

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-508720
(P2025-508720A)

(43)公表日 令和7年4月10日(2025.4.10)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 8 7
C 1 2 N	15/86 (2006.01)	C 1 2 N	15/86	Z	4 H 0 4 5
C 0 7 K	14/725 (2006.01)	C 0 7 K	14/725		
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全620頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-548363(P2024-548363)	(71)出願人	522043688	サナ バイオテクノロジー, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 1 0 2 シアトル イースト ブレイン ストリート 1 8 8 スイート 4 0 0	
(86)(22)出願日	令和5年2月17日(2023.2.17)	(74)代理人	100079108		
(85)翻訳文提出日	令和6年10月15日(2024.10.15)	(74)代理人	弁理士 稲葉 良幸		
(86)国際出願番号	PCT/US2023/013364	(74)代理人	100109346		
(87)国際公開番号	WO2023/158836	(74)代理人	弁理士 大貫 敏史	100117189 弁理士 江口 昭彦 100134120 弁理士 内藤 和彦	
(87)国際公開日	令和5年8月24日(2023.8.24)	(74)代理人	100117189		
(31)優先権主張番号	63/311,143	(74)代理人	100134120		
(32)優先日	令和4年2月17日(2022.2.17)	(72)発明者	ジョンソン, アダム ジェームズ		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			最終頁に続く	
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV			最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 遺伝子操作された C D 4 7 タンパク質及びその使用関連出願の相互参照

(57)【要約】

本開示は、遺伝子操作された C D 4 7 タンパク質及びそれらの使用を提供する。当該遺伝子操作された C D 4 7 タンパク質をコードするポリヌクレオチド、当該ポリヌクレオチドを含むベクター、当該遺伝子操作されたタンパク質及び／または当該ベクターを含む細胞、ならびに当該遺伝子操作された C D 4 7 タンパク質を含む組成物も開示される。

【選択図】 図 1

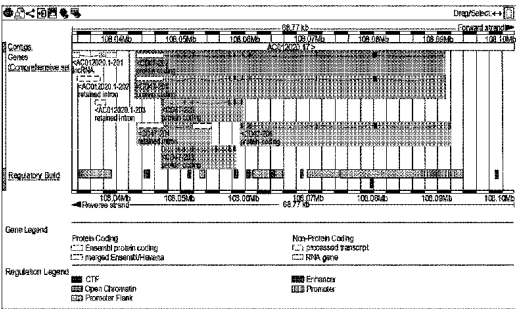


FIGURE 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 1 個以上の細胞外ドメインと、

(b) 1 個以上の膜テザーと、を含む遺伝子操作されたタンパク質をコードする 1 つ以上の核酸配列を含む核酸構築物であって、

前記 1 個以上の細胞外ドメインが、シグナル調節タンパク質 α (SIRP α) 相互作用モチーフを含み、

前記核酸構築物が、1 個以上の全長 CD 47 細胞内ドメインをコードする核酸配列を含まない、前記核酸構築物。

【請求項 2】

前記 SIRP α 相互作用モチーフが、CD 47 細胞外ドメインまたはその一部であるか、またはそれを含む、請求項 1 に記載の核酸構築物。

【請求項 3】

前記 CD 47 細胞外ドメインが、CD 47 免疫グロブリン可変部 (IgV) 様ドメインであるか、またはそれを含む、請求項 2 に記載の核酸構築物。

【請求項 4】

前記 CD 47 細胞外ドメインがヒト CD 47 細胞外ドメインである、請求項 1 または 2 に記載の核酸構築物。

【請求項 5】

前記 CD 47 細胞外ドメインが、配列番号 52 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列によりコードされる、請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 6】

前記 CD 47 細胞外ドメインが、配列番号 53 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列によりコードされる、請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 7】

前記 CD 47 細胞外ドメインが、配列番号 57 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列によりコードされる、請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 8】

前記 CD 47 細胞外ドメインが、配列番号 59 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列によりコードされる、請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 9】

前記 SIRP α 相互作用モチーフが、SIRP α 抗体またはその一部であるか、またはそれを含む、請求項 1 に記載の核酸構築物。

【請求項 10】

前記 1 個以上の膜テザーが、膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 11】

前記膜貫通ドメインが、CD 3 ζ 、CD 8 a、CD 16 a、CD 28、CD 32 a、CD 32 c、CD 40、CD 47、CD 64、ICOS、デクチン 1、DNGR 1、EGFR、GPCR、MyD88、PDGFR、SLAMF7、TRL 1、TLR 2、TLR 3、TRL 4、TLR 5、TLR 6、TLR 7、TLR 8、TLR 9、または VEGFR の膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、請求項 10 に記載の核酸構築物。

【請求項 12】

前記膜貫通ドメインが、CD 47 膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、請求項 10 または 11 に記載の核酸構築物。

【請求項 13】

前記膜貫通ドメインが、配列番号 54 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列によりコードされる、請求項 10 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 14】

前記膜貫通ドメインが、配列番号 56 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列によりコード

10

20

30

40

50

される、請求項 10～12 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 15】

前記膜貫通ドメインが、配列番号 58 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列によりコードされる、請求項 10～12 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 16】

前記膜貫通ドメインが、配列番号 60 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列によりコードされる、請求項 10～12 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 17】

前記膜貫通ドメインが、配列番号 62 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列によりコードされる、請求項 10～12 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

10

【請求項 18】

前記膜貫通ドメインが、CD8a 膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、請求項 10 または 11 に記載の核酸構築物。

【請求項 19】

前記膜貫通ドメインが、配列番号 69 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列によりコードされる、請求項 10、11、または 18 に記載の核酸構築物。

【請求項 20】

前記膜貫通ドメインが、CD28 膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、請求項 10 または 11 に記載の核酸構築物。

【請求項 21】

20

前記膜貫通ドメインが、配列番号 71 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列によりコードされる、請求項 10、11、または 20 に記載の核酸構築物。

【請求項 22】

前記膜貫通ドメインが、PDGFR 膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、請求項 10 または 11 に記載の核酸構築物。

【請求項 23】

前記膜貫通ドメインが、配列番号 73 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列によりコードされる、請求項 10、11、または 22 に記載の核酸構築物。

【請求項 24】

前記 1 個以上の膜テザーが、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーであるか、またはそれを含む、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

30

【請求項 25】

前記 GPI アンカーが、DAF / CD55 GPI アンカー、TRAILR3 GPI アンカー、または CD59 GPI アンカーであるか、またはそれを含む、請求項 24 に記載の核酸構築物。

【請求項 26】

前記 GPI アンカーが、DAF / CD55 GPI アンカーであるか、またはそれを含む、請求項 24 または 25 に記載の核酸構築物。

【請求項 27】

前記 DAF / CD55 GPI アンカーが、配列番号 65 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列によりコードされる、請求項 24～26 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

40

【請求項 28】

前記 GPI アンカーが、TRAILR3 GPI アンカーであるか、またはそれを含む、請求項 24 または 25 に記載の核酸構築物。

【請求項 29】

前記 TRAILR3 GPI アンカーが、配列番号 66 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列によりコードされる、請求項 24、25、または 28 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 30】

前記 TRAILR3 GPI アンカーが、配列番号 67 と少なくとも 80 % 同一な核酸

50

配列によりコードされる、請求項 24、25、または 28 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 31】

前記 G P I アンカーが、C D 5 9 G P I アンカーであるか、またはそれを含む、請求項 24 または 25 に記載の核酸構築物。

【請求項 32】

前記 C D 5 9 G P I アンカーが、配列番号 68 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列によりコードされる、請求項 24、25、または 31 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 33】

1 つ以上の制御配列を更に含む、請求項 1 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

10

【請求項 34】

前記 1 つ以上の制御配列が、細胞外シグナルペプチドをコードする、請求項 33 に記載の核酸構築物。

【請求項 35】

前記細胞外シグナルペプチドが、配列番号 51 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列によりコードされる、請求項 33 または 34 に記載の核酸構築物。

【請求項 36】

前記 1 つ以上の制御配列がプロモーターを含む、請求項 33 に記載の核酸構築物。

【請求項 37】

前記プロモーターが、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターである、請求項 36 に記載の核酸構築物。

20

【請求項 38】

前記プロモーターが、天然に存在するプロモーター、ハイブリッドプロモーター、または合成プロモーターである、請求項 36 または 37 に記載の核酸構築物。

【請求項 39】

前記プロモーターが、E F 1 α プロモーター、E F 1 α ショートプロモーター、C A G プロモーター、ユビキチン / S 2 7 a プロモーター、S V 4 0 初期プロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター、マウスメタロチオネイン - I プロモーター、R S V プロモーター、M M T V プロモーター、モロニー Maus 白血病ウイルス、末端反復配列領域、C M V プロモーター、アクチンプロモーター、免疫グロブリンプロモーター、熱ショックプロモーター、ポリオーマウイルスプロモーター、鶏痘ウイルスプロモーター、ウシ乳頭腫ウイルスプロモーター、トリ肉腫ウイルスプロモーター、レトロウイルスプロモーター、B 型肝炎ウイルスプロモーター、P G K プロモーター、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス 7 . 5 K プロモーター、S V 4 0 プロモーター、H S V の t k プロモーター、マウス乳癌ウイルス (M M T V) プロモーター、H I V の L T R プロモーター、モロニーウイルスのプロモーター、エプスタイン・バーウイルス (E B V) プロモーター、ラウス肉腫ウイルス (R S V) プロモーター、U 6 プロモーター、または U B C プロモーターであるか、またはそれを含む、請求項 36 ~ 38 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

30

【請求項 40】

前記プロモーターが、C A G プロモーターであるか、またはそれを含む、請求項 36 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

40

【請求項 41】

前記プロモーターが、配列番号 49 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列を含む、請求項 36 ~ 40 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 42】

前記プロモーターが、E F 1 α プロモーターであるか、またはそれを含む、請求項 36 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 43】

前記プロモーターが、配列番号 50 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列を含む、請求項

50

36～40または42のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【請求項44】

前記1つ以上の制御配列が、リボソーム結合部位、エンハンサーエレメント、アクチベーターエレメント、翻訳開始配列、翻訳終結配列、転写開始配列、転写終結配列、ポリアデニル化シグナル配列、複製エレメント、RNAプロセシング及び輸送エレメント、トランスポゾン配列、トランスポザーゼ配列、インスレーター配列、内部リボソーム進入部位(IRES)、5'UTR、3'UTR、mRNA3'末端プロセシング配列、境界エレメント、遺伝子座制御領域(LCR)、マトリックス結合領域(MAR)、組換えもしくはカセット交換用配列、リンカー配列、分泌シグナル、耐性マーカー、アンカーペプチド、局在化シグナル、融合タグ、アフィニティータグ、シャペロニン、プロテアーゼ、またはそれらの組み合わせを含む、請求項33に記載の核酸構築物。

10

【請求項45】

前記1個以上の細胞外ドメインが、細胞外ヒンジドメインを更に含む、請求項1～44のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【請求項46】

前記細胞外ヒンジドメインが、CD47ヒンジ、CD8aヒンジ、CD28ヒンジ、PDGFRヒンジ、またはIgG4ヒンジであるか、またはそれを含む、請求項45に記載の核酸構築物。

【請求項47】

前記細胞外ヒンジドメインが、CD47ヒンジであるか、またはそれを含む、請求項45または46に記載の核酸構築物。

20

【請求項48】

前記細胞外ヒンジドメインが、配列番号75と少なくとも80%同一な核酸配列によりコードされる、請求項45～47のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【請求項49】

前記細胞外ヒンジドメインが、CD8aヒンジであるか、またはそれを含む、請求項45または46に記載の核酸構築物。

【請求項50】

前記細胞外ヒンジドメインが、配列番号76と少なくとも80%同一な核酸配列によりコードされる、請求項45、46、または49に記載の核酸構築物。

30

【請求項51】

前記細胞外ヒンジドメインが、CD28ヒンジであるか、またはそれを含む、請求項45または46に記載の核酸構築物。

【請求項52】

前記細胞外ヒンジドメインが、配列番号77と少なくとも80%同一な核酸配列によりコードされる、請求項45、46、または7f51に記載の核酸構築物。

【請求項53】

前記細胞外ヒンジドメインが、PDGFRヒンジであるか、またはそれを含む、請求項45または46に記載の核酸構築物。

【請求項54】

前記細胞外ヒンジドメインが、配列番号78と少なくとも80%同一な核酸配列によりコードされる、請求項45、46、または53に記載の核酸構築物。

40

【請求項55】

前記細胞外ヒンジドメインが、IgG4ヒンジであるか、またはそれを含む、請求項45または46に記載の核酸構築物。

【請求項56】

前記細胞外ヒンジドメインが、配列番号79と少なくとも80%同一な核酸配列によりコードされる、請求項45、46、または55に記載の核酸構築物。

【請求項57】

細胞内ドメインをコードする1つ以上の核酸配列を更に含む、先行請求項のいずれか1

50

項に記載の核酸構築物。

【請求項 58】

前記細胞内ドメインが、CD47細胞内ドメインまたはその一部であるか、またはそれを含む、請求項57に記載の核酸構築物。

【請求項 59】

前記細胞内ドメインが、配列番号55と少なくとも80%同一な核酸配列によりコードされる、請求項57または58に記載の核酸構築物。

【請求項 60】

前記細胞内ドメインが、配列番号59と少なくとも80%同一な核酸配列によりコードされる、請求項57または58に記載の核酸構築物。

【請求項 61】

前記細胞内ドメインが、配列番号63と少なくとも80%同一な核酸配列によりコードされる、請求項57または58に記載の核酸構築物。

【請求項 62】

前記細胞内ドメインが、配列番号64と少なくとも80%同一な核酸配列によりコードされる、請求項57または58に記載の核酸構築物。

【請求項 63】

前記細胞内ドメインが、CD8a細胞内ドメインまたはその一部であるか、またはそれを含む、請求項57に記載の核酸構築物。

【請求項 64】

前記細胞内ドメインが、配列番号70と少なくとも80%同一な核酸配列によりコードされる、請求項57または63に記載の核酸構築物。

【請求項 65】

前記細胞内ドメインが、CD28細胞内ドメインまたはその一部であるか、またはそれを含む、請求項57に記載の核酸構築物。

【請求項 66】

前記細胞内ドメインが、配列番号72と少なくとも80%同一な核酸配列によりコードされる、請求項57または58に記載の核酸構築物。

【請求項 67】

前記細胞内ドメインが、PDGFR細胞内ドメインまたはその一部であるか、またはそれを含む、請求項57に記載の核酸構築物。

【請求項 68】

前記細胞内ドメインが、配列番号74と少なくとも80%同一な核酸配列によりコードされる、請求項57または67に記載の核酸構築物。

【請求項 69】

前記細胞内ドメインが、野生型CD47細胞内ドメインと比較して1種以上の改変を含む、請求項57～68のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【請求項 70】

前記細胞内ドメインが、野生型CD47細胞内ドメインと比較して1種以上の欠失を含む、請求項57～69のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【請求項 71】

前記細胞内ドメインが、野生型CD47細胞内ドメインと比較して1種以上の挿入を含む、請求項57～69のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【請求項 72】

前記細胞内ドメインが、野生型CD47細胞内ドメインと比較して改変された機能を含む、請求項57～71のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【請求項 73】

前記細胞内ドメインが、野生型CD47細胞内ドメインと比較して低減された機能を含む、請求項57～72のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【請求項 74】

10

20

30

40

50

前記細胞内ドメインが、野生型 C D 4 7 細胞内ドメインと比較して低減されたレベルの C D 4 7 細胞内シグナル伝達を含む、請求項 5 7 ～ 7 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 7 5】

前記細胞内ドメインが、非機能的細胞内ドメインを含む、請求項 5 7 ～ 7 4 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 7 6】

表 3 1 から選択される配列と少なくとも 8 0 % 同一な核酸配列を含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 7 7】

配列番号 1 3 と少なくとも 8 0 % 同一な核酸配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 7 8】

配列番号 1 4 と少なくとも 8 0 % 同一な核酸配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 7 9】

配列番号 1 8 と少なくとも 8 0 % 同一な核酸配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 8 0】

配列番号 1 3 3 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 8 1】

配列番号 1 3 4 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 8 2】

配列番号 1 3 5 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 8 3】

配列番号 1 3 6 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 8 4】

配列番号 1 3 7 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 8 5】

配列番号 1 3 8 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 8 6】

配列番号 1 3 9 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 8 7】

配列番号 1 4 0 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 8 8】

配列番号 1 4 1 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 8 9】

配列番号 1 4 2 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 9 0】

配列番号 1 4 3 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 の

10

20

30

40

50

いずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 9 1】

配列番号 1 4 4 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 9 2】

配列番号 1 4 5 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 9 3】

配列番号 1 4 6 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 9 4】

配列番号 1 4 7 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 9 5】

配列番号 1 4 8 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 9 6】

配列番号 1 4 9 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 9 7】

配列番号 1 5 0 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 9 8】

配列番号 1 5 1 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 9 9】

配列番号 1 5 2 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 0 0】

配列番号 1 5 3 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 0 1】

配列番号 1 5 4 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 0 2】

配列番号 1 5 5 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 0 3】

配列番号 1 5 6 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 0 4】

配列番号 1 5 7 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 0 5】

配列番号 1 5 8 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 0 6】

配列番号 1 5 9 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 0 7】

10

20

30

40

50

配列番号 160 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 108】

配列番号 161 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 109】

配列番号 162 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 110】

配列番号 163 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 111】

配列番号 164 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 112】

配列番号 165 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 113】

配列番号 166 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 114】

配列番号 167 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 115】

配列番号 168 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 116】

配列番号 169 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 117】

配列番号 170 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 118】

配列番号 171 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 119】

配列番号 172 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 120】

配列番号 173 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 121】

配列番号 174 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 122】

配列番号 175 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 123】

配列番号 176 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

10

20

30

40

50

【請求項 1 2 4】

配列番号 1 7 7 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 2 5】

配列番号 1 7 8 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 2 6】

配列番号 1 7 9 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 2 7】

配列番号 1 8 0 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 2 8】

配列番号 1 8 1 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 2 9】

配列番号 1 8 2 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 3 0】

配列番号 1 8 3 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 3 1】

配列番号 1 8 4 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 3 2】

配列番号 1 8 5 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 3 3】

配列番号 3 4 1 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 3 4】

配列番号 3 4 2 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 3 5】

表 3 3 から選択される 1 つ以上の配列と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 6 8 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 3 6】

表 3 3 及び／または表 3 1 から選択される 1 つ以上の配列と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 3 7】

配列番号 4 9 及び配列番号 1 4 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 6 8 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 3 8】

配列番号 1 4 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 6 8 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 3 9】

配列番号 4 9 及び配列番号 1 3 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 6 8 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 4 0】

配列番号 1 3 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 6 8 の

10

20

30

40

50

いずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 4 1】

配列番号 4 9 及び配列番号 1 8 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 6 8 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 4 2】

配列番号 1 8 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 6 8 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 4 3】

配列番号 5 1、5 2、5 4、5 5、5 6、及び 5 7 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 6 8 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 4 4】

配列番号 5 1、5 2、5 4、5 5、及び 5 6 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 6 8 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 4 5】

配列番号 5 1、5 2、5 4、及び 5 5 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 6 8 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 4 6】

配列番号 5 1、5 2、5 4、5 5、5 6、5 7、5 8、5 9、6 0、6 1、及び 6 2 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 6 8 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 4 7】

配列番号 5 1、5 2、5 4、5 5、5 6、5 7、5 8、5 9、6 0、及び 6 1 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 6 8 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 4 8】

配列番号 5 1、5 2、5 4、5 5、5 6、5 7、5 8、5 9、及び 6 0 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 6 8 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 4 9】

配列番号 5 1、5 2、5 4、5 5、5 6、5 7、5 8、及び 5 9 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 6 8 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 5 0】

配列番号 4 9、5 3、及び 6 5 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 6 8 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 5 1】

配列番号 5 3 及び 6 5 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 6 8 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 5 2】

配列番号 4 9、5 3、及び 6 6 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 6 8 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 5 3】

配列番号 5 3 及び 6 6 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 6 8 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 5 4】

配列番号 4 9、5 3、及び 6 7 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 6 8 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 5 5】

配列番号 5 3 及び 6 7 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 6 8 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 1 5 6】

配列番号 49、53、69、及び 70 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 157】

配列番号 53、69、及び 70 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 158】

配列番号 49、53、71、及び 72 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 8 k のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 159】

配列番号 53、71、及び 72 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

10

【請求項 160】

配列番号 49、53、73、及び 74 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 161】

配列番号 53、73、及び 74 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 162】

配列番号 49、52、78、73、及び 74 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

20

【請求項 163】

配列番号 52、78、73、及び 74 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 164】

配列番号 49、52、79、71、及び 72 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 165】

配列番号 52、79、71、及び 72 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 166】

配列番号 49、52、79、69、及び 70 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

30

【請求項 167】

配列番号 52、79、69、及び 70 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 168】

配列番号 49、52、77、71、及び 72 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 169】

配列番号 52、77、71、及び 72 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

40

【請求項 170】

配列番号 49、52、77、69、及び 70 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 171】

配列番号 52、77、69、及び 70 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 172】

配列番号 49、52、76、71、及び 72 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1 ～ 68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

50

【請求項 173】

配列番号 52、76、71、及び 72 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1～68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 174】

配列番号 49、52、76、69、及び 70 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1～68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 175】

配列番号 52、76、69、及び 70 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1～68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 176】

配列番号 49 及び 200 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1～68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 177】

配列番号 50 及び 200 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1～68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 178】

配列番号 200 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1～68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 179】

請求項 1～178 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物を含むベクター。

【請求項 180】

前記ベクターが多シストロン性ベクターである、請求項 179 に記載のベクター。

【請求項 181】

前記多シストロン性ベクターが、バイシストロン性ベクターまたはトリシストロン性ベクターである、請求項 180 に記載のベクター。

【請求項 182】

前記ベクターがプラスミドまたはウイルスベクターである、請求項 179～181 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 183】

前記ウイルスベクターが、偽型化された自己不活性化レンチウイルスベクターである、請求項 182 に記載のベクター。

【請求項 184】

請求項 1～178 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物によりコードされる遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 185】

(a) 1 個以上の細胞外ドメインと、

(b) 1 個以上の膜テザーと、を含む遺伝子操作されたタンパク質であって、

前記 1 個以上の細胞外ドメインが、シグナル調節タンパク質 α (SIRP α) 相互作用モチーフを含み、

前記遺伝子操作されたタンパク質が、1 個以上の全長 CD47 細胞内ドメインを含まない、前記遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 186】

前記 SIRP α 相互作用モチーフが、CD47 細胞外ドメインまたはその一部であるか、またはそれを含む、請求項 185 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 187】

前記 CD47 細胞外ドメインが、CD47 免疫グロブリン可変部 (IgV) 様ドメインである、請求項 186 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 188】

前記 CD47 細胞外ドメインがヒト CD47 細胞外ドメインである、請求項 185 または 186 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

10

20

30

40

50

【請求項 189】

前記CD47細胞外ドメインが、配列番号21と少なくとも80%同一なアミノ酸配列を含む、請求項186～188のいずれか1項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 190】

前記CD47細胞外ドメインが、配列番号22と少なくとも80%同一なアミノ酸配列を含む、請求項186～188のいずれか1項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 191】

前記CD47細胞外ドメインが、配列番号26と少なくとも80%同一なアミノ酸配列を含む、請求項186～188のいずれか1項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 192】

前記CD47細胞外ドメインが、配列番号30と少なくとも80%同一なアミノ酸配列を含む、請求項186～188のいずれか1項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 193】

前記SIRP α 相互作用モチーフが、SIRP α 抗体またはその一部であるか、またはそれを含む、請求項185に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 194】

前記SIRP α 抗体またはその一部が、配列番号186と少なくとも80%同一なアミノ酸配列を含む、請求項193に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 195】

前記SIRP α 抗体またはその一部が、配列番号187と少なくとも80%同一なアミノ酸配列を含む、請求項193に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 196】

前記SIRP α 抗体またはその一部が、配列番号188と少なくとも80%同一なアミノ酸配列を含む、請求項193に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 197】

前記SIRP α 抗体またはその一部が、配列番号189と少なくとも80%同一なアミノ酸配列を含む、請求項193に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 198】

前記SIRP α 抗体またはその一部が、配列番号190と少なくとも80%同一なアミノ酸配列を含む、請求項193に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 199】

前記SIRP α 抗体またはその一部が、配列番号191と少なくとも80%同一なアミノ酸配列を含む、請求項193に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 200】

前記SIRP α 抗体またはその一部が、配列番号192と少なくとも80%同一なアミノ酸配列を含む、請求項193に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 201】

前記SIRP α 抗体またはその一部が、配列番号193と少なくとも80%同一なアミノ酸配列を含む、請求項193に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 202】

前記SIRP α 抗体またはその一部が、配列番号194と少なくとも80%同一なアミノ酸配列を含む、請求項193に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 203】

前記SIRP α 抗体またはその一部が、配列番号195と少なくとも80%同一なアミノ酸配列を含む、請求項193に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 204】

前記SIRP α 抗体またはその一部が、配列番号196と少なくとも80%同一なアミノ酸配列を含む、請求項193に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 205】

前記SIRP α 抗体またはその一部が、配列番号197と少なくとも80%同一なアミ

10

20

30

40

50

ノ酸配列を含む、請求項 193 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 206】

前記 S I R P α 抗体またはその一部が、配列番号 198 と少なくとも 80 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 193 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 207】

前記 1 個以上の膜テザーが、膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、請求項 185 ~ 193 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 208】

前記膜貫通ドメインが、CD3ζ、CD8a、CD16a、CD28、CD32a、CD32c、CD40、CD47、CD64、ICOS、デクチン1、DNGR1、EGFR、GPCR、MyD88、PDGFR、SLAMF7、TRL1、TLR2、TLR3、TRL4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、またはVEGFRの膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、請求項 207 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

10

【請求項 209】

前記膜貫通ドメインが、CD47 膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、請求項 207 または 208 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 210】

前記膜貫通ドメインが、配列番号 23 と少なくとも 80 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 207 ~ 209 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

20

【請求項 211】

前記膜貫通ドメインが、配列番号 25 と少なくとも 80 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 207 ~ 209 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 212】

前記膜貫通ドメインが、配列番号 27 と少なくとも 80 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 207 ~ 209 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 213】

前記膜貫通ドメインが、配列番号 29 と少なくとも 80 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 207 ~ 209 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 214】

前記膜貫通ドメインが、配列番号 31 と少なくとも 80 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 207 ~ 209 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

30

【請求項 215】

前記膜貫通ドメインが、CD8a 膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、請求項 207 または 208 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 216】

前記膜貫通ドメインが、配列番号 38 と少なくとも 80 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 207、208、または 215 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 217】

前記膜貫通ドメインが、CD28 膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、請求項 207 または 208 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

40

【請求項 218】

前記膜貫通ドメインが、配列番号 40 と少なくとも 80 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 207、208、または 217 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 219】

前記膜貫通ドメインが、PDGFR 膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、請求項 207 または 208 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 220】

前記膜貫通ドメインが、配列番号 42 と少なくとも 80 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 207、208、または 219 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

50

【請求項 2 2 1】

前記 1 個以上の膜テザーが、グリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカーであるか、またはそれを含む、請求項 8 5 ～ 1 9 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 2 2 2】

前記 GPI アンカーが、DAF / CD 5 5 GPI アンカー、TRAIL R 3 GPI アンカー、または CD 5 9 GPI アンカーであるか、またはそれを含む、請求項 2 2 1 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 2 2 3】

前記 GPI アンカーが、DAF / CD 5 5 GPI アンカーであるか、またはそれを含む、請求項 2 2 1 または 2 2 2 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。 10

【請求項 2 2 4】

前記 DAF / CD 5 5 GPI アンカーが、配列番号 3 4 と少なくとも 8 0 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 2 2 1 ～ 2 2 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 2 2 5】

前記 GPI アンカーが、TRAIL R 3 GPI アンカーであるか、またはそれを含む、請求項 2 2 1 または 2 2 2 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 2 2 6】

前記 TRAIL R 3 GPI アンカーが、配列番号 3 5 と少なくとも 8 0 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 2 2 1、2 2 2、または 2 2 5 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。 20

【請求項 2 2 7】

前記 TRAIL R 3 GPI アンカーが、配列番号 3 6 と少なくとも 8 0 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 2 2 1、2 2 2、または 2 2 5 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 2 2 8】

前記 GPI アンカーが、CD 5 9 GPI アンカーであるか、またはそれを含む、請求項 2 2 1 または 2 2 2 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 2 2 9】

前記 CD 5 9 GPI アンカーが、配列番号 3 7 と少なくとも 8 0 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 2 2 1、2 2 2、または 2 2 8 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。 30

【請求項 2 3 0】

細胞外シグナルペプチドを更に含む、請求項 1 8 5 ～ 2 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 2 3 1】

前記細胞外シグナルペプチドが、配列番号 2 0 と少なくとも 8 0 % 同一な核酸配列によりコードされる、請求項 2 3 0 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 2 3 2】

前記 1 個以上の細胞外ドメインが、細胞外ヒンジドメインを更に含む、請求項 1 8 5 ～ 2 3 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。 40

【請求項 2 3 3】

前記細胞外ヒンジドメインが、CD 4 7 ヒンジ、CD 8 a ヒンジ、CD 2 8 ヒンジ、PDGFR ヒンジ、または Ig G 4 ヒンジであるか、またはそれを含む、請求項 2 3 2 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 2 3 4】

前記細胞外ヒンジドメインが、CD 4 7 ヒンジであるか、またはそれを含む、請求項 2 3 2 または 1 7 a に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 2 3 5】

前記細胞外ヒンジドメインが、配列番号 44 と少なくとも 80 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 232 ~ 234 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 236】

