

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-547053

(P2022-547053A)

(43)公表日 令和4年11月10日(2022.11.10)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	Z N A	4 B 0 6 5
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10		4 C 0 8 7
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	35/12		
A 6 1 K	35/545 (2015.01)	A 6 1 K	35/545		
A 6 1 K	35/28 (2015.01)	A 6 1 K	35/28		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全110頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2022-514585(P2022-514585)	(71)出願人	518370079		
(86)(22)出願日	令和2年9月4日(2020.9.4)		クリスパー セラピューティクス アクチ		
(85)翻訳文提出日	令和4年4月21日(2022.4.21)		エンゲゼルシャフト		
(86)国際出願番号	PCT/IB2020/058279		スイス国, 6 3 0 0 ツーク, バーラー		
(87)国際公開番号	WO2021/044377		シュトラッセ 1 4		
(87)国際公開日	令和3年3月11日(2021.3.11)	(74)代理人	100099759		
(31)優先権主張番号	62/896,477		弁理士 青木 篤		
(32)優先日	令和1年9月5日(2019.9.5)	(74)代理人	100123582		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 三橋 真二		
(31)優先権主張番号	62/979,756	(74)代理人	100117019		
(32)優先日	令和2年2月21日(2020.2.21)		弁理士 渡辺 陽一		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100141977		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		弁理士 中島 勝		
	最終頁に続く	(74)代理人	100138210		
			弁理士 池田 達則		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ユニバーサルドナー細胞

(57)【要約】

複数の対象に適合する遺伝子改変細胞、例えばユニバーサルドナー細胞及び前記遺伝子改変細胞を作製する方法が本明細書で提供される。ユニバーサルドナー細胞は、生存因子をコードする少なくとも1つの遺伝子内又はその近傍の少なくとも1つの遺伝子改変を含み、遺伝子改変は、免疫寛容原性因子をコードするポリペプチドの挿入を含む。ユニバーサルドナー細胞は、1つ以上のMHC-I若しくはMHC-IIヒト白血球抗原又はMHC-I若しくはMHC-II複合体の構成要素若しくは転写調節因子をコードする遺伝子内又はその近傍での少なくとも1つの遺伝子改変をさらに含み得、前記遺伝子改変は、第2の免疫寛容原性因子をコードするポリペプチドの挿入を含む。

CyT49 B2M gRNA Cutting Efficiency

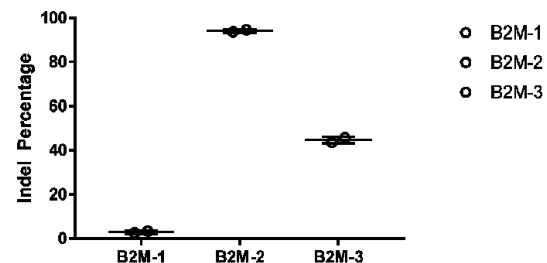


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生存因子をコードする遺伝子内又はその近傍に挿入される、第 1 の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を含むユニバーサルドナー細胞であって、前記免疫寛容原性因子を発現し、且つ前記生存因子の破壊された発現を有し、及び対照細胞と比較して増加した免疫回避及び／又は細胞生存を有するユニバーサルドナー細胞。

【請求項 2】

前記対照細胞は、野生型細胞又は前記挿入されるヌクレオチド配列を含まない細胞である、請求項 1 に記載のユニバーサルドナー細胞。

【請求項 3】

前記生存因子の前記破壊された発現は、減少又は消失した発現を含む、請求項 1 又は 2 に記載のユニバーサルドナー細胞。

【請求項 4】

前記第 1 の免疫寛容原性因子は、PD-L1、HLA-E、HLA-G、CTLA-4 又は CD47 である、請求項 1～3 のいずれか一項に記載のユニバーサルドナー細胞。

【請求項 5】

前記生存因子は、TXNIP、ZNF143、FOXO1、JNK 又は MANF である、請求項 1～4 のいずれか一項に記載のユニバーサルドナー細胞。

【請求項 6】

前記第 1 の免疫寛容原性因子は、HLA-E であり、及び前記生存因子は、TXNIP である、請求項 1～5 のいずれか一項に記載のユニバーサルドナー細胞。

【請求項 7】

HLA-E をコードする前記ヌクレオチド配列は、そのシグナルペプチドを伴わずに HLA-E に融合された B2M 膜タンパク質に融合された HLA-G 提示ペプチドに融合された B2M シグナルペプチドを含む HLA-E 三量体をコードする配列を含む、請求項 5 又は 6 に記載のユニバーサルドナー細胞。

【請求項 8】

前記 HLA-E 三量体をコードする前記配列は、配列番号 55 から本質的になる、請求項 7 に記載のユニバーサルドナー細胞。

【請求項 9】

前記第 1 の免疫寛容原性因子をコードする前記ヌクレオチド配列は、外来プロモーターに作動可能に連結される、請求項 1～8 のいずれか一項に記載のユニバーサルドナー細胞。

【請求項 10】

前記外来プロモーターは、CMV、EF1 α 、PGK、CAG 又は UBC プロモーターである、請求項 9 に記載のユニバーサルドナー細胞。

【請求項 11】

MHC-I 若しくは MHC-II ヒト白血球抗原又は MHC-I 若しくは MHC-II 複合体の構成要素若しくは転写調節因子をコードする遺伝子内又はその近傍に挿入される、第 2 の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列をさらに含み、前記免疫寛容原性因子を発現し、且つ前記 MHC-I 若しくは MHC-II ヒト白血球抗原又は前記 MHC-I 若しくは MHC-II 複合体の前記構成要素若しくは前記転写調節因子の破壊された発現を有する、請求項 1～10 のいずれか一項に記載のユニバーサルドナー細胞。

【請求項 12】

前記 MHC-I 若しくは MHC-II ヒト白血球抗原又は前記 MHC-I 若しくは MHC-II 複合体の前記構成要素若しくは前記転写調節因子の前記破壊された発現は、減少又は消失した発現を含む、請求項 11 に記載のユニバーサルドナー細胞。

【請求項 13】

前記第 2 の免疫寛容原性因子は、PD-L1、HLA-E、HLA-G、CTLA-4 又は CD47 である、請求項 11 又は 12 に記載のユニバーサルドナー細胞。

【請求項 14】

前記 MHC-I 若しくは MHC-II ヒト白血球抗原又は前記 MHC-I 若しくは MHC-II 複合体の前記構成要素若しくは前記転写調節因子は、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、HLA-DR、B2M、NLRC5、CIITA、RFX5、RFXAP 又は RFXANK である、請求項 11～13 のいずれか一項に記載のユニバーサルドナー細胞。

【請求項 15】

前記第 2 の免疫寛容原性因子は、PD-L1 であり、及び前記 MHC-I 若しくは MHC-II ヒト白血球抗原又は前記 MHC-I 若しくは MHC-II 複合体の前記構成要素若しくは前記転写調節因子は、B2M である、請求項 11～14 のいずれか一項に記載のユニバーサルドナー細胞。

10

【請求項 16】

PD-L1 をコードする前記ヌクレオチド配列は、配列番号 11 から本質的になる、請求項 15 に記載のユニバーサルドナー細胞。

【請求項 17】

前記第 2 の免疫寛容原性因子をコードする前記ヌクレオチド配列は、外来プロモーターに作動可能に連結される、請求項 11～16 のいずれか一項に記載のユニバーサルドナー細胞。

【請求項 18】

前記外来プロモーターは、CMV、EF1 α 、PGK、CAG 又は UBC プロモーターである、請求項 17 に記載のユニバーサルドナー細胞。

20

【請求項 19】

前記第 1 の免疫寛容原性因子は、HLA-E であり、前記生存因子は、TXNIP であり、前記第 2 の免疫寛容原性因子は、PD-L1 であり、及び前記 MHC-I 若しくは MHC-II ヒト白血球抗原又は前記 MHC-I 若しくは MHC-II 複合体の前記構成要素若しくは前記転写調節因子は、B2M である、請求項 11～18 のいずれか一項に記載のユニバーサルドナー細胞。

【請求項 20】

幹細胞である、請求項 1～19 のいずれか一項に記載のユニバーサルドナー細胞。

【請求項 21】

前記幹細胞は、胚性幹細胞、成体幹細胞、人工多能性幹細胞又は造血幹細胞である、請求項 20 に記載のユニバーサルドナー細胞。

30

【請求項 22】

分化細胞又は体細胞である、請求項 1～19 のいずれか一項に記載のユニバーサルドナー細胞。

【請求項 23】

系列限定前駆細胞又は完全に分化した体細胞に分化することができる、請求項 1～19 のいずれか一項に記載のユニバーサルドナー細胞。

【請求項 24】

前記系列限定前駆細胞は、脾臓内胚葉前駆細胞、脾臓内分泌性前駆細胞、間葉系前駆細胞、筋肉前駆細胞、芽球細胞、造血前駆細胞又は神経前駆細胞である、請求項 23 に記載のユニバーサルドナー細胞。

40

【請求項 25】

前記完全に分化した体細胞は、膵ベータ細胞、上皮細胞、内胚葉細胞、マクロファージ、肝細胞、脂肪細胞、腎細胞、血液細胞、心筋細胞又は免疫系細胞である、請求項 23 に記載のユニバーサルドナー細胞。

【請求項 26】

請求項 1～25 のいずれか一項に記載の複数のユニバーサルドナー細胞。

【請求項 27】

請求項 26 に記載の複数のユニバーサルドナー細胞に由来する系列限定前駆細胞又は完

50

全に分化した体細胞の集団。

【請求項 28】

前記系列限定前駆細胞は、膵臓内胚葉前駆細胞、膵臓内分泌性前駆細胞、間葉系前駆細胞、筋肉前駆細胞、芽球細胞、造血前駆細胞又は神経前駆細胞であり、及び前記完全に分化した体細胞は、膵ベータ細胞、上皮細胞、内胚葉細胞、マクロファージ、肝細胞、脂肪細胞、腎細胞、血液細胞、心筋細胞又は免疫系細胞である、請求項 27 に記載の細胞の集団。

【請求項 29】

請求項 6 又は 19 に記載の複数のユニバーサルドナー細胞。

【請求項 30】

請求項 29 に記載の複数のユニバーサルドナー細胞に由来する系列限定前駆細胞又は完全に分化した体細胞の集団。

【請求項 31】

前記系列限定前駆細胞は、胚体内胚葉細胞、原始腸管細胞、後方前腸細胞、膵臓内胚葉前駆細胞、膵臓内分泌性前駆細胞、未成熟ベータ細胞又は成熟ベータ細胞であり、及び前記完全に分化した体細胞は、膵ベータ細胞である、請求項 30 に記載の細胞の集団。

【請求項 32】

前記細胞の少なくとも約 50%、少なくとも約 70% 又は少なくとも約 90% は、前記第 1 の免疫寛容原性因子、前記第 2 の免疫寛容原性因子又は前記第 1 及び第 2 の免疫寛容原性因子を発現する、請求項 26 又は 29 に記載の複数の細胞。

【請求項 33】

前記細胞の少なくとも約 50%、少なくとも約 70% 又は少なくとも約 90% は、前記第 1 の免疫寛容原性因子、前記第 2 の免疫寛容原性因子又は前記第 1 及び第 2 の免疫寛容原性因子を発現する、請求項 27、28、30 又は 31 のいずれか一項に記載の細胞の集団。

【請求項 34】

請求項 26 に記載の複数の細胞又は請求項 27 若しくは 28 に記載の細胞の集団を含む組成物。

【請求項 35】

治療を、それを必要とする対象において行う際の使用のための、請求項 34 に記載の組成物。

【請求項 36】

前記対象は、疾患を有するか、それを有することが疑われるか又はそのリスクがある、請求項 35 に記載の組成物。

【請求項 37】

前記疾患は、遺伝的に受け継がれる疾患である、請求項 36 に記載の組成物。

【請求項 38】

請求項 29 に記載の複数の細胞又は請求項 30 若しくは 31 に記載の細胞の集団を含む組成物。

【請求項 39】

糖尿病の治療を、それを必要とする対象において行うための、請求項 38 に記載の組成物。

【請求項 40】

前記対象は、Ⅰ型糖尿病又はⅡ型糖尿病を有する、請求項 39 に記載の組成物。

【請求項 41】

前記対象は、ヒトである、請求項 35～40 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 42】

細胞であって、それを必要とする対象への投与のための細胞を得る方法であって、

(a) 請求項 26、29 又は 32 のいずれか一項に記載の複数のユニバーサルドナー細胞を得るか又は得ていることと、

10

20

30

40

50

(b) 前記細胞が系列限定前駆細胞又は完全に分化した体細胞に分化するのに十分な時間にわたって且つ条件下で前記複数のユニバーサルドナー細胞を維持することを含む方法。

【請求項 4 3】

治療を、それを必要とする対象において行うための方法であって、

(a) 請求項 2 6、2 9 又は 3 2 のいずれか一項に記載の複数のユニバーサルドナー細胞を、系列限定前駆細胞又は完全に分化した体細胞への分化後に得るか又は得ていることと；

(b) 前記系列限定前駆細胞又は完全に分化した体細胞を前記対象に投与することを含む方法。

10

【請求項 4 4】

投与することは、前記系列限定前駆細胞又は完全に分化した体細胞を含むデバイスを前記対象に埋入することを含む、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記系列限定前駆細胞は、膵臓内胚葉前駆細胞、膵臓内分泌性前駆細胞、間葉系前駆細胞、筋肉前駆細胞、芽球細胞、造血前駆細胞又は神経前駆細胞であり、及び前記完全に分化した体細胞は、膵ベータ細胞、上皮細胞、内胚葉細胞、マクロファージ、肝細胞、脂肪細胞、腎細胞、血液細胞、心筋細胞又は免疫系細胞である、請求項 4 2～4 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記対象は、疾患を有するか、それを有することが疑われるか又はそのリスクがある、請求項 4 2～4 5 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 4 7】

前記疾患は、遺伝的に受け継がれる疾患である、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記対象は、ヒトである、請求項 4 2～4 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 9】

糖尿病の治療を、それを必要とする対象において行うための方法であって、

(a) 請求項 2 9 又は 3 2 に記載の複数のユニバーサルドナー細胞を、膵臓内胚葉細胞、膵臓内分泌性細胞、未成熟ベータ細胞、成熟ベータ細胞又は膵ベータ細胞への分化後に得るか又は得ていることと；

(b) 前記膵臓内胚葉細胞、膵臓内分泌性細胞、未成熟ベータ細胞、成熟ベータ細胞又は膵ベータ細胞を前記対象に投与することを含む方法。

30

【請求項 5 0】

投与することは、前記膵臓内胚葉細胞、膵臓内分泌性細胞、未成熟ベータ細胞、成熟ベータ細胞又は膵ベータ細胞を含むデバイスを前記対象に埋入することを含む、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記対象は、I 型糖尿病又は II 型糖尿病を有する、請求項 4 9 又は 5 0 に記載の方法。

40

【請求項 5 2】

前記対象は、ヒトである、請求項 4 9～5 1 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】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2019年9月5日に出願された米国仮特許出願第62／896，477号明細書及び2020年2月21日に出願された米国仮特許出願第62／979，756号明細書の利益を主張し、各々の開示は、全体として参照により本明細書に組み込まれる。

50

【0002】

配列表の参照による組み込み

本出願は、ASCII形式でEFS-Webにより提出された配列表を含み、これは、全体として参照により本明細書に組み込まれる。2020年9月2日に作成されたASCIIの複製は、CT123-PC100867-666513-Sequence-Listing-ST25.txtという名称であり、サイズが約53,000バイトである。

【0003】

本発明は、遺伝子編集の分野に関し、いくつかの実施形態では、複数の対象に適合する細胞、例えばユニバーサルドナー細胞を作製する目的のための遺伝子改変に関する。

【背景技術】

【0004】

HLA適合、抗体によりT細胞活性化を誘発する経路の遮断、免疫抑制剤のカクテルの使用及び自己細胞療法を含む、移植された細胞又は生着された細胞の同種拒絶を克服するために、様々な手法が提案されてきた。移植片拒絶を弱める別の戦略は、移植された細胞又は生着された細胞とレシピエントとの間の同種間相違の最小化を含む。6番染色体上のヒト主要組織適合抗原複合体に位置する遺伝子によってコードされる分子である、細胞表面に発現されるヒト白血球抗原(HLA)は、免疫拒絶の主要なメディエーターである。ドナーと対象との間の単一のHLA遺伝子の不一致は、強い免疫応答を引き起こし得る(Fleischhauer K. et al. "Bone marrow-allograft rejection by T lymphocytes recognizing a single amino acid difference in HLA-B44", N Engl J Med., 1990, 323:1818-1822)。HLA遺伝子は、MHCクラスI(MHC-I)及びMHCクラスII(MHC-II)に分類される。MHC-I遺伝子(HLA-A、HLA-B及びHLA-C)は、ほとんど全ての組織型において発現され、「非自己」の抗原がプロセッシングされたペプチドをCD8+T細胞に提示し、それにより細胞溶解性CD8+T細胞へのそれらの活性化を促進する。「非自己」MHC-I分子を発現する移植された細胞又は生着された細胞は、これらの細胞に向けられる強い細胞性免疫応答を引き起こし、最終的に、活性化された細胞溶解性CD8+T細胞によるそれらの消滅をもたらす。MHC-Iタンパク質は、本質的に、小胞体中のベータ-2-ミクログロブリン(B2M)と関連し、これは、細胞表面上で機能的MHC-I分子を形成するために必須である。

【0005】

MHC-I遺伝子の広範な細胞での発現とは対照的に、MHC-II遺伝子の発現は、樹状細胞、マクロファージ及びB細胞などの抗原提示細胞に制限される。HLA抗原遺伝子は、ヒトゲノムにおいて観察される最も多型の遺伝子である(Rubinstein P., "HLA matching for bone marrow transplantation—how much is enough?" N Engl J Med., 2001, 345:1842-1844)。いずれのHLA遺伝子型とも適合する「ユニバーサルドナー」細胞の作製は、免疫拒絶及び免疫回避のための既存の方法論の関連する経済的コストを解決し得る代替の戦略を提供する。

【0006】

そのようなユニバーサルドナー細胞の系列を作製するために、先行する1つの手法は、MHC-I及びMHC-IIクラス遺伝子の発現を機能的に破壊した。これは、例えば、MHC-I軽鎖、B2Mをコードする両方の遺伝子アレルの遺伝子破壊により活性化され得る。得られたB2M欠損細胞株及びその派生体は、表面MHC-Iの著しい減少、それにより同種のCD8+T細胞に対する免疫原性の低減を呈すると予想されるであろう。転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)で標的化する手法を使用して、B2M遺伝子のエクソン2中の数ヌクレオチドの欠失によってB2M欠損hESC株を作製してきた(Lu, P. et al., "Generating hypoimmune

10

20

30

40

50

genic human embryonic stem cells by the disruption of beta 2-microglobulin”, Stem Cell Rev. 2013, 9: 806-813)。B2M標的化hESC株は、表面HLA-I欠損であると思われたが、それらは、依然としてB2M及びMHC-Iに特異的なmRNAを含有することが見出された。B2M及びMHC-I mRNAは、非標的化hESCのものと同様なレベルで発現された（両方とも構成的であり、且つIFN-g誘導性である）。したがって、これらのTALEN B2M標的化hESC株は、B2M mRNAも発現するB2M2/2マウス細胞で観察されたように、免疫拒絶を引き起こすのに十分であると考えられる残留細胞表面MHC-Iを発現する可能性があるという懸念がある（Gross, R. and Rappuoli, R. “Pertussis toxin promoter sequences involved in modulation”, Proc Natl Acad Sci, 1993, 90: 3913-3917）。TALEN B2M標的化hESC株は、オフターゲット切断現象について試験されなかったが、TALENを使用する際の特異的切断の発生は、それらの臨床使用に対して主要な安全性の懸念を強いると考えられる重大な問題のままである（Grau, J. et al. “TALEN offer: genome-wide TALEN off-target prediction”, Bioinformatics, 2013, 29: 2931-2932; Guilinger J. P. et al. “Broad specificity profiling of TALENs results in engineered nucleases with improved DN A-cleavage specificity”, Nat Methods 2014, 11: 429-435）。さらに、別の報告では、第1のB2Mアレルをノックアウトし、且つ第2のB2MアレルでHLA-E遺伝子をノックインして、HLA-A、HLA-B又はHLA-Cの表面発現がない状態でHLA-Eの二量体又は三量体の表面発現をもたらすことにより、同種認識を回避したIPS細胞を作製した（Gornallusse, G. G. et al., “HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells”, Nature Biotechnology, 2017, 35, 765-773）。

10

20

30

40

50

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

上記の戦略の一部の潜在的な制約は、MHCクラスI陰性細胞が、HLA分子がナチュラルキラー（NK）細胞に対する主要なリガンド阻害剤として機能するため、ナチュラルキラー（NK）細胞によって溶解されやすいことである。宿主NK細胞は、移植又は生着されたB2M-ノードナー細胞を除去することが示されており、同様の現象は、MHCクラスI陰性ヒト白血病株によりインビトロで発生する（Bix, M. et al., “Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice”, Nature, 1991, 349, 329-331; Zarcone, D. et al., “Human leukemia-derived cell lines and clones as models for mechanistic analysis of natural killer cell-mediated cytotoxicity”, Cancer Res. 1987, 47, 2674-2682）。したがって、先行する方法を改善して免疫応答を回避できるユニバーサルドナー細胞を作製する必要性及び生着後に生存できる細胞を作製する必要性が存在する。本明細書に記載されるとおり、生着後の細胞の生存は、同種拒絶に依存しない多くの他の経路、例えば低酸素、活性酸素種、栄養欠乏及び酸化ストレスによって媒介され得る。また、本明細書に記載されるとおり、生存因子（遺伝子及び／又はタンパク質）の遺伝的導入は、細胞が生着後に生存することを促進し得る。本明細書に記載されるとおり、ユニバーサルドナ

一細胞株は、同種拒絶及び生着後の生存の両方に対処する特性を兼ね備え得る。

【課題を解決するための手段】

【0008】

いくつかの態様では、本開示は、ユニバーサルドナー細胞を作製するための方法を包含する。方法は、(a)生存因子をコードする遺伝子内又はその近傍の部位を標的化する部位特異的ヌクレアーゼ、並びに(b)(i)(a)の標的部位の左に位置する領域と相同なヌクレオチド配列、及び(ii)(a)の標的部位の右に位置する領域と相同なヌクレオチド配列に隣接する、免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を細胞に送達することを含み、部位特異的ヌクレアーゼは、(a)の標的部位を切断し、(b)の核酸は、(a)の部位と部分的に重複するか、完全に重複するか、又はその中に含有される部位で挿入され、それによりユニバーサルドナー細胞を作製し、ユニバーサルドナー細胞は、(b)の核酸が挿入されていない細胞と比較して増加した細胞生存を有する。

10

【0009】

いくつかの実施形態では、生存因子は、TXNIP、ZNF143、FOXO1、JNK又はMANFであり、及び免疫寛容原性因子は、PD-L1、HLA-E、HLA-G、CTLA-4又はCD47である。特定の実施形態では、生存因子は、TXNIPであり、及び免疫寛容原性因子は、HLA-Eである。部位特異的ヌクレアーゼが、CRISPRヌクレアーゼ及びガイドRNA(gRNA)を含むCRISPR系である実施形態では、CRISPRヌクレアーゼは、II型Cas9ヌクレアーゼ又はV型Cfp1ヌクレアーゼであり、及びCRISPRヌクレアーゼは、少なくとも1つの核移行シグナルに連結される。いくつかの実施形態では、gRNAは、配列番号15~24又は45~54から選択されるポリヌクレオチド配列を標的化し、及び(i)配列番号25のヌクレオチド配列から本質的になり、且つ(ii)配列番号32のヌクレオチド配列から本質的になる。

20

【0010】

いくつかの実施形態では、方法は、(c)MHC-I若しくはMHC-IIヒト白血球抗原又はMHC-I若しくはMHC-II複合体の構成要素若しくは転写調節因子の1つ以上をコードする遺伝子内又はその近傍の部位を標的化する部位特異的ヌクレアーゼ、並びに(d)(iii)(c)の標的部位の左に位置する領域と相同なヌクレオチド配列、及び(iv)(c)の標的部位の右に位置する領域と相同なヌクレオチド配列に隣接する、免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を細胞に送達することをさらに含み、(d)の免疫寛容原性因子は、免疫寛容原性因子(b)と異なり、部位特異的ヌクレアーゼは、(c)の標的部位を切断し、(d)の核酸は、(c)の部位と部分的に重複するか、完全に重複するか、又はその中に含有される部位で挿入され、ユニバーサルドナー細胞は、(d)の核酸が挿入されていない細胞と比較して増加した免疫回避及び／又は細胞生存を有する。

30

【0011】

いくつかの実施形態では、1つ以上のMHC-I若しくはMHC-IIヒト白血球抗原又はMHC-I若しくはMHC-II複合体の構成要素若しくは転写調節因子をコードする遺伝子は、HLA-A、HLA-B若しくはHLA-Cから選択されるMHC-I遺伝子、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ若しくはHLA-DRから選択されるMHC-II遺伝子又はB2M、NLRC5、CIITA、RFX5、RFXAP若しくはRFXANKから選択される遺伝子であり、及び免疫寛容原性因子は、PD-L1、HLA-E、HLA-G、CTLA-4又はCD47である。特定の実施形態では、1つ以上のMHC-I若しくはMHC-IIヒト白血球抗原又はMHC-I若しくはMHC-II複合体の構成要素若しくは転写調節因子をコードする遺伝子は、B2Mであり、及び免疫寛容原性因子は、PD-L1である。部位特異的ヌクレアーゼが、CRISPRヌクレアーゼ及びgRNAを含むCRISPR系である実施形態では、CRISPRヌクレアーゼは、II型Cas9ヌクレアーゼ又はV型Cfp1ヌクレアーゼであり、及びCRISPRヌクレアーゼは、少なくとも1つの核移行シグナル

40

50

に連結される。いくつかの実施形態では、gRNAは、配列番号1～3又は35～44から選択されるポリヌクレオチド配列を標的化し、及び(iii)配列番号7のヌクレオチド配列から本質的になり、且つ(iv)配列番号13のヌクレオチド配列から本質的になる。

【0012】

いくつかの実施形態では、(b)及び(d)の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列は、外来プロモーターに作動可能に連結される。外来プロモーターは、構成的、誘導性、時間特異的、組織特異的又は細胞型特異的プロモーターから選択され得る。いくつかの実施形態では、外来プロモーターは、CMV、EF1a、PGK、CAG又はUBCプロモーターである。特定の実施形態では、外来プロモーターは、CAGプロモーターである。

10

【0013】

本開示は、本明細書で開示される方法によって作製されるユニバーサルドナー細胞も包含する。いくつかの実施形態では、細胞は、哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、ヒト細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、幹細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、多能性幹細胞(PSC)、胚性幹細胞(ESC)、成体幹細胞(ASC)、人工多能性幹細胞(iPSC)又は造血幹細胞・前駆細胞(HSPC)(造血幹細胞(HSC)とも呼ばれる)である。いくつかの実施形態では、細胞は、分化細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、体細胞である。

20

【0014】

一般に、本明細書で開示されるユニバーサルドナー細胞は、系列限定前駆細胞又は完全に分化した体細胞に分化することができる。いくつかの実施形態では、系列限定前駆細胞は、脾臓内胚葉前駆細胞、脾臓内分泌性前駆細胞、間葉系前駆細胞、筋肉前駆細胞、芽球細胞、造血前駆細胞又は神経前駆細胞であり、及び完全に分化した体細胞は、膵ベータ細胞などの内分泌性細胞、上皮細胞、内胚葉細胞、マクロファージ、肝細胞、脂肪細胞、腎細胞、血液細胞又は免疫系細胞である。いくつかの実施形態では、完全に分化した体細胞は、心筋細胞である。

【0015】

本開示のさらなる態様は、治療を、それを必要とする対象において行うための方法であって、本明細書で開示されるとおりのユニバーサルドナー細胞を、系列限定前駆細胞又は完全に分化した体細胞への分化後に得るか又は得ていることと、対象に系列限定前駆細胞又は完全に分化した体細胞を投与することを含む方法を提供する。また、細胞であって、それを必要とする対象への投与のための細胞を得る方法であって、本明細書で開示されるとおりのユニバーサルドナー細胞を得るか又は得ていることと、ユニバーサルドナー細胞を、細胞が系列限定前駆細胞又は完全に分化した体細胞に分化するのに十分な時間にわたって且つ条件下で維持することを含む方法が提供される。いくつかの実施形態では、対象は、疾患を有するか、それを有することが疑われるか又はそのリスクがあるヒトである。いくつかの実施形態では、疾患は、遺伝的に受け継がれる疾患である。

30

【0016】

本開示のさらに別の態様は、配列番号15～24又は45～54から選択されるポリヌクレオチド配列を標的化するgRNAを包含する。

40

【0017】

本開示は、様々な改変形態及び代替形態が可能であるが、その特定の実施形態は、図面中の例を通して示され、本明細書で詳細に記載される。しかしながら、本明細書に示される図面及び詳細な説明は、本開示を、開示された特定の実施形態に限定することを意図したものではなく、逆に、添付の特許請求の範囲によって定義されるとおりの本開示の趣旨及び範囲内に入る全ての変更形態、均等物及び代替形態を包含することを意図していることが理解されるべきである。

【0018】

本開示の他の特徴及び利点は、添付の図面を参照して、本発明の実施形態の以下の詳細

50

な説明において明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】C y T 4 9細胞におけるB 2 M g R N A切断のT I D E分析を示す。B 2 M - 1、B 2 M - 2及びB 2 M - 3 g R N Aが試験された。

【図2 A - 2 B】W T C y T 4 9細胞（図2 A）及びB 2 M K O C y T 4 9細胞（図2 B）におけるI F N - γあり及びなしの両方でのB 2 M発現のフローサイトメトリー評価を示す。

【図3】HDRのためのB 2 M - C A G G S - P D - L 1ドナーベクターのプラスミドマップを示す。

【図4】B 2 M K O / P D - L 1 K I C y T 4 9幹細胞の多能性のフローサイトメトリー分析を示す。派生したクローンは、多能性に不可欠な2つの転写因子であるO C T 4及びS O X 2の> 9 9 %の二重陽性であった。I g Gは、陰性対照として使用された。

【図5 A - 5 B】W T C y T 4 9（図5 A）及びB 2 M K O / P D - L 1 K I（図5 B）に由来する幹細胞クローンのフローサイトメトリー分析を示す。W T細胞は、I F N γに応答するB 2 M発現を上方制御する。B 2 M K O / P D - L 1 K Iクローンは、P D - L 1を十分に発現し、I F N γ処理の有無に関わらずB 2 Mを発現しない。N T - 1 = 未処理。I N T G - 1 = 5 0 n g / m L I F N γで4 8時間処理された細胞。

【図6】野生型、C y T 4 9、P D - L 1 K I / B 2 M K O又はB 2 M K O C y T 4 9細胞から分化した段階1（胚体内胚葉）細胞でのF O X A 2及びS O X 1 7に関するフローサイトメトリーを示す。

【図7】野生型、P D - L 1 K I / B 2 M K O又はB 2 M K O細胞から分化した段階1（胚体内胚葉）細胞におけるF O X A 2及びS O X 1 7発現に関する定量的パーセンテージを示す。

【図8】野生型、P D - L 1 K I / B 2 M K O又はB 2 M K O細胞から分化した段階4（P E C）細胞におけるC H G A、P D X 1及びN K X 6 . 1発現に関する定量的パーセンテージを示す。

【図9】段階4（P E C）の細胞の不均一な集団を示す。

【図10】野生型、P D - L 1 K I / B 2 M K O又はB 2 M K O細胞から分化した細胞における分化時間経過にわたる選択された遺伝子発現を示す。

【図11 A - 11 F】野生型、P D - L 1 K I / B 2 M K O又はB 2 M K O細胞から分化した細胞における分化時間経過にわたる選択された遺伝子発現を示す。図11 Aは、野生型細胞におけるB 2 M発現を示す。図11 Bは、B 2 M K O細胞におけるB 2 M発現を示す。図11 Cは、P D - L 1 K I / B 2 M K O細胞におけるB 2 M発現を示す。図11 Dは、野生型細胞におけるP D - L 1発現を示す。図11 Eは、B 2 M K O細胞におけるP D - L 1発現を示す。図11 Fは、P D - L 1 K I / B 2 M K O細胞におけるP D - L 1発現を示す。

【図12 A - 12 F】野生型、P D - L 1 / B 2 M K O又はB 2 M K O細胞から分化した細胞におけるP E C段階でのM H CクラスI及びクラスII発現を示す。図12 Aは、野生型細胞におけるM H CクラスI発現を示す。図12 Bは、B 2 M K O細胞におけるM H CクラスI発現を示す。図12 Cは、P D - L 1 K I / B 2 M K O細胞におけるM H CクラスI発現を示す。図12 Dは、野生型細胞におけるM H CクラスII P D - L 1発現を示す。図12 Eは、B 2 M K O細胞におけるM H CクラスII発現を示す。図12 Fは、P D - L 1 K I / B 2 M K O細胞におけるM H CクラスII発現を示す。

【図13】T C 1 1 3 3 h i P S CにおけるT X N I P g R N A切断のT I D E分析を示す。ガイドT 5は、エクソン1での切断に最も適しているように見えた。

【図14】HDRのためのT X N I P - C A G G S - H L A - Eドナーベクターのプラスミドマップを示す。

【図15】B 2 M K O / P D - L 1 K I及びT X N I P K O / H L A - E K I

10

20

30

40

50

CyT49幹細胞の多能性に関するフローサイトメトリー分析を示す。派生したクローンは、多能性に不可欠な2つの転写因子であるOCT4及びSOX2の>99%の二重陽性であった。クローンはまた、B2Mを発現しない。クローンは、MHC-Iを発現しない。

【図16】B2M KO/PD-L1 KI及びTXNIP KO/HLA-E KI CyT49幹細胞の多能性に関するフローサイトメトリー分析を示す。派生したクローンは、段階6（未成熟細胞）までの分化を経た後にPD-L1及びHLA-Eを発現する。IgGは、陰性対照として使用された。

【図17】野生型、B2M KO、PD-L1 KI/B2M KO (V1A) 又はTXNIP KO/HLA-E KI (V1B) hESCから分化した段階4 (PEC) 細胞におけるCHGA、PDX1及びNKX6.1発現の定量的パーセンテージを示す。

【図18A-18B】TXNIP KO細胞（図18A）又はTXNIP KO/HLA-E KI (V1B)（図18B）細胞における分化時間経過にわたる選択された遺伝子発現を示す。

【図19A-19B】CFSE増殖アッセイを使用するT細胞活性化のためのフローサイトメトリー分析を示す。ヒト初代CD3+T細胞を、WT、B2M KO、B2M KO/PD-L1 KI又はB2M KO/PD-L1 KI+TXNIP KO/HLA-E KI CyT49クローンに由来するPECと共にインキュベートした（図19A）。図19Bは、様々な細胞におけるT細胞活性化を要約する。対照として「CFSE-T単独」セットを伴う一方ANOVA（ダネット多重比較検定による $\alpha=0.05$ ）。*、 $p<0.05$ ；**、 $p<0.01$ ；***、 $p<0.001$ ；****、 $p<0.0001$ 。n.s.=非有意。

【図20】TXNIP KO細胞から分化した細胞の分化時間経過にわたる選択された遺伝子発現を示す。

【図21】TXNIP KO細胞から分化したPEC細胞におけるPDX1及びNKX6.1発現のフローサイトメトリー評価を示す。

【図22】段階6まで分化した後の野生型（「WT」）及び非切断ガイド対照（「NCG #1」）細胞と比較した様々なB2M KO/PD-L1 KI及びTXNIP KO/HLA-E KIクローン（「S6-V1B-H9」、「S6-V1B-3B11」、「S6-V1B-1G7」及び「S6-V1B-3C2」）の形態を示す。

【図23A-23F】段階6までの分化後のクローンの選択された遺伝子発現を示す。図23Aは、例示的なB2M KO/PD-L1 KI及びTXNIP KO/HLA-E KIクローンから分化した細胞の分化時間経過にわたる選択された遺伝子発現を示す。図23B-23Fは、未分化B2M KO/PD-L1 KI及びTXNIP KO/HLA-E KIクローン（「ES-V1B-H9」）並びに対照としての野生型の島（「Islets」）とともに段階6まで分化された野生型細胞（「S6-Cyt49 WT」）、非切断ガイド対照（「S6-NCG #1」）細胞並びに様々なB2M KO/PD-L1 KI及びTXNIP KO/HLA-E KIクローン（「S6-V1B-H9」、「S6-V1B-3B11」、「S6-V1B-1G7」及び「S6-V1B-3C2」）におけるINS（図23B）、NKX6.1（図23C）、GCG（図23D）、SST（図23E）及びGCK（図23F）の遺伝子発現を示す。

【図24A-24B】B2M KO/PD-L1 KI及びTXNIP KO/HLA-E KIクローンから分化された段階6の細胞におけるINS及びGCGの発現（図24A）並びにINS及びNKX6.1の発現（図24B）のフローサイトメトリー評価を示す。

【図25A-25B】野生型細胞（「S6-WT」）、非切断ガイド対照細胞（「S6-NCG #1」）並びに2つのB2M KO/PD-L1 KI及びTXNIP KO/HLA-E KIクローン（「S6-V1B003」及び「V1B-H9」）から分化した段階6の細胞におけるINSの発現（図25A）及びNKX6.1の発現（図25B）のパーセンテージを示す。

10

20

30

40

50

【図 2 6 A】異なる播種密度を有するクローン 1 (B 2 M KO / P D - L 1 K I 及び T X N I P KO / H L A - E K I) から分化した段階 4 の細胞における P D X 1 及び N K X 6 . 1 の発現のフローサイトメトリー評価を示す。

【図 2 6 B】クローン 1 (B 2 M KO / P D - L 1 K I 及び T X N I P KO / H L A - E K I) 細胞から分化した段階 4 の細胞における P D - L 1 及び H L A - E の発現のためのフローサイトメトリー評価を示す。

【図 2 7 A - 2 7 C】P E C 段階まで分化した播種クローンの特徴付けの分析を示す。図 2 7 A は、形態を示し、図 2 7 B は、分化時間経過にわたる選択された遺伝子発現を示し、図 2 7 C は、分化した集団における C H G A⁺ / N K X 6 . 1⁺ / P D X 1⁺ 発現細胞のパーセンテージを示す。

【図 2 8】T X N I P KO / H L A - E K I クローンから分化した細胞の分化時間経過にわたる選択された遺伝子発現を示す。

【発明を実施するための形態】

【0020】

I. 定義

欠失：本明細書で使用する場合、用語「遺伝子欠失」又は「ノックアウト」と互換的に使用され得る用語「欠失」は、一般に、ゲノム DNA の部位又は領域が、任意の分子生物学的方法、例えば本明細書に記載される方法、例えばゲノム DNA の部位にエンドヌクレアーゼ及び少なくとも 1 つの g R N A を送達することによって除去される遺伝子改変を指す。任意の数のヌクレオチドが欠失され得る。いくつかの実施形態では、欠失は、少なくとも 1 個、少なくとも 2 個、少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、少なくとも 5 個、少なくとも 10 個、少なくとも 15 個、少なくとも 20 個又は少なくとも 25 個のヌクレオチドの除去を含む。いくつかの実施形態では、欠失は、10 ~ 50、25 ~ 75、50 ~ 100、50 ~ 200 又は 100 を超えるヌクレオチドの除去を含む。いくつかの実施形態では、欠失は、標的遺伝子全体、例えば B 2 M 遺伝子の除去を含む。いくつかの実施形態では、欠失は、標的遺伝子の部分、例えば B 2 M 遺伝子のプロモーター及び / 又はコード配列の全て又は部分の除去を含む。いくつかの実施形態では、欠失は、転写調節因子、例えば標的遺伝子のプロモーター領域の除去を含む。いくつかの実施形態では、欠失は、コード領域によって正常に発現される産物がもはや発現されないか、切断型として発現されるか又は低いレベルで発現されるようなコード領域の全て又は部分の除去を含む。いくつかの実施形態では、欠失は、未改変細胞に対して遺伝子の発現の減少をもたらす。

【0021】

エンドヌクレアーゼ：本明細書で使用する場合、用語「エンドヌクレアーゼ」は、一般に、ポリヌクレオチド内のホスホジエステル結合を切断する酵素を指す。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、DNA ポリヌクレオチド内のホスホジエステル結合を特異的に切断する。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (Z F N)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (T A L E N)、ホーミングエンドヌクレアーゼ (H E)、メガヌクレアーゼ、M e g a T A L 又は C R I S P R 関連エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、RNA 誘導型エンドヌクレアーゼである。ある種の態様では、RNA 誘導型エンドヌクレアーゼは、C R I S P R ヌクレアーゼ、例えば I I 型 C R I S P R C a s 9 エンドヌクレアーゼ又は V 型 C R I S P R C p f 1 エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、C a s 1、C a s 1 B、C a s 2、C a s 3、C a s 4、C a s 5、C a s 6、C a s 7、C a s 8、C a s 9 (C s n 1 及び C s x 1 2 とし

ても知られる)、C a s 1 0 0、C s y 1、C s y 2、C s y 3、C s e 1、C s e 2、C s c 1、C s c 2、C s a 5、C s n 2、C s m 2、C s m 3、C s m 4、C s m 5、C s m 6、C m r 1、C m r 3、C m r 4、C m r 5、C m r 6、C s b 1、C s b 2、C s b 3、C s x 1 7、C s x 1 4、C s x 1 0、C s x 1 6、C s a X、C s x 3、C s x 1、C s x 1 5、C s f 1、C s f 2、C s f 3、C s f 4 若しくは C p f 1 エンドヌクレアーゼ又はそのホモログ、その天然に存在する分子の組換え、そのコドン最適化バ

ージョン若しくはその改変バージョン或いはその組み合わせである。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、1つ以上の一本鎖切断（SSB）及び／又は1つ以上の二本鎖切断（DSB）を導入し得る。

【0022】

遺伝子改変：本明細書で使用する場合、用語「遺伝子改変」は、一般に、任意の分子生物学的方法、例えば本明細書に記載される方法を使用して、例えばゲノムDNAの部位にエンドヌクレアーゼ及び少なくとも1つのgRNAを送達することによって遺伝的に編集又は操作されたゲノムDNAの部位を指す。遺伝子改変の例としては、挿入、欠失、重複、逆位及び転座並びにこれらの組み合わせが挙げられる。いくつかの実施形態では、遺伝子改変は、欠失である。いくつかの実施形態では、遺伝子改変は、挿入である。他の実施形態では、遺伝子改変は、標的遺伝子のリーディングフレームが移動されて、改変された遺伝子産物をもたらすか又は遺伝子産物をもたらさないような挿入-欠失変異（又はインデル）である。

10

【0023】

ガイドRNA（gRNA）：本明細書で使用する場合、用語「ガイドRNA」又は「gRNA」は、一般に、エンドヌクレアーゼと相互作用、例えば結合でき、且つ標的ゲノム部位又は領域と結合又はハイブリダイズできる短いリボ核酸を指す。いくつかの実施形態では、gRNAは、一分子ガイドRNA（sgRNA）である。いくつかの実施形態では、gRNAは、スペーサー伸長領域を含み得る。いくつかの実施形態では、gRNAは、tracrRNA伸長領域を含み得る。いくつかの実施形態では、gRNAは、一本鎖である。いくつかの実施形態では、gRNAは、天然に存在するヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、gRNAは、化学修飾されたgRNAである。いくつかの実施形態では、化学修飾されたgRNAは、化学修飾、例えば2'-O-メチル糖修飾を有する少なくとも1つのヌクレオチドを含むgRNAである。いくつかの実施形態では、化学修飾されたgRNAは、修飾された核酸骨格を含む。いくつかの実施形態では、化学修飾されたgRNAは、2'-O-メチル-ホスホロチオエート残基を含む。いくつかの実施形態では、gRNAは、DNAエンドヌクレアーゼと予め複合体を形成し得る。

20

【0024】

挿入：本明細書で使用する場合、用語「遺伝子挿入」又は「ノックイン」と互換的に使用され得る用語「挿入」は、一般に、ポリヌクレオチドが、任意の分子生物学的方法、例えば本明細書に記載される方法、例えばゲノムDNAの部位にエンドヌクレアーゼ及び少なくとも1つのgRNAを送達することによってゲノムDNAの部位又は領域に導入又は付加される遺伝子改変を指す。いくつかの実施形態では、挿入は、以前の遺伝子改変、例えば欠失又は挿入-欠失変異の部位であったゲノムDNAの部位内又はその近傍で起こり得る。いくつかの実施形態では、挿入は、以前の遺伝子改変、例えば欠失又は挿入-欠失変異の部位と部分的に重複するか、完全に重複するか、又はその中に含有されるゲノムDNAの部位で起こる。いくつかの実施形態では、挿入は、セーフハーバー座位で起こる。いくつかの実施形態では、挿入は、目的のタンパク質をコードするポリヌクレオチドの導入を含む。いくつかの実施形態では、挿入は、免疫寛容原性因子をコードするポリヌクレオチドの導入を含む。いくつかの実施形態では、挿入は、生存因子をコードするポリヌクレオチドの導入を含む。いくつかの実施形態では、挿入は、外来プロモーター、例えば構成的プロモーター、例えばCAGプロモーターの導入を含む。いくつかの実施形態では、挿入は、非コード遺伝子をコードするポリヌクレオチドの導入を含む。一般に、挿入されるポリヌクレオチドは、挿入の部位にあるか又はその近傍のゲノムDNAと実質的な配列相同性を有する配列（例えば、ホモロジーアーム）と隣接する。

