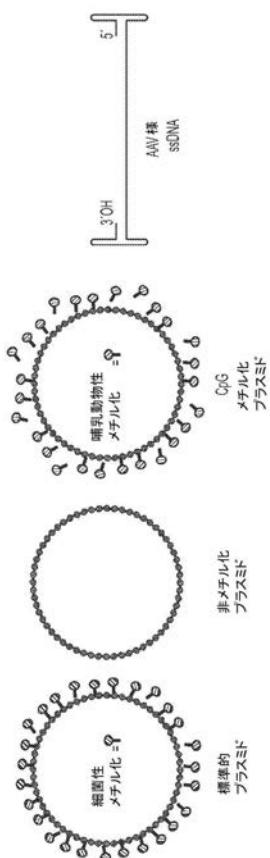


FIG. 21

【図 2 2】

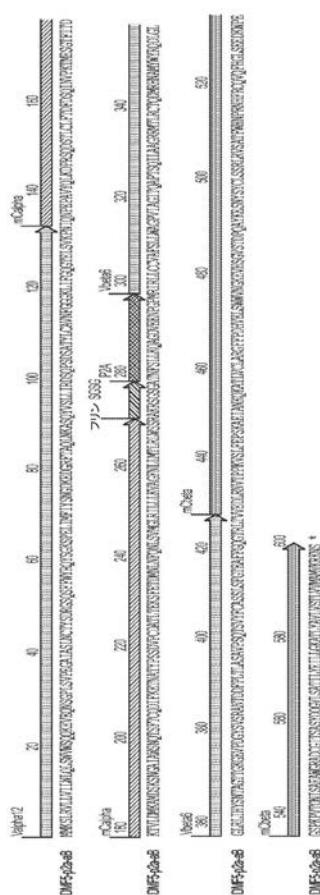


FIG. 22

【図 2 3】

FIG. 23 A

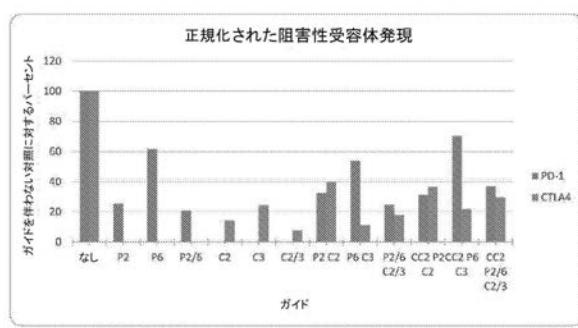
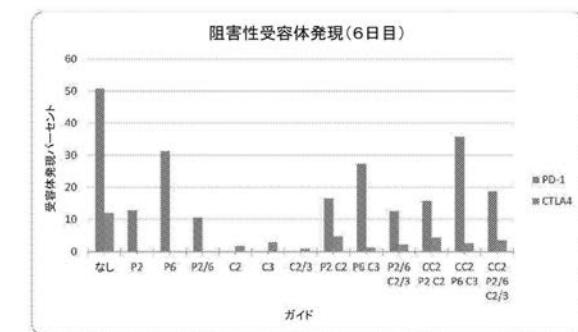


FIG. 23 B

【図 2 4】

FIG. 24 A

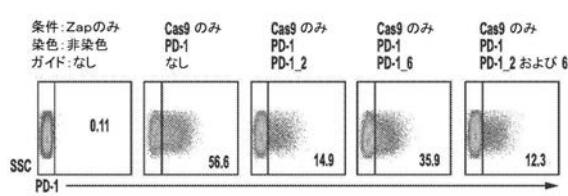
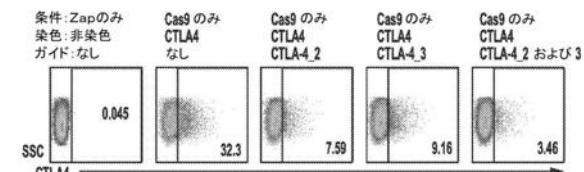
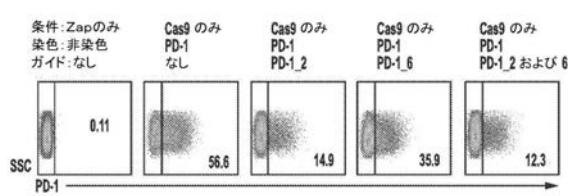
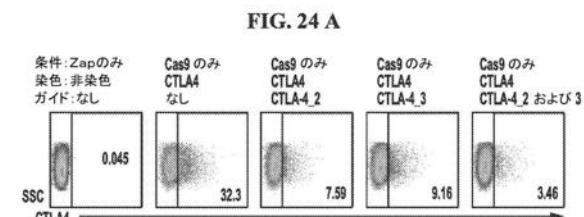


FIG. 24 B



【図 25】

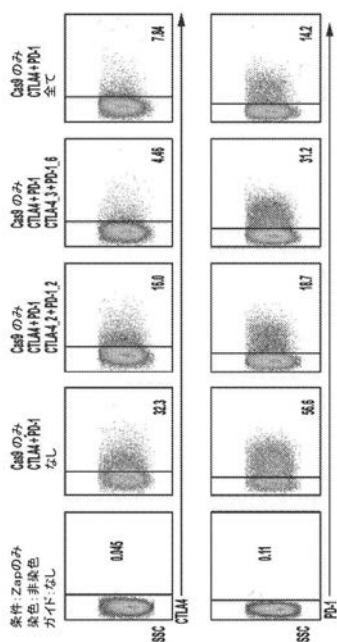
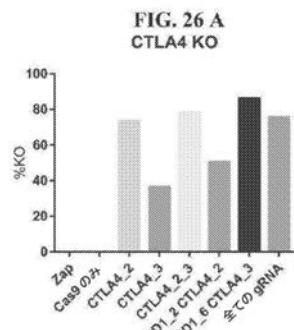


FIG. 25

【図 26】



PD1 KO

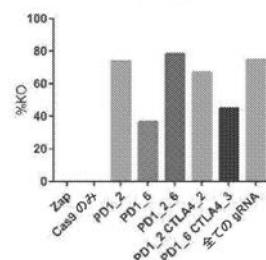
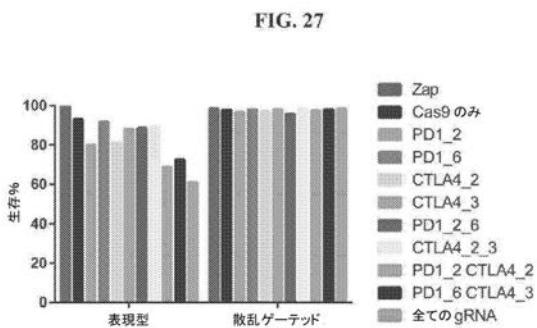
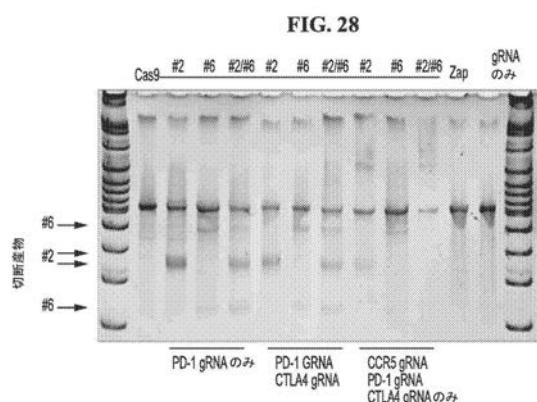


FIG. 26 B

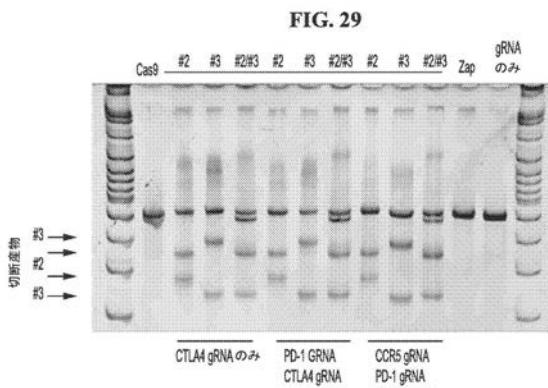
【図 27】



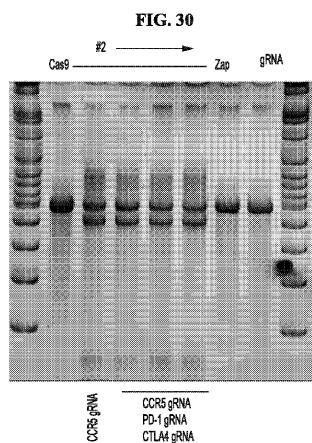
【図 28】



【図 29】



【図30】



【 図 3-1 】

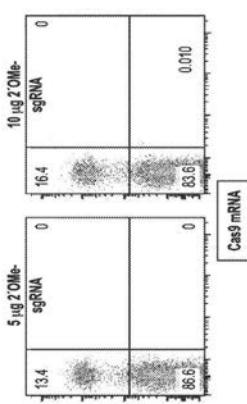


FIG. 31

【図32】

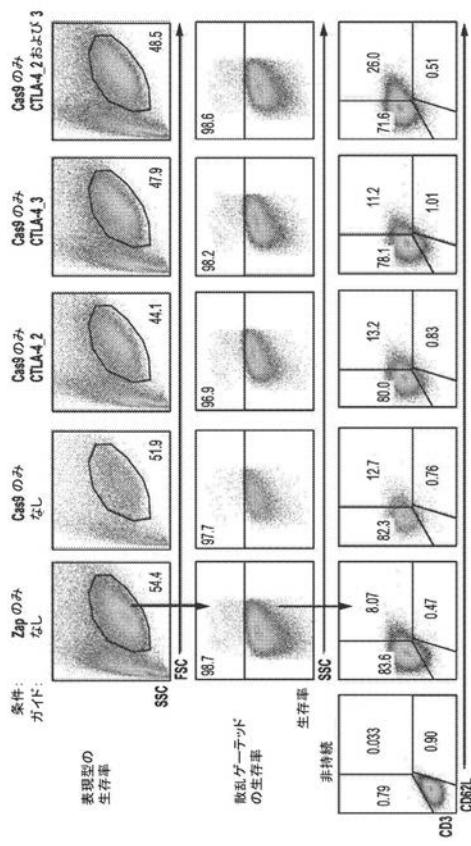


FIG. 32

【図33】

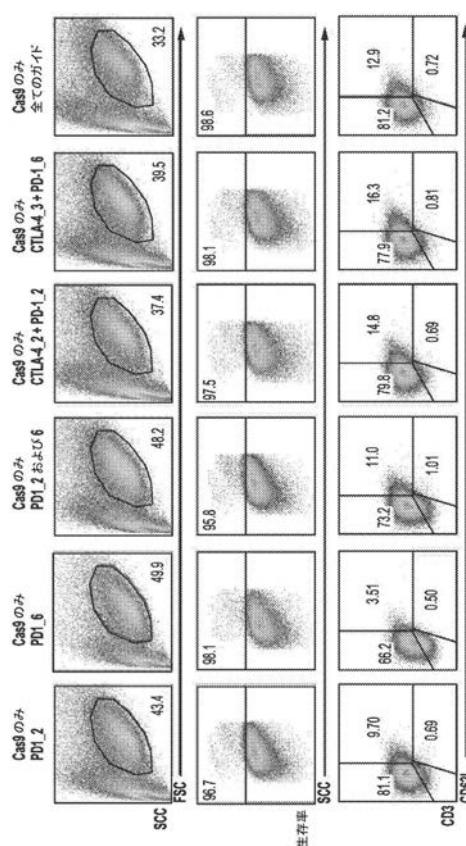


FIG. 33

【図 3 4】

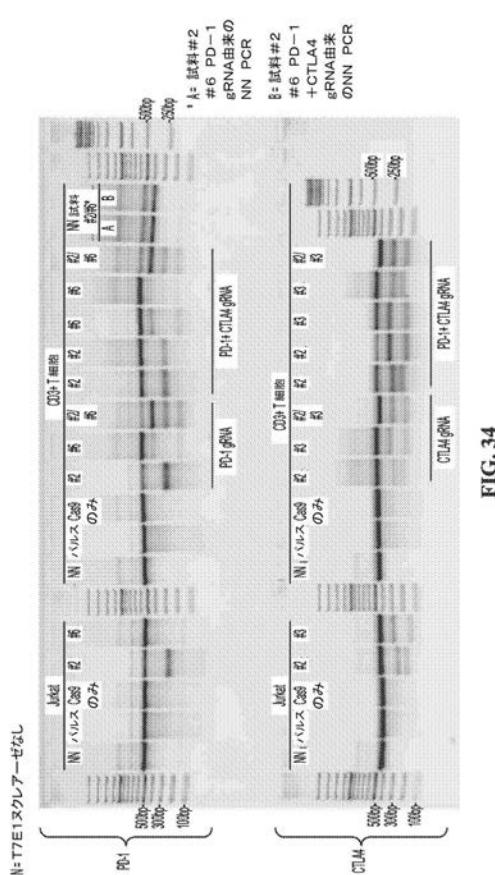
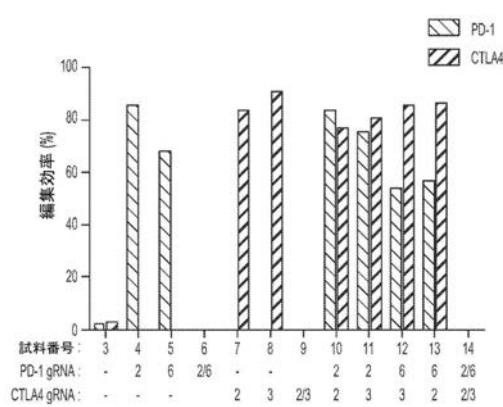


FIG. 34

【図 3 5】

FIG. 35



* 1遺伝子当たり2ガイドを有する試料は
TIDE解析に適合しない。

【図 3 6】

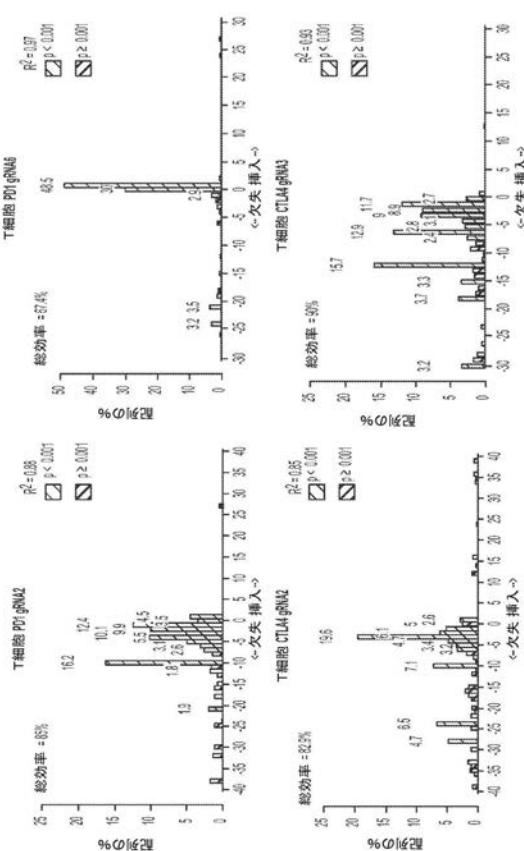


FIG. 36

【図 3 7】

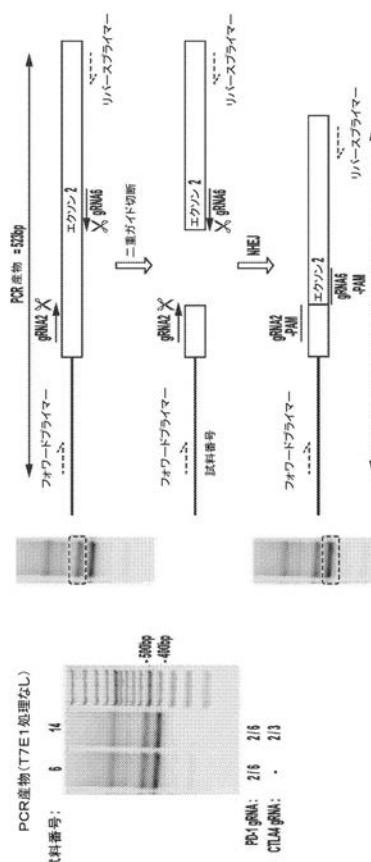


FIG. 37

【図 38】

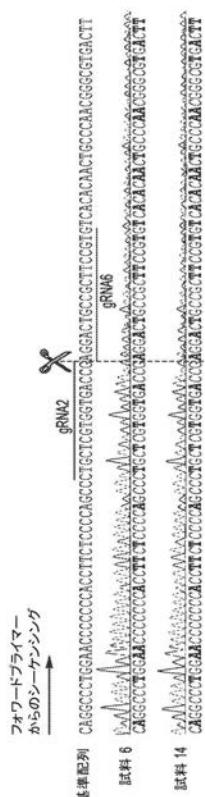


FIG. 38

【図 39】

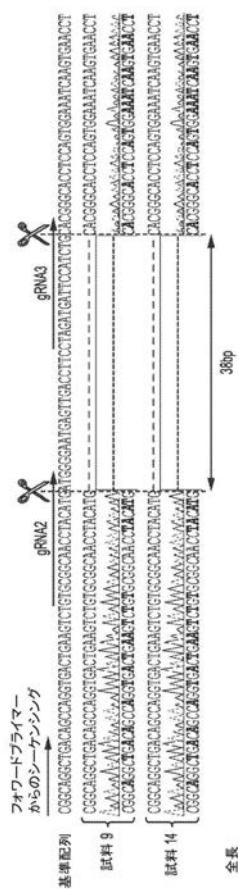
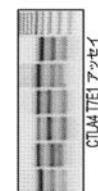