前記細胞外ヒンジドメインが、CD8a ヒンジであるか、またはそれを含む、請求項 232 または 233 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 237】

前記細胞外ヒンジドメインが、配列番号 45 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列を含む、請求項 232、233、または 236 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 238】

前記細胞外ヒンジドメインが、CD28 ヒンジであるか、またはそれを含む、請求項 232 または 233 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 239】

前記細胞外ヒンジドメインが、配列番号 46 と少なくとも 80 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 232、233、または 238 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 240】

前記細胞外ヒンジドメインが、PDGFR ヒンジであるか、またはそれを含む、請求項 232 または 233 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 241】

前記細胞外ヒンジドメインが、配列番号 47 と少なくとも 80 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 232、233、または 240 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 242】

前記細胞外ヒンジドメインが、IgG4 ヒンジであるか、またはそれを含む、請求項 232 または 233 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 243】

前記細胞外ヒンジドメインが、配列番号 48 と少なくとも 80 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 232、233、または 242 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 244】

細胞内ドメインを更に含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 245】

前記細胞内ドメインが、CD47 細胞内ドメインまたはその一部であるか、またはそれを含む、請求項 244 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 246】

前記細胞内ドメインが、配列番号 24 と少なくとも 80 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 244 または 245 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 247】

前記細胞内ドメインが、配列番号 28 と少なくとも 80 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 244 または 245 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 248】

前記細胞内ドメインが、配列番号 32 と少なくとも 80 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 244 または 245 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 249】

前記細胞内ドメインが、配列番号 33 と少なくとも 80 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 244 または 245 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 250】

前記細胞内ドメインが、CD8a 細胞内ドメインまたはその一部であるか、またはそれを含む、請求項 244 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 251】

前記細胞内ドメインが、配列番号 39 と少なくとも 80 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 244 または 250 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 2 5 2】

前記細胞内ドメインが、C D 2 8 細胞内ドメインまたはその一部であるか、またはそれを含む、請求項 2 4 4 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 2 5 3】

前記細胞内ドメインが、配列番号 4 1 と少なくとも 8 0 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 2 4 4 または 2 4 5 に記載の遺伝子操作されたタンパク質構築物。

【請求項 2 5 4】

前記細胞内ドメインが、P D G F R 細胞内ドメインまたはその一部であるか、またはそれを含む、請求項 2 4 4 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 2 5 5】

前記細胞内ドメインが、配列番号 4 3 と少なくとも 8 0 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 2 4 4 または 2 5 4 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 2 5 6】

前記細胞内ドメインが、野生型 C D 4 7 細胞内ドメインと比較して 1 種以上の改変を含む、請求項 2 4 4 ~ 2 5 5 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 2 5 7】

前記細胞内ドメインが、野生型 C D 4 7 細胞内ドメインと比較して 1 種以上の欠失を含む、請求項 2 4 4 ~ 2 5 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 2 5 8】

前記細胞内ドメインが、野生型 C D 4 7 細胞内ドメインと比較して 1 種以上の挿入を含む、請求項 2 4 4 ~ 2 5 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 2 5 9】

前記細胞内ドメインが、野生型 C D 4 7 細胞内ドメインと比較して改変された機能を含む、請求項 2 4 4 ~ 2 5 8 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 2 6 0】

前記細胞内ドメインが、野生型 C D 4 7 細胞内ドメインと比較して低減された機能を含む、請求項 2 4 4 ~ 2 5 9 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 2 6 1】

前記細胞内ドメインが、野生型 C D 4 7 細胞内ドメインと比較して低減されたレベルの C D 4 7 細胞内シグナル伝達を含む、請求項 2 4 4 ~ 2 6 0 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 2 6 2】

前記細胞内ドメインが、非機能的細胞内ドメインを含む、請求項 2 4 4 ~ 2 6 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 2 6 3】

表 3 0 から選択される配列と少なくとも 8 0 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 1 8 5 ~ 2 6 2 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 2 6 4】

配列番号 1 と少なくとも 8 0 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 1 8 5 ~ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 2 6 5】

配列番号 2 と少なくとも 8 0 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 1 8 5 ~ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 2 6 6】

配列番号 6 と少なくとも 8 0 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 1 8 5 ~ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 2 6 7】

配列番号 8 0 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ~ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 2 6 8】

配列番号 8 1 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 2 6 9】

配列番号 8 2 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 2 7 0】

配列番号 8 3 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 2 7 1】

配列番号 8 4 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 2 7 2】

配列番号 8 5 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 2 7 3】

配列番号 8 6 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 2 7 4】

配列番号 8 7 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 2 7 5】

配列番号 8 8 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 2 7 6】

配列番号 8 9 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 2 7 7】

配列番号 9 0 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 2 7 8】

配列番号 9 1 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 2 7 9】

配列番号 9 2 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 2 8 0】

配列番号 9 3 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 2 8 1】

配列番号 9 4 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 2 8 2】

配列番号 9 5 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 2 8 3】

配列番号 9 6 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 2 8 4】

配列番号 9 7 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

10

20

30

40

50

【請求項 285】

配列番号 98 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 185 ～ 263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 286】

配列番号 99 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 185 ～ 263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 287】

配列番号 100 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 185 ～ 263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 288】

配列番号 101 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 185 ～ 263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 289】

配列番号 102 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 185 ～ 263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 290】

配列番号 103 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 185 ～ 263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 291】

配列番号 104 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 185 ～ 263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 292】

配列番号 105 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 185 ～ 263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 293】

配列番号 106 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 185 ～ 263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 294】

配列番号 107 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 185 ～ 263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 295】

配列番号 108 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 185 ～ 263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 296】

配列番号 109 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 185 ～ 263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 297】

配列番号 110 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 185 ～ 263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 298】

配列番号 111 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 185 ～ 263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 299】

配列番号 112 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 185 ～ 263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 300】

配列番号 113 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 185 ～ 263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 301】

配列番号 114 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 185 ～ 2

10

20

30

40

50

6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 3 0 2】

配列番号 1 1 5 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 3 0 3】

配列番号 1 1 6 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 3 0 4】

配列番号 1 1 7 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 3 0 5】

配列番号 1 1 8 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 3 0 6】

配列番号 1 1 9 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 3 0 7】

配列番号 1 2 0 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 3 0 8】

配列番号 1 2 1 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 3 0 9】

配列番号 1 2 2 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 3 1 0】

配列番号 1 2 3 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 3 1 1】

配列番号 1 2 4 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 3 1 2】

配列番号 1 2 5 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 3 1 3】

配列番号 1 2 6 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 3 1 4】

配列番号 1 2 7 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 3 1 5】

配列番号 1 2 8 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 3 1 6】

配列番号 1 2 9 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 3 1 7】

配列番号 1 3 0 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 6 3 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 3 1 8】

10

20

30

40

50

配列番号 131 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 185 ～ 263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 319】

配列番号 132 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 185 ～ 263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 320】

配列番号 340 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 185 ～ 263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【請求項 321】

表 32 から選択される 1 つ以上の配列と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 185 ～ 255 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

10

【請求項 322】

表 32 及び／または表 30 から選択される 1 つ以上の配列と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 323】

配列番号 20、21、23、24、25、及び 26 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 185 ～ 255 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 324】

配列番号 20、21、23、24、及び 25 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 185 ～ 255 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

20

【請求項 325】

配列番号 20、21、23、及び 24 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 185 ～ 255 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 326】

配列番号 20、21、23、24、25、26、27、28、29、30、及び 31 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 185 ～ 255 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

30

【請求項 327】

配列番号 20、21、23、24、25、26、27、28、29、及び 30 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 185 ～ 255 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 328】

配列番号 20、21、23、24、25、26、27、28、及び 29 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 185 ～ 255 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 329】

配列番号 20、21、23、24、25、26、27、及び 28 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 185 ～ 255 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

40

【請求項 330】

配列番号 22 及び 34 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 185 ～ 255 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 331】

配列番号 22 及び 35 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 185 ～ 255 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 332】

配列番号 22 及び 36 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求

50

項 1 8 5 ～ 2 5 5 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 3 3 3】

配列番号 2 2、3 8、及び 3 9 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 5 5 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 3 3 4】

配列番号 2 2、4 0、及び 4 1 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 5 5 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 3 3 5】

配列番号 2 2、4 2、及び 4 3 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 5 5 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

10

【請求項 3 3 6】

配列番号 2 1、4 7、4 2、及び 4 3 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 5 5 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 3 3 7】

配列番号 2 1、4 8、4 0、及び 4 1 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 5 5 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 3 3 8】

配列番号 2 1、4 8、3 8、及び 3 9 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 5 5 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 3 3 9】

配列番号 2 1、4 6、4 0、及び 4 1 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 5 5 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

20

【請求項 3 4 0】

配列番号 2 1、4 6、3 8、及び 3 9 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 5 5 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 3 4 1】

配列番号 2 1、4 5、4 0、及び 4 1 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 5 5 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 3 4 2】

配列番号 2 1、4 5、3 8、及び 3 9 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 1 8 5 ～ 2 5 5 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

30

【請求項 3 4 3】

野生型ヒト CD 4 7 タンパク質と比べてより少ないグリコシル化修飾部位を含む、請求項 1 8 5 ～ 3 4 2 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 3 4 4】

前記遺伝子操作されたタンパク質が、N 2 0 6 グリコシル化部位を含まない、請求項 3 4 3 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【請求項 3 4 5】

請求項 1 8 5 ～ 3 4 4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質を含む遺伝子操作された細胞。

40

【請求項 3 4 6】

遺伝子操作されたタンパク質をコードする第 1 の導入遺伝子を含む遺伝子操作された細胞であって、

前記遺伝子操作されたタンパク質が、

(a) 1 個以上の細胞外ドメインと、

(b) 1 個以上の膜テザーと、を含み、

前記 1 個以上の細胞外ドメインが、シグナル調節タンパク質 α (SIRP α) 相互作用モチーフを含み、

前記遺伝子操作されたタンパク質が、1 個以上の全長 CD 4 7 細胞内ドメインを含まない、前記遺伝子操作された細胞。

50

【請求項 3 4 7】

前記 S I R P α 相互作用モチーフが、C D 4 7 細胞外ドメインまたはその一部であるか、またはそれを含む、請求項 3 4 6 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 3 4 8】

前記 C D 4 7 細胞外ドメインが、C D 4 7 免疫グロブリン可変部 (I g V) 様ドメインである、請求項 3 4 7 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 3 4 9】

前記 C D 4 7 細胞外ドメインがヒト C D 4 7 細胞外ドメインである、請求項 2 3 または 3 4 7 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 3 5 0】

前記 C D 4 7 細胞外ドメインが前記第 1 の導入遺伝子によりコードされ、前記第 1 の導入遺伝子が配列番号 5 2 と少なくとも 8 0 % 同一な核酸配列を含む、請求項 3 4 7 ~ 3 4 9 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 3 5 1】

前記 C D 4 7 細胞外ドメインが前記第 1 の導入遺伝子によりコードされ、前記第 1 の導入遺伝子が配列番号 5 3 と少なくとも 8 0 % 同一な核酸配列を含む、請求項 3 4 7 ~ 3 4 9 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 3 5 2】

前記 C D 4 7 細胞外ドメインが、配列番号 5 7 と少なくとも 8 0 % 同一な核酸配列によりコードされる、請求項 3 4 7 ~ 3 4 9 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 3 5 3】

前記 C D 4 7 細胞外ドメインが、配列番号 5 9 と少なくとも 8 0 % 同一な核酸配列によりコードされる、請求項 3 4 7 ~ 3 4 9 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 3 5 4】

前記 S I R P α 相互作用モチーフが、S I R P α 抗体またはその一部であるか、またはそれを含む、請求項 3 4 6 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 3 5 5】

前記 1 個以上の膜テザーが、膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、請求項 3 4 6 ~ 3 5 4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 3 5 6】

前記膜貫通ドメインが、C D 3 ζ 、C D 8 a、C D 1 6 a、C D 2 8、C D 3 2 a、C D 3 2 c、C D 4 0、C D 4 7、C D 6 4、I C O S、デクチン 1、D N G R 1、E G F R、G P C R、M y D 8 8、P D G F R、S L A M F 7、T R L 1、T L R 2、T L R 3、T R L 4、T L R 5、T L R 6、T L R 7、T L R 8、T L R 9、または V E G F R の膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、請求項 3 5 5 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 3 5 7】

前記膜貫通ドメインが、C D 4 7 膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、請求項 3 5 5 または 3 5 6 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 3 5 8】

前記膜貫通ドメインが前記第 1 の導入遺伝子によりコードされ、前記第 1 の導入遺伝子が配列番号 5 4 と少なくとも 8 0 % 同一な核酸配列を含む、請求項 3 5 5 ~ 3 5 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 3 5 9】

前記膜貫通ドメインが前記第 1 の導入遺伝子によりコードされ、前記第 1 の導入遺伝子が配列番号 5 6 と少なくとも 8 0 % 同一な核酸配列を含む、請求項 3 5 5 ~ 3 5 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 3 6 0】

前記膜貫通ドメインが前記第 1 の導入遺伝子によりコードされ、前記第 1 の導入遺伝子が配列番号 5 8 と少なくとも 8 0 % 同一な核酸配列を含む、請求項 3 5 5 ~ 3 5 7 のい

10

20

30

40

50

れか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 3 6 1】

前記膜貫通ドメインが前記第 1 の導入遺伝子によりコードされ、前記第 1 の導入遺伝子が配列番号 6 0 と少なくとも 8 0 % 同一な核酸配列を含む、請求項 3 5 5 ～ 3 5 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 3 6 2】

前記膜貫通ドメインが前記第 1 の導入遺伝子によりコードされ、前記第 1 の導入遺伝子が配列番号 6 2 と少なくとも 8 0 % 同一な核酸配列を含む、請求項 3 5 5 ～ 3 5 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 3 6 3】

前記膜貫通ドメインが、CD 8 a 膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、請求項 3 5 5 または 3 5 6 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 3 6 4】

前記膜貫通ドメインが前記第 1 の導入遺伝子によりコードされ、前記第 1 の導入遺伝子が配列番号 6 9 と少なくとも 8 0 % 同一な核酸配列を含む、請求項 3 5 5、3 5 6、または 3 6 3 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 3 6 5】

前記膜貫通ドメインが、CD 2 8 膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、請求項 3 5 5 または 3 5 6 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 3 6 6】

前記膜貫通ドメインが前記第 1 の導入遺伝子によりコードされ、前記第 1 の導入遺伝子が配列番号 7 1 と少なくとも 8 0 % 同一な核酸配列を含む、請求項 3 5 5、3 5 6、または 3 6 5 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 3 6 7】

前記膜貫通ドメインが、PDGFR 膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、請求項 3 5 5 または 3 5 6 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 3 6 8】

前記膜貫通ドメインが前記第 1 の導入遺伝子によりコードされ、前記第 1 の導入遺伝子が配列番号 7 3 と少なくとも 8 0 % 同一な核酸配列を含む、請求項 3 5 5、3 5 6、または 3 6 7 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 3 6 9】

前記 1 個以上の膜テザーが、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーであるか、またはそれを含む、請求項 3 4 6 ～ 3 5 4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 3 7 0】

前記 GPI アンカーが、DAF / CD 5 5 GPI アンカー、TRAILR 3 GPI アンカー、または CD 5 9 GPI アンカーであるか、またはそれを含む、請求項 3 6 9 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 3 7 1】

前記 GPI アンカーが、DAF / CD 5 5 GPI アンカーであるか、またはそれを含む、請求項 3 6 9 または 3 7 0 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 3 7 2】

前記 DAF / CD 5 5 GPI アンカーが前記第 1 の導入遺伝子によりコードされ、前記第 1 の導入遺伝子が配列番号 6 5 と少なくとも 8 0 % 同一な核酸配列を含む、請求項 3 6 9 ～ 3 7 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 3 7 3】

前記 GPI アンカーが、TRAILR 3 GPI アンカーであるか、またはそれを含む、請求項 3 6 9 または 3 7 0 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 3 7 4】

前記 TRAILR 3 GPI アンカーが前記第 1 の導入遺伝子によりコードされ、前記

10

20

30

40

50

第1の導入遺伝子が配列番号66と少なくとも80%同一な核酸配列を含む、請求項369、370、または373のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項375】

前記TRAILR3 GPIアンカーが前記第1の導入遺伝子によりコードされ、前記第1の導入遺伝子が配列番号67と少なくとも80%同一な核酸配列を含む、請求項369、370、または373のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項376】

前記GPIアンカーが、CD59 GPIアンカーであるか、またはそれを含む、請求項369または370に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項377】

前記CD59 GPIアンカーが前記第1の導入遺伝子によりコードされ、前記第1の導入遺伝子が配列番号68と少なくとも80%同一な核酸配列を含む、請求項369、370、または376のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項378】

1つ以上の制御配列を更に含む、請求項346～369のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項379】

前記1つ以上の制御配列が、細胞外シグナルペプチドをコードする、請求項378に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項380】

前記細胞外シグナルペプチドが前記第1の導入遺伝子によりコードされ、前記第1の導入遺伝子が配列番号51と少なくとも80%同一な核酸配列を含む、請求項378または379に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項381】

前記1つ以上の制御配列がプロモーターを含む、請求項378に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項382】

前記プロモーターが、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターである、請求項381に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項383】

前記プロモーターが、天然に存在するプロモーター、ハイブリッドプロモーター、または合成プロモーターである、請求項381または382に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項384】

前記プロモーターが、EF1 α プロモーター、EF1 α ショートプロモーター、CAGプロモーター、ユビキチン/S27aプロモーター、SV40初期プロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター、マウスメタロチオネイン-Iプロモーター、RSVプロモーター、MMTVプロモーター、モロニー Maus 白血病ウイルス、末端反復配列領域、CMVプロモーター、アクチンプロモーター、免疫グロブリンプロモーター、熱ショックプロモーター、ポリオマウイルスプロモーター、鶏痘ウイルスプロモーター、ウシ乳頭腫ウイルスプロモーター、トリ肉腫ウイルスプロモーター、レトロウイルスプロモーター、B型肝炎ウイルスプロモーター、PGKプロモーター、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター、SV40プロモーター、HSVのtkプロモーター、マウス乳癌ウイルス(MMTV)プロモーター、HIVのLTRプロモーター、モロニーウイルスのプロモーター、エプスタイン・バーウイルス(EBV)プロモーター、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター、またはUBCプロモーターであるか、またはそれを含む、請求項381～383のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項385】

前記プロモーターが、CAGプロモーターであるか、またはそれを含む、請求項381～384のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 386】

前記第1の導入遺伝子が前記プロモーターを含み、前記プロモーターが、配列番号49と少なくとも80%同一な核酸配列を含む、請求項381～385のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 387】

前記プロモーターが、EF1 α プロモーターであるか、またはそれを含む、請求項381～384のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 388】

前記第1の導入遺伝子が前記プロモーターを含み、前記プロモーターが、配列番号50と少なくとも80%同一な核酸配列を含む、請求項381～385または387のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

10

【請求項 389】

前記1つ以上の制御配列が、リボソーム結合部位、エンハンサーエレメント、アクチベーターエレメント、翻訳開始配列、翻訳終結配列、転写開始配列、転写終結配列、ポリアデニル化シグナル配列、複製エレメント、RNAプロセシング及び輸送エレメント、トランスポゾン配列、トランスポザーゼ配列、インスレーター配列、内部リボソーム進入部位(IRES)、5'UTR、3'UTR、mRNA3'末端プロセシング配列、境界エレメント、遺伝子座制御領域(LCR)、マトリックス結合領域(MAR)、組換えもしくはカセット交換用配列、リンカー配列、分泌シグナル、耐性マーカー、アンカーペプチド、局在化シグナル、融合タグ、アフィニティータグ、シャペロニン、プロテアーゼ、またはそれらの組み合わせを含む、請求項378に記載の遺伝子操作された細胞。

20

【請求項 390】

前記1個以上の細胞外ドメインが、細胞外ヒンジドメインを更に含む、請求項346～389のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 391】

前記細胞外ヒンジドメインが、CD47ヒンジ、CD8aヒンジ、CD28ヒンジ、PDGFRヒンジ、またはIgG4ヒンジであるか、またはそれを含む、請求項390に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 392】

前記細胞外ヒンジドメインが、CD47ヒンジであるか、またはそれを含む、請求項390または391に記載の遺伝子操作された細胞。

30

【請求項 393】

前記細胞外ヒンジドメインが前記第1の導入遺伝子によりコードされ、前記第1の導入遺伝子が配列番号75と少なくとも80%同一な核酸配列を含む、請求項390～392のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 394】

前記細胞外ヒンジドメインが、CD8aヒンジであるか、またはそれを含む、請求項390または391に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 395】

前記細胞外ヒンジドメインが前記第1の導入遺伝子によりコードされ、前記第1の導入遺伝子が配列番号76と少なくとも80%同一な核酸配列を含む、請求項390、391、または394に記載の遺伝子操作された細胞。

40

【請求項 396】

前記細胞外ヒンジドメインが、CD28ヒンジであるか、またはそれを含む、請求項390または391に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 397】

前記細胞外ヒンジドメインが前記第1の導入遺伝子によりコードされ、前記第1の導入遺伝子が配列番号77と少なくとも80%同一な核酸配列を含む、請求項390、391、または396に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 398】

50

前記細胞外ヒンジドメインが、PDGFRヒンジであるか、またはそれを含む、請求項 390 または 391 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 399】

前記細胞外ヒンジドメインが前記第 1 の導入遺伝子によりコードされ、前記第 1 の導入遺伝子が配列番号 78 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列を含む、請求項 390、391、または 398 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 400】

前記細胞外ヒンジドメインが、IgG4ヒンジであるか、またはそれを含む、請求項 390 または 391 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 401】

前記細胞外ヒンジドメインが前記第 1 の導入遺伝子によりコードされ、前記第 1 の導入遺伝子が配列番号 79 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列を含む、請求項 390、391、または 400 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 402】

前記第 1 の導入遺伝子が、細胞内ドメインをコードする 1 つ以上の核酸配列を更に含む、請求項 346 ~ 401 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 403】

前記細胞内ドメインが、CD47細胞内ドメインまたはその一部であるか、またはそれを含む、請求項 402 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 404】

前記細胞内ドメインが前記第 1 の導入遺伝子によりコードされ、前記第 1 の導入遺伝子が配列番号 55 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列を含む、請求項 402 または 403 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 405】

前記細胞内ドメインが前記第 1 の導入遺伝子によりコードされ、前記第 1 の導入遺伝子が配列番号 59 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列を含む、請求項 402 または 403 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 406】

前記細胞内ドメインが前記第 1 の導入遺伝子によりコードされ、前記第 1 の導入遺伝子が配列番号 63 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列を含む、請求項 402 または 403 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 407】

前記細胞内ドメインが前記第 1 の導入遺伝子によりコードされ、前記第 1 の導入遺伝子が配列番号 64 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列を含む、請求項 402 または 403 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 408】

前記細胞内ドメインが、CD8a細胞内ドメインまたはその一部であるか、またはそれを含む、請求項 402 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 409】

前記細胞内ドメインが前記第 1 の導入遺伝子によりコードされ、前記第 1 の導入遺伝子が配列番号 70 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列を含む、請求項 402 または 408 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 410】

前記細胞内ドメインが、CD28細胞内ドメインまたはその一部であるか、またはそれを含む、請求項 402 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 411】

前記細胞内ドメインが前記第 1 の導入遺伝子によりコードされ、前記第 1 の導入遺伝子が配列番号 72 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列を含む、請求項 402 または 403 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 412】

10

20

30

40

50

前記細胞内ドメインが、PDGFR細胞内ドメインまたはその一部であるか、またはそれを含む、請求項402に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項413】

前記細胞内ドメインが前記第1の導入遺伝子によりコードされ、前記第1の導入遺伝子が配列番号74と少なくとも80%同一な核酸配列を含む、請求項402または412に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項414】

前記細胞内ドメインが、野生型CD47細胞内ドメインと比較して1種以上の改変を含む、請求項402～413のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項415】

前記細胞内ドメインが、野生型CD47細胞内ドメインと比較して1種以上の欠失を含む、請求項402～414のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項416】

前記細胞内ドメインが、野生型CD47細胞内ドメインと比較して1種以上の挿入を含む、請求項402～414のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項417】

前記細胞内ドメインが、野生型CD47細胞内ドメインと比較して改変された機能を含む、請求項402～416のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項418】

前記細胞内ドメインが、野生型CD47細胞内ドメインと比較して低減された機能を含む、請求項402～417のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項419】

前記細胞内ドメインが、野生型CD47細胞内ドメインと比較して低減されたレベルのCD47細胞内シグナル伝達を含む、請求項402～418のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項420】

前記細胞内ドメインが、非機能的細胞内ドメインを含む、請求項402～419のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項421】

前記第1の導入遺伝子が、表31から選択される配列と少なくとも80%同一なアミノ酸配列を含む、請求項346～420のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項422】

前記第1の導入遺伝子が、配列番号13と少なくとも80%同一な核酸配列を含む、請求項346～421のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項423】

前記第1の導入遺伝子が、配列番号14と少なくとも80%同一な核酸配列を含む、請求項346～421のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項424】

前記第1の導入遺伝子が、配列番号18と少なくとも80%同一な核酸配列を含む、請求項346～421のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項425】

配列番号133と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、請求項346～421のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項426】

配列番号134と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、請求項346～421のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項427】

配列番号135と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、請求項346～421のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項428】

10

20

30

40

50

50

【請求項 4 4 5】

配列番号 1 5 3 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ～ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 4 6】

配列番号 1 5 4 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ～ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 4 7】

配列番号 1 5 5 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ～ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 4 8】

配列番号 1 5 6 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ～ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 4 9】

配列番号 1 5 7 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ～ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 5 0】

配列番号 1 5 8 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ～ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 5 1】

配列番号 1 5 9 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ～ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 5 2】

配列番号 1 6 0 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ～ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 5 3】

配列番号 1 6 1 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ～ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 5 4】

配列番号 1 6 2 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ～ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 5 5】

配列番号 1 6 3 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ～ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 5 6】

配列番号 1 6 4 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ～ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 5 7】

配列番号 1 6 5 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ～ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 5 8】

配列番号 1 6 6 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ～ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 5 9】

配列番号 1 6 7 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ～ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 6 0】

配列番号 1 6 8 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ～ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 6 1】

配列番号 1 6 9 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ～ 4

10

20

30

40

50

2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 6 2】

配列番号 1 7 0 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 6 3】

配列番号 1 7 1 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 6 4】

配列番号 1 7 2 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 6 5】

配列番号 1 7 3 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 6 6】

配列番号 1 7 4 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 6 7】

配列番号 1 7 5 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 6 8】

配列番号 1 7 6 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 6 9】

配列番号 1 7 7 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 7 0】

配列番号 1 7 8 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 7 1】

配列番号 1 7 9 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 7 2】

配列番号 1 8 0 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 7 3】

配列番号 1 8 1 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 7 4】

配列番号 1 8 2 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 7 5】

配列番号 1 8 3 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 7 6】

配列番号 1 8 4 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 7 7】

配列番号 1 8 5 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 7 8】

10

20

30

40

50

配列番号 3 4 1 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 7 9】

配列番号 3 4 2 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 8 0】

前記第 1 の導入遺伝子が、表 3 3 から選択される 1 つ以上の配列と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 8 1】

前記第 1 の導入遺伝子が、表 3 3 及び／または表 3 1 から選択される 1 つ以上の配列と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 4 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 8 2】

前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 4 9 及び配列番号 1 4 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 8 3】

前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 1 4 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 8 4】

前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 4 9 及び配列番号 1 3 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 8 5】

前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 1 3 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 8 6】

前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 4 9 及び配列番号 1 8 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 8 7】

前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 1 8 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 8 8】

前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 5 1、5 2、5 4、5 5、5 6、及び 5 7 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 8 9】

前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 5 1、5 2、5 4、5 5、及び 5 6 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 9 0】

前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 5 1、5 2、5 4、及び 5 5 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 9 1】

前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 5 1、5 2、5 4、5 5、5 6、5 7、5 8、5 9、6 0、6 1、及び 6 2 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 4 9 2】

前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 5 1、5 2、5 4、5 5、5 6、5 7、5 8、5 9、6 0、及び 6 1 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 9 3】

前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 5 1、5 2、5 4、5 5、5 6、5 7、5 8、5 9、及び 6 0 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 9 4】

前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 5 1、5 2、5 4、5 5、5 6、5 7、5 8、及び 5 9 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

10

【請求項 4 9 5】

前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 4 9、5 3、及び 6 5 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 9 6】

前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 5 3 及び 6 5 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 9 7】

前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 4 9、5 3、及び 6 6 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

20

【請求項 4 9 8】

前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 5 3 及び 6 6 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 4 9 9】

前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 4 9、5 3、及び 6 7 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

30

【請求項 5 0 0】

前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 5 3 及び 6 7 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 0 1】

前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 4 9、5 3、6 9、及び 7 0 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 0 2】

前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 5 3、6 9、及び 7 0 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

40

【請求項 5 0 3】

前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 4 9、5 3、7 1、及び 7 2 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 0 4】

前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 5 3、7 1、及び 7 2 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 0 5】

50

前記第1の導入遺伝子が、配列番号49、53、73、及び74と少なくとも80%同一な1つ以上の核酸配列を含む、請求項346～413のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項506】

前記第1の導入遺伝子が、配列番号53、73、及び74と少なくとも80%同一な1つ以上の核酸配列を含む、請求項346～413のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項507】

前記第1の導入遺伝子が、配列番号49、52、78、73、及び74と少なくとも80%同一な1つ以上の核酸配列を含む、請求項346～413のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項508】

前記第1の導入遺伝子が、配列番号52、78、73、及び74と少なくとも80%同一な1つ以上の核酸配列を含む、請求項346～413のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項509】

前記第1の導入遺伝子が、配列番号49、52、79、71、及び72と少なくとも80%同一な1つ以上の核酸配列を含む、請求項346～413のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項510】