30

40

【0025】

主要組織適合抗原複合体クラスI（MHC-I）：本明細書で使用する場合、用語「主要組織適合抗原複合体クラスI」又は「MHC-I」は、一般に、哺乳動物、例えばヒトを含む脊椎動物における全ての有核細胞の細胞表面に見出される生体分子のクラス；及び免疫応答を刺激するために、非自己又は外来抗原のペプチド、例えばタンパク質を、細胞

50

内（すなわちサイトゾル）から細胞傷害性T細胞、例えばCD8+T細胞に提示する機能を指す。いくつかの実施形態では、MHC-I生体分子は、MHC-I遺伝子又はMHC-Iタンパク質である。MHC-Iタンパク質のベータ-2ミクログロブリン（B2M）タンパク質との複合体形成は、全てのMHC-Iタンパク質の細胞表面発現のために必要とされる。いくつかの実施形態では、未改変細胞に対してMHC-Iヒト白血球抗原（HLA）の発現を減少させることは、MHC-I遺伝子の発現における減少（又は低減）を含む。いくつかの実施形態では、未改変細胞に対してMHC-Iヒト白血球抗原（HLA）の発現を減少させることは、MHC-Iタンパク質の細胞表面発現における減少（又は低減）を含む。いくつかの実施形態では、MHC-I生体分子は、HLA-A（NCBI遺伝子ID番号：3105）、HLA-B（NCBI遺伝子ID番号：3106）、HLA-C（NCBI遺伝子ID番号：3107）又はB2M（NCBI遺伝子ID番号：567）である。

10

【0026】

主要組織適合抗原複合体クラスII（MHC-II）：本明細書で使用する場合、用語「主要組織適合抗原複合体クラスII」又は「MHC-II」は、一般に、哺乳動物、例えばヒトを含む脊椎動物における抗原提示細胞の細胞表面に典型的に見出される生体分子のクラス；及び免疫応答を刺激するために、非自己又は外来抗原のペプチド、例えばタンパク質を、細胞の外部（細胞外）から細胞傷害性T細胞、例えばCD8+T細胞に提示する機能を指す。いくつかの実施形態では、抗原提示細胞は、樹状細胞、マクロファージ又はB細胞である。いくつかの実施形態では、MHC-II生体分子は、MHC-II遺伝子又はMHC-IIタンパク質である。いくつかの実施形態では、未改変細胞に対してMHC-IIヒト白血球抗原（HLA）の発現を減少させることは、MHC-II遺伝子の発現における減少（又は低減）を含む。いくつかの実施形態では、未改変細胞に対してMHC-IIヒト白血球抗原（HLA）の発現を減少させることは、MHC-IIタンパク質の細胞表面発現における減少（又は低減）を含む。いくつかの実施形態では、MHC-II生体分子は、HLA-DPA（NCBI遺伝子ID番号：3113）、HLA-DPB（NCBI遺伝子ID番号：3115）、HLA-DMA（NCBI遺伝子ID番号：3108）、HLA-DMB（NCBI遺伝子ID番号：3109）、HLA-DOA（NCBI遺伝子ID番号：3111）、HLA-DOB（NCBI遺伝子ID番号：3112）、HLA-DQA（NCBI遺伝子ID番号：3117）、HLA-DQB（NCBI遺伝子ID番号：3119）、HLA-DRA（NCBI遺伝子ID番号：3122）又はHLA-DRB（NCBI遺伝子ID番号：3123）である。

20

30

【0027】

ポリヌクレオチド：本明細書で使用する場合、用語「核酸」と互換的に使用され得る用語「ポリヌクレオチド」は、一般に、2個以上のヌクレオチドを含む生体分子を指す。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、少なくとも2個、少なくとも5個、少なくとも10個、少なくとも20個、少なくとも30個、少なくとも40個、少なくとも50個、少なくとも100個、少なくとも200個、少なくとも250個、少なくとも500個又は任意の数のヌクレオチドを含む。例えば、ポリヌクレオチドは、少なくとも500ヌクレオチド、少なくとも約600ヌクレオチド、少なくとも約700ヌクレオチド、少なくとも約800ヌクレオチド、少なくとも約900ヌクレオチド、少なくとも約1000ヌクレオチド、少なくとも約2000ヌクレオチド、少なくとも約3000ヌクレオチド、少なくとも約4000ヌクレオチド、少なくとも約4500ヌクレオチド又は少なくとも約5000ヌクレオチドを含み得る。ポリヌクレオチドは、DNA若しくはRNA分子又はハイブリッドDNA/RNA分子であり得る。ポリヌクレオチドは、一本鎖又は二本鎖であり得る。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、ゲノムDNAの部位又は領域である。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、未改変細胞又はユニバーサルドナー細胞のゲノム内に含まれる内在性の遺伝子である。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、ゲノムDNAに組み込まれていない外来ポリヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、ゲノムDNAに組み込まれている外来ポ

40

50

リヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、プラスミド又はアデノ随伴ウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、環状又は線状分子である。

【0028】

セーフハーバー座位：本明細書で使用する場合、用語「セーフハーバー座位」は、一般に、遺伝子挿入を、細胞に対する有害作用を伴わずにその位置、部位又は領域に収容できるゲノムDNAの任意の位置、部位又は領域を指す。いくつかの実施形態では、セーフハーバー座位は、遺伝子内又は遺伝子外領域である。いくつかの実施形態では、セーフハーバー座位は、典型的には、転写的にサイレントであるゲノムDNAの領域である。いくつかの実施形態では、セーフハーバー座位は、AAVS1 (PPP1R12C)、ALB、Angptl3、Apoc3、ASGR2、CCR5、FIX (F9)、G6PC、Gys2、HGD、Lp (a)、Pcsk9、Serpina1、TF又はTTR座位である。いくつかの実施形態では、セーフハーバー座位は、Sadelaín, M. et al., "Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome", Nature Reviews Cancer, 2012, Vol 12, pages 51-58において記載される。

10

【0029】

安全スイッチ：本明細書で使用する場合、用語「安全スイッチ」は、一般に、細胞にアポトーシスを起こさせる生体分子を指す。いくつかの実施形態では、安全スイッチは、タンパク質又は遺伝子である。いくつかの実施形態では、安全スイッチは、自殺遺伝子である。いくつかの実施形態では、安全スイッチ、例えば単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (HSV-tk) は、プロドラッグ、例えばガンシクロビルを代謝することにより、細胞にアポトーシスを起こさせる。いくつかの実施形態では、自身に対する過剰発現された安全スイッチの存在が細胞にアポトーシスを起こさせる。いくつかの実施形態では、安全スイッチは、p53系分子、HSV-tk又は誘導性カスパーゼ-9である。

20

【0030】

対象：本明細書で使用する場合、用語「対象」は、哺乳動物を指す。いくつかの実施形態では、対象は、非ヒト霊長類又は齧歯類である。いくつかの実施形態では、対象は、ヒトである。いくつかの実施形態では、対象は、疾患又は障害を有するか、それを有することが疑われるか又はそのリスクがある。いくつかの実施形態では、対象は、疾患又は障害の1つ以上の症状を有する。

30

【0031】

生存因子：本明細書で使用する場合、用語「生存因子」は、一般に、細胞において増加又は減少するとき、未改変細胞に対して、宿主対象への移植又は生着後に細胞、例えばユニバーサルドナー細胞がより高い生存率で生存することを可能にするタンパク質（例えば、本明細書に記載されるとおりのポリヌクレオチドによって発現される）を指す。いくつかの実施形態では、生存因子は、ヒト生存因子である。いくつかの実施形態では、生存因子は、細胞生存に関与する決定的な経路のメンバーである。いくつかの実施形態では、細胞生存に関与する決定的な経路は、低酸素、活性酸素種、栄養欠乏及び／又は酸化ストレスに対する影響を有する。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの生存因子の遺伝子改変、例えば欠失又は挿入は、生着後に未改変細胞より長い期間、例えば少なくとも1.05倍、少なくとも1.1倍、少なくとも1.25倍、少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍又は少なくとも50倍長い期間にわたってユニバーサルドナー細胞が生存することを可能にする。いくつかの実施形態では、生存因子は、ZNF143 (NCBI遺伝子ID番号：7702)、TXNIP (NCBI遺伝子ID番号：10628)、FOXO1 (NCBI遺伝子ID番号：2308)、JNK (NCBI遺伝子ID番号：5599) 又はMANF (NCBI遺伝子ID番号：7873) である。いくつかの実施形態では、生存因子は、細胞、例えばユニバーサルドナー細胞に挿入される。いくつかの実施形態では、生存因子は、細胞、例えばユニバーサルドナー細胞から欠失される。いくつかの実

40

50

施形態では、MANFをコードするポリヌクレオチドの挿入は、未改変細胞に対して、宿主対象への移植又は生着後に細胞、例えばユニバーサルドナー細胞がより高い生存率で生存することを可能にする。いくつかの実施形態では、ZFN143、TXNIP、FOXO1又はJNK遺伝子内又はその近傍での欠失又は挿入-欠失変異は、未改変細胞に対して、宿主対象への移植又は生着後に細胞、例えばユニバーサルドナー細胞がより高い生存率で生存することを可能にする。

【0032】

免疫寛容原性因子：本明細書で使用する場合、用語「免疫寛容原性因子」は、一般に、細胞において増加又は減少するとき、未改変細胞に対して、宿主対象への移植又は生着後に細胞、例えばユニバーサルドナー細胞がより高い率で免疫拒絶を阻害又は回避することを可能にするタンパク質（例えば、本明細書に記載されるとおりのポリヌクレオチドによって発現される）を指す。いくつかの実施形態では、免疫寛容原性因子は、ヒト免疫寛容原性因子である。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫寛容原性因子の遺伝子改変（例えば、少なくとも1つの免疫寛容原性因子の挿入又は欠失）は、生着後に未改変細胞より少なくとも1.05倍、少なくとも1.1倍、少なくとも1.25倍、少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍又は少なくとも50倍高い率で細胞、例えばユニバーサルドナー細胞が免疫拒絶を阻害又は回避することを可能にする。いくつかの実施形態では、免疫寛容原性因子は、HLA-E（NCBI遺伝子ID番号：3133）、HLA-G（NCBI遺伝子ID番号：3135）、CTLA-4（NCBI遺伝子ID番号：1493）、CD47（NCBI遺伝子ID番号：961）又はPD-L1（NCBI遺伝子ID番号：29126）である。いくつかの実施形態では、免疫寛容原性因子は、細胞、例えばユニバーサルドナー細胞に挿入される。いくつかの実施形態では、免疫寛容原性因子は、細胞、例えばユニバーサルドナー細胞から欠失される。いくつかの実施形態では、HLA-E、HLA-G、CTLA-4、CD47及び／又はPD-L1をコードするポリヌクレオチドの挿入は、宿主対象への移植又は生着後に細胞、例えばユニバーサルドナー細胞が免疫拒絶を阻害又は回避することを可能にする。

【0033】

MHC-I又はMHC-IIの転写調節因子：本明細書で使用する場合、用語「MHC-I又はMHC-IIの転写調節因子」は、一般に、MHC-I及び／又はMHC-IIヒト白血球抗原の発現を調節する、例えば増加又は減少させる生体分子を指す。いくつかの実施形態では、生体分子は、ポリヌクレオチド、例えば遺伝子又はタンパク質である。いくつかの実施形態では、MHC-I又はMHC-IIの転写調節因子は、少なくとも1つのMHC-I又はMHC-IIタンパク質の細胞表面発現を増加又は減少させることになる。いくつかの実施形態では、MHC-I又はMHC-IIの転写調節因子は、少なくとも1つのMHC-I又はMHC-II遺伝子の発現を増加又は減少させることになる。いくつかの実施形態では、転写調節因子は、CIITA（NCBI遺伝子ID番号：4261）又はNLRC5（NCBI遺伝子ID番号：84166）である。いくつかの実施形態では、CIITA又はNLRC5の発現の欠失又は低減は、少なくとも1つのMHC-I又はMHC-II遺伝子の発現を減少させる。

【0034】

ユニバーサルドナー細胞：本明細書で使用する場合、用語「ユニバーサルドナー細胞」は、一般に、未改変細胞に対して、細胞移植中に同種拒絶になりにくく、且つ／又は移植後の生存の増加を実証する遺伝子改変細胞を指す。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるとおりの遺伝子改変細胞は、ユニバーサルドナー細胞である。いくつかの実施形態では、ユニバーサルドナー細胞は、未改変細胞と比較して増加した免疫回避及び／又は細胞生存を有する。いくつかの実施形態では、ユニバーサルドナー細胞は、未改変細胞と比較して増加した細胞生存を有する。いくつかの実施形態では、ユニバーサルドナー細胞は、幹細胞であり得る。いくつかの実施形態では、ユニバーサルドナー細胞は、胚性幹細胞（ESC）、成体幹細胞（ASC）、人工多能性幹細胞（iPSC）又は造血幹細胞

10

20

30

40

50

・前駆細胞（HSPC）（造血幹細胞（HSC）とも呼ばれる）であり得る。いくつかの実施形態では、ユニバーサルドナー細胞は、分化細胞であり得る。いくつかの実施形態では、ユニバーサルドナー細胞は、体細胞（例えば、免疫系細胞）であり得る。いくつかの実施形態では、ユニバーサルドナー細胞は、対象に投与される。いくつかの実施形態では、ユニバーサルドナー細胞は、疾患を有するか、又は有することが疑われるか、又はそのリスクがある対象に投与される。いくつかの実施形態では、ユニバーサルドナー細胞は、系列限定前駆細胞又は完全に分化した体細胞に分化することができる。いくつかの実施形態では、系列限定前駆細胞は、脾臓内胚葉前駆細胞、脾臓内分泌性前駆細胞、間葉系前駆細胞、筋肉前駆細胞、芽球細胞、造血前駆細胞又は神経前駆細胞である。いくつかの実施形態では、完全に分化した体細胞は、膵ベータ細胞などの内分泌性細胞、上皮細胞、内胚葉細胞、マクロファージ、肝細胞、脂肪細胞、腎細胞、血液細胞又は免疫系細胞である。いくつかの実施形態では、完全に分化した体細胞は、心筋細胞である。

10

【0035】

未改変細胞：本明細書で使用する場合、用語「未改変細胞」は、MHC-I、MHC-II、MHC-I若しくはMHC-IIの転写調節因子、生存因子及び／又は免疫寛容原性因子をコードするポリヌクレオチド又は遺伝子を含む遺伝子改変にかけられたことがない細胞を指す。いくつかの実施形態では、未改変細胞は、幹細胞であり得る。いくつかの実施形態では、未改変細胞は、胚性幹細胞（ESC）、成体幹細胞（ASC）、人工多能性幹細胞（iPSC）又は造血幹細胞・前駆細胞（HSPC）（造血幹細胞（HSC）とも呼ばれる）であり得る。いくつかの実施形態では、未改変細胞は、分化細胞であり得る。いくつかの実施形態では、未改変細胞は、体細胞（例えば、免疫系細胞、例えばT細胞、例えばCD8+T細胞）から選択され得る。ユニバーサルドナー細胞が「未改変細胞に対して」比較される場合、ユニバーサルドナー細胞及び未改変細胞は、同じ細胞型であるか又は共通の親細胞株を共有し、例えば、ユニバーサルドナーiPSCは、未改変iPSCに対して比較される。

20

【0036】

遺伝子内又はその近傍：本明細書で使用する場合、用語「遺伝子内又はその近傍」は、前記遺伝子のイントロン又はエクストロン構成要素であるか又は前記遺伝子に隣接して位置するゲノムDNAの部位又は領域を指す。いくつかの実施形態では、ゲノムDNAの部位は、それが前記遺伝子のイントロン又はエクソンの少なくとも一部を含む場合、遺伝子内にある。いくつかの実施形態では、遺伝子の近傍に位置するゲノムDNAの部位は、前記遺伝子の5'又は3'末端（例えば、前記遺伝子のコード領域の5'又は3'末端）にあり得る。いくつかの実施形態では、遺伝子の近傍に位置するゲノムDNAの部位は、前記遺伝子の発現を調節するプロモーター領域又はリプレッサー領域であり得る。いくつかの実施形態では、遺伝子の近傍に位置するゲノムDNAの部位は、前記遺伝子と同じ染色体上にあり得る。いくつかの実施形態では、ゲノムDNAの部位又は領域は、前記遺伝子の5'又は3'末端（例えば、前記遺伝子のコード領域の5'又は3'末端）に対して50Kb、40Kb、30Kb、20Kb、10Kb、5Kb、1Kb以内又はそれより近傍にある場合、遺伝子の近傍にある。

30

【0037】

II. ゲノム編集方法

ゲノム編集は、一般に、ゲノムのヌクレオチド配列を好ましくは的確な又は既定の様式で改変するプロセスを指す。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されたとおりのゲノム編集方法、例えばCRISPR-エンドヌクレアーゼ系を使用して、例えばユニバーサルドナー細胞を作製するために本明細書に記載されたとおりの細胞を遺伝子改変し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されたとおりのゲノム編集方法、例えばCRISPR-エンドヌクレアーゼ系を使用して、例えば未改変細胞に対して、1つ以上のMHC-I及び／若しくはMHC-IIヒト白血球抗原又はMHC-I若しくはMHC-II複合体の他の構成要素の発現を減少させる少なくとも1つの遺伝子内又はその近傍に少なくとも1つの遺伝子改変を導入し；未改変細胞に対して、免疫寛容原性因子をコードす

40

50

る少なくとも1つのポリヌクレオチドの発現を増加させる少なくとも1つの遺伝子改変を導入し；及び／又は未改変細胞に対して、生存因子をコードする少なくとも1つの遺伝子の発現を増加又は減少させる少なくとも1つの遺伝子改変を導入するために、本明細書に記載されるとおりの細胞を遺伝子改変し得る。

【0038】

本明細書に記載されるゲノム編集の方法の例は、ゲノム中の的確な標的位置でデオキシリボ核酸（DNA）を切断する部位特異的ヌクレアーゼを使用して、それによりゲノム内の特定の位置で一本鎖又は二本鎖DNA切断を作製する方法を含む。そのような切断は、Cox et al., "Therapeutic genome editing: prospects and challenges", *Nature Medicine*, 2015, 21 (2), 121-31において記載されるとおり、相同組換え修復（HDR）及び非相同末端連結（NHEJ）などの天然の内在性細胞プロセスによって修復される場合があり、且つ規則的に修復される。これらの2つの主要なDNA修復プロセスは、代替の経路のファミリーからなる。NHEJは、二本鎖切断の結果生じるDNA末端を直接的に結合するものであり、ヌクレオチド配列の欠損又は付加を伴うこともあり、遺伝子の発現を破壊又は増強し得る。HDRは、切断点で既定のDNA配列を挿入する鋳型として相同配列又はドナー配列を利用する。相同配列は、姉妹染色分体などの内在性のゲノム中に存在し得る。代わりに、ドナー配列は、ヌクレアーゼ切断座位と高い相同性の領域（例えば、左及び右ホモロジーアーム）を有するが、切断される標的座位に組み込まれ得る欠失を含む追加の配列又は配列変化も含有し得るプラスミド、一本鎖オリゴヌクレオチド、二本鎖オリゴヌクレオチド、二重鎖オリゴヌクレオチド又はウイルスなどの外来ポリヌクレオチドであり得る。第三の修復機構は、遺伝的な結果が、若干の欠損及び挿入が切断部位で生じ得る点でNHEJに類似する、「代替的NHEJ」とも呼ばれるマイクロホモロジー媒介末端結合（MMEJ）であり得る。MMEJは、DNA切断部位に隣接する数塩基対の相同配列を利用して、より好ましいDNA末端連結修復結果を促進でき、最近の報告は、このプロセスの分子メカニズムをさらに解明しており；例えば、Cho and Greenberg, *Nature*, 2015, 518, 174-76; Kent et al., *Nature Structural and Molecular Biology*, 2015, 22 (3): 230-7; Mateos-Gomez et al., *Nature*, 2015, 518, 254-57; Ceccaldi et al., *Nature*, 2015, 528, 258-62を参照されたい。いくつかの場合、DNA切断の部位での潜在的なマイクロホモロジーの分析に基づいて修復結果を予測できる可能性がある。

【0039】

これらのゲノム編集機構の各々を使用して、所望の遺伝子改変を作製できる。ゲノム編集プロセスにおける工程は、1つ又は2つのDNA切断を作製することであり得るが、後者は、意図した変異部位の近傍としての標的座位における二本鎖切断又は2つの一本鎖切断である。これは、本明細書に記載され、且つ示されるとおりのエンドヌクレアーゼの使用を介して達成され得る。

【0040】

CRISPRエンドヌクレアーゼ系

CRISPR-エンドヌクレアーゼ系は、遺伝子編集のために使用されるRNA誘導型DNA標的化プラットフォームとして転用されてきた原核生物において天然に存在する防御機構である。CRISPR系としては、I、II、III、IV、V及びVI型の系が挙げられる。いくつかの態様では、CRISPR系は、II型CRISPR/Cas9系である。他の態様では、CRISPR系は、V型CRISPR/Cpf1系である。CRISPR系は、DNAの切断を標的化するDNAヌクレアーゼ、例えばCas9並びに2つの非コードRNAであるcrisprRNA（crRNA）及びトランス活性化RNA（tracrRNA）に依拠する。

【0041】

c r R N A は、典型的には、標的 D N A 中の約 2 0 ヌクレオチド (n t) 配列とのワトソン・クリック塩基対形成を介して C R I S P R - エンドヌクレアーゼ複合体の配列認識及び特異性を促進する。c r R N A 中の 5 ' 2 0 n t の配列を変化させることにより、特定の座位への C R I S P R - エンドヌクレアーゼ複合体の標的化が可能になる。C R I S P R - エンドヌクレアーゼ複合体は、単に、標的配列が、プロトスペーサー隣接モチーフ (P A M) と呼ばれる特定の短い D N A モチーフ (配列 N G G を有する) に続いている場合、シングルガイド R N A (s g R N A) の最初の 2 0 n t に一致する配列を含有する D N A 配列に結合する。

【 0 0 4 2 】

T r a c r R N A は、c r R N A の 3 ' 末端とハイブリダイズして R N A 二重鎖構造を形成し、エンドヌクレアーゼによって結合されて触媒活性のある C R I S P R - エンドヌクレアーゼ複合体を形成し、続いてこれにより標的 D N A を切断できる。

【 0 0 4 3 】

C R I S P R - エンドヌクレアーゼ複合体が標的部位で D N A に結合すると、エンドヌクレアーゼ内の 2 つの独立したヌクレアーゼドメインがそれぞれ P A M 部位の 3 塩基上流の D N A 鎖の一方を切断し、D N A の両鎖が塩基対 (平滑末端) で終結する二本鎖切断 (D S B) を残す。

【 0 0 4 4 】

いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、C a s 9 (C R I S P R 関連タンパク質 9) である。いくつかの実施形態では、C a s 9 エンドヌクレアーゼは、ストレプトコッカス・ピオゲネス (S t r e p t o c o c c u s p y o g e n e s) に由来するが、他の C a s 9 ホモログ、例えば S . アウレウス (S . a u r e u s) C a s 9 、 N . メニンギティディス (N . m e n i n g i t i d i s) C a s 9 、 S . サーマフィルス (S . t h e r m o p h i l u s) C R I S P R 1 C a s 9 、 S . サーマフィルス (S . t h e r m o p h i l u s) C R I S P R 3 C a s 9 又は T . デンティコラ (T . d e n t i c o l a) C a s 9 が使用され得る。他の場合、C R I S P R エンドヌクレアーゼは、C p f 1、例えば L . バクテリウム (L . b a c t e r i u m) N D 2 0 0 6 C p f 1 又はアシダミノコッカス (A c i d a m i n o c o c c u s) s p . B V 3 L 6 C p f 1 である。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、C a s 1、C a s 1 B、C a s 2、C a s 3、C a s 4、C a s 5、C a s 6、C a s 7、C a s 8、C a s 9 (C s n 1 及び C s x 1 2 としても知られる)、C a s 1 0 0、C s y 1、C s y 2、C s y 3、C s e 1、C s e 2、C s c 1、C s c 2、C s a 5、C s n 2、C s m 2、C s m 3、C s m 4、C s m 5、C s m 6、C m r 1、C m r 3、C m r 4、C m r 5、C m r 6、C s b 1、C s b 2、C s b 3、C s x 1 7、C s x 1 4、C s x 1 0、C s x 1 6、C s a X、C s x 3、C s x 1、C s x 1 5、C s f 1、C s f 2、C s f 3、C s f 4 又は C p f 1 エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、野生型バリエーションが使用され得る。いくつかの実施形態では、前述のエンドヌクレアーゼの改変バージョン (例えば、そのホモログ、その天然に存在する分子の組換え、そのコドン最適化又はその改変バージョン) が使用され得る。

【 0 0 4 5 】

C R I S P R ヌクレアーゼは、少なくとも 1 つの核移行シグナル (N L S) に連結され得る。少なくとも 1 つの N L S は、C R I S P R ヌクレアーゼのアミノ末端の 5 0 アミノ酸において又はそれ以内に位置し得、且つ／又は少なくとも 1 つの N L S は、C R I S P R ヌクレアーゼのカルボキシ末端の 5 0 アミノ酸において又はそれ以内に位置し得る。

【 0 0 4 6 】

例示的な C R I S P R / C a s ポリペプチドは、F o n f a r a e t a l . , “ P h y l o g e n y o f C a s 9 d e t e r m i n e s f u n c t i o n a l e x c h a n g e a b i l i t y o f d u a l - R N A a n d C a s 9 a m o n g o r t h o l o g o u s t y p e I I C R I S P R - C a s s y s t e m s ” , N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h , 2 0 1 4 , 4 2 : 2 5 7 7 - 2 5 9

10

20

30

40

50

0において公表されるとおりのCas9ポリペプチドを含む。CRISPR/Cas遺伝子の命名法は、Cas遺伝子が発見されて以来、広範な書き直しを経てきた。Fontana et al. も、様々な種に由来するCas9ポリペプチドのためのPAM配列を提供する。

【0047】

ジンクフィンガーヌクレアーゼ

ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) は、II型エンドヌクレアーゼFokIの触媒ドメインに連結された操作されたジンクフィンガーDNA結合ドメインで構成されるモジュラータンパク質である。FokIは、二量体としてのみ機能するため、ZFNの対は、触媒活性のあるFokI二量体の形成を可能にするために、反対側のDNA鎖上の同一標的「ハーフサイト」配列に正確な間隔で結合するように設計されなければならない。それ自体では配列特異性を有しないFokIドメインが二量体化すると、ゲノム編集の開始ステップとしてZFNのハーフサイト間にDNA二本鎖切断が生じる。

10

【0048】

各ZFNのDNA結合ドメインは、通常、豊富なCys2-His2構造の3~6個のジンクフィンガーで構成されており、各フィンガーは、主に標的DNA配列の一本鎖上のヌクレオチドのトリプレットを認識するが、4番目のヌクレオチドとの鎖交差相互作用も重要であり得る。DNAと重要な接触を作る位置におけるフィンガーのアミノ酸の改変は、所与のフィンガーの配列特異性を改変する。したがって、4フィンガーのジンクフィンガータンパク質は、12bpの標的配列を選択的に認識することになり、標的配列は、各フィンガーによって与えられるトリプレット優先度で構成されるが、トリプレット優先度は、隣接するフィンガーによって様々な程度まで影響され得る。ZFNの重要な態様は、それらが、個々のフィンガーを単に改変することにより、ほとんどのゲノムアドレスに容易に再標的化され得ることである。ZFNの大部分の適用において、4~6個のフィンガーのタンパク質が使用され、それぞれ12~18bpを認識する。したがって、ZFNの対は、通常、ハーフサイト間に典型的な5~7bpのスペーサーを含まない24~36bpの組み合わされた標的配列を認識することになる。結合部位は、15~17bpを含むより大きいスペーサーによりさらに分離され得る。この長さの標的配列は、ヒトゲノムの中で固有なものになると考えられ、設計プロセス中に反復した配列又は遺伝子ホモログが除外されると想定される。それに関わらず、ZFNのタンパク質-DNAの相互作用は、それらの特異性において絶対的なものではないため、2つのZFN間のヘテロ二量体として又は一方若しくは他方のZFNのホモ二量体として、オフターゲットの結合及び切断現象が生じる。後者の可能性は、FokIドメインの二量体化インターフェースを操作して、互いに且つそれら自体ではなく単に二量体化できる絶対ヘテロ二量体バリエーションとしても知られる「プラス」及び「マイナス」のバリエーションを作ることによって効率的に排除された。絶対ヘテロ二量体を強制することにより、ホモ二量体の形成を妨げる。これにより、ZFNだけでなく、これらのFokIバリエーションを採用する任意の他のヌクレアーゼの特異性が大幅に増強された。

20

30

【0049】

様々なZFNに基づく系は、当技術分野において記載されており、その変更形態は、定期的に報告され、多数の参考文献は、ZFNの設計を導くために使用される規則及びパラメーターを記載しており；例えば、Segal et al., Proc Natl Acad Sci, 1999, 96 (6): 2758-63; Dreier et al., J Mol Biol, 2000, 303 (4): 489-502; Liu Q et al., J Biol Chem, 2002, 277 (6): 3850-6; Dreier et al., J Biol Chem, 2005, 280 (42): 35588-97; 及びDreier et al., J Biol Chem, 2001, 276 (31): 29466-78を参照されたい。

40

【0050】

転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)

50

T A L E N は、Z F N と同様に、操作された DNA 結合ドメインが F o k I ヌクレアーゼドメインに連結され、T A L E N の対が直列に作動して標的化される DNA の切断を実現する、モジュラーヌクレアーゼの別の形式を表す。Z F N との主な違いは、D N E 結合ドメインの性質及び会合される標的 DNA 配列認識の特性である。T A L E N DNA 結合ドメインは、T A L E タンパク質に由来し、これは、植物の病原性微生物であるキサントモナス属 (*X a n t h o m o n a s* s p) において最初に記載された。T A L E は、33～35 アミノ酸リピートの直列配列で構成され、各リピートは、典型的には、最大で 20 b p の長さの標的 DNA 配列において一塩基対を認識し、最大で 40 b p の総標的配列長を与える。各リピートのヌクレオチド特異性は、12 位及び 13 位での 2 つのアミノ酸を含む反復可変二残基 (R V D) によって決定される。塩基のグアニン、アデニン、シトシン及びチミンは、それぞれ 4 つの R V D : A s n - A s n、A s n - I l e、H i s - A s p 及び A s n - G l y によって主に認識される。これは、ジンクフィンガーよりもはるかに単純な認識コードとなり、したがってヌクレアーゼ設計においてジンクフィンガーよりも有利となる。それにも関わらず、Z F N と同様に、T A L E N のタンパク質-D N A 相互作用は、それらの特異性において絶対的ではなく、及び T A L E N も、オフターゲット活性を低減する F o k I ドメインの絶対ヘテロ二量体バリエーションの使用から恩恵を得た。

10

【0051】

触媒機能において不活性化されている F o k I ドメインの追加のバリエーションが作製されてきた。T A L E N 又は Z F N のいずれかの対の片方が、不活性な F o k I ドメインを含む場合、D S B ではなく、標的部位で一本鎖 DNA の切断 (ニック) のみが生じることになる。この結果は、C R I S P R / C a s 9 又は C R I S P R / C p f 1 の「ニックアーゼ」変異体 (C a s 9 切断ドメインの 1 つが不活性化されている) の使用と同等である。DNA ニックを使用して、H D R によるゲノム編集を駆動することができるが、D S B によるものより効率が低い。主な利点は、オフターゲットニックが、N H E J に媒介される誤修復を起こしやすい D S B と異なり、迅速且つ正確に修復されることである。

20

【0052】

様々な T A L E N に基づく系は、当技術分野において記載されており、その変更形態は、定期的に報告されており；例えば、Boch, Science, 2009 326 (5959) : 1509-12 ; Mak et al., Science, 2012, 335 (6069) : 716-9 ; 及び Moscou et al., Science, 2009, 326 (5959) : 1501 を参照されたい。「ゴールデンゲート」プラットフォーム又はクロニングスキームに基づく T A L E N の使用は、複数のグループによって記載されており；例えば、Cermak et al., Nucleic Acids Res., 2011, 39 (12) : e82 ; Li et al., Nucleic Acids Res., 2011, 39 (14) : 6315-25 ; Weber et al., PLoS One., 2011, 6 (2) : e16765 ; Wang et al., J Genet Genomics, 2014, 41 (6) : 339-47. ; 及び Cermak T et al., Methods Mol Biol., 2015 1239 : 133-59 を参照されたい。

30

40

【0053】

ホーミングエンドヌクレアーゼ

ホーミングエンドヌクレアーゼ (H E) は、長い認識配列 (14～44 塩基対) を有する配列特異的エンドヌクレアーゼであり、高い特異性で (ゲノム中の固有の部位である場合が多い) DNA を切断する。真核生物、原生生物、細菌、古細菌、シアノバクテリア及びファージを含む幅広い宿主に由来する G I Y - Y I G、H i s - C i s ボックス、H - N - H、P D - (D / E) x K 及び V s r 様を含むそれらの構造によって分類されるとおりの少なくとも 6 つの既知の H E のファミリーがある。Z F N 及び T A L E N と同様に、H E を使用して、ゲノム編集における最初の工程として標的座位で D S B を引き起こすことができる。加えて、いくつかの天然の H E 及び操作された H E は、DNA の一本鎖のみ

50

を切断し、それにより部位特異的ニッカーゼとして機能する。H Eの広い標的配列及びそれらが提供する特異性は、それらを部位特異的なD S Bを起こすための魅力的な候補にした。

【0054】

様々なH Eに基づく系は、当技術分野において記載されており、その変更形態は、定期的に報告されており；例えば、Steentoft et al., Glycobiology, 2014, 24 (8) : 663-80; Belfort and Bonocora, Methods Mol Biol., 2014, 1123 : 1-26; 及びHafez and Hausner, Genome, 2012, 55 (8) : 553-69による概説を参照されたい。

10

【0055】

MegaTAL / Tev-mTALLEN / MegaTev

ハイブリッドヌクレアーゼのさらなる例として、MegaTALプラットフォーム及びTev-mTALLENプラットフォームは、TAL EのDNA結合ドメイン及び触媒活性のあるH Eの融合を使用し、TAL Eの調整可能なDNA結合及び特異性の両方並びにH Eの切断配列特異性を利用し；例えば、Boissel et al., Nucleic Acids Res., 2014, 42 : 2591-2601; Kleinstiver et al., G3, 2014, 4 : 1155-65; 及びBoissel and Scharenberg, Methods Mol Biol., 2015, 1239 : 171-96を参照されたい。

20

【0056】

さらなる変種において、MegaTev構造は、メガヌクレアーゼ (Mega) のG I Y-Y I GホーミングエンドヌクレアーゼI-Tev I (Tev) に由来するヌクレアーゼドメインとの融合物である。2つの活性部位は、DNA基質上で約30bp離れた位置にあり、適合性のない付着末端を伴う2つのD S Bを生成し；例えば、Wolfs et al., Nucleic Acids Res., 2014, 42, 8816-29を参照されたい。既存のヌクレアーゼに基づく手法の他の組み合わせは、発展することになり、且つ本明細書に記載される標的化ゲノム改変を実現するのに有用であることが予想される。

30

【0057】

dCas9-FokI又はdCpf1-FokI及び他のヌクレアーゼ

上記のヌクレアーゼプラットフォームの構造的且つ機能的な特性を組み合わせることにより、固有の欠点のいくつかを克服できる可能性のあるゲノム編集のさらなる手法を提供する。例として、CRISPRゲノム編集系は、通常、単一のCas9エンドヌクレアーゼを使用してD S Bを引き起こす。標的化の特異性は、標的DNAとワトソン-クリック塩基対形成を起こすガイドRNA中の20又は24個のヌクレオチド配列（その上、S.ピオゲネス (S. pyogenes) に由来するCas9の場合には隣接するNAG又はNGG PAM配列中の追加の2塩基）によって促進される。そのような配列は、ヒトゲノムにおいて固有であるのに十分なほど長い、RNA/DNA相互作用の特異性は、絶対的ではなく、特に標的配列の5'側の半分において著しい乱雑さが許容される場合があり、特異性を促進する塩基の数を効率的に低減する。これに対する1つの解決策は、Cas9又はCpf1の触媒機能を完全に不活性化し (RNA誘導型DNA結合機能のみ保持する)、代わりに不活性化されたCas9にFokIドメインを融合することであり；例えば、Tsai et al., Nature Biotech., 2014, 32 : 569-76; 及びGuillinger et al., Nature Biotech., 2014, 32 : 577-82を参照されたい。FokIは、二量体化して、触媒的に活性にならなければならないため、2つのガイドRNAが、二量体を形成し且つDNAを切断するために、近位に2つのFokI融合物を繋ぎ止めるために必要となる。これにより、組み合わせられた標的部位における塩基の数が本質的に2倍になり、それによりCRISPRに基づく系による標的化の厳密さが高まる。

40

50

【0058】

さらなる例として、I-TevIなどの触媒活性のあるHEへのTALE DNA結合ドメインの融合は、オフターゲット切断がさらに低減され得るとの期待をもって、TALEの調整可能なDNA結合及び特異性の両方並びにI-TevIの切断配列特異性を利用する。

【0059】

RNA誘導型エンドヌクレアーゼ

本明細書で使用されるとおりのRNA誘導型エンドヌクレアーゼ系は、野生型の例示的なエンドヌクレアーゼ、例えばS.ピオゲネス(S. pyogenes)由来のCas9 (米国特許出願公開第2014/0068797号明細書の配列番号8又はSapran auskas et al., Nucleic Acids Res, 39(21):9275-9282(2011))と少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%又は少なくとも100%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。エンドヌクレアーゼは、野生型エンドヌクレアーゼ(例えば、S.ピオゲネス(S. pyogenes)由来のCas9、上記)と10個の連続したアミノ酸にわたって少なくとも70、75、80、85、90、95、97、99又は100%の同一性を含み得る。エンドヌクレアーゼは、野生型エンドヌクレアーゼ(例えば、S.ピオゲネス(S. pyogenes)由来のCas9、上記)と10個の連続したアミノ酸にわたって最大70、75、80、85、90、95、97、99又は100%の同一性を含み得る。エンドヌクレアーゼは、野生型エンドヌクレアーゼ(例えば、S.ピオゲネス(S. pyogenes)由来のCas9、上記)とエンドヌクレアーゼのHNHヌクレアーゼドメイン中の10個の連続したアミノ酸にわたって少なくとも70、75、80、85、90、95、97、99又は100%の同一性を含み得る。エンドヌクレアーゼは、野生型エンドヌクレアーゼ(例えば、S.ピオゲネス(S. pyogenes)由来のCas9、上記)とエンドヌクレアーゼのHNHヌクレアーゼドメイン中の10個の連続したアミノ酸にわたって最大70、75、80、85、90、95、97、99又は100%の同一性を含み得る。エンドヌクレアーゼは、野生型エンドヌクレアーゼ(例えば、S.ピオゲネス(S. pyogenes)由来のCas9、上記)とエンドヌクレアーゼのRuvCヌクレアーゼドメイン中の10個の連続したアミノ酸にわたって少なくとも70、75、80、85、90、95、97、99又は100%の同一性を含み得る。エンドヌクレアーゼは、野生型エンドヌクレアーゼ(例えば、S.ピオゲネス(S. pyogenes)由来のCas9、上記)とエンドヌクレアーゼのRuvCヌクレアーゼドメイン中の10個の連続したアミノ酸にわたって最大70、75、80、85、90、95、97、99又は100%の同一性を含み得る。

【0060】

エンドヌクレアーゼは、野生型の例示的なエンドヌクレアーゼの改変形態を含み得る。野生型の例示的なエンドヌクレアーゼの改変形態は、エンドヌクレアーゼの核酸切断活性を低減する変異を含み得る。野生型の例示的なエンドヌクレアーゼの改変形態は、野生型の例示的なエンドヌクレアーゼ(例えば、S.ピオゲネス(S. pyogenes)由来のCas9、上記)の核酸切断活性の90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、5%未満又は1%未満を有し得る。エンドヌクレアーゼの改変形態は、実質的な核酸切断活性を有し得ない。エンドヌクレアーゼが、実質的な核酸切断活性を有しない改変形態であるとき、それは、「酵素活性のない」と本明細書で呼ばれる。

【0061】

企図される変異は、置換、付加及び欠失又はこれらの任意の組み合わせを含み得る。変異は、変異されるアミノ酸をアラニンに変換する。変異は、変異されるアミノ酸を別のアミノ酸(例えば、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、バリン、ロイシン、イソ

ロイシン、メチオニン、プロリン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、ヒスチジン、リジン又はアルギニン)に変換する。変異は、変異されるアミノ酸を非天然アミノ酸(例えば、セレノメチオニン)に変換する。変異は、変異されるアミノ酸をアミノ酸ミミック(例えば、ホスホミミック)に変換する。変異は、保存的変異であり得る。例えば、変異は、変異されるアミノ酸を、変異されるアミノ酸のサイズ、形状、電荷、極性、立体配座及び／又は回転異性体と類似するアミノ酸に変換する(例えば、システイン／セリン変異、リジン／アスパラギン変異、ヒスチジン／フェニルアラニン変異)。変異は、リーディングフレームの移動及び／又は未成熟終止コドンの生成を引き起こす可能性がある。変異は、遺伝子の調節領域又は1つ以上の遺伝子の発現に影響を及ぼす座位に対する変化を引き起こす可能性がある。

10

【0062】

ガイドRNA

本開示は、ポリヌクレオチド内の特定の標的部位に対して関連するエンドヌクレアーゼの活性を方向付けることができるガイドRNA(gRNA)を提供する。ガイドRNAは、目的の標的核酸配列及びCRISPRリピート配列にハイブリダイズする少なくとも1つのスペーサー配列を含み得る。II型CRISPR系において、gRNAは、tracrRNA配列と呼ばれる第2のRNAも含む。II型CRISPRガイドRNA(gRNA)において、CRISPRリピート配列及びtracrRNA配列は、互いにハイブリダイズして二重鎖を形成する。V型CRISPR系において、gRNAは、二重鎖を形成するcrRNAを含む。いくつかの実施形態では、gRNAは、エンドヌクレアーゼに結合することができ、その結果、gRNA及びエンドヌクレアーゼは、複合体を形成する。gRNAは、エンドヌクレアーゼとの会合のために複合体に対する標的特異性をもたらすことができる。したがって、ゲノム標的化核酸は、エンドヌクレアーゼの活性を方向付けることができる。

20

【0063】

例示的なガイドRNAとしては、15~200個のヌクレオチドを含むスペーサー配列を含み、gRNAは、GRCh38ヒトゲノムアセンブリに基づくゲノム位置を標的化する。当業者によって理解されたとおり、各gRNAは、そのゲノム標的部位又は領域に相補的なスペーサー配列を含むように設計され得る。Jinek et al., Science, 2012, 337, 816-821及びDeltcheva et al., Nature, 2011, 471, 602-607を参照されたい。

30

【0064】

gRNAは、二分子ガイドRNAであり得る。gRNAは、一分子ガイドRNAであり得る。

【0065】

二分子ガイドRNAは、RNAの二本の鎖を含み得る。第1の鎖は、5'から3'方向において、任意選択のスペーサー延長配列、スペーサー配列及び最小CRISPRリピート配列を含む。第2の鎖は、最小tracrRNA配列(最小CRISPRリピート配列に相補的)、3'tracrRNA配列及び任意選択のtracrRNA延長配列を含み得る。

40

【0066】

一分子ガイドRNA(sgRNA)は、5'から3'方向において、任意選択のスペーサー延長配列、スペーサー配列、最小CRISPRリピート配列、一分子ガイドリンカー、最小tracrRNA配列、3'tracrRNA配列及び任意選択のtracrRNA延長配列を含み得る。任意選択のtracrRNA延長は、ガイドRNAに対する追加の機能性(例えば、安定性)に寄与する要素を含み得る。一分子ガイドリンカーは、最小CRISPRリピート及び最小tracrRNA配列を連結して、ヘアピン構造を形成することができる。任意選択のtracrRNA延長は、1つ以上のヘアピンを含み得る。

【0067】

50

いくつかの実施形態では、sgRNAは、sgRNA配列の5'末端で20ヌクレオチドのスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態では、sgRNAは、sgRNA配列の5'末端で20ヌクレオチド未満のスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態では、sgRNAは、sgRNA配列の5'末端で20ヌクレオチドより長いスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態では、sgRNAは、sgRNA配列の5'末端で17~30ヌクレオチドを有する可変長スペーサー配列を含む。いくつかの実施形態では、sgRNAは、1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180又は200個を超えるヌクレオチドの長さを有するスペーサー延長配列を含む。いくつかの実施形態では、sgRNAは、3、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90又は100個未満のヌクレオチドの長さを有するスペーサー延長配列を含む。