FIG. 39



【図 40】

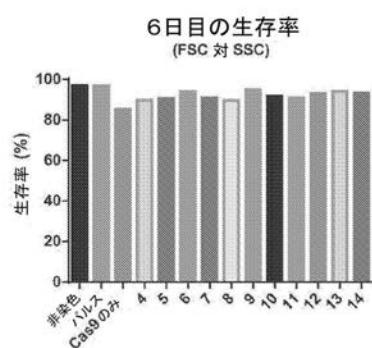


FIG. 40 A

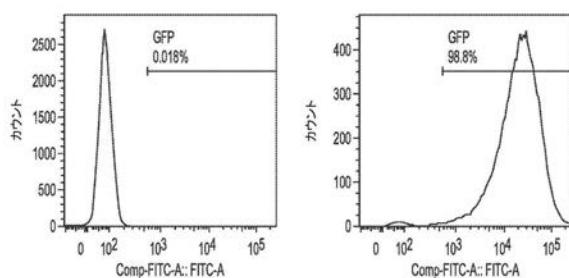


FIG. 40 B

【図 41】

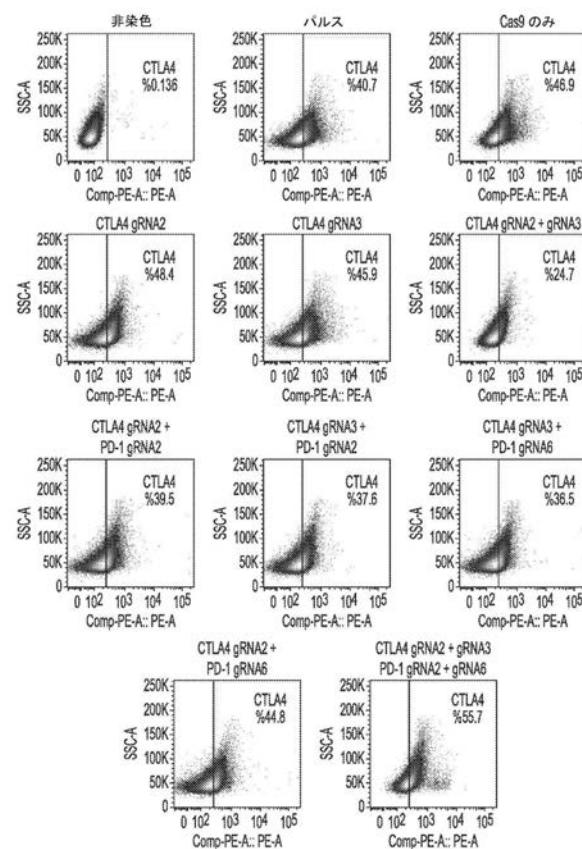


FIG. 41

【図 46】

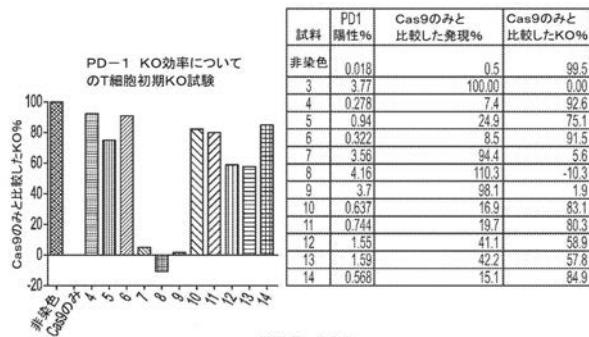


FIG. 46 A

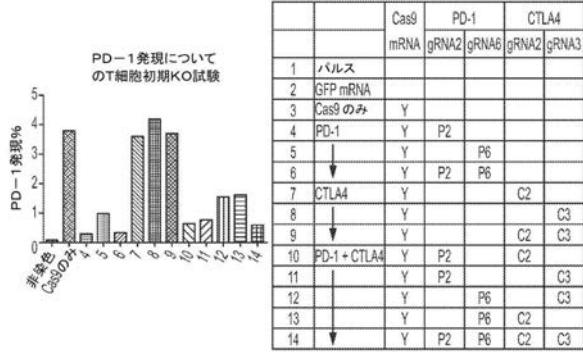


FIG. 46 B

【図 47】

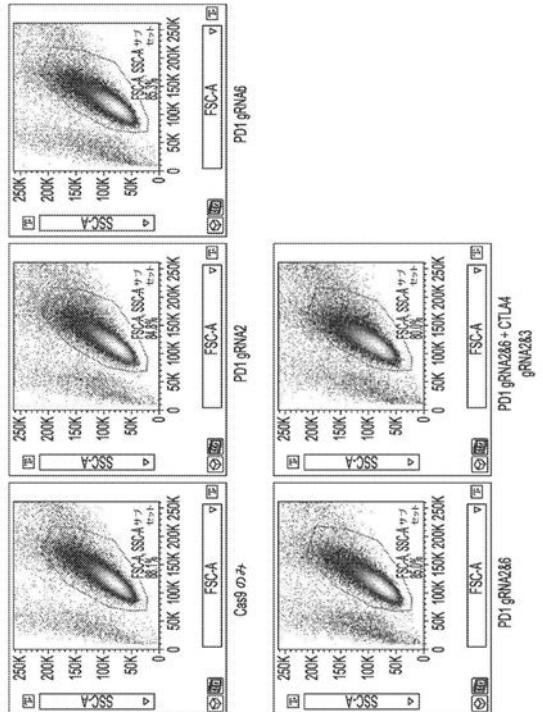


FIG. 47

【図 48】

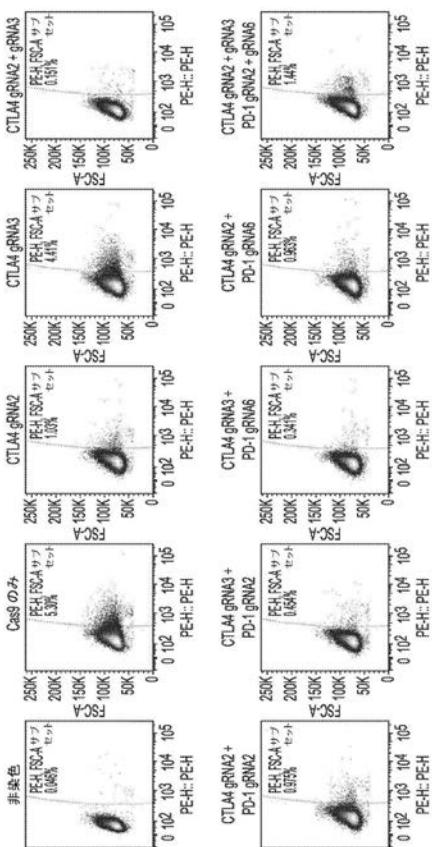


FIG. 48

【図 49】

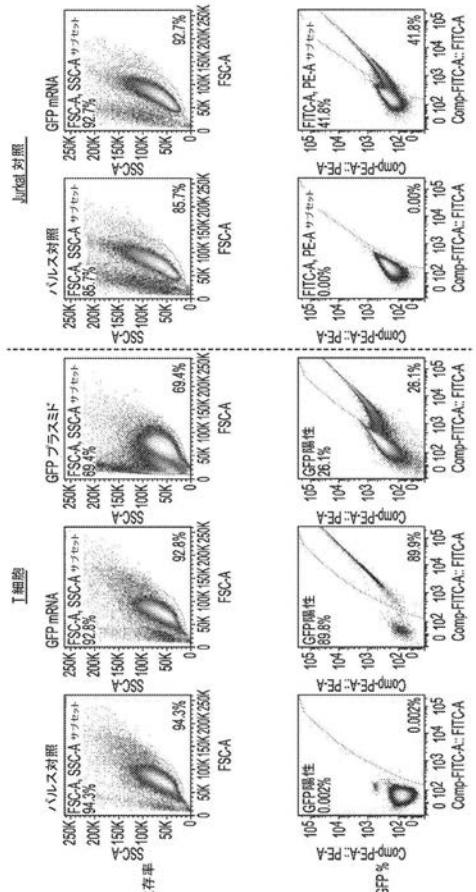


FIG. 49

【図 5 0】

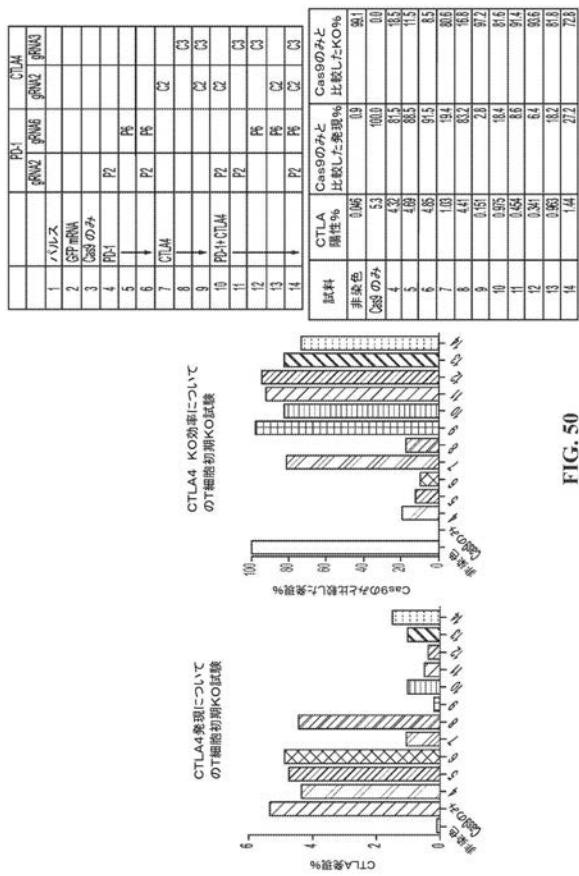


FIG. 50

【図52】

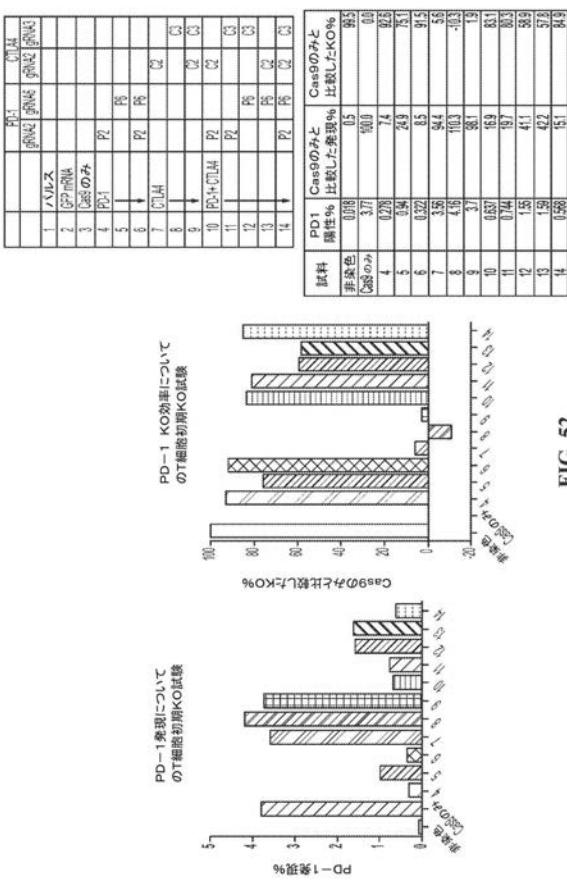


FIG. 52

【 図 5 1 】

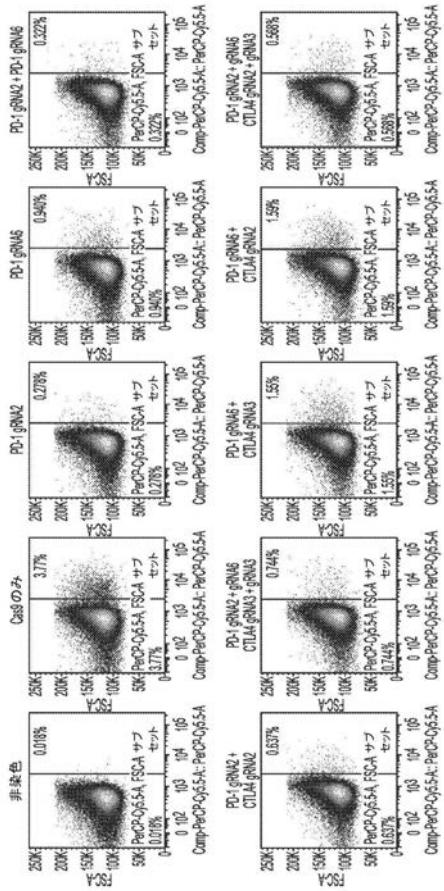
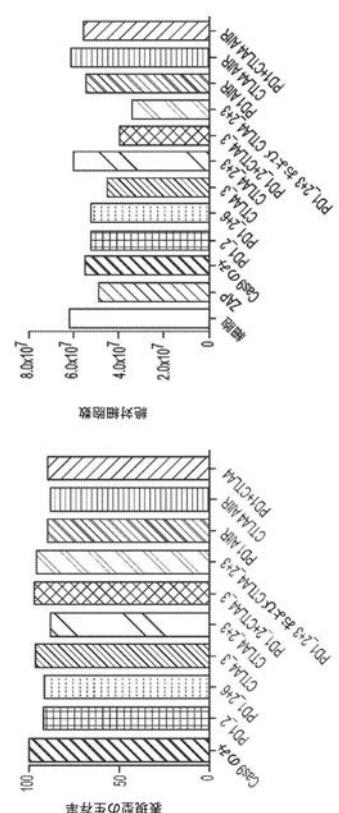


FIG. 51

【 囮 5 3 】



EIC 53

【図 5 4】

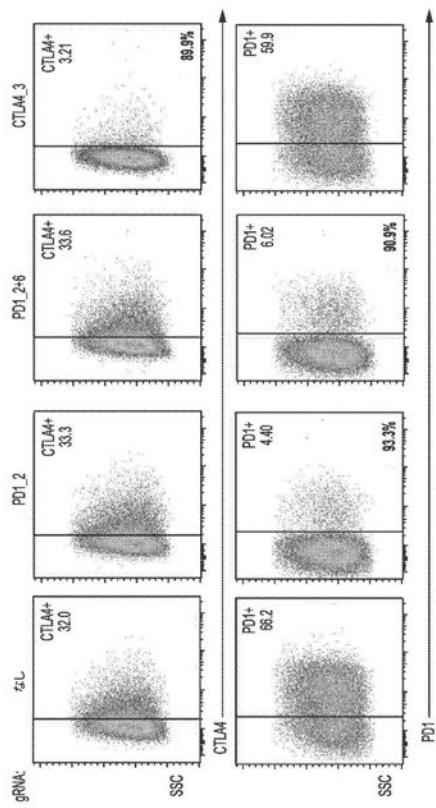


FIG. 54

【図 5 5】

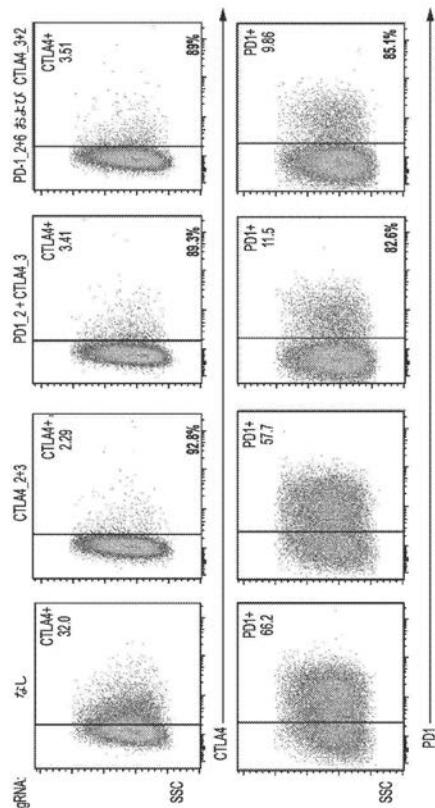


FIG. 55

【図 5 6】

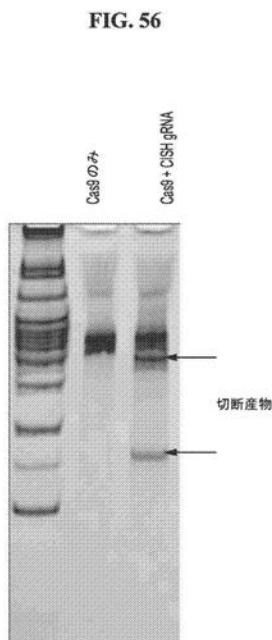


FIG. 56

【図 5 7】

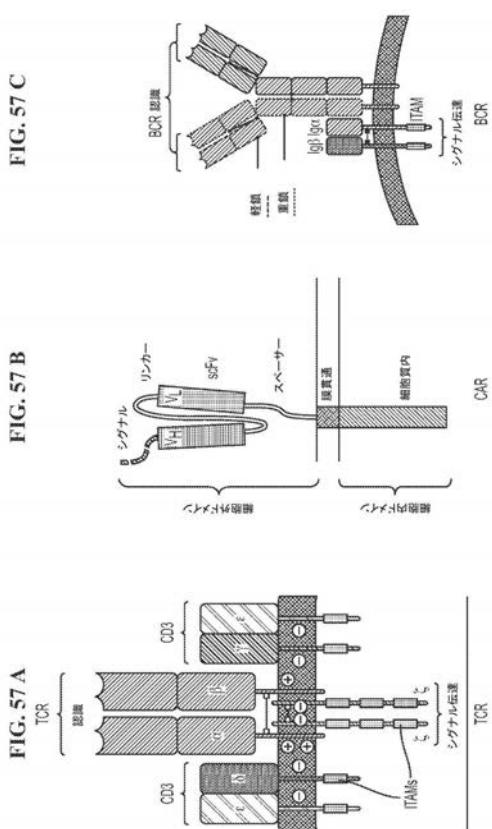


FIG. 57 C

FIG. 57 B

FIG. 57 A

【図 5 8】

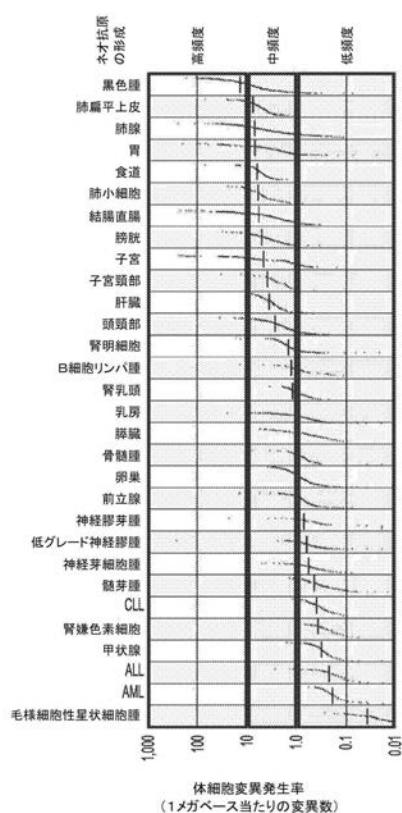
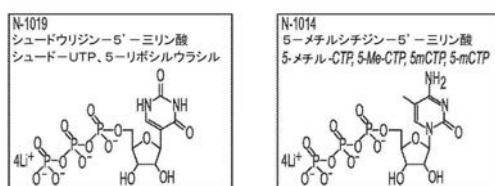