前記第1の導入遺伝子が、配列番号52、79、71、及び72と少なくとも80%同一な1つ以上の核酸配列を含む、請求項346～413のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項511】

前記第1の導入遺伝子が、配列番号49、52、79、69、及び70と少なくとも80%同一な1つ以上の核酸配列を含む、請求項346～413のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項512】

前記第1の導入遺伝子が、配列番号52、79、69、及び70と少なくとも80%同一な1つ以上の核酸配列を含む、請求項346～413のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項513】

前記第1の導入遺伝子が、配列番号49、52、77、71、及び72と少なくとも80%同一な1つ以上の核酸配列を含む、請求項346～413のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項514】

前記第1の導入遺伝子が、配列番号52、77、71、及び72と少なくとも80%同一な1つ以上の核酸配列を含む、請求項346～413のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項515】

前記第1の導入遺伝子が、配列番号49、52、77、69、及び70と少なくとも80%同一な1つ以上の核酸配列を含む、請求項346～413のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項516】

前記第1の導入遺伝子が、配列番号52、77、69、及び70と少なくとも80%同一な1つ以上の核酸配列を含む、請求項346～413のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項517】

前記第1の導入遺伝子が、配列番号49、52、76、71、及び72と少なくとも80%同一な1つ以上の核酸配列を含む、請求項346～413のいずれか1項に記載の遺

10

20

30

40

50

伝子操作された細胞。

【請求項 5 1 8】

前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 5 2、7 6、7 1、及び 7 2 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 1 9】

前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 4 9、5 2、7 6、6 9、及び 7 0 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 2 0】

前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 5 2、7 6、6 9、及び 7 0 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 2 1】

前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 4 9 及び 2 0 0 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 2 2】

前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 5 0 及び 2 0 0 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 2 3】

前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 2 0 0 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 2 4】

ゲノムの第 1 の挿入部位に前記第 1 の導入遺伝子を含む、請求項 3 4 6 ~ 5 2 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 2 5】

前記第 1 の挿入部位が、T 細胞受容体 (T C R) 遺伝子座である、請求項 5 2 4 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 2 6】

前記 T C R 遺伝子座が、T R A C 遺伝子座、T R B C 1 遺伝子座、または T R B C 2 遺伝子座であるか、またはそれを含む、請求項 5 2 5 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 2 7】

前記第 1 の挿入部位が、β 2 ミクログロブリン (B 2 M) 遺伝子座である、請求項 5 2 5 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 2 8】

前記第 1 の挿入部位が、クラス I I トランス活性化因子 (C I I T A) 遺伝子座である、請求項 5 2 5 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 2 9】

前記第 1 の挿入部位が、セーフハーバー遺伝子座である、請求項 5 2 5 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 3 0】

前記セーフハーバー遺伝子座が、A A V S 1、A B O、C C R 5、C L Y B L、C X C R 4、F 3、F U T 1、H M G B 1、K D M 5 D、L R P 1、M I C A、M I C B、R H D、R O S A 2 6、または S H S 2 3 1 遺伝子座である、請求項 5 2 9 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 3 1】

前記第 1 の挿入部位がエキソンである、請求項 5 2 5 ~ 5 3 0 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 5 3 2】

前記第 1 の挿入部位がイントロンである、請求項 5 2 5 ～ 5 3 0 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 3 3】

前記第 1 の挿入部位が、イントロンとエキソンとの間に存在する、請求項 5 2 5 ～ 5 3 0 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 3 4】

前記第 1 の挿入部位が制御領域に存在する、請求項 5 2 5 ～ 5 3 0 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 3 5】

前記遺伝子操作された細胞が、前記遺伝子操作されたタンパク質の細胞表面発現を有する、請求項 3 4 6 ～ 5 3 4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 3 6】

前記遺伝子操作された細胞が、遺伝子操作されなかった同等の細胞と比較して減少した T C R の細胞表面発現を有する、請求項 3 4 6 ～ 5 3 5 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 3 7】

前記遺伝子操作された細胞が、遺伝子操作されなかった同等の細胞と比較して減少した B 2 M の細胞表面発現を有する、請求項 3 4 6 ～ 5 3 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 3 8】

前記遺伝子操作された細胞が、遺伝子操作されなかった同等の細胞と比較して減少した C I I T A の発現を有する、請求項 3 4 6 ～ 5 3 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 3 9】

前記遺伝子操作された細胞が、T C R 遺伝子座、B 2 M 遺伝子座、T A P I 遺伝子座、N L R C 5 遺伝子座、C I I T A 遺伝子座、H L A - A 遺伝子座、H L A - B 遺伝子座、H L A - C 遺伝子座、H L A - D P 遺伝子座、H L A - D M 遺伝子座、H L A - D O A 遺伝子座、H L A - D O B 遺伝子座、H L A - D Q 遺伝子座、H L A - D R 遺伝子座、R F X 5 遺伝子座、R F X A N K 遺伝子座、R F X A P 遺伝子座、N F Y - A 遺伝子座、N F Y - B 遺伝子座、N F Y - C 遺伝子座、またはそれらの組み合わせでの改変を含む、請求項 3 4 6 ～ 5 3 8 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 4 0】

前記遺伝子操作された細胞が、H L A - A 遺伝子座、H L A - B 遺伝子座、H L A - C 遺伝子座、またはそれらの組み合わせをノックアウトするように遺伝子操作されている、請求項 3 4 6 ～ 5 3 9 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 4 1】

前記遺伝子操作された細胞が、H L A - D M 遺伝子座、H L A - D O 遺伝子座、H L A - D P 遺伝子座、H L A - D Q 遺伝子座、H L A - D R 遺伝子座、またはそれらの組み合わせをノックアウトするように遺伝子操作されている、請求項 3 4 6 ～ 5 3 9 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 4 2】

前記遺伝子操作された細胞が、T C R 遺伝子座をノックアウトするように遺伝子操作されている、請求項 3 4 6 ～ 5 4 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 4 3】

前記遺伝子操作された細胞が、B 2 M 遺伝子座をノックアウトするように遺伝子操作された、請求項 3 4 6 ～ 5 4 2 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 4 4】

前記遺伝子操作された細胞が、C I I T A 遺伝子座をノックアウトするように遺伝子操作されている、請求項 3 4 6 ～ 5 4 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 5 4 5】

前記細胞が、

(a) 1 種以上の主要組織適合複合体 (MHC) クラス I 分子、もしくは前記 1 種以上の MHC クラス I 分子の発現を調節する 1 種以上の分子、及び／または

(b) 1 種以上の MHC クラス II 分子、もしくは前記 1 種以上の MHC クラス II 分子の発現を調節する 1 種以上の分子

の 1 つ以上のアレルを不活性化または破壊する 1 種以上の改変を含む、請求項 3 4 6 ～ 5 4 4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 4 6】

前記細胞が、1 種以上の MHC クラス I 分子、または前記 1 種以上の MHC クラス I 分子の発現を調節する 1 種以上の分子の 1 つ以上のアレルを不活性化または破壊する 1 種以上の改変を含む、請求項 3 4 6 ～ 5 4 5 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

10

【請求項 5 4 7】

前記細胞が、1 種以上の MHC クラス II 分子、または前記 1 種以上の MHC クラス II 分子の発現を調節する 1 種以上の分子の 1 つ以上のアレルを不活性化または破壊する 1 種以上の改変を含む、請求項 3 4 6 ～ 5 4 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 4 8】

前記細胞が、

(a) 1 種以上の MHC クラス I 分子、または前記 1 種以上の MHC クラス I 分子の発現を調節する 1 種以上の分子、及び

(b) 1 種以上の MHC クラス II 分子、または前記 1 種以上の MHC クラス II 分子の発現を調節する 1 種以上の分子

の 1 つ以上のアレルを不活性化または破壊する 1 種以上の改変を含む、請求項 3 4 6 ～ 5 4 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

20

【請求項 5 4 9】

前記 1 種以上の改変が、前記 1 種以上の MHC クラス I 分子の細胞表面タンパク質発現を低減する、請求項 3 4 6 ～ 5 4 8 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 5 0】

前記 1 種以上の改変が、前記 1 種以上の MHC クラス I 分子の細胞表面輸送を低減する、請求項 3 4 6 ～ 5 4 9 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

30

【請求項 5 5 1】

前記 1 種以上の改変が、前記 1 種以上の MHC クラス I 分子の機能を低減し、任意により、前記機能が抗原提示である、請求項 3 4 6 ～ 5 5 0 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 5 2】

前記 1 種以上の MHC クラス I 分子が、1 種以上のヒト白血球抗原 (HLA) クラス I 分子である、請求項 3 4 6 ～ 5 5 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 5 3】

前記 1 種以上の HLA クラス I 分子が、HLA-A、HLA-B、及び HLA-C からなる群から選択される、請求項 5 5 2 に記載の遺伝子操作された細胞。

40

【請求項 5 5 4】

前記 1 種以上の MHC クラス I 分子の発現を調節する前記 1 種以上の分子が、B2M、NLRC5、及び TAP1 からなる群から選択される、請求項 3 4 6 ～ 5 5 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 5 5】

前記 1 種以上の改変が、前記 1 種以上の MHC クラス II 分子の細胞表面タンパク質発現を低減する、請求項 3 4 6 ～ 5 5 4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 5 6】

前記 1 種以上の改変が、前記 1 種以上の MHC クラス II 分子の細胞表面輸送を低減す

50

る、請求項 3 4 6 ~ 5 5 5 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 5 7】

前記 1 種以上の改変が、前記 1 種以上の MHC クラス II 分子の機能を低減し、任意により、前記機能が抗原提示である、請求項 3 4 6 ~ 5 5 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 5 8】

前記 1 種以上の MHC クラス II 分子が、1 種以上のヒト白血球抗原 (HLA) クラス II 分子である、請求項 3 4 6 ~ 5 5 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 5 9】

前記 1 種以上の HLA クラス II 分子が、HLA-DP、HLA-DQ、及び／または HLA-DR からなる群から選択される、請求項 5 5 8 に記載の遺伝子操作された細胞。

10

【請求項 5 6 0】

前記 1 種以上の MHC クラス II 分子の発現を調節する前記 1 種以上の分子が、CITA 及び CD74 からなる群から選択される、請求項 3 4 6 ~ 5 5 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 6 1】

免疫寛容誘導因子をコードする第 2 の導入遺伝子を更に含む、請求項 3 4 6 ~ 5 4 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 6 2】

前記免疫寛容誘導因子が、A20/TNFAIP3、B2M-HLA-E、CD16、CD16Fc 受容体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、CD52、CD55、CD59、CD64、CD200、CCL21、CCL22、CTLA4-Ig、C1 阻害因子、CR1、DUX4、FASL、HLA-C、HLA-E、HLA-E 重鎖、HLA-F、HLA-G、H2-M3、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、IL-39、MANF、Mfge8、PD-L1、または Serpinb9 であるか、またはそれを含む、請求項 5 6 1 に記載の遺伝子操作された細胞。

20

【請求項 5 6 3】

前記免疫寛容誘導因子をコードする前記第 2 の導入遺伝子が、TCR 遺伝子座の挿入部位で挿入されている、請求項 5 6 1 または 5 6 2 に記載の遺伝子操作された細胞。

30

【請求項 5 6 4】

前記免疫寛容誘導因子をコードする前記第 2 の導入遺伝子が、B2M 遺伝子座の挿入部位で挿入されている、請求項 5 6 1 または 5 6 2 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 6 5】

前記免疫寛容誘導因子をコードする前記第 2 の導入遺伝子が、CITA 遺伝子座の挿入部位で挿入されている、請求項 5 6 1 または 5 6 2 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 6 6】

前記免疫寛容誘導因子をコードする前記第 2 の導入遺伝子が、セーフハーバー遺伝子座の挿入部位で挿入されている、請求項 5 6 1 または 5 6 2 に記載の遺伝子操作された細胞。

40

【請求項 5 6 7】

前記セーフハーバー遺伝子座が、AAVS1、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1、MICA、MICB、RHD、ROSA26、または SHS231 遺伝子座である、請求項 5 6 6 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 6 8】

前記遺伝子操作された細胞が、前記免疫寛容誘導因子の細胞表面発現を有する、請求項 5 6 1 ~ 5 6 5 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 6 9】

キメラ抗原受容体 (CAR) をコードする第 3 の導入遺伝子を更に含む、請求項 3 4 6

50

～568のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項570】

前記CARが、CD5特異的CAR、CD19特異的CAR、CD20特異的CAR、CD22特異的CAR、CD23特異的CAR、CD30特異的CAR、CD33特異的CAR、CD38特異的CAR、CD70特異的CAR、CD123特異的CAR、CD138特異的CAR、 κ 、 λ 、B細胞成熟物質(BCMA)特異的CAR、Gタンパク質共役受容体ファミリーCグループ5メンバーD(GPRC5D)特異的CAR、CD123特異的CAR、LeY特異的CAR、NKG2Dリガンド特異的CAR、WT1特異的CAR、GD2特異的CAR、HER2特異的CAR、EGFR特異的CAR、EGFRvIII特異的CAR、B7H3特異的CAR、PSMA特異的CAR、PSCA特異的CAR、CAIX特異的CAR、CD171特異的CAR、CEA特異的CAR、CSPG4特異的CAR、EPHA2特異的CAR、FAP特異的CAR、FR α 特異的CAR、IL-13R α 特異的CAR、メソテリン特異的CAR、MUC1特異的CAR、MUC16特異的CAR、ROR1特異的CAR、C-Met特異的CAR、CD133特異的CAR、Ep-CAM特異的CAR、GPC3特異的CAR、HPV16-E6特異的CAR、IL13Ra2特異的CAR、MAGEA3特異的CAR、MAGEA4特異的CAR、MART1特異的CAR、NY-ESO-1特異的CAR、VEGFR2特異的CAR、 α 葉酸受容体特異的CAR、CD24特異的CAR、CD44v7/8特異的CAR、EGP-2特異的CAR、EGP-40特異的CAR、erb-B2特異的CAR、erb-B2, 3, 4特異的CAR、FBP特異的CAR、胎児アセチルコリン受容体特異的CAR、GD2特異的CAR、GD3特異的CAR、HMW-MAA特異的CAR、IL-11R α 特異的CAR、KDR特異的CAR、ルイスY特異的CAR、L1細胞接着分子特異的CAR、MAGE-A1特異的CAR、癌胎児性抗原(h5T4)特異的CAR、TAG-72特異的CAR、またはCD19/CD22二重特異性CARであるか、またはそれを含む、請求項569に記載の遺伝子操作された細胞。

10

20

【請求項571】

前記CARが、CD19特異的CAR、CD20特異的CAR、CD22特異的CAR、CD38特異的CAR、CD123特異的CAR、CD138特異的CAR、BCMA特異的CAR、またはCD19/CD22二重特異性CARであるか、またはそれを含む、請求項569または570に記載の遺伝子操作された細胞。

30

【請求項572】

前記遺伝子操作された細胞が、前記CARの細胞表面発現を有する、請求項569～571のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項573】

キメラ自己抗原受容体(CAAR)をコードする第3の導入遺伝子を更に含む、請求項346～567のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項574】

前記CAARが、 β 細胞抗原、滑膜関節抗原、ミエリン塩基性タンパク質、プロテオリピドタンパク質、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質、MuSK、ケラチノサイト接着タンパク質デスモグレイン3(Dsg3)、Ror-RNP複合体、La抗原、ミエロペルオキシダーゼ、プロテイナーゼ3、カルジオリピン、シトルリン化タンパク質、カルバミル化タンパク質、及び基底膜コラーゲンの α 3鎖からなる群から選択される抗原を含む、請求項573に記載の遺伝子操作された細胞。

40

【請求項575】

前記遺伝子操作された細胞が、前記CAARの細胞表面発現を有する、請求項573または574に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項576】

B細胞自己抗体受容体(BAR)をコードする第3の導入遺伝子を更に含む、請求項346～567のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項577】

50

前記遺伝子操作された細胞が、前記 B A R の細胞表面発現を有する、請求項 5 7 6 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 7 8】

前記第 3 の導入遺伝子がセーフハーバー遺伝子座に挿入されている、請求項 5 6 9 ～ 5 7 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 7 9】

前記第 3 の導入遺伝子が、T R A C 遺伝子座、T R B C 1 遺伝子座、T R B C 2 遺伝子座、B 2 M 遺伝子座、C I I T A 遺伝子座、M I C A 遺伝子座、M I C B 遺伝子座、またはセーフハーバー遺伝子座に挿入されている、請求項 5 6 9 ～ 5 7 8 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

10

【請求項 5 8 0】

前記第 3 の導入遺伝子が、A A V S 1 遺伝子座、A B O 遺伝子座、C C R 5 遺伝子座、C L Y B L 遺伝子座、C X C R 4 遺伝子座、F 3 遺伝子座、F U T 1 遺伝子座、H M G B 1 遺伝子座、K D M 5 D 遺伝子座、L R P 1 遺伝子座、R H D 遺伝子座、R O S A 2 6 遺伝子座、または S H S 2 3 1 遺伝子座に挿入されている、請求項 5 6 9 ～ 5 7 9 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 8 1】

前記第 1 の導入遺伝子及び前記第 2 の導入遺伝子が、同じ挿入部位に挿入されている、請求項 3 4 6 ～ 5 6 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 8 2】

前記第 1 の導入遺伝子及び前記第 3 の導入遺伝子が、同じ挿入部位に挿入されている、請求項 3 4 6 ～ 5 6 6 または 5 7 6 ～ 5 8 0 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

20

【請求項 5 8 3】

前記第 2 の導入遺伝子及び前記第 3 の導入遺伝子が、同じ挿入部位に挿入されている、請求項 5 6 1 ～ 5 8 0 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 8 4】

前記第 1 の導入遺伝子、前記第 2 の導入遺伝子、及び前記第 3 の導入遺伝子が、同じ挿入部位に挿入されている、請求項 3 4 6 ～ 5 8 0 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

30

【請求項 5 8 5】

前記第 1 の導入遺伝子、前記第 2 の導入遺伝子、及び前記第 3 の導入遺伝子が、3 種の別個の構築物によりコードされる、請求項 3 4 6 ～ 5 8 4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 8 6】

前記第 1 の導入遺伝子、前記第 2 の導入遺伝子、及び前記第 3 の導入遺伝子が、2 種の別個の構築物によりコードされる、請求項 3 4 6 ～ 5 8 4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 8 7】

前記第 1 の導入遺伝子、前記第 2 の導入遺伝子、及び前記第 3 の導入遺伝子が、多シストロン性構築物によりコードされる、請求項 3 4 6 ～ 5 8 4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

40

【請求項 5 8 8】

前記第 1 の導入遺伝子及び／または前記第 2 の導入遺伝子及び／または前記第 3 の導入遺伝子が、ゲノム編集複合体をコードする、請求項 3 4 6 ～ 5 8 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 8 9】

前記ゲノム編集複合体が、ゲノム標的化物質及びゲノム改変物質を含む、請求項 5 8 8 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 5 9 0】

50

前記ゲノム標的化物質が核酸誘導型標的化物質である、請求項 589 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 591】

前記ゲノム標的化物質が、配列特異的ヌクレアーゼ、核酸によりプログラム化可能な DNA 結合タンパク質、RNA 誘導型ヌクレアーゼ、Cas ヌクレアーゼ及びガイド RNA を含む RNA 誘導型ヌクレアーゼ (CRISPR-Cas の組み合わせ)、gRNA 及び Cas ヌクレアーゼを含むリボ核タンパク質 (RNP) 複合体、ホーミングエンドヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZF) 核酸結合性物質、転写活性化因子様エフェクター (TALE) 核酸結合性物質、メガヌクレアーゼ、Cas ヌクレアーゼ、CoaCas タンパク質、ホーミングエンドヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ欠損 Cas タンパク質、酵素的に不活性な Cas タンパク質、CRISPR 関連トランスポザーゼ (CAST)、II 型もしくは V 型 Cas タンパク質、またはそれらの機能部分からなる群から選択される、請求項 589 または 590 に記載の遺伝子操作された細胞。

10

【請求項 592】

前記ゲノム標的化物質が、Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a (Cpf1)、Cas12b (C2c1)、Cas12c (C2c3)、Cas12d (CasY)、Cas12e (CasX)、Cas12f (C2c10)、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k (C2c5)、Cas13、Cas13a (C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr1、Cmr2、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csd1、Csd2、Cas5d、Cse1、Cse2、Cse3、Cse4、Cas5e、Csf1、Csm1、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csn1、Csn2、Cst1、Cst2、Cas5t、Csh1、Csh2、Cas5h、Csa1、Csa2、Csa3、Csa4、Csa5、Cas5a、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3、Csy4、Mad7、SpCas9、SpCas9 の eSpCas9、SpCas9-HF1、HypaSpCas9、HeFSpCas9、及び evoSpCas9 高忠実度バリエーション、SaCas9、NmeCas9、CjCas9、StCas9、TdCas9、LbCas12a、AsCas12a、AacCas12b、BhCas12b v4、TnpB、dCas (D10A)、dCas (H840A)、dCas13a、dCas13b、またはそれらの機能部分からなる群から選択される、請求項 589～591 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

20

30

【請求項 593】

前記ゲノム改変物質が、標的遺伝子座を開裂するか、脱アミノ化するか、それにニックを入れるか、それを重合させるか、調査するか、融合させるか、切断するか、ほどくか、破壊するか、変化させるか、メチル化するか、脱メチル化するか、または別様に不安定化する、請求項 589～592 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 594】

前記ゲノム改変物質が、リコンビナーゼ、インテグラーゼ、トランスポザーゼ、エンドヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼ、ニッカーゼ、ヘリカーゼ、DNA ポリメラーゼ、RNA ポリメラーゼ、逆転写酵素、デアミナーゼ、フリッパーゼ、メチラーゼ、デメチラーゼ、アセチラーゼ、核酸修飾タンパク質、RNA 修飾タンパク質、DNA 修飾タンパク質、アルゴノートタンパク質、エピジェネティック修飾タンパク質、ヒストン修飾タンパク質、またはそれらの機能部分を含む、請求項 589～593 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

40

【請求項 595】

前記ゲノム改変物質が、配列特異的ヌクレアーゼ、核酸によりプログラム化可能な DNA 結合タンパク質、RNA 誘導型ヌクレアーゼ、Cas ヌクレアーゼ及びガイド RNA を含む RNA 誘導型ヌクレアーゼ (CRISPR-Cas の組み合わせ)、前記 gRNA 及び前記 Cas ヌクレアーゼを含むリボ核タンパク質 (RNP) 複合体、ホーミングエンド

50

ヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、メガヌクレアーゼ、Casヌクレアーゼ、コアCasタンパク質、TnpBヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ欠損Casタンパク質、酵素的に不活性なCasタンパク質、CRISPR関連トランスポザーゼ（CAST）、II型もしくはV型Casタンパク質、塩基編集、プライム編集、部位特異的標的化エレメントによるプログラム化可能な付加（PASTE）、またはそれらの機能部分からなる群から選択される、請求項589～594のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項596】

前記ゲノム改変物質が、Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a（Cpf1）、Cas12b（C2c1）、Cas12c（C2c3）、Cas12d（CasY）、Cas12e（CasX）、Cas12f（C2c10）、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k（C2c5）、Cas13、Cas13a（C2c2）、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr1、Cmr2、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csd1、Csd2、Cas5d、Cse1、Cse2、Cse3、Cse4、Cas5e、Csf1、Csm1、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csn1、Csn2、Cst1、Cst2、Cas5t、Csh1、Csh2、Cas5h、Csa1、Csa2、Csa3、Csa4、Csa5、Cas5a、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3、Csy4、Mad7、SpCas9、SpCas9のeSpCas9、SpCas9-HF1、HypaSpCas9、HeFSpCas9、及びevoSpCas9高忠実度バリエーション、SaCas9、NmeCas9、CjCas9、StCas9、TdCas9、LbCas12a、AsCas12a、AacCas12b、BhCas12b v4、TnpB、FokI、dCas（D10A）、dCas（H840A）、dCas13a、dCas13b、塩基エディター、プライムエディター、標的プライムド逆転写（TPRT）エディター、APOBEC1、シチジンデアミナーゼ、アデノシンデアミナーゼ、ウラシルグリコシラーゼ阻害剤（UGI）、アデニン塩基エディター（ABE）、シトシン塩基エディター（CBE）、逆転写酵素、セリンインテグラーゼ、リコンビナーゼ、トランスポザーゼ、ポリメラーゼ、アデニン→チミンもしくは「ATBE」（またはチミン→アデニンもしくは「TABE」）トランスバージョン塩基エディター、10-11転座メチルシトシンジオキシゲナーゼ（TET）、TET1、TET3、TET1CD、ヒストンアセチルトランスフェラーゼp300、ヒストンメチルトランスフェラーゼSMYD3、ヒストンメチルトランスフェラーゼPRDM9、H3K79メチルトランスフェラーゼDOT1L、転写抑制因子、またはその機能部分からなる群から選択される、請求項589～595のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項597】

前記ゲノム標的化物質及び前記ゲノム改変物質が、単一のポリペプチドの異なるドメインである、請求項589～596のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項598】

前記ゲノム標的化物質及び前記ゲノム改変物質が、互いに作動可能に連結されている2つの異なるポリペプチドである、請求項589～597のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項599】

前記ゲノム標的化物質及び前記ゲノム改変物質が、互いに連結されていない2つの異なるポリペプチドである、請求項589～597のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項600】

前記ゲノム編集複合体が、少なくとも1つの標的遺伝子座に相補的な標的化ドメインを有するガイド核酸を含み、任意により、前記ガイド核酸がガイドRNA（gRNA）であ

る、請求項 589～599 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 601】

前記ゲノム編集複合体が RNA 誘導型ヌクレアーゼを含む、請求項 588～598 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 602】

前記 RNA 誘導型ヌクレアーゼが Cas ヌクレアーゼを含む、請求項 601 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 603】

前記ゲノム編集複合体が、前記 Cas ヌクレアーゼ及び前記 gRNA を含むリボ核タンパク質 (RNP) 複合体を含む、請求項 602 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 604】

前記 Cas ヌクレアーゼが、II 型または V 型 Cas タンパク質である、請求項 602 または 603 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 605】

前記 Cas ヌクレアーゼが、Cas3、Cas4、Cas5、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a (Cpf1)、Cas12b (C2c1)、Cas12c (C2c3)、Cas12d (CasY)、Cas12e (CasX)、Cas12f (C2c10)、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k (C2c5)、Cas13、Cas13a (C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr5、Cse1、Cse2、Csf1、Csm2、Csn2、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3、及び Mad7 からなる群から選択される、請求項 602～604 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 606】

前記遺伝子操作された細胞が、ヒト細胞または非ヒト動物細胞である、請求項 346～587 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 607】

前記非ヒト動物細胞が、ブタ、ウシ、またはヒツジ細胞である、請求項 606 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 608】

前記遺伝子操作された細胞がヒト細胞である、請求項 606 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 609】

前記遺伝子操作された細胞が、幹細胞または前駆細胞に由来する分化した細胞である、請求項 346～608 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 610】

前記幹細胞が多能性幹細胞である、請求項 609 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 611】

前記多能性幹細胞が人工多能性幹細胞 (iPSC) である、請求項 610 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 612】

前記多能性幹細胞が胚性幹細胞 (ESC) である、請求項 610 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 613】

前記細胞がドナーから単離された初代細胞である、請求項 346～612 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 614】

前記ドナーが、前記初代細胞が前記ドナーから採取される時点で健常であり、及び／または疾患もしくは病態を有すると疑われていない、請求項 613 に記載の遺伝子操作された細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 6 1 5】

前記遺伝子操作された細胞が、複数のドナーから単離された初代細胞の集団の一部である、請求項 3 4 6～6 1 4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 6 1 6】

前記複数のドナーが、前記初代細胞が前記ドナーから採取される時点で健常であり、及び／または疾患もしくは病態を有すると疑われていない、請求項 3 4 6～6 1 5 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 6 1 7】

前記細胞が、島細胞、 β 膵島細胞、膵島細胞、免疫細胞、B 細胞、T 細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞、ナチュラルキラー T (NKT) 細胞、マクロファージ細胞、内皮細胞、筋細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、骨格筋細胞、ドーパミン作動性ニューロン、網膜色素上皮細胞、視細胞、肝実質細胞、甲状腺細胞、皮膚細胞、グリア前駆細胞、神経細胞、心臓細胞、幹細胞、造血幹細胞、人工多能性幹細胞 (iPSC)、間葉系幹細胞 (MSC)、胚性幹細胞 (ESC)、多能性幹細胞 (PSC)、血液細胞、またはそれらの組み合わせである、請求項 3 4 6～6 1 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 6 1 8】

前記細胞が T 細胞である、請求項 3 4 6～6 1 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 6 1 9】

前記 T 細胞が、CD3+T 細胞、CD4+T 細胞、CD5+T 細胞、ナイーブ T 細胞、制御性 T (Treg) 細胞、非制御性 T 細胞、Th1 細胞、Th2 細胞、Th9 細胞、Th17 細胞、濾胞性ヘルパー T (Tfh) 細胞、細胞傷害性 T リンパ球 (CTL)、エフェクター T (Teff) 細胞、セントラルメモリー T 細胞、エフェクターメモリー T 細胞、CD45RA を発現するエフェクターメモリー T 細胞 (TEMRA 細胞)、組織常在性メモリー (T_{rm}) 細胞、バーチャルメモリー T 細胞、自然免疫メモリー T 細胞、メモリー幹細胞 (T_{sc})、 $\gamma\delta$ T 細胞、またはそれらの組み合わせである、請求項 6 1 8 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 6 2 0】

前記 T 細胞が、細胞傷害性 T 細胞、ヘルパー T 細胞、メモリー T 細胞、制御性 T 細胞、腫瘍浸潤リンパ球、またはそれらの組み合わせである、請求項 6 1 8 または 6 1 9 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 6 2 1】