10

【0068】

いくつかの実施形態では、sgRNAは、別の部分（例えば、安定性制御配列、エンドリボヌクレアーゼ結合配列又はリボザイム）を含むスペーサー延長配列を含む。部分は、核酸を標的化する核酸の安定性を低減又は増大させることができる。部分は、転写ターミネーターセグメント（すなわち転写終結配列）であり得る。部分は、真核細胞において機能し得る。部分は、原核細胞において機能し得る。部分は、真核細胞及び原核細胞の両方において機能し得る。好適な部分の非限定的な例としては、5'キャップ（例えば、7-メチルグアニレートキャップ（m7 G））、リボスイッチ配列（例えば、タンパク質及びタンパク質複合体による安定性の調節並びに／又は接触性の調節を可能にする）、dsRNA二重鎖（すなわちヘアピン）を形成する配列、RNAを細胞内位置（例えば、核、ミトコンドリア、クロロプラストなど）に標的化する配列、追跡をもたらす修飾又は配列（例えば、蛍光分子への直接的なコンジュゲーション、蛍光検出を容易にする部分へのコンジュゲーション、蛍光検出を可能にする配列など）及び／又はタンパク質のための結合部位をもたらす修飾又は配列（例えば、転写活性化因子、転写抑制因子、DNAメチルトランスフェラーゼ、DNAデメチラーゼ、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ、ヒストンデアセチラーゼなどを含む、DNAに対して作用するタンパク質）が挙げられる。

20

【0069】

いくつかの実施形態では、sgRNAは、標的ポリヌクレオチド中の配列にハイブリダイズするスペーサー配列を含む。gRNAのスペーサーは、ハイブリダイゼーション（すなわち塩基対形成）を介して配列特異的な様式で標的ポリヌクレオチドと相互作用することができる。スペーサーのヌクレオチド配列は、目的の標的核酸の配列に依存して変化し得る。

30

【0070】

CRISPR-エンドヌクレアーゼ系において、スペーサー配列は、系において使用されるエンドヌクレアーゼのPAMの5'に位置する標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズするように設計され得る。スペーサーは、標的配列と完全に一致し得るか、又はミスマッチを有し得る。各エンドヌクレアーゼ、例えばCas9ヌクレアーゼは、それが標的DNA中で認識する特定のPAM配列を有する。例えば、S.ピオゲネス（*S. pyogenes*）Cas9は、配列5'-NRG-3'（ここで、Rは、A又はGのいずれかを含み、Nは、任意のヌクレオチドであり、Nは、スペーサー配列によって標的化される標的核酸配列の3'の直近にある）を含むPAMを認識する。

40

【0071】

標的ポリヌクレオチド配列は、20個のヌクレオチドを含み得る。標的ポリヌクレオチドは、20個未満のヌクレオチドを含み得る。標的ポリヌクレオチドは、20個より多いポリヌクレオチドを含み得る。標的ポリヌクレオチドは、少なくとも5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30個以上のヌクレオチドを含み得る。標的ポリヌクレオチドは、最大5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30個以上のヌクレオチドを含み得る。標的ポリヌクレオチド配列は、PAMの第1のヌクレオチドの5'の直近に20個の塩基を含み

50

得る。

【0072】

標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズするスペーサー配列は、少なくとも約6個のヌクレオチド (nt) の長さを有し得る。スペーサー配列は、少なくとも約6 nt、少なくとも約10 nt、少なくとも約15 nt、少なくとも約18 nt、少なくとも約19 nt、少なくとも約20 nt、少なくとも約25 nt、少なくとも約30 nt、少なくとも約35 nt若しくは少なくとも約40 nt、約6 nt～約80 nt、約6 nt～約50 nt、約6 nt～約45 nt、約6 nt～約40 nt、約6 nt～約35 nt、約6 nt～約30 nt、約6 nt～約25 nt、約6 nt～約20 nt、約6 nt～約19 nt、約10 nt～約50 nt、約10 nt～約45 nt、約10 nt～約40 nt、約10 nt～約35 nt、約10 nt～約30 nt、約10 nt～約25 nt、約10 nt～約20 nt、約10 nt～約19 nt、約19 nt～約25 nt、約19 nt～約30 nt、約19 nt～約35 nt、約19 nt～約40 nt、約19 nt～約45 nt、約19 nt～約50 nt、約19 nt～約60 nt、約20 nt～約25 nt、約20 nt～約30 nt、約20 nt～約35 nt、約20 nt～約40 nt、約20 nt～約45 nt、約20 nt～約50 nt又は約20 nt～約60 ntであり得る。いくつかの例において、スペーサー配列は、20個のヌクレオチドを含み得る。いくつかの例において、スペーサーは、19個のヌクレオチドを含み得る。いくつかの例において、スペーサーは、18個のヌクレオチドを含み得る。いくつかの例において、スペーサーは、22個のヌクレオチドを含み得る。

10

20

【0073】

いくつかの例において、スペーサー配列と標的核酸との間の相補性パーセントは、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%又は100%である。いくつかの例において、スペーサー配列と標的核酸との間の相補性パーセントは、最大約30%、最大約40%、最大約50%、最大約60%、最大約65%、最大約70%、最大約75%、最大約80%、最大約85%、最大約90%、最大約95%、最大約97%、最大約98%、最大約99%又は100%である。いくつかの例において、スペーサー配列と標的核酸との間の相補性パーセントは、標的核酸の相補鎖の標的配列の6個の連続した5'の大部分のヌクレオチドにわたって100%である。スペーサー配列と標的核酸との間の相補性パーセントは、約20個の連続したヌクレオチドにわたって少なくとも60%であり得る。スペーサー配列及び標的核酸の長さは、1～6個のヌクレオチドで異なり得、これは、1つ又は複数のバルジと考えられ得る。

30

【0074】

tracrRNA配列は、細胞中において最小CRISPRリピート配列にハイブリダイズするヌクレオチドを含み得る。最小tracrRNA配列及び最小CRISPRリピート配列は、二重鎖、すなわち塩基対形成した二本鎖構造を形成し得る。合わせると、最小tracrRNA配列及び最小CRISPRリピートは、RNA誘導型エンドヌクレアーゼに結合できる。最小tracrRNA配列の少なくとも一部は、最小CRISPRリピート配列にハイブリダイズできる。最小tracrRNA配列は、最小CRISPRリピート配列と少なくとも約30%、約40%、約50%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%又は100%相補的であり得る。

40

【0075】

最小tracrRNA配列は、約7ヌクレオチド～約100ヌクレオチドの長さを有し得る。例えば、最小tracrRNA配列は、約7ヌクレオチド (nt) ～約50 nt、約7 nt～約40 nt、約7 nt～約30 nt、約7 nt～約25 nt、約7 nt～約20 nt、約7 nt～約15 nt、約8 nt～約40 nt、約8 nt～約30 nt、約8 nt～約25 nt、約8 nt～約20 nt、約8 nt～約15 nt、約15 nt～約100

50

nt、約15nt～約80nt、約15nt～約50nt、約15nt～約40nt、約15nt～約30nt又は約15nt～約25nt長であり得る。最小tracrRNA配列は、およそ9ヌクレオチド長であり得る。最小tracrRNA配列は、およそ12ヌクレオチドであり得る。最小tracrRNAは、上記のJinek et al.において記載されるtracrRNA nt 23～48からなり得る。

【0076】

最小tracrRNA配列は、一続きの少なくとも6、7又は8個の連続したヌクレオチドにわたって基準の最小tracrRNA（例えば、野生型、S.ピオゲネス（S. pyogenes）由来のtracrRNA）配列と少なくとも約60%同一であり得る。例えば、最小tracrRNA配列は、一続きの少なくとも6、7又は8個の連続したヌクレオチドにわたって基準の最小tracrRNA配列と少なくとも約65%同一、約70%同一、約75%同一、約80%同一、約85%同一、約90%同一、約95%同一、約98%同一、約99%同一又は100%同一であり得る。

【0077】

最小CRISPR RNAと最小tracrRNAとの間の二重鎖は、二重らせんを含み得る。最小CRISPR RNAと最小tracrRNAとの間の二重鎖は、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個以上のヌクレオチドを含み得る。最小CRISPR RNAと最小tracrRNAとの間の二重鎖は、最大約1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個以上のヌクレオチドを含み得る。

【0078】

二重鎖は、ミスマッチを含み得る（すなわち、二重鎖の2本の鎖は、100%相補的ではない）。二重鎖は、少なくとも約1、2、3、4又は5個のミスマッチを含み得る。二重鎖は、最大約1、2、3、4又は5個のミスマッチを含み得る。二重鎖は、2個以下のミスマッチを含み得る。

【0079】

いくつかの実施形態では、tracrRNAは、3' tracrRNAであり得る。いくつかの実施形態では、3' tracrRNA配列は、基準のtracrRNA配列（例えば、S.ピオゲネス（S. pyogenes）由来のtracrRNA）に対して少なくとも約30%、約40%、約50%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%又は100%の配列同一性を有する配列を含み得る。

【0080】

いくつかの実施形態では、gRNAは、tracrRNA延長配列を含み得る。tracrRNA延長配列は、約1ヌクレオチド～約400ヌクレオチドの長さを有し得る。tracrRNA延長配列は、1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180又は200個を超えるヌクレオチドの長さを有し得る。tracrRNA延長配列は、約20～約5000個以上のヌクレオチドの長さを有し得る。tracrRNA延長配列は、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90又は100個未満の長さを有し得る。tracrRNA延長配列は、10未満のヌクレオチド長を含み得る。tracrRNA延長配列は、10～30ヌクレオチド長であり得る。tracrRNA延長配列は、30～70ヌクレオチド長であり得る。

【0081】

tracrRNA延長配列は、機能性部分（例えば、安定性制御配列、リボザイム、エンドリボヌクレアーゼ結合配列）を含み得る。機能性部分は、転写ターミネーターセグメント（すなわち転写終結配列）を含み得る。機能性部分は、約10ヌクレオチド（nt）～約100ヌクレオチド、約10nt～約20nt、約20nt～約30nt、約30nt～約40nt、約40nt～約50nt、約50nt～約60nt、約60nt～約70nt、約70nt～約80nt、約80nt～約90nt若しくは約90nt～約100nt、約15nt～約80nt、約15nt～約50nt、約15nt～約40nt、

約 15 nt ~ 約 30 nt 又は 約 15 nt ~ 約 25 nt の全長を有し得る。

【0082】

いくつかの実施形態では、sgRNA は、約 3 ヌクレオチド ~ 約 100 ヌクレオチドの長さを有するリンカー配列を含み得る。上記の Jinek et al. において、例えば単純な 4 ヌクレオチド「テトラループ」(−GAAA−) が使用された (Jinek et al., Science, 2012, 337 (6096) : 816–821)。例示的なリンカーは、約 3 ヌクレオチド (nt) ~ 約 90 nt、約 3 nt ~ 約 80 nt、約 3 nt ~ 約 70 nt、約 3 nt ~ 約 60 nt、約 3 nt ~ 約 50 nt、約 3 nt ~ 約 40 nt、約 3 nt ~ 約 30 nt、約 3 nt ~ 約 20 nt、約 3 nt ~ 約 10 nt の長さを有する。例えば、リンカーは、約 3 nt ~ 約 5 nt、約 5 nt ~ 約 10 nt、約 10 nt ~ 約 15 nt、約 15 nt ~ 約 20 nt、約 20 nt ~ 約 25 nt、約 25 nt ~ 約 30 nt、約 30 nt ~ 約 35 nt、約 35 nt ~ 約 40 nt、約 40 nt ~ 約 50 nt、約 50 nt ~ 約 60 nt、約 60 nt ~ 約 70 nt、約 70 nt ~ 約 80 nt、約 80 nt ~ 約 90 nt 又は 約 90 nt ~ 約 100 nt の長さを有し得る。一分子ガイド核酸のリンカーは、4 ~ 40 ヌクレオチドであり得る。リンカーは、少なくとも約 100、500、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500 又は 7000 個以上のヌクレオチドであり得る。リンカーは、最大約 100、500、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500 又は 7000 個以上のヌクレオチドであり得る。

【0083】

リンカーは、様々な配列のいずれかを含み得るが、いくつかの例において、リンカーは、ガイドの他の機能性領域に支障をきたすであろう分子内結合を引き起こす可能性があるガイド RNA の他の部分と相同性の広範な領域を有する配列を含まないことになる。上記の Jinek et al. において、単純な 4 ヌクレオチド配列 −GAAA− が使用されたが (Jinek et al., Science, 2012, 337 (6096) : 816–821)、より長い配列を含む多数の他の配列が同様に使用され得る。

【0084】

リンカー配列は、機能性部分を含み得る。例えば、リンカー配列は、アプタマー、リボザイム、タンパク質-相互作用ヘアピン、タンパク質結合部位、CRISPR アレイ、イントロン又はエクソンを含む 1 つ以上の特徴を含み得る。リンカー配列は、少なくとも約 1、2、3、4 又は 5 個以上の機能性部分を含み得る。いくつかの例において、リンカー配列は、最大約 1、2、3、4 又は 5 個以上の機能性部分を含み得る。

【0085】

いくつかの実施形態では、sgRNA は、例えば、sgRNA 配列の 3' 末端にウラシルを含まない。いくつかの実施形態では、sgRNA は、例えば、sgRNA 配列の 3' 末端に 1 つ以上のウラシルを含む。いくつかの実施形態では、sgRNA は、sgRNA 配列の 3' 末端に 1、2、3、4、5、6、7、8、9 又は 10 個のウラシル (U) を含む。

【0086】

sgRNA は、化学修飾され得る。いくつかの実施形態では、化学修飾された gRNA は、化学修飾、例えば 2'-O-メチル糖修飾を有する少なくとも 1 つのヌクレオチドを含む gRNA である。いくつかの実施形態では、化学修飾された gRNA は、修飾された核酸骨格を含む。いくつかの実施形態では、化学修飾された gRNA は、2'-O-メチル-ホスホロチオエート残基を含む。いくつかの実施形態では、化学修飾は、当技術分野において記載されるとおり、安定性を増強し、自然免疫応答の可能性又は程度を低減し、且つ／又は他の特質を増強する。

【0087】

いくつかの実施形態では、修飾された gRNA は、修飾された骨格、例えばホスホロチオエート、ホスホトリエステル、モルホリノ、メチルホスホネート、短鎖アルキル若しく

はシクロアルキル糖間結合又は短鎖ヘテロ原子若しくは複素環式糖間結合を含み得る。

【0088】

モルホリノ系化合物は、Braasch and David Corey, Biochemistry, 2002, 41(14): 4503-4510; Genesis, 2001, Volume 30, Issue 3; Heasman, Dev. Biol., 2002, 243: 209-214; Nasevicius et al., Nat. Genet., 2000, 26: 216-220; Lacerra et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 2000, 97: 9591-9596; 及び1991年7月23日に登録された米国特許第5,034,506号明細書において記載されている。

10

【0089】

シクロヘキセニル核酸オリゴヌクレオチドミメティックは、Wang et al., J. Am. Chem. Soc., 2000, 122: 8595-8602において記載されている。

【0090】

いくつかの実施形態では、修飾されたgRNAは、2'位において1つ以上の置換された糖部分、例えば以下の1つを含み得る: OH、SH、SCH₃、F、OCN、OCH₃、OCH₃O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nNH₂又はO(CH₂)_nCH₃ (nは1~約10である); C1~C10低級アルキル、アルコキシアルコキシ、置換低級アルキル、アルカール又はアラキル; Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; O-、S-又はN-アルキル; O-、S-又はN-アルケニル; SOCH₃; SO₂CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; NH₂; ヘテロシクロアルキル; ヘテロシクロアルカール; アミノアルキルアミノ; ポリアルキルアミノ; 置換シリル; RNA切断基; レポーター基; 干渉物質; 2'-O-(2-メトキシエチル); 2'-メトキシ(2'-O-C₆H₅); 2'-プロポキシ(2'-OCH₂CH₂CH₃); 及び2'-フルオロ(2'-F)。同様の修飾は、gRNA上の他の位置、特に3'末端ヌクレオチド上の糖の3'位及び5'末端ヌクレオチドの5'位でもなされ得る。いくつかの例において、ヌクレオチド単位の糖及びヌクレオシド間結合の両方、すなわち骨格は、新規の基で置き換えられ得る。

20

【0091】

ガイドRNAは、追加的に又は代替的に、核酸塩基(当技術分野において単に「塩基」と呼ばれる場合が多い)修飾又は置換も含み得る。本明細書で使用する場合、「未修飾」又は「天然」核酸塩基は、アデニン(A)、グアニン(G)、チミン(T)、シトシン(C)及びウラシル(U)を含む。修飾された核酸塩基としては、天然の核酸においてまれに又は一時的にのみ見出される核酸塩基、例えばヒポキサンチン、6-メチルアデニン、5-Meピリミジン、特に5-メチルシトシン(5-メチル-2'-デオキシシトシンとも呼ばれ、且つ当技術分野において5-Me-Cと呼ばれる場合が多い)、5-ヒドロキシメチルシトシン(HMC)、グリコシルHMC及びゲントピオシルHMC並びに合成核酸塩基、例えば2-アミノアデニン、2-(メチルアミノ)アデニン、2-(イミダゾリルアルキル)アデニン、2-(アミノアルキルアミノ)アデニン又は他のヘテロ置換アルキルアデニン、2-チオウラシル、2-チオチミン、5-ブロモウラシル、5-ヒドロキシメチルウラシル、8-アザグアニン、7-デアザグアニン、N₆(6-アミノヘキシル)アデニン及び2,6-ジアミノプリンが挙げられる。Kornberg, A., DNA Replication, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp 75-77, 1980; Gebeyehu et al., Nucl. Acid Res. 1997, 15: 4513。当技術分野において知られる「ユニバーサル」塩基、例えばイノシンも含まれ得る。5-Me-C置換は、0.6~1.2℃によって核酸二重鎖の安定性を増大させることが示され(Sanghvi, Y. S., in Crooke, S. T. and Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278)、塩基置換の態様である。

30

40

50

【0092】

修飾された核酸塩基は、5-メチルシトシン（5-me-C）、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、アデニン及びグアニンの6-メチル並びに他のアルキル誘導体、アデニン及びグアニンの2-プロピル並びに他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン及び2-チオシトシン、5-ハロウラシル及びシトシン、5-プロピニルウラシル及びシトシン、6-アゾウラシル、シトシン及びチミン、5-ウラシル（プソイド-ウラシル）、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシル並びに他の8-置換アデニン及びグアニン、5-ハロ、特に5-プロモ、5-トリフルオロメチル並びに他の5-置換ウラシル及びシトシン、7-メチルクアニン（7-methylguanine）及び7-メチルアデニン、8-アザグアニン及び8-アザアデニン、7-デアザグアニン及び7-デアザアデニン並びに3-デアザグアニン及び3-デアザアデニンなどの他の合成並びに天然核酸塩基を含み得る。

10

【0093】

ゲノム標的化核酸及びエンドヌクレアーゼの複合体

gRNAは、エンドヌクレアーゼ（例えば、Cas9などのRNA誘導型ヌクレアーゼ）と相互作用し、それにより複合体を形成する。gRNAは、エンドヌクレアーゼを標的ポリヌクレオチドに導く。

【0094】

エンドヌクレアーゼ及びgRNAは、それぞれ細胞又は対象に別々に投与され得る。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、1つ以上のガイドRNA又はtracrRNAと合わせた1つ以上のcrRNAと予め複合体を形成し得る。次に、予め複合体を形成した材料が細胞又は対象に投与され得る。そのような予め複合体を形成した材料は、リボ核タンパク質粒子（RNP）として知られる。RNP中のエンドヌクレアーゼは、例えば、Cas9エンドヌクレアーゼ又はCpf1エンドヌクレアーゼであり得る。エンドヌクレアーゼは、1つ以上の核移行シグナル（NLS）により、N末端、C末端又はN末端及びC末端の両方で隣接され得る。例えば、Cas9エンドヌクレアーゼは、2つのNLSであるN末端に位置する1つ目のNLS及びC末端に位置する2つ目のNLSによって隣接され得る。NLSは、SV40 NLSなど、当技術分野において知られる任意のNLSであり得る。RNP中のゲノム標的化核酸とエンドヌクレアーゼのモル比は、約1：1～約10：1の範囲であり得る。例えば、RNP中のsgRNAとCas9エンドヌクレアーゼとのモル比は、3：1であり得る。

20

30

【0095】

核酸コード化系構成要素

本開示は、本開示のゲノム標的化核酸をコードするヌクレオチド配列を含む核酸、本開示のエンドヌクレアーゼ及び／又は本開示の方法の態様を実行するために必要な任意の核酸若しくはタンパク質性分子を提供する。コード化核酸は、RNA、DNA又はその組み合わせであり得る。

【0096】

本開示のゲノム標的化核酸をコードする核酸、本開示のエンドヌクレアーゼ及び／又は本開示の方法の態様を実行するために必要な任意の核酸若しくはタンパク質性分子は、ベクター（例えば、組換え発現ベクター）を含み得る。

40

【0097】

用語「ベクター」は、連結されている別の核酸を輸送できる核酸分子を指す。ベクターの1つの型は、追加の核酸セグメントがライゲートされ得る環状二本鎖DNAループを指す「プラスミド」である。ベクターの別の型は、ウィルスベクターであり、追加の核酸セグメントは、ウィルスゲノムにライゲートされ得る。ある種のベクターは、それらが導入される宿主細胞における自律的複製が可能である（例えば、細菌の複製開始点を有する細菌ベクター及びエピソード哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソード哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それにより

50

宿主ゲノムとともに複製される。

【0098】

いくつかの例において、ベクターは、それらが作動可能に連結される核酸の発現を指示することができる。そのようなベクターは、本明細書において、「組換え発現ベクター」又はより単純には同じ機能を果たす「発現ベクター」と呼ばれる。

【0099】

用語「作動可能に連結された」は、目的のヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列の発現を可能にする様式で調節配列に連結されていることを意味する。用語「調節配列」は、例えば、プロモーター、エンハンサー及び他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むことが意図される。そのような調節配列は、当技術分野においてよく知られており、例えば Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, 1990, 185, Academic Press, San Diego, CA において記載されている。調節配列としては、宿主細胞の多くの型においてヌクレオチド配列の構成的発現を指示するもの、ある種の宿主細胞においてのみヌクレオチド配列の発現を指示するもの（例えば、組織特異的調節配列）が挙げられる。発現ベクターの設計は、標的細胞の選択、所望される発現のレベルなどの要因に依存し得ることが当業者によって認識される。

【0100】

企図される発現ベクターとしては、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、SV40、単純ヘルペスウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、レトロウイルス（例えば、マウス白血病ウイルス、脾臓壊死ウイルス並びにラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、トリ白血病ウイルス、レンチウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス及び乳癌ウイルスなどのレトロウイルスに由来するベクター）及び他の組換えベクターに基づくウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。真核生物の標的細胞のために企図される他のベクターとしては、ベクター pXT1、pSG5、pSVK3、pBPV、pMSG 及び pSVLSV40 (Pharmacia) が挙げられるが、これらに限定されない。宿主細胞と適合する限り、他のベクターを使用し得る。

【0101】

いくつかの例において、ベクターは、1つ以上の転写及び／又は翻訳制御エレメントを含み得る。利用される宿主／ベクター系に依存して、構成的プロモーター及び誘導性プロモーター、転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーターなどを含むいくつかの好適な転写及び翻訳制御エレメントのいずれかが発現ベクターにおいて使用され得る。ベクターは、ウイルス配列又は CRISPR 機構若しくは他のエレメントの構成要素のいずれかを不活性化する自己不活性化ベクターであり得る。

【0102】

好適な真核生物のプロモーター（すなわち真核細胞において機能するプロモーター）の非限定的な例としては、サイトメガロウイルス (CMV) 最初期、単純ヘルペスウイルス (HSV) チミジンキナーゼ、初期及び後期 SV40、レトロウイルス由来の末端反復配列 (LTR)、ヒト伸長因子-1 α プロモーター (EF1 α)、ニワトリベーターアクチンプロモーター (CBA)、ユビキチン C プロモーター (UBC)、ニワトリベーターアクチンプロモーターに融合されたサイトメガロウイルスエンハンサーを含むハイブリッドコンストラクト (CAG)、プロモーター、第1エクソン及びニワトリベーターアクチン遺伝子の第1イントロンに融合されたサイトメガロウイルスエンハンサーを含むハイブリッドコンストラクト (CAG又はCAGGS)、マウス幹細胞ウイルスプロモーター (MSCV)、ホスホグリセリン酸キナーゼ-1 座位プロモーター (PGK) 及びマウスメタロチオネイン-I プロモーターに由来するものが挙げられる。

【0103】

プロモーターは、誘導性プロモーター（例えば、熱ショックプロモーター、テトラサイクリン調節性プロモーター、ステロイド調節性プロモーター、金属調節性プロモーター、

10

20

30

40

50

エストロゲン受容体調節性プロモーターなど）であり得る。プロモーターは、構成的プロモーター（例えば、CMVプロモーター、UBCプロモーター、CAGプロモーター）であり得る。いくつかの場合、プロモーターは、空間に制約されるプロモーター及び／又は時間に制約されるプロモーター（例えば、組織特異的プロモーター、細胞型特異的プロモーターなど）であり得る。

【0104】

本開示の複合体、ポリペプチド及び核酸の細胞への導入は、ウイルス又はバクテリオファージ感染、トランスフェクション、接合、プロトプラスト融合、リポフェクション、エレクトロポレーション、ヌクレオフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリエチレンジオキサイド（PEI）媒介性トランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、リボソーム媒介性トランスフェクション、粒子銃技術、リン酸カルシウム沈殿、直接的マイクロインジェクション、ナノ粒子媒介性核酸送達などによって行われ得る。

10

【0105】

III. 免疫応答を回避し、生存を増加させる戦略

本明細書では、遺伝子改変細胞、すなわちユニバーサルドナー細胞が対象への生着後にそれらの生存若しくは生存率を増加させ、且つ／又は免疫応答を回避することを可能にする戦略が記載される。いくつかの実施形態では、これらの戦略は、ユニバーサルドナー細胞が未改変細胞より高い成功率で生存し、且つ／又は免疫応答を回避することを可能にする。いくつかの実施形態では、遺伝子改変細胞は、生存因子をコードする少なくとも1つの遺伝子内又はその近傍への少なくとも1つの遺伝子改変の導入を含み、遺伝子改変は、免疫寛容原性因子をコードするポリペプチドの挿入を含む。ユニバーサルドナー細胞は、1つ以上のMHC-I若しくはMHC-IIヒト白血球抗原又はMHC-I若しくはMHC-II複合体の構成要素若しくは転写調節因子をコードする遺伝子内又はその近傍での少なくとも1つの遺伝子改変をさらに含み、前記遺伝子改変は、第2の免疫寛容原性因子をコードするポリペプチドの挿入を含む。

20

【0106】

いくつかの実施形態では、遺伝子改変細胞は、未改変細胞に対して、1つ以上のMHC-I及びMHC-IIヒト白血球抗原の発現を減少させる少なくとも1つの遺伝子内又はその近傍での少なくとも1つの遺伝子改変；未改変細胞に対して、免疫寛容原性因子をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドの発現を増加させる少なくとも1つの遺伝子改変；並びに未改変細胞に対して、生存因子をコードする少なくとも1つの遺伝子の発現を改変する少なくとも1つの遺伝子改変の導入を含む。他の実施形態では、遺伝子改変細胞は、未改変細胞に対して、1つ以上のMHC-I及びMHC-IIヒト白血球抗原の発現を改変する少なくとも1つの遺伝子内又はその近傍での少なくとも1つの欠失又は挿入-欠失変異；並びに1つ以上のMHC-I及びMHC-II HLAの発現を改変する遺伝子の欠失の部位と部分的に重複するか、完全に重複するか、又はその中に含有される部位での少なくとも1つの免疫寛容原性因子をコードするポリヌクレオチドの少なくとも1つの挿入を含む。さらに他の実施形態では、遺伝子改変細胞は、未改変細胞に対して、生存因子をコードする少なくとも1つの遺伝子の発現を改変する少なくとも1つの遺伝子改変を含む。

30

40

【0107】

主要組織適合抗原複合体（MHC）をコードする遺伝子は、ヒトChr. 6p21上に位置する。MHC遺伝子によってコードされる結果としてのタンパク質は、細胞移植中のドナー適合性に必須である一連の表面タンパク質である。MHC遺伝子は、MHCクラスI（MHC-I）及びMHCクラスII（MHC-II）に分類される。MHC-I遺伝子（HLA-A、HLA-B及びHLA-C）は、ほとんど全ての組織型において発現され、「非自己」の抗原がプロセッシングされたペプチドをCD8+T細胞に提示し、それにより細胞溶解性CD8+T細胞へのそれらの活性化を促進する。「非自己」MHC-I分子を発現する移植された細胞又は生着された細胞は、これらの細胞に向けられる強い細胞

50

性免疫応答を引き起こし、最終的に、活性化された細胞溶解性CD8+T細胞によるそれらの消滅をもたらす。MHC-Iタンパク質は、本質的に、小胞体中のベータ-2-ミクログロブリン(B2M)と関連し、これは、細胞表面上で機能的MHC-I分子を形成するために必須である。加えて、免疫調節機能を有する3つの非古典的MHC-Ib分子(HLA-E、HLA-F及びHLA-G)が存在する。MHC-II生体分子としては、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ及びHLA-DRが挙げられる。免疫応答におけるそれらの主要な機能に起因して、MHC-I及びMHC-II生体分子は、非宿主細胞の細胞生着、例えば再生医療を目的とする細胞生着後の免疫拒絶に寄与する。

【0108】

10

MHC-I細胞表面分子は、MHCにコードされる重鎖(HLA-A、HLA-B又はHLA-C)及びインバリエントなサブユニットベータ-2-ミクログロブリン(B2M)で構成される。したがって、細胞内でのB2M濃度の低減は、MHC-I細胞表面分子の細胞表面発現を低減する効果的な方法を可能にする。

【0109】

いくつかの実施形態では、細胞は、1つ以上のMHC-I又はMHC-II遺伝子の遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、細胞は、MHC-I及び／又はMHC-IIの発現を調節する1つ以上のポリヌクレオチド配列の遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、本開示の遺伝子改変は、本明細書に記載される方法を含むが、それらに限定されない任意の遺伝子編集方法を使用して実施される。

20

【0110】

いくつかの実施形態では、未改変細胞に対して、1つ以上のMHC-I及びMHC-IIヒト白血球抗原の発現を減少させることは、例えば、MHC-I及び／又はMHC-II遺伝子における直接的な少なくとも1つの塩基対の遺伝子欠失及び／又は挿入のための標的化によって達成される。いくつかの実施形態では、未改変細胞に対して、1つ以上のMHC-I及びMHC-IIヒト白血球抗原の発現を減少させることは、例えば、遺伝子欠失のためにCIITA遺伝子を標的化することによって達成される。いくつかの実施形態では、未改変細胞に対して、1つ以上のMHC-I及びMHC-IIヒト白血球抗原の発現を減少させることは、例えば、遺伝子欠失のためにMHC-I又はMHC-IIの少なくとも1つの転写調節因子を標的化することによって達成される。いくつかの実施形態では、MHC-I又はMHC-IIの転写調節因子は、NLRC5又はCIITA遺伝子である。いくつかの実施形態では、MHC-I又はMHC-IIの転写調節因子は、RFX5、RFXAP、RFXANK、NFY-A、NFY-B、NFY-C、IRF-1及び／又はTAP1遺伝子である。

30

【0111】

いくつかの実施形態では、細胞のゲノムは、HLA-A、HLA-B及び／又はHLA-C遺伝子の全体又は一部を欠失させるために改変されている。いくつかの実施形態では、細胞のゲノムは、HLA-A、HLA-B及び／又はHLA-C遺伝子のプロモーター領域の全体又は一部を欠失させるために改変されている。いくつかの実施形態では、細胞のゲノムは、MHC-I又はMHC-IIの転写調節因子をコードする遺伝子の全体又は一部を欠失させるために改変されている。いくつかの実施形態では、細胞のゲノムは、MHC-I又はMHC-IIの転写調節因子をコードする遺伝子のプロモーター領域の全体又は一部を欠失させるために改変されている。

40

【0112】

いくつかの実施形態では、細胞のゲノムは、ベータ-2-ミクログロブリン(B2M)の発現を減少させるために改変されている。B2Mは、全ての多型MHCクラスI重鎖の表面発現に必要な共有のタンパク質サブユニットをコードする非多型遺伝子である。HLA-Iタンパク質は、小胞体においてB2Mと直接的に会合し、これは、機能性の細胞表面で発現されるHLA-I分子を形成するために必須である。いくつかの実施形態では、gRNAは、5'-GCTACTCTCTCTTTCTGGCC-3'配列(配列番号

50

1) を含む B 2 M 遺伝子内の部位を標的化する。いくつかの実施形態では、gRNA は、5' - G G C C G A G A T G T C T C G C T C C G - 3' 配列 (配列番号 2) を含む B 2 M 遺伝子内の部位を標的化する。いくつかの実施形態では、gRNA は、5' - C G C G A G C A C A G C T A A G G C C A - 3' 配列 (配列番号 3) を含む B 2 M 遺伝子内の部位を標的化する。代替的な実施形態では、gRNA は、以下の配列のいずれかを含む B 2 M 遺伝子内の部位を標的化する: 5' - T A T A A G T G G A G G C G T C G C G C - 3' (配列番号 35)、5' - G A G T A G C G C G A G C A C A G C T A - 3' (配列番号 36)、5' - A C T G G A C G C G T C G C G C T G G C - 3' (配列番号 37)、5' - A A G T G G A G G C G T C G C G C T G G - 3' (配列番号 38)、5' - G G C C A C G G A G C G A G A C A T C T - 3' (配列番号 39)、5' - G C C C G A A T G C T G T C A G C T T C - 3' (配列番号 40)、5' - C T C G C G C T A C T C T C T C T T T C - 3' (配列番号 41)、5' - T C C T G A A G C T G A C A G C A T T C - 3' (配列番号 42)、5' - T T C C T G A A G C T G A C A G C A T T - 3' (配列番号 43) 又は 5' - A C T C T C T C T T T C T G G C C T G G - 3' (配列番号 44)。いくつかの実施形態では、gRNA は、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 35、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 41、配列番号 42、配列番号 43 又は配列番号 44 のいずれか 1 つのポリヌクレオチド配列を含む。gRNA / CRISPR ヌクレアーゼ複合体は、B 2 M 座位中の標的部位を標的化及び切断する。NHEJ による二本鎖切断の修復は、少なくともヌクレオチド上の欠失及び / 又は少なくとも 1 つのヌクレオチドの挿入をもたらす可能性があり、それにより B 2 M の発現を破壊するか又は消失させる。代わりに、B 2 M 座位は、それぞれ異なる gRNA を含む少なくとも 2 つの CRISPR 系によって標的化される場合があり、その結果、B 2 M 座位中の 2 つの部位での切断が 2 つの切断間の配列の欠失をもたらし、それにより B 2 M の発現を消失させる。

【0113】

いくつかの実施形態では、細胞のゲノムは、チオレドキシン相互作用タンパク質 (TXNIP) の発現を減少させるために改変されている。いくつかの実施形態では、gRNA は、5' - G A A G C G T G T C T T C A T A G C G C - 3' 配列 (配列番号 15) を含む TXNIP 遺伝子内の部位を標的化する。いくつかの実施形態では、gRNA は、5' - T T A C T C G T G T C A A A G C C G T T - 3' 配列 (配列番号 16) を含む TXNIP 遺伝子内の部位を標的化する。いくつかの実施形態では、gRNA は、5' - T G T C A A A G C C G T T A G G A T C C - 3' 配列 (配列番号 17) を含む TXNIP 遺伝子内の部位を標的化する。いくつかの実施形態では、gRNA は、5' - G C C G T T A G G A T C C T G G C T T G - 3' 配列 (配列番号 18) を含む TXNIP 遺伝子内の部位を標的化する。いくつかの実施形態では、gRNA は、5' - G C G G A G T G G C T A A A G T G C T T - 3' 配列 (配列番号 19) を含む TXNIP 遺伝子内の部位を標的化する。いくつかの実施形態では、gRNA は、5' - T C C G C A A G C C A G G A T C C T A A - 3' 配列 (配列番号 20) を含む TXNIP 遺伝子内の部位を標的化する。いくつかの実施形態では、gRNA は、5' - G T T C G G C T T T G A G C T T C C T C - 3' 配列 (配列番号 21) を含む TXNIP 遺伝子内の部位を標的化する。いくつかの実施形態では、gRNA は、5' - G A G A T G G T G A T C A T G A G A C C - 3' 配列 (配列番号 22) を含む TXNIP 遺伝子内の部位を標的化する。いくつかの実施形態では、gRNA は、5' - T T G T A C T C A T A T T T G T T T C C - 3' 配列 (配列番号 23) を含む TXNIP 遺伝子内の部位を標的化する。いくつかの実施形態では、gRNA は、5' - A A C A A A T A T G A G T A C A A G T T - 3' 配列 (配列番号 24) を含む TXNIP 遺伝子内の部位を標的化する。いくつかの実施形態では、gRNA は、5' - G A A G C G T G T C T T C A T A G C G C A G G - 3' 配列 (配列番号 45) を含む TXNIP 遺伝子内の部位を標的化する。いくつかの実施形態では、gRNA は、5' - T T A C T C G T G T C A A A G C C G T T A G G - 3' 配列 (配列番号 46) を含む TXNIP 遺伝子内の部位を標的化する。いくつかの実施形態では、gRNA は、5' - T G

T C A A A G C C G T T A G G A T C C T G G - 3' 配列 (配列番号 47) を含む T X N I P 遺伝子内の部位を標的化する。いくつかの実施形態では、g R N A は、5' - G C C G T T A G G A T C C T G G C T T G C G G - 3' 配列 (配列番号 48) を含む T X N I P 遺伝子内の部位を標的化する。いくつかの実施形態では、g R N A は、5' - G C G G A G T G G C T A A A G T G C T T T G G - 3' 配列 (配列番号 49) を含む T X N I P 遺伝子内の部位を標的化する。いくつかの実施形態では、g R N A は、5' - T C C G C A A G C C A G G A T C C T A A C G G - 3' 配列 (配列番号 50) を含む T X N I P 遺伝子内の部位を標的化する。いくつかの実施形態では、g R N A は、5' - G T T C G G C T T T G A G C T T C C T C A G G - 3' 配列 (配列番号 51) を含む T X N I P 遺伝子内の部位を標的化する。いくつかの実施形態では、g R N A は、5' - G A G A T G G T G A T C A T G A G A C C T G G - 3' 配列 (配列番号 52) を含む T X N I P 遺伝子内の部位を標的化する。いくつかの実施形態では、g R N A は、5' - T T G T A C T C A T A T T T G T T T C C A G G - 3' 配列 (配列番号 53) を含む T X N I P 遺伝子内の部位を標的化する。いくつかの実施形態では、g R N A は、5' - A A C A A A T A T G A G T A C A A G T T C G G - 3' 配列 (配列番号 54) を含む T X N I P 遺伝子内の部位を標的化する。いくつかの実施形態では、g R N A は、配列番号 15 ~ 24 又は 45 ~ 54 のいずれか 1 つのポリヌクレオチド配列を含む T X N I P 遺伝子内の部位を標的化する。いくつかの実施形態では、g R N A は、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23 又は配列番号 24 のいずれか 1 つのポリヌクレオチド配列を標的化する。g R N A / C R I S P R ヌクレアーゼ複合体は、T X N I P 遺伝子座位中の標的部位を標的化及び切断する。N H E J による二本鎖切断の修復は、少なくともヌクレオチド上の欠失及び／又は少なくとも 1 つのヌクレオチドの挿入をもたらす可能性があり、それにより T X N I P の発現を破壊するか又は消失させる。代わりに、T X N I P 遺伝子座位中への外来遺伝子をコードするポリヌクレオチドの挿入は、T X N I P の発現を破壊し得るか又は消失させ得る。

10

20

30

40

50

【0114】

いくつかの実施形態では、細胞のゲノムは、クラス II トランス活性化因子 (C I I T A) の発現を減少させるために改変されている。C I I T A は、タンパク質の L R 又はヌクレオチド結合ドメイン (N B D) ロイシンリッチリピート (L R R) ファミリーのメンバーであり、M H C エンハンセオソームと会合することによって M H C - I I の転写を調節する。C I I T A の発現は、発生段階に応じて B 細胞及び樹状細胞において誘導され、大部分の細胞型において I F N - γ によって誘導可能である。

【0115】

いくつかの実施形態では、細胞のゲノムは、N L R ファミリーである C A R D ドメイン含有 5 (N L R C 5) の発現を減少させるために改変されている。N L R C 5 は、M H C - I 媒介性免疫応答の非常に重要な調節因子であり、C I I T A と同様に、N L R C 5 は、I F N - γ によって高度に誘導可能であり、核内に移動できる。N L R C 5 は、M H C - I 遺伝子のプロモーターを活性化し、M H C - I 及び M H C - I 抗原提示に関与する関連遺伝子の転写を誘導する。

【0116】

いくつかの実施形態では、免疫寛容原性因子を遺伝子改変細胞に挿入又は再挿入して、免疫特権のあるユニバーサルドナー細胞を作製することができる。いくつかの実施形態では、本明細書で開示されるユニバーサルドナー細胞は、1 つ以上の免疫寛容原性因子を発現するためにさらに改変されている。例示的な免疫寛容原性因子としては、H L A - C、H L A - E、H L A - F、H L A - G、P D - L 1、C T L A - 4 - I g、C D 47、C I - 阻害剤及び I L - 35 の 1 つ以上が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの免疫寛容原性因子をコードする少なくとも 1 つのポリヌクレオチドの遺伝子改変、例えば挿入は、生着後に未改変細胞より少なくとも 1.05 倍、少なくとも 1.1 倍、少なくとも 1.25 倍、少なくとも 1.5 倍、少なくとも 2 倍

、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍又は少なくとも50倍高い率でユニバーサルドナー細胞が免疫拒絶を阻害又は回避することを可能にする。いくつかの実施形態では、HLA-E、HLA-G、CTLA-4、CD47及び／又はPD-L1をコードするポリヌクレオチドの挿入は、宿主対象への移植又は生着後にユニバーサルドナー細胞が免疫拒絶を阻害又は回避することを可能にする。

【0117】

免疫寛容原性因子をコードするポリヌクレオチドは、一般に、免疫寛容原性因子をコードする配列に隣接する左及び右ホモロジーアームを含む。ホモロジーアームは、標的化される挿入部位又はその近傍にあるゲノムDNAと実質的な配列相同性を有する。例えば、左ホモロジーアームは、標的部位又は切断部位の左又は上流に位置する領域と相同なヌクレオチド配列であり得、右ホモロジーアームは、標的部位又は切断部位の右又は下流に位置する領域と相同なヌクレオチド配列であり得る。各ホモロジーアームの近位端は、切断部位に隣接するゲノムDNA配列と相同であり得る。代わりに、各ホモロジーアームの近位端は、切断部位から最大約10、20、30、40、50、60又は70核酸塩基離れて位置するゲノムDNA配列と相同であり得る。そのため、免疫寛容原性因子をコードするポリヌクレオチドは、切断部位の約10、20、30、40、50、60又は70塩基対以内の標的化される遺伝子座位に挿入され得、且つ切断部位に隣接する（及びホモロジーアームと相同性を有しない）さらなるゲノムDNAは、欠失され得る。ホモロジーアームは、約50ヌクレオチド～数千ヌクレオチドの長さの範囲であり得る。いくつかの実施形態では、ホモロジーアームは、約500ヌクレオチド～約1000ヌクレオチドの長さの範囲であり得る。ホモロジーアームとゲノムDNAとの間の実質的な配列相同性は、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%又は少なくとも約99%であり得る。

【0118】

いくつかの実施形態では、ホモロジーアームは、B2Mガイド（例えば、配列番号1～3、35～44のヌクレオチド配列を含むgRNA）とともに使用される。いくつかの実施形態では、ホモロジーアームは、B2M遺伝子の開始部位を除去することになる任意のB2Mガイドとともに使用されるように設計される。いくつかの実施形態では、B2Mホモロジーアームは、配列番号7若しくは13のポリヌクレオチド配列又は配列番号7若しくは13のものと少なくとも85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含み得るか又はそれから本質的になり得る。いくつかの実施形態では、左B2Mホモロジーアームは、配列番号7又は配列番号7のものと少なくとも85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含み得るか又はそれから本質的になり得る。いくつかの実施形態では、右B2Mホモロジーアームは、配列番号13又は配列番号13のものと少なくとも85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含み得るか又はそれから本質的になり得る。

【0119】

いくつかの実施形態では、ホモロジーアームは、TXNIPガイド（例えば、配列番号15～24のヌクレオチド配列を含むgRNA）とともに使用される。いくつかの実施形態では、ホモロジーアームは、TXNIPのエクソン1を標的化するいずれかのTXNIPガイド（例えば、配列番号15～20のヌクレオチド配列を含むgRNA）とともに使用されるように設計される。いくつかの実施形態では、TXNIPホモロジーアームは、配列番号25若しくは32のポリヌクレオチド配列又は配列番号25若しくは32のものと少なくとも85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含み得るか又はそれから本質的になり得る。いくつかの実施形態では、左TXNIPホモロジーアームは、配列番号25又は配列番号25のものと少なくとも85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含み得るか又はそれから本質的になり得る。いくつかの実施形態では、右TXNIPホモロジーアーム

ムは、配列番号 3 2 又は配列番号 3 2 のものと少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含み得るか又はそれから本質的になり得る。

【0 1 2 0】

少なくとも 1 つの免疫寛容原性因子をコードする少なくとも 1 つのポリヌクレオチドは、外来プロモーターに作動可能に連結され得る。外来プロモーターは、構成的、誘導性、時間特異的、組織特異的又は細胞型特異的プロモーターであり得る。いくつかの実施形態では、外来プロモーターは、CMV、EF1a、PGK、CAG 又は UBC プロモーターである。