FIG. 58

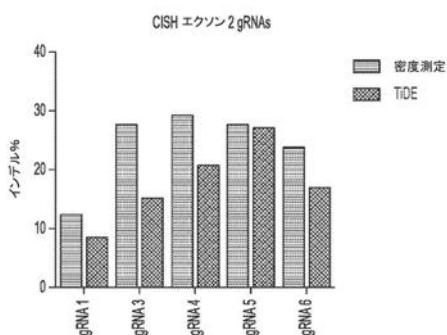
【図 5 9】

FIG. 59

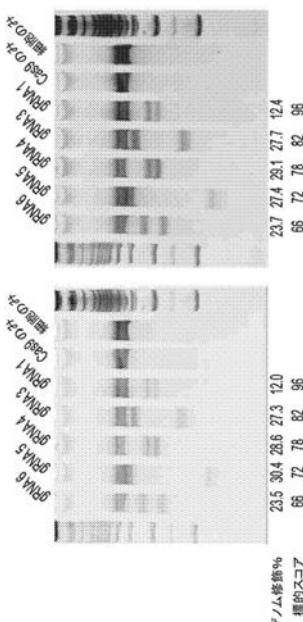


【図 6 0】

FIG. 60



【図 6 1】



【図 6 2】

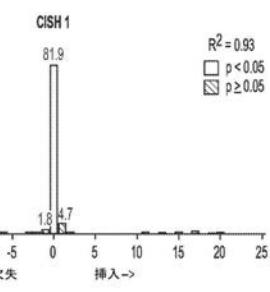


FIG. 62 A

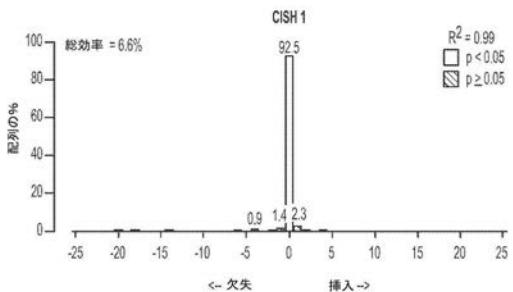


FIG. 62 B

【図 6 3】

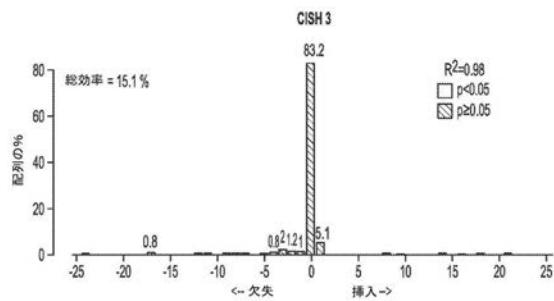


FIG. 63 A

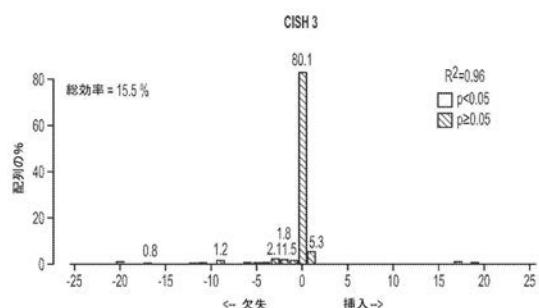


FIG. 63 B

【図 6 4】

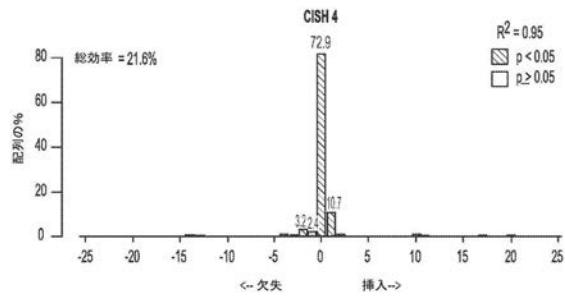


FIG. 64 A

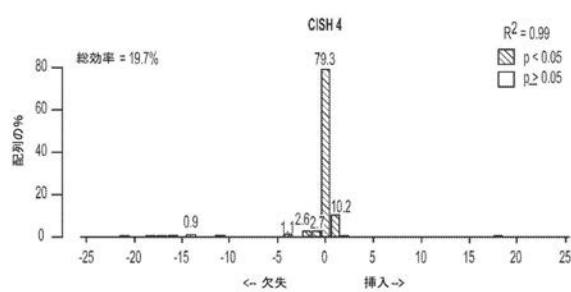


FIG. 64 B

【図 6 5】

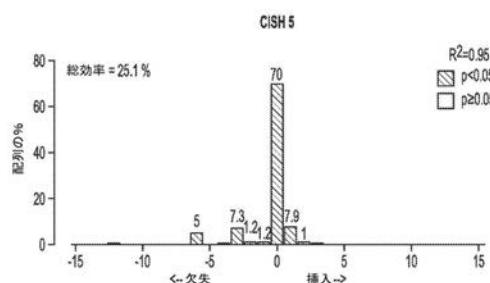


FIG. 65 A

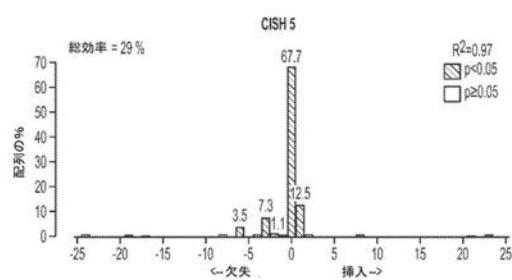


FIG. 65 B

【図 6 6】

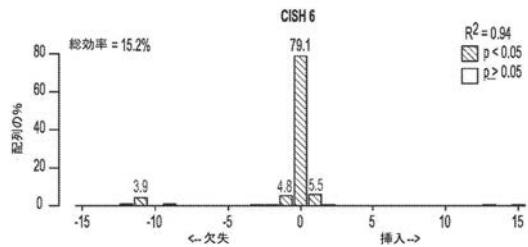


FIG. 66 A

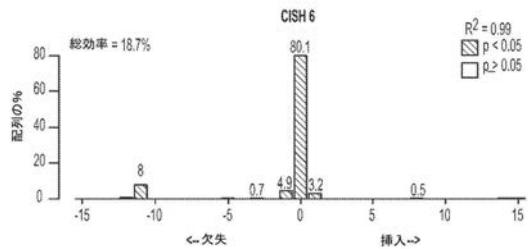
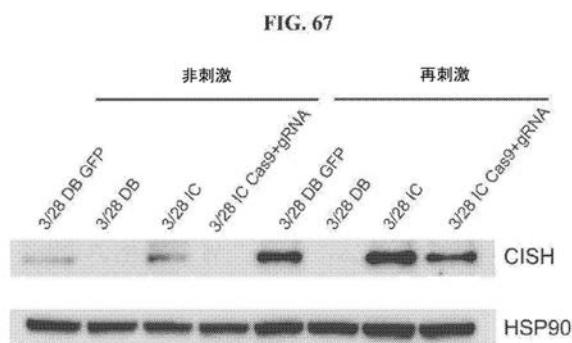


FIG. 66 B

【図 6 7】



IC = Immunocult (Stem Cell Technologies)
DB = Dynabeads

【図 6 8】

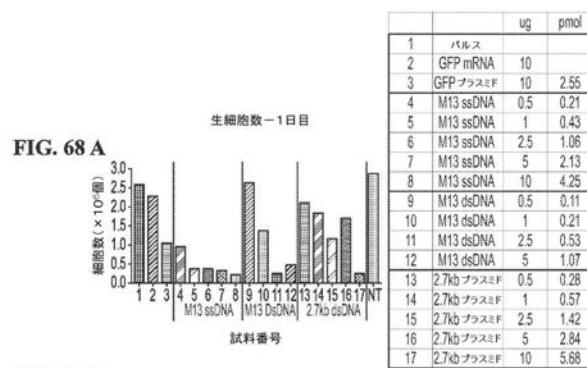


FIG. 68 B

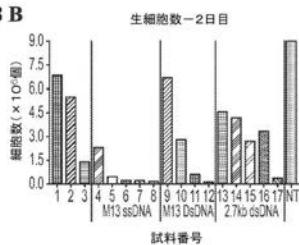
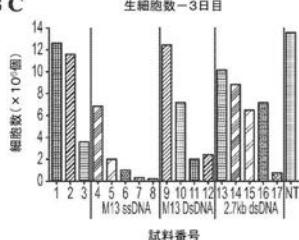
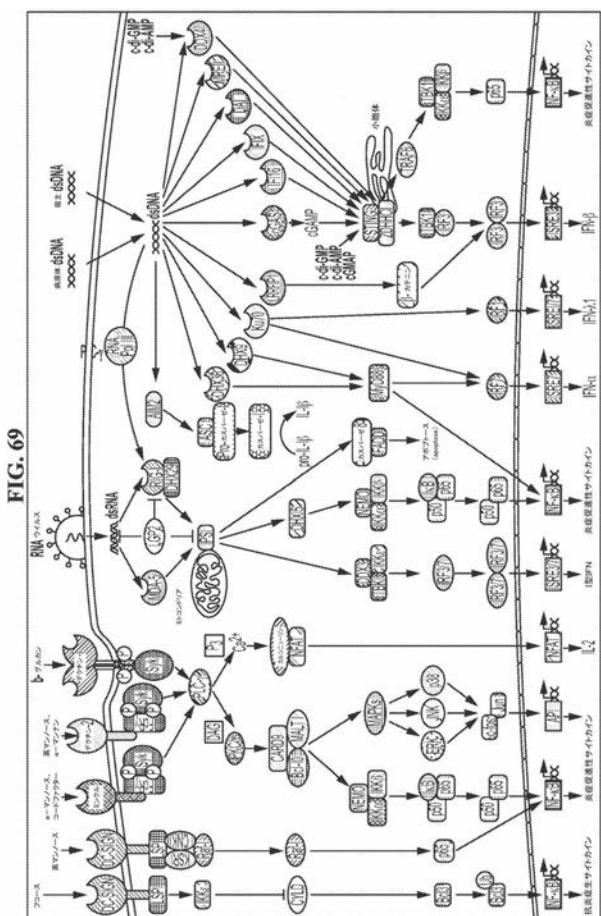


FIG. 68 C



【図 6 9】



【図 7 0】

FIG. 70 A

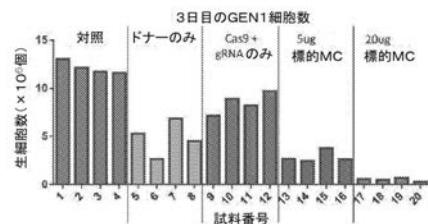
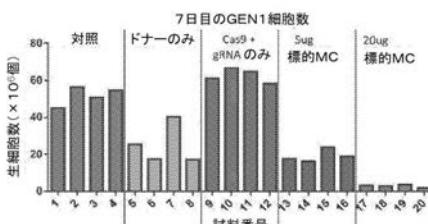
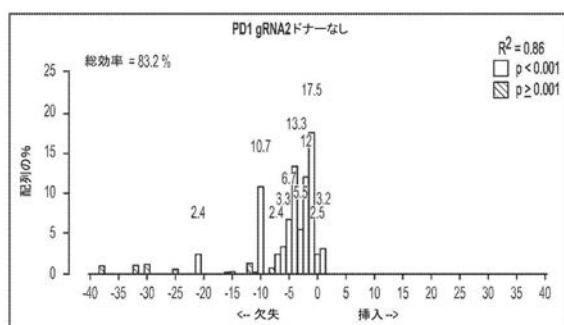


FIG. 70 B



【図 7 1】

FIG. 71 A



【図 7 2】

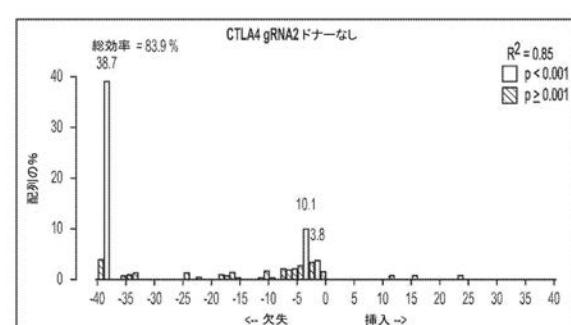


FIG. 72 A

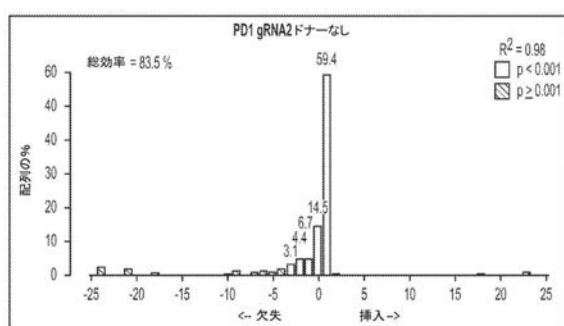


FIG. 71 B

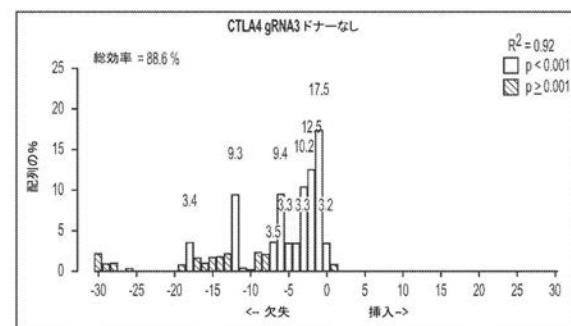


FIG. 72 B

【図 7 3】

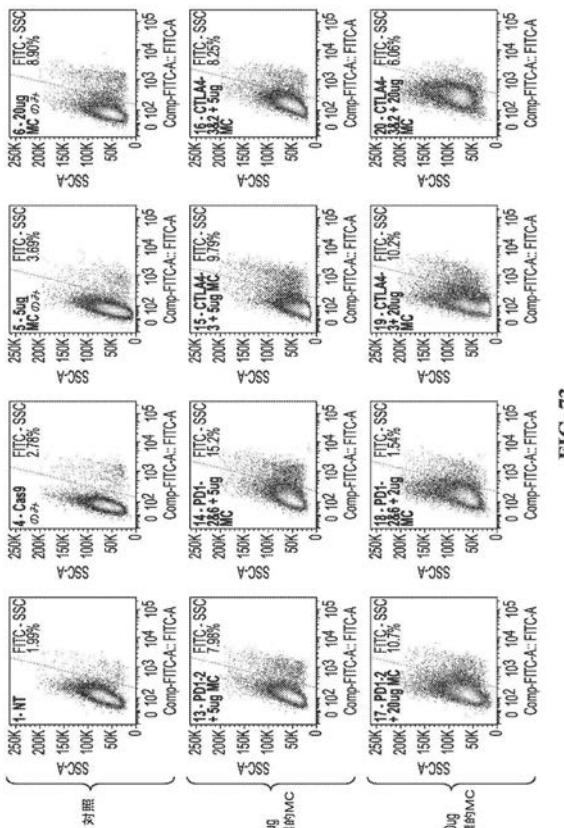
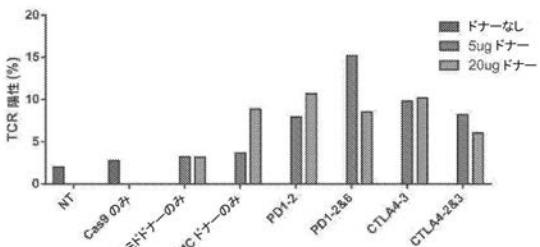


FIG. 73

【図 7 4】

FIG. 74



【図 75】

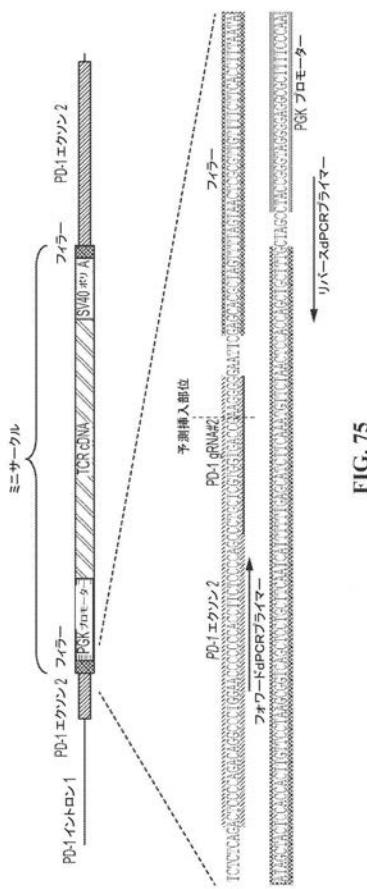
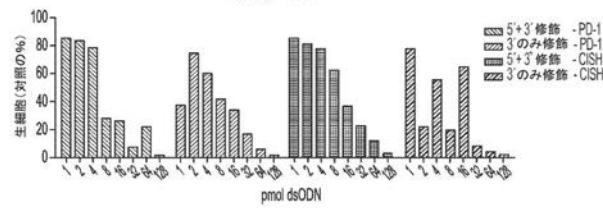


FIG. 75

【図 76】

FIG. 76 A

GUIDE-seqオリゴ投与試験
細胞数=4日目



$R^2 = 0.62$
 $\square p < 0.001$
 $\blacksquare p \geq 0.001$

PD-1 gRNA#2
総効率 =
56.4%

CISH gRNA#2
総効率 =
85.1%

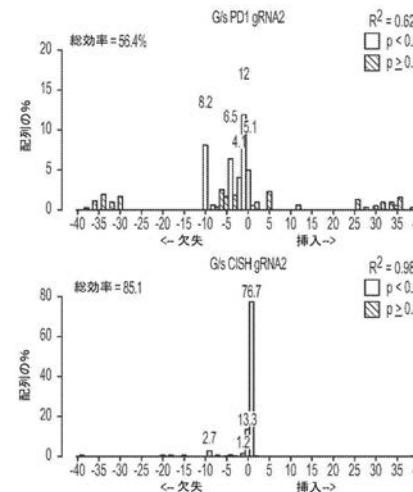


FIG. 76 B

【図 77】

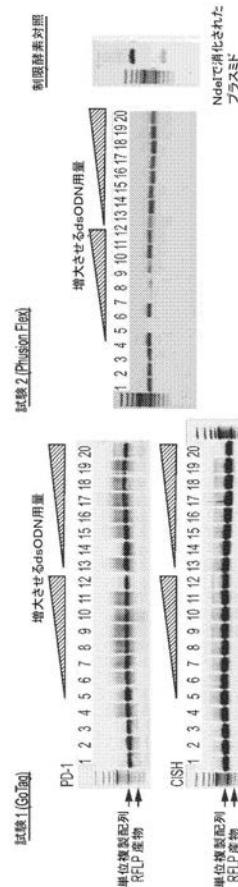


FIG. 77

【図 78】

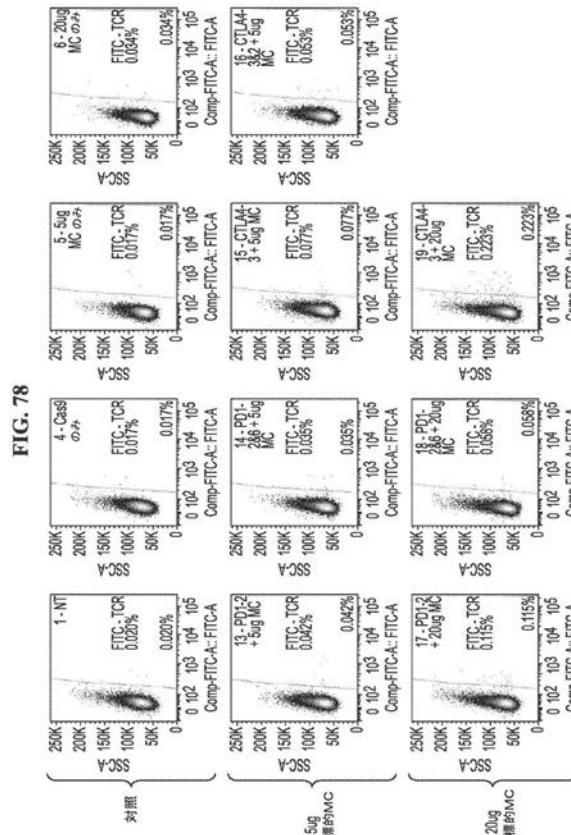
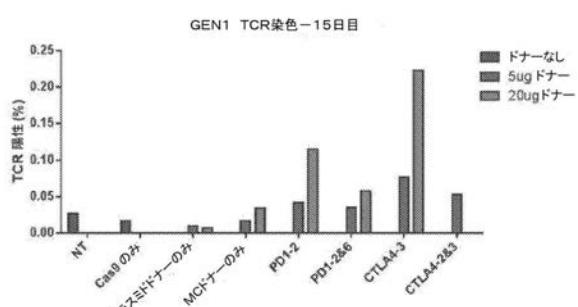


FIG. 78

【図 7 9】

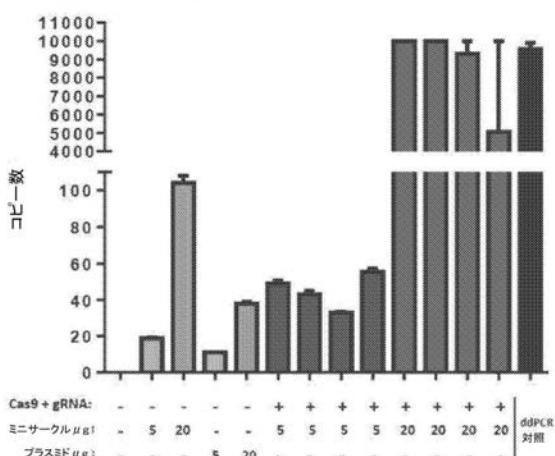
FIG. 79



【図 8 0】

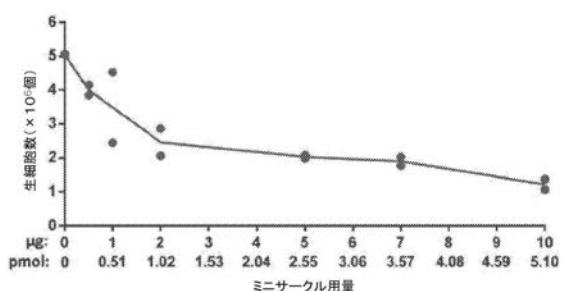
FIG. 80

m T C R b d d P C R - 4日目



【図 8 1】

FIG. 81 A



【図 8 2】

FIG. 82 A

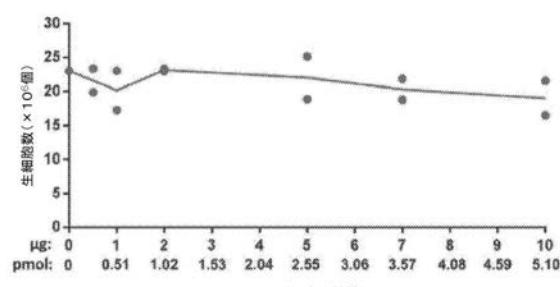
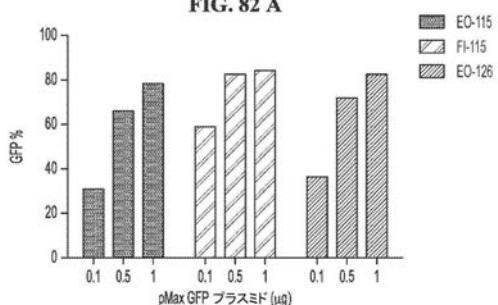