前記細胞がヒト T 細胞である、請求項 6 1 8～6 2 0 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 6 2 2】

前記細胞が自家 T 細胞である、請求項 6 1 8～6 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 6 2 3】

前記細胞が同種異系 T 細胞である、請求項 6 1 8～6 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 6 2 4】

前記同種異系 T 細胞が初代 T 細胞である、請求項 6 2 3 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 6 2 5】

前記同種異系 T 細胞が、胚性幹細胞 (ESC) または人工多能性幹細胞 (iPSC) から分化している、請求項 6 2 3 または 6 2 4 に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 6 2 6】

前記遺伝子操作されたタンパク質が、前記遺伝子操作された細胞と同じ細胞種の対照細胞における内在性 CD47 タンパク質と比べて少なくとも約 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍、20 倍、25 倍、30 倍、40 倍、50 倍、60 倍、70 倍、80 倍、90

10

20

30

40

50

倍、100倍、150倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、1100倍、1200倍、1300倍、1400倍、1500倍、2000倍、2500倍、3000倍、3500倍、4000倍、4500倍、または5000倍を超えるレベルで前記遺伝子操作された細胞において発現される、請求項346～625のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項627】

前記遺伝子操作されたタンパク質が、前記遺伝子操作された細胞と同じ細胞種の対照細胞における内在性CD47タンパク質と比べて少なくとも約1倍～少なくとも約15倍を超えるレベルで前記遺伝子操作された細胞において発現される、請求項346～625のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

10

【請求項628】

前記遺伝子操作されたタンパク質が、前記遺伝子操作された細胞と同じ細胞種の対照細胞における内在性CD47タンパク質と比べて少なくとも約1倍～少なくとも約10倍を超えるレベルで前記遺伝子操作された細胞において発現される、請求項346～625のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項629】

前記遺伝子操作されたタンパク質が、前記遺伝子操作された細胞と同じ細胞種の対照細胞における内在性CD47タンパク質と比べて少なくとも約1倍～少なくとも約5倍を超えるレベルで前記遺伝子操作された細胞において発現される、請求項346～625のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

20

【請求項630】

前記遺伝子操作されたタンパク質が、前記遺伝子操作された細胞と同じ細胞種の対照細胞における内在性CD47タンパク質と比べて少なくとも約3倍～少なくとも約4倍を超えるレベルで前記遺伝子操作された細胞において発現される、請求項346～625のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項631】

前記遺伝子操作されたタンパク質が、前記遺伝子操作された細胞と同じ細胞種の対照細胞における内在性CD47タンパク質と比べて少なくとも約3倍～少なくとも約10倍を超えるレベルで前記遺伝子操作された細胞において発現される、請求項346～625のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

30

【請求項632】

前記遺伝子操作されたタンパク質が、前記遺伝子操作された細胞と同じ細胞種の対照細胞における内在性CD47タンパク質と比べて少なくとも約4倍～少なくとも約10倍を超えるレベルで前記遺伝子操作された細胞において発現される、請求項346～625のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項633】

前記遺伝子操作されたタンパク質が、前記遺伝子操作された細胞と同じ細胞種の対照細胞における内在性CD47タンパク質と比べて少なくとも約500倍～少なくとも約2000倍を超えるレベルで前記遺伝子操作された細胞において発現される、請求項346～625のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

40

【請求項634】

前記遺伝子操作されたタンパク質が、前記遺伝子操作された細胞と同じ細胞種の対照細胞における内在性CD47タンパク質と比べて少なくとも約500倍～少なくとも約1500倍を超えるレベルで前記遺伝子操作された細胞において発現される、請求項346～625のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項635】

前記遺伝子操作されたタンパク質が、前記遺伝子操作された細胞と同じ細胞種の対照細胞における内在性CD47タンパク質と比べて少なくとも約900倍～少なくとも約1000倍を超えるレベルで前記遺伝子操作された細胞において発現される、請求項346～625のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

50

【請求項 6 3 6】

前記遺伝子操作されたタンパク質が、前記遺伝子操作された細胞と同じ細胞種の対照細胞における内在性CD47タンパク質と比べて少なくとも約1000倍を超えるレベルで前記遺伝子操作された細胞において発現される、請求項346～625のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【請求項 6 3 7】

請求項345～636のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞を含む組成物。

【請求項 6 3 8】

(i) 請求項345～636のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞及び(ii) 薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物。

10

【請求項 6 3 9】

請求項345～636のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞、請求項637に記載の組成物、または請求項638に記載の医薬組成物を対象に投与することを含む方法。

【請求項 6 4 0】

前記方法が対象の疾患を処置する方法である、請求項639に記載の方法。

【請求項 6 4 1】

対象の疾患を処置するのに使用される、請求項345～636のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞を含む細胞集団。

【請求項 6 4 2】

対象の疾患を処置するのに使用される請求項637に記載の組成物。

20

【請求項 6 4 3】

対象の疾患を処置するのに使用される請求項638に記載の医薬組成物。

【請求項 6 4 4】

対象の疾患を処置するのに使用される、請求項345～636のいずれか1項に記載の遺伝子改変細胞、請求項56に記載の細胞集団、請求項54もしくは56aに記載の組成物、または請求項54aもしくは54bに記載の医薬組成物の使用。

【請求項 6 4 5】

疾患の処置のための薬剤の製造における請求項345～636のいずれか1項に記載の遺伝子改変細胞、請求項56に記載の細胞集団、請求項54もしくは56aに記載の組成物、または請求項54aもしくは54bに記載の医薬組成物の使用。

30

【請求項 6 4 6】

前記疾患ががんである、先行請求項のいずれか1項に記載の遺伝子改変細胞、細胞集団、組成物、医薬組成物、または使用。

【請求項 6 4 7】

前記がんが、CD5、CD19、CD20、CD22、CD23、CD30、CD33、CD70、κ、λ、B細胞成熟物質(BCMA)、Gタンパク質共役受容体ファミリーCグループ5メンバーD(GPRC5D)、CD123、LeY、NKG2Dリガンド、WT1、GD2、HER2、EGFR、EGFRvIII、B7H3、PSMA、PSCA、CAIX、CD171、CEA、CSPG4、EPHA2、FAP、FRα、IL-13Rα、メソテリン、MUC1、MUC16、ROR1、C-Met、CD133、EPCAM、GPC3、HPV16-E6、IL13Ra2、MAGEA3、MAGEA4、MART1、NY-ESO-1、VEGFR2、α葉酸受容体、CD24、CD44v7/8、EGP-2、EGP-40、erb-B2、erb-B2, 3, 4、FBP、胎児アセチルコリン受容体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-11Rα、KDR、ルイスY、L1細胞接着分子、MAGE-A1、癌胎児性抗原(h5T4)、及び/またはTAG-72の発現に関連する、先行請求項のいずれか1項に記載の遺伝子改変細胞、細胞集団、組成物、医薬組成物、または使用。

40

【請求項 6 4 8】

前記がんが血液悪性腫瘍である、先行請求項のいずれか1項に記載の遺伝子改変細胞、

50

細胞集団、組成物、医薬組成物、または使用。

【請求項 6 4 9】

前記血液悪性腫瘍が、骨髄性新生物、骨髄異形成症候群（MDS）、骨髄増殖／骨髄異形成症候群、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、急性転化慢性骨髄性白血病（bcCML）、B細胞急性リンパ性白血病（B-ALL）、T細胞急性リンパ性白血病（T-ALL）、T細胞リンパ腫、及びB細胞リンパ腫からなる群から選択される、先行請求項のいずれか1項に記載の遺伝子改変細胞、細胞集団、組成物、医薬組成物、または使用。

【請求項 6 5 0】

前記がんが固形悪性腫瘍である、先行請求項のいずれか1項に記載の遺伝子改変細胞、細胞集団、組成物、医薬組成物、または使用。

【請求項 6 5 1】

前記固形悪性腫瘍が、乳癌、卵巣癌、大腸癌、前立腺癌、上皮癌、腎細胞腫、膵臓腺癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、神経膠芽腫、横紋筋肉腫、神経芽細胞腫、黒色腫、ユーイング肉腫、骨肉腫、中皮腫、及び腺癌から選択される、先行請求項のいずれか1項に記載の遺伝子改変細胞、細胞集団、組成物、医薬組成物、または使用。

【請求項 6 5 2】

前記疾患が自己免疫疾患である、先行請求項のいずれか1項に記載の遺伝子改変細胞、細胞集団、組成物、医薬組成物、または使用。

【請求項 6 5 3】

前記自己免疫疾患が、ループス、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、乾癬、乾癬性関節炎、多発性硬化症、クローン病、潰瘍性大腸炎、アジソン病、グレーブス病、シェーグレン症候群、橋本甲状腺炎、及びセリアック病からなる群から選択される、先行請求項のいずれか1項に記載の遺伝子改変細胞、細胞集団、組成物、医薬組成物、または使用。

【請求項 6 5 4】

前記疾患が糖尿病である、先行請求項のいずれか1項に記載の遺伝子改変細胞、先行請求項のいずれか1項に記載の細胞集団、先行請求項のいずれか1項に記載の組成物、先行請求項のいずれか1項に記載の医薬組成物、または先行請求項のいずれか1項に記載の使用。

【請求項 6 5 5】

前記糖尿病が、I型糖尿病、II型糖尿病、前糖尿病、及び妊娠性糖尿病からなる群から選択される、先行請求項のいずれか1項に記載の遺伝子改変細胞、細胞集団、組成物、医薬組成物、または使用。

【請求項 6 5 6】

前記疾患が神経系疾患である、先行請求項のいずれか1項に記載の遺伝子改変細胞、細胞集団、組成物、医薬組成物、または使用。

【請求項 6 5 7】

前記神経系疾患が、強直症、てんかん、脳炎、髄膜炎、片頭痛、ハンチントン病、アルツハイマー病、パーキンソン病、ペリツェウス・メルツバッハー病、及び多発性硬化症からなる群から選択される、先行請求項のいずれか1項に記載の遺伝子改変細胞、細胞集団、組成物、医薬組成物、または使用。

【請求項 6 5 8】

核酸構築物を含む遺伝子操作された細胞を作製する方法であって、請求項1～184のいずれか1項に記載の核酸構築物を細胞に送達し、これにより、遺伝子操作された細胞を作製することを含む、前記方法。

【請求項 6 5 9】

前記核酸構築物が、前記遺伝子操作されたタンパク質をコードする第1の導入遺伝子を含む、請求項658に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 6 6 0】

前記方法が、前記遺伝子操作されたタンパク質をコードする第 1 の導入遺伝子を前記細胞のゲノムの第 1 の挿入部位に挿入することを含む、請求項 6 5 8 または 6 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 6 1】

前記第 1 の挿入部位が T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子座である、請求項 6 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 6 2】

前記 TCR 遺伝子座が、TRAC 遺伝子座、TRBC1 遺伝子座、または TRBC2 遺伝子座であるか、またはそれを含む、請求項 6 6 1 に記載の方法。

10

【請求項 6 6 3】

前記第 1 の挿入部位が β 2 ミクログロブリン (B2M) 遺伝子座である、請求項 6 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 6 4】

前記第 1 の挿入部位が、クラス II トランス活性化因子 (CIITA) 遺伝子座である、請求項 6 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 6 5】

前記第 1 の挿入部位が、セーフハーバー遺伝子座である、請求項 6 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 6 6】

前記セーフハーバー遺伝子座が、AAVS1、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1、MICA、MICB、RH D、ROSA26、または SHS231 遺伝子座である、請求項 6 6 5 に記載の方法。

20

【請求項 6 6 7】

前記第 1 の挿入部位がエキソンである、請求項 6 6 0 ~ 6 6 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 6 8】

前記第 1 の挿入部位がイントロンである、請求項 6 6 0 ~ 6 6 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 6 9】

前記第 1 の挿入部位が、イントロンとエキソンとの間に存在する、請求項 6 6 0 ~ 6 6 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 6 7 0】

前記第 1 の挿入部位が制御領域に存在する、請求項 6 6 0 ~ 6 6 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 7 1】

挿入するステップが、遺伝子治療ベクター、トランスポザーゼ、レンチウイルスベクター、レトロウイルス、フソソーム、PiggyBac トランスポゾン、Sleeping Beauty (SB11) トランスポゾン、Mos1 トランスポゾン、または Tol2 トランスポゾンを使用した挿入を含む、請求項 6 6 0 ~ 6 7 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 6 7 2】

挿入するステップが、レンチウイルスベクターを使用した挿入を含む、請求項 6 6 0 ~ 6 7 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 7 3】

挿入するステップが、ゲノム改変タンパク質を使用した相同組換え修復 (HDR) により媒介される挿入を含む、請求項 6 6 0 ~ 6 7 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 7 4】

ゲノム編集複合体を前記細胞に導入することを更に含む、請求項 6 5 8 ~ 6 7 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 7 5】

50

前記ゲノム編集複合体が、ゲノム標的化合物及びゲノム改変物質を含む、請求項 6 7 4 に記載の方法。

【請求項 6 7 6】

前記ゲノム標的化合物が前記ゲノム編集複合体をセーフハーバー部位に局在させ、任意により、前記ゲノム標的化合物が核酸誘導型標的化合物である、請求項 6 7 5 に記載の方法。

【請求項 6 7 7】

前記ゲノム標的化合物が、配列特異的ヌクレアーゼ、核酸によりプログラム化可能な DNA 結合タンパク質、RNA 誘導型ヌクレアーゼ、Cas ヌクレアーゼ及びガイド RNA を含む RNA 誘導型ヌクレアーゼ (CRISPR-Cas の組み合わせ)、gRNA 及び Cas ヌクレアーゼを含むリボ核タンパク質 (RNP) 複合体、ホーミングエンドヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZF) 核酸結合性物質、転写活性化因子様エフェクター (TALE) 核酸結合性物質、メガヌクレアーゼ、Cas ヌクレアーゼ、CoaCas タンパク質、ホーミングエンドヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ欠損 Cas タンパク質、酵素的に不活性な Cas タンパク質、CRISPR 関連トランスポザーゼ (CAST)、II 型もしくは V 型 Cas タンパク質、またはそれらの機能部分からなる群から選択される、請求項 6 7 5 または 6 7 6 に記載の方法。

【請求項 6 7 8】

前記ゲノム標的化合物が、Cas 1、Cas 2、Cas 3、Cas 4、Cas 5、Cas 6、Cas 7、Cas 8a、Cas 8b、Cas 8c、Cas 9、Cas 10、Cas 12、Cas 12a (Cpf1)、Cas 12b (C2c1)、Cas 12c (C2c3)、Cas 12d (CasY)、Cas 12e (CasX)、Cas 12f (C2c10)、Cas 12g、Cas 12h、Cas 12i、Cas 12k (C2c5)、Cas 13、Cas 13a (C2c2)、Cas 13b、Cas 13c、Cas 13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr1、Cmr2、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csd1、Csd2、Cas5d、Cse1、Cse2、Cse3、Cse4、Cas5e、Cs f1、Csm1、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csn1、Csn2、Cst1、Cst2、Cas5t、Csh1、Csh2、Cas5h、Csa1、Csa2、Csa3、Csa4、Csa5、Cas5a、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3、Csy4、Mad7、SpCas9、SpCas9 の eSpCas9、SpCas9-HF1、HypaSpCas9、HeFSpCas9、及び evoSpCas9 高忠実度バリエーション、SaCas9、NmeCas9、CjCas9、StCas9、TdCas9、LbCas12a、AsCas12a、AacCas12b、BhCas12b v4、TnpB、dCas (D10A)、dCas (H840A)、dCas13a、dCas13b、またはそれらの機能部分からなる群から選択される、請求項 6 7 5 ~ 6 7 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 7 9】

前記ゲノム改変物質が、標的遺伝子座を開裂するか、脱アミノ化するか、それにニックを入れるか、それを重合させるか、調査するか、融合させるか、切断するか、ほどくか、破壊するか、変化させるか、メチル化するか、脱メチル化するか、または別様に不安定化する、請求項 6 7 5 ~ 6 7 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 8 0】

前記ゲノム改変物質が、リコンビナーゼ、インテグラーゼ、トランスポザーゼ、エンドヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼ、ニッカーゼ、ヘリカーゼ、DNA ポリメラーゼ、RNA ポリメラーゼ、逆転写酵素、デアミナーゼ、フリッパーゼ、メチラーゼ、デメチラーゼ、アセチラーゼ、核酸修飾タンパク質、RNA 修飾タンパク質、DNA 修飾タンパク質、アルゴノートタンパク質、エピジェネティック修飾タンパク質、ヒストン修飾タンパク質、またはそれらの機能部分を含む、請求項 6 7 5 ~ 6 7 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 8 1】

10

20

30

40

50

前記ゲノム改変物質が、配列特異的ヌクレアーゼ、核酸によりプログラム化可能なDNA結合タンパク質、RNA誘導型ヌクレアーゼ、Casヌクレアーゼ及びガイドRNAを含むRNA誘導型ヌクレアーゼ（CRISPR-Casの組み合わせ）、前記gRNA及び前記Casヌクレアーゼを含むリボ核タンパク質（RNP）複合体、ホーミングエンドヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、メガヌクレアーゼ、Casヌクレアーゼ、コアCasタンパク質、TnpBヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ欠損Casタンパク質、酵素的に不活性なCasタンパク質、CRISPR関連トランスポザーゼ（CAST）、II型もしくはV型Casタンパク質、塩基編集、プライム編集、部位特異的標的化エレメントによるプログラム化可能な付加（PASTE）、またはそれらの機能部分からなる群から選択される、請求項675～680のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項682】

前記ゲノム改変物質が、Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a（Cpf1）、Cas12b（C2c1）、Cas12c（C2c3）、Cas12d（CasY）、Cas12e（CasX）、Cas12f（C2c10）、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k（C2c5）、Cas13、Cas13a（C2c2）、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr1、Cmr2、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csd1、Csd2、Cas5d、Cse1、Cse2、Cse3、Cse4、Cas5e、Csf1、Csm1、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csn1、Csn2、Cst1、Cst2、Cas5t、Csh1、Csh2、Cas5h、Csa1、Csa2、Csa3、Csa4、Csa5、Cas5a、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3、Csy4、Mad7、SpCas9、SpCas9のeSpCas9、SpCas9-HF1、HypaSpCas9、HeFSpCas9、及びevoSpCas9高忠実度バリエーション、SaCas9、NmeCas9、CjCas9、StCas9、TdCas9、LbCas12a、AscCas12a、AacCas12b、BhCas12b v4、TnpB、FokI、dCas（D10A）、dCas（H840A）、dCas13a、dCas13b、塩基エディター、プライムエディター、標的プライムド逆転写（TPRT）エディター、APOBEC1、シチジンデアミナーゼ、アデノシンデアミナーゼ、ウラシルグリコシラーゼ阻害剤（UGI）、アデニン塩基エディター（ABE）、シトシン塩基エディター（CBE）、逆転写酵素、セリンインテグラーゼ、リコンビナーゼ、トランスポザーゼ、ポリメラーゼ、アデニン→チミンもしくは「ATBE」（またはチミン→アデニンもしくは「TABE」）トランスバージョン塩基エディター、10-11転座メチルシトシンジオキシゲナーゼ（TET）、TET1、TET3、TET1CD、ヒストンアセチルトランスフェラーゼp300、ヒストンメチルトランスフェラーゼSMYD3、ヒストンメチルトランスフェラーゼPRDM9、H3K79メチルトランスフェラーゼDOT1L、転写抑制因子、またはその機能部分からなる群から選択される、請求項675～681のいずれか1項に記載の方法。

20

30

【請求項683】

前記ゲノム標的化物質及び前記ゲノム改変物質が、単一のポリペプチドの異なるドメインである、請求項675～682のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項684】

前記ゲノム標的化物質及び前記ゲノム改変物質が、互いに作動可能に連結されている2つの異なるポリペプチドである、請求項675～683のいずれか1項に記載の方法。

【請求項685】

前記ゲノム標的化物質及び前記ゲノム改変物質が、互いに連結されていない2つの異なるポリペプチドである、請求項675～683のいずれか1項に記載の方法。

【請求項686】

前記ゲノム編集複合体が、ゲノムのセーフハーバー部位内の少なくとも1つの配列に相

50

補的な標的化ドメインを有するガイド核酸を含み、任意により、前記ガイド核酸がガイドRNA (gRNA) である、請求項674～685のいずれか1項に記載の方法。

【請求項687】

前記ゲノム編集複合体がRNA誘導型ヌクレアーゼを含む、請求項674～686のいずれか1項に記載の方法。

【請求項688】

前記RNA誘導型ヌクレアーゼがCasヌクレアーゼを含む、請求項687に記載の方法。

【請求項689】

前記ゲノム編集複合体が、前記Casヌクレアーゼ及び前記gRNAを含むリボ核タンパク質 (RNP) 複合体を含む、請求項688に記載の方法。 10

【請求項690】

前記Casヌクレアーゼが、II型またはV型Casタンパク質である、請求項688または689に記載の方法。

【請求項691】

前記Casヌクレアーゼが、Cas3、Cas4、Cas5、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a (Cpf1)、Cas12b (C2c1)、Cas12c (C2c3)、Cas12d (CasY)、Cas12e (CasX)、Cas12f (C2c10)、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k (C2c5)、Cas13、Cas13a (C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr5、Cse1、Cse2、Csf1、Csm2、Csn2、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3、及びMad7からなる群から選択される、請求項688～690のいずれか1項に記載の方法。 20

【請求項692】

前記gRNAが相補的領域を含み、前記相補的領域が遺伝子座内の標的核酸配列に相補的な核酸配列を含み、前記標的核酸配列が前記挿入部位を含む、請求項678に記載の方法。

【請求項693】

前記遺伝子座がTCR遺伝子座である、請求項692に記載の方法。 30

【請求項694】

前記遺伝子座がB2M遺伝子座である、請求項692に記載の方法。

【請求項695】

前記遺伝子座がCIITA遺伝子座である、請求項692に記載の方法。

【請求項696】

前記第1の挿入部位が、プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 配列から25ヌクレオチド以下であり、前記PAM配列が、ngg、nag、ngrrt、ngrrn、nnngatt、nnnnryac、nnagaaaw、naaaac、tttv、ttn、attn、tttn、gttn、またはyttnであり、

(i) r = aまたはgであり、 40

(ii) y = cまたはtであり、

(iii) w = aまたはtであり、

(iv) v = aまたはcまたはgであり、

(v) n = a、c、t、またはgである、請求項660～695のいずれか1項に記載の方法。

【請求項697】

挿入するステップが、SpCas9を使用した相同組換え修復 (HDR) により媒介される挿入を含み、前記PAMが、nggまたはnagであり、n = a、c、t、またはgである、請求項660～696のいずれか1項に記載の方法。

【請求項698】

挿入するステップが、S a C a s 9を使用した相同組換え修復（H D R）により媒介される挿入を含み、前記P A Mが、n g r r tまたはn g r r nであり、

（i）r = aまたはgであり、

（i i）n = a、c、t、またはgである、請求項660～696のいずれか1項に記載の方法。

【請求項699】

挿入するステップが、N m e C a s 9を使用した相同組換え修復（H D R）により媒介される挿入を含み、前記P A Mが、n n n n g a t tであり、n = a、c、t、またはgである、請求項660～696のいずれか1項に記載の方法。

【請求項700】

挿入するステップが、C j C a s 9を使用した相同組換え修復（H D R）により媒介される挿入を含み、前記P A Mが、n n n n r y a cであり、

（i）r = aまたはgであり、

（i i）y = cまたはtであり、

（i i i）n = a、c、t、またはgである、請求項660～696のいずれか1項に記載の方法。

【請求項701】

挿入するステップが、S t C a s 9を使用した相同組換え修復（H D R）により媒介される挿入を含み、前記P A Mが、n n a g a a wであり、

（i）w = aまたはtであり、

（i i）n = a、c、t、またはgである、請求項660～696のいずれか1項に記載の方法。

【請求項702】

挿入するステップが、T d C a s 9を使用した相同組換え修復（H D R）により媒介される挿入を含み、前記P A Mが、n a a a a cであり、n = a、c、t、またはgである、請求項660～696のいずれか1項に記載の方法。

【請求項703】

挿入するステップが、L b C a s 1 2 aを使用した相同組換え修復（H D R）により媒介される挿入を含み、前記P A Mが、t t t vであり、v = aまたはcまたはgである、請求項660～696のいずれか1項に記載の方法。

【請求項704】

挿入するステップが、A s C a s 1 2 aを使用した相同組換え修復（H D R）により媒介される挿入を含み、前記P A Mが、t t t vであり、v = aまたはcまたはgである、請求項660～696のいずれか1項に記載の方法。

【請求項705】

挿入するステップが、A a c C a s 1 2 bを使用した相同組換え修復（H D R）により媒介される挿入を含み、前記P A Mが、t t nであり、n = a、c、t、またはgである、請求項660～696のいずれか1項に記載の方法。

【請求項706】

挿入するステップが、B h C a s 1 2 bを使用した相同組換え修復（H D R）により媒介される挿入を含み、前記P A Mが、a t t n、t t t n、またはg t t nであり、n = a、c、t、またはgである、請求項660～696のいずれか1項に記載の方法。

【請求項707】

挿入するステップが、M A D 7（E r C a s 1 2 a）を使用した相同組換え修復（H D R）により媒介される挿入を含み、前記P A Mが、y t t nであり、

（i）y = cまたはtであり、

（i i）n = a、c、t、またはgである、請求項660～696のいずれか1項に記載の方法。

【請求項708】

部位特異的ヌクレアーゼを使用した相同組換え修復（H D R）により媒介される挿入が

10

20

30

40

50

、レンチウイルスを使用したHDRによる挿入と等しいか、またはそれより高いHDR効率で実行される、請求項660、678、または697～707のいずれか1項に記載の方法。

【請求項709】

挿入するステップが、ZFNを使用した相同組換え修復（HDR）により媒介される挿入を含む、請求項660～673、675、676、または677のいずれか1項に記載の方法。

【請求項710】

前記第1の挿入部位が、ジンクフィンガー結合配列から25ヌクレオチド以下である、請求項660～673、675、676、677、または709のいずれか1項に記載の方法。

【請求項711】

挿入するステップが、TALENを使用した相同組換え修復（HDR）により媒介される挿入を含む、請求項660～673、675、676、または677のいずれか1項に記載の方法。

【請求項712】

前記第1の挿入部位が、転写活性化因子様エフェクター（TALE）結合配列から25ヌクレオチド以下である、請求項660～673、675、676、677、または711のいずれか1項に記載の方法。

【請求項713】

挿入するステップが、ガイドRNA（gRNA）及びTnpBポリペプチドを使用した相同組換え修復（HDR）により媒介される挿入を含む、請求項660～675または677のいずれか1項に記載の方法。

【請求項714】

前記gRNAが相補的領域を含み、前記相補的領域が遺伝子座内の標的核酸配列に相補的な核酸配列を含み、前記標的核酸配列が前記挿入部位を含む、請求項713に記載の方法。

【請求項715】

前記遺伝子座がTCR遺伝子座である、請求項714に記載の方法。

【請求項716】

前記遺伝子座がB2M遺伝子座である、請求項714に記載の方法。

【請求項717】

前記遺伝子座がCIITA遺伝子座である、請求項714に記載の方法。

【請求項718】

前記遺伝子座がセーフハーバー遺伝子座である、請求項714に記載の方法。

【請求項719】

前記セーフハーバー遺伝子座が、AAVS1、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1、MICA、MICB、RHD、ROSA26、またはSHS231遺伝子座である、請求項718に記載の方法。

【請求項720】

前記挿入部位が、標的隣接モチーフ（TAM）配列から25ヌクレオチド以下であり、前記TAM配列が、tca、tcac、tcag、tcatt、tcaa、ttcan、ttcaa、ttcag、またはttgatであり、

（i）n=a、c、t、またはgである、請求項713～719のいずれか1項に記載の方法。

【請求項721】

挿入するステップが、TnpBポリペプチドを使用した相同組換え修復（HDR）により媒介される挿入を含み、前記TAMが、tcaである、請求項713～720のいずれか1項に記載の方法。

【請求項722】

10

20

30

40

50

挿入するステップが、T n p Bポリペプチドを使用した相同組換え修復（H D R）により媒介される挿入を含み、前記T A Mが、t c a cである、請求項7 1 3～7 2 0のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7 2 3】

挿入するステップが、T n p Bポリペプチドを使用した相同組換え修復（H D R）により媒介される挿入を含み、前記T A Mが、t c a gである、請求項7 1 3～7 2 0のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7 2 4】

挿入するステップが、T n p Bポリペプチドを使用した相同組換え修復（H D R）により媒介される挿入を含み、前記T A Mが、t c a tである、請求項7 1 3～7 2 0のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7 2 5】

挿入するステップが、T n p Bポリペプチドを使用した相同組換え修復（H D R）により媒介される挿入を含み、前記T A Mが、t c a aである、請求項7 1 3～7 2 0のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7 2 6】

挿入するステップが、T n p Bポリペプチドを使用した相同組換え修復（H D R）により媒介される挿入を含み、前記T A Mが、t t c a nであり、n = a、c、t、またはgである、請求項7 1 3～7 2 0のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7 2 7】

挿入するステップが、T n p Bポリペプチドを使用した相同組換え修復（H D R）により媒介される挿入を含み、前記T A Mが、t t c a aである、請求項7 1 3～7 2 0のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7 2 8】

挿入するステップが、T n p Bポリペプチドを使用した相同組換え修復（H D R）により媒介される挿入を含み、前記T A Mが、t t c a gである、請求項7 1 3～7 2 0のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7 2 9】

挿入するステップが、T n p Bポリペプチドを使用した相同組換え修復（H D R）により媒介される挿入を含み、前記T A Mが、t t g a tである、請求項7 1 3～7 2 0のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7 3 0】