【0 1 2 1】

いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの免疫寛容原性因子をコードする少なくとも 1 つのポリヌクレオチドは、セーフハーバー座位、例えば AAVS1 座位に挿入される。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの免疫寛容原性因子をコードする少なくとも 1 つのポリヌクレオチドは、MHC-I 遺伝子、MHC-II 遺伝子又は MHC-I 若しくは MHC-II の転写調節因子と部分的に重複するか、完全に重複するか、又はその中に含有される（すなわちその中又は近傍にある）ゲノム DNA の部位又は領域に挿入される。

【0 1 2 2】

いくつかの実施形態では、PD-L1 をコードするポリヌクレオチドは、B2M 遺伝子座位内又はその近傍の部位で挿入される。いくつかの実施形態では、PD-L1 をコードするポリヌクレオチドは、B2M 遺伝子若しくはプロモーターの全て又は部分の欠失と一致するか、又はそれに続く B2M 遺伝子座位内又はその近傍にある部位で挿入される。PD-L1 をコードするポリヌクレオチドは、外来プロモーターに作動可能に連結される。外来プロモーターは、CMV プロモーターであり得る。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 1 1 のヌクレオチド配列を含む。

【0 1 2 3】

いくつかの実施形態では、HLA-E をコードするポリヌクレオチドは、B2M 遺伝子座位内又はその近傍の部位で挿入される。いくつかの実施形態では、HLA-E をコードするポリヌクレオチドは、B2M 遺伝子若しくはプロモーターの全て又は部分の欠失と一致するか、又はそれに続く B2M 遺伝子座位内又はその近傍にある部位で挿入される。HLA-E をコードするポリヌクレオチドは、外来プロモーターに作動可能に連結される。外来プロモーターは、CMV プロモーターであり得る。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 6、2 7、2 8、2 9、3 0 及び／又は 3 0 のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 5 5 のヌクレオチド配列を含む。

【0 1 2 4】

いくつかの実施形態では、HLA-G をコードするポリヌクレオチドは、HLA-A、HLA-B 又は HLA-C 遺伝子座位内又はその近傍にある部位で挿入される。いくつかの実施形態では、HLA-G をコードするポリヌクレオチドは、HLA-A、HLA-B 若しくは HLA-C 遺伝子又はプロモーターの欠失と一致するか、或いはそれに続く HLA-A、HLA-B 又は HLA-C 遺伝子座位内又はその近傍にある部位で挿入される。

【0 1 2 5】

いくつかの実施形態では、CD47 をコードするポリヌクレオチドは、CIIITA 遺伝子座位内又はその近傍の部位で挿入される。いくつかの実施形態では、CD47 をコードするポリヌクレオチドは、CIIITA 遺伝子若しくはプロモーターの欠失と一致するか、又はそれに続く CIIITA 遺伝子座位内又はその近傍にある部位で挿入される。

【0 1 2 6】

いくつかの実施形態では、HLA-G をコードするポリヌクレオチドは、CIIITA 遺伝子座位内若しくは近傍の部位にある CD47 をコードするポリヌクレオチドの挿入と一致する HLA-A、HLA-B 又は HLA-C 遺伝子座位内又はその近傍の部位で挿入さ

10

20

30

40

50

れる。

【0127】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫寛容原性因子をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドは、ベクターの一部として細胞に送達され得る。例えば、ベクターは、プラスミドベクターであり得る。様々な実施形態では、細胞に送達されるプラスミドベクターの量は、約0.5 μ g～約10 μ g（約 10^6 細胞当たり）の範囲であり得る。いくつかの実施形態では、プラスミドの量は、約1 μ g～約8 μ g、約2 μ g～約6 μ g又は約3 μ g～約5 μ gの範囲であり得る。特定の実施形態では、細胞に送達されるプラスミドの量は、約4 μ gであり得る。

【0128】

いくつかの実施形態では、細胞は、1つ以上の生存因子の発現の増加又は減少を含む。いくつかの実施形態では、細胞は、生存因子をコードする1つ以上のポリヌクレオチド配列の挿入を含む。いくつかの実施形態では、細胞は、さらなる生存因子の1つの欠失を含む。いくつかの実施形態では、本開示の遺伝子改変は、本明細書に記載される方法を含むが、それらに限定されない任意の遺伝子編集方法を使用して実施される。いくつかの実施形態では、細胞は、未改変細胞に対して、少なくとも1つの生存因子の発現の増加又は減少を含む。いくつかの実施形態では、生存因子は、細胞生存に関与するメンバー又は決定的な経路、例えば低酸素、活性酸素種、栄養欠乏及び／又は酸化ストレスである。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの生存因子の遺伝子改変は、生着後に未改変細胞より長い期間、例えば少なくとも1.05倍、少なくとも1.1倍、少なくとも1.25倍、少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍又は少なくとも50倍長い期間にわたってユニバーサルドナー細胞が生存することを可能にする。いくつかの実施形態では、生存因子は、ZNF143、TXNIP、FOXO1、JNK又はMANFである。

【0129】

いくつかの実施形態では、細胞は、MANFをコードするポリヌクレオチドの挿入を含み、未改変細胞に対して、宿主対象への移植又は生着後にユニバーサルドナー細胞がより高い生存率で生存することを可能にする。いくつかの実施形態では、MANFをコードするポリヌクレオチドは、セーフハーバー座位に挿入される。いくつかの実施形態では、MANFをコードするポリヌクレオチドは、MHC-I、MHC-II又はMHC-I若しくはMHC-IIの転写調節因子に属する遺伝子に挿入される。

【0130】

いくつかの実施形態では、細胞のゲノムは、ZNF143、TXNIP、FOXO1及び／又はJNK遺伝子の全体又は一部を欠失させるために改変されている。いくつかの実施形態では、細胞のゲノムは、ZNF143、TXNIP、FOXO1及び／又はJNK遺伝子のプロモーター領域の全体又は一部を欠失させるために改変されている。

【0131】

いくつかの実施形態では、2つ以上の生存因子が細胞内で遺伝子改変される。

【0132】

ある種の実施形態では、MHC-II発現を有さず、且つMHC-Iの中程度の発現を有する細胞は、MHC-I又はMHC-IIの表面発現を有しないように遺伝子改変される。別の実施形態では、MHC-I／IIの表面発現を有しない細胞は、PD-L1の発現、例えばPD-L1をコードするポリヌクレオチドの挿入を有するようにさらに編集される。さらに別の実施形態では、MHC-I／IIの表面発現を有しない細胞は、PD-L1の発現、例えばPD-L1をコードするポリヌクレオチドの挿入を有するようにさらに編集され、且つ未改変細胞に対して、生存因子をコードする少なくとも1つの遺伝子の発現を増加又は減少させるようにも遺伝子改変される。

【0133】

いくつかの実施形態では、細胞は、例えば、遺伝子改変による、生着後の免疫回避又は細胞生存のいずれかに必ずしも関係付けられない1つ以上のさらなる遺伝子の発現の増加

10

20

30

40

50

又は減少をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞は、未改変細胞に対して、1つ以上の安全スイッチタンパク質の発現の増加をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞は、安全スイッチタンパク質をコードする1つ以上のさらなる遺伝子の発現の増加を含む。いくつかの実施形態では、安全スイッチは、自殺遺伝子でもある。いくつかの実施形態では、安全スイッチは、単純ヘルペスウイルス-1チミジンキナーゼ（HSV-tk）又は誘導性カスパーゼ-9である。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの安全スイッチをコードするポリヌクレオチドは、ゲノム、例えばセーフハーバー座位に挿入される。いくつかの他の実施形態では、遺伝子改変される1つ以上のさらなる遺伝子は、コンストラクトとともに組み込まれた安全スイッチタンパク質；標的化モダリティ；受容体；シグナル伝達分子；転写因子；薬学的に活性なタンパク質又はペプチド；薬物標的候補；並びにその生着、輸送、回遊、生存率、自己再生、持続及び／又は生存を促進するタンパク質の1つ以上をコードする。

10

【0134】

本発明の一態様は、ゲノム操作されたユニバーサルドナー細胞を作製する方法を提供し、ユニバーサルドナー細胞は、ゲノム中の1つ以上の選択された部位で少なくとも1つの標的化されたゲノム改変を含み、方法は、選択された部位での標的化された改変を可能にする1つ以上のコンストラクトを前記細胞に導入することにより、本明細書に記載されるとおりの細胞型を遺伝子操作することと；選択された部位認識が可能な1つ以上のエンドヌクレアーゼを使用して、選択された部位で1つ以上の二本鎖切断を前記細胞に導入することと；選択された部位での標的化された挿入又は欠失を生成するための内在性DNA修復を可能にするように編集された細胞を培養し；それによりゲノム改変されたユニバーサルドナー細胞を得ることを含む。ゲノム改変されたドナー細胞は、複数の部位が標的化及び改変されるように、連続的なラウンドのゲノム改変を経る場合がある。ゲノム改変された細胞は、当技術分野でよく知られる手法を使用して培養され、特徴付けられ、選択され、且つ増殖される。この方法によって作製されたユニバーサルドナー細胞は、少なくとも1つの機能的な標的化されたゲノム改変を含むことになり、ゲノム改変された細胞は、それらが幹細胞である場合、前駆細胞又は完全に分化した細胞に分化することができる。

20

【0135】

いくつかの他の実施形態では、ゲノム操作されたユニバーサルドナー細胞は、HLA-E、HLA-G、CD47又はPD-L1の少なくとも1つにおける導入又は増加された発現を含む。いくつかの実施形態では、ゲノム操作されたユニバーサルドナー細胞は、HLAクラスI及び／又はクラスII欠損である。いくつかの実施形態では、ゲノム操作されたユニバーサルドナー細胞は、B2Mヌル又は不十分なB2Mを含む。いくつかの実施形態では、ゲノム操作されたユニバーサルドナー細胞は、HLA-E、HLA-G及びPD-L1の1つ以上をコードする組込み又は非組込み外来ポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、導入された前記発現は、前記細胞中に含まれる、発現されないか又は不十分に発現される遺伝子のいずれかから発現が増加したものである。いくつかの実施形態では、非組込み外来ポリヌクレオチドは、センダイウイルス、AAV、エピソード又はプラスミドを使用して導入される。いくつかの実施形態では、ユニバーサルドナー細胞は、B2Mヌルであり、HLA-E、HLA-G、PD-L1の1つ以上の発現の導入及び少なくとも1つの安全スイッチタンパク質の発現の増加又は減少を伴う。別の実施形態では、ユニバーサルドナー細胞は、HLA-A、HLA-B及びHLA-Cヌルであり、HLA-E、HLA-G、PD-L1及び少なくとも1つの安全スイッチタンパク質の1つ以上の発現の導入を伴う。いくつかの実施形態では、ユニバーサルドナー細胞は、B2Mヌルであり、HLA-E、HLA-G、PD-L1の1つ以上の発現の導入及び少なくとも1つの生存因子、例えばMANFの発現の増加又は減少を伴う。本明細書に記載される遺伝子改変細胞のいずれかを作製する方法は、本明細書に記載される遺伝子編集方法の少なくともいずれかを使用して実施されることが企図される。

30

40

【0136】

IV. 細胞型

50

本明細書に記載されるとおりの細胞、例えばユニバーサルドナー細胞（及び対応する未改変細胞）は、任意の可能なクラスの細胞型に属し得る。いくつかの実施形態では、細胞、例えばユニバーサルドナー細胞（及び対応する未改変細胞）は、哺乳動物細胞であり得る。いくつかの実施形態では、細胞、例えばユニバーサルドナー細胞（及び対応する未改変細胞）は、ヒト細胞であり得る。いくつかの実施形態では、細胞、例えばユニバーサルドナー細胞（及び対応する未改変細胞）は、幹細胞であり得る。いくつかの実施形態では、細胞、例えばユニバーサルドナー細胞（及び対応する未改変細胞）は、多能性幹細胞（PSC）であり得る。いくつかの実施形態では、細胞、例えばユニバーサルドナー細胞（及び対応する未改変細胞）は、胚性幹細胞（ESC）、成体幹細胞（ASC）、人工多能性幹細胞（iPSC）又は造血幹細胞・前駆細胞（HSPC）（造血幹細胞（HSC）とも呼ばれる）であり得る。いくつかの実施形態では、細胞、例えばユニバーサルドナー細胞（及び対応する未改変細胞）は、分化細胞であり得る。いくつかの実施形態では、細胞、例えばユニバーサルドナー細胞（及び対応する未改変細胞）は、体細胞、例えば免疫系細胞又は収縮細胞、例えば骨格筋細胞であり得る。

10

【0137】

本明細書に記載される細胞、例えばユニバーサルドナー幹細胞は、HLA発現及びユニバーサル幹細胞株の免疫原性の評価を判断するために適切な細胞型に分化され得る。一般に、分化は、細胞が目的の分化細胞に分化するのに十分な期間にわたって且つ条件下で目的の細胞を維持することを含む。例えば、本明細書で開示されるユニバーサル幹細胞は、間葉系前駆細胞（MPC）、低免疫原性心筋細胞、筋肉前駆細胞、芽球細胞、内皮細胞（EC）、マクロファージ、肝細胞、ベータ細胞（例えば、膵ベータ細胞）、膵臓内胚葉前駆細胞、膵臓内分泌性前駆細胞、造血前駆細胞又は神経前駆細胞（NPC）に分化され得る。いくつかの実施形態では、ユニバーサルドナー細胞は、胚体内胚葉細胞、原始腸管細胞、後方前腸細胞、膵臓内胚葉細胞（PEC）、膵臓内分泌性細胞、未成熟ベータ細胞又は成熟ベータ細胞に分化され得る。

20

【0138】

幹細胞は、増殖及びさらなる前駆細胞を生じさせる能力の両方があり、これらは、分化した娘細胞又は分化可能な娘細胞を生じさせることができる多数の母細胞を生成する能力を有する。娘細胞自体は、増殖し、引き続いて1つ以上の成熟細胞型に分化する後代を生成するように誘導され得るが、親の発生潜在力を有する1つ以上の細胞も保持する。次に、用語「幹細胞」は、特定の状況下でさらに特定の表現型又は分化した表現型に分化する能力又は潜在力を有し、且つ一定の状況下で実質的に分化することなく増殖する能力を保持する細胞を指す。一態様では、前駆細胞又は幹細胞という用語は、全般的な母細胞を指し、その子孫（後代）は、分化、例えば胚細胞及び組織の漸進的な多様化に見られるとおり、完全に個別の特徴を獲得することにより、多くの場合に異なる方向に特殊化する。細胞分化は、典型的には、多くの細胞分裂を介して起こる複雑なプロセスである。分化細胞は、それ自体が多能性細胞などに由来する多能性細胞に由来し得る。これらの多能性細胞の各々は、幹細胞であると考えられ得るが、各々が生じさせることができる細胞型の範囲は、非常に変動し得る。一部の分化細胞は、より高い発生潜在力を有する細胞を生じさせる能力も有する。そのような能力は、天然であり得るか、又は様々な因子による処理時に人工的に誘導され得る。多くの生物学的な例において、幹細胞は、それらが2つ以上の異なる細胞型の後代を生成できるため、「多能性」でもあり得るが、これは、「幹細胞性」に必要ではない。

30

40

【0139】

「分化細胞」は、比較される細胞より発生経路がさらに進んだ細胞である。したがって、幹細胞は、系列限定前駆体細胞（筋細胞前駆細胞など）に分化することができ、これは、さらに進んだ経路の他の型の前駆細胞（筋細胞前駆体など）、続いて筋細胞などの最終段階の分化細胞に分化することができ、ある種の組織型において特徴的な役割を果たし、且つさらに増殖する能力を保持するか又は保持しない場合がある。いくつかの実施形態では、分化細胞は、膵ベータ細胞であり得る。

50

【0140】

胚性幹細胞

本明細書に記載される細胞は、胚性幹細胞（ESC）であり得る。ESCは、哺乳動物胚の未分化胚芽細胞に由来し、任意の細胞型に分化し、迅速に増殖することができる。ESCは、正常な核型を有するとも考えられ、高いテロメラーゼ活性を維持し、且つ顕著な長期間の増殖ポテンシャルを呈し、これらの細胞をユニバーサルドナー細胞としての使用のための優れた候補にする。

【0141】

成体幹細胞

本明細書に記載される細胞は、成体幹細胞（ASC）であり得る。ASCは、哺乳動物、例えばヒトにおいて見出され得る未分化細胞である。ASCは、それらの自己再生する、例えば未分化状態を維持しながら複数のラウンドの細胞複製を通して継代される能力及び複数の異なる細胞型、例えばグリア細胞に分化する能力によって定義される。成体幹細胞は、造血幹細胞、乳腺幹細胞、腸管幹細胞、間葉系幹細胞、内皮幹細胞、神経幹細胞、嗅覚成体幹細胞、神経冠幹細胞及び精巢細胞を包含し得る広範なクラスの幹細胞である。

【0142】

人工多能性幹細胞

本明細書に記載される細胞は、人工多能性幹細胞（iPSC）であり得る。iPSCは、多能性に関与する決定的な転写因子、例えばOCT4、SOX2、cMYC及びKLF4をコードする遺伝子を導入することによって成体ヒト細胞から直接的に作製され得る。iPSCは、引き続く前駆細胞が投与される同じ対象に由来し得る。すなわち、体細胞は、対象から得られ、人工多能性幹細胞に初期化され、続いて対象に投与される前駆細胞（例えば、自己細胞）に再分化され得る。しかしながら、自己細胞の場合、生着後の免疫応答及び不十分な生存率のリスクが残存する。

【0143】

ヒト造血幹細胞・前駆細胞

本明細書に記載される細胞は、ヒト造血幹細胞・前駆細胞（hHSPC）であり得る。この幹細胞系列は、赤血球系（赤血球又は赤血球細胞（RBC））、骨髓性（単球及びマクロファージ、好中球、好塩基球、好酸球、巨核球／血小板及び樹状細胞）及びリンパ系（T細胞、B細胞、NK細胞）を含む全ての血液細胞型を生じさせる。血液細胞は、自己再生によってそれ自体を補充する能力を有する非常に少数の多能性造血幹細胞（HSC）の増殖及び分化によって産生される。分化中、HSCの後代は、様々な中間の成熟段階を通して発達し、成熟に達する前に多分化能を有し、且つ系列に関係付けられた前駆細胞を生成する。骨髓（BM）は、ヒトにおける造血発生の主要な部位であり、通常の条件下では、ごく少数の造血幹細胞・前駆細胞（HSPC）が末梢血液（PB）中に見出され得る。サイトカイン、癌治療において使用されるいくつかの骨髓抑制性薬物及び造血間質細胞とBM間質細胞との間の相互作用を破壊する化合物による治療により、多数の幹細胞及び前駆細胞を血行に迅速に動員できる。

【0144】

他の細胞型への細胞の分化

本開示の方法の別の工程は、分化細胞に細胞を分化させることを含み得る。分化させる工程は、当技術分野において知られる任意の方法に従って実施され得る。例えば、ヒトiPSCは、アクチビン及びB27サプリメント（Life Technologies）を含む様々な処理を使用して胚体内胚葉に分化される。胚体内胚葉は、肝細胞にさらに分化され、処理は、FGF4、HGF、BMP2、BMP4、オンコスタチンM、デキサメタゾンなどを含む（Duan et al, Stem Cells, 2010; 28: 674-686; Ma et al, Stem Cells Translational Medicine, 2013; 2: 409-419）。別の実施形態では、分化させる工程は、Sawitza et al, Sci Rep. 2015; 5: 13320に従って実施され得る。分化細胞は、哺乳動物、例えばヒトの任意の体細胞であり得る。いくつ

10

20

30

40

50

かの実施形態では、体細胞は、外分泌性上皮細胞（例えば、唾液腺粘液細胞、前立腺細胞）、ホルモン分泌細胞（例えば、下垂体前葉細胞、腸管細胞、膵島）、角化上皮細胞（例えば、表皮角化細胞）、湿性重層化障壁上皮細胞、感覚変換細胞（例えば、光受容体）、自律神経性神経細胞、感覚器及び末梢ニューロン支持細胞（例えば、シュワン細胞）、中枢神経系ニューロン、グリア細胞（例えば、星状細胞、乏突起膠細胞）、レンズ細胞、脂肪細胞、腎細胞、バリア機能細胞（例えば、導管細胞）、細胞外マトリックス細胞、収縮細胞（例えば、骨格筋細胞、心筋細胞、平滑筋細胞）、血液細胞（例えば、赤血球）、免疫系細胞（例えば、巨核球、ミクログリア細胞、好中球、マスト細胞、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞）、生殖細胞（例えば、精子細胞）、ナース細胞又は間質細胞であり得る。

10

【0145】

一般に、本明細書で開示されるユニバーサルドナー細胞の集団は、挿入された1つ以上のヌクレオチド配列の発現を経時的に維持する。例えば、ユニバーサルドナー細胞の少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%又は少なくとも約99%は、1つ以上の免疫寛容原性因子を発現する。さらに、本明細書で開示されるユニバーサルドナー細胞に由来する系列限定細胞又は完全に分化した細胞の集団は、挿入された1つ以上のヌクレオチド配列の発現を経時的に維持する。例えば、系列限定細胞又は完全に分化した細胞の少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%又は少なくとも約99%は、1つ以上の免疫寛容原性因子を発現する。

20

【0146】

V. 製剤化及び投与

遺伝子編集のための製剤化及び送達

本明細書に記載されるとおりのガイドRNA、ポリヌクレオチド、例えば免疫寛容原性因子をコードするポリヌクレオチド又はエンドヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド及びエンドヌクレアーゼは、当技術分野において知られる任意の様式で製剤化され、細胞に送達され得る。

30

【0147】

ガイドRNA及び／又はポリヌクレオチドは、特定の投与様式及び剤形に依存して、担体、溶媒、安定剤、アジュバント、希釈剤などの薬学的に許容される賦形剤とともに製剤化され得る。ガイドRNA及び／又はポリヌクレオチド組成物は、製剤化及び投与経路に依存して、生理学的に適合性のpH及び約3のpH～約11のpH、約3のpH～約7のpHの範囲に達するように製剤化され得る。いくつかの場合、pHは、約pH5.0～約pH8の範囲に調整され得る。いくつかの場合、組成物は、1つ以上の薬学的に許容される賦形剤とともに、本明細書に記載されるとおりの治療有効量の少なくとも1つの化合物を含み得る。任意選択により、組成物は、本明細書に記載される化合物の組み合わせを含み得るか、又は細菌増殖の処置若しくは予防において有用な第2の活性成分（限定されないが、例えば抗細菌剤又は抗微生物剤）を含み得るか、又は本開示の試薬の組み合わせを含み得る。

40

【0148】

好適な賦形剤としては、例えば、タンパク質、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマーアミノ酸、アミノ酸コポリマー及び不活性ウイルス粒子などの巨大でゆっくりと代謝される高分子を含む担体分子が挙げられる。他の例示的な賦形剤としては、抗酸化剤（限定されないが、例えばアスコルビン酸）、キレート剤（限定されないが、例えばEDTA）、炭水化物（限定されないが、例えばデキストリン、ヒドロキシアルキルセルロース及びヒドロキシアルキルメチルセルロース）、ステアリン酸、液体（限定されないが、例えば油、水、生理食塩水、グリセロール及びエタノール）、湿潤剤又は乳化剤、pH緩衝

50

物質などを挙げることができる。

【0149】

ガイドRNAポリヌクレオチド（RNA又はDNA）及び／又はエンドヌクレアーゼポリヌクレオチド（RNA又はDNA）は、当技術分野において知られるウイルス性又は非ウイルス性送達ビヒクルによって送達され得る。代わりに、エンドヌクレアーゼポリペプチドは、エレクトロポレーション又は脂質ナノ粒子など、当技術分野において知られるウイルス性又は非ウイルス性送達ビヒクルによって送達され得る。さらなる代替的な態様では、DNAエンドヌクレアーゼは、1つ以上のポリペプチドとして、単独で又は1つ以上のガイドRNA若しくはtracrRNAと合わせた1つ以上のcrRNAと予め複合体を形成して送達され得る。

10

【0150】

ポリヌクレオチドは、ナノ粒子、リボソーム、リボ核タンパク質、正に荷電したペプチド、小分子RNAコンジュゲート、アプタマー-RNAキメラ及びRNA-融合タンパク質複合体を含むが、これらに限定されない非ウイルス性ビヒクルによって送達され得る。いくつかの例示的な非ウイルス性送達ビヒクルは、Peer and Lieberman, Gene Therapy, 2011, 18: 1127-1133（他のポリヌクレオチドの送達にも有用であるsiRNAのための非ウイルス性送達ビヒクルに焦点を当てている）において記載される。

【0151】

本開示のポリヌクレオチドに関して、製剤化は、例えば、国際出願PCT／米国特許出願公開第2012／069610号明細書において教示されるもののいずれかから選択され得る。

20

【0152】

ガイドRNA、sgRNA及びエンドヌクレアーゼをコードするmRNAなどのポリヌクレオチドは、脂質ナノ粒子（LNP）によって細胞又は対象に送達され得る。

【0153】

LNPは、1000nm未満、500nm未満、250nm未満、200nm未満、150nm未満、100nm未満、75nm未満、50nm未満又は25nm未満の直径を有する任意の粒子を指す。代わりに、ナノ粒子は、1～1000nm、1～500nm、1～250nm、25～200nm、25～100nm、35～75nm又は25～60nmのサイズの範囲であり得る。

30

【0154】

LNPは、カチオン性、アニオン性又は中性脂質から作製され得る。膜融合リン脂質DOPE又は膜成分コレステロールなどの中性脂質は、トランスフェクション活性及びナノ粒子安定性を増強する「ヘルパー脂質」としてLNP中に含まれ得る。カチオン性脂質の制約としては、不十分な安定性及び迅速なクリアランス並びに炎症性又は抗炎症性応答の発生に起因する低い有効性が挙げられる。

【0155】

LNPは、疎水性脂質、親水性脂質又は疎水性脂質及び親水性脂質の両方でも構成され得る。

40

【0156】

当技術分野において知られる任意の脂質又は脂質の組み合わせを使用して、LNPを生成することができる。LNPを生成するために使用される脂質の例は、DOTMA、DOSPA、DOTAP、DMRIE、DC-コレステロール、DOTAP-コレステロール、GAP-DMORIE-DPyPE及びGL67A-DOPE-DMPE-ポリエチレングリコール（PEG）である。カチオン性脂質の例は、98N12-5、C12-200、DLin-KC2-DMA（KC2）、DLin-MC3-DMA（MC3）、XTC、MD1及び7C1である。中性脂質の例は、DPSC、DPPC、POPC、DOP E及びSMである。PEG修飾脂質の例は、PEG-DMG、PEG-CerC14及びPEG-CerC20である。

50

【0157】

脂質は、LNPを生成するために任意の数のモル比において組み合わせられ得る。加えて、ポリヌクレオチドは、LNPを生成するために広範なモル比において脂質と組み合わせられ得る。

【0158】

組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターは、送達のために使用され得る。送達されるポリヌクレオチド、rep及びcap遺伝子並びにヘルパーウイルス機能を含む、パッケージ化されるAAVゲノムが細胞に提供されるrAAV粒子を生成するための手法は、当技術分野において標準的なものである。rAAVの生成は、通常、次の成分が単一の細胞(本明細書でパッケージング細胞と表示される)内に存在することを必要とする：rAAVゲノム、rAAVゲノムから分離された(すなわちその中に入らない)AAV rep及びcap遺伝子並びにヘルパーウイルス機能。AAV rep及びcap遺伝子は、組換えウイルスが由来することができ、本明細書に記載されるAAV血清型を含むが、これらに限定されないrAAVゲノムITRと異なるAAV血清型に由来し得る任意のAAV血清型に由来し得る。偽型rAAVの生成は、例えば、国際特許出願公開番号国際公開第01/83692号パンフレットにおいて開示される。

10

【0159】

細胞、例えばユニバーサルドナー細胞の製剤化及び投与

本明細書に記載されるとおりの遺伝子改変細胞、例えばユニバーサルドナー細胞は、製剤化され、且つ当技術分野において知られる任意の様式によって対象に投与され得る。

20

【0160】

用語「投与する」、「導入する」、「埋入する」、「生着する」及び「移植する」は、所望の部位での導入細胞の少なくとも部分的な局在をもたらす方法又は経路による細胞、例えば前駆細胞の対象への留置に関連して脈において互換的に使用される。細胞、例えば前駆細胞又はそれらの分化した後代は、埋入された細胞又は細胞の構成要素の少なくとも一部が生存したままである対象における所望の位置への送達をもたらす任意の適切な経路によって投与され得る。対象への投与後の細胞の生存期間は、数時間(例えば、24時間)の短い期間から数日、数年又はさらに対象の寿命(すなわち長期の生着)までであり得る。

【0161】

本明細書に記載されるとおりの遺伝子改変細胞、例えばユニバーサルドナー細胞は、対象への投与後、未改変細胞のものより長い期間生存可能であり得る。

30

【0162】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるとおりの細胞を含む組成物は、例えば、一定期間かけた大量投与として又は持続注入による静脈内投与を含み得る好適な経路によって投与され得る。いくつかの実施形態では、静脈内投与は、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑膜内又は髄腔内経路によって実施され得る。いくつかの実施形態では、組成物は、固体形態、水性形態又は液体形態であり得る。いくつかの実施形態では、水性又は液体形態は、噴霧又は凍結乾燥され得る。いくつかの実施形態では、噴霧又は凍結乾燥形態は、水性又は液体溶液により再構成され得る。

40

【0163】

細胞組成物は、乳化手順が細胞生存率に悪影響を及ぼさないことを条件として、リポソーム組成物としても乳化又は提示され得る。細胞及び任意の他の活性成分は、薬学的に許容され、且つ活性成分と適合性である賦形剤とともに、且つ本明細書に記載される治療方法における使用のために好適な量で混合され得る。

【0164】

細胞組成物中に含まれる追加の薬剤は、その成分に薬学的に許容される塩を含み得る。薬学的に許容される塩は、例えば、塩酸若しくはリン酸などの無機酸又は酢酸、酒石酸、マンデル酸などのような有機酸とともに形成される酸付加塩(ポリペプチドの遊離アミノ基とともに形成される)を含む。遊離カルボキシル基と形成される塩は、例えば、水酸化

50

ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム又は水酸化第二鉄などの無機塩基及びイソプロピルアミン、トリメチルアミン、２－エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどのような有機塩基にも由来し得る。

【０１６５】

生理学的に許容できる担体は、当技術分野においてよく知られる。例示的な液体担体は、活性成分及び水に加えて材料を含有しないか、又はリン酸緩衝食塩水など、生理的 pH 値のリン酸ナトリウム、生理食塩水若しくはその両方などの緩衝液を含有する滅菌水溶液である。さらに、水性担体は、２つ以上の緩衝液塩並びに塩化ナトリウム及び塩化カリウムなどの塩、デキストロース、ポリエチレングリコール及び他の溶質を含有し得る。液体組成物は、水に加えて且つ水を除いて、液相も含有し得る。そのような追加の液相の例は、グリセリン、綿実油などの植物油及び水－油エマルジョンである。特定の障害又は状態の治療において有効である細胞組成物において使用される活性化合物の量は、障害又は状態の性質に依存する可能性があり、標準的な臨床手法によって決定され得る。

10

【０１６６】

いくつかの実施形態では、細胞を含む組成物は、疾患を有するか、それを有することが疑われるか又はそのリスクがある対象、例えばヒト対象に投与され得る。いくつかの実施形態では、組成物は、疾患を有しないか、有すると疑われないか又はそのリスクがない対象に投与され得る。いくつかの実施形態では、対象は、健康なヒトである。いくつかの実施形態では、遺伝的に受け継がれる疾患を有するか、それを有することが疑われるか又はそのリスクがある対象、例えばヒト対象。いくつかの実施形態では、対象は、疾患の症状に罹患しているか又はそれを発症するリスクがある。いくつかの実施形態では、疾患は、糖尿病、例えばⅠ型糖尿病又はⅡ型糖尿病である。

20

【０１６７】

V I . 本開示の特定の組成物及び方法

したがって、本開示は、特に、以下の非限定的な組成物及び方法に関する。

【０１６８】

第１の組成物、組成物１において、本開示は、生存因子をコードする遺伝子内又はその近傍に挿入される、第１の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を含むユニバーサルドナー細胞を含む組成物であって、ユニバーサルドナー細胞は、免疫寛容原性因子を発現し、且つ生存因子の破壊された発現を有し、及びユニバーサルドナー細胞は、対照細胞と比較して増加した免疫回避及び／又は細胞生存を有する、組成物を提供する。

30

【０１６９】

別の組成物、組成物２において、本開示は、対照細胞が、野生型細胞又は挿入されるヌクレオチド配列を含まない細胞である、組成物１において提供されたとおりの組成物を提供する。

【０１７０】

別の組成物、組成物３において、本開示は、生存因子の破壊された発現が、減少又は消失した発現を含む、組成物１又は２において提供されたとおりの組成物を提供する。

【０１７１】

別の組成物、組成物４において、本開示は、第１の免疫寛容原性因子が P D - L 1、H L A - E、H L A - G、C T L A - 4 又は C D 4 7 である、組成物１～３のいずれか１つにおいて提供されたとおりの組成物を提供する。

40

【０１７２】

別の組成物、組成物５において、本開示は、生存因子が T X N I P、Z N F 1 4 3、F O X O 1、J N K 又は M A N F である、組成物１～４のいずれか１つにおいて提供されたとおりの組成物を提供する。

【０１７３】

別の組成物、組成物６において、本開示は、第１の免疫寛容原性因子が H L A - E であり、及び生存因子が T X N I P である、組成物請求項１～５のいずれか１つにおいて提供されたとおりの組成物を提供する。

50

【0174】

別の組成物、組成物7において、本開示は、HLA-Eをコードするヌクレオチド配列が、そのシグナルペプチドを伴わずにHLA-Eに融合されたB2M膜タンパク質に融合されたHLA-G提示ペプチドに融合されたB2Mシグナルペプチドを含むHLA-E三量体をコードする配列を含む、組成物5又は6において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0175】

別の組成物、組成物8において、本開示は、HLA-E三量体をコードする配列が配列番号55から本質的になる、組成物7において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0176】

別の組成物、組成物9において、本開示は、第1の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列が外来プロモーターに作動可能に連結される、組成物1～8のいずれか1つにおいて提供されたとおりの組成物を提供する。

【0177】

別の組成物、組成物10において、本開示は、外来プロモーターがCMV、EF1 α 、PGK、CAG又はUBCプロモーターである、組成物9において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0178】

別の組成物、組成物11において、本開示は、MHC-I若しくはMHC-IIヒト白血球抗原又はMHC-I若しくはMHC-II複合体の構成要素若しくは転写調節因子をコードする遺伝子内又はその近傍に挿入される、第2の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列をさらに含み、ユニバーサルドナー細胞が免疫寛容原性因子を発現し、且つMHC-I若しくはMHC-IIヒト白血球抗原又はMHC-I若しくはMHC-II複合体の構成要素若しくは転写調節因子の破壊された発現を有する、組成物請求項1～10のいずれか1つにおいて提供されたとおりの組成物を提供する。

【0179】

別の組成物、組成物12において、本開示は、MHC-I若しくはMHC-IIヒト白血球抗原又はMHC-I若しくはMHC-II複合体の構成要素若しくは転写調節因子の破壊された発現が、減少又は消失した発現を含む、組成物11において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0180】

別の組成物、組成物13において、本開示は、第2の免疫寛容原性因子がPD-L1、HLA-E、HLA-G、CTLA-4又はCD47である、組成物11又は12において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0181】

別の組成物、組成物14において、本開示は、MHC-I若しくはMHC-IIヒト白血球抗原又はMHC-I若しくはMHC-II複合体の構成要素若しくは転写調節因子がHLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、HLA-DR、B2M、NLRC5、CIITA、RFX5、RFXAP又はRFXANKである、組成物11～13のいずれか1つにおいて提供されたとおりの組成物を提供する。

【0182】

別の組成物、組成物15において、本開示は、第2の免疫寛容原性因子がPD-L1であり、及びMHC-I若しくはMHC-IIヒト白血球抗原又はMHC-I若しくはMHC-II複合体の構成要素若しくは転写調節因子がB2Mである、組成物11～14のいずれか1つにおいて提供されたとおりの組成物を提供する。

【0183】

別の組成物、組成物16において、本開示は、PD-L1をコードするヌクレオチド配列が配列番号11から本質的になる、組成物15において提供されたとおりの組成物を提供する。

10

20

30

40

50

【0184】

別の組成物、組成物17において、本開示は、第2の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列が外来プロモーターに作動可能に連結される、組成物11～16のいずれか1つにおいて提供されたとおりの組成物を提供する。

【0185】

別の組成物、組成物18において、本開示は、外来プロモーターがCMV、EF1 α 、PGK、CAG又はUBCプロモーターである、組成物17において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0186】

別の組成物、組成物19において、本開示は、第1の免疫寛容原性因子がHLA-Eであり、生存因子がTXNIPであり、第2の免疫寛容原性因子がPD-L1であり、及びMHC-I若しくはMHC-IIヒト白血球抗原又はMHC-I若しくはMHC-II複合体の構成要素若しくは転写調節因子がB2Mである、組成物11～18のいずれか1つにおいて提供されたとおりの組成物を提供する。

10

【0187】

別の組成物、組成物20において、本開示は、細胞が幹細胞である、組成物1～19のいずれか1つにおいて提供されたとおりの組成物を提供する。

【0188】

別の組成物、組成物21において、本開示は、幹細胞が胚性幹細胞、成体幹細胞、人工多能性幹細胞又は造血幹細胞である、組成物20において提供されたとおりの組成物を提供する。

20

【0189】

別の組成物、組成物22において、本開示は、細胞が分化細胞又は体細胞である、組成物1～19のいずれか1つにおいて提供されたとおりの組成物を提供する。

【0190】

別の組成物、組成物23において、本開示は、細胞が系列限定前駆細胞又は完全に分化した体細胞に分化することができる、組成物1～19のいずれか1つにおいて提供されたとおりの組成物を提供する。

【0191】

別の組成物、組成物24において、本開示は、系列限定前駆細胞が膵臓内胚葉前駆細胞、膵臓内分泌性前駆細胞、間葉系前駆細胞、筋肉前駆細胞、芽球細胞、造血前駆細胞又は神経前駆細胞である、組成物23において提供されたとおりの組成物を提供する。

30

【0192】

別の組成物、組成物25において、本開示は、完全に分化した体細胞が膵ベータ細胞、上皮細胞、内胚葉細胞、マクロファージ、肝細胞、脂肪細胞、腎細胞、血液細胞、心筋細胞又は免疫系細胞である、組成物23において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0193】

別の組成物、組成物26において、本開示は、組成物が複数のユニバーサルドナー細胞を含む、組成物1～25のいずれか1つにおいて提供されたとおりの組成物を提供する。

【0194】

別の組成物、組成物27において、本開示は、組成物が、複数のユニバーサルドナー細胞に由来する系列限定前駆細胞又は完全に分化した体細胞の集団で構成される、組成物26において提供されたとおりの組成物を提供する。

40

【0195】

別の組成物、組成物28において、本開示は、系列限定前駆細胞が膵臓内胚葉前駆細胞、膵臓内分泌性前駆細胞、間葉系前駆細胞、筋肉前駆細胞、芽球細胞、造血前駆細胞又は神経前駆細胞であり、及び完全に分化した体細胞が膵ベータ細胞、上皮細胞、内胚葉細胞、マクロファージ、肝細胞、脂肪細胞、腎細胞、血液細胞、心筋細胞又は免疫系細胞である、組成物27において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0196】

50

別の組成物、組成物 29 において、本開示は、組成物が複数のユニバーサルドナー細胞を含む、組成物 6 又は 19 において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0197】

別の組成物、組成物 30 において、本開示は、組成物が、複数のユニバーサルドナー細胞に由来する系列限定前駆細胞又は完全に分化した体細胞の集団で構成される、組成物 29 において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0198】

別の組成物、組成物 31 において、本開示は、系列限定前駆細胞が胚体内胚葉細胞、原始腸管細胞、後方前腸細胞、脾臓内胚葉前駆細胞、脾臓内分泌性前駆細胞、未成熟ベータ細胞又は成熟ベータ細胞であり、及び完全に分化した体細胞が脾ベータ細胞である、組成物 30 において提供されたとおりの組成物を提供する。

10

【0199】

別の組成物、組成物 32 において、本開示は、細胞の少なくとも約 50%、少なくとも約 70% 又は少なくとも約 90% が第 1 の免疫寛容原性因子、第 2 の免疫寛容原性因子又は第 1 及び第 2 の免疫寛容原性因子を発現する、組成物 26 又は 29 において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0200】

別の組成物、組成物 33 において、本開示は、細胞の少なくとも約 50%、少なくとも約 70% 又は少なくとも約 90% が第 1 の免疫寛容原性因子、第 2 の免疫寛容原性因子又は第 1 及び第 2 の免疫寛容原性因子を発現する、組成物 27、28、30 又は 31 のいずれか 1 つにおいて提供されたとおりの組成物を提供する。

20

【0201】

別の組成物、組成物 34 において、本開示は、組成物 26 の複数の細胞又は組成物 27 若しくは 28 の細胞の集団を含む組成物を提供する。

【0202】

別の組成物、組成物 35 において、本開示は、治療を、それを必要とする対象において行う際の使用のための、組成物 34 において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0203】

別の組成物、組成物 36 において、本開示は、対象が、疾患を有するか、それを有することが疑われるか又はそのリスクがある、組成物 35 において提供されたとおりの組成物を提供する。

30

【0204】

別の組成物、組成物 37 において、本開示は、疾患が、遺伝的に受け継がれる疾患である、組成物 36 において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0205】

別の組成物、組成物 38 において、本開示は、組成物 29 の複数の細胞又は組成物 30 若しくは 31 の細胞の集団を含む組成物を提供する。

【0206】

別の組成物、組成物 39 において、本開示は、糖尿病の治療を、それを必要とする対象において行うための、組成物 38 において提供されたとおりの組成物を提供する。

40

【0207】

別の組成物、組成物 40 において、本開示は、対象が I 型糖尿病又は II 型糖尿病を有する、組成物 39 において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0208】

別の組成物、組成物 41 において、本開示は、対象がヒトである、組成物 35～40 のいずれか 1 つにおいて提供されたとおりの組成物を提供する。

【0209】

第 1 の方法、方法 1 において、本開示は、細胞であって、それを必要とする対象への投与のための細胞を得る方法であって、(a) 組成物 26、29 又は 32 のいずれか 1 つの複数のユニバーサルドナー細胞を得るか又は得ていることと、(b) 細胞の系列限定前駆

50

細胞又は完全に分化した体細胞への分化に十分な時間にわたって且つ条件下で複数のユニバーサルドナー細胞を維持することを含む方法を提供する。

【0210】

別の方法、方法2において、本開示は、治療を、それを必要とする対象において行うための方法であって、(a)組成物26、29又は32のいずれか1つの複数のユニバーサルドナー細胞を、系列限定前駆細胞又は完全に分化した体細胞への分化後に得るか又は得ていることと；(b)系列限定前駆細胞又は完全に分化した体細胞を対象に投与することを含む方法を提供する。

【0211】

別の方法、方法3において、本開示は、投与することが、系列限定前駆細胞又は完全に分化した体細胞を含むデバイスを対象に埋入することを含む、方法2において提供されたとおりの方法を提供する。

10

【0212】

別の方法、方法4において、本開示は、系列限定前駆細胞が膵臓内胚葉前駆細胞、膵臓内分泌性前駆細胞、間葉系前駆細胞、筋肉前駆細胞、芽球細胞、造血前駆細胞又は神経前駆細胞であり、及び完全に分化した体細胞が膵ベータ細胞、上皮細胞、内胚葉細胞、マクロファージ、肝細胞、脂肪細胞、腎細胞、血液細胞、心筋細胞又は免疫系細胞である、方法1～3のいずれか1つにおいて提供されたとおりの方法を提供する。

【0213】

別の方法、方法5において、本開示は、対象が、疾患を有するか、それを有することが疑われるか又はそのリスクがある、方法1～4のいずれか1つにおいて提供されたとおりの方法を提供する。

20

【0214】

別の方法、方法6において、本開示は、疾患が、遺伝的に受け継がれる疾患である、方法5において提供されたとおりの方法を提供する。

【0215】

別の方法、方法7において、本開示は、対象がヒトである、方法1～6のいずれか1つにおいて提供されたとおりの方法を提供する。

【0216】

別の方法、方法8において、本開示は、糖尿病の治療を、それを必要とする対象において行うための方法であって、(a)組成物29又は32の複数のユニバーサルドナー細胞を、膵臓内胚葉細胞、膵臓内分泌性細胞、未成熟ベータ細胞、成熟ベータ細胞又は膵ベータ細胞への分化後に得るか又は得ていることと；(b)膵臓内胚葉細胞、膵臓内分泌性細胞、未成熟ベータ細胞、成熟ベータ細胞又は膵ベータ細胞を対象に投与することを含む方法を提供する。

30

【0217】

別の方法、方法9において、本開示は、投与することが、膵臓内胚葉細胞、膵臓内分泌性細胞、未成熟ベータ細胞、成熟ベータ細胞又は膵ベータ細胞を含むデバイスを対象に埋入することを含む、方法8において提供されたとおりの方法を提供する。