FIG. 81 B

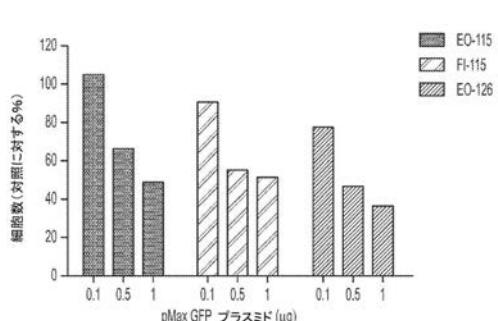


FIG. 82 B

【図 8 3】

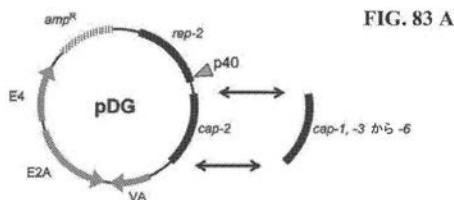


FIG. 83 A

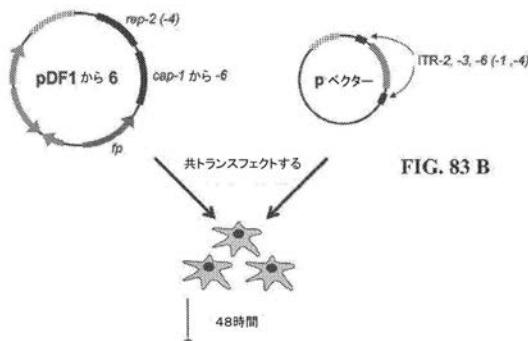
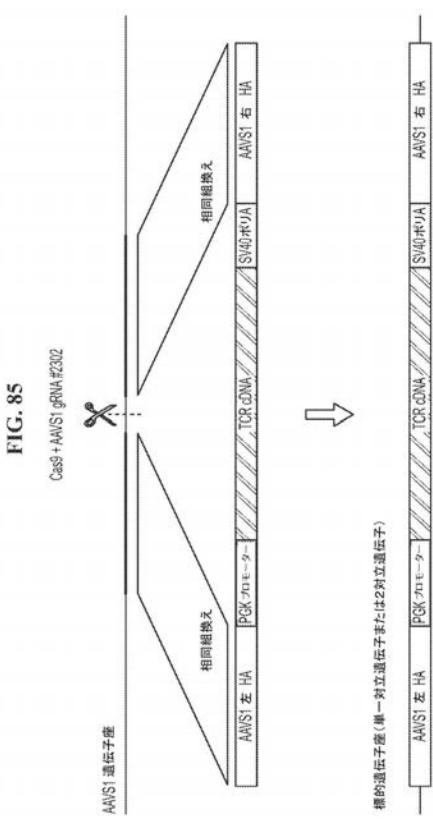


FIG. 83 R

ウイルスを採取し、市販のキット(Virapur)を使用して精製する

【 図 8 5 】



【 図 8 4 】



FIG. 84

【 四 8 6 】

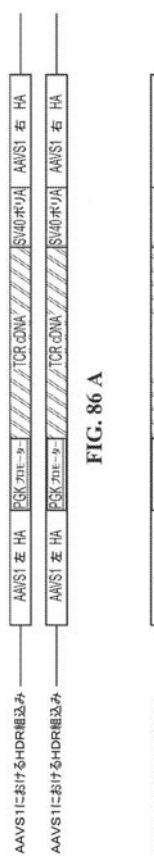


FIG. 86 A

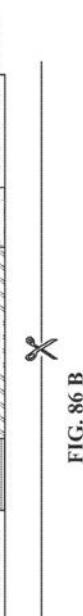


FIG. 86 B

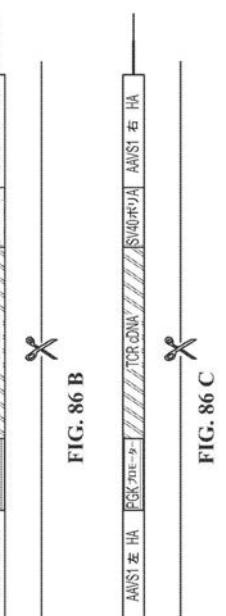
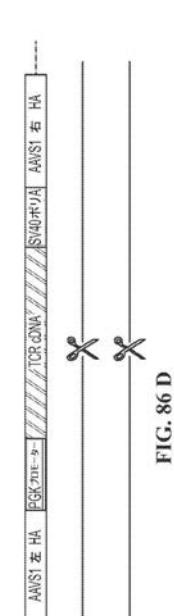
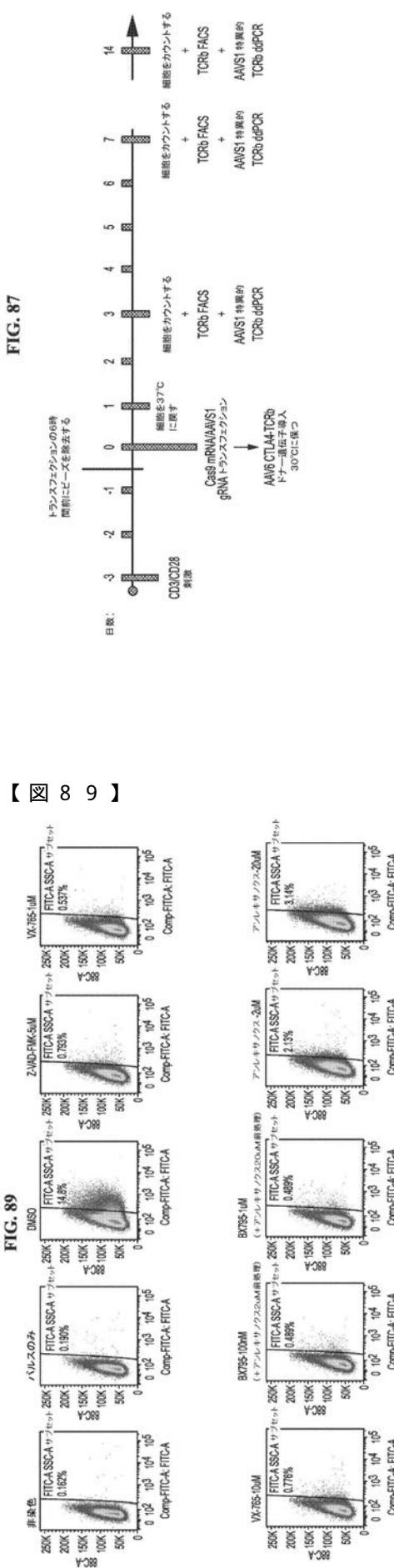


FIG. 86 C



AAVS1におけるNHEJ性
ランダム組込み

【 図 8 7 】



【 図 8 8 】

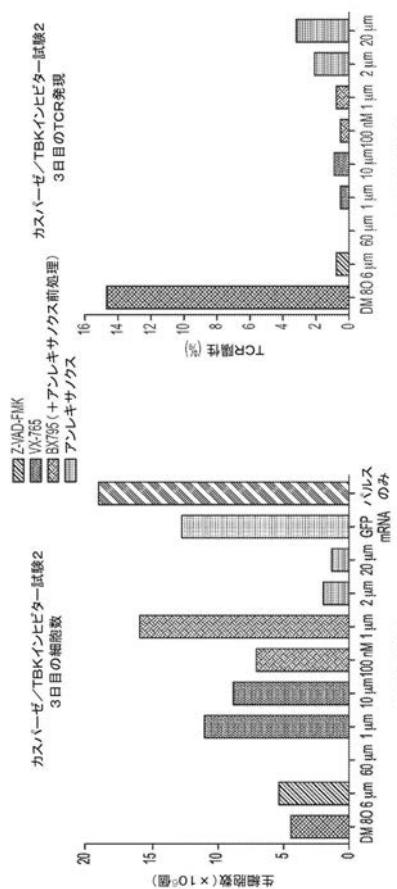
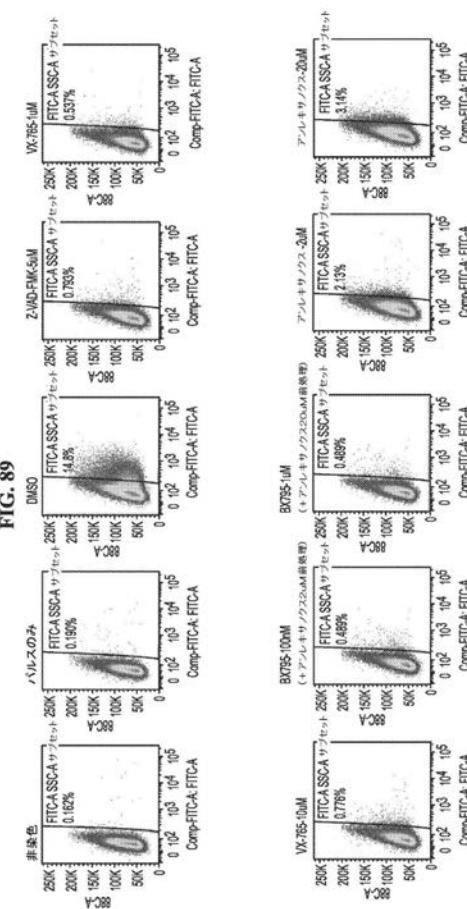


FIG. 88 B

【図 8 9】



【 図 9 0 】

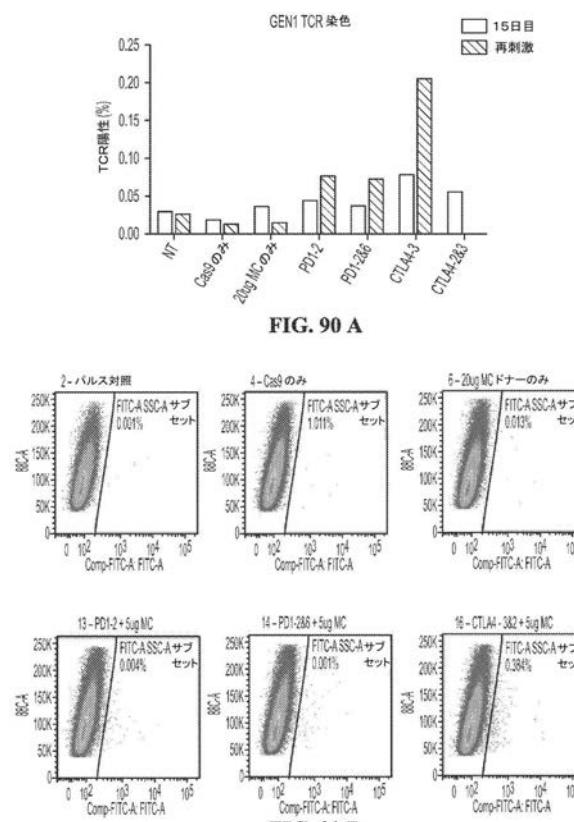
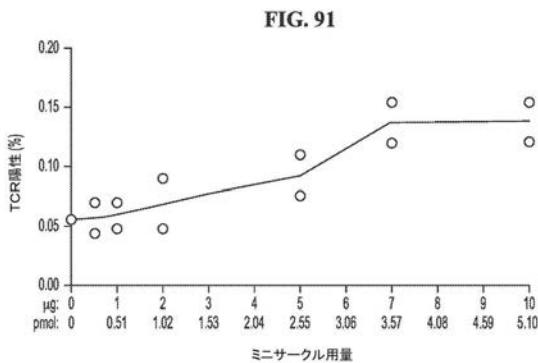
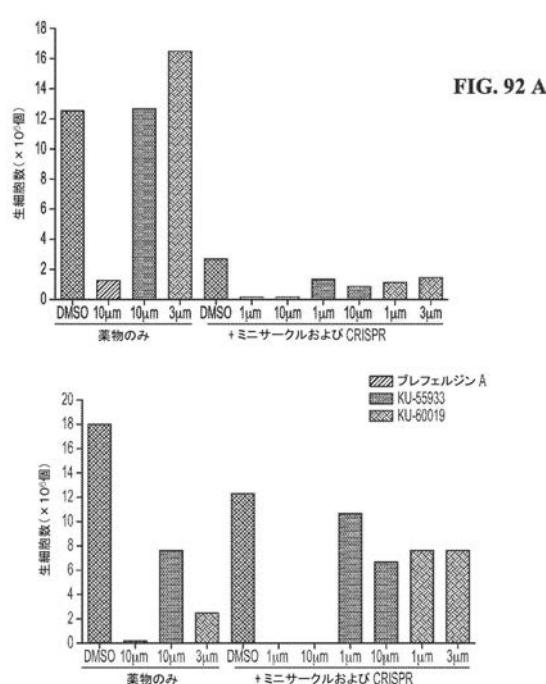


FIG. 90 B

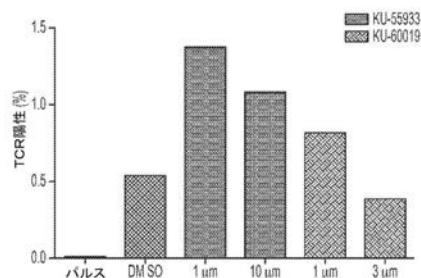
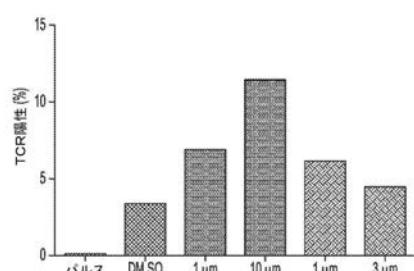
【図 9 1】



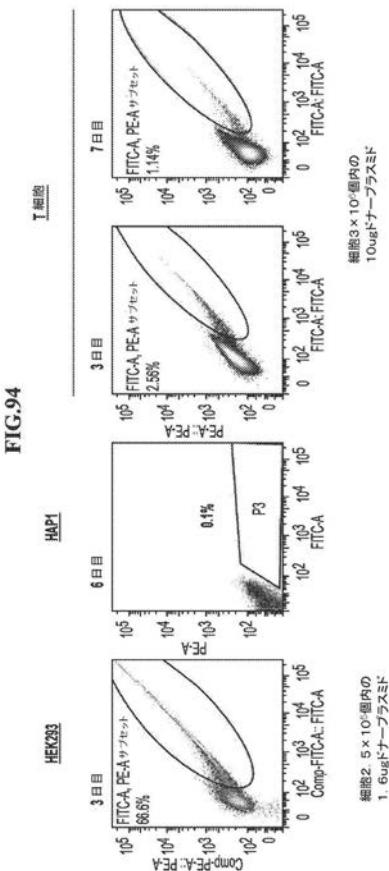
【図 9 2】



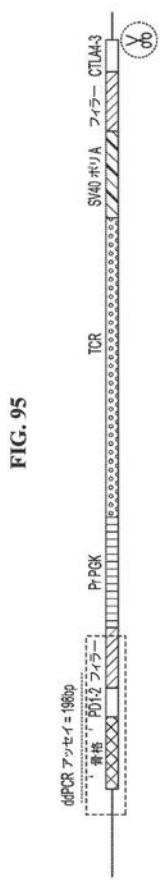
【図 9 3】



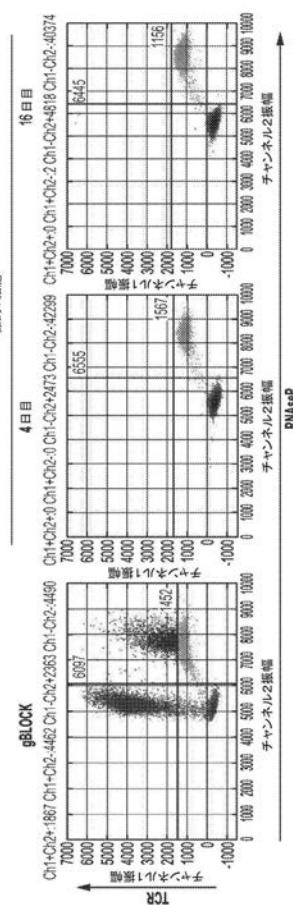
【図 9 4】



【図 9 5】



標的T細胞



【図 9 6】

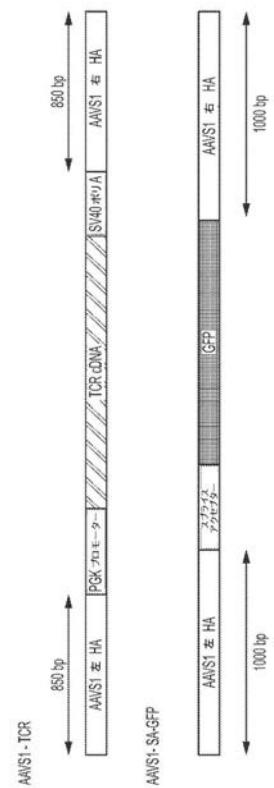
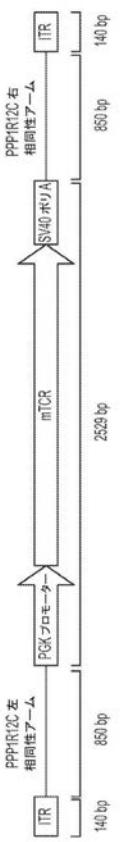
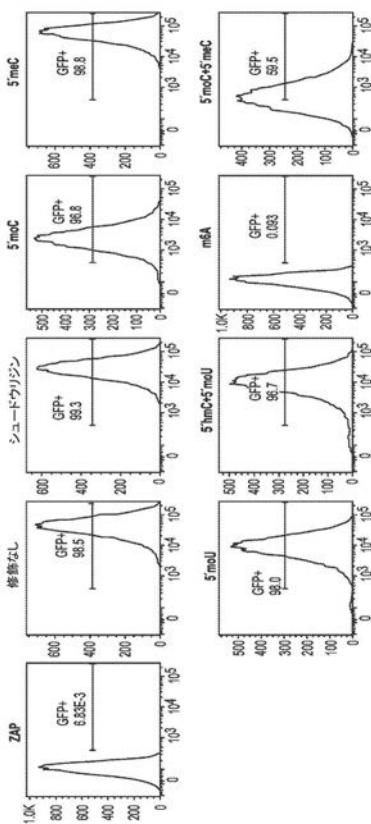


FIG. 96

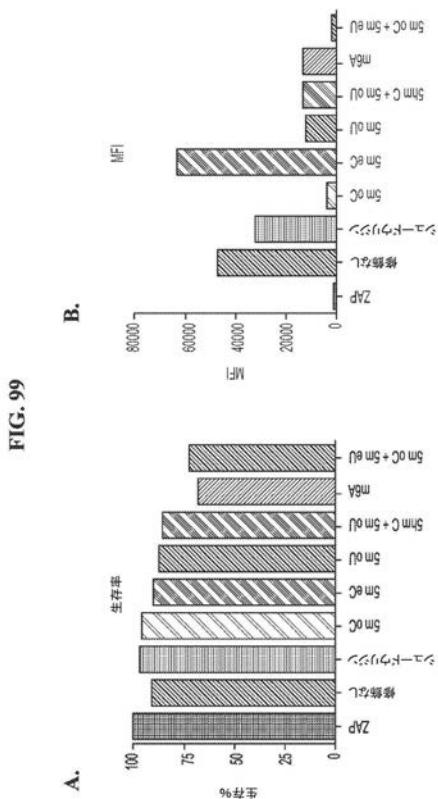
【図 9 7】



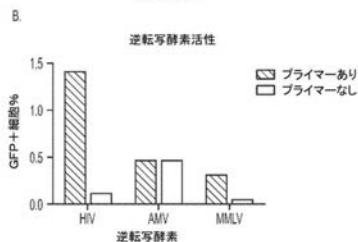
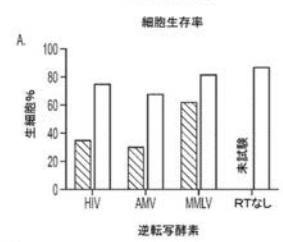
【図 9 8】