前記核酸構築物を前記細胞に送達するステップが、レトロウイルスまたはアデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターによるウイルス形質導入を含む、請求項6 5 8または6 5 9に記載の方法。

【請求項7 3 1】

前記レトロウイルスが、モロニー Maus 白血病ウイルス（M - M u L V）、モロニー Maus 肉腫ウイルス（M o M S V）、ハーベイ Maus 肉腫ウイルス（H a M u S V）、Maus 乳癌ウイルス（M u M T V）、テナガザル白血病ウイルス（G a L V）、ネコ白血病ウイルス（F L V）、スプマウイルス、フレンド Maus 白血病ウイルス、Maus 幹細胞ウイルス（M S C V）、ラウス肉腫ウイルス（R S V）、レンチウイルス、ガンマレトロウイルス、イプシロンレトロウイルス、アルファレトロウイルス、ベータレトロウイルス、デルタレトロウイルス、またはスプーマレトロウイルスであるか、またはそれを含む、請求項7 3 0に記載の方法。

【請求項7 3 2】

前記A A Vベクターが、A A V 6ベクターまたはA A V 9ベクターである、請求項7 3 0に記載の方法。

【請求項7 3 3】

T C R遺伝子座の前記挿入部位の前記遺伝子操作されたタンパク質をコードする前記第1の導入遺伝子が、機能的T C Rの発現を低減する、請求項6 6 0、6 6 1、6 6 2、6

10

20

30

40

50

7 3 ～ 6 9 3、6 9 6 ～ 7 1 5、または 7 2 0 ～ 7 3 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 3 4】

T C R 遺伝子座の前記挿入部位の前記遺伝子操作されたタンパク質をコードする前記第 1 の導入遺伝子が、機能的 T C R の発現を破壊する、請求項 6 6 0、6 6 1、6 6 2、6 7 3 ～ 6 9 3、6 9 6 ～ 7 1 5、または 7 2 0 ～ 7 3 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 3 5】

B 2 M 遺伝子座の前記挿入部位の前記遺伝子操作されたタンパク質をコードする前記第 1 の導入遺伝子が、機能的 B 2 M の発現を低減する、請求項 6 6 0、6 6 1、6 6 2、6 7 3 ～ 6 9 3、6 9 6 ～ 7 1 5、または 7 2 0 ～ 7 3 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 3 6】

B 2 M 遺伝子座の前記挿入部位の前記遺伝子操作されたタンパク質をコードする前記第 1 の導入遺伝子が、機能的 M H C I 分子の発現を低減する、請求項 6 6 0、6 6 1、6 6 2、6 7 3 ～ 6 9 3、6 9 6 ～ 7 1 5、または 7 2 0 ～ 7 3 2、または 7 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 3 7】

B 2 M 遺伝子座の前記挿入部位の前記遺伝子操作されたタンパク質をコードする前記第 1 の導入遺伝子が、機能的 B 2 M の発現を破壊する、請求項 6 6 0、6 6 1、6 6 2、6 7 3 ～ 6 9 3、6 9 6 ～ 7 1 5、または 7 2 0 ～ 7 3 2、または 7 3 5 ～ 7 3 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 3 8】

B 2 M 遺伝子座の前記挿入部位の前記遺伝子操作されたタンパク質をコードする前記第 1 の導入遺伝子が、機能的 M H C I 分子の発現を破壊する、請求項 6 6 0、6 6 1、6 6 2、6 7 3 ～ 6 9 3、6 9 6 ～ 7 1 5、または 7 2 0 ～ 7 3 2、または 7 3 5 ～ 7 3 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 3 9】

C I I T A 遺伝子座の前記挿入部位の前記遺伝子操作されたタンパク質をコードする前記第 1 の導入遺伝子が、機能的 C I I T A の発現を低減する、請求項 6 6 0、6 6 1、6 6 2、6 7 3 ～ 6 9 3、6 9 6 ～ 7 1 5、または 7 2 0 ～ 7 3 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 4 0】

C I I T A 遺伝子座の前記挿入部位の前記遺伝子操作されたタンパク質をコードする前記第 1 の導入遺伝子が、機能的 M H C I I 分子の発現を低減する、請求項 6 6 0、6 6 1、6 6 2、6 7 3 ～ 6 9 3、6 9 6 ～ 7 1 5、または 7 2 0 ～ 7 3 2、または 7 3 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 4 1】

C I I T A 遺伝子座の前記挿入部位の前記遺伝子操作されたタンパク質をコードする前記第 1 の導入遺伝子が、機能的 C I I T A の発現を破壊する、請求項 6 6 0、6 6 1、6 6 2、6 7 3 ～ 6 9 3、6 9 6 ～ 7 1 5、または 7 2 0 ～ 7 3 2、または 7 3 9 ～ 7 4 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 4 2】

C I I T A 遺伝子座の前記挿入部位の前記遺伝子操作されたタンパク質をコードする前記第 1 の導入遺伝子が、機能的 M H C I I 分子の発現を破壊する、請求項 6 6 0、6 6 1、6 6 2、6 7 3 ～ 6 9 3、6 9 6 ～ 7 1 5、または 7 2 0 ～ 7 3 2、または 7 3 9 ～ 7 4 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 4 3】

前記細胞が、

(a) 1 種以上の主要組織適合複合体 (M H C) クラス I 分子、もしくは前記 1 種以上の M H C クラス I 分子の発現を調節する 1 種以上の分子、及び／または

(b) 1 種以上の M H C クラス I I 分子、もしくは前記 1 種以上の M H C クラス I I 分子の発現を調節する 1 種以上の分子

10

20

30

40

50

の 1 つ以上のアレルを不活性化または破壊する 1 種以上の改変を含む、請求項 6 5 8 ～ 7 4 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 4 4】

前記細胞が、1 種以上の M H C クラス I 分子、または前記 1 種以上の M H C クラス I 分子の発現を調節する 1 種以上の分子の 1 つ以上のアレルを不活性化または破壊する 1 種以上の改変を含む、請求項 6 5 8 ～ 7 4 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 4 5】

前記細胞が、1 種以上の M H C クラス I I 分子、または前記 1 種以上の M H C クラス I I 分子の発現を調節する 1 種以上の分子の 1 つ以上のアレルを不活性化または破壊する 1 種以上の改変を含む、請求項 6 5 8 ～ 7 4 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 7 4 6】

前記細胞が、

(a) 1 種以上の M H C クラス I 分子、または前記 1 種以上の M H C クラス I 分子の発現を調節する 1 種以上の分子、及び

(b) 1 種以上の M H C クラス I I 分子、もしくは前記 1 種以上の M H C クラス I I 分子の発現を調節する 1 種以上の分子

の 1 つ以上のアレルを不活性化または破壊する 1 種以上の改変を含む、請求項 6 5 8 ～ 7 4 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 4 7】

前記 1 種以上の改変が、前記 1 種以上の M H C クラス I 分子の細胞表面タンパク質発現を低減する、請求項 7 4 3 ～ 7 4 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 7 4 8】

前記 1 種以上の改変が、前記 1 種以上の M H C クラス I 分子の細胞表面輸送を低減する、請求項 7 4 3 ～ 7 4 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 4 9】

前記 1 種以上の改変が、前記 1 種以上の M H C クラス I 分子の機能を低減し、任意により、前記機能が抗原提示である、請求項 7 4 3 ～ 7 4 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 5 0】

前記 1 種以上の M H C クラス I 分子が、1 種以上のヒト白血球抗原 (H L A) クラス I 分子である、請求項 7 4 3 ～ 7 4 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 7 5 1】

前記 1 種以上の H L A クラス I 分子が、H L A - A、H L A - B、及び H L A - C からなる群から選択される、請求項 7 5 0 に記載の方法。

【請求項 7 5 2】

前記 1 種以上の M H C クラス I 分子の発現を調節する前記 1 種以上の分子が、B 2 M、N L R C 5、及び T A P 1 からなる群から選択される、請求項 7 4 3 ～ 7 5 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 5 3】

前記 1 種以上の改変が、前記 1 種以上の M H C クラス I I 分子の細胞表面タンパク質発現を低減する、請求項 7 4 3 ～ 7 5 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 7 5 4】

前記 1 種以上の改変が、前記 1 種以上の M H C クラス I I 分子の細胞表面輸送を低減する、請求項 7 4 3 ～ 7 5 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 5 5】

前記 1 種以上の改変が、前記 1 種以上の M H C クラス I I 分子の機能を低減し、任意により、前記機能が抗原提示である、請求項 7 4 3 ～ 7 5 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 5 6】

前記 1 種以上の M H C クラス I I 分子が、1 種以上のヒト白血球抗原 (H L A) クラス I I 分子である、請求項 7 4 3 ～ 7 5 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 5 7】

50

前記１種以上のHLAクラスII分子が、HLA-DP、HLA-DQ、及び／またはHLA-DRからなる群から選択される、請求項756に記載の方法。

【請求項758】

前記１種以上のMHCクラスII分子の発現を調節する前記１種以上の分子が、CIITA及びCD74からなる群から選択される、請求項743～757のいずれか１項に記載の方法。

【請求項759】

セーフハーバー遺伝子座の挿入部位の前記遺伝子操作されたタンパク質をコードする前記第１の導入遺伝子は、機能的AAVS1、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1、MICA、MICB、RHD、ROSA26、またはSHS231の発現を破壊する、請求項660～758のいずれか１項に記載の方法。

【請求項760】

セーフハーバー遺伝子座の前記挿入部位の前記遺伝子操作されたタンパク質をコードする前記第１の導入遺伝子が、機能的AAVS1、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1、MICA、MICB、RHD、ROSA26、またはSHS231分子の発現を破壊する、請求項660～758のいずれか１項に記載の方法。

【請求項761】

前記遺伝子操作された細胞が、前記遺伝子操作されたタンパク質の細胞表面発現を有する、請求項658～760のいずれか１項に記載の方法。

【請求項762】

前記核酸構築物が、免疫寛容誘導因子をコードする第２の導入遺伝子を更に含む、請求項658～761のいずれか１項に記載の方法。

【請求項763】

前記方法が、前記第２の導入遺伝子を前記細胞のゲノムの第２の挿入部位に挿入することを更に含む、請求項762に記載の方法。

【請求項764】

前記免疫寛容誘導因子が、A20/TNFAIP3、B2M-HLA-E、CD16、CD16 Fc受容体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、CD52、CD55、CD59、CD64、CD200、CCL21、CCL22、CTLA4-Ig、C1阻害因子、CR1、DUX4、FASL、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鎖、HLA-F、HLA-G、H2-M3、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、IL-39、MANF、Mfge8、PD-L1、またはSerpinb9であるか、またはそれを含む、請求項762に記載の方法。

【請求項765】

前記免疫寛容誘導因子をコードする前記第２の導入遺伝子が、TCR遺伝子座の前記第２の挿入部位で挿入されている、請求項762～764のいずれか１項に記載の方法。

【請求項766】

前記免疫寛容誘導因子をコードする前記第２の導入遺伝子が、B2M遺伝子座の前記第２の挿入部位で挿入されている、請求項762～764のいずれか１項に記載の方法。

【請求項767】

前記免疫寛容誘導因子をコードする前記第２の導入遺伝子が、CIITA遺伝子座の前記第２の挿入部位で挿入されている、請求項762～121b764のいずれか１項に記載の方法。

【請求項768】

前記免疫寛容誘導因子をコードする前記第２の導入遺伝子が、セーフハーバー遺伝子座の前記第２の挿入部位で挿入されている、請求項762～764のいずれか１項に記載の方法。

【請求項769】

10

20

30

40

50

前記セーフハーバー遺伝子座が、AAVS1、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1、MICA、MICB、RHD、ROSA26、またはSHS231遺伝子座である、請求項768に記載の方法。

【請求項770】

前記遺伝子操作された細胞が、前記免疫寛容誘導因子の細胞表面発現を有する、請求項762～769のいずれか1項に記載の方法。

【請求項771】

前記核酸構築物が、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする第3の導入遺伝子を更に含む、請求項658～770のいずれか1項に記載の方法。

【請求項772】

前記方法が、前記第3の導入遺伝子を前記細胞のゲノムの第3の挿入部位に挿入することを更に含む、請求項771に記載の方法。

【請求項773】

前記CARが、CD5特異的CAR、CD19特異的CAR、CD20特異的CAR、CD22特異的CAR、CD23特異的CAR、CD30特異的CAR、CD33特異的CAR、CD38特異的CAR、CD70特異的CAR、CD123特異的CAR、CD138特異的CAR、 κ 、 λ 、B細胞成熟物質(BCMA)特異的CAR、Gタンパク質共役受容体ファミリーCグループ5メンバーD(GPRC5D)特異的CAR、CD123特異的CAR、LeY特異的CAR、NKG2Dリガンド特異的CAR、WT1特異的CAR、GD2特異的CAR、HER2特異的CAR、EGFR特異的CAR、EGFRvIII特異的CAR、B7H3特異的CAR、PSMA特異的CAR、PSCA特異的CAR、CAIX特異的CAR、CD171特異的CAR、CEA特異的CAR、CSPG4特異的CAR、EPHA2特異的CAR、FAP特異的CAR、FR α 特異的CAR、IL-13R α 特異的CAR、メソテリン特異的CAR、MUC1特異的CAR、MUC16特異的CAR、ROR1特異的CAR、C-Met特異的CAR、CD133特異的CAR、Ep-CAM特異的CAR、GPC3特異的CAR、HPV16-E6特異的CAR、IL13Ra2特異的CAR、MAGEA3特異的CAR、MAGEA4特異的CAR、MART1特異的CAR、NY-ESO-1特異的CAR、VEGFR2特異的CAR、 α 葉酸受容体特異的CAR、CD24特異的CAR、CD44v7/8特異的CAR、EGP-2特異的CAR、EGP-40特異的CAR、erb-B2特異的CAR、erb-B2, 3, 4特異的CAR、FBP特異的CAR、胎児アセチルコリン受容体特異的CAR、GD2特異的CAR、GD3特異的CAR、HMW-MAA特異的CAR、IL-11R α 特異的CAR、KDR特異的CAR、ルイスY特異的CAR、L1細胞接着分子特異的CAR、MAGE-A1特異的CAR、癌胎児性抗原(h5T4)特異的CAR、TAG-72特異的CAR、またはCD19/CD22二重特異性CARであるか、またはそれを含む、請求項771に記載の方法。

【請求項774】

前記CARが、CD19特異的CAR、CD20特異的CAR、CD22特異的CAR、CD38特異的CAR、CD123特異的CAR、CD138特異的CAR、BCMA特異的CAR、またはCD19/CD22二重特異性CARであるか、またはそれを含む、請求項771～773のいずれか1項に記載の方法。

【請求項775】

前記遺伝子操作された細胞が、前記CARの細胞表面発現を有する、請求項771～774のいずれか1項に記載の方法。

【請求項776】

前記核酸構築物が、キメラ自己抗原受容体(CAAR)をコードする第3の導入遺伝子を更に含む、請求項658～770のいずれか1項に記載の方法。

【請求項777】

前記方法が、前記第3の導入遺伝子を前記細胞のゲノムの第3の挿入部位に挿入することを更に含む、請求項776に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 778】

前記 C A A R が、腓β細胞抗原、滑膜関節抗原、ミエリン塩基性タンパク質、プロテオリピドタンパク質、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質、M u S K、ケラチノサイト接着タンパク質デスモグレイン 3 (D s g 3)、R o - R N P 複合体、L a 抗原、ミエロペルオキシダーゼ、プロテイナーゼ 3、カルジオリピン、シトルリン化タンパク質、カルバミル化タンパク質、及び基底膜コラーゲンの α 3 鎖からなる群から選択される抗原を含む、請求項 776 に記載の方法。

【請求項 779】

前記遺伝子操作された細胞が、前記 C A A R の細胞表面発現を有する、請求項 776 ~ 778 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 780】

前記核酸構築物が、B 細胞自己抗体受容体 (B A R) をコードする第 3 の導入遺伝子を更に含む、請求項 658 ~ 770 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 781】

前記方法が、前記第 3 の導入遺伝子を前記細胞のゲノムの第 3 の挿入部位に挿入することを更に含む、請求項 780 に記載の方法。

【請求項 782】

前記遺伝子操作された細胞が、前記 B A R の細胞表面発現を有する、請求項 780 に記載の方法。

【請求項 783】

前記第 3 の導入遺伝子がセーフハーバー遺伝子座に挿入されている、請求項 771 ~ 782 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 784】

前記第 3 の導入遺伝子が、T R A C 遺伝子座、T R B C 1 遺伝子座、T R B C 2 遺伝子座、B 2 M 遺伝子座、C I I T A 遺伝子座、M I C A 遺伝子座、M I C B 遺伝子座、またはセーフハーバー遺伝子座に挿入されている、請求項 771 ~ 783 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 785】

前記第 3 の導入遺伝子が、A A V S 1 遺伝子座、A B O 遺伝子座、C C R 5 遺伝子座、C L Y B L 遺伝子座、C X C R 4 遺伝子座、F 3 遺伝子座、F U T 1 遺伝子座、H M G B 1 遺伝子座、K D M 5 D 遺伝子座、L R P 1 遺伝子座、R H D 遺伝子座、R O S A 2 6 遺伝子座、または S H S 2 3 1 遺伝子座に挿入されている、請求項 771 ~ 784 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 786】

前記第 1 の導入遺伝子及び前記第 2 の導入遺伝子が、同じ挿入部位に挿入されている、請求項 658 ~ 785 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 787】

前記第 1 の導入遺伝子及び前記第 3 の導入遺伝子が、同じ挿入部位に挿入されている、請求項 658 ~ 768 または 780 ~ 785 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 788】

前記第 2 の導入遺伝子及び前記第 3 の導入遺伝子が、同じ挿入部位に挿入されている、請求項 762 ~ 785 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 789】

前記第 1 の導入遺伝子、前記第 2 の導入遺伝子、及び前記第 3 の導入遺伝子が、同じ挿入部位に挿入されている、請求項 658 ~ 785 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 790】

前記第 1 の導入遺伝子、前記第 2 の導入遺伝子、及び前記第 3 の導入遺伝子が、3 種の別個の構築物によりコードされる、請求項 658 ~ 789 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 791】

前記第 1 の導入遺伝子、前記第 2 の導入遺伝子、及び前記第 3 の導入遺伝子が、2 種の

10

20

30

40

50

別個の構築物によりコードされる、請求項 6 5 8 ~ 7 8 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 9 2】

前記第 1 の導入遺伝子、前記第 2 の導入遺伝子、及び前記第 3 の導入遺伝子が、多シストロン性構築物によりコードされる、請求項 6 5 8 ~ 7 8 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 9 3】

前記遺伝子操作された細胞が、ヒト細胞または非ヒト動物細胞である、請求項 6 5 8 ~ 7 9 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 9 4】

前記非ヒト動物細胞が、ブタ、ウシ、またはヒツジ細胞である、請求項 7 9 3 に記載の方法。

【請求項 7 9 5】

前記遺伝子操作された細胞がヒト細胞である、請求項 7 9 3 に記載の方法。

【請求項 7 9 6】

前記遺伝子操作された細胞が、幹細胞または前駆細胞に由来する分化した細胞である、請求項 6 5 8 ~ 7 9 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 9 7】

前記細胞が幹細胞または前駆細胞である、請求項 6 5 8 ~ 7 9 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 9 8】

前記細胞が、幹細胞または前駆細胞に由来する分化した細胞である、請求項 6 5 8 ~ 7 9 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 9 9】

前記幹細胞が多能性幹細胞である、請求項 7 9 6 に記載の方法。

【請求項 8 0 0】

前記多能性幹細胞が人工多能性幹細胞 (iPSC) である、請求項 7 9 9 に記載の方法。

【請求項 8 0 1】

前記多能性幹細胞が胚性幹細胞 (ESC) である、請求項 7 9 9 に記載の方法。

【請求項 8 0 2】

前記細胞がドナーから単離された初代細胞である、請求項 6 5 8 ~ 8 0 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 0 3】

前記ドナーが、前記初代細胞が前記ドナーから採取される時点で健常であり、及び／または疾患もしくは病態を有すると疑われていない、請求項 8 0 2 に記載の方法。

【請求項 8 0 4】

前記細胞が、島細胞、β 膵島細胞、膵島細胞、免疫細胞、B 細胞、T 細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞、ナチュラルキラー T (NKT) 細胞、マクロファージ細胞、内皮細胞、筋細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、骨格筋細胞、ドーパミン作動性ニューロン、網膜色素上皮細胞、視細胞、肝実質細胞、甲状腺細胞、皮膚細胞、グリア前駆細胞、神経細胞、心臓細胞、幹細胞、造血幹細胞、人工多能性幹細胞 (iPSC)、間葉系幹細胞 (MSC)、胚性幹細胞 (ESC)、多能性幹細胞 (PSC)、血液細胞、またはそれらの組み合わせである、請求項 6 5 8 ~ 8 0 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 0 5】

前記細胞が T 細胞である、請求項 6 5 8 ~ 8 0 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 0 6】

前記 T 細胞が、CD3 + T 細胞、CD4 + T 細胞、CD5 + T 細胞、ナイーブ T 細胞、制御性 T (Treg) 細胞、非制御性 T 細胞、Th1 細胞、Th2 細胞、Th9 細胞、Th17 細胞、濾胞性ヘルパー T (Tfh) 細胞、細胞傷害性 T リンパ球 (CTL)、エフェクター T (Teff) 細胞、セントラルメモリー T 細胞、エフェクターメモリー T 細胞

10

20

30

40

50

、CD45RAを発現するエフェクターメモリーT細胞（TEMRA細胞）、組織常在性メモリー（T_{rm}）細胞、バーチャルメモリーT細胞、自然免疫メモリーT細胞、メモリー幹細胞（T_{sc}）、 $\gamma\delta$ T細胞、またはそれらの組み合わせである、請求項805に記載の方法。

【請求項807】

前記T細胞が、細胞傷害性T細胞、ヘルパーT細胞、メモリーT細胞、制御性T細胞、腫瘍浸潤リンパ球、またはそれらの組み合わせである、請求項805または806に記載の方法。

【請求項808】

前記細胞がヒトT細胞である、請求項805～807のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項809】

前記細胞が自家T細胞である、請求項805～808のいずれか1項に記載の方法。

【請求項810】

前記細胞が同種異系T細胞である、請求項805～808のいずれか1項に記載の方法

。

【請求項811】

前記同種異系T細胞が初代T細胞である、請求項810に記載の方法。

【請求項812】

前記同種異系T細胞が、胚性幹細胞（ESC）または人工多能性幹細胞（iPSC）から分化している、請求項810または811に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2022年2月17日に出願された米国仮出願第63／311,143号の優先権を主張し、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本開示は、一般に、遺伝子操作されたCD47タンパク質及びその使用に関する。遺伝子操作されたCD47タンパク質をコードするポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドを含むベクター、遺伝子操作されたタンパク質及び／またはベクターを含む細胞、ならびに遺伝子操作されたCD47タンパク質を含む組成物も開示される。

30

【0003】

国際出願PCT／US2021／065157、ならびに米国出願第63／282,961号、同63／270,956号、及び同63／222,954号は、その全体が参照により組み込まれる。

【発明の概要】

【0004】

CD47は、ヒトにおけるCD47遺伝子によりコードされる膜貫通タンパク質である（図1）。これは免疫グロブリン（Ig）スーパーファミリーに属する。CD47は、約50kDaの分子量を有する。これはグリコシル化され、人体の実質的に全ての細胞によりユビキタスに発現される（図2）。これは、N末端の単一のIgV様ドメイン、5個の膜貫通セグメントを有する高度に疎水性のストレッチ、及び選択的にスプライシングされるC末端の細胞質尾部を有する（図4）。加えて、これは、隣接する膜貫通セグメントの間に2個の細胞外領域及び2個の細胞内領域を有する。シグナルペプチド、それがCD47アイソフォームに存在する場合、IgV様ドメインのN末端に存在する。ヒトCD47遺伝子は、6つの天然に存在する転写物を有し、これらのうちの5つがそれぞれCD47のタンパク質アイソフォームをコードする（Ensembl、遺伝子：CD47）。従って、ヒトCD47の5つのタンパク質アイソフォームが存在し、各々が様々な細胞種及び組織型間で差次的発現を示す。

40

【0005】

CD47は、アポトーシス、増殖、接着、及び遊走が含まれる、様々な細胞プロセスに

50

関与する。CD47は、複数の細胞外リガンド、例えば、TSP-1、インテグリン、他のCD47タンパク質、及びSIRPαと相互作用する。CD47/SIRPα相互作用は、免疫系などの多数の身体システムにおいて多数の細胞間相互作用を調節し、免疫系では、CD47/SIRPα相互作用は、リンパ球恒常性、樹状細胞（DC）成熟及び活性化、二次リンパ器官における特定のDCサブセットの適切な局在化、ならびに細胞の遊出を調節する。移植または細胞療法用途の文脈におけるドナー細胞が含まれる、細胞上のCD47は、「自己のマーカ―」として機能することができ、循環免疫細胞表面上のSIRPαに結合して、抑制性の「私を殺さないで」シグナルを伝達することにより貪食を調節することができる。CD47-SIRPα結合は、SIRPα上の免疫受容体チロシンベース抑制性モチーフ（ITIM）のリン酸化をもたらし、このことが、SHP1及びSHP2（Src相同ホスファターゼ）の動員を引き起こす。次に、これらのホスファターゼは、貪食シナプスでのミオシンIIの蓄積を阻害し、これにより、貪食を防止する（Fujio et al., 1996）。マクロファージにより標的細胞の貪食は、最終的に活性化シグナル（例えば、FcγR、CRT、LRP-1）及び抑制性シグナル（例えば、SIRPα-CD47）のバランスにより調節される。CD47発現の上昇は、細胞が免疫監視、その後の破壊及び自然免疫細胞による殺傷を回避するのを補助し得る。従って、CD47は、さもないと正常な免疫応答の病的活性化または望ましくない活性化が存在する場合に免疫寛容を誘発する免疫寛容誘導因子として使用することができる。これは、例えば、同種異系間移植もしくは同種異系細胞療法を受けた後に患者がドナー抗原に対する免疫反応を発症する場合、または身体が自己免疫疾患に関与する自己抗原に対して不適当に反応する場合に、起こり得る。しかしながら、CD47のかかる使用に関して改善する必要性が当該技術分野において存在する。

10

20

30

40

50

【0006】

本開示は、一態様では、野生型全長ヒトCD47タンパク質と比べてより少ないアミノ酸を有する遺伝子操作されたCD47タンパク質を提供する。かかる遺伝子操作されたタンパク質は、遺伝子治療ベクターを組み込むことによる送達が含まれる、より効率的な細胞の遺伝子操作手法をもたらす。

【0007】

ある態様では、本開示は、ヒトCD47細胞外ドメインまたはその一部、少なくとも1個のヒトCD47膜貫通ドメインまたはその一部、及び少なくとも1個のアミノ酸の欠失を含むヒトCD47細胞内ドメインの一部を含む遺伝子操作されたCD47タンパク質を提供し、ここで、当該欠失は、18アミノ酸のC末端欠失ではない。

【0008】

ある態様では、本開示は、ヒトCD47細胞外ドメインの一部、少なくとも1個のヒトCD47膜貫通ドメインまたはその一部、及び18アミノ酸のC末端欠失を含むヒトCD47細胞内ドメインの一部を含む遺伝子操作されたCD47タンパク質を提供する。

【0009】

ある態様では、本開示は、ヒトCD47細胞外ドメインまたはその一部、少なくとも1個かつ5個以下のヒトCD47膜貫通ドメイン（複数可）またはその一部（複数可）、及び18アミノ酸のC末端欠失を含むヒトCD47細胞内ドメインの一部を含む遺伝子操作されたCD47タンパク質を提供する。

【0010】

ある態様では、本開示は、ヒトCD47細胞外ドメインまたはその一部、少なくとも1個のヒトCD47膜貫通ドメインまたはその一部、及びシグナルペプチドを含む遺伝子操作されたCD47タンパク質を提供し、ここで、当該遺伝子操作されたCD47タンパク質は、細胞内ドメインを含まない。

【0011】

ある態様では、本開示は、ヒトCD47細胞外ドメイン、及び少なくとも1個のヒトCD47膜貫通ドメインまたはその一部を含む遺伝子操作されたCD47タンパク質を提供し、ここで、当該遺伝子操作されたCD47タンパク質は、細胞内ドメインを含まない。

【0012】

ある態様では、本開示は、ヒトCD47細胞外ドメインまたはその一部、及び少なくとも1個かつ5個以下のヒトCD47膜貫通ドメイン（複数可）またはその一部（複数可）を含む遺伝子操作されたCD47タンパク質を提供し、ここで、当該遺伝子操作されたCD47タンパク質は、細胞内ドメインを含まない。

【0013】

ある態様では、本開示は、ヒトCD47細胞外ドメインまたはその一部、及び少なくとも1個のヒトCD47膜貫通ドメインまたはその一部を含み、細胞内ドメインを含まないか、または少なくとも1個のアミノ酸の欠失を含むヒトCD47細胞内ドメインを含む遺伝子操作されたCD47タンパク質を提供し、ここで、当該遺伝子操作されたCD47タンパク質は、配列番号1及び配列番号6に対する最高で99%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。

10

【0014】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質は、野生型CD47タンパク質と比べてより少ないグリコシル化修飾部位を含む。

【0015】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質は、野生型ヒトCD47タンパク質と比べてより少ないグリコシル化修飾を含む。

【0016】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質は、2個未満のヘパラン及び／またはコンドロイチン硫酸グリコサミノグリカン修飾部位を含む。

20

【0017】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質は、2個未満のヘパラン及び／またはコンドロイチン硫酸グリコサミノグリカン鎖を含む。

【0018】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質は、5個未満のN-グリコシル化修飾部位を含む。