【0218】

別の方法、方法10において、本開示は、対象がI型糖尿病又はII型糖尿病を有する、方法8又は9において提供されたとおりの方法を提供する。

40

【0219】

別の方法、方法11において、本開示は、対象がヒトである、方法8～10のいずれか1つにおいて提供されたとおりの方法を提供する。

【0220】

別の組成物、組成物41において、本開示は、チオレドキシン相互作用タンパク質(TXNIP)をコードする遺伝子内又はその近傍に挿入される、HLAクラスI組織適合抗原、アルファ鎖E(HLA-E)をコードするヌクレオチド配列を含むユニバーサルドナー細胞を含む組成物であって、ユニバーサルドナー細胞がHLA-Eを発現し、且つTX

50

N I P の破壊された発現を有し、及びユニバーサルドナー細胞が対照と比較して増加した免疫回避及び／又は細胞生存を有する、組成物を提供する。

【0221】

別の組成物、組成物42において、本開示は、対照細胞が、野生型細胞又は挿入されるヌクレオチド配列を含まない細胞である、組成物41において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0222】

別の組成物、組成物43において、本開示は、T X N I P の破壊された発現が、減少又は消失した発現を含む、組成物41において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0223】

別の組成物、組成物44において、本開示は、H L A - E をコードするヌクレオチド配列が、そのシグナルペプチドを伴わずにH L A - E に融合されたB 2 M 膜タンパク質に融合されたH L A - G 提示ペプチドに融合されたB 2 M シグナルペプチドを含むH L A - E 三量体をコードする配列を含む、組成物41において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0224】

別の組成物、組成物45において、本開示は、H L A - E 三量体をコードする配列が配列番号55から本質的になる、組成物44において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0225】

別の組成物、組成物46において、本開示は、H L A - E をコードするヌクレオチド配列が外来プロモーターに作動可能に連結される、組成物41において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0226】

別の組成物、組成物47において、本開示は、外来プロモーターがC A G プロモーターである、組成物41において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0227】

別の組成物、組成物48において、本開示は、細胞が幹細胞である、組成物41において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0228】

別の組成物、組成物49において、本開示は、幹細胞が胚性幹細胞、成体幹細胞、人工多能性幹細胞又は造血幹細胞である、組成物48において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0229】

別の組成物、組成物50において、本開示は、細胞が分化細胞又は体細胞である、組成物41において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0230】

別の組成物、組成物51において、本開示は、細胞が系列限定前駆細胞又は完全に分化した体細胞に分化することができる、組成物41において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0231】

別の組成物、組成物52において、本開示は、系列限定前駆細胞が胚体内胚葉細胞、原始腸管細胞、後方前腸細胞、脾臓内胚葉前駆細胞、脾臓内分泌性前駆細胞、未成熟ベータ細胞又は成熟ベータ細胞であり、及び完全に分化した体細胞が脾ベータ細胞である、組成物51において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0232】

別の組成物、組成物53において、本開示は、組成物41において提供されたとおりの複数のユニバーサルドナー細胞を含む組成物を提供する。

【0233】

別の組成物、組成物54において、本開示は、細胞の少なくとも約50%がH L A - E

10

20

30

40

50

を発現する、組成物 53 において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0234】

別の組成物、組成物 55 において、本開示は、細胞の少なくとも約 70% が HLA-E を発現する、組成物 53 において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0235】

別の組成物、組成物 56 において、本開示は、細胞の少なくとも約 90% が HLA-E を発現する、組成物 53 において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0236】

別の組成物、組成物 57 において、本開示は、組成物 53 の複数のユニバーサルドナー細胞に由来する系列限定前駆細胞又は完全に分化した体細胞の集団を含む組成物を提供する。

10

【0237】

別の組成物、組成物 58 において、本開示は、系列限定前駆細胞が胚体内胚葉細胞、原始腸管細胞、後方前腸細胞、膵臓内胚葉前駆細胞、膵臓内分泌性前駆細胞、未成熟ベータ細胞又は成熟ベータ細胞であり、及び完全に分化した体細胞が膵ベータ細胞である、組成物 57 において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0238】

別の組成物、組成物 59 において、本開示は、細胞の少なくとも約 50% が HLA-E を発現する、組成物 58 において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0239】

別の組成物、組成物 60 において、本開示は、細胞の少なくとも約 70% が HLA-E を発現する、組成物 59 において提供されたとおりの組成物を提供する。

20

【0240】

別の組成物、組成物 61 において、本開示は、細胞の少なくとも約 90% が HLA-E を発現する、組成物 59 において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0241】

別の組成物、組成物 62 において、本開示は、HLA クラス I 組織適合抗原、アルファ鎖 E (HLA-E) の導入又は増加された発現及びチオレドキシン相互作用タンパク質 (TXNIP) の破壊された発現を有する遺伝子改変細胞を含む組成物であって、遺伝子改変細胞が未改変細胞と比較して増加した免疫回避及び／又は細胞生存を有する、組成物を提供する。

30

【0242】

別の組成物、組成物 63 において、本開示は、TXNIP をコードする遺伝子内又はその近傍に挿入される、HLA-E をコードするヌクレオチド配列を含み、それにより TXNIP 遺伝子を破壊する、組成物 62 において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0243】

別の組成物、組成物 64 において、本開示は、TXNIP の破壊された発現が、減少又は消失した発現を含む、組成物 62 において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0244】

別の方法、方法 12 において、本開示は、糖尿病の治療を、それを必要とする対象において行うための方法であって、組成物 53 の複数のユニバーサルドナー細胞を、膵臓内胚葉細胞、膵臓内分泌性細胞、未成熟ベータ細胞、成熟ベータ細胞又は膵ベータ細胞への分化後に得るか又は得ていることと；(b) 膵臓内胚葉細胞、膵臓内分泌性細胞、未成熟ベータ細胞、成熟ベータ細胞又は膵ベータ細胞を対象に投与することを含む方法を提供する。

40

【0245】

別の方法、方法 13 において、本開示は、投与することが、膵臓内胚葉細胞、膵臓内分泌性細胞、未成熟ベータ細胞、成熟ベータ細胞又は膵ベータ細胞を含むデバイスを対象に埋入することを含む、方法 12 において提供されたとおりの方法を提供する。

【0246】

50

別の方法、方法 14 において、本開示は、対象が I 型糖尿病又は II 型糖尿病を有する、方法 12 において提供されたとおりの方法を提供する。

【0247】

別の方法、方法 15 において、本開示は、対象がヒトである、方法 12 において提供されたとおりの方法を提供する。

【0248】

別の組成物、組成物 65 において、本開示は、(a) ベーター 2 ミクログロブリン (B2M) をコードする遺伝子内又はその近傍に挿入される、プログラム死ーリガンド 1 (PD-L1) をコードするヌクレオチド配列、及び (b) チオレドキシン相互作用タンパク質 (TXNIP) をコードする遺伝子内又はその近傍に挿入される、HLA クラス I 組織適合抗原、アルファ鎖 E (HLA-E) をコードするヌクレオチド配列を含むユニバーサルドナー細胞を含む組成物であって、ユニバーサルドナー細胞が PD-L1 及び HLA-E を発現し、且つ B2M 及び TXNIP の破壊された発現を有し、及びユニバーサルドナー細胞が対照と比較して増加した免疫回避及び／又は細胞生存を有する、組成物を提供する。

10

【0249】

別の組成物、組成物 66 において、本開示は、対照細胞が、野生型細胞又は挿入されるヌクレオチド配列を含まない細胞である、組成物 65 において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0250】

別の組成物、組成物 67 において、本開示は、B2M の破壊された発現が、B2M の減少又は消失した発現を含み、且つ TXNIP の破壊された発現が、TXNIP の減少又は消失した発現を含む、組成物 65 において提供されたとおりの組成物を提供する。

20

【0251】

別の組成物、組成物 68 において、本開示は、PD-L1 をコードするヌクレオチド配列が配列番号 11 から本質的になる、組成物 65 において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0252】

別の組成物、組成物 69 において、本開示は、HLA-E をコードするヌクレオチド配列が、そのシグナルペプチドを伴わずに HLA-E に融合された B2M 膜タンパク質に融合された HLA-G 提示ペプチドに融合された B2M シグナルペプチドを含む HLA-E 三量体をコードする配列を含む、組成物 65 において提供されたとおりの組成物を提供する。

30

【0253】

別の組成物、組成物 70 において、本開示は、HLA-E 三量体をコードする配列が配列番号 55 から本質的になる、組成物 69 において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0254】

別の組成物、組成物 71 において、本開示は、PD-L1 をコードするヌクレオチド配列が外来プロモーターに作動可能に連結され、且つ HLA-E をコードするヌクレオチド配列が外来プロモーターに作動可能に連結される、組成物 65 において提供されたとおりの組成物を提供する。

40

【0255】

別の組成物、組成物 72 において、本開示は、外来プロモーターが CAG プロモーターである、組成物 71 において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0256】

別の組成物、組成物 73 において、本開示は、細胞が幹細胞である、組成物 65 において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0257】

別の組成物、組成物 74 において、本開示は、幹細胞が胚性幹細胞、成体幹細胞、人工

50

多能性幹細胞又は造血幹細胞である、組成物 7 3 において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0258】

別の組成物、組成物 7 5 において、本開示は、細胞が分化細胞又は体細胞である、組成物 6 5 において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0259】

別の組成物、組成物 7 6 において、本開示は、細胞が系列限定前駆細胞又は完全に分化した体細胞に分化することができる、組成物 6 5 において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0260】

別の組成物、組成物 7 7 において、本開示は、系列限定前駆細胞が胚体内胚葉細胞、原始腸管細胞、後方前腸細胞、膵臓内胚葉前駆細胞、膵臓内分泌性前駆細胞、未成熟ベータ細胞又は成熟ベータ細胞であり、及び完全に分化した体細胞が膵ベータ細胞である、組成物 7 6 において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0261】

別の組成物、組成物 7 8 において、本開示は、組成物 6 5 において提供されたとおりの複数のユニバーサルドナー細胞を含む組成物を提供する。

【0262】

別の組成物、組成物 7 9 において、本開示は、細胞の少なくとも約 50% が PD-L1 を発現し、且つ／又は細胞の少なくとも約 50% が HLA-E を発現する、組成物 7 8 において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0263】

別の組成物、組成物 8 0 において、本開示は、細胞の少なくとも約 70% が PD-L1 を発現し、且つ／又は細胞の少なくとも約 70% が HLA-E を発現する、組成物 7 8 において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0264】

別の組成物、組成物 8 1 において、本開示は、細胞の少なくとも約 90% が PD-L1 を発現し、且つ／又は細胞の少なくとも約 90% が HLA-E を発現する、組成物 7 8 において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0265】

別の組成物、組成物 8 2 において、本開示は、組成物 7 8 において提供されたとおりの複数のユニバーサルドナー細胞に由来する系列限定前駆細胞又は完全に分化した体細胞の集団を含む組成物を提供する。

【0266】

別の組成物、組成物 8 3 において、本開示は、系列限定前駆細胞が胚体内胚葉細胞、原始腸管細胞、後方前腸細胞、膵臓内胚葉前駆細胞、膵臓内分泌性前駆細胞、未成熟ベータ細胞又は成熟ベータ細胞であり、及び完全に分化した体細胞が膵ベータ細胞である、組成物 8 2 において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0267】

別の組成物、組成物 8 4 において、本開示は、細胞の少なくとも約 50% が PD-L1 を発現し、且つ／又は細胞の少なくとも約 50% が HLA-E を発現する、組成物 8 3 において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0268】

別の組成物、組成物 8 5 において、本開示は、細胞の少なくとも約 70% が PD-L1 を発現し、且つ／又は細胞の少なくとも約 70% が HLA-E を発現する、組成物 8 3 において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0269】

別の組成物、組成物 8 6 において、本開示は、細胞の少なくとも約 90% が PD-L1 を発現し、且つ／又は細胞の少なくとも約 90% が HLA-E を発現する、組成物 8 3 において提供されたとおりの組成物を提供する。

10

20

30

40

50

【0270】

別の組成物、組成物87において、本開示は、PD-L1及びHLA-Eの導入又は増加された発現並びにB2M及びTXNIPの破壊された発現を有する遺伝子改変細胞を含む組成物であって、遺伝子改変細胞が未改変細胞と比較して増加した免疫回避及び／又は細胞生存を有する、組成物を提供する。

【0271】

別の組成物、組成物88において、本開示は、B2Mをコードする遺伝子内又はその近傍に挿入される、PD-L1をコードするヌクレオチド配列を含み、それによりB2M遺伝子を破壊し、且つTXNIPをコードする遺伝子内又はその近傍に挿入される、HLA-Eをコードするヌクレオチド配列を含み、それによりTXNIP遺伝子を破壊する、組成物87において提供されたとおりの組成物を提供する。

10

【0272】

別の組成物、組成物89において、本開示は、B2M及びTXNIPの破壊された発現が、B2M及びTXNIPの減少又は消失した発現を含む、組成物87において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0273】

別の方法、方法16において、本開示は、糖尿病の治療を、それを必要とする対象において行うための方法であって、(a)組成物78の複数のユニバーサルドナー細胞を、膵臓内胚葉細胞、膵臓内分泌性細胞、未成熟ベータ細胞、成熟ベータ細胞又は膵ベータ細胞への分化後に得るか又は得ていることと；(b)膵臓内胚葉細胞、膵臓内分泌性細胞、未成熟ベータ細胞、成熟ベータ細胞又は膵ベータ細胞を対象に投与することを含む方法を提供する。

20

【0274】

別の方法、方法17において、本開示は、投与することが、膵臓内胚葉細胞、膵臓内分泌性細胞、未成熟ベータ細胞、成熟ベータ細胞又は膵ベータ細胞を含むデバイスを対象に埋入することを含む、方法16において提供されたとおりの方法を提供する。

【0275】

別の方法、方法18において、本開示は、対象がI型糖尿病又はII型糖尿病を有する、方法16において提供されたとおりの方法を提供する。

【0276】

別の方法、方法19において、本開示は、対象がヒトである、方法16において提供されたとおりの方法を提供する。

30

【0277】

別の方法、方法20において、本開示は、ユニバーサルドナー細胞を作製するための方法であって、(a)生存因子をコードする遺伝子内又はその近傍の部位を標的化する第1の部位特異的ヌクレアーゼ；並びに(b)(i)(a)の標的部位の左に位置する領域と相同なヌクレオチド配列、及び(ii)(a)の標的部位の右に位置する領域と相同なヌクレオチド配列に隣接する、第1の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を含む第1の核酸を細胞に送達することを含み、第1の部位特異的ヌクレアーゼが(a)の標的部位を切断し、(b)の第1の核酸が、(a)の部位と部分的に重複するか、完全に重複するか、又はその中に含有される部位で挿入され、それによりユニバーサルドナー細胞を作製し、ユニバーサルドナー細胞が、(b)の核酸が挿入されていない細胞と比較して増加した細胞生存を有する、方法を提供する。

40

【0278】

別の方法、方法21において、本開示は、生存因子がTXNIP、ZNF143、FOXO1、JNK又はMANFである、方法20において提供されたとおりの方法を提供する。

【0279】

別の方法、方法22において、本開示は、第1の免疫寛容原性因子がPD-L1、HLA-E、HLA-G、CTLA-4又はCD47である、方法20又は21において提供

50

されたとおりの方法を提供する。

【0280】

別の方法、方法23において、本開示は、生存因子がTXNIPである、方法20～22のいずれか1つにおいて提供されたとおりの方法を提供する。

【0281】

別の方法、方法24において、本開示は、第1の免疫寛容原性因子がHLA-Eである、方法23において提供されたとおりの方法を提供する。

【0282】

別の方法、方法25において、本開示は、第1の部位特異的ヌクレアーゼが、CRISPRヌクレアーゼ及びガイドRNA (gRNA)を含むCRISPR系である、方法20～24のいずれか1つにおいて提供されたとおりの方法を提供する。

10

【0283】

別の方法、方法26において、本開示は、CRISPRヌクレアーゼがII型Cas9ヌクレアーゼ又はV型Cpf1ヌクレアーゼであり、且つCRISPRヌクレアーゼが少なくとも1つの核移行シグナルに連結される、方法20～25のいずれか1つにおいて提供されたとおりの方法を提供する。

【0284】

別の方法、方法27において、本開示は、gRNAが、配列番号15～24からなる標的配列に対応するスペーサー配列を含む、方法20～26のいずれか1つにおいて提供されたとおりの方法を提供する。

20

【0285】

別の方法、方法28において、本開示は、(b)(i)のヌクレオチド配列が配列番号25から本質的になり、且つ(b)(ii)のヌクレオチド配列が配列番号32から本質的になる、方法25～27のいずれか1つにおいて提供されたとおりの方法を提供する。

【0286】

別の方法、方法29において、本開示は、(c)MHC-I若しくはMHC-IIヒト白血球抗原又はMHC-I若しくはMHC-II複合体の構成要素若しくは転写調節因子の1つ以上をコードする遺伝子内又はその近傍の部位を標的化する第2の部位特異的ヌクレアーゼ；並びに(d)(iii)(c)の標的部位の左に位置する領域と相同なヌクレオチド配列、及び(iv)(c)の標的部位の右に位置する領域と相同なヌクレオチド配列に隣接する、第2の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を含む第2の核酸を細胞に送達することをさらに含み、(d)の第2の免疫寛容原性因子が第1の免疫寛容原性因子(b)と異なり、第2の部位特異的ヌクレアーゼが(c)の標的部位を切断し、(d)の第2の核酸が、(c)の部位と部分的に重複するか、完全に重複するか、又はその中に含有される部位で挿入され、ユニバーサルドナー細胞が、(d)の第2の核酸が挿入されていない細胞と比較して増加した免疫回避及び／又は細胞生存を有する、方法20～28のいずれか1つにおいて提供されたとおりの方法を提供する。

30

【0287】

別の方法、方法30において、本開示は、MHC-I若しくはMHC-IIヒト白血球抗原又はMHC-I若しくはMHC-II複合体の構成要素若しくは転写調節因子がHLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、HLA-DR、B2M、NLRC5、CIITA、RFX5、RFXAP又はRFXANKである、方法29において提供されたとおりの方法を提供する。

40

【0288】

別の方法、方法31において、本開示は、第2の免疫寛容原性因子がPD-L1、HLA-E、HLA-G、CTLA-4又はCD47である、方法29又は30において提供されたとおりの方法を提供する。

【0289】

別の方法、方法32において、本開示は、MHC-I若しくはMHC-IIヒト白血球

50

抗原又はMHC-I若しくはMHC-II複合体の構成要素若しくは転写調節因子がB2Mである、方法29～31のいずれか1つにおいて提供されたとおりの方法を提供する。

【0290】

別の方法、方法33において、本開示は、第2の免疫寛容原性因子がPD-L1である、方法32において提供されたとおりの方法を提供する。

【0291】

別の方法、方法34において、本開示は、第2の部位特異的ヌクレアーゼが、CRISPRヌクレアーゼ及びgRNAを含むCRISPR系である、方法29～33のいずれか1つにおいて提供されたとおりの方法を提供する。

【0292】

別の方法、方法35において、本開示は、CRISPRヌクレアーゼがII型Cas9ヌクレアーゼ又はV型Cfp1ヌクレアーゼであり、且つCRISPRヌクレアーゼが少なくとも1つの核移行シグナルに連結される、方法34において提供されたとおりの方法を提供する。

【0293】

別の方法、方法36において、本開示は、gRNAが、配列番号1～3又は35～44からなる標的配列に対応するスペーサー配列を含む、方法34又は35において提供されたとおりの方法を提供する。

【0294】

別の方法、方法37において、本開示は、(d)(iii)のヌクレオチド配列が配列番号7から本質的になり、且つ(d)(iv)のヌクレオチド配列が配列番号13から本質的になる、方法34～36のいずれか1つにおいて提供されたとおりの方法を提供する。

【0295】

別の方法、方法38において、本開示は、CRISPRヌクレアーゼ及びgRNAが1:3のモル比で存在する、方法25～28又は34～37のいずれか1つにおいて提供されたとおりの方法を提供する。

【0296】

別の方法、方法39において、本開示は、第1の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列が外来プロモーターに作動可能に連結され、且つ第2の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列が外来プロモーターに作動可能に連結される、方法20～38のいずれか1つにおいて提供されたとおりの方法を提供する。

【0297】

別の方法、方法40において、本開示は、外来プロモーターが構成的、誘導性、時間特異的、組織特異的又は細胞型特異的プロモーターであり、任意選択により、外来プロモーターがCMV、EF1α、PGK、CAG又はUBCプロモーターである、方法39において提供されたとおりの方法を提供する。

【0298】

別の方法、方法41において、本開示は、ユニバーサルドナー細胞を作製するための方法であって、(a)生存因子をコードする遺伝子内又はその近傍の部位を標的化する第1の部位特異的ヌクレアーゼ；(b)(i)(a)の標的部位の左に位置する領域と相同なヌクレオチド配列、及び(ii)(a)の標的部位の右に位置する領域と相同なヌクレオチド配列に隣接する、第1の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を含む第1の核酸(第1の部位特異的ヌクレアーゼは、(a)の標的部位を切断し、及び相同組換えのプロセスを通して、(b)の第1の核酸は、第1の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を、(a)の部位と部分的に重複するか、完全に重複するか、又はその中に含有される部位に挿入し、それにより(a)の遺伝子を破壊するための鋳型として利用される)；(c)MHC-I若しくはMHC-IIヒト白血球抗原又はMHC-I若しくはMHC-II複合体の構成要素若しくは転写調節因子の1つ以上をコードする遺伝子内又はその近傍の部位を標的化する第2の部位特異的ヌクレアーゼ；並びに(d)(iii)

10

20

30

40

50

(c) の標的部位の左に位置する領域と相同なヌクレオチド配列、及び (iv) (c) の標的部位の右に位置する領域と相同なヌクレオチド配列に隣接する、第 2 の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列 (d) の免疫寛容原性因子は、免疫寛容原性因子 (b) と異なり、第 2 の部位特異的ヌクレアーゼは、(c) の標的部位を切断し、及び相同組換えのプロセスを通して、(d) の第 2 の核酸は、第 2 の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を、(c) の部位と部分的に重複するか、完全に重複するか、又はその中に含有される部位に挿入し、それにより (c) の遺伝子を破壊するための鑄型として利用される) を含む第 2 の核酸を細胞に送達し、それによりユニバーサルドナー細胞を作製することを含み、ユニバーサルドナー細胞は、(b) の第 1 の核酸及び (d) の第 2 の核酸が挿入されていない細胞と比較して増加した細胞生存を有する、方法を提供する。

10

【0299】

別の方法、方法 42 において、本開示は、生存因子が TXNIP であり、第 1 の免疫寛容原性因子が HLA-E であり、MHC-I 若しくは MHC-II ヒト白血球抗原又は MHC-I 若しくは MHC-II 複合体の構成要素若しくは転写調節因子が B2M であり、及び第 2 の免疫寛容原性因子が PD-L1 である、方法 41 において提供されたとおりの方法を提供する。

【0300】

別の方法、方法 43 において、本開示は、細胞が哺乳動物細胞であり、任意選択により、細胞がヒト細胞である、方法 20～42 のいずれか 1 つにおいて提供されたとおりの方法を提供する。

20

【0301】

別の方法、方法 44 において、本開示は、細胞が幹細胞である、方法 20～43 のいずれか 1 つにおいて提供されたとおりの方法を提供する。

【0302】

別の方法、方法 45 において、本開示は、細胞が多能性幹細胞、胚性幹細胞、成体幹細胞、人工多能性幹細胞又は造血幹細胞である、方法 20～43 のいずれか 1 つにおいて提供されたとおりの方法を提供する。

【0303】

別の方法、方法 46 において、本開示は、細胞が分化細胞又は体細胞である、方法 20～43 のいずれか 1 つにおいて提供されたとおりの方法を提供する。

30

【0304】

別の方法、方法 47 において、本開示は、ユニバーサルドナー細胞が系列限定前駆細胞又は完全に分化した体細胞に分化することができる、方法 20～43 のいずれか 1 つにおいて提供されたとおりの方法を提供する。

【0305】

別の方法、方法 48 において、本開示は、系列限定前駆細胞が膵臓内胚葉前駆細胞、膵臓内分泌性前駆細胞、間葉系前駆細胞、筋肉前駆細胞、芽球細胞、造血前駆細胞又は神経前駆細胞である、方法 47 において提供されたとおりの方法を提供する。

【0306】

別の方法、方法 49 において、本開示は、完全に分化した体細胞が膵ベータ細胞などの内分泌性細胞、上皮細胞、内胚葉細胞、マクロファージ、肝細胞、脂肪細胞、腎細胞、血液細胞又は免疫系細胞である、方法 47 において提供されたとおりの方法を提供する。

40

【0307】

別の方法、方法 49A において、本開示は、完全に分化した体細胞が心筋細胞又は免疫系細胞である、方法 47 において提供されたとおりの方法を提供する。

【0308】

別の組成物、組成物 90 において、本開示は、方法 20～49 のいずれか 1 つによって作製される複数のユニバーサルドナー細胞を含む組成物を提供する。

【0309】

別の組成物、組成物 91 において、本開示は、細胞が分化を経るのに十分な時間にわた

50

って且つ条件下で維持される、組成物 90 において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0310】

別の組成物、組成物 92 において、本開示は、治療を、それを必要とする対象において行う際の使用のための、組成物 90 又は 91 において提供されたとおりの組成物を提供する。

【0311】

別の組成物、組成物 93 において、本開示は、対象が、疾患を有するか、それを有することが疑われるか又はそのリスクがある、組成物 92 によって提供されたとおりの組成物を提供する。

10

【0312】

別の方法、方法 50 において、本開示は、対象に組成物 90 又は 91 の複数のユニバーサルドナー細胞を投与することを含む方法を提供する。

【0313】

別の方法、方法 51 において、本開示は、治療を、それを必要とする対象において行うための方法であって、(a) 組成物 90 の複数のユニバーサルドナー細胞を、系列限定前駆細胞又は完全に分化した体細胞への分化後に得るか又は得ていることと；(b) 系列限定前駆細胞又は完全に分化した体細胞を対象に投与することを含む方法を提供する。

【0314】

別の方法、方法 52 において、本開示は、細胞であって、それを必要とする対象への投与のための細胞を得る方法であって、(a) 請求項 31 のユニバーサルドナー細胞を得るか又は得ていることと；(b) 細胞の系列限定前駆細胞又は完全に分化した体細胞への分化に十分な時間にわたって且つ条件下でユニバーサルドナー細胞を維持することを含む方法を提供する。

20

【0315】

別の方法、方法 53 において、本開示は、系列限定前駆細胞が膵臓内胚葉前駆細胞、膵臓内分泌性前駆細胞、間葉系前駆細胞、筋肉前駆細胞、芽球細胞、造血前駆細胞又は神経前駆細胞である、方法 51 又は 52 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0316】

別の方法、方法 54 において、本開示は、完全に分化した体細胞が膵ベータ細胞などの内分泌性細胞、上皮細胞、内胚葉細胞、マクロファージ、肝細胞、脂肪細胞、腎細胞、血液細胞又は免疫系細胞である、方法 51 又は 52 によって提供されたとおりの方法を提供する。

30

【0317】

別の方法、方法 54A において、本開示は、完全に分化した体細胞が心筋細胞である、方法 51 又は 52 において提供されたとおりの方法を提供する。

【0318】

別の方法、方法 55 において、本開示は、対象が、疾患を有するか、それを有することが疑われるか又はそのリスクがあるヒトである、方法 50～54 によって提供されたとおりの方法を提供する。

40

【0319】

別の方法、方法 56 において、本開示は、疾患が、遺伝的に受け継がれる疾患である、方法 55 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0320】

別の組成物、組成物 93 において、本開示は、配列番号 15～24 からなる標的配列に対応するスペーサー配列を含むガイド RNA を提供する。

【0321】

別の方法、方法 57 において、本開示は、ユニバーサルドナー細胞を作製するためのインビトロでの方法であって、(a) RNA 誘導型ヌクレアーゼ；(b) チオレドキシン相互作用タンパク質 (TXNIP) 遺伝子座位中の標的部位を標的化するガイド RNA (g

50

R N A) ; 及び (c) 核酸であって、 (i) 免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列 ; (i i) 配列番号 2 5 から本質的になり且つ標的部位の左及び 5 0 核酸塩基内に位置するゲノム領域と配列相同性を有するヌクレオチド配列 ; 並びに (i i i) 配列番号 3 2 から本質的になり且つ標的部位の右及び 5 0 核酸塩基内に位置するゲノム領域と配列相同性を有するヌクレオチド配列を含む核酸を含むベクター ((i) は、 (i i) 及び (i i i) に隣接する) を幹細胞に送達することを含み、 T X N I P 遺伝子座位が標的部位で切断され、且つ核酸が T X N I P 遺伝子座位に挿入され、それにより T X N I P 遺伝子を破壊し、ユニバーサルドナー細胞を作製し、ユニバーサルドナー細胞が対照細胞と比較して増加した免疫回避及び／又は細胞生存を有する、方法を提供する。

10

【 0 3 2 2 】

別の方法、方法 5 7 A において、本開示は、核酸が標的部位の 5 0 塩基対以内で T X N I P 遺伝子座位に挿入される、方法 5 7 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【 0 3 2 3 】

別の方法、方法 5 8 において、本開示は、対照細胞が、野生型細胞又は挿入される核酸を含まない細胞である、方法 5 7 によって提供されたとおりの組成物を提供する。

【 0 3 2 4 】

別の方法、方法 5 9 において、本開示は、破壊された T X N I P 遺伝子が、 T X N I P の減少又は消失した発現を有する、方法 5 7 によって提供されたとおりの方法を提供する。

20

【 0 3 2 5 】

別の方法、方法 6 0 において、本開示は、 g R N A が、配列番号 1 5 ~ 2 4 からなる配列に対応するスパーサー配列を含む、方法 5 7 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【 0 3 2 6 】

別の方法、方法 6 1 において、本開示は、 g R N A が、配列番号 2 0 からなる配列に対応するスパーサー配列を含む、方法 5 7 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【 0 3 2 7 】

別の方法、方法 6 2 において、本開示は、ベクターがプラスミドベクターである、方法 5 7 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【 0 3 2 8 】

別の方法、方法 6 3 において、本開示は、免疫寛容原性因子が H L A クラス I 組織適合抗原、アルファ鎖 E (H L A - E) である、方法 5 7 によって提供されたとおりの方法を提供する。

30

【 0 3 2 9 】

別の方法、方法 6 4 において、本開示は、 H L A - E をコードするヌクレオチド配列が、そのシグナルペプチドを伴わずに H L A - E に融合された B 2 M 膜タンパク質に融合された H L A - G 提示ペプチドに融合された B 2 M シグナルペプチドを含む H L A - E 三量体をコードする配列を含む、方法 6 3 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【 0 3 3 0 】

別の方法、方法 6 5 において、本開示は、 H L A - E 三量体をコードする配列が配列番号 5 5 から本質的になる、方法 6 3 によって提供されたとおりの方法を提供する。

40

【 0 3 3 1 】

別の方法、方法 6 6 において、本開示は、 H L A - E 三量体をコードする配列が外来プロモーターに作動可能に連結される、方法 6 5 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【 0 3 3 2 】

別の方法、方法 6 7 において、本開示は、外来プロモーターが C M V 、 E F 1 α 、 P G K 、 C A G 又は U B C プロモーターである、方法 6 6 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【 0 3 3 3 】

50

別の方法、方法 68 において、本開示は、RNA 誘導型ヌクレアーゼが Cas9 ヌクレアーゼである、方法 57 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0334】

別の方法、方法 69 において、本開示は、Cas9 ヌクレアーゼが少なくとも 1 つの核移行シグナルに連結される、方法 68 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0335】

別の方法、方法 70 において、本開示は、Cas9 ヌクレアーゼ及び gRNA が 1 : 3 のモル比で存在する、方法 69 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0336】

別の方法、方法 71 において、本開示は、幹細胞が胚性幹細胞、成体幹細胞、人工多能性幹細胞又は造血幹細胞である、方法 57 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0337】

別の方法、方法 72 において、本開示は、幹細胞がヒト肝細胞である、方法 57 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0338】

別の方法、方法 73 において、本開示は、ユニバーサルドナー細胞を作製するためのインビトロでの方法であって、(a) RNA 誘導型ヌクレアーゼ；(b) チオレドキシン相互作用タンパク質 (TXNIP) 遺伝子座位中の標的部位を標的化するガイド RNA (gRNA)、及び (c) 核酸であって、(i) 免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列；(ii) 標的部位の左及び 50 核酸塩基内に位置するゲノム領域と配列相同性を有するヌクレオチド配列；並びに (iii) 標的部位の右及び 50 核酸塩基内に位置するゲノム領域と配列相同性を有するヌクレオチド配列を含む核酸を含むベクター ((i) は、(ii) 及び (iii) に隣接し、且つベクターは、配列番号 34 又は 56 からなるヌクレオチド配列を含み、TXNIP 遺伝子座位は、標的部位で切断され、且つ核酸は、TXNIP 遺伝子座位に挿入され、それにより TXNIP 遺伝子を破壊する) を幹細胞に送達し、ユニバーサルドナー細胞を作製することを含み、ユニバーサルドナー細胞が対照細胞と比較して増加した免疫回避及び／又は細胞生存を有する、方法を提供する。

【0339】

別の方法、方法 73A において、本開示は、核酸が標的部位の 50 塩基対以内で TXNIP 遺伝子座位に挿入される、方法 73 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0340】

別の方法、方法 74 において、本開示は、対照細胞が、野生型細胞又は挿入される核酸を含まない細胞である、方法 73 によって提供されたとおりの組成物を提供する。

【0341】

別の方法、方法 75 において、本開示は、破壊された TXNIP 遺伝子が、TXNIP の減少又は消失した発現を有する、方法 73 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0342】

別の方法、方法 76 において、本開示は、gRNA が、配列番号 15 ~ 24 からなる配列に対応するスパーサー配列を含む、方法 73 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0343】

別の方法、方法 77 において、本開示は、gRNA が、配列番号 20 からなる配列に対応するスパーサー配列を含む、方法 73 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0344】

別の方法、方法 78 において、本開示は、ベクターがプラスミドベクターである、方法 73 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0345】

別の方法、方法 79 において、本開示は、免疫寛容原性因子が HLA クラス I 組織適合抗原、アルファ鎖 E (HLA-E) である、方法 73 によって提供されたとおりの方法を

10

20

30

40

50

提供する。

【0346】

別の方法、方法80において、本開示は、RNA誘導型ヌクレアーゼがCas9ヌクレアーゼである、方法73によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0347】

別の方法、方法81において、本開示は、Cas9ヌクレアーゼが少なくとも1つの核移行シグナルに連結される、方法80によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0348】

別の方法、方法82において、本開示は、Cas9ヌクレアーゼ及びgRNAが1:3のモル比で存在する、方法80によって提供されたとおりの方法を提供する。

10

【0349】

別の方法、方法83において、本開示は、幹細胞が胚性幹細胞、成体幹細胞、人工多能性幹細胞又は造血幹細胞である、方法73によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0350】

別の方法、方法84において、本開示は、幹細胞がヒト肝細胞である、方法73によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0351】

別の方法、方法85において、本開示は、ユニバーサルドナー細胞を作製するためのインビトロでの方法であって、(a) ベクター2ミクログロブリン(B2M)遺伝子座位中の標的部位を標的化するRNA誘導型ヌクレアーゼ及びガイドRNA(gRNA)を含む第1のリボ核タンパク質(RNP)複合体；(b) 核酸であって、(i) 第1の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列；(ii) 配列番号7から本質的になり且つB2M遺伝子座位中の標的部位の左及び50核酸塩基内に位置するゲノム領域と配列相同性を有するヌクレオチド配列；並びに(iii) 配列番号13から本質的になり且つB2M遺伝子座位中の標的部位の右及び50核酸塩基内に位置するゲノム領域と配列相同性を有するヌクレオチド配列を含む核酸を含む第1のベクター((i)は、(ii)及び(iii)に隣接し；B2M遺伝子座位は、標的部位で切断され、第1の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を含む核酸は、B2M遺伝子座位に挿入され、それによりB2M遺伝子を破壊する)；(c) チオレドキシン相互作用タンパク質(TXNIP)遺伝子座位中の標的部位を標的化するRNA誘導型ヌクレアーゼ及びgRNAを含む第2のRNP複合体；並びに(d) 核酸であって、(i) 第2の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列；(ii) 配列番号25から本質的になり且つTXNIP遺伝子座位中の標的部位の左及び50核酸塩基内に位置するゲノム領域と配列相同性を有するヌクレオチド配列；並びに(iii) 配列番号32から本質的になり且つTXNIP遺伝子座位中の標的部位の右及び50核酸塩基内に位置するゲノム領域と配列相同性を有するヌクレオチド配列を含む核酸を含む第2のベクター((i)は、(ii)及び(iii)に隣接し；TXNIP遺伝子座位は、標的部位で切断され、第2の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を含む核酸は、TXNIP遺伝子座位に挿入され、それによりTXNIP遺伝子を破壊する)を幹細胞に送達し、ユニバーサルドナー細胞を作製することを含み、ユニバーサルドナー細胞が対照細胞と比較して増加した免疫回避及び／又は細胞生存を有する、方法を提供する。

20

30

40

【0352】

別の方法、方法85Aにおいて、本開示は、(b)における核酸が標的部位の50塩基対以内のB2M遺伝子座位に挿入され、且つ／又は(d)における核酸が標的部位の50塩基対以内のTXNIP遺伝子座位に挿入される、方法85によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0353】

別の方法、方法86において、本開示は、対照細胞が、野生型細胞又は挿入される核酸を含まない細胞である、方法85によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0354】

50

別の方法、方法 87 において、本開示は、破壊された B2M 遺伝子が、B2M の減少又は消失した発現を有し、及び破壊された TXNIP 遺伝子が、TXNIP の減少又は消失した発現を有する、方法 85 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0355】

別の方法、方法 88 において、本開示は、第 1 の RNP 複合体の gRNA が、配列番号 1～3 又は 35～44 からなる配列に対応するスパーサー配列を含み、且つ第 2 の RNP 複合体の gRNA が、配列番号 15～24 からなる配列に対応するスパーサー配列を含む、方法 85 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0356】

別の方法、方法 89 において、本開示は、第 1 の RNP 複合体の gRNA が、配列番号 2 からなる配列に対応するスパーサー配列を含み、且つ第 2 の RNP 複合体の gRNA が、配列番号 20 からなる配列に対応するスパーサー配列を含む、方法 85 によって提供されたとおりの方法を提供する。

10

【0357】

別の方法、方法 90 において、本開示は、第 1 のベクターがプラスミドベクターであり、且つ第 2 のベクターがプラスミドベクターである、方法 85 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0358】

別の方法、方法 91 において、本開示は、第 1 の免疫寛容原性因子がプログラム死ーリガンド 1 (PD-L1) であり、且つ第 2 の免疫寛容原性因子が HLA クラス I 組織適合抗原、アルファ鎖 E (HLA-E) である、方法 85 によって提供されたとおりの方法を提供する。

20

【0359】

別の方法、方法 92 において、本開示は、PD-L1 をコードするヌクレオチド配列が配列番号 11 から本質的になる、方法 91 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0360】

別の方法、方法 93 において、本開示は、HLA-E をコードするヌクレオチド配列が、そのシグナルペプチドを伴わずに HLA-E に融合された B2M 膜タンパク質に融合された HLA-G 提示ペプチドに融合された B2M シグナルペプチドを含む HLA-E 三量体をコードする配列を含み、且つ HLA-E 三量体をコードする配列が配列番号 55 から本質的になる、方法 91 によって提供されたとおりの方法を提供する。

30

【0361】

別の方法、方法 94 において、本開示は、第 1 の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列が外来プロモーターに作動可能に連結され、且つ第 2 の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列が外来プロモーターに作動可能に連結される、方法 85 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0362】

別の方法、方法 95 において、本開示は、外来プロモーターが CMV、EF1 α 、PGK、CAG 又は UBC プロモーターである、方法 94 によって提供されたとおりの方法を提供する。

40

【0363】

別の方法、方法 96 において、本開示は、第 1 の RNP 複合体及び第 2 の RNP 複合体の各々が、1:3 の RNA 誘導型ヌクレアーゼと gRNA とのモル比を含む、方法 85 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0364】

別の方法、方法 97 において、本開示は、第 1 の RNP 複合体及び第 2 の RNP 複合体の各々の RNA 誘導型ヌクレアーゼが Cas9 ヌクレアーゼである、方法 85 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0365】

別の方法、方法 98 において、本開示は、Cas9 ヌクレアーゼが少なくとも 1 つの核

50

移行シグナルに連結される、方法 97 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0366】

別の方法、方法 99 において、本開示は、幹細胞が胚性幹細胞、成体幹細胞、人工多能性幹細胞又は造血幹細胞である、方法 85 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0367】

別の方法、方法 100 において、本開示は、幹細胞がヒト肝細胞である、方法 85 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0368】

別の方法、方法 101 において、本開示は、ユニバーサルドナー細胞を作製するためのインビトロでの方法であって、(a) ベクター 2 ミクログロブリン (B2M) 遺伝子座位中の標的部位を標的化する RNA 誘導型ヌクレアーゼ及びガイド RNA (gRNA) を含む第 1 のリボ核タンパク質 (RNP) 複合体；(b) 核酸であって、(i) 第 1 の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列；(ii) B2M 遺伝子座位中の標的部位の左及び 50 核酸塩基内に位置するゲノム領域と配列相同性を有するヌクレオチド配列；並びに (iii) B2M 遺伝子座位中の標的部位の右及び 50 核酸塩基内に位置するゲノム領域と配列相同性を有するヌクレオチド配列を含む核酸を含む第 1 のベクター ((i) は、(ii) 及び (iii) に隣接し、且つ第 1 のベクターは、配列番号 33 からなるヌクレオチド配列を含み；B2M 遺伝子座位は、標的部位で切断され、第 1 の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を含む核酸は、B2M 遺伝子座位に挿入され、それにより B2M 遺伝子を破壊する)；(c) チオレドキシン相互作用タンパク質 (TXNIP) 遺伝子座位中の標的部位を標的化する RNA 誘導型ヌクレアーゼ及び gRNA を含む第 2 の RNP 複合体；並びに (d) 核酸であって、(i) 第 2 の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列；(ii) TXNIP 遺伝子座位中の標的部位の左及び 50 核酸塩基内に位置するゲノム領域と配列相同性を有するヌクレオチド配列；並びに (iii) TXNIP 遺伝子座位中の標的部位の右及び 50 核酸塩基内に位置するゲノム領域と配列相同性を有するヌクレオチド配列を含む核酸を含む第 2 のベクター ((i) は、(ii) 及び (iii) に隣接し、且つ第 2 のベクターは、配列番号 34 又は 56 からなるヌクレオチド配列を含み、TXNIP 遺伝子座位は、標的部位で切断され、且つ第 2 の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を含む核酸は、TXNIP 遺伝子座位に挿入され、それにより TXNIP 遺伝子を破壊する)を幹細胞に送達し、ユニバーサルドナー細胞を作製することを含み、ユニバーサルドナー細胞が対照細胞と比較して増加した免疫回避及び／又は細胞生存を有する、方法を提供する。

【0369】

別の方法、方法 101A において、本開示は、(b) における核酸が標的部位の 50 塩基対以内の B2M 遺伝子座位に挿入され、且つ／又は (d) における核酸が標的部位の 50 塩基対以内の TXNIP 遺伝子座位に挿入される、方法 101 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0370】

別の方法、方法 102 において、本開示は、対照細胞が、野生型細胞又は挿入される核酸を含まない細胞である、方法 101 によって提供されたとおりの組成物を提供する。

【0371】

別の方法、方法 103 において、本開示は、破壊された B2M 遺伝子が、B2M の減少又は消失した発現を有し、及び破壊された TXNIP 遺伝子が、TXNIP の減少又は消失した発現を有する、方法 10 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0372】

別の方法、方法 104 において、本開示は、第 1 の RNP 複合体の gRNA が、配列番号 1～3 又は 35～44 からなる配列に対応するスパーサー配列を含み、且つ第 2 の RNP 複合体の gRNA が、配列番号 15～24 からなる配列に対応するスパーサー配列を含む、方法 101 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0373】

別の方法、方法105において、本開示は、第1のRNP複合体のgRNAが、配列番号2からなる配列に対応するスペーサー配列を含み、且つ第2のRNP複合体のgRNAが、配列番号20からなる配列に対応するスペーサー配列を含む、方法101によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0374】

別の方法、方法106において、本開示は、第1のベクターがプラスミドベクターであり、且つ第2のベクターがプラスミドベクターである、方法101によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0375】

別の方法、方法107において、本開示は、第1の免疫寛容原性因子がプログラム死ーリガンド1 (PD-L1) であり、且つ第2の免疫寛容原性因子がHLAクラスI組織適合抗原、アルファ鎖E (HLA-E) である、方法101によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0376】

別の方法、方法108において、本開示は、第1のRNP複合体及び第2のRNP複合体の各々が、1:3のRNA誘導型ヌクレアーゼとgRNAとのモル比を含む、方法101によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0377】

別の方法、方法109において、本開示は、第1のRNP複合体及び第2のRNP複合体の各々のRNA誘導型ヌクレアーゼがCas9ヌクレアーゼである、方法101によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0378】

別の方法、方法110において、本開示は、Cas9ヌクレアーゼが少なくとも1つの核移行シグナルに連結される、方法109によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0379】

別の方法、方法111において、本開示は、幹細胞が胚性幹細胞、成体幹細胞、人工多能性幹細胞又は造血幹細胞である、方法101によって提供されたとおりの組成物を提供する。

【0380】

別の方法、方法112において、本開示は、幹細胞がヒト肝細胞である、方法101によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0381】