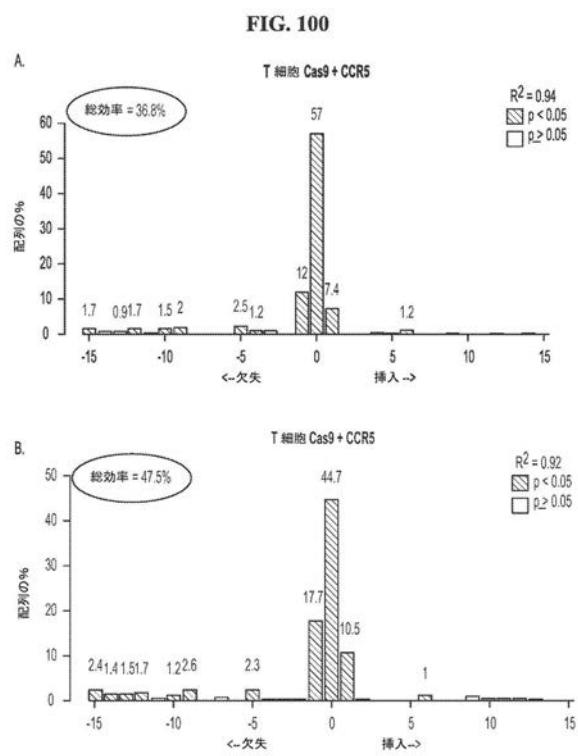
(四 9 9)



【 四 1 0 1 】

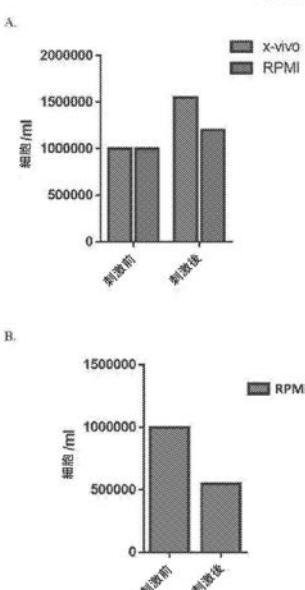


【 図 1 0 0 】



【図102】

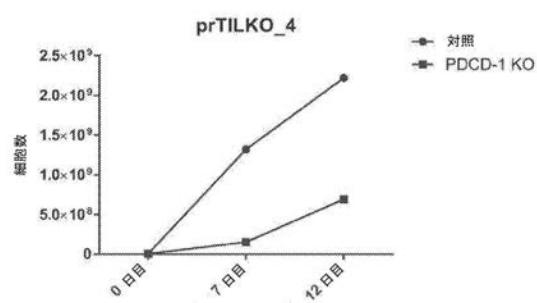
FIG. 102



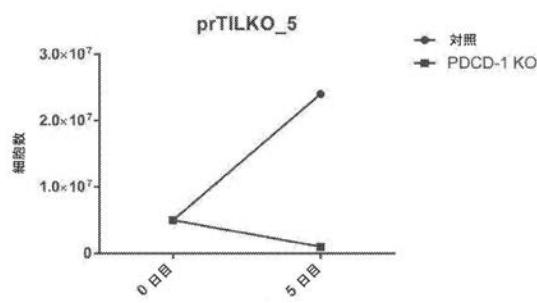
【図 103】

FIG. 103

A.



B.



【図 104】

FIG. 104A

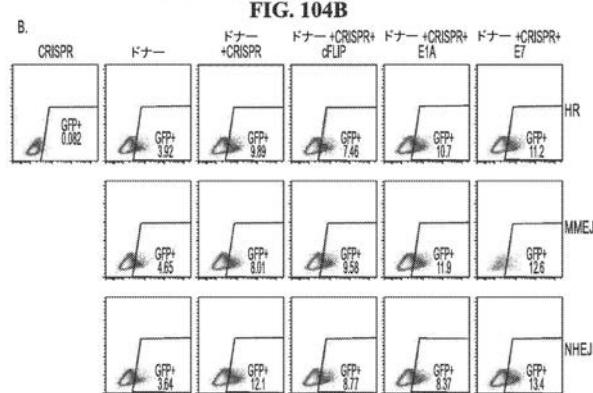
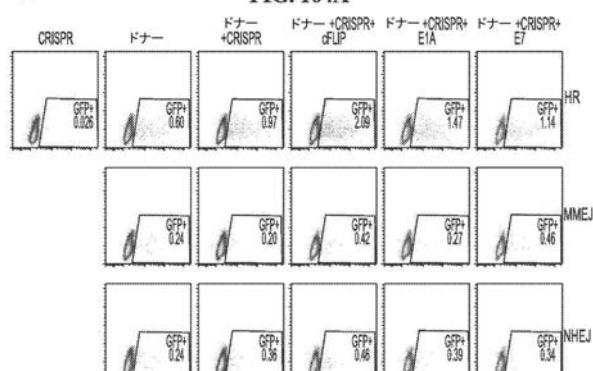
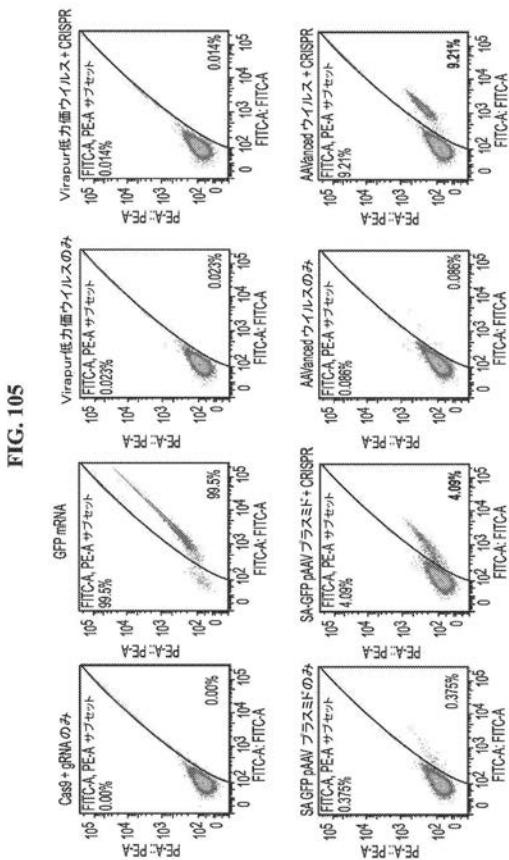
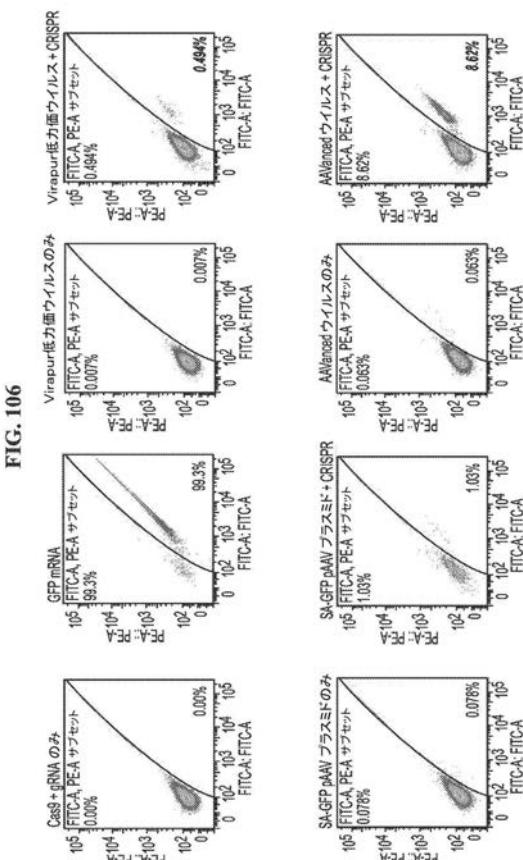


FIG. 104B

【図 105】



【図 106】



【図 107】

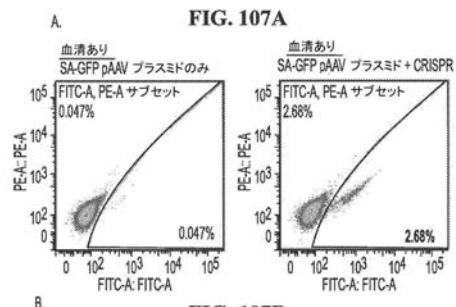
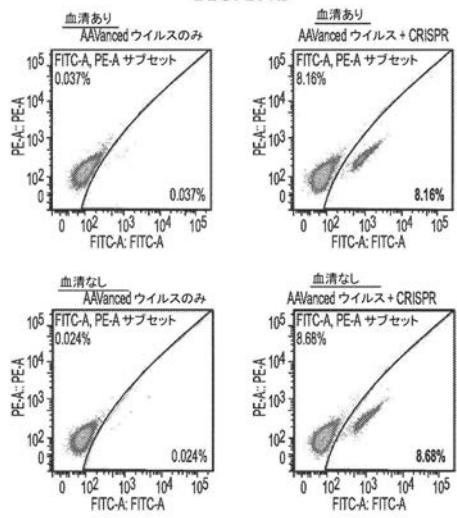


FIG. 107B



【図 108】

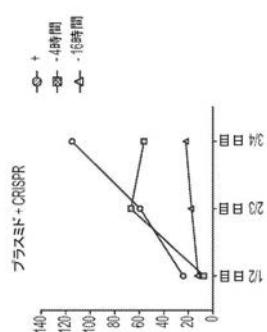
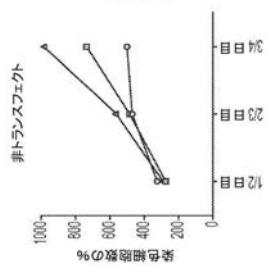
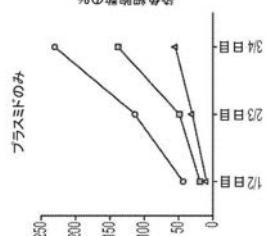
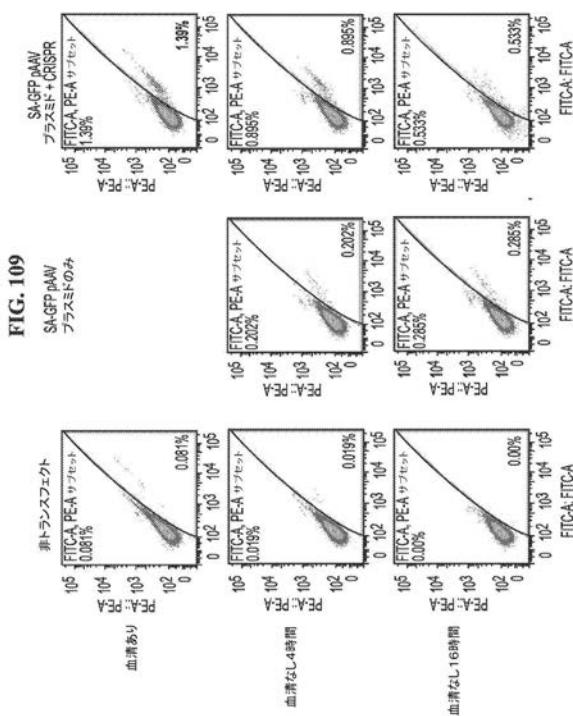


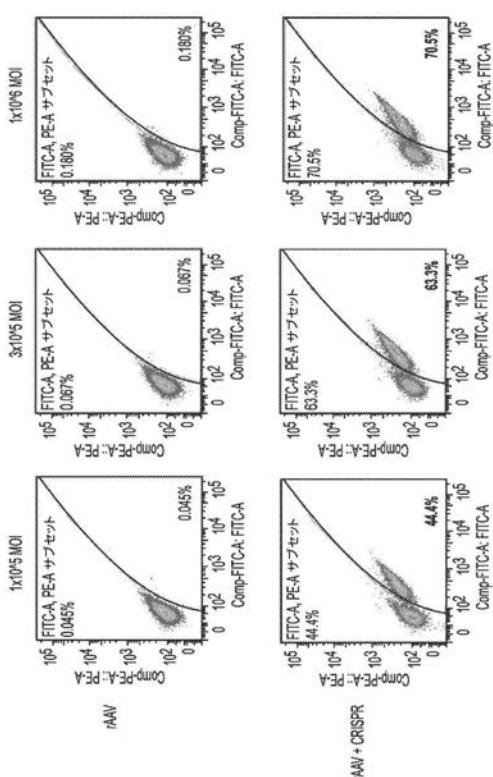
FIG. 108



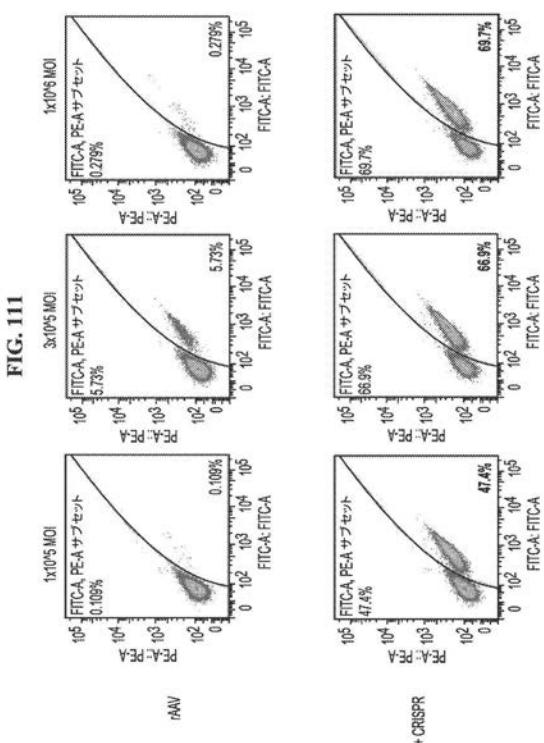
【図 109】



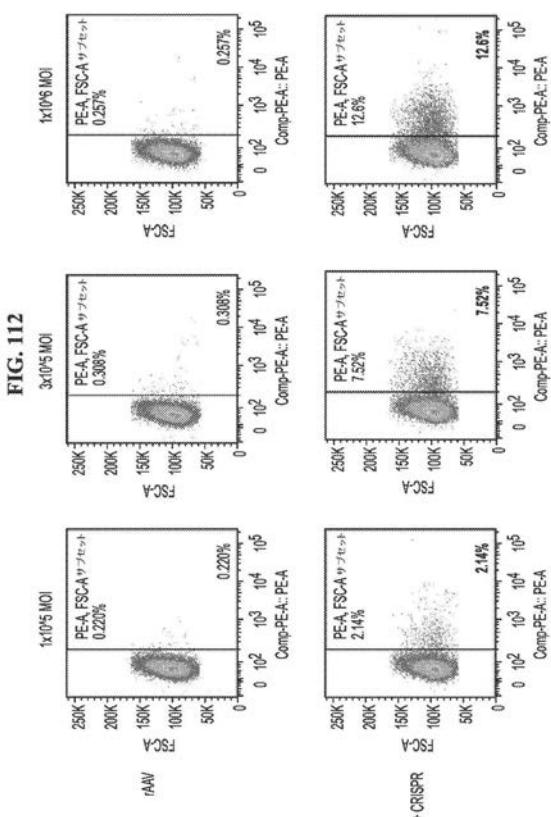
【図 110】



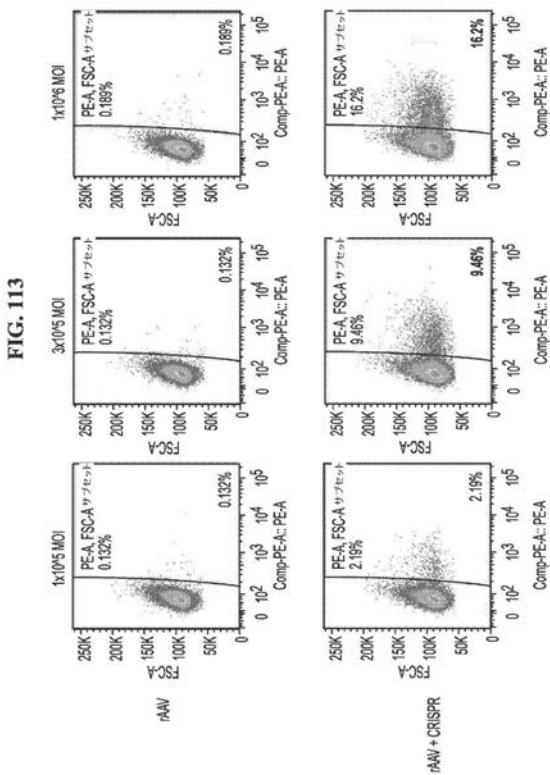
【図 111】



【図 112】

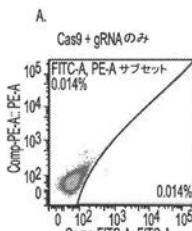
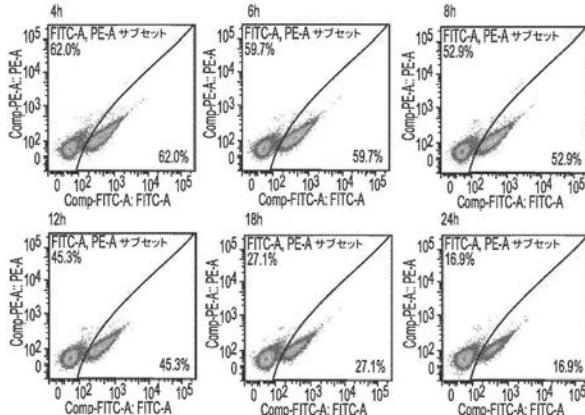


【図 113】



【図 114】

FIG. 114A

FIG. 114B
CRISPR+rAAV

【図 115】

FIG. 115A

rAAV遺伝子導入のタイミング
4日目のSA-GFP

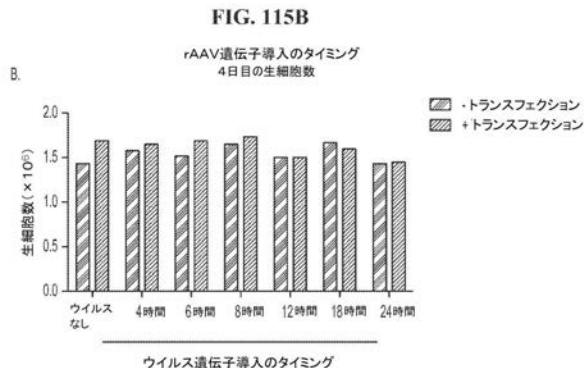
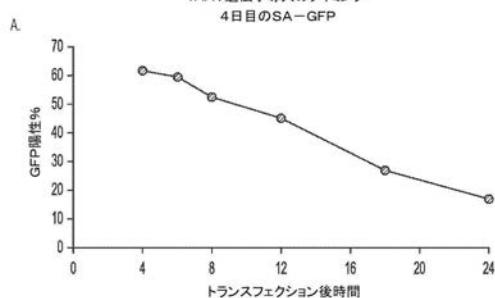


FIG. 115B

rAAV遺伝子導入のタイミング
4日目の生細胞数

【図 116】

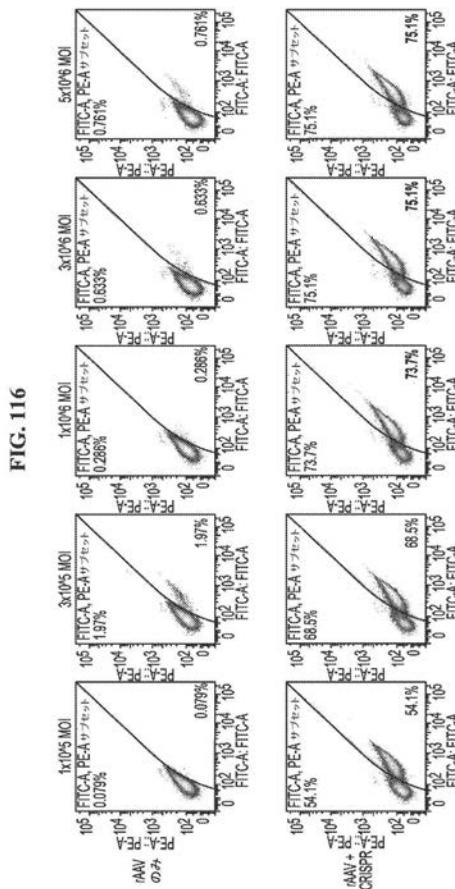


FIG. 116

【図 117】

FIG. 117A

拡大MOI試験結果
4日目のGFP

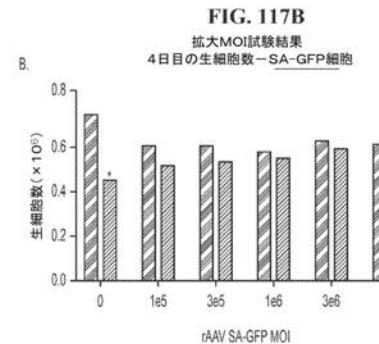
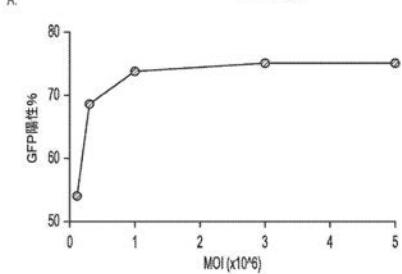