【0019】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質は、4個未満のN-グリコシル化修飾鎖を含む。

30

【0020】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質におけるヒトCD47細胞外ドメインまたはその一部は、野生型ヒトCD47タンパク質と比較して1個以上のトロンボスポンジン-1結合部位（複数可）を欠く。

【0021】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質におけるヒトCD47細胞外ドメインまたはその一部は、野生型ヒトCD47タンパク質と比較して1個以上のインテグリン結合部位（複数可）を欠く。幾つかの実施形態では、インテグリンは、 $\alpha v \beta 3$ インテグリン、 $\alpha I I b \beta 3$ インテグリン、 $\alpha 2 \beta 1$ インテグリン、 $\alpha 4 \beta 1$ インテグリン、 $\alpha 6 \beta 1$ インテグリン、及び $\alpha 5$ インテグリンからなる群から選択される。

40

【0022】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質におけるヒトCD47細胞外ドメインまたはその一部は、少なくとも1個のSIRP α 相互作用モチーフを含む。

【0023】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質は、ヒトCD47細胞外ドメイン内またはその一部内のシステインと、ヒトCD47

50

膜貫通ドメイン（複数可）内またはその間のシステインとの間のジスルフィド結合を含む。

【0024】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質は、免疫寛容誘導因子である。

【0025】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質は、膜貫通タンパク質である。

【0026】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質におけるヒトCD47細胞外ドメインは、配列番号2のアミノ酸19～141に対する少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0027】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質における少なくとも1個のヒトCD47膜貫通ドメイン（複数可）のいずれかは、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む：配列番号2のアミノ酸142～162に対する少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列、配列番号2のアミノ酸177～197に対する少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列、配列番号2のアミノ酸208～228に対する少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列、及び配列番号2のアミノ酸236～257に対する少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列、及び配列番号2のアミノ酸269～289に対する少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列。

【0028】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質におけるヒトCD47細胞内ドメインは、配列番号2のアミノ酸290～323の配列に対する少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0029】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質は、配列番号7に記載されるアミノ酸配列に対する少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0030】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質は、配列番号8に記載されるアミノ酸配列に対する少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0031】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質は、配列番号9に記載されるアミノ酸配列に対する少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0032】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質は、配列番号12に記載されるアミノ酸配列に対する少なくとも80%、90%、9

10

20

30

40

50

5 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または100 %の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0033】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質は、配列番号10に記載されるアミノ酸配列に対する少なくとも80 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または100 %の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0034】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質は、配列番号11に記載されるアミノ酸配列に対する少なくとも80 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または100 %の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0035】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、遺伝子操作されたヒトCD47タンパク質、遺伝子操作されたヒト化CD47タンパク質、または遺伝子操作された部分的ヒト化CD47タンパク質である。

【0036】

別の態様では、本開示は、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質をコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0037】

別の態様では、本開示は、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。幾つかの実施形態では、ベクターは、プラスミドまたはウイルスベクターである。幾つかの実施形態では、ウイルスベクターは、偽型化された自己不活性化レンチウイルスベクターである。幾つかの実施形態では、ベクターは、多シストロン性ベクターである。幾つかの実施形態では、多シストロン性ベクターは、バイシストロン性ベクターまたはトリシストロン性ベクターである。

20

【0038】

別の態様では、本開示は、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質をコードするポリヌクレオチド、及び／または本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含む細胞を提供する。

30

【0039】

別の態様では、本開示は、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質を含む細胞を提供する。

【0040】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される細胞は、幹細胞である。

【0041】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される細胞は、多能性幹細胞である。幾つかの実施形態では、多能性幹細胞は、人工多能性幹細胞 (iPSC) または胚性幹細胞である。

40

【0042】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される細胞は、臍島細胞である。

【0043】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される細胞は、初代臍島細胞である。幾つかの実施形態では、臍島細胞は、多能性幹細胞から分化している。幾つかの実施形態では、多能性幹細胞は、iPSCまたはESCである。

【0044】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される細胞は、T細胞である。

【0045】

50

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される細胞は、初代T細胞である。幾つかの実施形態では、初代T細胞は、キメラ抗原受容体を含むT細胞である。幾つかの実施形態では、T細胞は、CAR-T細胞である。幾つかの実施形態では、T細胞は、多能性幹細胞から分化している。幾つかの実施形態では、多能性幹細胞は、iPSCまたはESCである。

【0046】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される細胞は、幹細胞、臍島細胞、T細胞、CAR-T細胞、心臓細胞、心臓前駆細胞、神経細胞、グリア前駆細胞、内皮細胞、B細胞、網膜色素上皮細胞、肝実質細胞、甲状腺細胞、皮膚細胞、血液細胞、形質細胞、血小板、腎細胞、上皮細胞、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）、及びCAR-NK細胞からなる細胞の群から選択される。

10

【0047】

幾つかの実施形態では、細胞は、初代細胞である。幾つかの実施形態では、細胞は、分化した細胞である。

【0048】

幾つかの実施形態では、細胞は、低免疫原性細胞である。

【0049】

幾つかの実施形態では、1種以上の主要組織適合性（MHC）クラスIタンパク質及び／または1種以上のMHCクラスIIタンパク質の発現は、野生型または対照細胞と比較して低減される。幾つかの実施形態では、野生型または対照細胞は、出発材料である。幾つかの実施形態では、本明細書において開示される細胞は、1種以上の主要組織適合性（MHC）クラスIタンパク質及び／または1種以上のMHCクラスIIタンパク質を発現しない。幾つかの実施形態では、MHCタンパク質は、HLAタンパク質である。

20

【0050】

幾つかの実施形態では、MHCクラスIタンパク質の発現は、本明細書に記載される細胞におけるB2Mをノックアウトすること、またはその発現を低減することにより低減される。

【0051】

幾つかの実施形態では、MHCクラスIIタンパク質の発現は、本明細書に記載される細胞におけるCIITAをノックアウトすること、またはその発現を低減することにより低減される。

30

【0052】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される細胞におけるTRAC及び／またはTRBCがノックアウトされるか、またはそれらの発現が低減される。

【0053】

別の態様では、本開示は、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質を含む組成物を提供する。

【0054】

別の態様では、本開示は、本明細書において開示される細胞を含む組成物を提供する。

【図面の簡単な説明】

40

【0055】

【図1】ヒトCD47遺伝子のマップを示し、タンパク質をコードするヒトCD47遺伝子の領域を示す。このマップは、Ensemblゲノムデータベースのものである。

【図2A】CD47のアイソフォーム発現：ENSG00000196776.14 CD47分子（出典：HGNCシンボル；Acc：HGNC：1682）を示し、様々なヒト組織及びヒト細胞種における各アイソフォームの発現を示す。このデータは、Genotype-Tissue Expression（GTEx）プロジェクトデータベースのものである。

【図2B】CD47のアイソフォーム発現：ENSG00000196776.14 CD47分子（出典：HGNCシンボル；Acc：HGNC：1682）を示し、様々なヒ

50

ト組織及びヒト細胞種における各アイソフォームの発現を示す。このデータは、Genotype-Tissue Expression (GTEx) プロジェクトデータベースのものである。

【図3】予測されるCD47膜貫通ドメイン及びヒトCD47タンパク質トポロジーを示す。特に図3は、ヒトCD47タンパク質における様々なドメインの予測される位置を示す。この予測は、Universal Protein Resource (UniProt) によるものである。

【図4】AlphaFoldタンパク質構造データベースの予測されるヒトCD47三次構造を示す。

【図5A】ヒトCD47タンパク質のアイソフォーム201、アイソフォーム202、アイソフォーム203、アイソフォーム205、及びアイソフォーム206の配列アラインメントを示す。

【図5B】ヒトCD47タンパク質のアイソフォーム201、アイソフォーム202、アイソフォーム203、アイソフォーム205、及びアイソフォーム206の配列アラインメントを示す。

【図5C】ヒトCD47タンパク質のアイソフォーム201、アイソフォーム202、アイソフォーム203、アイソフォーム205、及びアイソフォーム206の配列アラインメントを示す。

【図5D】ヒトCD47タンパク質のアイソフォーム201、アイソフォーム202、アイソフォーム203、アイソフォーム205、及びアイソフォーム206の配列アラインメントを示す。

【図6】Ella自動免疫測定システムにより評価される、例示的な短縮型CD47バリエーションを含むLVVのウイルス価を示す例示的なグラフを示す。

【図7】短縮型CD47 LVVによる処理後のCD47を発現するCD47KO HEK293T細胞の百分率(%) (抗CD47フローサイトメトリーにより評価される)を示す例示的なグラフを提供する。GPIアンカーを含む幾つかが含まれる、様々なCD47バリエーションを試験した。

【図8】短縮型CD47 LVVによる処理後のCD47を発現するCD47KO HEK293T細胞の百分率(%) (抗CD47フローサイトメトリーにより評価される)を示す例示的なグラフを提供する。短縮された細胞内ドメイン及び代替的な膜貫通ドメインを含む幾つかが含まれる、様々なCD47バリエーションを試験した。

【図9】短縮型CD47 LVVによる処理後のCD47を発現するCD47KO HEK293T細胞の百分率(%) (抗CD47フローサイトメトリーにより評価される)を示す例示的なグラフを提供する。短縮された細胞内ドメイン及び代替的なヒンジドメインを含むものが含まれる、様々なCD47バリエーションを試験した。

【図10】短縮型CD47 LVVによる処理後のCD47を発現するCD47KO HEK293T細胞の百分率(%) (抗CD47フローサイトメトリーにより評価される)を示す例示的なグラフを提供する。短縮された細胞内ドメイン及び代替的なヒンジドメインを含むものが含まれる、様々なCD47バリエーションを試験した。

【図11】短縮型CD47 LVVによる処理後のCD47を発現するCD47KO HEK293T細胞の百分率(%) (抗CD47フローサイトメトリーにより評価される)を示す例示的なグラフを提供する。短縮された細胞内ドメイン及び代替的なヒンジドメインを含むものが含まれる、様々なCD47バリエーションを試験した。

【図12A】短縮型CD47 LVVによる処理後のCD47を発現するCD47KO HEK293T細胞の百分率(%) (抗CD47フローサイトメトリーにより評価される)を示す例示的なグラフを示す。

【図12B】短縮型CD47 LVVによる処理後のCD47を発現するCD47KO HEK293T細胞の百分率(%) (抗CD47フローサイトメトリーにより評価される)を示す例示的なグラフを示す。

【図12C】短縮型CD47 LVVによる処理後のCD47を発現するCD47KO

10

20

30

40

50

H E K 2 9 3 T細胞の百分率 (%) (抗 C D 4 7 フローサイトメトリーにより評価される) を示す例示的なグラフを示す。

【図 1 2 D】短縮型 C D 4 7 L V V による処理後の C D 4 7 を発現する C D 4 7 K O H E K 2 9 3 T細胞の百分率 (%) (抗 C D 4 7 フローサイトメトリーにより評価される) を示す例示的なグラフを示す。

【図 1 2 E】短縮型 C D 4 7 L V V による処理後の C D 4 7 を発現する C D 4 7 K O H E K 2 9 3 T細胞の百分率 (%) (抗 C D 4 7 フローサイトメトリーにより評価される) を示す例示的なグラフを示す。

【図 1 3】短縮型 C D 4 7 L V V による処理後の C D 4 7 を発現する C D 4 7 K O H E K 2 9 3 T細胞の百分率 (%) (抗 C D 4 7 フローサイトメトリーにより評価される) を示す例示的なグラフを提供する。 10

【図 1 4】短縮型 C D 4 7 L V V による処理後の C D 4 7 を発現する C D 4 7 K O H E K 2 9 3 T細胞の百分率 (%) (抗 C D 4 7 フローサイトメトリーにより評価される) を示す例示的なグラフを提供する。

【図 1 5】短縮型 C D 4 7 L V V による処理後の C D 4 7 を発現する C D 4 7 K O H E K 2 9 3 T細胞の百分率 (%) (S I R P α - F C フローサイトメトリーにより評価される) を示す例示的なグラフを提供する。

【図 1 6】短縮型 C D 4 7 L V V による処理後の C D 4 7 を発現する C D 4 7 K O H E K 2 9 3 T細胞の百分率 (%) (S I R P α - F C フローサイトメトリーにより評価される) を示す例示的なグラフを提供する。 20

【図 1 7】短縮型 C D 4 7 L V V による処理後の C D 4 7 を発現する C D 4 7 K O H E K 2 9 3 T細胞の百分率 (%) (S I R P α - F C フローサイトメトリーにより評価される) を示す例示的なグラフを提供する。

【図 1 8 A】短縮型 C D 4 7 L V V による処理後の C D 4 7 を発現する C D 4 7 K O H E K 2 9 3 T細胞の百分率 (%) (抗 C D 4 7 フローサイトメトリーにより評価される) を示す例示的なグラフを提供する。

【図 1 8 B】短縮型 C D 4 7 L V V による処理後の C D 4 7 を発現する C D 4 7 K O H E K 2 9 3 T細胞の百分率 (%) (S I R P α - F C フローサイトメトリーにより評価される) を示す例示的なグラフを提供する。

【発明を実施するための形態】 30

【0056】

I. 定義

本明細書において引用される全ての刊行物、特許、及び特許出願は、各個別の刊行物、特許、及び特許出願が参照によりそれらの全体が組み込まれることが具体的に、かつ個別に示されているかのような程度まで、それらの全体が参照により組み込まれる。

【0057】

特に明記しない限り、本開示において、本明細書において使用される科学用語及び技術用語は、当業者により一般に理解される意味を有する。

本明細書に記載されるものと同様または同等の任意の方法及び材料が本開示の実施に有用であるが、好ましい方法及び材料が本明細書に記載される。従って、本明細書において定義される用語は、本明細書全体を参照することにより、より完全に説明される。 40

【0058】

本明細書で使用する場合、単数形の用語「a」、「and」、及び「the」は、文脈が明らかに別様に指示しない限り、複数形の参照を包含する。

【0059】

本明細書で使用する場合、「及び／または」は、関連する列挙された項目のうちの1つ以上のあらゆる可能な組み合わせ、及び択一的に解釈される場合（「または」）は、組み合わせがないことを指し、それを包含する。更に、本発明は、本発明の幾つかの実施形態では、本明細書に記載される任意の特徴または特徴の組み合わせが除外または省略され得ることも意図する。 50

【0060】

本明細書で使用する場合、用語「約」は、測定可能な値、例えば、配列長などに言及する場合、明示された量の5%、1%、0.5%、または更には0.1%の変動を包含することを意図する。

【0061】

文脈上別段の解釈を要する場合を除き、用語「含む (comprise)」、「含む (comprises)」、及び「含む (comprising)」、または同様の用語は、要素または特徴の列挙されたリストが、明示または列挙された要素のみを含むのではなく、列挙または明示されていない他の要素または特徴を含み得るように、非排他的包含を意味することを意図する。

10

【0062】

特に明記しない限り、それぞれ、核酸は、5'側から3'側の方向で左から右に記載され、アミノ酸配列は、アミノからカルボキシの方向で左から右へ記載される。

【0063】

本開示は、記載される特定の方法、手順、及び試薬に限定されないことを理解されたい。これは、それらが当業者により使用される文脈に応じて異なり得るためである。

【0064】

本明細書で使用する場合、「親和性」は、分子（例えば、受容体）の単一の結合部位とその結合パートナー（例えば、リガンド）との間の非共有結合性相互作用の総量の強さを指す。分子のそのパートナーに対する親和性は、通常、平衡解離定数 (K_D)（またはその逆の平衡会合定数、 K_A ）により表され得る。親和性は、本明細書に記載されるものが含まれる、当該技術分野において公知の一般的な方法により測定され得る。例えば、Pope M. E., Soste M. V., Eyford B. A., Anderson N. L., Pearson T. W., (2009) J. Immunol. Methods. 341 (1-2): 86-96、及びその中で記載されている方法を参照のこと。

20

【0065】

本明細書で使用する場合、核酸またはポリヌクレオチド配列に適用される用語「同一性パーセント」及び「%同一性」は、標準化されたアルゴリズムを使用してアラインメントされた少なくとも2つの核酸またはポリヌクレオチド配列間の残基一致の百分率を指す。このようなアルゴリズムは、2つの配列間のアラインメントを最適化し、これにより、2つの配列のより意味のある比較を達成するために、標準化された再現可能な方法で、比較されている配列にギャップを挿入し得る。

30

【0066】

核酸またはポリヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul, S. F. et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410) により提供される一般的に使用され、無料で利用可能な一連の配列比較アルゴリズムを使用して決定され得、これは、NCBI, Bethesda, Md. が含まれる幾つかの供給源から、及び <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> にてインターネット上で利用可能である。

40

【0067】

高度な同一性を示さない核酸またはポリヌクレオチド配列は、それにもかかわらず、遺伝コードの縮重に起因して同様のアミノ酸配列をコードし得る。全てが実質的に同じタンパク質をコードする複数の核酸配列をもたらしこの縮重を使用して、核酸配列における変化がなされ得ると理解されよう。具体的には、縮重コドン置換は、1つ以上の選択された（または全ての）コドンの3番目の位置が混合塩基及び／またはデオキシイノシン残基と置換されている配列を作製することにより達成され得る (Batzner et al. (1991) Nucleic Acid Res 19: 5081, Ohtsuka et al. (1985) J Biol Chem 260: 2605-2608, Ca

50

ssol et al. (1992)、Rossolini et al. (1994) Mol Cell Probes 8:91-98)。用語「核酸」は、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド、及びそれらの一本鎖型または二本鎖型のいずれかでのポリマーを指す。特に限定されない限り、この用語は、参照核酸と類似した結合特性を有し、天然に存在するヌクレオチドと類似した様式で代謝される、天然ヌクレオチドの公知のアナログを含有する核酸を包含する。核酸という用語は、ポリヌクレオチド、ならびに（適切な文脈では）遺伝子、cDNA、及び遺伝子によりコードされるmRNAと互換的に使用される。

【0068】

本明細書で使用する場合、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質配列に関する「アミノ酸配列同一性パーセント (%)」は、配列をアラインメントし、必要に応じてギャップを導入して最大限の配列同一性パーセントを達成した後の、別のペプチドまたはポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である、候補配列におけるアミノ酸残基の百分率 (%) と定義され、いかなる保存的置換も配列同一性の一部として考慮しない。本開示におけるアミノ酸配列同一性パーセントは、BLASTソフトウェアを使用して測定される。当業者であれば、比較される配列の全長にわたって最大限のアラインメントを得るのに必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントの評価のための適切なパラメータを決定することができる。

【0069】

アミノ酸置換は、ポリペプチドにおける1個のアミノ酸の別のアミノ酸との置換を指す。例示的な置換を表1に示す。アミノ酸置換は、関心対象のタンパク質に導入され得、生成物が目的の活性、例えば、生物学的活性の保持／改善についてスクリーニングされ得る。

【表1】

表1. 例示的なアミノ酸置換

元の残基	例示的な置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn; Glu
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Val; Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン

【0070】

アミノ酸は、以下の共通の側鎖特性に従って分類され得る。

- (1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 塩基性：His、Lys、Arg；
- (5) 鎖の方向に影響を与える残基：gly、pro；
- (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

【0071】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーを、別のクラスに交換することを伴う。配列表に記載されるような配列のヌクレオチドまたはアミノ酸位置に関して、

用語「に対応する」は、構造配列アラインメントに基づいて、または標準的なアラインメントアルゴリズム、例えば、GAPアルゴリズムを使用して、標的配列とのアラインメントにより同定されたヌクレオチドまたはアミノ酸位置を指す。例えば、類似する配列（例えば、断片または種バリエーション）の対応する残基は、構造アラインメント法による参照配列とのアラインメントにより決定され得る。配列をアラインメントすることによって、当業者は、例えば、保存されているアミノ酸残基及び同一のアミノ酸残基を基準として使用して、対応する残基を同定することができる。

【0072】

本明細書で使用する場合、ヒトCD47タンパク質のアイソフォームは、ヒトCD47遺伝子から翻訳され、選択的スプライシングによりプロセッシングされるタンパク質を指す。

10

【0073】

本明細書で使用する場合、野生型ヒトCD47タンパク質は、インビボで天然に存在するヒトCD47タンパク質、例えば、ヒトゲノムにおいて／によりコードされる野生型ヒトCD47タンパク質を指す。野生型ヒトCD47タンパク質は、天然に存在するヒトCD47タンパク質のアイソフォームのいずれかであり得る。CD47の現在知られている天然に存在する5つのアイソフォーム（アイソフォーム201、202、203、205、206）のアミノ酸配列を配列番号1、2、4～5に示す。アイソフォームCD47-202（配列番号2）は、それがシグナル配列を含んで翻訳されるため、全長野生型ヒトCD47タンパク質である。シグナル配列を欠く成熟CD47-202アイソフォームの配列を配列番号3に示す。野生型ヒトCD47タンパク質は、それが発現される際、シグナルペプチドを有していても有していなくてもよい。例えば、CD47-206は、それが翻訳される際、シグナルペプチドを欠く。野生型ヒトCD47タンパク質は、グリコシル化されていてもグリコシル化されていなくてもよい。野生型ヒトCD47タンパク質は、プロテオグリカンであり得る。

20

【0074】

本明細書で使用する場合、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、いずれの種においても天然に存在しないCD47タンパク質を指す。換言すれば、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、いずれの種においても野生型CD47タンパク質ではない。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、ヒト野生型CD47タンパク質を出発材料として使用し、本明細書に記載される改変のうちの1つ以上をなすことにより遺伝子操作されていることを意味する、遺伝子操作されたヒトCD47タンパク質である。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、非ヒト（例えば、マウス）CD47タンパク質を出発材料として使用し、非ヒトCD47配列をヒト化することに加えて、本明細書に記載される他の改変のうちの1つ以上をなすことにより遺伝子操作されていることを意味する、遺伝子操作されたヒト化CD47タンパク質である。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、非ヒト（例えば、マウス）CD47タンパク質を出発材料として使用し、非ヒトCD47配列の一部をヒト化することに加えて、本明細書に記載される他の改変のうちの1つ以上をなすことにより遺伝子操作されていることを意味する、遺伝子操作された部分的ヒト化CD47タンパク質である。

30

40

【0075】

本明細書で使用する場合、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、天然ゲノムにおいて／によりコードされるCD47タンパク質ではない、例えば、野生型CD47タンパク質ではないタンパク質を指す。遺伝子操作されたCD47タンパク質の非限定的な例としては、(i) ヒトCD47細胞外ドメインまたはその一部、少なくとも1個のヒトCD47膜貫通ドメインまたはその一部、及び少なくとも1個のアミノ酸の欠失を含むヒトCD47細胞内ドメインの一部を有する遺伝子操作されたCD47タンパク質であって、当該欠失が、18アミノ酸のC末端欠失ではない、当該遺伝子操作されたCD47タンパク質、(ii) ヒトCD47細胞外ドメインの一部、少なくとも1個のヒトCD47膜貫通ドメインまたはその一部、及び18アミノ酸のC末端欠失を含むヒトCD47細胞内ドメイ

50

ンの一部を有する遺伝子操作されたCD47タンパク質、(iii)ヒトCD47細胞外ドメインまたはその一部、少なくとも1個かつ5個以下のヒトCD47膜貫通ドメイン(複数可)またはその一部(複数可)、及び18アミノ酸のC末端欠失を含むヒトCD47細胞内ドメインの一部を有する遺伝子操作されたCD47タンパク質、(iv)ヒトCD47細胞外ドメインまたはその一部、少なくとも1個のヒトCD47膜貫通ドメインまたはその一部、及びシグナルペプチドを有する遺伝子操作されたCD47タンパク質であって、当該遺伝子操作されたCD47タンパク質が細胞内ドメインを含まない、当該遺伝子操作されたCD47タンパク質、(v)ヒトCD47細胞外ドメイン、及び少なくとも1個のヒトCD47膜貫通ドメインまたはその一部を有する遺伝子操作されたCD47タンパク質であって、当該遺伝子操作されたCD47タンパク質が細胞内ドメインを含まない、当該遺伝子操作されたCD47タンパク質、(vi)ヒトCD47細胞外ドメインまたはその一部、及び少なくとも1個かつ5個以下のヒトCD47膜貫通ドメイン(複数可)またはその一部(複数可)を有する遺伝子操作されたCD47タンパク質であって、当該遺伝子操作されたCD47タンパク質が細胞内ドメインを含まない、当該遺伝子操作されたCD47タンパク質、(vii)ヒトCD47細胞外ドメインまたはその一部、及び少なくとも1個のヒトCD47膜貫通ドメインまたはその一部を有し、細胞内ドメインを有さないか、または少なくとも1個のアミノ酸の欠失を含むヒトCD47細胞内ドメインを有する遺伝子操作されたCD47タンパク質が挙げられ、ここで、当該遺伝子操作されたCD47タンパク質は、配列番号1及び配列番号6に対する最高で99%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。

10

20

【0076】

本明細書で使用する場合、発現されるポリヌクレオチドまたはポリペプチドの文脈において、用語「外来性」は、言及された分子または言及されたポリペプチドが関心対象の細胞に導入されることを意味することを意図する。ポリペプチドは、例えば、細胞の遺伝物質へのコード核酸の導入、例えば、染色体への組込みにより導入され得るか、または非染色体性遺伝物質、例えば、プラスミドまたは発現ベクターとして導入され得る。従って、この用語は、それがコード核酸の発現に関して使用される場合、発現可能な形態でのコード核酸の細胞への導入を指す。外来性ポリヌクレオチドは、例えば、ベクターを用いて、ウイルス形質導入を使用して細胞の少なくとも1つのアレルに挿入され得る。幾つかの実施形態では、ベクターは、外来性ポリヌクレオチドを保有する偽型化された自己不活性化レンチウイルスベクターである。幾つかの実施形態では、ベクターは、水疱性口内炎VSV-Gエンベロープで偽型化された、外来性ポリヌクレオチドを保有する自己不活性化レンチウイルスベクターである。幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドは、ウイルス形質導入を使用して細胞の少なくとも1つのアレルに挿入される。幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドは、レンチウイルスベクターのウイルスベクターを使用して細胞の少なくとも1つのアレルに挿入される。幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドは、細胞の少なくとも1つのアレルの標的位置に挿入される。

30

【0077】

「外来性」分子は、細胞に通常存在しないが、1つ以上の遺伝学的方法、生化学的方法、または他の方法により細胞に導入され得る分子、構築物、因子などである。「細胞における通常の存在」は、細胞の特定の発生段階及び環境条件に関して決定される。従って、例えば、神経細胞の胚発生の間にのみ存在する分子は、成体の神経細胞に対して外来性分子である。外来性分子は、例えば、機能不全の内在性分子の機能するバージョンまたは通常は機能する内在性分子の機能不全バージョンを含み得る。

40

【0078】

外来性分子または因子は、とりわけ、コンビナトリアルケミストリープロセスにより生成されるような低分子、または高分子、例えば、タンパク質、核酸、炭水化物、脂質、糖タンパク質、リポタンパク質、多糖類、上記の分子の任意の修飾された誘導体、または上記の分子のうちの1つ以上含む任意の複合体であり得る。核酸としては、DNA及びRNAが挙げられ、核酸は、一本鎖または二本鎖であり得、直鎖状、分枝鎖状、または環状で

50

あり得、任意の長さのものであり得る。核酸は、二重鎖を形成することができるもの、及び三重鎖形成核酸を包含する。例えば、米国特許第 5, 176, 996 号及び同第 5, 422, 251 号を参照のこと。タンパク質としては、限定されるものではないが、DNA 結合タンパク質、転写因子、クロマチンリモデリング因子、メチル化 DNA 結合タンパク質、ポリメラーゼ、メチラーゼ、デメチラーゼ、アセチラーゼ、デアセチラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、インテグラーゼ、リコンビナーゼ、リガーゼ、トポイソメラーゼ、ギラーゼ、及びヘリカーゼが挙げられる。

【0079】

外来性分子または構築物は、内在性分子と同じ種類の分子、例えば、外来性タンパク質または核酸であり得る。かかる例では、外来性分子は、細胞における内在性分子の濃度より高い濃度で細胞に導入される。幾つかの例では、外来性核酸は、感染性ウイルスゲノム、細胞に導入されるプラスミドもしくはエピソーム、または細胞内に通常存在しない染色体を含み得る。外来性分子を細胞に導入するための方法は、当業者に公知であり、限定されるものではないが、脂質による導入（すなわち、中性及びカチオン性脂質が含まれるリポソーム）、エレクトロポレーション、直接注入、細胞融合、微粒子銃、リン酸カルシウム共沈法、DEAE-デキストランによる導入、及びウイルスベクターによる導入が挙げられる。

【0080】

本明細書で使用する場合、用語「遺伝子改変」及びその文法的等価物は、核酸、例えば、生物のゲノム内の核酸の 1 つ以上の変化を指し得る。例えば、遺伝子改変は、遺伝子または遺伝子の一部または他の核酸配列の変化、追加、及び／または欠失を指し得る。遺伝子改変細胞は、遺伝子または遺伝子の一部が追加された、欠失した、及び／または変化した細胞も指し得る。遺伝子改変細胞は、遺伝子または遺伝子の一部ではない核酸配列が追加された細胞も指し得る。遺伝子改変としては、例えば、一過性のノックインまたはノックダウンメカニズム、及び標的遺伝子または遺伝子の一部または核酸配列の永続的なノックイン、ノックダウン、またはノックアウトをもたらすメカニズムの両方が挙げられる。遺伝子改変としては、例えば、一過性のノックイン、及び核酸配列の永続的なノックインをもたらすメカニズムの両方が挙げられる。遺伝子改変としては、例えば、転写の低減または増加、mRNA 安定性の低減または増加、翻訳の低減または増加、及びタンパク質安定性の低減または増加も挙げられる。