第1のプロセス、プロセス1において、本開示は、ユニバーサルドナー細胞を作製するためのプロセスであって、(a) プログラム死ーリガンド1 (PD-L1) をコードするヌクレオチド配列を、ベクター2ミクログロブリン (B2M) をコードする遺伝子内又はその近傍に挿入することによって幹細胞を改変し、それによりPD-L1陽性細胞を作製することと；(b) PD-L1陽性細胞を濃縮することと；(c) HLAクラスI組織適合抗原、アルファ鎖E (HLA-E) をコードするヌクレオチド配列を、チオレドキシン相互作用タンパク質 (TXNIP) をコードする遺伝子内又はその近傍に挿入することによって(b)からのPD-L1陽性細胞を改変し、それによりPD-L1、HLA-E二重陽性細胞を作製することと；(d) PD-L1、HLA-E二重陽性細胞を濃縮することと；(e) PD-L1、HLA-E二重陽性細胞を選択するために単一細胞ソーティングすることと；(f) (e)からの細胞をユニバーサルドナー細胞として特徴付けることと；(g) 長期間の保管のためにユニバーサルドナー細胞を凍結させることとを含むプロセスを提供する。

【0382】

別のプロセス、プロセス2において、本開示は、(a)での改変が、(1) B2M遺伝子座位中の標的部位を標的化するRNA誘導型ヌクレアーゼ及びガイドRNA (gRNA) を含む第1のリボ核タンパク質 (RNP) 複合体、並びに(2) 核酸であって、(i) B2M遺伝子座位中の標的部位の左に位置する領域と相同なヌクレオチド配列、(ii)

P D - L 1 をコードするヌクレオチド配列、及び (i i i) B 2 M 遺伝子座位中の標的部位の右に位置する領域と相同なヌクレオチド配列を含む核酸を含む第 1 のベクター (B 2 M 遺伝子座位は、標的部位で切断され、P D - L 1 をコードするヌクレオチド配列を含む核酸は、B 2 M 遺伝子座位に挿入され、それにより B 2 M 遺伝子を破壊する) を幹細胞に送達することを含む、プロセス 1 において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【 0 3 8 3 】

別のプロセス、プロセス 2 A において、本開示は、核酸が標的部位の 5 0 塩基対以内の B 2 M 遺伝子座位に挿入される、プロセス 2 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【 0 3 8 4 】

別のプロセス、プロセス 3 において、本開示は、第 1 の R N P 複合体の R N A 誘導型ヌクレアーゼが C a s 9 ヌクレアーゼであり、且つ第 1 の R N P 複合体の g R N A が、配列番号 2 からなる標的配列に対応するスペーサー配列を含む、プロセス 2 において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【 0 3 8 5 】

別のプロセス、プロセス 4 において、本開示は、C a s 9 ヌクレアーゼが少なくとも 1 つの核移行シグナルに連結される、プロセス 3 において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【 0 3 8 6 】

別のプロセス、プロセス 5 において、本開示は、第 1 の R N P が、3 : 1 の g R N A : R N A 誘導型ヌクレアーゼのモル比を含む、プロセス 2 において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【 0 3 8 7 】

別のプロセス、プロセス 6 において、本開示は、(a) (2) (i) のヌクレオチド配列が配列番号 7 から本質的になり、且つ (a) (2) (i i i) のヌクレオチド配列が配列番号 1 3 から本質的になる、プロセス 2 において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【 0 3 8 8 】

別のプロセス、プロセス 7 において、本開示は、P D - L 1 をコードするヌクレオチド配列が配列番号 1 1 から本質的になる、プロセス 2 において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【 0 3 8 9 】

別のプロセス、プロセス 8 において、本開示は、P D - L 1 をコードするヌクレオチド配列が C A G プロモーターに作動可能に連結される、プロセス 2 において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【 0 3 9 0 】

別のプロセス、プロセス 9 において、本開示は、第 1 のベクターがプラスミドベクターであり、且つ配列番号 3 3 からなるヌクレオチド配列を含む、プロセス 2 において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【 0 3 9 1 】

別のプロセス、プロセス 1 0 において、本開示は、(a) (1) 及び (a) (2) の送達がエレクトロポレーションを含む、プロセス 2 において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【 0 3 9 2 】

別のプロセス、プロセス 1 1 において、本開示は、(b) での P D - L 1 陽性細胞の濃縮が磁気支援細胞ソーティング (M A C S) 、単一細胞クローニング、前記 P D - L 1 陽性細胞を増殖させること又はこれらの組み合わせを含む、プロセス 1 において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【 0 3 9 3 】

別のプロセス、プロセス 1 2 において、本開示は、(c) での改変が、(1) T X N I

10

20

30

40

50

P 遺伝子座位中の標的部位を標的化するRNA誘導型ヌクレアーゼ及びgRNAを含む第2のRNP複合体、並びに(2)核酸であって、(i)TXNIP遺伝子座位中の標的部位の左に位置する領域と相同なヌクレオチド配列、(ii)HLA-Eをコードするヌクレオチド配列、及び(iii)TXNIP遺伝子座位中の標的部位の右に位置する領域と相同なヌクレオチド配列を含む核酸を含む第2のベクター(TXNIP遺伝子座位は、標的部位で切断され、HLA-Eをコードするヌクレオチド配列を含む核酸は、TXNIP遺伝子座位に挿入され、それによりTXNIP遺伝子を破壊する)をPD-L1陽性細胞に送達することを含む、プロセス1において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0394】

別のプロセス、プロセス12Aにおいて、本開示は、核酸が標的部位の50塩基対以内のTXNIP遺伝子座位に挿入される、プロセス12によって提供されたとおりの方法を提供する。

10

【0395】

別のプロセス、プロセス13において、本開示は、第2のRNP複合体のRNA誘導型ヌクレアーゼがCas9ヌクレアーゼであり、且つ第2のRNP複合体のgRNAが、配列番号20からなる標的配列に対応するスペーサー配列を含む、プロセス12において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0396】

別のプロセス、プロセス14において、本開示は、Cas9ヌクレアーゼが少なくとも1つの核移行シグナルに連結される、プロセス13において提供されたとおりのプロセスを提供する。

20

【0397】

別のプロセス、プロセス15において、本開示は、第2のRNPが、3:1のgRNA:RNA誘導型ヌクレアーゼのモル比を含む、プロセス12において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0398】

別のプロセス、プロセス16において、本開示は、(c)(2)(i)のヌクレオチド配列が配列番号25から本質的になり、且つ(c)(2)(iii)のヌクレオチド配列が配列番号32から本質的になる、プロセス12において提供されたとおりのプロセスを提供する。

30

【0399】

別のプロセス、プロセス17において、本開示は、HLA-Eをコードするヌクレオチド配列が、そのシグナルペプチドを伴わずにHLA-Eに融合されたB2M膜タンパク質に融合されたHLA-G提示ペプチドに融合されたB2Mシグナルペプチドを含むHLA-E三量体をコードする配列を含む、プロセス12において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0400】

別のプロセス、プロセス18において、本開示は、HLA-E三量体をコードする配列が配列番号55から本質的になる、プロセス17において提供されたとおりのプロセスを提供する。

40

【0401】

別のプロセス、プロセス19において、本開示は、HLA-Eをコードするヌクレオチド配列がCAGプロモーターに作動可能に連結される、プロセス12において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0402】

別のプロセス、プロセス20において、本開示は、第2のベクターがプラスミドベクターであり、且つ配列番号34又は56からなるヌクレオチド配列を含む、プロセス12において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0403】

別のプロセス、プロセス21において、本開示は、(c)(1)及び(c)(2)の送

50

達がエレクトロポレーションを含む、プロセス12において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0404】

別のプロセス、プロセス22において、本開示は、(d)でのPD-L1、HLA-E二重陽性細胞の濃縮が磁気支援細胞ソーティング、単一細胞クローニング、前記PD-L1、HLA-E二重陽性細胞を増殖させること又はこれらの組み合わせを含む、プロセス請求項1において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0405】

別のプロセス、プロセス23において、本開示は、(e)での単一細胞ソーティングが蛍光活性化細胞分取(FACS)、単一細胞クローニング、前記単一細胞ソーティングされた細胞を増殖させること又はこれらの組み合わせを含む、プロセス1において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0406】

別のプロセス、プロセス24において、本開示は、(f)での特徴付けが接合状態及び／又はインデルプロファイルについてのDNA分析を含む、プロセス1において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0407】

別のプロセス、プロセス25において、本開示は、(f)での特徴付けが形態、生存能、核型分析、内毒素レベル、マイコプラズマレベル、オン／オフターゲット分析、ランダムベクター挿入、残留Cas9、残留ベクター、多能性状態、分化能又はこれらの組み合わせについての細胞分析を含む、プロセス1において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0408】

別のプロセス、プロセス26において、本開示は、(f)での特徴付け前に凍結させることをさらに含む、プロセス1において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0409】

別のプロセス、プロセス27において、本開示は、(a)において、作製されたPD-L1陽性細胞を増殖させること、(c)において、作製されたPD-L1、HLA-E二重陽性細胞を増殖させること、(e)において、選択されたPD-L1、HLA-E二重陽性細胞を増殖させること又はこれらの組み合わせをさらに含む、プロセス1において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0410】

別のプロセス、プロセス28において、本開示は、ユニバーサルドナー細胞を作製するためのプロセスであって、(a)MHC-I若しくはMHC-IIヒト白血球抗原又はMHC-I若しくはMHC-IIの構成要素若しくは転写調節因子をコードする遺伝子内又はその近傍において、第1の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を挿入することによって幹細胞を改変し、それにより第1の免疫寛容原性因子陽性細胞を作製することと；(b)第1の免疫寛容原性因子陽性細胞を濃縮することと；(c)生存因子をコードする遺伝子内又はその近傍において、第2の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を挿入することによって(b)からの第1の免疫寛容原性因子陽性細胞を改変し、それにより第1の免疫寛容原性因子陽性／第2の免疫寛容原性因子陽性細胞を作製することと；(d)第1の免疫寛容原性因子陽性／第2の免疫寛容原性因子陽性細胞を濃縮することと；(e)第1の免疫寛容原性因子陽性／第2の免疫寛容原性陽性細胞を選択するために単一細胞ソーティングすることと；(f)(e)からの細胞をユニバーサルドナー細胞として特徴付けることと；(g)長期間の保管のためにユニバーサルドナー細胞を凍結させることとを含むプロセスを提供する。

【0411】

別のプロセス、プロセス29において、本開示は、(b)での第1の免疫寛容原性因子陽性細胞の濃縮が磁気支援細胞ソーティング(MACS)、単一細胞クローニング、前記第1の免疫寛容原性因子陽性細胞を増殖させること又はこれらの組み合わせを含む、プロ

10

20

30

40

50

セス 28 において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0412】

別のプロセス、プロセス 30 において、本開示は、(d) での第 1 の免疫寛容原性因子陽性／第 2 の免疫寛容原性因子陽性細胞の濃縮が磁気支援細胞ソーティング、単一細胞クローニング、前記第 1 の免疫寛容原性因子陽性／第 2 の免疫寛容原性因子陽性細胞を増殖させること又はこれらの組み合わせを含む、プロセス 28 又は 29 において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0413】

別のプロセス、プロセス 31 において、本開示は、(a) において作製された第 1 の免疫寛容原性因子陽性細胞を増殖させること、(c) において作製された第 1 の免疫寛容原性因子陽性／第 2 の免疫寛容原性因子陽性細胞を増殖させること、(e) において選択された第 1 の免疫寛容原性因子陽性／第 2 の免疫寛容原性因子陽性細胞を増殖させること又はこれらの組み合わせをさらに含む、プロセス 28～30 のいずれか 1 つにおいて提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0414】

別のプロセス、プロセス 32 において、本開示は、(a) での改変が、(1) MHC-I 若しくは MHC-II ヒト白血球抗原又は MHC-I 若しくは MHC-II 複合体の構成要素若しくは転写調節因子遺伝子座位中の標的部位を標的化する第 1 の RNA 誘導型ヌクレアーゼ及び第 1 のガイド RNA (gRNA)、並びに (2) 第 1 の核酸であって、(i) MHC-I 若しくは MHC-II ヒト白血球抗原又は MHC-I 若しくは MHC-II 複合体の構成要素若しくは転写調節因子遺伝子座位中の標的部位の左に位置する領域と相同なヌクレオチド配列、(ii) 第 1 の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列、及び (iii) MHC-I 若しくは MHC-II ヒト白血球抗原又は MHC-I 若しくは MHC-II 複合体の構成要素若しくは転写調節因子遺伝子座位中の標的部位の右に位置する領域と相同なヌクレオチド配列を含む第 1 の核酸を含む第 1 のベクターを幹細胞に送達することを含み、MHC-I 若しくは MHC-II ヒト白血球抗原又は MHC-I 若しくは MHC-II 複合体の構成要素若しくは転写調節因子遺伝子座位が標的部位で切断され、第 1 の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を含む第 1 の核酸が、MHC-I 若しくは MHC-II ヒト白血球抗原又は MHC-I 若しくは MHC-II 複合体の構成要素若しくは転写調節因子遺伝子座位に挿入され、それにより MHC-I 若しくは MHC-II ヒト白血球抗原又は MHC-I 若しくは MHC-II 複合体の構成要素若しくは転写調節因子遺伝子を破壊する、プロセス 28～31 のいずれか 1 つにおいて提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0415】

別のプロセス、プロセス 32A において、本開示は、核酸が、標的部位の 50 塩基対以内の MHC-I 若しくは MHC-II ヒト白血球抗原又は MHC-I 若しくは MHC-II 複合体の構成要素若しくは転写調節因子遺伝子座位に挿入される、プロセス 32 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0416】

別のプロセス、プロセス 33 において、本開示は、第 1 の RNA 誘導型ヌクレアーゼ及び第 1 の gRNA が第 1 のリボ核タンパク質 (RNP) 複合体を形成する、プロセス 32 において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0417】

別のプロセス、プロセス 34 において、本開示は、(a) での改変が、(1) MHC-I 若しくは MHC-II ヒト白血球抗原又は MHC-I 若しくは MHC-II 複合体の構成要素若しくは転写調節因子遺伝子座位中の標的部位を標的化する第 1 の RNA 誘導型ヌクレアーゼ及び第 1 のガイド RNA (gRNA) を含む第 1 のリボ核タンパク質 (RNP) 複合体、並びに (2) 第 1 の核酸であって、(i) MHC-I 若しくは MHC-II ヒト白血球抗原又は MHC-I 若しくは MHC-II 複合体の構成要素若しくは転写調節因子遺伝子座位中の標的部位の左に位置する領域と相同なヌクレオチド配列、(ii) 第 1

の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列、及び (i i i) M H C - I 若しくは M H C - I I ヒト白血球抗原又は M H C - I 若しくは M H C - I I 複合体の構成要素若しくは転写調節因子遺伝子座位中の標的部位の右に位置する領域と相同なヌクレオチド配列を含む第 1 の核酸を含む第 1 のベクターを幹細胞に送達することを含み、 M H C - I 若しくは M H C - I I ヒト白血球抗原又は M H C - I 若しくは M H C - I I 複合体の構成要素若しくは転写調節因子遺伝子座位が標的部位で切断され、第 1 の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を含む第 1 の核酸が、 M H C - I 若しくは M H C - I I ヒト白血球抗原又は M H C - I 若しくは M H C - I I 複合体の構成要素若しくは転写調節因子遺伝子座位に挿入され、それにより M H C - I 若しくは M H C - I I ヒト白血球抗原又は M H C - I 若しくは M H C - I I 複合体の構成要素若しくは転写調節因子遺伝子を破壊する、

10

【 0 4 1 8 】

別のプロセス、プロセス 3 4 A において、本開示は、核酸が、標的部位の 5 0 塩基対以内の M H C - I 若しくは M H C - I I ヒト白血球抗原又は M H C - I 若しくは M H C - I I 複合体の構成要素若しくは転写調節因子遺伝子座位に挿入される、プロセス 3 4 によって提供されたとおりの方法を提供する。

【 0 4 1 9 】

別のプロセス、プロセス 3 5 において、本開示は、 M H C - I 若しくは M H C - I I ヒト白血球抗原又は M H C - I 若しくは M H C - I I 複合体の構成要素若しくは転写調節因子遺伝子が H L A - A 、 H L A - B 、 H L A - C 、 H L A - D P 、 H L A - D M 、 H L A - D O A 、 H L A - D O B 、 H L A - D Q 、 H L A - D R 、 B 2 M 、 N L R C 5 、 C I I T A 、 R F X 5 、 R F X A P 又は R F X A N K である、プロセス 2 8 ~ 3 4 のいずれか 1 つにおいて提供されたとおりのプロセスを提供する。

20

【 0 4 2 0 】

別のプロセス、プロセス 3 6 において、本開示は、 M H C - I 若しくは M H C - I I ヒト白血球抗原又は M H C - I 若しくは M H C - I I 複合体の構成要素若しくは転写調節因子遺伝子が B 2 M である、プロセス 2 8 ~ 3 5 のいずれか 1 つにおいて提供されたとおりのプロセスを提供する。

【 0 4 2 1 】

別のプロセス、プロセス 3 7 において、本開示は、 (a) (2) (i) のヌクレオチド配列が配列番号 7 から本質的になり、且つ (a) (2) (i i i) のヌクレオチド配列が配列番号 1 3 から本質的になる、プロセス 3 6 において提供されたとおりのプロセスを提供する。

30

【 0 4 2 2 】

別のプロセス、プロセス 3 8 において、本開示は、第 1 の g R N A が、配列番号 2 となる標的配列に対応するスペーサー配列を含む、プロセス 3 6 又は 3 7 において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【 0 4 2 3 】

別のプロセス、プロセス 3 9 において、本開示は、第 1 の R N A 誘導型ヌクレアーゼが C a s 9 ヌクレアーゼである、プロセス 3 2 ~ 3 8 のいずれか 1 つにおいて提供されたとおりのプロセスを提供する。

40

【 0 4 2 4 】

別のプロセス、プロセス 4 0 において、本開示は、 C a s 9 ヌクレアーゼが少なくとも 1 つの核移行シグナルに連結される、プロセス 3 9 において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【 0 4 2 5 】

別のプロセス、プロセス 4 1 において、本開示は、第 1 の R N P が、 3 : 1 の第 1 の g R N A : 第 1 の R N A 誘導型ヌクレアーゼのモル比を含む、プロセス 3 2 ~ 4 0 のいずれか 1 つにおいて提供されたとおりのプロセスを提供する。

【 0 4 2 6 】

50

別のプロセス、プロセス42において、本開示は、第1の免疫寛容原性因子がPD-L1、HLA-E、HLA-G、CTLA-4又はCD47である、プロセス28~41のいずれか1つにおいて提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0427】

別のプロセス、プロセス43において、本開示は、第1の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列が外来プロモーターに作動可能に連結される、プロセス28~42のいずれか1つにおいて提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0428】

別のプロセス、プロセス44において、本開示は、外来プロモーターがCMV、EF1 α 、PGK、CAG又はUBCプロモーターである、プロセス43において提供されたとおりのプロセスを提供する。

10

【0429】

別のプロセス、プロセス45において、本開示は、第1の免疫寛容原性因子がPD-L1である、プロセス28~44のいずれか1つにおいて提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0430】

別のプロセス、プロセス46において、本開示は、PD-L1をコードするヌクレオチド配列が配列番号11から本質的になる、プロセス45において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0431】

別のプロセス、プロセス47において、本開示は、PD-L1をコードするヌクレオチド配列がCAGプロモーターに作動可能に連結される、プロセス46において提供されたとおりのプロセスを提供する。

20

【0432】

別のプロセス、プロセス48において、本開示は、第1のベクターが、配列番号33からなるヌクレオチド配列を含む、プロセス45~47のいずれか1つにおいて提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0433】

別のプロセス、プロセス49において、本開示は、(c)での改変が、(1)生存因子遺伝子座位中の標的部位を標的化する第2のRNA誘導型ヌクレアーゼ及び第2のガイドRNA(gRNA)、並びに(2)第2の核酸であって、(i)生存因子遺伝子座位中の標的部位の左に位置する領域と相同なヌクレオチド配列、(ii)第2の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列、及び(iii)生存因子遺伝子座位中の標的部位の右に位置する領域と相同なヌクレオチド配列を含む第2の核酸を含む第2のベクター(生存因子遺伝子座位は、標的部位で切断され、第2の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を含む第2の核酸は、生存因子遺伝子座位に挿入され、それにより生存因子遺伝子を破壊する)を幹細胞に送達することを含む、プロセス28~48のいずれか1つにおいて提供されたとおりのプロセスを提供する。

30

【0434】

別のプロセス、プロセス49Aにおいて、本開示は、核酸が標的部位の50塩基対以内の生存因子遺伝子座位に挿入される、プロセス49によって提供されたとおりの方法を提供する。

40

【0435】

別のプロセス、プロセス50において、本開示は、第2のRNA誘導型ヌクレアーゼ及び第2のgRNAが第2のリボ核タンパク質(RNP)複合体を形成する、プロセス49において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0436】

別のプロセス、プロセス51において、本開示は、(c)での改変が、(1)生存因子遺伝子座位中の標的部位を標的化する第2のRNA誘導型ヌクレアーゼ及び第2のガイドRNA(gRNA)を含む第2のリボ核タンパク質(RNP)複合体、並びに(2)第2

50

の核酸であって、(i) 生存因子遺伝子座位中の標的部位の左に位置する領域と相同なヌクレオチド配列、(ii) 第2の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列、及び(iii) 第2の生存因子遺伝子座位中の標的部位の右に位置する領域と相同なヌクレオチド配列を含む第2の核酸を含む第2のベクター（生存因子遺伝子座位は、標的部位で切断され、第2の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を含む第2の核酸は、生存因子遺伝子座位に挿入され、それにより生存因子遺伝子を破壊する）を第1の免疫寛容原性因子陽性細胞に送達することを含む、プロセス28～48のいずれか1つにおいて提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0437】

別のプロセス、プロセス51Aにおいて、本開示は、核酸が標的部位の50塩基対以内の生存因子遺伝子座位に挿入される、プロセス51によって提供されたとおりの方法を提供する。

【0438】

別のプロセス、プロセス52において、本開示は、生存遺伝子がTXNIP、ZNF143、FOXO1、JNK又はMANFである、プロセス28～51のいずれか1つにおいて提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0439】

別のプロセス、プロセス53において、本開示は、生存遺伝子がTXNIPである、プロセス52において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0440】

別のプロセス、プロセス54において、本開示は、第2のgRNAが、配列番号20からなる標的配列に対応するスペーサー配列を含む、プロセス53において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0441】

別のプロセス、プロセス55において、本開示は、(c)(2)(i)のヌクレオチド配列が配列番号25から本質的になり、且つ(c)(2)(iii)のヌクレオチド配列が配列番号32から本質的になる、プロセス52又は53において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0442】

別のプロセス、プロセス56において、本開示は、第2のRNA誘導型ヌクレアーゼがCas9ヌクレアーゼである、プロセス49～55のいずれか1つにおいて提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0443】

別のプロセス、プロセス57において、本開示は、Cas9ヌクレアーゼが少なくとも1つの核移行シグナルに連結される、プロセス56において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0444】

別のプロセス、プロセス58において、本開示は、第2のRNPが、3:1の第2のgRNA:第2のRNA誘導型ヌクレアーゼのモル比を含む、プロセス49～57のいずれか1つにおいて提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0445】

別のプロセス、プロセス59において、本開示は、第2の免疫寛容原性因子がPD-L1、HLA-E、HLA-G、CTLA-4又はCD47である、プロセス49～58のいずれか1つにおいて提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0446】

別のプロセス、プロセス60において、本開示は、第2の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列が外来プロモーターに作動可能に連結される、プロセス28～59のいずれか1つにおいて提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0447】

別のプロセス、プロセス61において、本開示は、外来プロモーターがCMV、EF1

10

20

30

40

50

α、PGK、CAG又はUBCプロモーターである、プロセス60において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0448】

別のプロセス、プロセス62において、本開示は、第2の免疫寛容原性因子がHLA-Eである、プロセス28～61のいずれか1つにおいて提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0449】

別のプロセス、プロセス63において、本開示は、HLA-Eをコードするヌクレオチド配列が、そのシグナルペプチドを伴わずにHLA-Eに融合されたB2M膜タンパク質に融合されたHLA-G提示ペプチドに融合されたB2Mシグナルペプチドを含むHLA-E三量体をコードする配列を含む、プロセス62において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0450】

別のプロセス、プロセス64において、本開示は、HLA-E三量体をコードする配列が配列番号55から本質的になる、プロセス63において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0451】

別のプロセス、プロセス65において、本開示は、HLA-Eをコードするヌクレオチド配列がCAGプロモーターに作動可能に連結される、プロセス63又は64において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0452】

別のプロセス、プロセス66において、本開示は、第2のベクターが、配列番号34又は56からなるヌクレオチド配列を含む、プロセス62～65のいずれか1つにおいて提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0453】

別のプロセス、プロセス67において、本開示は、(e)での単一細胞ソーティングが蛍光活性化細胞分取(FACS)、単一細胞クローニング、前記単一細胞ソーティングされた細胞を増殖させること又はこれらの組み合わせを含む、プロセス28～66のいずれか1つにおいて提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0454】

別のプロセス、プロセス68において、本開示は、(f)での特徴付けが接合状態及び／又はインデルプロファイルについてのDNA分析を含む、プロセス28～67のいずれか1つにおいて提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0455】

別のプロセス、プロセス69において、本開示は、(f)での特徴付けが形態、生存能、核型分析、内毒素レベル、マイコプラズマレベル、オン／オフターゲット分析、ランダムベクター挿入、残留Cas9、残留ベクター、多能性状態、分化能又はこれらの組み合わせについての細胞分析を含む、プロセス28～68において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【0456】

別のプロセス、プロセス70において、本開示は、(f)での特徴付け前に凍結させることをさらに含む、プロセス28～69において提供されたとおりのプロセスを提供する。

【実施例】

【0457】

下の実施例は、本開示による特定のユニバーサルドナー細胞の作製及び特徴付けを記載する。

【0458】

実施例1：細胞維持及び増殖

hESC／hiPSCの維持。ヒト胚性幹細胞株CyT49（専売のhES細胞株、V

10

20

30

40

50

iaCyte, Inc.、San Diego, CA) の細胞は、Schulz et al. (2012) PLoS ONE 7 (5) : e37004 において記載されるとおりに維持され、培養され、継代され、増殖され、且つ蒔かれた。CyT49細胞は、ACCUTASE (登録商標) (Stemcell Technologies 07920 又は等価物) を使用して解離された。

【0459】

TC1133細胞株 (Lonza) などのヒト人工多能性幹細胞 (hiPSC) は、BIOLAMININ 521 CTG (BioLamina Cat#CT521) でコーティングされた組織培養プレート上でStemFlex Complete (Life Technologies、A3349401) 中において維持された。プレートは、DPBS中のBIOLAMININ、カルシウム、マグネシウム (Life Technologies、14040133) の1:10又は1:20希釈物により37℃で2時間予めコーティングされた。細胞はStemFlex培地を毎日供給された。細胞の継代に関して、CyT49のためのものと同じ細胞密度が使用された。単一細胞として細胞を播種するために、細胞は、BIOLAMININでコーティングされたプレート上でStemFlex中において1% RevitaCell (商標) 補給物 (100×) (ThermoFisher Cat#A2644501) とともに播種された。

【0460】

hiPSCの単一細胞クローニング。単一細胞クローニングのために、hiPSC (hESC又はhiPSC) は、ACCUTASE (登録商標) による解離の3~4時間前にRevitacell (1×Revitacellの最終濃度) とともにStemFlex Completeを供給された。解離後、細胞は、BIOLAMININでコーティングされた96ウェル組織培養プレートの1ウェル当たり単一細胞としてソーティングされた。WOLF FACSソーター (Nanocelllect) を使用して、単一細胞をウェルにソーティングした。プレートは、Revitacellとともに100~200µLのStemFlex Completeで予め充填された。細胞播種の3日後、細胞は、新鮮なStemFlexを供給され、100~200µLの培地が1日おきに供給され続けた。増殖の10日後、細胞は、12~14日目までStemFlexを毎日供給された。この時点で、プレートはACCUTASE (登録商標) で解離され、回収された細胞懸濁液は、1:2に分割され、半分は維持のために新しい96ウェルプレートに入れられ、半分はDNA抽出溶液QuickExtract (商標) DNA抽出溶液 (Lucigen) に入れられた。DNA抽出後、PCRを実施して、標的化されたDNA座位での所望の遺伝子編集の有無を評価した。サンガー配列決定を使用して所望の編集を検証した。

【0461】

単一細胞に由来するhiPSCクローンの増殖。CyT49 (ViaCyte) に関して、順調に標的化されたクローンは、純粋な10% XF KSR A10H10培地を含む24ウェルプレートであるがBIOLAMININでコーティングされたプレート上に継代された。24ウェルの段階後、CyT49クローンは、Schulz et al. (2012) PLoS ONE 7 (5) : e37004 において記載されるとおりに継代された。

【0462】

hiPSC (TC1133) に関して、細胞は、クローニング及び継代段階でのRevitacellを含むBIOLAMININでコーティングされたプレート上での定期的な維持プロセス全体にわたってStemFlex Complete中で維持された。

【0463】

実施例2: B2Mノックアウト (KO) ヒト多能性幹細胞 (hiPSC) の作製

hiPSC中のB2MのためのガイドRNA (gRNA) 選択。3つのB2M標的化gRNAは、B2Mコード配列のエクソン1を標的化するために設計された。これらのgRNAは、gRNA設計ソフトウェアを使用して配列相同性予測に基づいて予測される低いオフターゲットスコアを有した。gRNAの標的配列は、表1において示される。gRNA

は、標的DNA配列に対応するRNA配列を含む。

【0464】

【表1】

表 1. B2M gRNA 標的配列

名称	標的配列 (5'-3')	配列番号	PAM
B2M-1 gRNA (エクソン 1_T12)	GCTACTCTCTCTTTCTGGCC	1	TGG
B2M-2 gRNA (エクソン 1_T2)	GGCCGAGATGTCTCGCTCCG	2	TGG
B2M-3 gRNA (エクソン 1_T8)	CGCGAGCACAGCTAAGGCCA	3	CGG
エクソン 1_T1	TATAAGTGGAGGCGTCGCGC	35	TGG
エクソン 1_T3	GAGTAGCGCGAGCACAGCTA	36	AGG
エクソン 1_T4	ACTGGACGCGTCGCGCTGGC	37	GGG
エクソン 1_T5	AAGTGGAGGCGTCGCGCTGG	38	CGG
エクソン 1_T6	GGCCACGGAGCGAGACATCT	39	CGG
エクソン 1_T7	GCCCGAATGCTGTCAGCTTC	40	AGG
エクソン 1_T9	CTCGCGCTACTCTCTTTTC	41	TGG
エクソン 1_T10	TCCTGAAGCTGACAGCATT	42	GGG
エクソン 1_T11	TTCCTGAAGCTGACAGCATT	43	CGG
エクソン 1_T13	ACTCTCTCTTTCTGGCCTGG	44	AGG

10

20

30

【0465】

hPSCにおけるそれらの切断効率を評価するために、CyT49細胞（ViaCyte 専売のhES細胞株）は、125 pmol Cas9及び375 pmol gRNAの絶対値を有する3:1（gRNA:Cas9）のモル比のCas9タンパク質（Biomay）及びガイドRNA（Synthego）（gRNA配列については表3を参照のこと）のリボ核タンパク質（RNP）混合物とともにNeonエレクトロポレーター（Neonトランスフェクションシステム ThermoFisher Cat#MPK5000）を使用して電気穿孔された。RNP複合体を形成するために、gRNA及びCas9を、R-緩衝液（Neonトランスフェクションシステム 100 µLキット ThermoFisher Cat#MPK10096）を含む1つの容器中で合わせて、25 µLの合計体積にし、室温で15分間インキュベートした。細胞は、ACCUTASE（登録商標）を使用して解離され、続いてDMEM/F12培地（Gibco、cat#11320033）中で再懸濁され、NC-200（Chemometec）を使用して計数され、遠心分離された。合計で 1×10^6 個の細胞がRNP複合体とともに再懸濁され、R-緩衝液が加えられて、125 µLの合計体積になった。次に、この混合物は、1100 Vにおいて30秒間2パルスで電気穿孔された。エレクトロポレーション後、細胞は、RevitaCellを含むStemFlex培地で充填されたEppendorfチューブにピペットで移された。次に、この細胞懸濁液は、1:20の希釈度のBIOLAM ININ 521 CTGで予めコーティングされた組織培養ディッシュに播種された。細胞は、正常酸素圧インキュベーター（37℃、8% CO₂）中で48時間培養された

40

50

。48時間後、ゲノムDNAは、QuickExtract (Lucigen、Middleton、WI; Cat#QE09050)を使用して細胞から収集された。

【0466】

標的B2M配列のためのPCRが実施され、得られた増幅DNAは、TIDE分析によって切断効率について評価された。関連している領域のためのPCRは、Platinum Taq Supermix (Invitrogen、cat#125320176及びCat#11495017)を使用して実施された。PCRプライマーの配列は表2に示され；サイクル条件は表3において提供される。

【0467】

【表2】

10

表2. B2M TIDE プライマー

名称	種類	配列 (5'-3')	配列番号
B2MF2	フォワード	CAGACAGCAAACCTCACCCAG	4
B2MR2	リバーズ	AAACTTTGTCCCGACCCCTCC	5

【0468】

【表3】

20

表3. B2M PCR サイクルパラメーター

工程	温度	時間	サイクル数
変性	94°C	2分	1
変性	94°C	15秒	38
アニーリング	55°C	30秒	
伸長	68°C	45秒	
伸長反応	68°C	5分	1
保持	4	保持	

30

【0469】

得られた増幅産物をPCR精製及びサンガー配列決定にかけた。サンガー配列決定の結果は、ガイド配列とともにTsunamiソフトウェアに入力された。インデルのパーセンテージ及び同一性は、ソフトウェアによって計算された。次に、特定のgRNAがhPSCにおけるそれらのインデル頻度に基づいて選択された。図1は、B2M-1、B2M-2及びB2M-3 gRNAの切断効率を示す。

40

【0470】

選択されたgRNAのオフターゲットは、配列類似性が予測される部位のハイブリッド捕捉分析を使用して幹細胞に由来するDNAにおいて評価された。B2M-2及びB2M-3ガイドは、検出可能なオフターゲット作用を示さなかった。B2M-2 gRNAは、その高いオンターゲット活性及び検出不可能なオフターゲット活性に起因してさらなるクローン作製について選択された。

【0471】

B2M KO hPSCクローン作製及び特徴付け。B2M-2 gRNAを使用して、CyT49 hESC (ViaCyte) は電気穿孔され、エレクトロポレーションの3日後、WOLF FACSソーター (Nanocelllect) を使用してStem

50

Flex及びRevitacellを含むBIOLAMININ 521 CTGでコーティングされた96ウェルプレートに単一細胞ソーティングされた。播種された単一細胞を、コロニーが単一細胞として再播種されるほど大きくなるまで、1日おきに培地を交換しながら正常酸素圧インキュベーター（37℃、8%CO₂）中で増殖させた。コンフルエントになったとき、試料を、維持及びゲノムDNA抽出のために分割した。

【0472】

クローンのB2M KO状態は、PCR及びサンガー配列決定を介して確認された。標的B2M領域の得られたDNA配列は、インデル同一性及び接合状態を決定するためにSnappeneソフトウェアにおいて整列された。所望の編集を有するクローンが増殖され、B2M発現についてのフローサイトメトリー評価を介してさらに検証された（利用される抗体のリストについては表4を参照のこと）。クローンは、インターフェローンガンマ処理の有無で評価された（25 ng/mL、R&D Systems、285-IF）。図2Aは、野生型細胞におけるB2M発現を示し、図2Bは、B2M KO細胞におけるB2M発現を示す。クローンの核型状態は、Cell Line Geneticsサービス（Madison、WI）を介して評価され、正常な核型が報告された。

【0473】

【表4】

表4. 多能性フローサイトメトリーのための抗体

抗原	クローン	フルオロフォア	製造業者	カタログ #
Oct3/4	40/3	Alexa 647	BD Bioscience	560329
SOX2	030-678	PE	BD Bioscience	562195
B2M	2M2	PE	Biolegend	316305
HLA-ABC	W6/32	Alexa 488	Biolegend	311415
mIgG1 カップ	N/A	PE	BD Bioscience	555749
PD-L1	B7-H1	Alexa-488	ThermoFisher	53-5983-42
HLA-E	3D12	PE	ThermoFisher	12-9953-42

【0474】

クローンは、多能性マーカーOCT4及びSOX2のための細胞内フローサイトメトリーにより多能性を保持することが確認された。確認された多能性クローンは、以前に確立された方法（Schulze et al. (2012) PLoS ONE 7(5): e37004）を使用して脾臓内分泌性前駆細胞に分化された。

【0475】

実施例3：B2M KO／PD-L1ノックイン（KI）ヒト多能性幹細胞（hPSC）の作製

B2M-KO／PD-L1 KI戦略の設計。PD-L1（CD274）をB2M座位に挿入するためのプラスミド設計は、B2Mの開始コドンが、相同組換え修復（HDR）を経た後に除去されて、PD-L1を挿入して、部分的なB2M発現の機会を無効にするようになされた。図3は、プラスミドの模式図を示し、表5はその中の要素及び位置を特定する。ドナープラスミドは、エクソン1の周りのB2M座位と同一な配列を有する800塩基対ホモロジーアームに隣接するPD-L1のCAGGSプロモーター駆動cDNAを含有した。プラスミドの完全な配列は、配列番号33を含む。

【0476】

10

20

30

40

50

【表 5】

表 5. B2M-CAGGS-PD-L1 ドナープラスミドの要素

要素	位置 (bp 単位のサイズ)	配列番号
左 ITR	1-130 (130)	6
LHA-B2M	145-944 (800)	7
CMV エンハンサー	973-1352 (380)	8
ニワトリ β -アクチンプロモーター	1355-1630 (276)	9
キメライントロン	1631-2639 (1009)	10
PD-L1	2684-3556 (873)	11
bGH ポリ(A)シグナル	3574-3798 (225)	12
RHA-B2M	3805-4604 (800)	13
右 ITR	4646-4786 (141)	14
プラスミド全体	7133 bp	33

【0477】

B2M-2 gRNA は、標的化された B2M 座位での PD-L1 導入遺伝子の挿入を容易にするために使用された。PD-L1 ドナープラスミドは、B2M 標的化 gRNA 及び Cas9 タンパク質で構成される RNP 複合体とともに導入された。100 万個の CyT49 細胞 (ViaCyte) 当たり、4 μ g のプラスミド DNA が RNP とともに送達された。エレクトロポレーションは、実施例 2 において記載されるとおりに実施された。エレクトロポレーションの 7 日後、細胞は、WOLF FACS-ソーター (Nanocelllect) を使用して、PD-L1 表面発現について Revitacell とともに StemFlex を含む BIO LAMININ 521 CTG でコーティングされた 96 ウェルプレートにソーティングされた。FACS-ソーティングに関して、未編集の細胞は、陰性対照として機能した。PD-L1 陽性細胞は、ソーティング及び単一細胞クローニングのために選択された。

【0478】

PD-L1 表面発現を検出するために、抗 PD-L1 蛍光抗体が使用された (表 4 を参照のこと)。播種された単一細胞を、コロニーが単一細胞として再播種されるほど大きくなるまで、1 日おきに培地を交換しながら正常酸素圧インキュベーター (37°C、8% CO₂) 中で増殖させた。コンフルエントになったとき、試料を、維持及びゲノム DNA 抽出のために分割した。

【0479】

正確に標的化されたクローンは、プラスミドのホモロジーアームの外側から PD-L1 cDNA 挿入物までの領域を増幅するプライマーを使用して、PD-L1 ノックイン (KI) 挿入物のために KI 組込み DNA のみの増幅を可能にする PCR を介して同定された。オンターゲット挿入物は、PCR によって接合状態について試験されて、KI がヘテロ接合性又はホモ接合性様式において生じたかどうかの評価された。ヘテロ接合性クローンが同定された場合、KI 陰性アレルをサンガー配列決定に送って、それが非 KI アレルにおいて B2M-破壊インデルを含有したことを検証した。完全な B2M 破壊を伴う正確な KI クローン (KI 挿入物又はインデル形成のいずれかによる) は、3000 万個の細胞の集団サイズに達するまで、増加性の組織培養形式において増殖された。およそ 10 個のクローンがこの様式で増殖され、細胞内フローサイトメトリーを介して OCT4 及び SO

X2について試験することによって多能性であると確認された(図4)。次に、上の試験を通過したクローンは、下記のと通りの核型分析(Cell Line Genetics)についてさらに試験された。さらに、クローンは、下記のと通りの確立されたプロトコル(Schulz et al., (2012) PLoS ONE 7(5):e37004)を介して脾臓内胚葉前駆細胞(PEC)に分化するそれらの能力について試験された。B2Mの消失は、フローサイトメトリーを介してインターフェロン-ガンマ処理(25 ng/mL、R&D Systems、285-IF)の有無におけるB2Mの発現の欠如によってさらに確認された。図5A及び5Bは、それぞれ野生型及びB2M KO/PD-L1 KI細胞におけるPD-L1発現を示す。

【0480】

実施例4：編集されたクローンの核型分析

編集された胚性幹(ES)細胞のG-バンド核型分析。100万個の編集されたES細胞は、培養培地(DMEM/F12+10% XenoフリーKSRと10 ng/mLアクチビン及び10 ng/mLヘレグリン)を含むT-25培養フラスコ中に継代された。一晚培養した後、3つのT25培養フラスコは、核型分析；染色体1、12、17、20のためのFISH分析；及び標準的な8×60Kアレイによるアレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション(aCGH)分析のために細胞遺伝学研究室(Cell Line Genetics, Inc.)に送られた。非切断ガイド(「NCG」)、B2M KOクローン及びB2M KO/PD-L1 KIクローン(「V1-A」)とともに電気穿孔された、選択された細胞のG-バンディング結果は、表6において示される。

【0481】

【表6】

表6. G-バンド核型分析結果

細胞株	種類	継代	核型分析	FISH分析	aCGHアレイ分析
NCG#1	非切断ガイド	P36	正常	正常	通過
NCG#2	非切断ガイド	P36	正常	正常	通過
B2M KO#1	B2M KO	P38	正常	正常	通過
B2M KO#2	B2M KO	P36	正常	正常	通過
B2M KO#3	B2M KO	P36	正常	正常	通過
V1-A003	B2M KO/PD-L1 KI	P37	正常	正常	通過
V1-A004	B2M KO/PD-L1 KI	P38	正常	正常	通過
V1-A007	B2M KO/PD-L1 KI	P37	正常	正常	通過
V1-A008	B2M KO/PD-L1 KI	P38	正常	正常	通過

【0482】

実施例5：編集されたヒト胚性幹細胞の脾臓内胚葉細胞(PEC)への分化

編集されたヒト胚性幹細胞(ES)の維持。様々な継代数(P38~42)の編集されたヒト胚性幹細胞は、hESM培地(DMEM/F12+10% KSR+ 10 ng/mLアクチビンA及び10 ng/mLヘレグリン)及び最終10%のヒトAB血清とともに、4日間の継代のために33,000細胞/cm²又は3日間の継代のために50,000細胞/cm²で播種された。

【0483】

PEC分化のための編集されたヒト胚性幹細胞の凝集。編集されたESは、ACCUTASE(登録商標)で単一細胞に解離され、続いて遠心分離され、1mL当たり100万

個の細胞でDMEM／F12培地中の2% StemPro (Cat# A1000701、Invitrogen、CA) 中において再懸濁され、合計で350～400万個の細胞が、8RPM±0.5RPMの回転速度により1つの850cm²のローターボトル (Cat# 431198、Corning、NY) 中に分化前の18～20時間播種された。編集されたヒト胚性幹細胞に由来するES凝集物は、Schulz et al. (2012) PLoS ONE 7 (5) : e37004 において記載されるとおりローターボトルを使用して脾臓系列に分化した。

【0484】

実施例6：分化した脾臓内胚葉細胞 (PEC) の特徴付け

段階1 (DE) のFOXA2及びSOX17並びにPEC段階のCHGA、PDX1及びNKX6.1のためのフローサイトメトリー。hESCに由来する段階1の凝集物又はhESCに由来する脾性凝集物を、PBSで洗浄し、続いてACCUMAX (商標) (カタログ# A7089、Sigma、MO) を使用して37℃で酵素的に解離して、単細胞懸濁液にした。MACS分離緩衝液 (Cat# 130-091-221、Miltenyi Biotec、North Rhine-Westphalia、Germany) を加え、懸濁液を、40µmフィルターに通過させ、ペレットにした。細胞内マーカーの染色のために、細胞を、4% (wt/v) パラホルムアルデヒド中で30分間固定し、FACS緩衝液 (PBS、0.1% (wt/v) BSA、0.1% (wt/v) NaN₃) 中で洗浄し、続いて細胞を、氷上でPerm緩衝液 (PBS、0.2% (v/v) Triton X-100 (Cat# A16046、Alfa Aesar、MA)、5% (v/v) 正常ロバ血清、0.1% (wt/v) NaN₃) により30分間透過処理し、続いて洗浄緩衝液 (PBS、1% (wt/v) BSA、0.1% (wt/v) NaN₃) で洗浄した。細胞を、ブロック緩衝液 (PBS、0.1% (v/v)、Triton X-100、5% (v/v) 正常ロバ血清、0.1% (wt/v) NaN₃) で希釈された一次抗体 (表7) と4℃で一晩インキュベートした。細胞を、IC緩衝液中で洗浄し、続いて適切な二次抗体と4℃で60分間インキュベートした。細胞をIC緩衝液中で洗浄し、続いてFACS緩衝液中で洗浄した。フローサイトメトリーデータは、NovoCyteフローサイトメーター (ACEA Biosciences、Brussels) により得られた。データは、FlowJoソフトウェア (Tree Star, Inc.) を使用して分析された。無処置の細胞は、前方 (低角度) 及び側方 (直交性、90°) 光散乱に基づいて同定された。バックグラウンドは、抗体対照及び未分化細胞を使用して推定された。図面において、代表的なフローサイトメトリープロットは、亜集団の1つについて示される。図面において報告される数は、無処置の細胞ゲートからの全細胞のパーセンテージを表す。