FIG. 117B

拡大MOI試験結果
4日目の生細胞数 - SA-GFP細胞

【図 118】

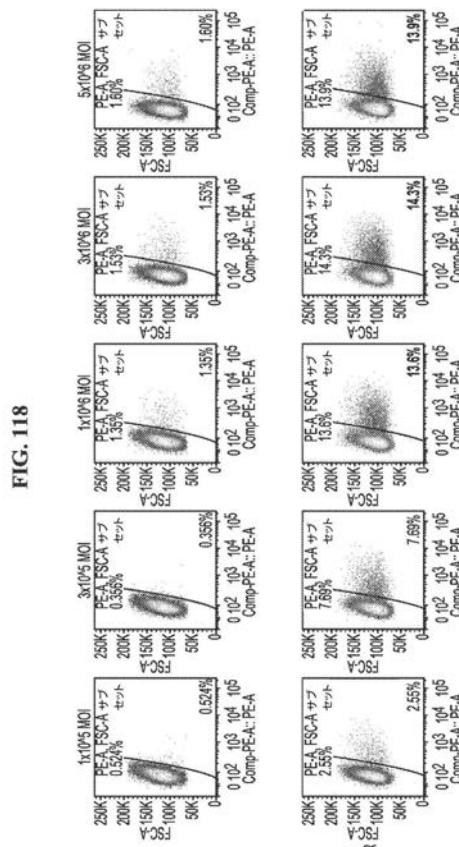
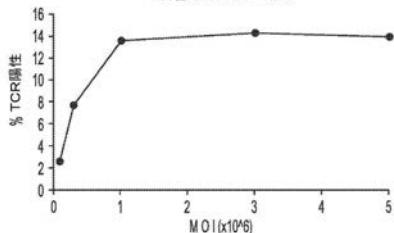


FIG. 118

【図 119】

FIG. 119

拡大MOI試験結果
4日目のAAVS1 TCR



【図 120】

FIG. 120A

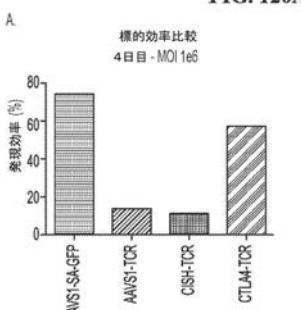
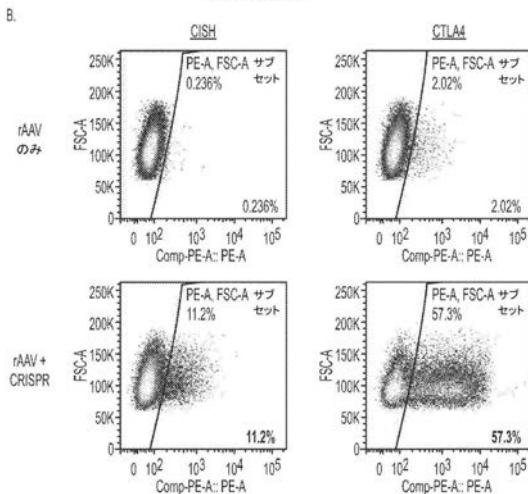


FIG. 120B



【図 121】

FIG. 121A

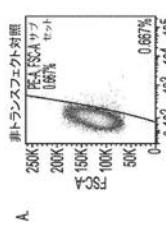
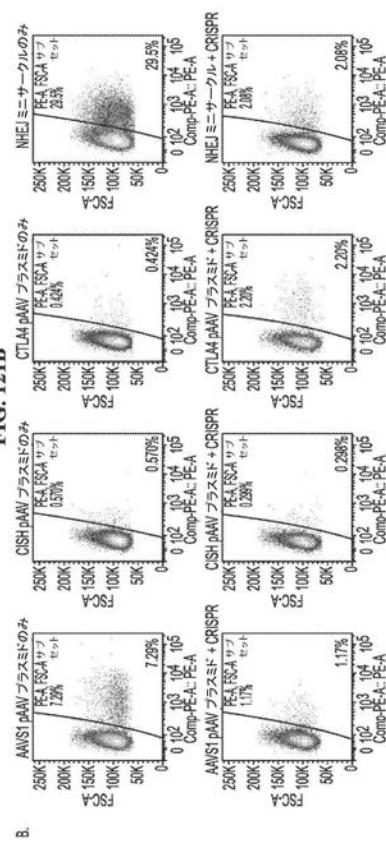


FIG. 121B



【図 122】

FIG. 122A

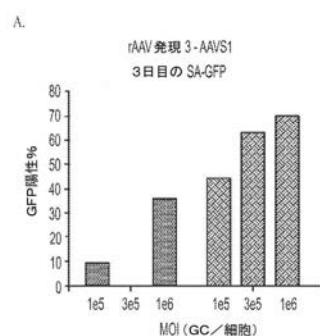
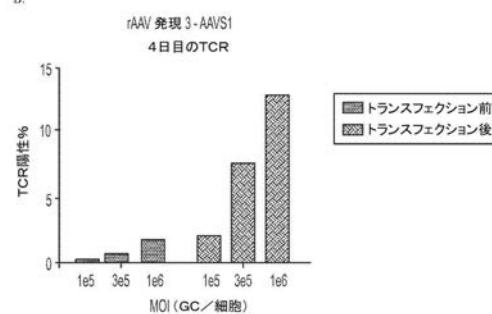


FIG. 122B



【 図 1 2 3 】

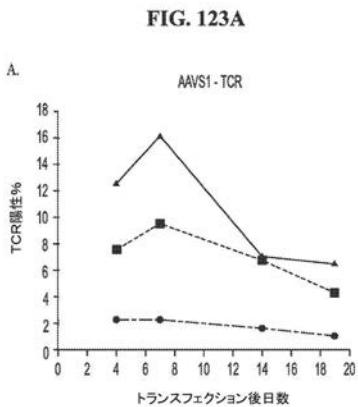
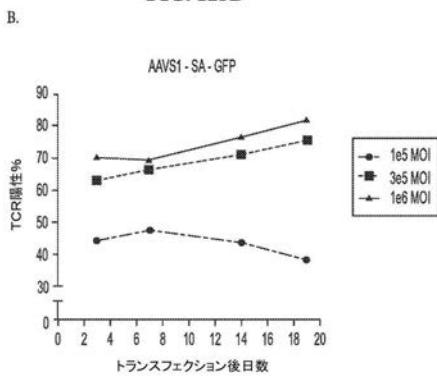
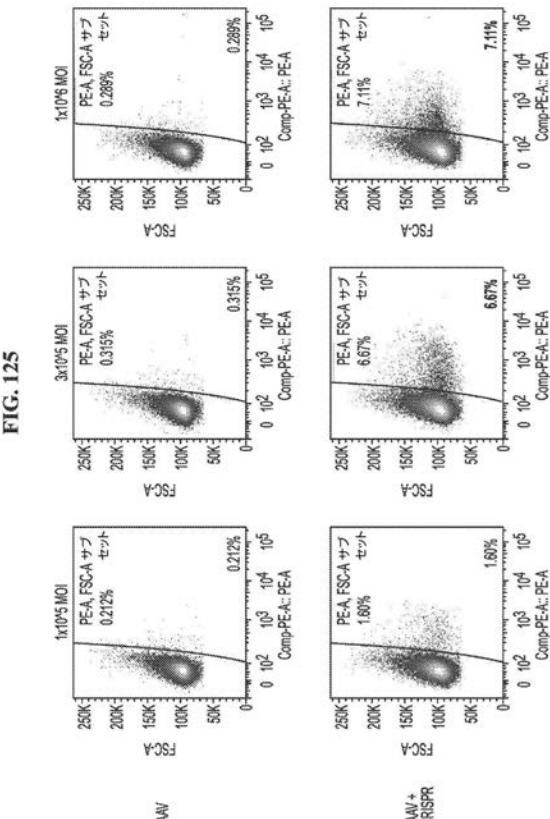


FIG. 123B



【図125】



【図124】

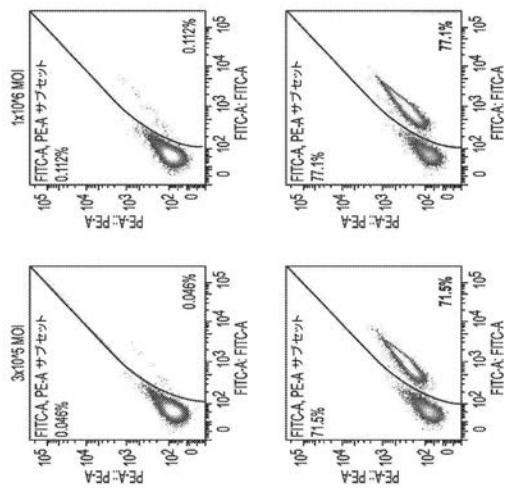


FIG. 124

【 図 1 2 6 】

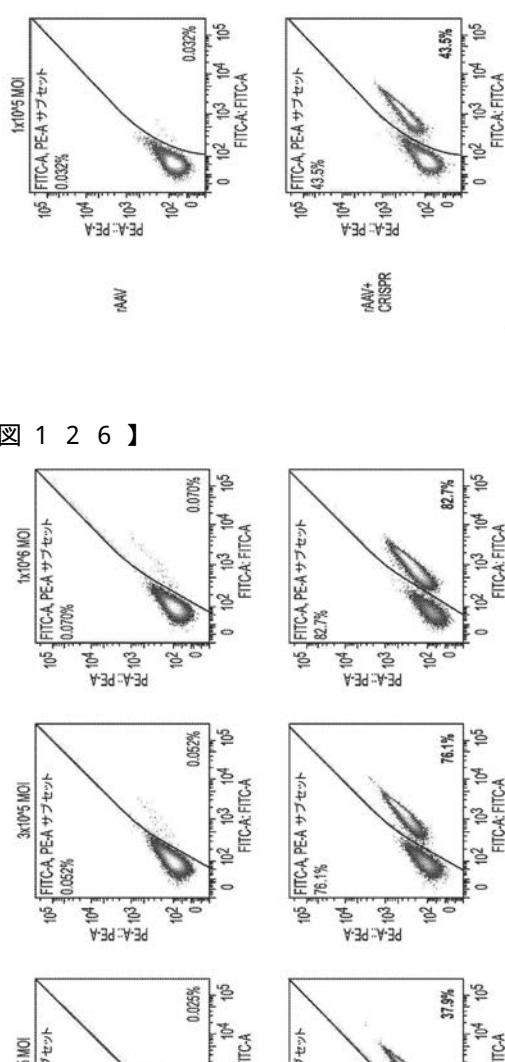


FIG. 126

【図 127】

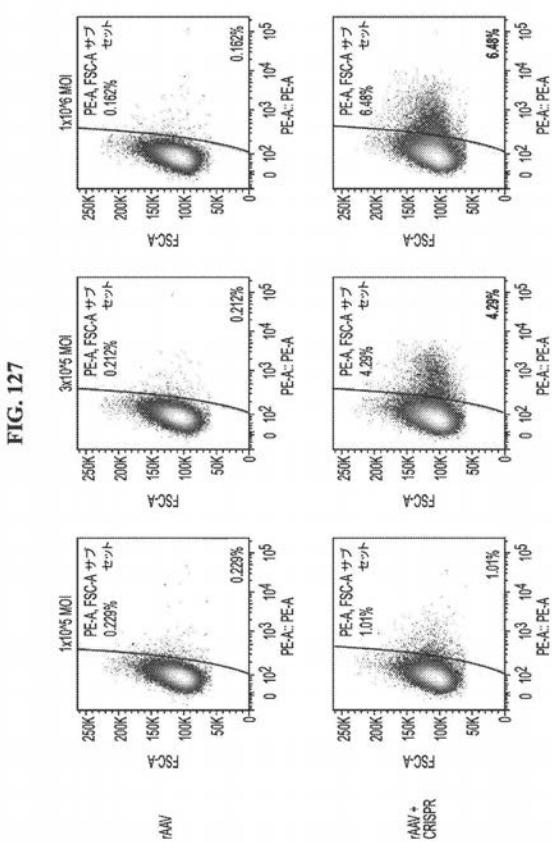


FIG. 127

【図 128】

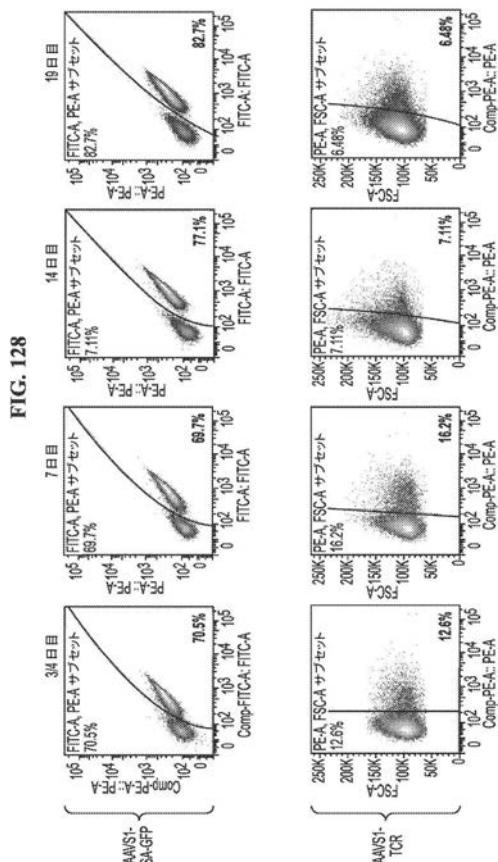


FIG. 128

【図 129】

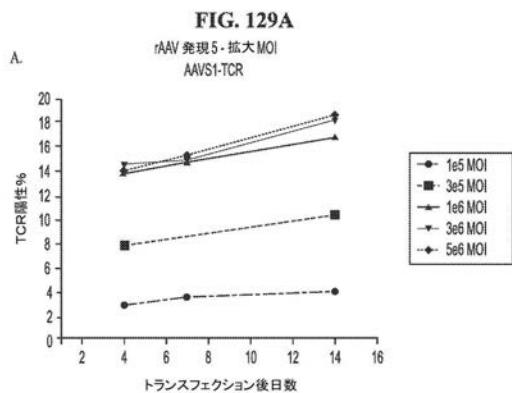


FIG. 129B

【図 130】

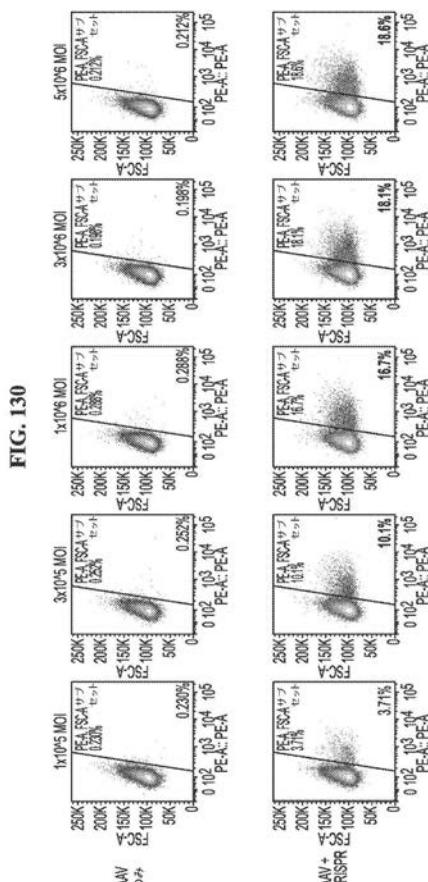
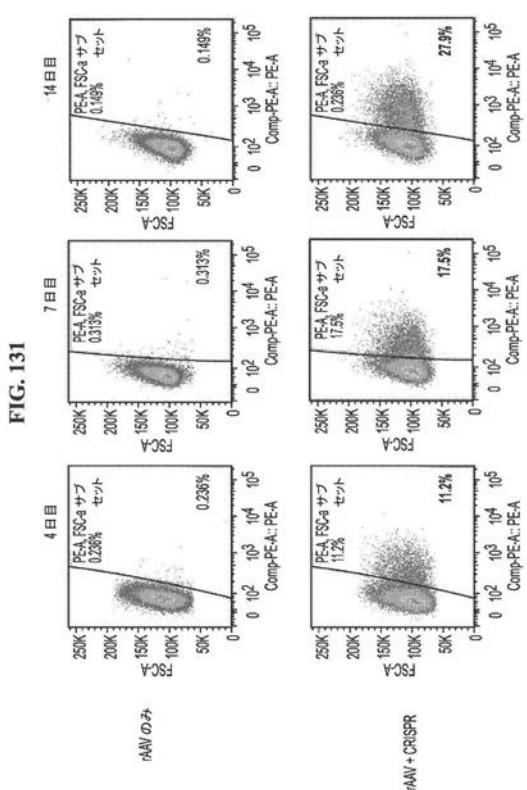
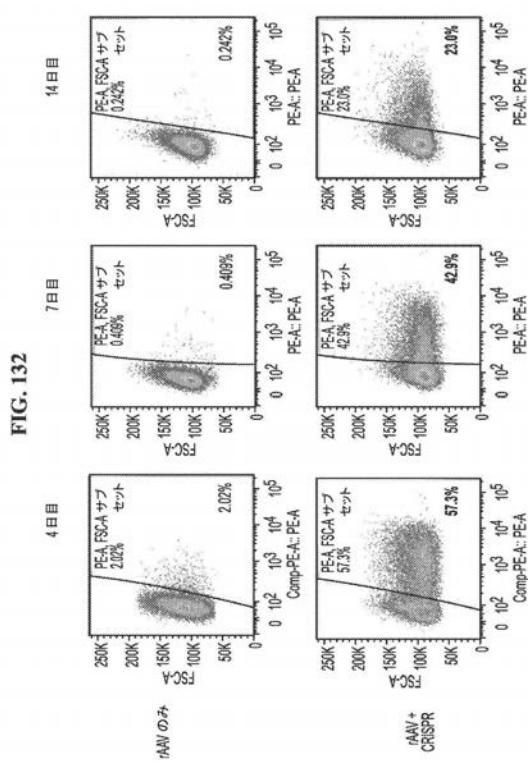


FIG. 130

【図 131】



【図 132】



【図 133】

FIG. 133A

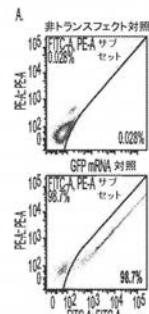
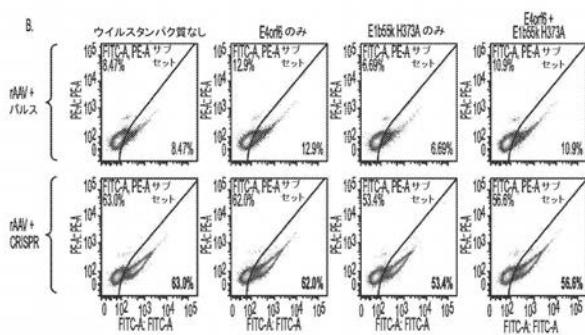
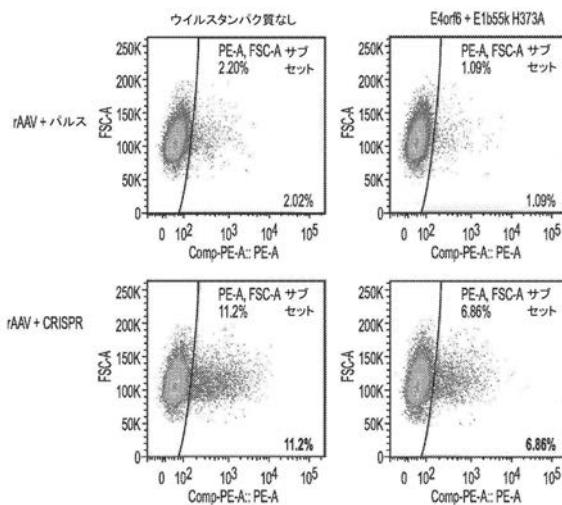


FIG. 133B



【図 134】

FIG. 134



【図 135】

FIG. 135A

A. ウイルスタンパク質なし

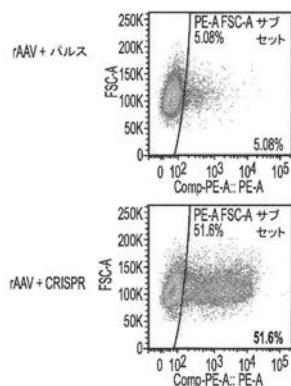
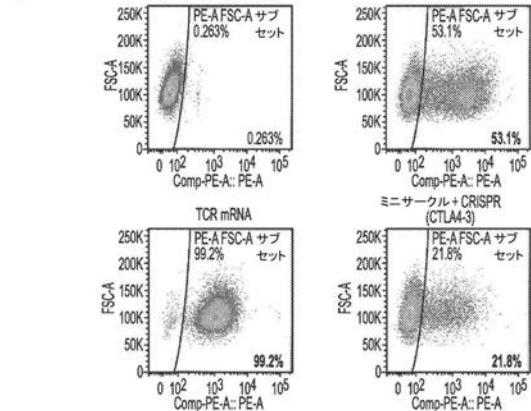


FIG. 135B

B. 非トランフェクト対照



【図 136】

FIG. 136A

A.