【0081】

本明細書で使用する場合、ペプチドの一部は、参照ペプチドより少ないアミノ酸を有し、そのペプチド由来の少なくとも 1 個のアミノ酸を有する。

【0082】

本明細書で使用する場合、組成物は、2 種以上の生成物、物質、または化合物、例えば、細胞の任意の混合物を指す。

【0083】

II. CD47 タンパク質

CD47 タンパク質の概要

本開示は、遺伝子操作された CD47 タンパク質及びその使用に関する。

【0084】

インテグリン関連タンパク質 (IAP) または MER6 としても公知の CD47 は、ヒトにおいてヒト CD47 遺伝子 (配列番号 19) (図 1) によりコードされる膜貫通タンパク質である。CD47 は、免疫グロブリン (Ig) スーパーファミリーに属し、CD47 は、アポトーシス、増殖、接着、及び遊走が含まれる、様々な細胞プロセスに関与する。

【0085】

ヒト CD47 は約 50 kDa である。これはグリコシル化され、人体の実質的に全ての細胞によりユビキタスに発現される (図 2)。歴史的文献は、アイソフォーム 202 (すなわち、CD47-202、配列番号 2) が、主に脳において発現することを示唆するが

【 0 0 8 6 】

10

20

30

40

50

7、208～228、236～257、もしくは269～289との少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。

【0090】

本明細書で使用する場合、シグナルペプチドは、タンパク質が最初に翻訳される際にCD47タンパク質のN末端に存在する短いペプチドを指す。シグナルペプチドは、通常、細胞膜への挿入時またはその直後にシグナルペプチダーゼによりタンパク質から切断される。シグナルペプチドは、細胞にタンパク質を通常は形質膜に移動させるように機能する。幾つかの実施形態では、ヒトCD47タンパク質のシグナルペプチドは、配列番号2のアミノ酸1～18に対応するアミノ酸配列、または配列番号2のアミノ酸1～18との少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。幾つかの実施形態では、ヒトCD47タンパク質のシグナルペプチドは、配列番号2のアミノ酸1～18に対応するアミノ酸配列、または配列番号2のアミノ酸1～18との少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。

【0091】

ヒトCD47遺伝子は、6つの転写物を有し、これらのうちの5つがCD47のタンパク質アイソフォームをコードする(Ensembl、遺伝子:CD47)。6つの転写物は、CD47-201、CD47-202、CD47-203、CD47-204、CD47-205、及びCD47-206という名称である(Ensembl、遺伝子:CD47、ENSG00000196776)。6つの転写物のコードDNA配列(CDS)をそれぞれ配列番号13～18に示す。5つのタンパク質アイソフォームのアミノ酸配列をそれぞれ配列番号1、2、4、5、6に示す(表2)。

【0092】

転写物CD47-202(配列番号14)は、323アミノ酸を有するアイソフォームCD47-202(配列番号2)をコードする。CD47-202は、ヒトCD47遺伝子で最も長い転写物である。これは、Ensemblデータベースにおいて代表的な転写物に指定される。代表的な転写物の特定において、Ensemblは、全てを考慮して、保存されたエキソンの最も大きな範囲を有し、最も高い発現を示し、最も長いコード配列を有し、NCBI及びUniProtなどの他の重要な情報源において代表している転写物を同定することを目的としている。CD47-202転写物の全てのスプライス部位は、少なくとも1つの疑いのないmRNA(non-suspect mRNA)により支持される。

【0093】

転写物CD47-201(配列番号13)は、305アミノ酸を有するアイソフォームCD47-201(配列番号1)をコードする。アイソフォームCD47-201は、アイソフォームCD47-202からの18アミノ酸のC末端短縮を示す。CD47-201転写物の全てのスプライス部位は、少なくとも1つの疑いのないmRNA(non-suspect mRNA)により支持される。

【0094】

転写物CD47-203(配列番号15)は、86アミノ酸を有するアイソフォームCD47-203(配列番号4)をコードする。転写物モデルの唯一の支持は、単一の発現配列タグ(EST)によるものである。

【0095】

転写物CD47-204(配列番号16)は、タンパク質をコードしない。この転写物の全てのスプライス部位は、少なくとも1つの疑いのないmRNA(non-suspect mRNA)により支持される。

【0096】

転写物CD47-205（配列番号17）は、109アミノ酸を有するアイソフォームCD47-205（配列番号5）をコードする。アイソフォーム205は、3個の膜貫通ドメイン、及びアイソフォームCD47-202（配列番号2）からの短縮された細胞内ドメインを含む。転写物モデルを最も支持するmRNAは、疑いがあるとフラグが立てられているか、または支持は複数のESTによるものである。

【0097】

転写物CD47-206（配列番号18）は、183アミノ酸を有するアイソフォームCD47-206（配列番号6）をコードする。アイソフォーム206は、短縮された細胞外ドメイン、及びアイソフォームCD47-202（配列番号2）からの5個の膜貫通ドメインを含む。

【0098】

5つのアイソフォームのアミノ酸配列を表2に列挙する。ヒトCD47タンパク質における様々なドメインに対応するアミノ酸は、表2においても確認され、図5に示される。

「細胞内連結部」は、細胞内に位置する（すなわち、細胞外に位置せず、かつ細胞膜内に位置しない）が、遺伝子操作されたCD47タンパク質のN末端またはC末端に位置しない、隣接する膜貫通ドメインを連結する細胞内領域を指す。「細胞外連結部」は、細胞外に位置する（すなわち、細胞内に位置せず、かつ細胞膜内に位置しない）、隣接する膜貫通ドメインを連結する細胞外領域を指す。本明細書で使用する場合、CD47「細胞内ドメイン」は、細胞内連結部を含まない。また本明細書で使用する場合、CD47「細胞外ドメイン」は、細胞外連結部を含まない。

【表2】

表2. CD47ドメインのアミノ酸配列番号

	CD47-201 配列番号1	CD47-202 配列番号2	CD47-203 配列番号4	CD47-205 配列番号5	CD47-206 配列番号6
シグナルペプチド	1～18	1～18	該当なし	該当なし	該当なし
細胞外ドメイン	19～141	19～141			1～96
膜貫通ドメイン1	142～162	142～162			97～117
細胞内連結部1	163～176	163～176			118～131
膜貫通ドメイン2	177～197	177～197			132～152
細胞外連結部1	198～207	198～207		1～4	153～162
膜貫通ドメイン3	208～228	208～228		5～25	163～183
細胞内連結部2	229～235	229～235		26～32	
膜貫通ドメイン4	236～256	236～256		33～53	
細胞外連結部2	257～268	257～268		54～65	
膜貫通ドメイン5	269～289	269～289		66～86	
細胞内ドメイン	290～305	290～323		87～109	

【0099】

遺伝子操作されたCD47タンパク質

本開示は、野生型全長ヒトCD47タンパク質と比べてより少ないアミノ酸を有する遺伝子操作されたCD47タンパク質を提供する。かかる遺伝子操作されたタンパク質は、遺伝子治療ベクターを組み込むことによる送達が含まれる、より効率的な細胞の遺伝子操作手法をもたらす。

【0100】

野生型全長ヒトCD47タンパク質は、本明細書で使用する場合、本特許出願の出願日時点でEnsemblデータベースに開示されているアイソフォームCD47-202を指す。野生型全長のヒトCD47タンパク質は、配列番号2のアミノ酸配列を有し、ここで、アミノ酸1～18はシグナルペプチドであり、アミノ酸19～141は細胞外ドメインであり、アミノ酸142～162、177～197、208～228、236～257、269～289は、5個の膜貫通ドメイン（図3）であり、アミノ酸290～323は細胞内ドメインである。アミノ酸163～176及び229～235は、膜貫通ドメイン間の2個の細胞内連結部であり、アミノ酸198～207及び257～268は、膜貫通ドメイン間の2個の細胞外連結部である（図3）。

【0101】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、アイソフォーム202（配列番号2）のC末端が短縮されたバージョンである。例えば、幾つかの実施形態では、C末端短縮は、連続的であり、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、または161アミノ酸（複数可）の長さである。好ましくは、C末端短縮は、158、123、92、64、31、または95アミノ酸の長さであり、それぞれ配列番号7～12に記載されるアミノ酸配列を有する遺伝子操作されたCD47タンパク質をもたらす。幾つかの実施形態では、配列番号2のC末端短縮を有する遺伝子操作されたCD47タンパク質は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、または140連続アミノ酸（複数可）のN末端短縮を更に有する。

【0102】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、アイソフォーム201（配列番号1）のC末端が短縮されたバージョンである。例えば、幾つかの実施形態では、C末端短縮は、連続的であり、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、6

10

20

30

40

50

5、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、または143アミノ酸（複数可）の長さである。幾つかの実施形態では、配列番号1のC末端短縮を有する遺伝子操作されたCD47タンパク質は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、または95連続アミノ酸（複数可）のN末端短縮を更に有する。

10

【0103】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、アイソフォーム206（配列番号6）のC末端が短縮されたバージョンである。例えば、幾つかの実施形態では、C末端短縮は、連続的であり、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、または66アミノ酸（複数可）の長さである。幾つかの実施形態では、配列番号6のC末端短縮を有する遺伝子操作されたCD47タンパク質は、1、2、3、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、または140連続アミノ酸（複数可）のN末端短縮を更に有する。

20

30

【0104】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、最小限の細胞内ドメインを含む。本明細書で使用する場合、最小限の細胞内ドメインは、遺伝子操作されたCD47タンパク質のSIRP α 結合性を保持するために必要とされる最小数のアミノ酸を有する細胞内ドメインを指す。

40

【0105】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、最小限の細胞外ドメインを含む。本明細書で使用する場合、最小限の細胞外ドメインは、遺伝子操作されたCD47タンパク質がSIRP α に結合するのに必要とされる最小数のアミノ酸を有する細胞外ドメインを指す。

【0106】

50

ある態様では、本開示は、ヒトCD47細胞外ドメインまたはその一部及び少なくとも1個のヒトCD47膜貫通ドメインを含む遺伝子操作されたCD47タンパク質を提供し、ここで、細胞内ドメインが存在する場合、それは、少なくとも1個のアミノ酸の欠失を有するヒトCD47細胞内ドメインである。幾つかの実施形態では、2個以上の膜貫通ドメインが遺伝子操作されたCD47タンパク質に存在する場合、膜貫通ドメインの各々は、細胞内及び／または細胞外連結部（複数可）と相互に連結している。

【0107】

ある態様では、本開示は、ヒトCD47細胞外ドメインまたはその一部及び少なくとも1個のヒトCD47膜貫通ドメインから本質的になる遺伝子操作されたCD47タンパク質を提供する。幾つかの実施形態では、2個以上の膜貫通ドメインが遺伝子操作されたCD47タンパク質に存在する場合、膜貫通ドメインの各々は、細胞内及び／または細胞外連結部（複数可）と相互に連結している。本明細書で使用する場合、用語「から本質的になる」は、指定した要素、及び遺伝子操作されたCD47タンパク質のSIRPα結合性を抑制しない任意の追加の要素を含む。

【0108】

ある態様では、本開示は、ヒトCD47細胞外ドメインまたはその一部及び少なくとも1個のヒトCD47膜貫通ドメインからなる遺伝子操作されたCD47タンパク質を提供する。幾つかの実施形態では、2個以上の膜貫通ドメインが遺伝子操作されたCD47タンパク質に存在する場合、膜貫通ドメインの各々は、細胞内及び／または細胞外連結部（複数可）と相互に連結している。

【0109】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、ヒトCD47細胞外ドメインまたはその一部、少なくとも1個のヒトCD47膜貫通ドメインまたはその一部、及び少なくとも1個のアミノ酸の欠失を含むヒトCD47細胞内ドメインの一部を含み、ここで、当該欠失は、18アミノ酸のC末端欠失ではない。

【0110】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、ヒトCD47細胞外ドメインの一部、少なくとも1個のヒトCD47膜貫通ドメインまたはその一部、及び18アミノ酸のC末端欠失を含むヒトCD47細胞内ドメインの一部を含む。

【0111】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、ヒトCD47細胞外ドメインまたはその一部、少なくとも1個かつ5個以下のヒトCD47膜貫通ドメイン（複数可）またはその一部（複数可）、及び18アミノ酸のC末端欠失を含むヒトCD47細胞内ドメインの一部を含む。

【0112】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、ヒトCD47細胞外ドメインまたはその一部、少なくとも1個のヒトCD47膜貫通ドメインまたはその一部、及びシグナルペプチドを含み、ここで、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、細胞内ドメインを含まない。

【0113】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、ヒトCD47細胞外ドメイン、及び少なくとも1個のヒトCD47膜貫通ドメインまたはその一部を含み、ここで、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、細胞内ドメインを含まない。

【0114】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、ヒトCD47細胞外ドメインまたはその一部、及び少なくとも1個かつ5個以下のヒトCD47膜貫通ドメイン（複数可）またはその一部（複数可）を含み、ここで、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、細胞内ドメインを含まない。

【0115】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、ヒトCD47細胞外

10

20

30

40

50

ドメイン、5個のヒトCD47膜貫通ドメイン、及び18アミノ酸のC末端欠失を有するヒトCD47細胞内ドメインを含み、ここで、遺伝子操作されたCD47タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号1ではない。

【0116】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、ヒトCD47細胞外ドメイン及び5個のヒトCD47膜貫通ドメインを含み、ここで、遺伝子操作されたCD47タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号6ではない。

【0117】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、ヒトCD47細胞外ドメインまたはその一部、少なくとも1個のヒトCD47膜貫通ドメインまたはその一部を含み、細胞内ドメインを含まないか、または少なくとも1個のアミノ酸の欠失を含むヒトCD47細胞内ドメインを含み、ここで、遺伝子操作されたCD47タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号1及び配列番号6との最高99%の同一性を有する。換言すれば、幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、ヒトCD47細胞外ドメインまたはその一部、少なくとも1個のヒトCD47膜貫通ドメインまたはその一部を含み、細胞内ドメインを含まないか、または少なくとも1個のアミノ酸の欠失を含むヒトCD47細胞内ドメインを含み、ここで、遺伝子操作されたCD47タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号1に対する99%以下の同一性を有し、配列番号6に対する99%以下の同一性を有する。

【0118】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質におけるヒトCD47細胞外ドメインは、野生型ヒトCD47細胞外ドメインである。幾つかの実施形態では、野生型ドメインは、配列番号1のアミノ酸19～141または配列番号6のアミノ酸1～96に対応するアミノ酸配列を有する。

【0119】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質におけるヒトCD47細胞外ドメインは、配列番号1のアミノ酸19～141または配列番号6のアミノ酸1～96に対する少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質におけるヒトCD47細胞外ドメインは、配列番号1のアミノ酸19～141または配列番号6のアミノ酸1～96に対する少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。

【0120】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質におけるヒトCD47細胞外ドメインは、野生型ヒトCD47細胞外ドメインと構造的に同等である。

【0121】

本明細書で使用する場合、「構造的に同等」は、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する2つのアミノ酸配列を指す。

好ましくは、配列変動は、遺伝子操作されたCD47タンパク質の生物活性を変化させない。幾つかの実施形態では、配列変動は、遺伝子操作されたヒトタンパク質がSIRPαに結合するのを妨げない。幾つかの実施形態では、配列変動は、遺伝子操作されたヒトタンパク質が免疫寛容誘導因子となることを妨げない。幾つかの実施形態では、配列変動の少なくとも一部は、保存的アミノ酸置換（複数可）により発生し得る。

【0122】

幾つかの実施形態では、本開示の遺伝子操作されたタンパク質は、1個以上の膜テザーを含む。幾つかの実施形態では、1個以上の膜テザーは、膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む。幾つかの実施形態では、膜貫通ドメインは、以下からなる群から選択され

10

20

30

40

50

るGPCRの膜貫通ドメインを含む：5-ヒドロキシトリプタミン（セロトニン）受容体1A（HTR1A）、5-ヒドロキシトリプタミン（セロトニン）受容体1B（HTR1B）、5-ヒドロキシトリプタミン（セロトニン）受容体1D（HTR1D）、5-ヒドロキシトリプタミン（セロトニン）受容体1E（HTR1E）、5-ヒドロキシトリプタミン（セロトニン）受容体1F（HTR1F）、5-ヒドロキシトリプタミン（セロトニン）受容体2A（HTR2A）、5-ヒドロキシトリプタミン（セロトニン）受容体2B（HTR2B）、5-ヒドロキシトリプタミン（セロトニン）受容体2C（HTR2C）、5-ヒドロキシトリプタミン（セロトニン）受容体4（HTR4）、5-ヒドロキシトリプタミン（セロトニン）受容体5A（HTR5A）、5-ヒドロキシトリプタミン（セロトニン）受容体5B（HTR5BP）、5-ヒドロキシトリプタミン（セロトニン）受容体6（HTR6）、アデニル酸シクラーゼ共役型5-ヒドロキシトリプタミン（セロトニン）受容体7（HTR7）、ムスカリン性コリン受容体1（CHRM1）、ムスカリン性コリン受容体2（CHRM2）、ムスカリン性コリン受容体3（CHRM3）、ムスカリン性コリン受容体4（CHRM4）、ムスカリン性コリン受容体5（CHRM5）、アデノシンA1受容体（ADORA1）、アデノシンA2a受容体（ADORA2A）、アデノシンA2b受容体（ADORA2B）、アデノシンA3受容体（ADORA3）、接着Gタンパク質共役受容体A1（ADGRA1）、接着Gタンパク質共役受容体A2（ADGRA2）、接着Gタンパク質共役受容体A3（ADGRA3）、接着Gタンパク質共役受容体B1（ADGRB1）、接着Gタンパク質共役受容体B2（ADGRB2）、接着Gタンパク質共役受容体B3（ADGRB3）、カドヘリン EGF LAG7回貫通G型受容体1（CELSR1）、カドヘリン EGF LAG7回貫通G型受容体2（CELSR2）、カドヘリン EGF LAG7回貫通G型受容体3（CELSR3）、接着Gタンパク質共役受容体D1（ADGRD1）、接着Gタンパク質共役受容体D2（ADGRD2）、接着Gタンパク質共役受容体E1（ADGRE1）、接着Gタンパク質共役受容体E2（ADGRE2）、接着Gタンパク質共役受容体E3（ADGRE3）、接着Gタンパク質共役受容体E4（ADGRE4P）、接着Gタンパク質共役受容体E5（ADGRE5）、接着Gタンパク質共役受容体F1（ADGRF1）、接着Gタンパク質共役受容体F2（ADGRF2）、接着Gタンパク質共役受容体F3（ADGRF3）、接着Gタンパク質共役受容体F4（ADGRF4）、接着Gタンパク質共役受容体F5（ADGRF5）、接着Gタンパク質共役受容体G1（ADGRG1）、接着Gタンパク質共役受容体G2（ADGRG2）、接着Gタンパク質共役受容体G3（ADGRG3）、接着Gタンパク質共役受容体G4（ADGRG4）、接着Gタンパク質共役受容体G5（ADGRG5）、接着Gタンパク質共役受容体G6（ADGRG6）、接着Gタンパク質共役受容体G7（ADGRG7）、接着Gタンパク質共役受容体L1（ADGRL1）、接着Gタンパク質共役受容体L2（ADGRL2）、接着Gタンパク質共役受容体L3（ADGRL3）、接着Gタンパク質共役受容体L4（ADGRL4）、接着Gタンパク質共役受容体V1（ADGRV1）、アドレナリン受容体 α 1A（ADRA1A）、アドレナリン受容体 α 1B（ADRA1B）、アドレナリン受容体 α 1D（ADRA1D）、アドレナリン受容体 α 2A（ADRA2A）、アドレナリン受容体 α 2B（ADRA2B）、アドレナリン受容体 α 2C（ADRA2C）、アドレナリン受容体 β 1（ADRB1）、アドレナリン受容体 β 2（ADRB2）、アドレナリン受容体 β 3（ADRB3）、アンジオテンシンII受容体1型（AGTR1）、アンジオテンシンII受容体2型（AGTR2）、アペリン受容体（APLNR）、Gタンパク質共役胆汁酸受容体1（GPBAR1）、ニューロメジンB受容体（NMBR）、ガストリン放出ペプチド受容体（GRP R）、ボンベシン様受容体3（BRS3）、ブラジキニン受容体B1（BDKRB1）、ブラジキニン受容体B2（BDKRB2）、カルシトニン受容体（CALCR）、カルシトニン受容体様受容体（CALCRL）、カルシウム感知受容体（CASR）、Gタンパク質共役受容体クラスC（GPRC6A）、カンナビノイド受容体1（脳）（CNR1）、カンナビノイド受容体2（CNR2）、ケメリンケモカイン様受容体1（CMKLR1）、ケモカイン（C-Cモチーフ）受容体1（CCR1）、ケモカイン（C-Cモチーフ

10

20

30

40

50

受容体2 (CCR2)、ケモカイン (C-Cモチーフ) 受容体3 (CCR3)、ケモカイン (C-Cモチーフ) 受容体4 (CCR4)、ケモカイン (C-Cモチーフ) 受容体5 (遺伝子/偽遺伝子) (CCR5)、ケモカイン (C-Cモチーフ) 受容体6 (CCR6)、ケモカイン (C-Cモチーフ) 受容体7 (CCR7)、ケモカイン (C-Cモチーフ) 受容体8 (CCR8)、ケモカイン (C-Cモチーフ) 受容体9 (CCR9)、ケモカイン (C-Cモチーフ) 受容体10 (CCR10)、ケモカイン (C-X-Cモチーフ) 受容体1 (CXCR1)、ケモカイン (C-X-Cモチーフ) 受容体2 (CXCR2)、ケモカイン (C-X-Cモチーフ) 受容体3 (CXCR3)、ケモカイン (C-X-Cモチーフ) 受容体4 (CXCR4)、ケモカイン (C-X-Cモチーフ) 受容体5 (CXCR5)、ケモカイン (C-X-Cモチーフ) 受容体6 (CXCR6)、ケモカイン (C-X3-Cモチーフ) 受容体1 (CX3CR1)、ケモカイン (Cモチーフ) 受容体1 (XCR1)、非定型ケモカイン受容体1 (ダッフィー血液型) (ACKR1)、非定型ケモカイン受容体2 (ACKR2)、非定型ケモカイン受容体3 (ACKR3)、非定型ケモカイン受容体4 (ACKR4)、ケモカイン (C-Cモチーフ) 受容体様2 (CCRL2)、コレシストキニンA受容体 (CKAR)、コレシストキニンB受容体 (CKBR)、Gタンパク質共役受容体1 (GPR1)、ボンベシン様受容体3 (BRS3)、Gタンパク質共役受容体3 (GPR3)、Gタンパク質共役受容体4 (GPR4)、Gタンパク質共役受容体6 (GPR6)、Gタンパク質共役受容体12 (GPR12)、Gタンパク質共役受容体15 (GPR15)、Gタンパク質共役受容体17 (GPR17)、Gタンパク質共役受容体18 (GPR18)、Gタンパク質共役受容体19 (GPR19)、Gタンパク質共役受容体20 (GPR20)、Gタンパク質共役受容体21 (GPR21)、Gタンパク質共役受容体22 (GPR22)、Gタンパク質共役受容体25 (GPR25)、Gタンパク質共役受容体26 (GPR26)、Gタンパク質共役受容体27 (GPR27)、Gタンパク質共役受容体31 (GPR31)、Gタンパク質共役受容体32 (GPR32)、Gタンパク質共役受容体33 (遺伝子/偽遺伝子) (GPR33)、Gタンパク質共役受容体34 (GPR34)、Gタンパク質共役受容体35 (GPR35)、Gタンパク質共役受容体37 (エンドセリン受容体B型様) (GPR37)、Gタンパク質共役受容体37様1 (GPR37L1)、Gタンパク質共役受容体39 (GPR39)、Gタンパク質共役受容体42 (遺伝子/偽遺伝子) (GPR42)、Gタンパク質共役受容体45 (GPR45)、Gタンパク質共役受容体50 (GPR50)、Gタンパク質共役受容体52 (GPR52)、Gタンパク質共役受容体55 (GPR55)、Gタンパク質共役受容体61 (GPR61)、Gタンパク質共役受容体62 (GPR62)、Gタンパク質共役受容体63 (GPR63)、Gタンパク質共役受容体65 (GPR65)、Gタンパク質共役受容体68 (GPR68)、Gタンパク質共役受容体75 (GPR75)、Gタンパク質共役受容体78 (GPR78)、Gタンパク質共役受容体79 (GPR79)、Gタンパク質共役受容体82 (GPR82)、Gタンパク質共役受容体83 (GPR83)、Gタンパク質共役受容体84 (GPR84)、Gタンパク質共役受容体85 (GPR85)、Gタンパク質共役受容体87 (GPR87)、Gタンパク質共役受容体88 (GPR88)、Gタンパク質共役受容体101 (GPR101)、Gタンパク質共役受容体119 (GPR119)、Gタンパク質共役受容体132 (GPR132)、Gタンパク質共役受容体135 (GPR135)、Gタンパク質共役受容体139 (GPR139)、Gタンパク質共役受容体141 (GPR141)、Gタンパク質共役受容体142 (GPR142)、Gタンパク質共役受容体146 (GPR146)、Gタンパク質共役受容体148 (GPR148)、Gタンパク質共役受容体149 (GPR149)、Gタンパク質共役受容体150 (GPR150)、Gタンパク質共役受容体151 (GPR151)、Gタンパク質共役受容体152 (GPR152)、Gタンパク質共役受容体153 (GPR153)、Gタンパク質共役受容体160 (GPR160)、Gタンパク質共役受容体161 (GPR161)、Gタンパク質共役受容体162 (GPR162)、Gタンパク質共役受容体171 (GPR171)、Gタンパク質共役受容体173 (GPR173)、Gタンパク質共役受容体174 (GPR174)、Gタンパク質共役受

10

20

30

40

50

容体 176 (GPR176)、Gタンパク質共役受容体 182 (GPR182)、Gタン
 パク質共役受容体 183 (GPR183)、ロイシンリッチリピート含有Gタンパク質共役受容体 4 (LGR4)、ロイシンリッチリピート含有Gタンパク質共役受容体 5 (LGR5)、ロイシンリッチリピート含有Gタンパク質共役受容体 6 (LGR6)、MAS1
 癌原遺伝子 (MAS1)、MAS1 癌原遺伝子様 (MAS1L)、MAS 関連 GPR ファ
 ミリーメンバー D (MRGPRD)、MAS 関連 GPR ファミリーメンバー E (MRGPRE)、MAS 関連 GPR ファミリーメンバー F (MRGPRF)、MAS 関連 GPR フ
 アミリーメンバー G (MRGPRG)、MAS 関連 GPR ファミリーメンバー X1 (MRGPRX1)、MAS 関連 GPR ファミリーメンバー X2 (MRGPRX2)、MAS 関
 連 GPR ファミリーメンバー X3 (MRGPRX3)、MAS 関連 GPR ファミリーメン 10
 バー X4 (MRGPRX4)、オプシン 3 (OPN3)、オプシン 4 (OPN4)、オプ
 シン 5 (OPN5)、プリン受容体 P2Y (P2RY8)、プリン受容体 P2Y (P2RY10)、微量アミン関連受容体 2 (TAAR2)、微量アミン関連受容体 3 (遺伝子／
 偽遺伝子) (TAAR3)、微量アミン関連受容体 4 (TAAR4P)、微量アミン関連
 受容体 5 (TAAR5)、微量アミン関連受容体 6 (TAAR6)、微量アミン関連受容
 体 8 (TAAR8)、微量アミン関連受容体 9 (遺伝子／偽遺伝子) (TAAR9)、G
 タンパク質共役受容体 156 (GPR156)、Gタンパク質共役受容体 158 (GPR
 158)、Gタンパク質共役受容体 179 (GPR179)、Gタンパク質共役受容体ク
 ラス C (GPRC5A)、Gタンパク質共役受容体クラス C (GPRC5B)、Gタンパ
 ク質共役受容体クラス C (GPRC5C)、Gタンパク質共役受容体クラス C (GPRC 20
 5D)、Frizzled クラス受容体 1 (FZD1)、Frizzled クラス受容体
 2 (FZD2)、Frizzled クラス受容体 3 (FZD3)、Frizzled クラ
 ス受容体 4 (FZD4)、Frizzled クラス受容体 5 (FZD5)、Frizzl
 ed クラス受容体 6 (FZD6)、Frizzled クラス受容体 7 (FZD7)、Fr
 izzled クラス受容体 8 (FZD8)、Frizzled クラス受容体 9 (FZD9
)
 、Frizzled クラス受容体 10 (FZD10)、スーズンド受容体 (SMO) (Frizzled クラス)、補体成分 3a 受容体 1 (C3AR1)、補体成分 5a 受容体
 1 (C5AR1)、補体成分 5a 受容体 2 (C5AR2)、副腎皮質刺激ホルモン放出ホル 30
 モン受容体 1 (CRHR1)、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン受容体 2 (CRHR
 2)、ドーパミン受容体 D1 (DRD1)、ドーパミン受容体 D2 (DRD2)、ドーパ
 ミン受容体 D3 (DRD3)、ドーパミン受容体 D4 (DRD4)、ドーパミン受容体 D
 5 (DRD5)、エンドセリン受容体 A 型 (EDNRA)、エンドセリン受容体 B 型 (E
 DNRB)、ホルミルペプチド受容体 1 (FPR1)、ホルミルペプチド受容体 2 (FPR
 2)、ホルミルペプチド受容体 3 (FPR3)、遊離脂肪酸受容体 1 (FFAR1)、
 遊離脂肪酸受容体 2 (FFAR2)、遊離脂肪酸受容体 3 (FFAR3)、遊離脂肪酸受
 容体 4 (FFAR4)、Gタンパク質共役受容体 42 (遺伝子／偽遺伝子) (GPR42)
)、γ-アミノ酪酸 (GABA) B 受容体、1 (GABBR1)、γ-アミノ酪酸 (GA 40
 BA) B 受容体、2 (GABBR2)、ガラニン受容体 1 (GALR1)、ガラニン受容
 体 2 (GALR2)、ガラニン受容体 3 (GALR3)、成長ホルモン分泌促進因子受容
 体 (GHSR)、成長ホルモン放出ホルモン受容体 (GHRHR)、胃抑制ポリペプチド
 受容体 (GIPR)、グルカゴン様ペプチド 1 受容体 (GLP1R)、グルカゴン様ペプ
 チド 2 受容体 (GLP2R)、グルカゴン受容体 (GCGR)、セクレチン受容体 (SC
 TR)、卵胞刺激ホルモン受容体 (FSHR)、黄体形成ホルモン／絨毛性ゴナドトロピ
 ン受容体 (LHCGR)、甲状腺刺激ホルモン受容体 (TSHR)、性腺刺激ホルモン放
 出ホルモン受容体 (GNRHR)、性腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体 2 (偽遺伝子)
 (GNRHR2)、Gタンパク質共役受容体 18 (GPR18)、Gタンパク質共役受容
 体 55 (GPR55)、Gタンパク質共役受容体 119 (GPR119)、Gタンパク質
 共役エストロゲン受容体 1 (GPER1)、ヒスタミン受容体 H1 (HRH1)、ヒスタ 50