【0485】

【表7】

表7. 分化PECの特徴付けのためのフローサイトメトリー用の抗体

抗原	フルオロフォア	供給元	希釈度
SOX17	AF647	BD Bioscience (Cat#562594)	1:50
FOXA2	PE	Miltenyi Biotechnology (Cat#130-107-773)	1:10
PDX1	PE	BD Bioscience (Cat#562161)	1:2.5
NKX6.1	AF647	BD Bioscience (Cat#563338)	1:2.5
CHGA	AF405	Novus (Cat#NBP2-33198AF405)	1:1000

10

20

30

40

50

【0486】

DE段階では、FOXA2及びSOX17二重陽性細胞の集団は、CyT49野生型分化細胞の全細胞の90%を超えた。PD-L1 KI/B2M KO及びB2M KO細胞は、野生型細胞と比較して同等のDEのパーセンテージを示した(図6及び図7)。

【0487】

PEC段階では、クロモグラニン(CHGA)、PDX1及びNKX6.1のためのフローサイトメトリーが実施された。PEC段階の不均一な集団は、膵臓前駆細胞及び初期内分泌を含む(図8)。不均一な集団の円グラフから(図9)、分化した編集細胞(PD-L1 KI/B2M KO又はB2M KO)の細胞集団の分布は、野生型細胞と非常に類似していた。

【0488】

ターゲットRNAseq。遺伝子発現分析のためのターゲットRNAseqは、Illumina TruSeq及び111個の遺伝子を標的化するオリゴのカスタムパネルを使用して実施された。パネルは主に、膵臓分化中の発生段階のマーカーである遺伝子を含む。各分化段階の最後において、10µLのAPV(凝集したペレットの体積)が回収され、オンカラムデオキシリボヌクレアーゼ処理を含む、Qiagen RNeasy又はRNeasy 96スピンカラムプロトコルを使用して抽出された。定量化及び品質管理は、Qubitと合わせたTapeStation又はQiagen QIAxcelのいずれかを使用して実施された。50~200ngのRNAは、Qubitと合わせたTapeStation又はQiagen QIAxcelのいずれかを使用する得られたdsDNAライブラリーの定量化及び品質管理の前に、cDNA合成、カスタムオリゴプールのハイブリダイゼーション、結合オリゴの洗浄、伸長、ライゲーション、ライブラリーのPCR増幅及びライブラリーの精製からなるIllumina TruSeqライブラリー調製プロトコルに従って処理された。その後、ライブラリーは、4nMの濃度に希釈され、プールされた後、変性、PhiX対照のスパイクイン及びIllumina MiSeqシーケンサー上への添加の前に10~12pMへのさらなる希釈が行われた。配列決定の実行後、最初のデータ分析は、BaseSpaceにより自動的に実施され、カスタムプローブの各々についての生のリードカウントを生成した。次に、各遺伝子に関して、これらのリードカウントは、1つのリードカウントを加えることにより(0による下流の除算を防ぐため)その遺伝子に対応する全てのプローブについて合計された。正規化は遺伝子SF3B2に対して実施され、リードは、通常、段階0に対する倍率変化として可視化された。データが主要な成分分析のために処理されたとき、正規化は、DEseq法を使用して実施された。

【0489】

選択された遺伝子発現は、図10において示された。PD-L1 KI/B2M KO又はB2M KO細胞からのFOXA2、CHGA、PDX1及びNKX6.1の動的発現パターンは、野生型細胞と同様であった。

【0490】

PEC段階でのB2M及びPD-L1発現の確認。PEC段階では、分化した凝集物は、インターフェロナーガンマ(50ng/ml)の有無で48時間処理された。凝集物を、PBSで洗浄し、続いてACCUMAX(商標)(カタログ#A7089、Sigma、MO)を使用して37℃で酵素的に解離して、単一細胞懸濁液にした。MACS分離緩衝液(Cat#130-091-221、Miltenyi Biotec、North Rhine-Westphalia、Germany)を加え、懸濁液を、40µmフィルターに通過させ、ペレットにした。表面マーカーの染色のために、解離した細胞を、MACS分離緩衝液中に希釈された蛍光コンジュゲート抗体とともに20分間インキュベートし、続いてMACS分離緩衝液中で洗浄した。細胞を、フロー取得のためにFACS緩衝液中で再懸濁した。フローサイトメトリーデータは、NovoCyteフローサイトメーターにより得られた。図11A~11Fで示されるとおり、B2M発現は、B2M KO(図11B)又はPD-L1 KI/B2M KO(図11C)に由来する分化したP

10

20

30

40

50

ECにおいて検出限界未満であり、且つPD-L1は、PD-L1 KI/B2M KO (図11F)に由来する分化したPECにおいて発現された。一般に、PECの約90%超はPD-L1を発現し、細胞の同種集団を示した。多くの場合、遺伝子編集された幹細胞の分化後に経時的な導入遺伝子発現の消失がある (Hong et al., Mol. Ther., 2017, 25 (1): 44-53)。

【0491】

PEC細胞の免疫表現型。PEC段階では、分化した凝集物は、インターフェロン-ガンマ (50 ng/ml) の有無で48時間処理された。凝集物は、MHCクラスI及びI染色のために収集された。野生型又は編集された細胞 (PD-L1 KI/B2M KO及びB2M KO) に由来するPEC段階でMHCクラスIの発現はなかった (図12D~12F)。HLA-ABC (MHCクラスI) の発現は低く (野生型から1.3%)、それは、IFN-γ刺激時に高度に調節された。しかしながら、HLA-ABCは、編集された細胞 (PD-L1 KI/B2M KO及びB2M KO) においてIFN-γ刺激下でさえ発現しなかった (図12A~12C)。

【0492】

実施例7: TXNIP KOヒト多能性幹細胞 (hPSC) の作製

TXNIPのためのガイドRNA (gRNA) 選択。10個のTXNIP標的化gRNAは、TXNIPコード配列のエクソン1及びエクソン2を標的化するために設計された (表8)。PAM配列は、表8に示される標的配列において太字フォントで示され、ガイド配列に対応するDNA配列は、表8に示される。これらのgRNAは、gRNA設計ソフトウェアを使用して配列相同性予測に基づいて予測される低いオフターゲットスコアを有した。

【0493】

【表8】

表8. 選択されたTXNIP 標的配列及びgRNA 配列

名称	標的配列 (5'-3') (太字の PAM 配列)	配列 番号	ガイド配列 (5'-3') の DNA バージョン	配列 番号
TXNIP_エクソン 1_T1	GAAGCGTGTCTTCATA GCGC AGG	45	GAAGCGTGTCTTCATA GCGC	15
TXNIP_エクソン 1_T21	TTACTCGTGTCAAAGCC GTT AGG	46	TTACTCGTGTCAAAGC CGTT	16
TXNIP_エクソン 1_T22	TGTCAAAGCCGTTAGG ATCCT TGG	47	TGTCAAAGCCGTTAGG ATCC	17
TXNIP_エクソン 1_T23	GCCGTTAGGATCCTGG CTTG CGG	48	GCCGTTAGGATCCTGG CTTG	18
TXNIP_エクソン 1_T25	GCGGAGTGGCTAAAGT GCTT TGG	49	GCGGAGTGGCTAAAGT GCTT	19
TXNIP_エクソン 1_T5	TCCGCAAGCCAGGATC CTA ACGG	50	TCCGCAAGCCAGGATC CTAA	20
TXNIP_エクソン 2_T4	GTTCGGCTTTGAGCTTC CTC AGG	51	GTTCGGCTTTGAGCTT CCTC	21
TXNIP_エクソン 2_T2	GAGATGGTGATCATGA GACCT TGG	52	GAGATGGTGATCATGA GACC	22
TXNIP_エクソン 2_T1	TTGTACTCATATTTGTT TCC AGG	53	TTGTACTCATATTTGTT TCC	23
TXNIP_エクソン 2_T3	AACAAATATGAGTACA AGTTC GG	54	AACAAATATGAGTACA AGTT	24

【0494】

TXNIP KO hPSCクローン作製及び特徴付け。hPSCにおけるこれらのgRNAの切断効率を評価するために、TC1133 hiPSC細胞は、125 pmol

の Cas 9 及び 375 pmol の gRNA の絶対値を有する 3 : 1 (gRNA : Cas 9) のモル比の Cas 9 タンパク質 (Biomay) 及びガイド RNA (SyntheGo) の RNP 混合物とともに Neon エレクトロポレーター (Neon トランスフェクションシステム ThermoFisher Cat # MPK5000) を使用して電気穿孔された。RNP 複合体を形成するために、gRNA 及び Cas 9 を、R-緩衝液を含む 1 つの容器中で合わせて、25 μ L の合計体積にし、室温で 15 分間インキュベートした。細胞は、ACCUTASE (登録商標) を使用して解離され、続いて DMEM / F12 培地 (Gibco、cat # 11320033) 中で再懸濁され、NC-200 (Chemometec) を使用して計数され、遠心分離された。合計で 1×10^6 個の細胞が RNP 複合体とともに再懸濁され、R-緩衝液が加えられて、125 μ L の合計体積になった。次に、この混合物は、パラメーター：2 パルス、30 ms、1100 V を使用して電気穿孔された。エレクトロポレーション後、細胞は、RevitaCell を含む StemFlex 培地で充填された Eppendorf チューブにピペットで移された。次に、この細胞懸濁液は、BIOLAMININ 521 CTG で予めコーティングされた組織培養ディッシュに蒔かれた。細胞は、正常酸素圧インキュベーター (37 $^{\circ}$ C、8 % CO₂) 中で 48 時間培養された。48 時間後、ゲノム DNA は、QuickExtract を使用して細胞から収集された。

10

【0495】

標的 TXNIP 配列のための PCR が実施され、得られた増幅 DNA は、サンガー法により配列決定された。TIDE 分析を使用して、Tsunami ソフトウェアを使用するインデルパーセンテージのための出力配列決定データを分析した。図 13 は、TXNIP gRNA に関する切断効率を示す。次に、gRNA が hPSC におけるそれらのインデル頻度に基づいて選択された。

20

【0496】

最大の切断効率の gRNA のオフターゲットは、配列類似性が予測される部位でのハイブリッド捕捉分析を使用して幹細胞に由来する DNA において評価された。検出可能なオフターゲット効果を示さず、高いオンターゲット活性を示したため、TXNIP gRNA T5 によるさらなる実験が実施された。

【0497】

TXNIP KO hPSC クローン作製及び特徴付け。TXNIP gRNA T5 を使用して、CyT49 hESC (Viacyte) は電気穿孔され、エレクトロポレーションの 3 日後、WOLF FACS-ソーター (Nanocelllect) を使用して StemFlex 及び RevitaCell を含む BIOLAMININ 521 CTG 96 ウェルプレートに単一細胞ソーティングされた。播種された単一細胞を、コロニーが単一細胞として再播種されるほど大きくなるまで、1 日おきに培地を交換しながら正常酸素圧インキュベーター (37 $^{\circ}$ C、8 % CO₂) 中で増殖させた。コンフルエントになったとき、試料を、維持及びゲノム DNA 抽出のために分割した。

30

【0498】

クローンの TXNIP KO 状態は、PCR 及びサンガー配列決定を介して確認された。標的 TXNIP 領域の得られた DNA 配列は、インデル同一性及び接合状態を決定するために SnapGene ソフトウェアにおいて整列された。所望の編集を有するクローンが増殖され、TXNIP 発現についてのフローサイトメトリー評価を介してさらに検証された。クローンの核型状態は、Cell Line Genetics サービスを介して評価され、正常な核型が報告された (表 9) 。

40

【0499】

50

【表 9】

表 9. 核型分析

細胞株	継代	核型分析	FISH 分析	aCGH アレイ分析
TXNIPKO#2	P31	正常	正常	通過
TXNIPKO#13	P31	正常	正常	通過

【0500】

クローンは、多能性マーカー OCT 4 及び SOX 2 のための細胞内フローサイトメトリーにより多能性を保持することが確認された。確認された多能性クローンは、以前に確立された方法 (Schulz et al., (2012) PLoS ONE 7 (5): e37004) を使用して膵臓内分泌性前駆細胞に分化された。

【0501】

遺伝子発現分析のためのターゲット RNA seq は、上記のとおり Illumina TruSeq 及びオリゴのカスタムパネルを使用して実施された。選択された遺伝子発現は、図 20 において示された。TXNIP KO 細胞からの FOXA 2、CHGA、PDX 1 及び NKX 6.1 の動的発現パターンは、野生型細胞と同様であった。PEC 段階では、クロモグラニン (CHGA)、PDX 1 及び NKX 6.1 のためのフローサイトメトリーも実施された。PEC 段階の不均一な集団は、30.6% の膵臓前駆細胞 (すなわち CHGA⁺/NKX 6.1⁺/PDX 1⁺) を含んだ (図 21)。

【0502】

実施例 8: B2M KO/PD-L1 KI 及び TXNIP KO/HLA-E KI ヒト多能性幹細胞 (hPSC) の作製

B2M KO/PD-L1 KI 及び TXNIP KO/HLA-E KI 戦略の設計。PD-L1 コード配列が B2M 座位に挿入され (それにより B2M 遺伝子をノックアウトした) 且つ HLA-E コード配列が TXNIP 座位に挿入された (それにより TXNIP 遺伝子をノックアウトした) 細胞が作製された。

【0503】

PD-L1 (CD274) を B2M 座位に挿入するためのプラスミド設計は、実施例 3 に示された。ドナープラスミドは、エクソン 1 の周りの B2M 座位と同一な配列を有する 800 塩基対ホモロジーアームに隣接する PD-L1 の CAGGS プロモーター駆動 cDNA を含有する。B2M-2 gRNA は、標的化された B2M 座位での PD-L1 導入遺伝子の挿入を容易にするために使用された。PD-L1 ドナープラスミドは、B2M 標的化 gRNA 及び Cas9 タンパク質で構成される RNP 複合体とともに導入された。100 万個の CyT49 細胞 (ViaCyte) 当たり、4 µg のプラスミド DNA が RNP とともに送達された。エレクトロポレーションは、実施例 2 において記載されるとおり実施された。エレクトロポレーションの 7 日後、細胞は、Miltenyi 試薬 (抗マウス IgG マイクロビーズ Cat # 130-048-401、LS カラム Cat # 130-042-401 及び MidiMACS セパレーター Cat # 130-042-302) 又は ThermoFisher 試薬 (DynaMag (商標) -15 マグネット Cat # 12301D、CELLlection (商標) 汎マウス IgG キット Cat # 11531D、Dynabeads (商標) 汎マウス IgG Cat # 11042) を使用して、磁気支援細胞ソーティング (MACS) を介して PD-L1 陽性細胞について濃縮された。

【0504】

濃縮された PD-L1 陽性集団が増殖された後、HLA-E 三量体 cDNA 導入遺伝子は、HLA-E 配列を含むドナープラスミドを使用して CRISPR 誘導性 HDR を介して TXNIP ゲノム座位に挿入された。HLA-E 三量体 cDNA は、そのシグナルペプチドを伴わずに HLA-E タンパク質に融合された B2M 膜タンパク質に融合された HL

A-G 提示ペプチドに融合された B2M シグナルペプチドで構成された。この三量体設計は以前に公開されている (Gornalusse et al. (2017) Nat. Biotechnol. 35 (8) : 765-772)。HLA-E 三量体コード配列 (リンカーを含む) は、配列番号 55 (すなわち配列番号 26~31) である。HLA-E 送達のためのドナープラスミドは、エクソン 1 (図 14、表 10 及び表 11) の周りの TXNIP 座位と同一な配列を有する 800 塩基対ホモロジーアームに隣接する HLA-E 三量体の CAGGS プロモーター駆動発現を含有する。いくつかの実施形態では、ドナープラスミドは、配列番号 34 又は 56 を含む。

【0505】

【表 10】

10

表 10. TXNIP-CAGGS-HLA-E ドナープラスミド 1 の要素

要素	位置 (bp 単位のサイズ)	配列番号
左 ITR	1-130 (130)	6
LHA-TXNIP	145-944 (800)	25
CMV エンハンサー	973-1352 (380)	8
ニワトリβ-アクチンプロモーター	1355-1630 (276)	9
キメライントロン	1631-2639 (1009)	10
B2M シグナル配列	2684-2743 (60)	26
HLA-G ペプチド	2744-2770 (27)	27
GS リンカー	2771-2815 (45)	28
B2M 膜タンパク質	2816-3112 (297)	29
GS リンカー	3113-3172 (60)	30
HLA-E	3173-4183 (1011)	31
bGH ポリ(A)シグナル	4204-4428 (225)	12
RHA-TXNIP	4435-5234 (800)	32
右 ITR	5276-5416 (141)	14
プラスミド全体	7763 bp	34

20

30

【0506】

40

50

【表 1 1】

表 11. TXNIP-CAGGS-HLA-E ドナープラスミド 2 の要素

要素	位置 (bp 単位のサイズ)	配列番号
左 ITR	1-130 (130)	6
LHA-TXNIP	145-944 (800)	25
CMV エンハンサー	973-1352 (380)	8
ニワトリ β -アクチンプロモーター	1355-1630 (276)	9
キメライントロン (短縮化)	1631-2336 (706)	57
B2M シグナル配列	2381-2440 (60)	26
HLA-G ペプチド	2441-2467 (27)	27
GS リンカー	2468-2512 (45)	28
B2M 膜タンパク質	2513-2809 (297)	29
GS リンカー	2810-2869 (60)	30
HLA-E	2870-3880 (1011)	31
bGH ポリ(A)シグナル	3901-4125 (225)	12
RHA-TXNIP	4132-4931 (800)	32
右 ITR	4973-5113 (141)	14
プラスミド全体	7460 bp	56

【0507】

TXNIP-T5 gRNA は、標的化された TXNIP 座位での HLA-E 導入遺伝子の挿入を容易にするために使用された。HLA-E ドナープラスミドは、TXNIP-T5 gRNA 及び Cas9 タンパク質で構成される RNP 複合体とともに導入された。100 万個の PD-L1 + 細胞当たり、4 μ g の HLA-E ドナープラスミド DNA (配列番号 56) が RNP とともに送達され。代わりに、HLA-E ドナープラスミド DNA (配列番号 34) が使用され得る。エレクトロポレーションは、実施例 2 において記載されるとおりに実施された。エレクトロポレーションの 7 日後、細胞は、Miltenyi 試薬又は ThermoFisher 試薬を使用して MACS を介して HLA-E 陽性細胞について濃縮された。HLA-E 濃縮後、細胞は、WOLF FACS-ソーター (Nanocelllect) を使用して、StemFlex 及び Revitacell を含む BIO LAMININ 521 CTG でコーティングされた 96 ウェルプレートに単一細胞ソーティングされた。播種された単一細胞を、コロニーが単一細胞として再播種されるほど大きくなるまで、1 日おきに培地を交換しながら正常酸素圧インキュベーター (37 °C、8 % CO₂) 中で増殖させた。コンフルエントになったとき、試料を、維持及びゲノム DNA 抽出のために分割した。抗 PD-L1 及び抗 HLA-E 抗体 (表 4) は、MACS 濃縮並びに HLA-E 及び PD-L1 二重陽性細胞のためのゲーティング設定を有する 96 ウェルプレートに FACS ソーティングのために使用された。FACS ソーティングに関して、未編集の細胞は、陰性対照として機能した。

【0508】

正確に標的化されたクローンは、プラスミドのホモロジーアームの外側からそれぞれ PD-L1 cDNA 挿入物又は HLA-E cDNA 挿入物までの領域を増幅するプライ

マーを使用して、PD-L1 KI 挿入物及びHLA-E KI 挿入物のためにKI 組込みDNAのみの増幅を可能にするPCRを介して同定された。オンターゲット挿入物は、PCRによって接合状態について試験されて、KIがヘテロ接合性又はホモ接合性様式において生じたかどうかの評価された。ヘテロ接合性クローンが同定された場合、KI陰性アレルをサンガー配列決定に送って、それがそれぞれB2M-破壊インデル又はTXNIP-破壊インデルを含有したことを検証した。完全なB2M及びTXNIP破壊（KI挿入物又はインデル形成のいずれかによる）を伴う正確なKIクローンは、3000万個の細胞の集団サイズに達するまで、増加性の組織培養形式において増殖された。およそ10個のクローンがこの様式で増殖され、細胞内フローサイトメトリーを介してOCT4及びSOX2について試験することによって多能性であると確認された（図15）。

10

【0509】

次に、上の試験を通過したクローンは、上記のと通りの核型分析（Cell Line Genetics）についてさらに試験された。選択されたB2M KO/PD-L1 KI+TXNIP KO/HLA-E KI（「V1-B」）クローンのG-バンディング結果は、表12において示される。さらに、その後、V1-Bクローンは、臍臓内胚葉前駆細胞（PEC）に分化するそれらの能力について試験された。

【0510】

【表12】

表 12. G-バンディング結果

20

細胞株	継代	核型分析	FISH 分析	aCGH アレイ分析
V1-B003	P37	正常	正常	通過
V1-B007	P37	正常	正常	通過
V1-B008	P36	正常	正常	通過

【0511】

PD-L1 及びHLA-E は、以前に報告された臍臓内分泌性プロトコルに従って段階6の細胞への分化後に発現され続けた（Rezania et al. (2014) Nat. Biotechnol. 32 (11) : 1121-1133）（図16）。分化細胞の集団は、導入遺伝子の発現に関して均一であり、例えば細胞の94.4%がPD-L1を発現し、細胞の97.0%がHLA-Eを発現する。図22Aは、野生型及び非切断ガイド対照細胞と比較して、段階6に分化した様々なクローン細胞（「S6-V1B-H9」、「S6-V1B-3B11」、「S6-V1B-1G7」及び「S6-V1B-3C2」）の同様の形態を示す。B2M KO/PD-L1 KI及びTXNIP KO/HLA-E KIクローンの選択された遺伝子発現は、図23A～図23Fに示される。B2M KO/PD-L1 KI及びTXNIP KO/HLA-E KIクローン細胞からのINS、NKX6.1、GCK、GCG及びSSTの動的発現パターンは、野生型細胞と同様であった（図23A）。様々な分化したB2M KO/PD-L1 KI及びTXNIP KO/HLA-E KIクローン（「S6-V1B-H9」、「S6-V1B-3B11」、「S6-V1B-1G7」及び「S6-V1B-3C2」）からの段階6のマーカーINS（図23B）、NKX6.1（図23C）、GCG（図23D）、SST（図23E）及びGCK（図23F）の発現レベルは、段階6の野生型細胞及び野生型の島におけるレベルと同様であった。未分化のB2M KO/PD-L1 KI及びTXNIP KO/HLA-E KIクローン（「ES-V1B-H9」）が陰性対照として使用された。

30

40

【0512】

図24A～24Bは、B2M KO/PD-L1 KI及びTXNIP KO/HLA

50

ー E K I クローンから分化された段階 6 の細胞における I N S 及び G C G の発現 (図 2 4 A) 並びに I N S 及び N K X 6 . 1 の発現 (図 2 4 B) のフローサイトメトリー評価を示す。図 2 5 A ~ 2 5 B は、2 つの B 2 M K O / P D - L 1 K I 及び T X N I P K O / H L A - E K I クローン (「S 6 - V 1 B 0 0 3」及び「V 1 B - H 9」) から分化した段階 6 の細胞における I N S の発現 (図 2 5 A) 及び N K X 6 . 1 の発現 (図 2 5 B) のパーセンテージを示す。両者の発現は、野生型及び非切断ガイド対照細胞のものと同様であった。

【0513】

P E C 段階では、クロモグラニン (C H G A)、P D X 1 及び N K X 6 . 1 のためのフローサイトメトリーが実施された。P E C 段階の不均一な集団は、膵臓前駆細胞、初期内分泌を含む (図 1 7)。遺伝子発現分析のためのターゲット R N A s e q は、上記のとおり実施された。T X N I P K O クローンに関する選択された遺伝子発現は、図 1 8 A に示され、V 1 - B クローンに関する選択された遺伝子発現は、図 1 8 B に示される。V 1 - B 又は T X N I P K O クローン細胞からの F O X A 2、C H G A、P D X 1 及び N K X 6 . 1 の動的発現パターンは、野生型細胞と同様であった。

【0514】

配列番号 5 6 のヌクレオチド配列を含む H L A - E ドナーベクターを使用して、H L A - E コード配列が T X N I P 座位に挿入された (それにより T X N I P 遺伝子をノックアウトした) 細胞が作製された。遺伝子発現分析のためのターゲット R N A s e q は、上記のとおり実施された。T X N I P K O / H L A - E K I クローンに関する選択された遺伝子発現は、図 2 8 に示される。T X N I P K O / H L A - E K I 細胞からの F O X A 2、C H G A、P D X 1 及び N K X 6 . 1 の動的発現パターンは、野生型細胞と同様であった。

【0515】

代わりに、配列番号 3 4 のヌクレオチド配列を含む H L A - E ドナーベクターを使用して、H L A - E コード配列が T X N I P 座位に挿入された細胞が作製された。大部分が編集された細胞は P E C 段階に分化され、細胞の集団の少なくとも 7 5 % において H L A - E を発現した (データは示さず)。T X N I P K O 細胞から分化した P E C 細胞における P D X 1 及び N K X 6 . 1 発現のフローサイトメトリー評価は、野生型細胞から分化した P E C 細胞と同様であった (データは示さず)。

【0516】

実施例 9 : T 細胞活性化 / 増殖アッセイ

P E C 分化細胞は、インビトロヒト T 細胞活性化 / 増殖アッセイを介して免疫応答を誘発するそれらの能力について試験された。新鮮なドナー P B M C は、H e m a c a r e から購入され、C D 3 + T 細胞は、汎 T 細胞単離キット、ヒト (M i l t e n y i C a t # 1 3 0 - 0 9 6 - 5 3 5) を使用して精製された。単離された T 細胞は、製造業者の指示書により C e l l T r a c e (商標) C F S E 細胞増殖キットプロトコル (T h e r m o f i s h e r C a t # 3 4 5 5 4) で標識され、分化した P E C とともに 5 日間共インキュベートされた。T 細胞増殖及び活性化のための D y n a b e a d s (商標) ヒト T - アクチベーター C D 3 / C D 2 8 (T h e r m o f i s h e r C a t # 1 1 1 6 1 D) は、T 細胞を活性化する陽性対照として使用された。T 細胞単独で C F S E により標識され、陰性対照として使用された。C D 3 + C F S E + 細胞のパーセントは、T 細胞増殖のパーセントを評価するために測定された (図 1 9 A ~ 1 9 B)。W T P E C は、T 細胞単独の対照を超えて T 細胞増殖を誘発した。B 2 M K O、B 2 M K O / P D - L 1 K I 及び B 2 M K O / P D - L 1 K I + T X N I P K O / H L A - E K I C y T 4 9 に由来する P E C は、T 細胞のみの対照を超えて T 細胞増殖を誘発しなかったが、これは編集された細胞の低免疫原性の性質を示している。

【0517】

実施例 10 : 遺伝子標的化されたクローン株のインビボ有効性試験

膵臓内胚葉細胞は、以下の遺伝子改変を有する C y T 4 9 に由来するクローン h E S 細

10

20

30

40

50

胞株から生成された：1) B2M発現の標的化された欠失及びPD-L1の強制発現、2) B2M発現の標的化された欠失及びHLA-Eの強制発現、又は3) TXNIPの標的化された欠失。加えて、クローン未改変細胞株は、非切断ガイドRNA (NCG) によるトランスフェクションから得られた。

【0518】

標準的な手順に従って、指定のクローン株に由来する膵臓内胚葉凝集物を、穿孔デバイス (PD) 中にロードして、試験又は対照物品を生成した。PDは、皮下移植時に直接的な血管新生を可能にし、被包された膵臓前駆細胞は、グルコース反応性、インスリン産生細胞を含む機能的な膵臓内分泌性細胞にインビボで成熟する。

【0519】

表13において要約されるとおり、胸腺欠損ヌードラットの5つの群に、それぞれ上記の4つのクローン株の分化から得られたおよそ 7×10^6 個の膵臓内胚葉細胞又は野生型 CyT49 hES (ViaCyte) 細胞を含有する2つの物品を皮下移植した。

【0520】

【表13】

表 13. 試験設計

群番号	群 ID	hESC 起源	遺伝子改変		動物の数	終点
			ノックアウト (機能喪失)	ノックイン (機能獲得)		
1	対照	未改変 CyT49	なし	なし	群当たり 6	20 週
2	NCG	CyT49 サブ-クローン	なし	なし		
3	TXNIP KO	CyT49 サブ-クローン	TXNIP	なし		
4	B2M KO/ PD-L1 KI	CyT49 サブ-クローン	B2M	PD-L1		
5	B2M KO/ HLA-E	CyT49 サブ-クローン	B2M	HLA-E		

【0521】

12週目から、生存している全ての動物を、グルコース刺激インスリン分泌 (GSIS) 試験を介する有効性評価にかけた。血液試料は、3 g / kg のグルコースの腹腔内投与前及び後に非絶食動物から得られた。ヒトC-ペプチドの血清濃度は、標準的な酵素結合免疫吸着測定法を介して決定された。

【0522】

GSIS試験は、12、16及び20週目に実施された。結果は、特に12週の時点を超えて実験群間で実質的な相違がないことを示した。対照群 (群1、 $< 40 \text{ pM} \sim 2.0 \text{ nM}$ 、平均 1.1 nM) において検出されるC-ペプチドレベルと比較して、C-ペプチドレベルは、群3 (TXNIP KO、平均 1.5 nM) からの6頭の動物の2頭において上昇した。他の群、群2 (NCG、平均 0.5 nM)、群4 (B2M KO / PD-L1 KI、平均 0.5 nM) 及び群5 (B2M KO / HLA-E KI、平均 0.4 nM) は、対照群と比較してC-ペプチドレベルの同様の範囲であったが、より多くの動物がその範囲の下端付近であったことを示した。しかしながら、これらの相違は、統計的に有意ではなかった。これらの結果は、導入された遺伝子改変もクローン株を作製するために必要な操作も、その細胞株がインビトロで膵臓内胚葉細胞に分化し、その後、インビボで機能的なベータ細胞を作製する能力に影響を及ぼさないことを示した。

【0523】

20週目で、G S I S 試験後、動物は、安楽死され、移植された試験物品は、中性緩衝ホルマリン中で固定され、スライドに加工され、H & E 並びにインスリン及びグルカゴンのために免疫組織化学によって染色された。

【0524】

G S I S 試験によるインビボでの有効性評価は、未編集の対照物品と、各々が遺伝子改変のサブセットを有するクローン細胞株に由来する膵臓内胚葉細胞で構築された編集された試験物品との間で実質的な相違を示さなかった。結果は、個々の遺伝子改変及びそれらが導入されるプロセスがインビボで許容され得ることを示唆している。

【0525】

実施例11. B2M KO / PD-L1 KI、TXNIP KO / HLA-E KI 細胞株のインビボ有効性試験

4つのクローン株は、基本的に実施例8において上記のとおりに作製され、穿孔デバイスにロードされて、試験物品を形成した。対照物品は、未改変C y T 49細胞 (V i a C y t e) を含有した。約 7×10^6 個の膵臓内胚葉細胞を含む物品は、胸腺欠損ヌードラット (2物品 / ラット、8ラット / 群) に皮下移植された。

【0526】

12、16、20及び24週目に、生存している全ての動物を、グルコース刺激インスリン分泌 (G S I S) 試験にかけた。血液試料は、3 g / k g のグルコースの腹腔内投与前及び後に絶食動物から得られた。ヒトC-ペプチドの血清濃度は、標準的な酵素結合免疫吸着測定法を介して決定された。血清C-ペプチドは、移植後の12週目に大部分の動物において検出された。移植後の16、20及び24週目の血清C-ペプチドレベルは、表14に示される。対照細胞に対して、遺伝子編集された細胞が移植された動物の群間で統計的に有意な相違は観察されなかった。

【0527】

【表14】

表14. インビボでの血清C-ペプチドレベル。

群	血清C-ペプチド (pmol)		
	平均	95%下限	(95%上限
遺伝子編集された細胞 - 16週	729	40	1418
遺伝子編集された細胞 - 20週	1080	391	1769
遺伝子編集された細胞 - 24週	1676	987	2365
対照細胞 - 16週	1075	386	1764
対照細胞 - 20週	1883	1193	2572
対照細胞 - 24週	2466	1777	3155

【0528】

25週目に、生存している動物は、飼料を与えない状態で血中グルコースを減少させたことに応答する血清ヒトC-ペプチドの変化を評価するために、インスリンチャレンジ (インスリン耐性試験、I T T) かけられる。血液試料は、体重1 k g 当たり1単位のインスリンの腹腔内投与前及びその後の複数の時点 (15、30、60分) で絶食動物から得られる。ヒトC-ペプチドの血清濃度は、標準的な酵素結合免疫吸着測定法を介して決定される。

【0529】

26週目に、生存している動物は、安楽死され、移植された試験物品は、スライドに加

工され、H & E 並びにインスリン及びグルカゴンのために免疫組織化学（IHC）によって染色されて、ヒト膵臓内分泌性細胞を同定する。ヒトに特異的な核マーカーNuMA1のための追加のIHCは、試験物品移植片の内腔の外側の移植に由来する細胞の潜在的な位置を同定するために実施される。

【0530】

実施例12. B2M KO/PD-L1 KI、TXNIP KO/HLA-E KI細胞株のインビボ有効性試験

B2M KO/PD-L1 KI、TXNIP KO/HLA-E KI膵臓内胚葉細胞の凝集物（およそ 7×10^6 個の細胞を含む）は、試験物品に配合される。46頭の胸腺欠損ヌードラットにそれぞれ2つの試験物品が皮下移植される。試験時の動物は、GSIS、ITT及び非絶食時血中グルコース（NFBG）について評価される。1群当たり10頭の動物は、13、17、26及び39週の予定された終了時点で安楽死される一方、6頭の追加の動物は、起こり得る予定外の早期の終了を考慮して試験される。各動物から、2頭の移植された試験物品は、組織学的評価又は総C-ペプチド含量評価のいずれかに無作為に割り当てられる。表15は、試験設計を示す。

【0531】

【表15】

表 15. 試験設計

群番号	試験物品の数	動物の数	GSIS 時点 (週)	ITT 時点 (週)	終点 (週)	移植片分析
1	20	10頭の雄	12	NA	13	
2	20	10頭の雄	12, 16	NA	17	各群について: 組織学的検査 5頭の動物 C-ペプチド含量 5頭の動物
3	20	10頭の雄	12, 16, 20, 24	25	26	
4	最大 32	最大 16頭の雄	12, 16, 20, 24, 30, 36	25, 33	39	
合計	92	46頭の雄				

【0532】

12、16、20、24、30及び36週目に、生存している全ての動物は、グルコース刺激インスリン分泌（GSIS）試験を介する有効性評価にかけられる。血液試料は、3g/kgのグルコースの腹腔内投与前及び後に絶食動物から得られる。ヒトC-ペプチドの血清濃度は、標準的な酵素結合免疫吸着測定法を介して決定される。

【0533】

25及び33週目に、生存している動物は、飼料を与えない状態で血中グルコースを減少させたことに応答する血清ヒトC-ペプチドの変化を評価するために、インスリンチャレンジ（インスリン耐性試験、ITT）にかけられる。血液試料は、体重1kg当たり1単位のインスリンの腹腔内投与前及びその後の複数の時点（15、30、60分）で絶食動物から得られる。ヒトC-ペプチドの血清濃度は、標準的な酵素結合免疫吸着測定法を介して決定される。

【0534】

非絶食時血中グルコース（NFBG）は、およそ12、16、20、24、25、30、33及び36週目でGSIS及びITT試験のために絶食の開始前に測定される。

【0535】

表13において特定される予定された終点で、動物は安楽死される。安楽死は、CO₂吸入後の両側開胸によって実施される。剖検は、全ての予定された終了及び予定外の終了時に実施され、肉眼での異常が記録される。

【0536】

指定された移植片は、凍結された後、内腔内容物の均質化が行われる。ホモジネートの総C-ペプチド含量は、標準的な酵素結合免疫吸着測定法を介して決定される。移植片の総C-ペプチド含量は、臨床投薬を予測するために使用される。

【0537】

指定される移植された試験物品は、中性緩衝ホルマリン中で固定され、スライドに加工され、H & E並びにインスリン及びグルカゴンのために免疫組織化学(IHC)によって染色されて、ヒト膵臓内分泌性細胞を同定する。ヒトに特異的な核マーカーNuMA1のための追加のIHCは、試験物品移植片の内腔の外側の移植に由来する細胞の潜在的な位置を同定するために実施される。

【0538】

実施例13：ヒトiPSCにおけるB2M KO/PD-L1 KI、TXNIP KO/HLA-E KIの作製

PD-L1コード配列がB2M座位に挿入されたヒトiPSC(iPSC 0025)が作製された。RNP複合体は、B2M-2 gRNA(配列番号2)及びCas9を3:1(gRNA:Cas9)のモル比で合わせることで形成された。RNP複合体を形成するために、gRNA及びCas9を、R-緩衝液を含む1つの容器中で合わせて、25 µLの合計体積にし、室温で15分間インキュベートした。細胞は、ACCUTASE(登録商標)を使用して解離され、続いてDMEM/F12培地(Gibco、cat #11320033)中で再懸濁され、NC-200(Chemometec)を使用して計数され、遠心分離された。合計で1×10⁶個の細胞がRNP複合体とともに再懸濁された。4 µgのB2M-CAGGS-PD-L1ドナープラスミド(配列番号33)及びR-緩衝液が125 µLの総体積のために添加された。次に、この混合物は、パラメーター:2パルス、30 ms、1100 Vを使用して電気穿孔された。エレクトロポレーションの7日後、細胞は、基本的には実施例8において上記のとおりMiltenyi試薬又はThermoFisher試薬を使用してMACSを介してPD-L1陽性細胞について濃縮された。

【0539】

濃縮されたPD-L1陽性集団が増殖された後、細胞は、基本的には上記のとおり3:1(gRNA:Cas9)のモル比のTXNIP-T5 gRNA(配列番号20)及びCas9タンパク質を含むRNP複合体並びに4 µgのTXNIP-CAGGS-HLA-Eドナープラスミド2(配列番号56)とともに電気穿孔された。エレクトロポレーションの7日後、細胞は、Miltenyi試薬又はThermoFisher試薬を使用してMACSを介してHLA-E陽性細胞について濃縮された。HLA-E濃縮後、細胞は、WOLF FACSソーター(Nanocelllect)を使用して、StemFlex及びRevitacellを含むBIOLAMININ 521 CTGでコーティングされた96ウェルプレートに単一細胞ソーティングされた。播種された単一細胞を、コロニーが単一細胞として再播種されるほど大きくなるまで、1日おきに培地を交換しながら正常酸素圧インキュベーター(37℃、8%CO₂)中で増殖させた。コンフルエントになったとき、試料を、維持及びゲノムDNA抽出のために分割した。抗PD-L1及び抗HLA-E抗体(表4)は、MACS濃縮並びにHLA-E及びPD-L1二重陽性細胞のためのゲーティング設定を有する96ウェルプレートにFACSソーティングのために使用された。FACSソーティングに関して、未編集の細胞は、陰性対照として機能した。

【0540】

正確に標的化されたクローンは、プラスミドのホモロジーアームの外側からそれぞれP

D-L1 cDNA挿入物又はHLA-E cDNA挿入物までの領域を増幅するプライマーを使用して、PD-L1 KI挿入物及びHLA-E KI挿入物のためにKI組込みDNAのみの増幅を可能にするPCRを介して同定された。オンターゲット挿入物は、PCRによって接合状態について試験されて、KIがヘテロ接合性又はホモ接合性様式において生じたかどうかの評価された。ヘテロ接合性クローンが同定された場合、KI陰性アレルをサンガー配列決定に送って、それがそれぞれB2M-破壊インデル又はTXNIP-破壊インデルを含有したことを検証した。完全なB2M及びTXNIP破壊（KI挿入物又はインデル形成のいずれかによる）を伴う正確なKIクローンは、3000万個の細胞の集団サイズに達するまで、増加性の組織培養形式において増殖された。選択されたクローンがこの様式で増殖され、細胞内フローサイトメトリーを介してOCT4及びSOX2について試験することによって多能性であると確認された。

10

【0541】

4つの編集されたhiPSCクローン(VI-B)は、Rezania et al. (Nat Biotechnol. 2014 Nov; 32(11):1121-33)の臍臓内分泌性プロトコルを使用して分化された。段階4では、クロモグラニン(CHGA)、PDX1及びNKX6.1のためのフローサイトメトリーが実施された。異なる代表的な密度で播種されたクローン(クローン1)のPDX1及びNKX6.1に関する結果は、図26Aに示される。CHGAは、4つ全てのクローンについて陰性であった。PD-L1及びHLA-Eに関するフローサイトメトリーも実施された。クローン(クローン1)のPD-L1及びHLA-Eに関する結果は、図26Bに示される。

20

【0542】

実施例14：B2M KO/PD-L1 KI、TXNIP KO/HLA-E KIヒト多能性幹細胞(hPSC)冷凍細胞バンクを製造するためのプロセス

CyT49 hESC(ViaCyte)は、3:1(gRNA:Cas9)のモル比のB2M-2 gRNA(配列番号2)及びCas9タンパク質を含むRNP複合体並びに4 µgのB2M-CAGGS-PD-L1ドナープラスミド(配列番号33)とともに1100Vにおいて30msの2パルスで電気穿孔された。エレクトロポレーション後、細胞は、RevitaCellを含むStemFlex培地で充填されたEppendorfチューブにピペットで移された。次に、この細胞懸濁液は、1:20の希釈度のBIOLAMININ 521 CTGで予めコーティングされた組織培養ディッシュに播種された。細胞は、正常酸素圧インキュベーター(37℃、8% CO₂)中で培養された。

30

【0543】

エレクトロポレーションの7日後、細胞は、Alexa-488標識された抗PD-L1抗体及び磁性ビーズ(DYNABEADS(登録商標)汎マウスIgG; Thermo Fisher)を使用してMACSを介してPD-L1陽性細胞について濃縮された。PD-L1陽性細胞は、XF-KSR増殖培地(Gibco)中で7日間培養することによって増殖された。

【0544】

次に、PD-L1陽性細胞は、3:1(gRNA:Cas9)のモル比のTXNIP-T5 gRNA(配列番号20)及びCas9タンパク質を含むRNP複合体並びに4 µgのTXNIP-CAGGS-HLA-Eドナープラスミド2(配列番号56)とともに1100Vにおいて30msの2パルスで電気穿孔された。エレクトロポレーション後、細胞は、RevitaCellを含むStemFlex培地で充填されたEppendorfチューブにピペットで移された。次に、この細胞懸濁液は、1:20の希釈度のBIOLAMININ 521 CTGで予めコーティングされた組織培養ディッシュに播種された。細胞は、正常酸素圧インキュベーター(37℃、8% CO₂)中で培養された。

40

【0545】

エレクトロポレーションの7日後、細胞は、PE標識された抗HLA-E抗体及び磁性ビーズ(DYNABEADS(登録商標)汎マウスIgG; Thermo Fisher)を使用してMACSを介してHLA-E陽性細胞について濃縮された。PD-L1及び

50

H L A - E 二重陽性細胞は、X F - K S R 増殖培地 (G i b c o) 中で約 5 日間培養することによって増殖された。

【 0 5 4 6 】

P D - L 1 及び H L A - E 二重陽性細胞は、単一細胞ソーティングされた。このために、細胞は、A C C U T A S E (登録商標) による解離の 3 ~ 4 時間前に R e v i t a c e l l (1 × R e v i t a c e l l の最終濃度) とともに S t e m F l e x C o m p l e t e を供給された。解離後、単一細胞は、B I O L A M I N I N でコーティングされた 9 6 ウェル組織培養プレートの単一のウェルにソーティングされた。W O L F F A C S ソーター (N a n o c e l l e c t) を使用して、上記の抗 P D - L 1 及び抗 H L A - E 抗体を使用して単一細胞をウェルにソーティングした。プレートは、R e v i t a c e l l とともに 1 0 0 ~ 2 0 0 μ L の S t e m F l e x C o m p l e t e で予め充填された。細胞播種の 3 日後、細胞は、新鮮な S t e m F l e x を供給され、1 0 0 ~ 2 0 0 μ L の培地が 1 日おきに供給され続けた。増殖の 1 0 日後、細胞は、1 2 ~ 1 4 日目まで S t e m F l e x を毎日供給された。この時点で、プレートは A C C U T A S E (登録商標) で解離され、回収された細胞懸濁液は、1 : 2 に分割されて 2 つの 9 6 ウェルプレートに入れられ、約 4 日間培養された。