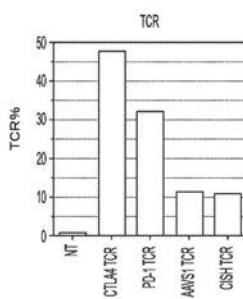
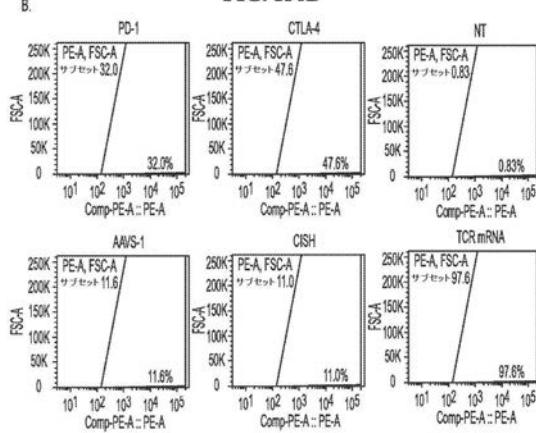


FIG. 136B



【図 137】

A.

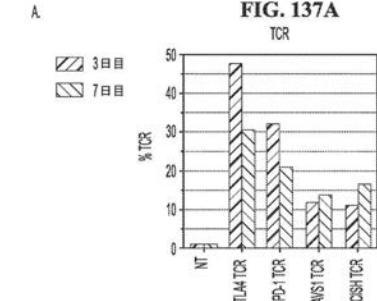


FIG. 137A

TCR

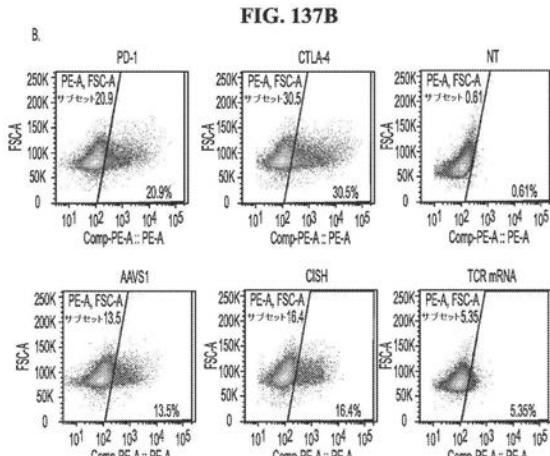
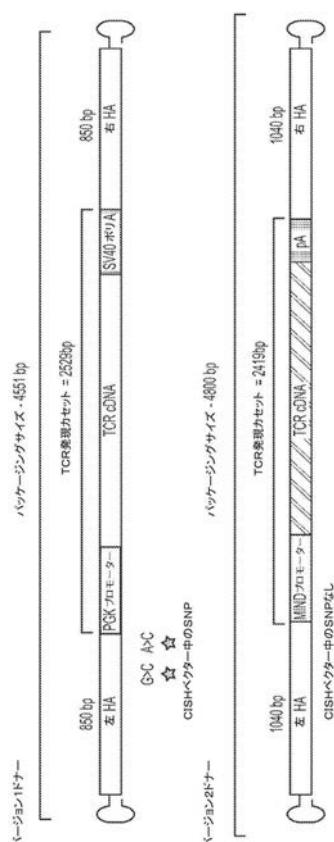


FIG. 137B

FIG. 138



【 义 1 3 9 】

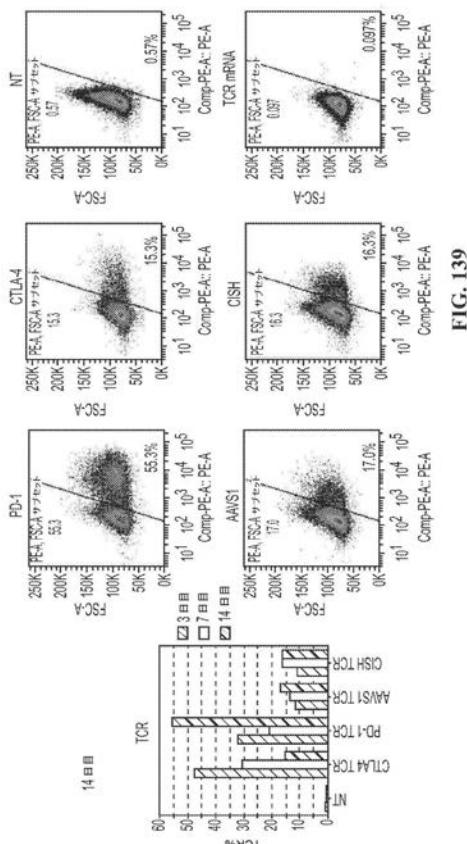


FIG. 139

【図141】

FIG. 141 A

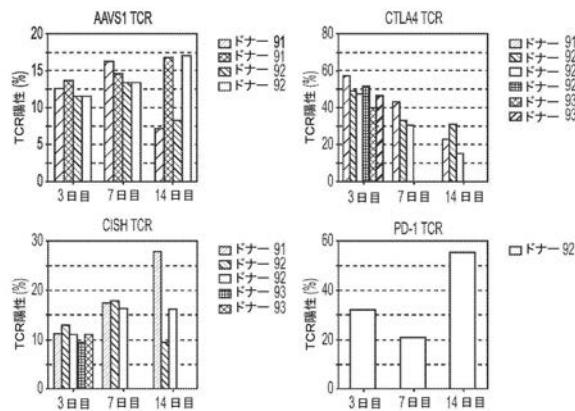


FIG. 141 B

	AAVS1	CTLA4	CISH	PD-1
ドナー 91	なし	なし	2 SNPs	6 SNPs
ドナー 92	なし	なし	2 SNPs	なし
ドナー 93	1 SNP	なし	2 SNPs	なし

【 図 1 4 0 】

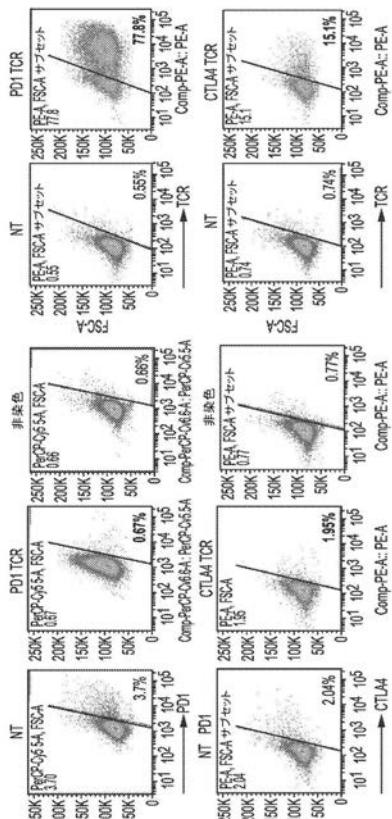
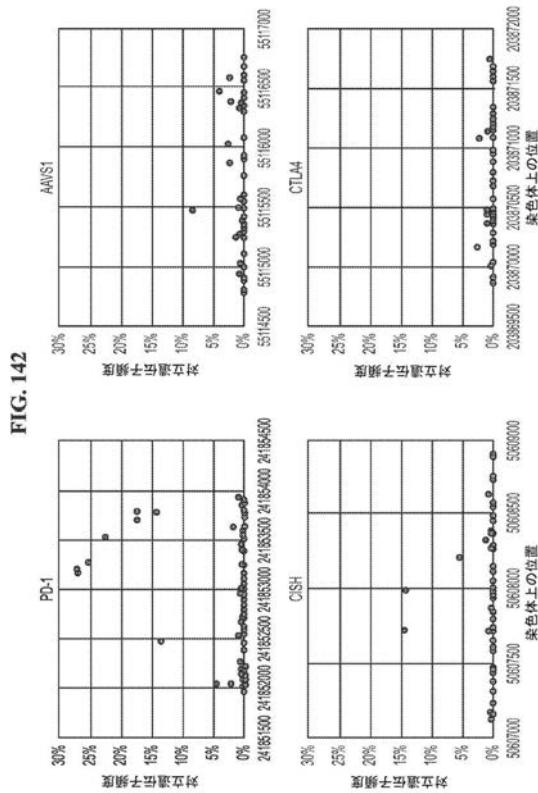
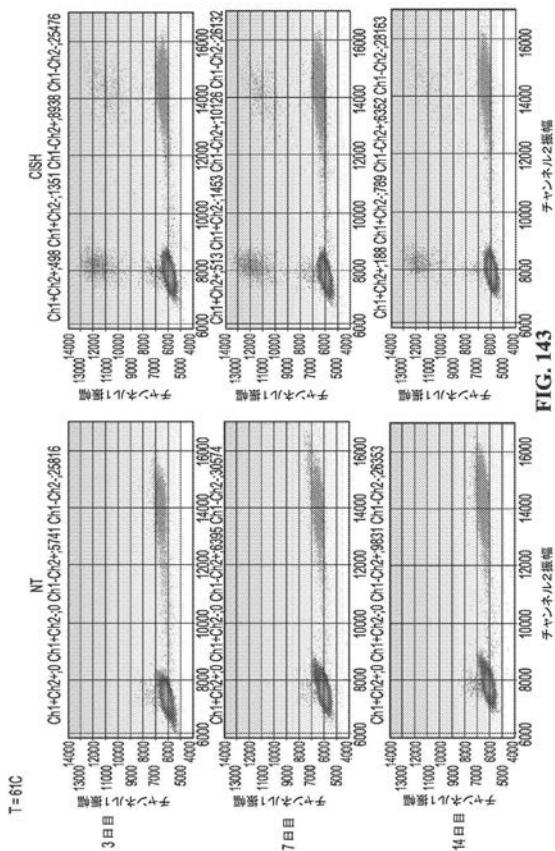


FIG. 140

【 図 1 4 2 】



【 図 1 4 3 】



【 図 1 4 5 】

FIG. 145 A

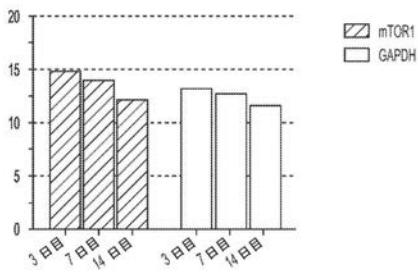
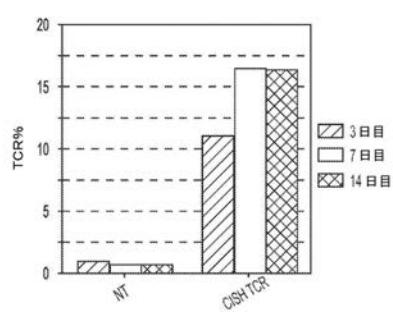
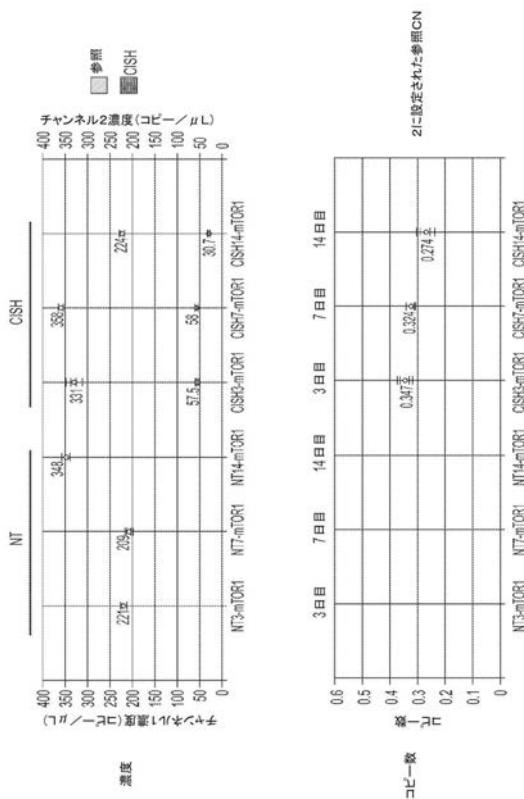


FIG. 145 B



【図144】



【 図 1 4 6 】

FIG. 146 A

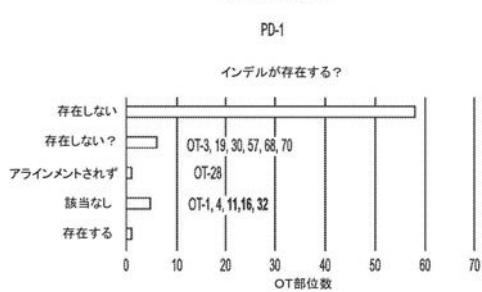
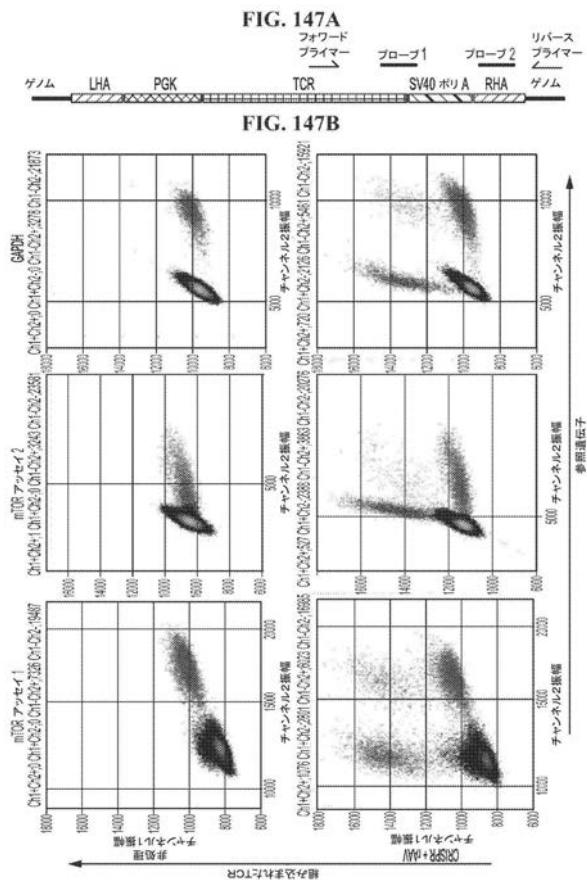


FIG. 146 B



【図 147】



【図 148】

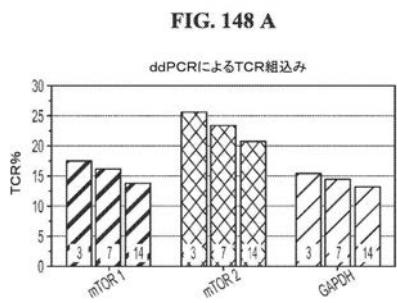
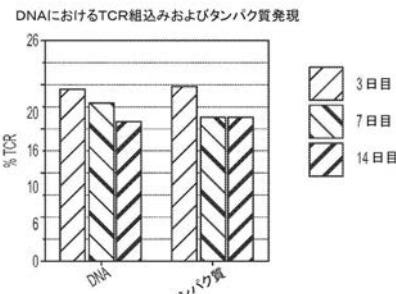
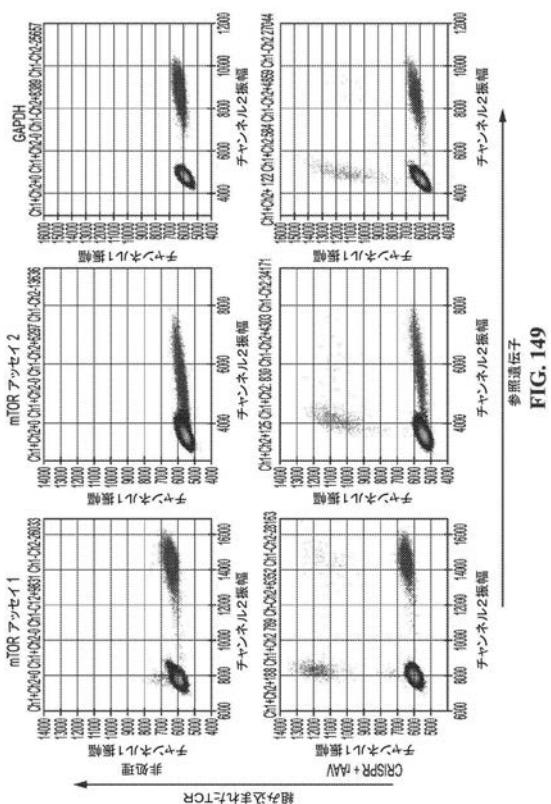


FIG. 148 B



【図 149】



【図 150】

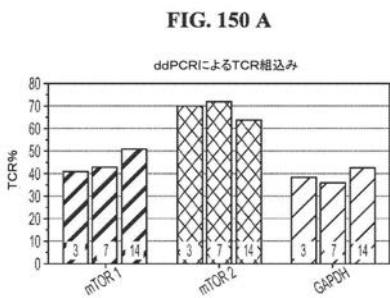
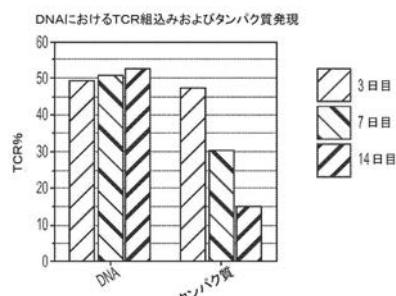
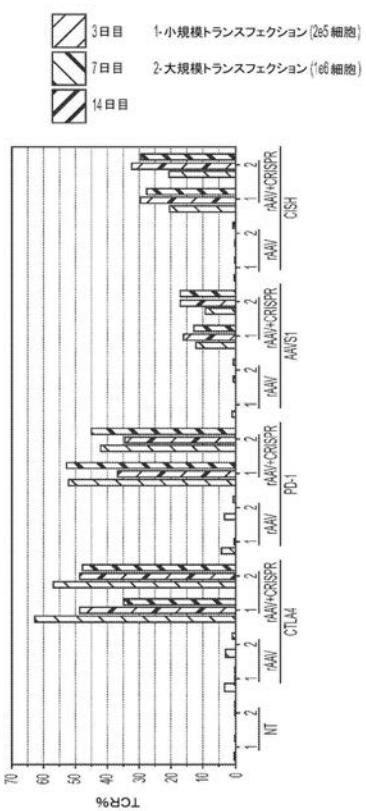


FIG. 150 B



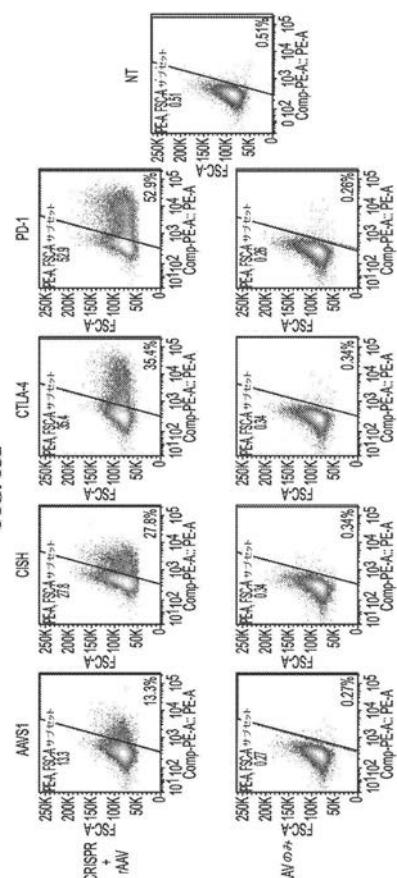
【図 151】

FIG. 151



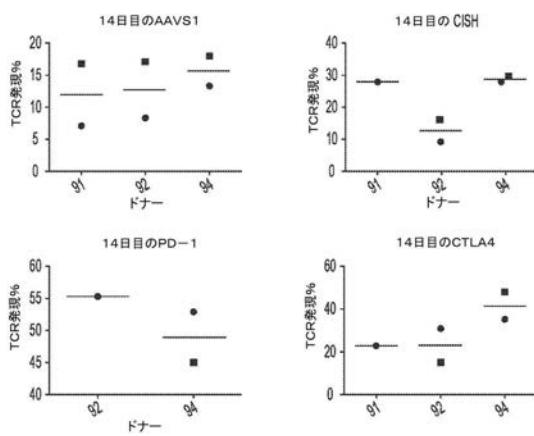
【図 152】

FIG. 152



【図 153】

FIG. 153



【図 154】

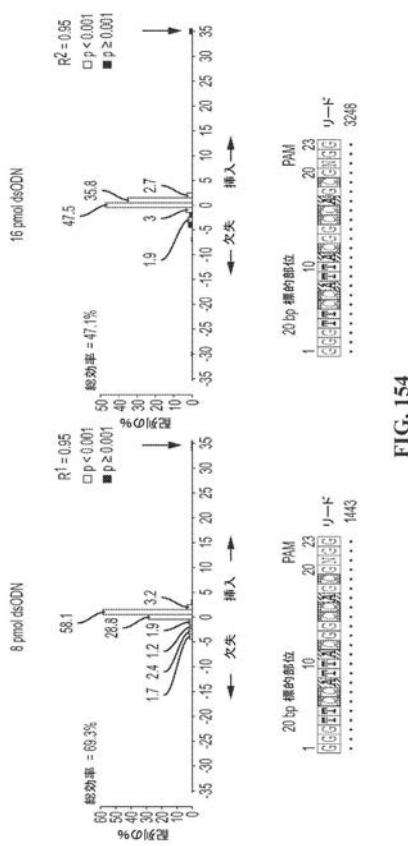
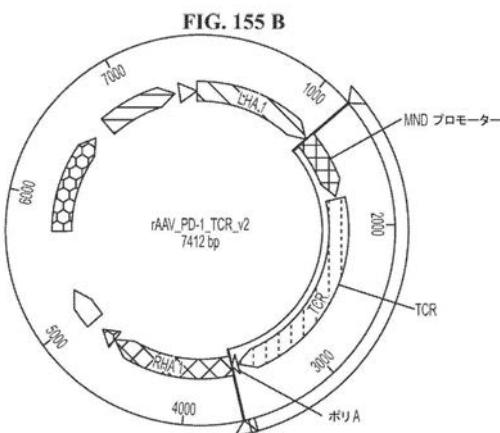
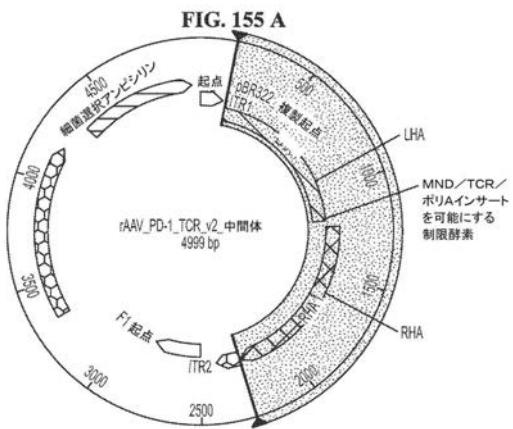


FIG. 154

【図 155】



【図 157】

FIG. 157 A

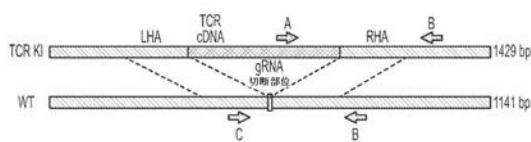
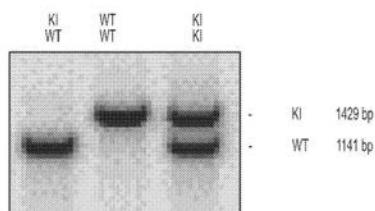


FIG. 157 B



【図 156】

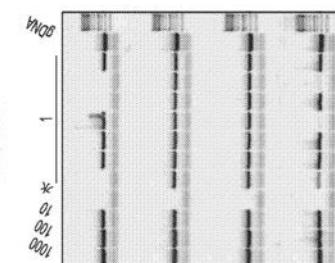
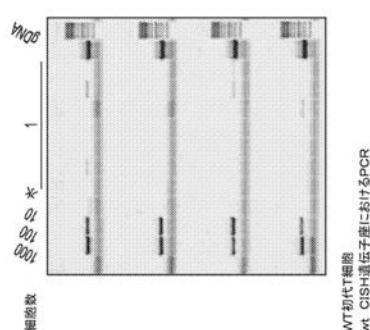


FIG. 156

WT 細胞
WT CISH遺伝子座におけるPCR

【図 158】

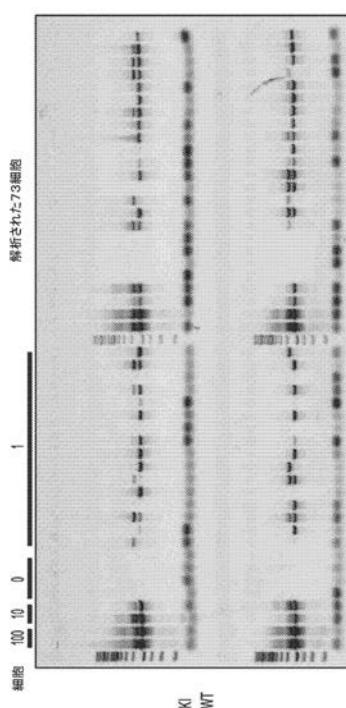
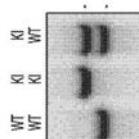


FIG. 158



【図 159】

FIG. 159 A

7日目のTCR発現

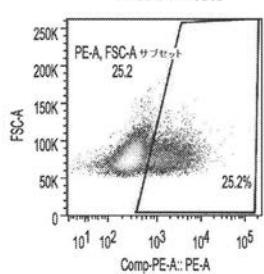
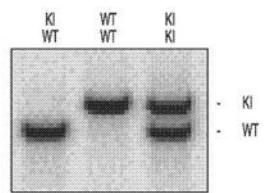
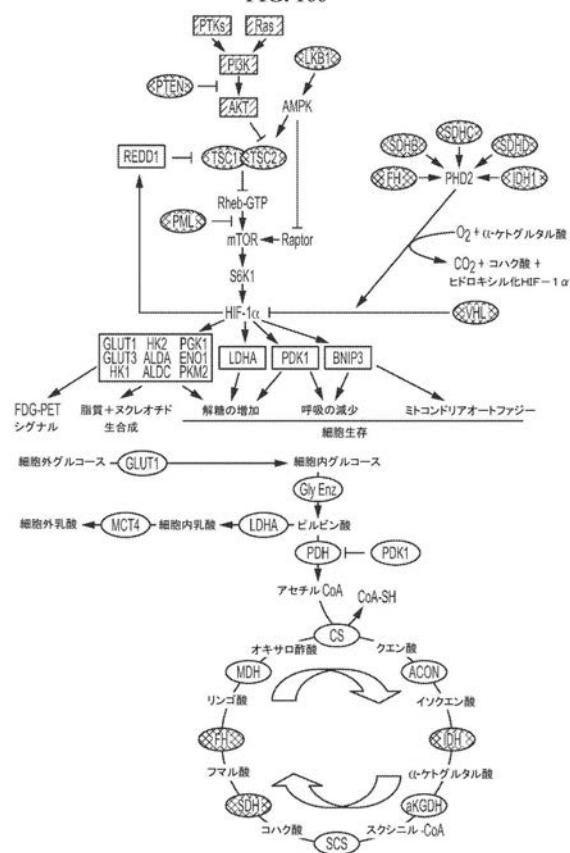


FIG. 159 B



【図 160】

FIG. 160



【配列表】

2019536447000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 17/58615
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 35/17, C07K 14/47, C07K 14/725, C12N 5/0783 (2018.01) CPC - A61K 35/17, C07K 5/0636, C07K 14/4718, C07K 14/7051, C12N 2510/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History Document Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History Document Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History Document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2014/0120622 A1 (Sangamo Therapeutics Inc.) 01 May 2014 (01.05.2014) para [0010], [0017], [0018], [0048], [0068], [0087], [0090], [0155], [0164], [0169], [0182]	1-3, 14-20, (23,27-29)(1-3,14,18-19), 30(1-2), (31-32)(1-2,14), 37(1-2,19), 38(1-2), 41(3,19), (48-49,55-56)(1-3,18-19), (57-58)(1-3,15-19), 59, (60-63)(1-3,15-19), (66-67)(1-3,14,18-19), 68, (72-76)(1-3,15-19), 79
Y	Palmer et al., "Cish actively silences TCR signaling in CD8+ T cells to maintain tumor tolerance". J. Exp. Med., 16 November 2015, Vol. 212, No. 12, pp 2095-2113. abstract	1-3, 14-20, (23,27-29)(1-3,14,18-19), 30(1-2), (31-32)(1-2,14), 37(1-2,19), 38(1-2), 41(3,19), (48-49,55-56)(1-3,18-19), (57-58)(1-3,15-19), 59, (60-63)(1-3,15-19), (66-67)(1-3,14,18-19), 68, (72-76)(1-3,15-19), 79
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 12 April 2018	Date of mailing of the international search report 24 APR 2018	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 17/58615

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A, P	US 2017/0085636 A1 (Regents of the University of Minnesota et al.) 09 March 2017 (09.03.2017) entire document	1-3, 14-19

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.						
PCT/US 17/58615								
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)								
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: 3. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 24-26, 33-36, 39, 40, 42-47, 50-54, 64, 65, 69-71, 77, 78, 80 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). 								
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)								
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: -----see Extra Sheet for continuation-----</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees. 3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 4. <input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim Nos.: 1-3, 14-20, (23, 27-32, 37, 38, 41, 48, 49, 55-58) (in part), 59, (60-63, 66, 67) (in part), 68, (72-76) (in part), 79 								
<p>Remark on Protest</p> <table border="0"> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>No protest accompanied the payment of additional search fees.</td> </tr> </table>			<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.
<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.							
<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.							
<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.							

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 17/58615

Continuation of Box III: Observations where Lack Of Unity is Lacking

This application contains the following Inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-3, 14-20, (23,27-32,37,38,41,48,49,55-57,58) (in part), 59, (60-63,66,67)(in part), 68, (72-76)(in part), 79, drawn to a method of producing a population of genetically-modified cells

Group II: Claims 4-6, 12, 13 (23,27-32,37,38,41,48,49,55-57,58,60-63,66,67,72-76)(in part), drawn to a method of treating cancer in a human subject

Group III: Claims 7-11, 21, 22, (23,27-29,48,49,55,56,63,72-76)(in part), drawn to a composition of genetically modified cells.

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

Special Technical Features:

Group I claims have the special technical feature of a method steps for producing a population of genetically modified cells, not required by Groups II or III.

Group II claims have the special technical feature of a method involving the step of administrating a therapeutically effective amount of a population of ex-vivo genetically modified cells, not required by Groups I or III.

Group III claims have the special technical feature of a composition of genetically-modified cells, not required by Groups I or II.

Common Technical Features:

1. Providing a population of cells from a human subject; modifying, ex vivo, at least one cell in said population of cells by introducing a break in a Cytokine Inducible SH2 Containing Protein (CISH) gene using a clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) system.

2. Introducing an adeno-associated virus (AAV) vector comprising at least one exogenous transgene encoding a T cell receptor (TCR) to at least one cell in said population of cells to integrate said exogenous transgene into the genome of said at least one cell at said break.

3. Group III composition claim 21, a population of genetically-modified cells depend from Group I methods claims 1-3 or 18-19.

4. Group III composition claim 22, a population of genetically-modified tumor infiltrating lymphocytes depend from Group I methods claims 15-17.

However, said common technical feature does not represent a contribution over the prior art, and is obvious over US 2011/0016543 A1 to Weinstein et al. (hereinafter "Weinstein"), in view of US 2014/0301990 A1 to Ospedale San Raffaele srl (hereinafter "Ospedale"), in view of the publication titled "Cish actively silences TCR signaling in CD8+ T cells to maintain tumor tolerance" by Palmer et al. (hereinafter "Palmer") [published in J. Exp. Med 16 November 2015 Vol 212 No 12 Pages 2095-2113].

As to common technical feature #1, Weinstein teaches providing a population of cells from a human subject; modifying, ex vivo, at least one cell in said population of cells by introducing a break in a Cytokine Inducible SH2 Containing Protein (CISH) gene (Claim 19; "19. A genetically modified cell, the cell comprising at least one edited chromosomal sequence encoding an inflammation-related protein"; 21. The genetically modified cell of claim 19, wherein the edited chromosomal sequence is inactivated such that a functional inflammation-related protein is not produced. 29. The genetically modified cell of claim 19, wherein the cell is of bovine, canine, equine, feline, human, ovine, porcine, non-human primate, or rodent origin"; para [0032]; "In general, the genetically modified animal or cell detailed above in sections (I) and (II), respectively, is generated using a zinc finger nuclease-mediated genome editing process. The process for editing a chromosomal sequence comprises: (a) introducing into an embryo or cell at least one nucleic acid encoding a zinc finger nuclease that recognizes a target sequence in the chromosomal sequence and is able to cleave a site in the chromosomal sequence"; para [0021]; By way of non-limiting example, inflammation-related proteins include but are not limited to the proteins listed in Table A; pg 10 Table A (continued): SOS1 [i.e. synonym of CISH1], SOS2 [i.e. synonym of CISH2]). Weinstein does not teach using a clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) system to introduce a genomic DNA break in the CISH gene. However, it would have been obvious that the nuclease of zinc-finger nuclease taught by Weinstein could be substituted with CRISPR Cas9 nuclease and a sgRNA targeting a site in a CISH gene, using method well known in the art.

* continued on next sheet-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 17/58615

---continued from previous sheet---

As to common technical feature #2, Ospedale teaches using a viral vector to introduce one exogenous transgene encoding a T cell receptor (TCR) to at least one cell in said population of cells to integrate said exogenous transgene into the genome of said at least one cell at said break (para [0014-0015]; "Disclosed herein are compositions and methods for partial or complete inactivation or disruption of an endogenous TCR gene and compositions and methods for introducing and expressing to desired levels of exogenous TCR transgenes into T-lymphocytes, after or simultaneously with the disruption of the endogenous TCR gene. [0015]; In one aspect, provided herein are zinc finger nucleases (ZFNs), TALENs or a CRISPR/Cas system with an engineered single guide RNA that cleaves a TCR gene" para [0016]; "exogenous sequences (donor or patch sequences) for targeted insertion into the TCR alpha and/or the TCR beta gene. In certain embodiments, the donor sequence comprises tumor antigen specific TCR transgene wherein the TCR transgene is a TCR alpha transgene, a TCR beta transgene and combinations thereof"; para [0156]; "Moreover, donor polynucleotides can be introduced as naked nucleic acid, as nucleic acid complexed with an agent such as a liposome or polyplex, or can be delivered by viruses (e.g., adenovirus, AAV, herpesvirus, retrovirus, lentivirus and integrase defective lentivirus (IDLV)). Ospedale does not specifically teach targeted insertion into a CISH gene. However, it would have been obvious to an artisan of ordinary skill that the CISH gene with double-stranded breaks generated by the CRISPR/Cas system taught by Ospedale could have used donor DNA sequences targeting construct (e.g. rAAV vector) comprising the genetic modification flanked by regions of homology which are substantially identical to the CISH genomic target locus.

As to common technical feature #3, the population of genetically-modified cells are obvious based on the discussion already set forth in common technical features #1 and #2.

As to common technical feature #4, the population of genetically-modified cells are obvious based on the discussion already set forth in common technical features #1 and #2. Furthermore, Palmer teaches tumor-infiltrating lymphocytes (abstract; "Improving the functional avidity of effector T cells is critical in overcoming inhibitory factors within the tumor microenvironment and eliciting tumor regression. We have found that Cish, a member of the suppressor of cytokine signaling (SOCS) family, is induced by TCR stimulation in CD8+ T cells and inhibits their functional avidity against tumors. Genetic deletion of Cish in CD8+ T cells enhances their expansion, functional avidity, and cytokine polyfunctionality, resulting in pronounced and durable regression of established tumors").

As the common technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered common special technical feature that would otherwise unify the groups. The inventions lack unity with one another.

Therefore, Groups I-III lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864	1 0 0 Z
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
C 1 2 N 5/0781 (2010.01)	C 1 2 N 5/0781	
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/0783	

(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,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,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,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(71)出願人 508285606
ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメリカ , アズ リブレゼンテッド バイ ザ セクレタリー , デパートメント オブ ヘルス アンド ヒューマン サービシーズ
アメリカ合衆国 , メリーランド 2 0 8 9 2 - 7 6 6 0 , ベセスダ , エグゼキュティブ ブールバード 6 0 1 1 , スイート 3 2 5 , エムエスシー 7 6 6 0

(74)代理人 100078282
弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ヘンリー , トーマス
イギリス国 シービー 7 5 ゼットイー ケンブリッジシャー , ソハム , サイプリアン ラスト ウェイ 7 5

(72)発明者 ローズ , エリック
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 5 7 0 9 , カミノ , ポニー エクスプレス トレイル 4 3 4 7

(72)発明者 チョードリー , モダシール
アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 0 1 9 , ニューヨーク , セントラル パーク サウス 1 0 6 ナンバー 2 6 ディー

(72)発明者 モリアリティ , ブランデン
アメリカ合衆国 ミネソタ 5 5 1 2 6 , ショアビュー , シェアウッド ロード 1 5 2 0

(72)発明者 ウェバー , ピュー
アメリカ合衆国 ミネソタ 5 5 4 4 8 , クーン ラピッズ , 1 3 0 ティーエイチ サークル エヌダブリュー 2 6 0 7

(72)発明者 ローゼンバーグ , スティーブン エー .
アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 5 4 , ポトマック , アイロン ゲート ロード 1 0 1 0 4

(72)発明者 パーマー , ダグラス シー .
アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 5 2 , ノース ベセスダ , ロックビル パイク 1 0 2 0 8 , アパートメント 3 0 2

(72)発明者 レスティフォ , ニコラス ピー .
アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 1 5 , チェビー チェース , フロリダ ストリート 6 8 0 8

F ターΔ(参考) 4B065 AA94X AA94Y AB01 AC14 BA02 BD50 CA24 CA44
4C084 AA13 NA14 ZB26
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26
4C087 AA01 AA02 BB37 BB65 CA12 CA20 NA14 ZB26