10

【 0 5 4 7 】

一部の細胞は、視覚的分析 (形態) 及び D N A 分析 (接合状態分析及びインデルプロファイルについての P C R 及び D N A 配列決定) のために収集され、残りの細胞は培養され、T 1 7 5 フラスコ中で培養するために増殖された。培養の約 2 週間後、クローンは凍結のために選択された。細胞は、標準的な手順を使用して、形態、生存能、内毒素、マイコプラズマ、核型、多能性、分化能、オン / オフターゲット分析、ランダムプラスミド組込み、残留 C a s 9 / プラスミドのために凍結させる前及び後に特徴付けられた。細胞は、冷凍培地中で凍結され、- 8 0 ° C の冷凍バイアル又は液体窒素中で保管された。

20

【 0 5 4 8 】

特定の B 2 M K O / P D - L 1 K I + T X N I P K O / H L A - E K I クローン (「シードクローン」) が製造され、前記プロセスによって単離された。シードクローンは、P E C 段階に分化され、特徴付けられた。図 2 7 A は、P E C 段階のシードクローンの形態が野生型細胞と同様であったことを示す。図 2 7 B は、シードクローンから分化した細胞における分化時間経過にわたる F O X A 2 、C H G A 、P D X 1 及び N K X 6 . 1 の動的発現パターンが野生型細胞と同様であったことを示す。図 2 7 C は、分化した集団における C H G A / N K X 6 . 1 + / P D X 1 + 細胞のパーセンテージを示す。

30

40

50

【図面】
【図 1】

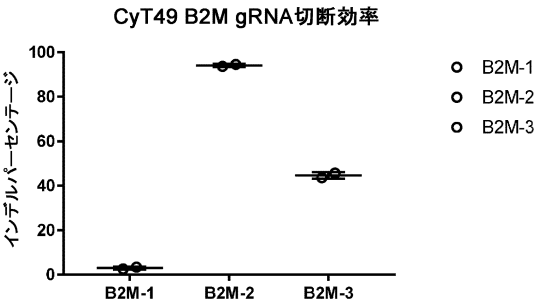


図 1

【図 2 A】

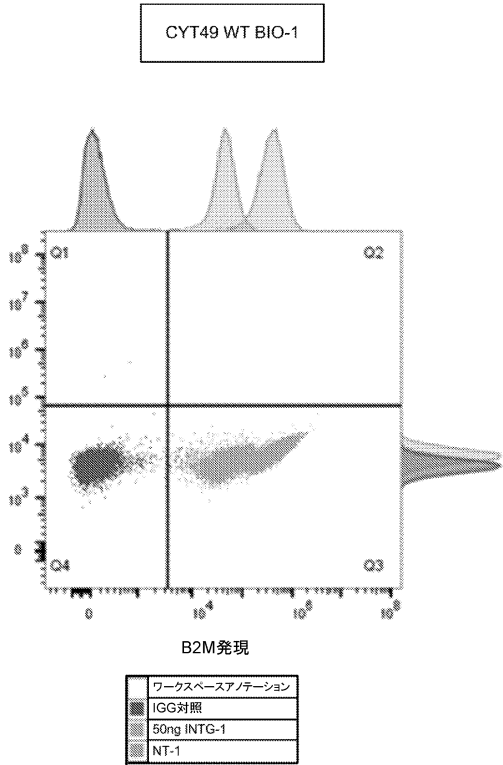


図 2A

【図 2 B】

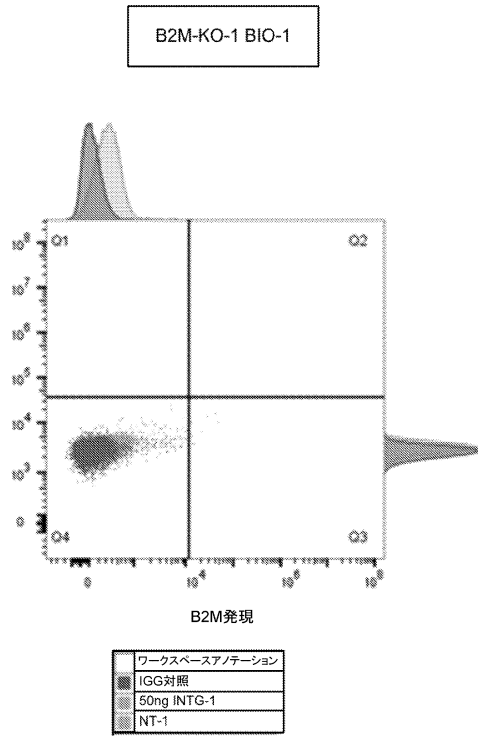


図 2B

【図 3】

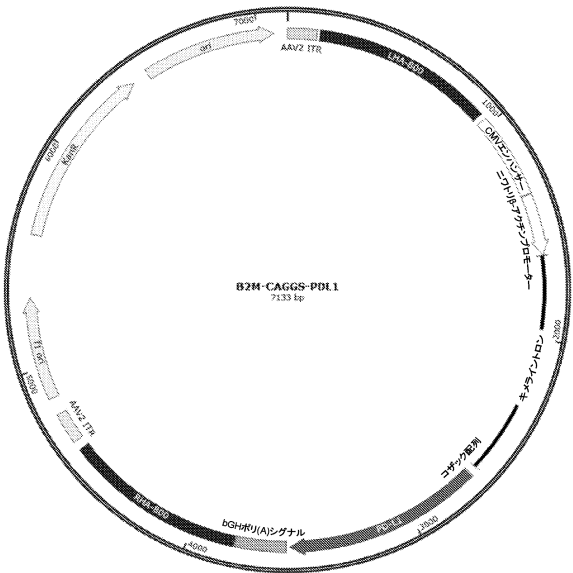


図 3

【図 4】

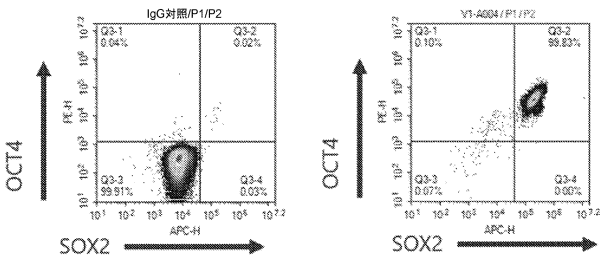


図 4

【図 5 A】

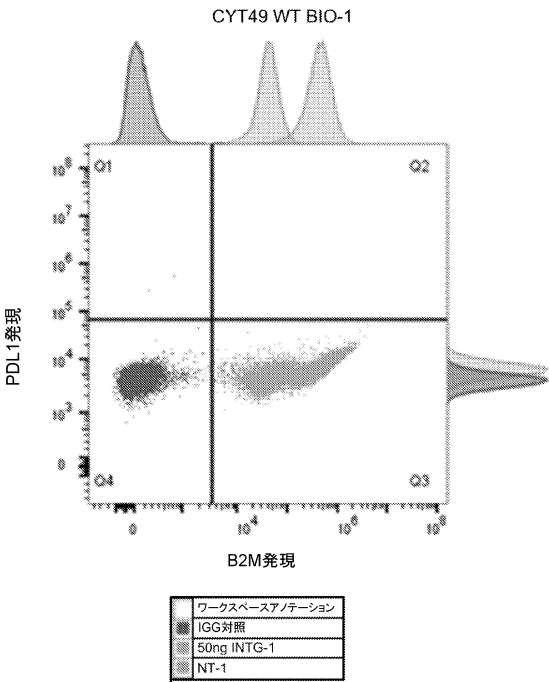


図 5A

【 図 5 B 】

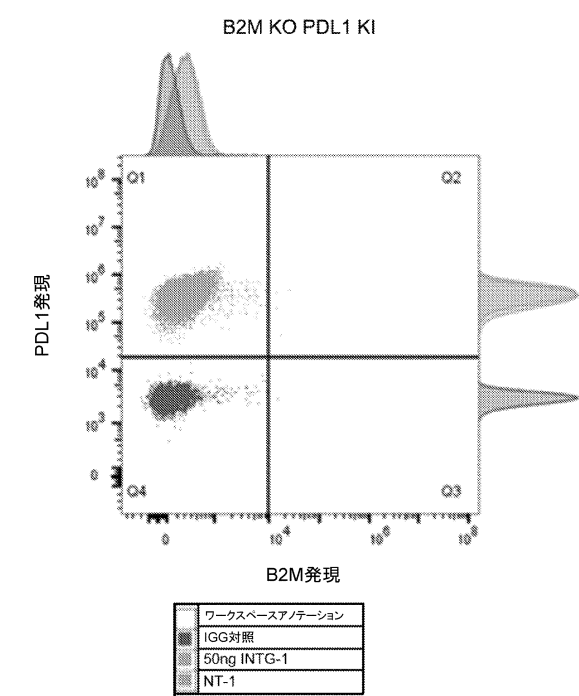
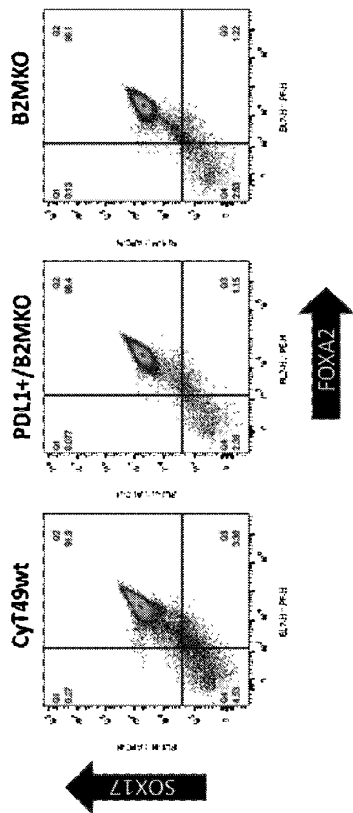


図 5B

【 図 6 】



【 図 7 】

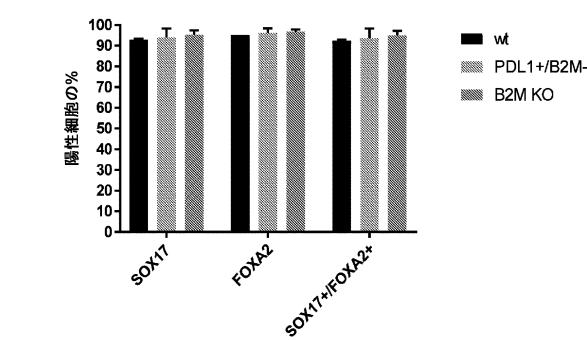


図 7

【 図 8 】

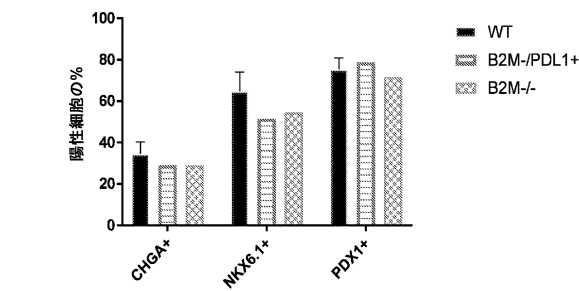


図 8

【図 9】

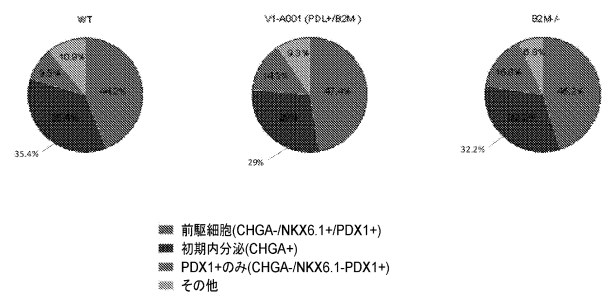


図 9

【図 10】

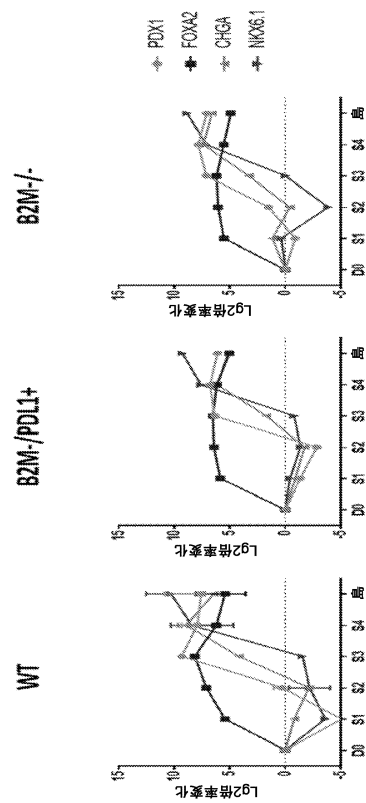


図 10

【図 11 A】

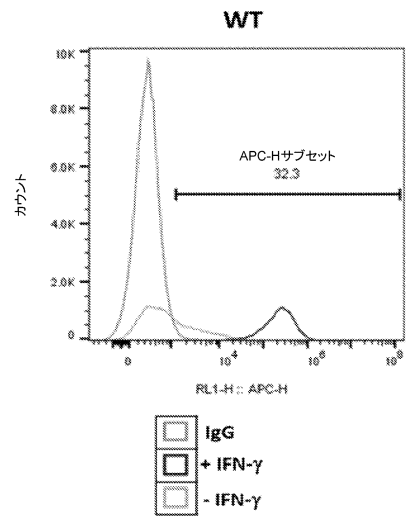


図 11A

【図 11 B】

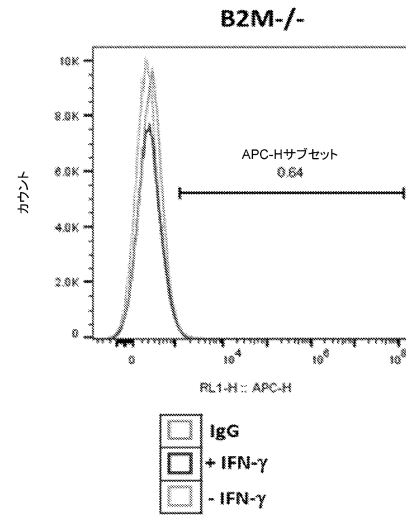


図 11B

10

20

30

40

50

【図 1 1 C】

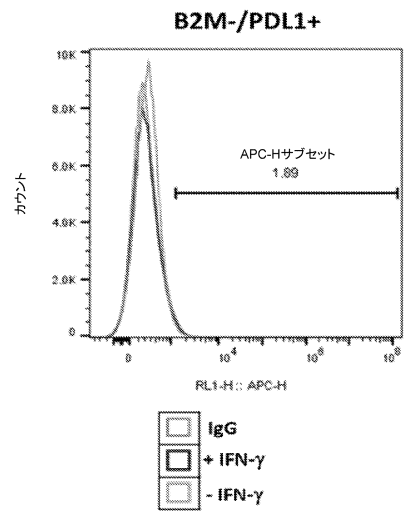


図 11C

【図 1 1 D】

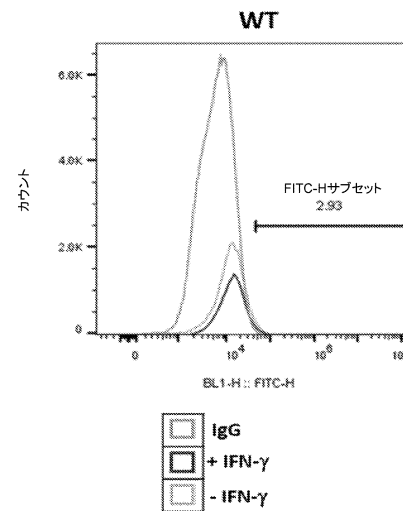


図 11D

【図 1 1 E】

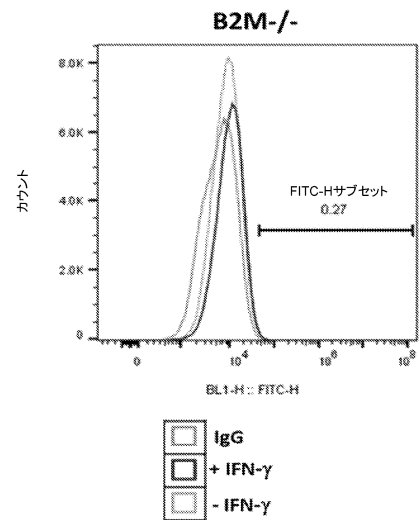


図 11E

【図 1 1 F】

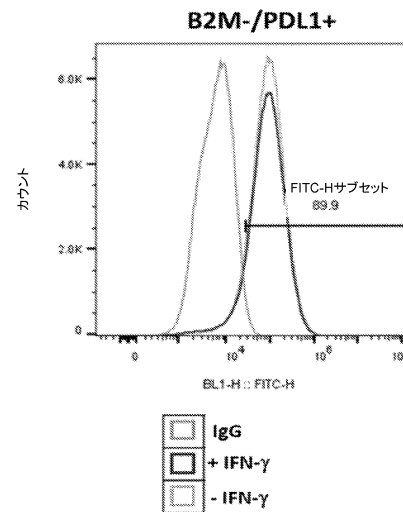


図 11F

10

20

30

40

50

【図 1 2 A】

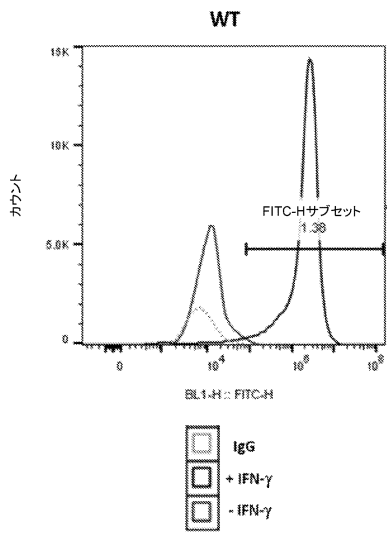


図 12A

【図 1 2 B】

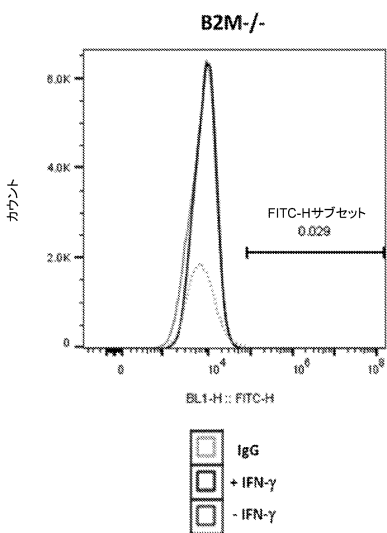


図 12B

【図 1 2 C】

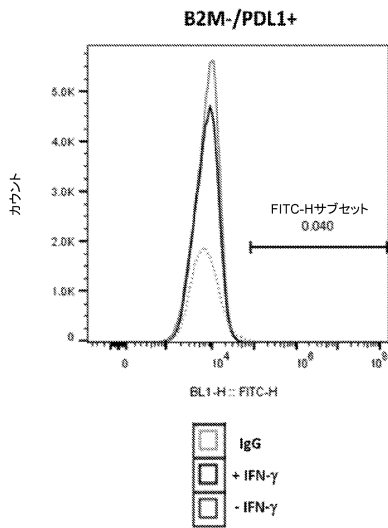


図 12C

【図 1 2 D】

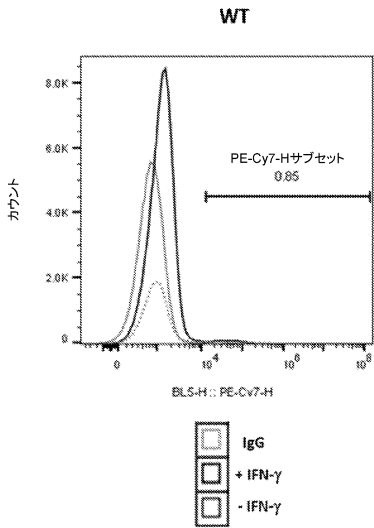


図 12D

10

20

30

40

50

【図 1 2 E】

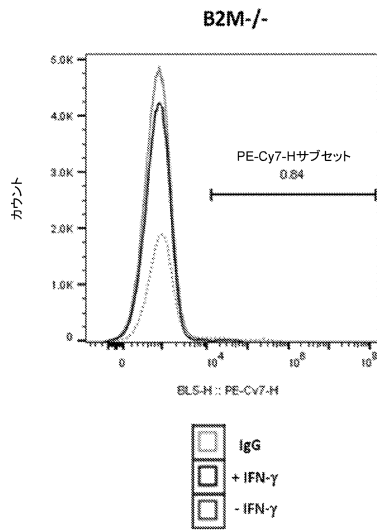


図 12E

【図 1 2 F】

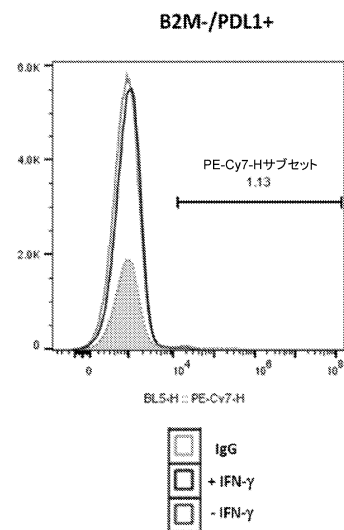


図 12F

【図 1 3】

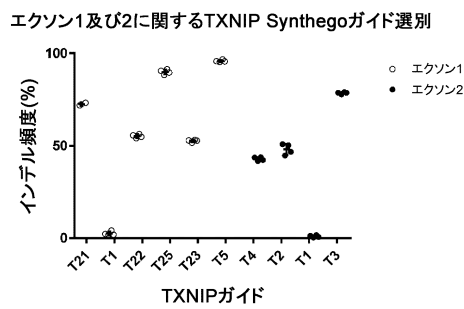


図 13

【図 1 4】

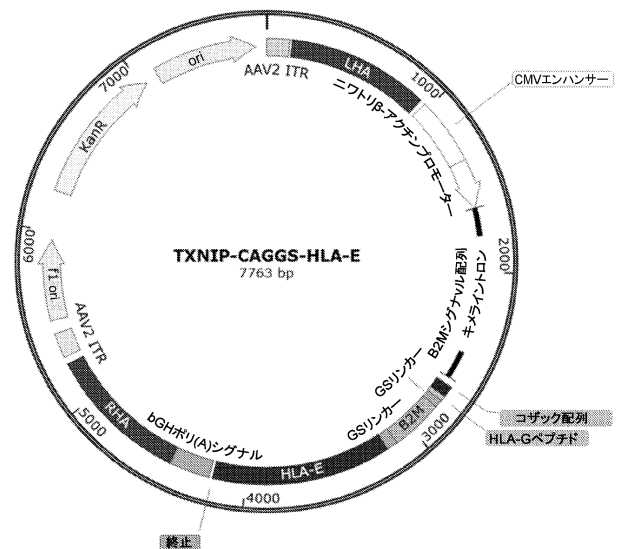


図 14

【図 15】

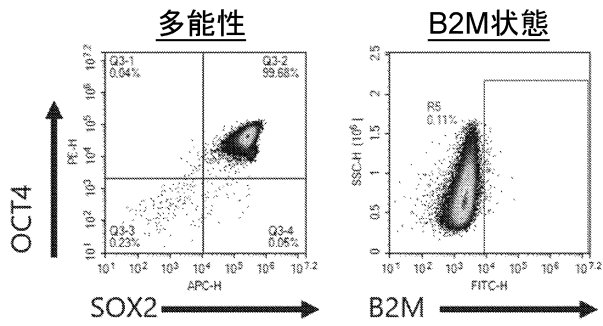


図 15

【図 16】

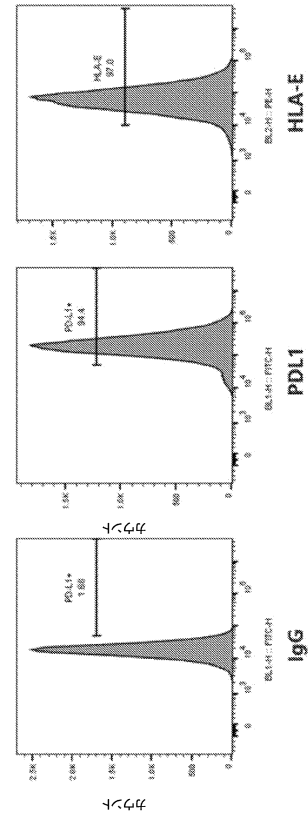


図 16

【図 17】

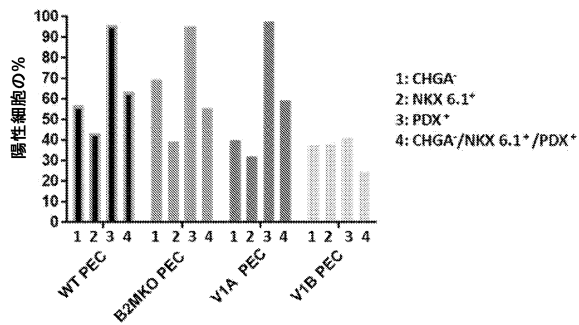


図 17

【図 18 A - 18 B】

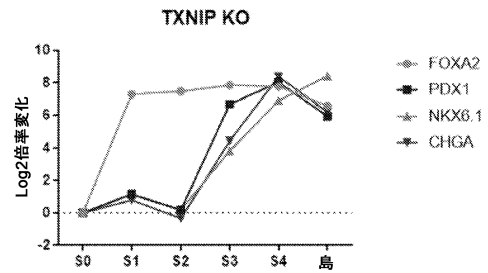


図 18A

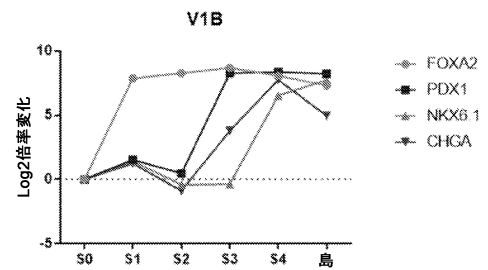


図 18B

10

20

30

40

50

【図 19 A】

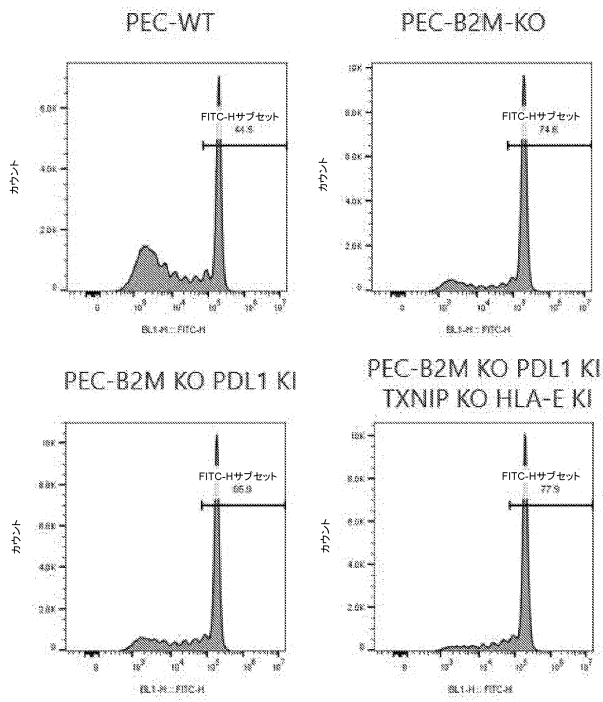


図 19A

【図 19 B】

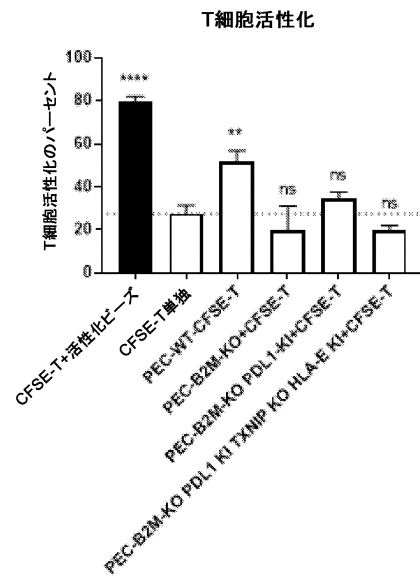


図 19B

【図 20】

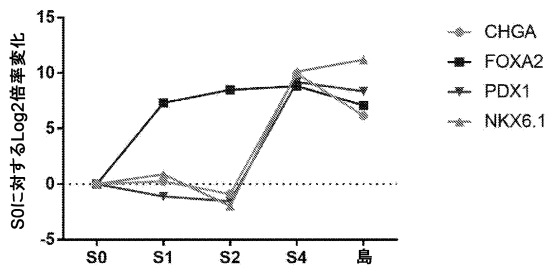


図 20

【図 21】

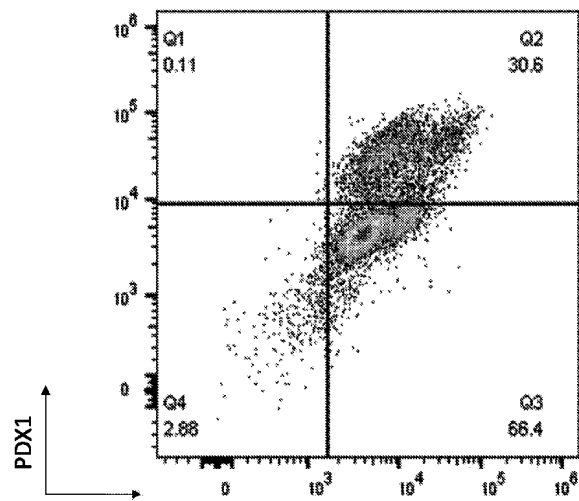


FIG. 21

【図 2 2】

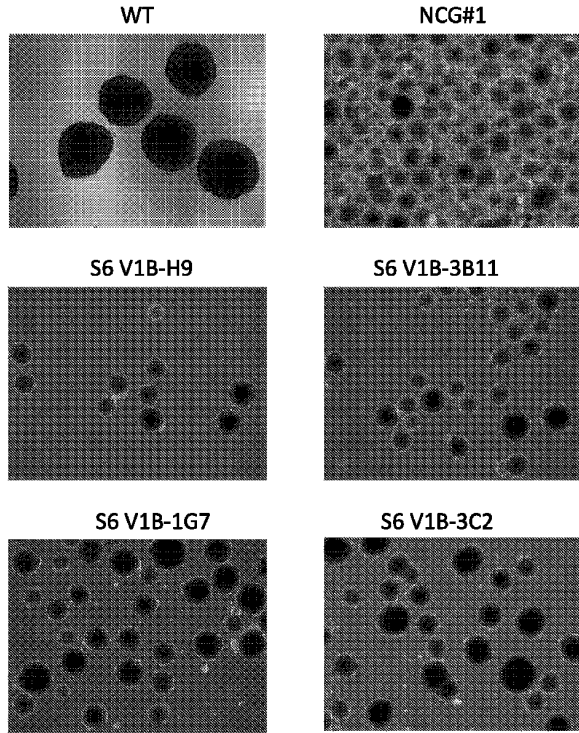
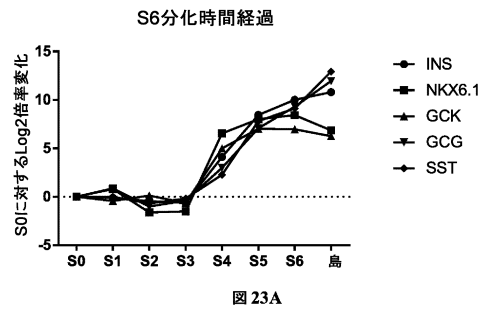
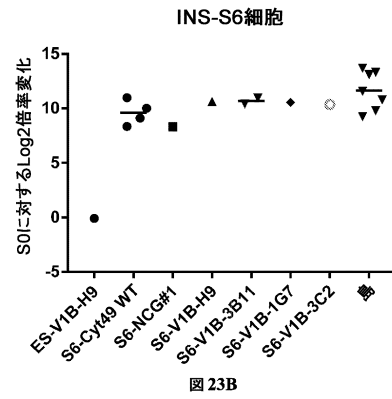


FIG. 22

【図 2 3 A - 2 3 B】

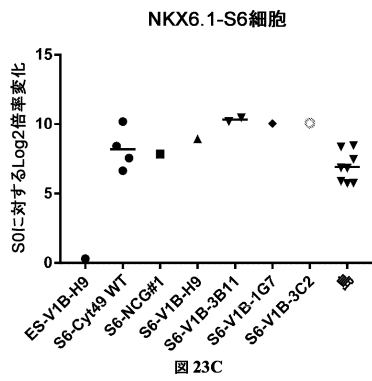


10

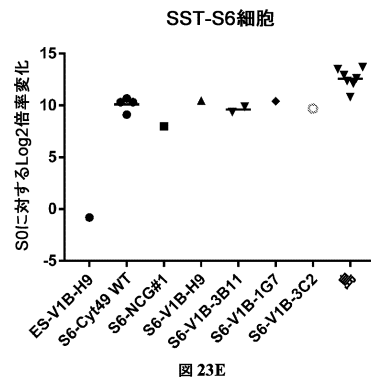


20

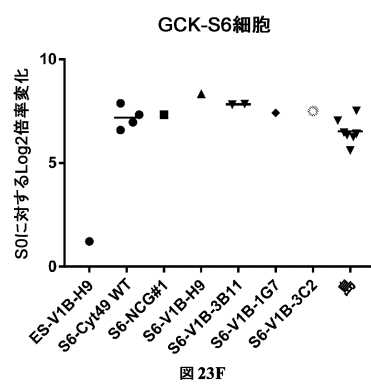
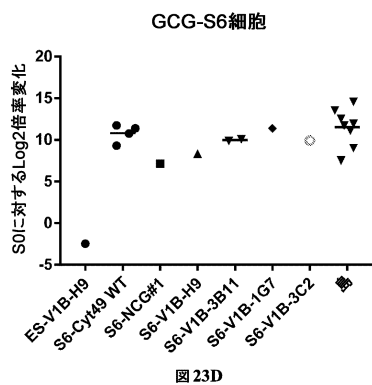
【図 2 3 C - 2 3 D】



【図 2 3 E - 2 3 F】



30



40

50

【図 24 A】

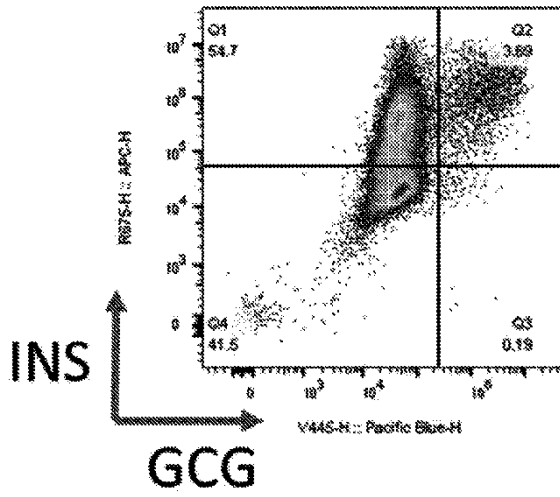


FIG. 24A

【図 24 B】

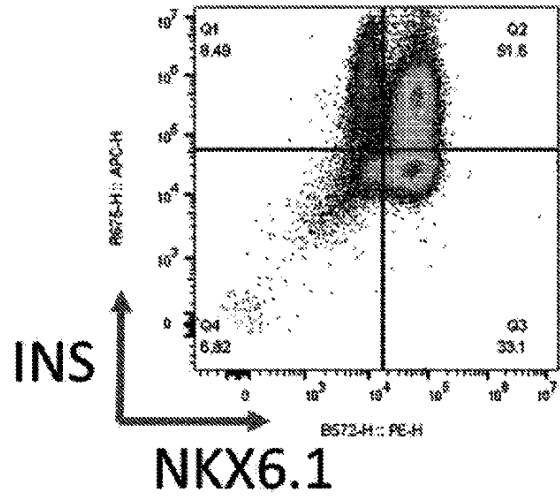


FIG. 24B

【図 25 A - 25 B】

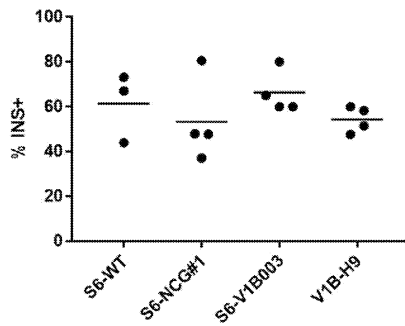


図 25A

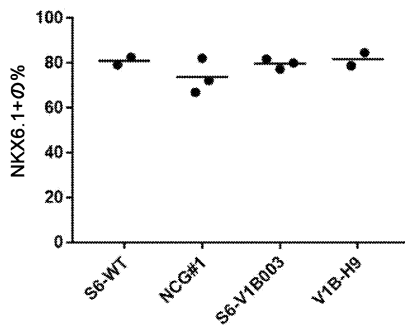


図 25B

【図 26 A】

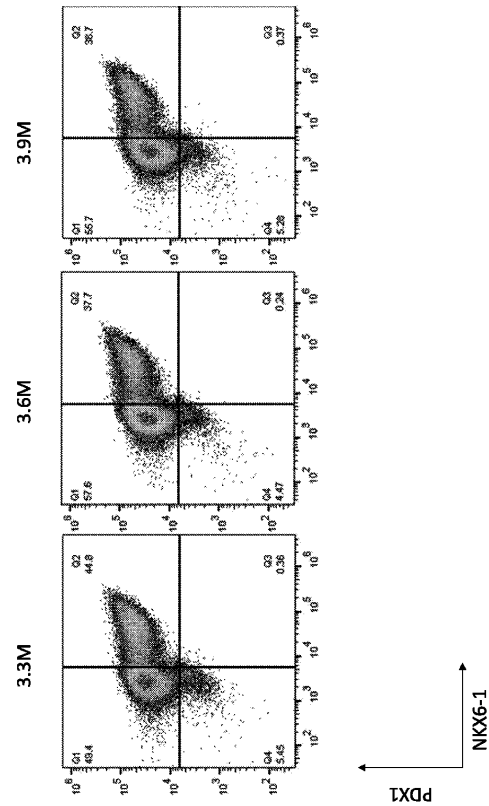


FIG. 26A

10

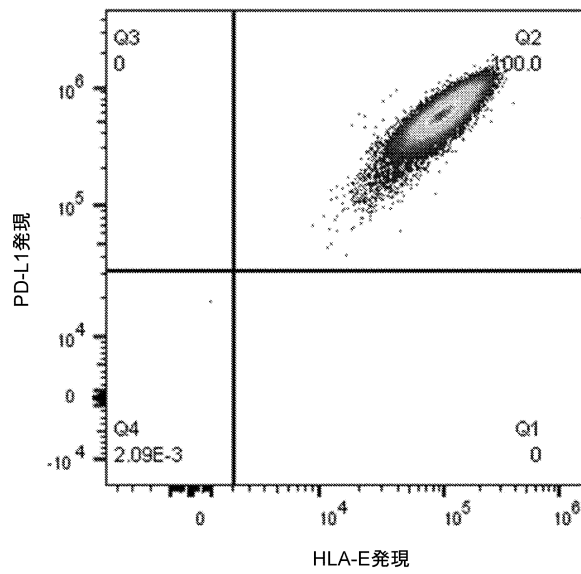
20

30

40

50

【図 26 B】



【図 27 A - 27 B】

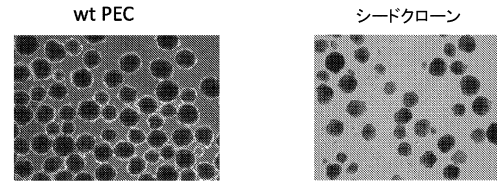
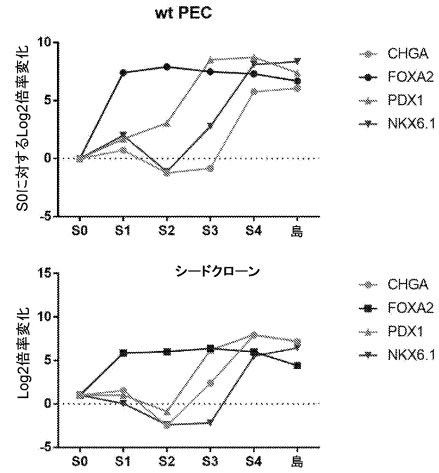


図 27A



10

20

【図 27 C】

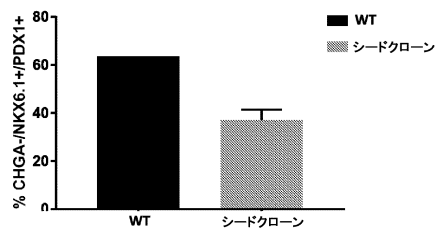


図 27C

【図 28】

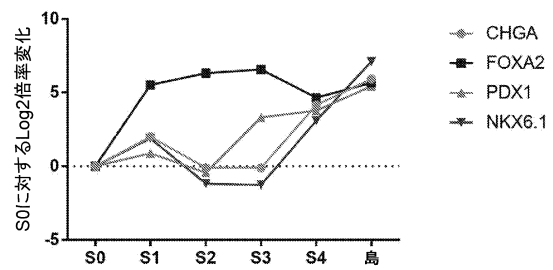


図 28

30

40

50

【配列表】

2022547053000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2020/058279

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K35/12 C12N15/85 C12N5/071 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EP0-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	V M Sluch ET AL: "CRISPR-editing of hESCs allows for production of immune evasive cells capable of differentiation to pancreatic progenitors for future type 1 diabetes therapy", 1 September 2019 (2019-09-01), XP055640694, Retrieved from the Internet: URL:https://27funs395cqh24ygs02lso4j-wpeng ine.netdna-ssl.com/wp-content/uploads/2019 /09/ViaCyte-CRISPR-EASD-Abstract-September -2019.pdf [retrieved on 2019-11-08] abstract ----- -/--	1-52
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
12 November 2020		20/11/2020
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentkan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Brero, Alessandro

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2020/058279

Q(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/076486 A1 (CELLECTIS [FR]) 25 April 2019 (2019-04-25) abstract; claims 6, 28, 33 -----	1-4, 22, 23, 25-28, 32-36, 42, 43, 45, 46, 48
X	GERMÁN G GORNALUSSE ET AL: "HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 35, no. 8, 15 May 2017 (2017-05-15), pages 765-772, XP055640664, us ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.3860 abstract; p 2-3 -----	1-4, 20-28, 32-34, 42
A	XIAO HAN ET AL: "Generation of hypoimmunogenic human pluripotent stem cells", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 116, no. 21, 30 April 2019 (2019-04-30), pages 10441-10446, XP055640699, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1902566116 the whole document -----	11-19
X,P	WO 2020/049535 A1 (CRISPER THERAPEUTICS AG [CH]; RAMOS ZAYAS REBECA [US]) 12 March 2020 (2020-03-12) abstract p 10442-10443; fig 1 -----	1-52

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2020/058279

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019076486 A1	25-04-2019	AU 2018351689 A1	30-04-2020
		AU 2018353112 A1	23-04-2020
		CA 3084476 A1	25-04-2019
		CN 111511903 A	07-08-2020
		EP 3673049 A1	01-07-2020
		EP 3684919 A1	29-07-2020
		KR 20200075851 A	26-06-2020
		US 2020237823 A1	30-07-2020
		WO 2019076486 A1	25-04-2019
		WO 2019076489 A1	25-04-2019
WO 2020049535 A1	12-03-2020	US 2020080107 A1	12-03-2020
		US 2020080114 A1	12-03-2020
		US 2020347403 A1	05-11-2020
		US 2020347411 A1	05-11-2020
		WO 2020049535 A1	12-03-2020

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K	35/39	(2015.01)	A 6 1 K	35/39	
A 6 1 K	35/30	(2015.01)	A 6 1 K	35/30	
A 6 1 K	35/34	(2015.01)	A 6 1 K	35/34	
A 6 1 K	35/14	(2015.01)	A 6 1 K	35/14	Z
A 6 1 K	35/15	(2015.01)	A 6 1 K	35/15	Z
A 6 1 K	35/22	(2015.01)	A 6 1 K	35/22	
A 6 1 K	35/36	(2015.01)	A 6 1 K	35/36	
A 6 1 K	35/407	(2015.01)	A 6 1 K	35/407	
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	5/0735	(2010.01)	C 1 2 N	5/0735	
C 1 2 N	5/074	(2010.01)	C 1 2 N	5/074	
C 1 2 N	5/0789	(2010.01)	C 1 2 N	5/0789	
C 1 2 N	5/0775	(2010.01)	C 1 2 N	5/0775	
C 1 2 N	5/0797	(2010.01)	C 1 2 N	5/0797	
C 1 2 N	5/0786	(2010.01)	C 1 2 N	5/0786	

,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,D
K,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),O
A(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,B
B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD
,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,
LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,
RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,Z
W

(72)発明者 アリレザ レザニア

アメリカ合衆国, マサチューセッツ 02139, ケンブリッジ, メイン ストリート 610, シー／オー クリスパー セラピューティクス

(72)発明者 レベッカ ラモスーザヤス

アメリカ合衆国, マサチューセッツ 02139, ケンブリッジ, メイン ストリート 610, シー／オー クリスパー セラピューティクス

F ターム (参考)

4B065 AA90X AA90Y AA93X AA93Y AB01 AC14 CA24 CA44
4C087 AA01 AA02 BB34 BB37 BB41 BB44 BB45 BB47 BB48 BB51
BB52 BB64 BB65 CA04 CA12 NA05 NA12 ZC35