ミン受容体H2 (HRH2)、ヒスタミン受容体H3 (HRH3)、ヒスタミン受容体H4 (HRH4)、ヒドロキシカルボン酸受容体1 (HCAR1)、ヒドロキシカルボン酸受容体2 (HCAR2)、ヒドロキシカルボン酸受容体3 (HCAR3)、KISS1受容体 (KISS1R)、ロイコトリエンB4受容体 (LTB4R)、ロイコトリエンB4受容体2 (LTB4R2)、システニルロイコトリエン受容体1 (CYSLTR1)、システニルロイコトリエン受容体2 (CYSLTR2)、オキソエイコサノイド (OXE)受容体1 (OXER1)、ホルミルペプチド受容体2 (FPR2)、リゾホスファチジン酸受容体1 (LPAR1)、リゾホスファチジン酸受容体2 (LPAR2)、リゾホスファチジン酸受容体3 (LPAR3)、リゾホスファチジン酸受容体4 (LPAR4)、リゾホスファチジン酸受容体5 (LPAR5)、リゾホスファチジン酸受容体6 (LPAR6)、スフィンゴシン-1-リン酸受容体1 (S1PR1)、スフィンゴシン-1-リン酸受容体2 (S1PR2)、スフィンゴシン-1-リン酸受容体3 (S1PR3)、スフィンゴシン-1-リン酸受容体4 (S1PR4)、スフィンゴシン-1-リン酸受容体5 (S1PR5)、メラニン凝集ホルモン受容体1 (MCHR1)、メラニン凝集ホルモン受容体2 (MCHR2)、メラノコルチン1受容体 (α メラノサイト刺激ホルモン受容体) (MC1R)、メラノコルチン2受容体 (副腎皮質刺激ホルモン) (MC2R)、メラノコルチン3受容体 (MC3R)、メラノコルチン4受容体 (MC4R)、メラノコルチン5受容体 (MC5R)、メラトニン受容体1A (MTNR1A)、メラトニン受容体1B (MTNR1B)、代謝型グルタミン酸受容体1 (GRM1)、代謝型グルタミン酸受容体2 (GRM2)、代謝型グルタミン酸受容体3 (GRM3)、代謝型グルタミン酸受容体4 (GRM4)、代謝型グルタミン酸受容体5 (GRM5)、代謝型グルタミン酸受容体6 (GRM6)、代謝型グルタミン酸受容体7 (GRM7)、代謝型グルタミン酸受容体8 (GRM8)、モチリン受容体 (MLNR)、ニューロメジンU受容体1 (NMUR1)、ニューロメジンU受容体2 (NMUR2)、ニューロペプチドFF受容体1 (NPFFR1)、ニューロペプチドFF受容体2 (NPFFR2)、ニューロペプチドS受容体1 (NPSR1)、ニューロペプチドB/W受容体1 (NPBWR1)、ニューロペプチドB/W受容体2 (NPBWR2)、ニューロペプチドY受容体Y1 (NPY1R)、ニューロペプチドY受容体Y2 (NPY2R)、ニューロペプチドY受容体Y4 (NPY4R)、ニューロペプチドY受容体Y5 (NPY5R)、ニューロペプチドY受容体Y6 (偽遺伝子) (NPY6R)、ニューロテンシン受容体1 (高親和性) (NTSR1)、ニューロテンシン受容体2 (NTSR2)、オピオイド受容体 δ 1 (OPRD1)、オピオイド受容体 κ 1 (OPRK1)、オピオイド受容体 μ 1 (OPRM1)、オピエート受容体様1 (OPRL1)、ヒポクレチン (オレキシン) 受容体1 (HCRTR1)、ヒポクレチン (オレキシン) 受容体2 (HCRTR2)、Gタンパク質共役受容体107 (GPR107)、Gタンパク質共役受容体137 (GPR137)、嗅覚受容体ファミリー51サブファミリーEメンバー1 (OR51E1)、膜貫通タンパク質、脂肪細胞関連1 (TPRA1)、Gタンパク質共役受容体143 (GPR143)、Gタンパク質共役受容体157 (GPR157)、オキソグルタル酸 (α -ケトグルタル酸) 受容体1 (OXGR1)、プリン受容体P2Y (P2RY1)、プリン受容体P2Y (P2RY2)、ピリミジン受容体P2Y (P2RY4)、ピリミジン受容体P2Y (P2RY6)、プリン受容体P2Y (P2RY11)、プリン受容体P2Y (P2RY12)、プリン受容体P2Y (P2RY13)、プリン受容体P2Y (P2RY14)、副甲状腺ホルモン1受容体 (PTH1R)、副甲状腺ホルモン2受容体 (PTH2R)、血小板活性化因子受容体 (PTAFR)、プロキネチシン受容体1 (PROKR1)、プロキネチシン受容体2 (PROKR2)、プロラクチン放出ホルモン受容体 (PRLHR)、プロスタグランジンD2受容体 (DP) (PTGDR)、プロスタグランジンD2受容体2 (PTGDR2)、プロスタグランジンE受容体1 (PTGER1)、プロスタグランジンE受容体2 (PTGER2)、プロスタグランジンE受容体3 (PTGER3)、プロスタグランジンE受容体4 (PTGER4)、プロスタグランジンF受容体 (PTGFR)、プロスタグランジン12 (プロスタサイクリン) 受容体 (IP) (PTGIR)、トロンボキサ

10

20

30

40

50

ンA2受容体(TBXAR)、凝固因子II(トロンビン)受容体(F2R)、F2R様トリプシン受容体1(F2RL1)、凝固因子II(トロンビン)受容体様2(F2RL2)、F2R様トロンビン/トリプシン受容体3(F2RL3)、ピログルタミル化RFアミドペプチド受容体(QRFR)、リラキシン/インスリン様ファミリーペプチド受容体1(RXFP1)、リラキシン/インスリン様ファミリーペプチド受容体2(RXFP2)、リラキシン/インスリン様ファミリーペプチド受容体3(RXFP3)、リラキシン/インスリン様ファミリーペプチド受容体4(RXFP4)、ソマトスタチン受容体1(SSTR1)、ソマトスタチン受容体2(SSTR2)、ソマトスタチン受容体3(SSTR3)、ソマトスタチン受容体4(SSTR4)、ソマトスタチン受容体5(SSTR5)、コハク酸受容体1(SUCNR1)、タキキニン受容体1(TACR1)、タキキニン受容体2(TACR2)、タキキニン受容体3(TACR3)、味覚受容体1型メンバー1(TAS1R1)、味覚受容体1型メンバー2(TAS1R2)、味覚受容体1型メンバー3(TAS1R3)、味覚受容体2型メンバー1(TAS2R1)、味覚受容体2型メンバー3(TAS2R3)、味覚受容体2型メンバー4(TAS2R4)、味覚受容体2型メンバー5(TAS2R5)、味覚受容体2型メンバー7(TAS2R7)、味覚受容体2型メンバー8(TAS2R8)、味覚受容体2型メンバー9(TAS2R9)、味覚受容体2型メンバー10(TAS2R10)、味覚受容体2型メンバー13(TAS2R13)、味覚受容体2型メンバー14(TAS2R14)、味覚受容体2型メンバー16(TAS2R16)、味覚受容体2型メンバー19(TAS2R19)、味覚受容体2型メンバー20(TAS2R20)、味覚受容体2型メンバー30(TAS2R30)、味覚受容体2型メンバー31(TAS2R31)、味覚受容体2型メンバー38(TAS2R38)、味覚受容体2型メンバー39(TAS2R39)、味覚受容体2型メンバー40(TAS2R40)、味覚受容体2型メンバー41(TAS2R41)、味覚受容体2型メンバー42(TAS2R42)、味覚受容体2型メンバー43(TAS2R43)、味覚受容体2型メンバー45(TAS2R45)、味覚受容体2型メンバー46(TAS2R46)、味覚受容体2型メンバー50(TAS2R50)、味覚受容体2型メンバー60(TAS2R60)、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体(TRHR)、微量アミン関連受容体1(TAAR1)、ウロテンシン2受容体(UTSR)、アルギニンバソプレシン受容体1A(AVPR1A)、アルギニンバソプレシン受容体1B(AVPR1B)、アルギニンバソプレシン受容体2(AVPR2)、オキシトシン受容体(OXTR)、アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド1(下垂体)受容体I型(ADCYAP1R1)、血管作用性小腸ペプチド受容体1(VIPR1)、血管作用性小腸ペプチド受容体2(VIPR2)、及びそれらの任意のバリエーション。幾つかの実施形態では、膜貫通ドメインは、CD3ζ、CD8a、CD16a、CD28、CD32a、CD32c、CD40、CD47、CD64、ICOS、デクチン1、DNGR1、EGFR、GPCR、MyD88、PDGFR、SLAMF7、TRL1、TLR2、TLR3、TRL4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、またはVEGFRの膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む。

【0123】

原形質膜タンパク質は、表在性膜に結合していてもよく、または膜内在性タンパク質であり得る。例えば、Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Chapter 12のKomath SS, Fujita M, Hart GW, et al. *Glycosylphosphatidylinositol Anchors*における概説を参照のこと。GPI係留は、翻訳後修飾時のグリコシルホスファチジルイノシトールまたはGPIのタンパク質C末端への結合を指す。幾つかの実施形態では、異種の膜結合配列は、GPIアンカー結合配列である。C末端を介してGPIアンカーに結合しているタンパク質は、通常、脂質二重層の外側に見出される。GPIアンカーは、I型膜内在性

タンパク質の単一の膜貫通ドメインの代替例である。

【0124】

異種GPIアンカー結合配列は、任意の公知のGPIにより係留されるタンパク質（Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 11におけるFerguson MAJ, Kinoshita T, Hart GW. *Glycosyl phosphatidylinositol Anchors*. において概説されている）に由来し得る。幾つかの実施形態では、異種GPIアンカー結合配列は、CD14、CD16、CD48、DAF/CD55、CD59、CD80、CD87、またはTRAIL-R3に由来するGPIアンカー結合配列である。幾つかの実施形態では、異種GPIアンカー結合配列は、DAF/CD55に由来する。幾つかの実施形態では、異種GPIアンカー結合配列は、CD59に由来する。幾つかの実施形態では、異種GPIアンカー結合配列は、TRAIL-R3に由来する。例示的实施形態では、異種GPIアンカー結合配列は、DAF/CD55、CD59、またはTRAIL-R3に由来する。幾つかの実施形態では、活性化要素のうち的一方または両方は、活性化要素の細胞膜への発現を誘導するのに役立つ異種シグナル配列を含む。パッケージング細胞株において活性である任意のシグナル配列が使用され得る。幾つかの実施形態では、シグナル配列は、DAF/CD55シグナル配列である。幾つかの実施形態では、シグナル配列は、CD59シグナル配列である。幾つかの実施形態では、シグナル配列は、TRAIL-R3シグナル配列である。

10

20

【0125】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、1個以上の野生型ヒトCD47膜貫通ドメインを含む。幾つかの実施形態では、野生型ドメインは、配列番号2のアミノ酸142～162、177～197、208～228、236～257、または269～289に対応するアミノ酸配列を有する。

【0126】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、野生型ヒトCD47膜貫通ドメインと構造的に同等な1個以上の膜貫通ドメインを含む。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、配列番号2のアミノ酸142～162、177～197、208～228、236～257、または269～289に対する少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する1個以上の膜貫通ドメインを含む。

30

【0127】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質におけるヒトCD47細胞内ドメインは、野生型ヒトCD47細胞内ドメインである。幾つかの実施形態では、野生型細胞内ドメインは、配列番号2のアミノ酸290～323に対応するアミノ酸配列を有する。

【0128】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質におけるヒトCD47細胞内ドメインは、野生型ヒトCD47細胞内ドメインと構造的に同等である。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質におけるヒトCD47細胞内ドメインは、配列番号2のアミノ酸290～323に対する少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。

40

【0129】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、配列番号7に記載されるアミノ酸配列に対する少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

50

【0130】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、配列番号8に記載されるアミノ酸配列に対する少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0131】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、配列番号9に記載されるアミノ酸配列に対する少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0132】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、配列番号12に記載されるアミノ酸配列に対する少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0133】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、配列番号10に記載されるアミノ酸配列に対する少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0134】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、配列番号11に記載されるアミノ酸配列に対する少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

20

【0135】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、膜貫通タンパク質である。膜貫通タンパク質は、細胞膜を完全に貫通しており、細胞内及び細胞外部分の両方を有する膜内在性タンパク質である。本明細書で使用する場合、「細胞内部分」は、分子に存在する場合、CD47細胞内ドメイン及び細胞内連結部を含み得る。本明細書で使用する場合、「細胞外部分」は、分子に存在する場合、CD47細胞外ドメイン及び細胞外連結部を含み得る。

【0136】

本明細書で使用する場合、野生型ヒトCD47細胞外ドメインは、野生型ヒトCD47タンパク質アイソフォームのいずれかの細胞外ドメインを指す。野生型ヒトCD47膜貫通ドメインは、野生型ヒトCD47タンパク質アイソフォームのいずれかの膜貫通ドメインを指す。野生型ヒトCD47細胞内ドメインは、野生型ヒトCD47タンパク質アイソフォームのいずれかの細胞内ドメインを指す。

30

【0137】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、遺伝子操作されたヒトCD47タンパク質、遺伝子操作されたヒト化CD47タンパク質、または遺伝子操作された部分的ヒト化CD47タンパク質である。

【0138】

本明細書で使用する場合、「ヒト化された」または「ヒト化」は、遺伝子操作されたCD47タンパク質のアミノ酸配列が、ヒトにおけるその免疫原性を低減するために改変されることを意味する。本明細書で使用する場合、「部分的にヒト化された」か「部分的ヒト化」は、遺伝子操作されたCD47タンパク質のアミノ酸配列の一部が、ヒトにおける遺伝子操作されたCD47タンパク質の免疫原性を低減するために改変されることを意味する。例えば、幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質の細胞外ドメインが、ヒトにおける遺伝子操作されたCD47タンパク質の免疫原性を低減するために改変される。ヒト化は、通常、非ヒト供給源由来のタンパク質配列を改変して、ヒトにおいて天然に産生されるその対応物タンパク質に対する類似性を増加させることにより達成される。以下の2つの主な手法がタンパク質をヒト化するために使用されてきた：合理的設計及び実験的方法。合理的設計法は、タンパク質構造モデリングを特徴とし、これにより、タンパク質の幾つかのバリエーションを作製し、それらの結合または任意の他の関心対

40

50

象の特性を評価する。合理的設計法とは対照的に、実験的方法は、タンパク質の構造情報を必要としない。それらは、組み合わせの大規模なライブラリーの作製、及び濃縮技術、例えば、ファージ、リボソーム、もしくは酵母ディスプレイ、または高スループットスクリーニング技術による目的のバリエーションの選択に基づく。これらの方法は、変異のタンパク質構造に対する影響の推定ではなく選抜に基づく。例えば、幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質のヒト化は、遺伝子操作されたCD47タンパク質のSIRPα結合領域をヒトCD47タンパク質に移植することを含む。他の実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質のヒト化は、遺伝子操作されたCD47タンパク質における1個以上の残基（複数可）がヒトCD47タンパク質における対応する残基と置換されるように、遺伝子操作されたCD47タンパク質に1つ以上の点変異を導入することを含む。

10

【0139】

幾つかの実施形態では、本開示の遺伝子操作されたタンパク質は、SIRPα抗体を含むSIRPα相互作用モチーフを含む。幾つかの実施形態では、SIRPα抗体は、表3から選択される。

【表3-1】

表3. SIRPα抗体

名称	関連する特許	非特許文献	会社/機関
ADU-1805	2020 US20220135671 2018 US20180312587 2018 US10851164	2019 Functional characterization of the selective pan-allele anti-SIRPα antibody ADU-1805 that blocks the SIRPα-CD47 innate immune checkpoint.	Aduro
Alectorの特許の抗SIRPα	2022 US20220289844 2019 US20210277113 2019 US20190359707 2019 WO2019226973 2019 US11319373 2017 WO2018107058 2017 US20190275150		Alector

20

30

40

50

【表 3 - 2】

ALX Oncologyの特許の抗SIRPa	2022 US2020242928 2022 US2020324996 2021 US20210363269 2021 US2020002434 2021 US11242404 2021 US20230018821 2021 WO2021247430 2020 US20200392199 2020 US20210070838 2020 US11208459 2019 US20190352419 2019 US11292850 2017 US20180105600 2017 US11401338		ALX Oncology
Apexigenの特許の抗SIRPa	2021 WO2021174127		Apexigen

【表 3 - 3】

Arch Oncologyの特許の抗SIRPA	2021 US2020226469 2021 WO2021222746 2019 WO2020102422 2019 US20200297842 2019 US11202828	2021 Novel SIRPa Antibodies That Induce Single-Agent Phagocytosis of Tumor Cells while Preserving T Cells.	Arch Oncology
BI 765063	2022 WO202254379 2022 US20230012273 2022 US2020281991 2019 WO2019175218 2018 WO2019073080 2018 US20210179728 2017 WO2017178653 2017 US20190127477 2017 US11279766	2022 NCT05249426 Phase 1A Study to Test Whether Different Combinations of BI 765063, Ezzimab, Chemotherapy, Cetuximab, and BI 836880 Help People With Head and Neck Cancer or Liver Cancer 2020 NCT04653142 Phase 1A Study to Test Different Doses of BI 765063 Alone and in Combination With BI 754091 in Japanese Patients With Different Types of Advanced Cancer (Solid Tumors)	Boehringer Ingelheim OSE Immunotherapy

10

20

30

40

50

【表 3－4】

Bio-The raの特許の抗 SIRPA	2022 WO2022247933	Bio-Ther a Soluti ons
Bioray Pharmaの 特許の抗SIR PA	2021 WO2022121980	Bioray P harma Zheijang Hisun
Byondis の特許の抗SIR PA	2022 US202 0195063 2019 US202 10388107 2018 US202 10070874 2018 US112 74159	Byondis

10

【表 3－5】

CC-95 251	2019 WO2020 068752	2022 NCT051682 02 Phase 1A Study to As sess the Effec t of CC-95251 in Participant s With Acute M yeloid Leukemi a and Myelodys plastic Syndro mes 2019 NCT037834 03 Phase 1A Study of CC -95251, a Monocl onal Antibody Directed Again st SIRPα, With C etuximab in Su bjects With Ad vanced Solid C ancers 2019 NCT038162 54 Phase 1A Study of CC -95251, a Monocl onal Antibody Directed Again st SIRPα, With C etuximab in Su bjects With Ad vanced Solid C ancers	Celgene
ES004	2020 WO2021 032078 2020 US2021 0347908		Elpiscie nce

20

30

40

50

【表 3 - 6】

Hospital for Sick Childrenの特許の抗SIRPA	2012 WO2013056352 2012 US20140242095		Toronto Hospital for Sick Children
Kobe U.の抗SIRPA	2021 WO202102634 2019 WO2020013170 2019 US20210155707	2022 Anticancer efficacy of monotherapy with antibodies to SIRPα/SIRPβ1 mediated by induction of antitumorogenic macrophages. 2018 Anti-human SIRPα antibody is a new tool for cancer immunotherapy.	Daiichi Sankyo Kobe University
L&L Biopharmaの特許の抗SIRPα	2021 WO2021185273		L&L Biopharma
Lanovaの特許の抗SIRPA	2021 US20220169726 2020 WO2021129697		Lanova
Qureの特許の抗SIRPA	2021 WO2022110922		QureBio
Sairopaの特許の抗SIRPA	2022 US20220135677		Sairopa

10

20

【表 3 - 7】

Sound Biologicsの特許の抗SIRPA	2020 WO2020180811 2020 US20220235144		Sound Biologics
Stanford U.の特許の抗SIRPA	2021 US20210171654 2020 WO2021011912 2020 US20200262918 2018 US10487150 2018 WO2019023347 2018 US20190119396 2018 US10961318 2018 US20180319883 2018 US10781256 2017 US20180037652 2017 US10611842 2016 WO2016205042 2016 US20180171030 2016 US10618976 2015 WO2015138600 2015 US20170073414 2015 US10081680	2017 Anti-SIRPα antibody given immunotherapy enhances neutrophil and macrophage anti-tumor activity.	Forty Seven Stanford

30

40

50

【表 3－8】

Synthon の特許の抗SIRPA	2018 WO2018210795 2018 WO2018210793		Synthon
Electra の特許の抗SIRPA/SIRPB	2021 WO20211226576 2021 WO20211226591		Electra
Forty Seven の特許の抗SIRPA/SIGLEC-10	2020 WO2020198353		Forty Seven
IMM2902		2022 NCT05076591 Phase 1 IMM2902, a HER2/SIRPα Bispecific mAb-Trap Antibody-receptor Fusion Protein, in Patients With HER2-expressing Advanced Solid Tumors	ImmuneOnco
Lanova の特許の抗SIRPA/PD-L1	2021 WO202127901		Lanova
OSEの特許の抗PD-1/SIRPA	2019 US20220056135		OSE Immunotherapeutics

10

20

【0140】

グリコシル化

ヒトCD47タンパク質は、グリコシル化される。タンパク質グリコシル化は、タンパク質へのグリカン（炭水化物、サッカライド、または糖とも称される）の共有結合を伴う。グリカンが連結されるアミノ酸側鎖の原子に基づいて、ほとんどのタンパク質グリコシル化は、以下の2つの分類に入る：N結合型グリコシル化及びO結合型グリコシル化。N結合型グリコシル化では、グリカンは、保存されたコンセンサス配列Asn-Xaa-Ser/Thr（Xaa≠Pro）におけるアスパラギン残基の側鎖窒素原子に結合される一方で、O結合型グリコシル化では、グリカンは、ヒドロキシルアミノ酸、主にセリン及びトレオニン残基の側鎖酸素原子に結合される。

30

【0141】

野生型ヒトCD47タンパク質のIgVドメインは、Nグリコシル化され、O結合型グリコサミノグリカンで修飾される。ヒトCD47タンパク質は、Ser64及びSer79にヘパラン及びコンドロイチン硫酸グリコサミノグリカン（GAG）鎖の両方を有する250kDa超の分子量を有するプロテオグリカンとして発現され得る（Kaur et al., J. Biological Chemistry, 2011）。ヘパラン硫酸（HSGAG）及びコンドロイチン硫酸（CSGAG）は、ゴルジ装置で合成され、ゴルジ装置において、粗面小胞体で作られたタンパク質コアが、プロテオグリカンを形成させるグリコシルトランスフェラーゼによるO結合型グリコシル化により翻訳後修飾される。加えて、N結合型グリコシル化が、ヒトCD47タンパク質における5つの修飾部位候補のうちの4つ（N16、N32、N55、及びN93）で同定された（Hatherley et al., Cell, 2008）。この段落におけるアミノ酸の番号付けは、配列番号3（すなわち、成熟した全長野生型CD47）に基づく。

40

【0142】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、野生型ヒトCD47タンパク質と比べてより少ないグリコシル化修飾部位を含む。グリコシル化修飾部位は、グリカンの結合部位として機能することができる、タンパク質における連続するアミノ酸の配列を指す。グリコシル化修飾部位は、シークオンとも称される。幾つかの実施形態で

50

は、野生型ヒトCD47タンパク質のグリコサミノグリカン修飾部位内の1個以上のアミノ酸（複数可）が、遺伝子操作されたCD47タンパク質において欠失しているか、または置換されている。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、0、1、2、3、4、5、または6個のグリコシル化部位（複数可）を有する。

【0143】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、野生型ヒトCD47タンパク質と比べてより少ないグリコシル化修飾を含む。グリコシル化修飾としては、限定されるものではないが、N-グリコシル化、O-グリコシル化、ホスホセリングリコシル化、及びC-グリコシル化が挙げられる。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、0、1、2、3、4、または5個のグリコシル化修飾（複数可）を有する。

10

【0144】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、野生型ヒトCD47タンパク質と比べてより少ないグリコサミノグリカン修飾部位を含む。グリコサミノグリカン修飾部位は、グリコサミノグリカンの結合部位として機能することができる、タンパク質における連続するアミノ酸の配列を指す。幾つかの実施形態では、野生型ヒトCD47タンパク質のグリコサミノグリカン修飾部位内の1個以上のアミノ酸（複数可）が、遺伝子操作されたCD47タンパク質において欠失しているか、または置換されている。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、0または1個のグリコサミノグリカン修飾部位を有する。

20

【0145】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、野生型ヒトCD47タンパク質と比べてより少ないグリコサミノグリカン鎖を含む。グリコサミノグリカン鎖としては、限定されるものではないが、ヘパラン硫酸（HSGAG）、コンドロイチン硫酸（CSGAG）、ケラタン硫酸、及びヒアルロン酸が挙げられる。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、0または1個のグリコサミノグリカン側鎖を有する。

【0146】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、2個未満のヘパラン及び／またはコンドロイチン硫酸グリコサミノグリカン修飾部位を含む。幾つかの実施形態では、野生型ヒトCD47タンパク質のグリコサミノグリカン修飾部位内の1個以上のアミノ酸（複数可）が、遺伝子操作されたCD47タンパク質において欠失しているか、または置換されている。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、1個のヘパラン及び／またはコンドロイチン硫酸グリコサミノグリカン修飾部位を含む。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、ヘパラン及び／またはコンドロイチン硫酸グリコサミノグリカン修飾部位を含まない。

30

【0147】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、2個未満のヘパラン及び／またはコンドロイチン硫酸グリコサミノグリカン鎖を含む。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、0または1個のヘパラン及び／またはコンドロイチン硫酸グリコサミノグリカン鎖を有する。

40

【0148】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、野生型ヒトCD47タンパク質と比べてより少ないN結合型グリコシル化部位を含む。N結合型グリコシル化部位は、サッカライド、特にN-グリカンの結合部位として機能することができる、タンパク質における連続するアミノ酸の配列である。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、0、1、2、3、または4個のN結合型グリコシル化部位（複数可）を有する。

【0149】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、野生型ヒトCD47

50

タンパク質と比べてより少ないN結合型グリコシル化修飾を含む。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、0、1、2、または3個のN結合型グリコシル化修飾（複数可）を有する。

【0150】

遺伝子操作されたCD47タンパク質の生物活性

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、野生型ヒトCD47タンパク質と機能的に同等である。本明細書で使用する場合、「機能的に同等」は、野生型ヒトCD47タンパク質の生物活性のうちの少なくとも1つの種類を有することを指す。野生型ヒトCD47タンパク質の生物活性の種類としては、限定されるものではないが、TSP-1、インテグリン、別のCD47タンパク質、またはSIRPαと相互作用する能力が挙げられる。好ましくは、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、SIRPαに結合することができる。

10

【0151】

TSP-1との相互作用

CD47の主要な分泌リガンドは、トロンボスポンジン-1（TSP-1）である。TSP-1はホモ三量体糖タンパク質であり、そのC末端ドメインはCD47への結合を媒介する（Isenberg et al., 2009）。トロンボスポンジンファミリーの少なくとも2つの更なるメンバーが、より低い親和性を有するがCD47に結合する。TSP-1は、細胞運動性、増殖、及び分化の調節に関与する細胞外マトリックス糖タンパク質のトロンボスポンジンファミリーの典型的なメンバーである。CD47の細胞外IgVドメインは、TSP-1のC末端細胞結合ドメイン（CBD）に対する受容体である。変異誘発研究は、CD47のヘパラン硫酸修飾がTSP-1のCD47との高親和性相互作用に必要とされることを確立した（Kaur et al., 2011）。

20

【0152】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、野生型ヒトCD47タンパク質と比較して1個以上のトロンボスポンジン-1結合部位（複数可）を欠く。幾つかの実施形態では、野生型ヒトCD47タンパク質のTSP-1部位内の1個以上のアミノ酸（複数可）が、遺伝子操作されたCD47タンパク質において欠失しているか、または置換されている。幾つかの実施形態では、1個以上のTSP-1結合部位を欠く遺伝子操作されたCD47タンパク質は、1個以上のヘパラン硫酸でグリコシル化されていない。

30

【0153】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、野生型ヒトCD47タンパク質と比較してより低い親和性でTSP-1に結合する。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、約0.1 μM、0.2 μM、0.3 μM、0.4 μM、0.5 μM、0.6 μM、0.7 μM、0.8 μM、0.9 μM、1 μM、2 μM、3 μM、4 μM、5 μM、6 μM、7 μM、8 μM、9 μM、10 μM、20 μM、30 μM、40 μM、50 μM、60 μM、70 μM、80 μM、90 μM、100 μMより高いKDでTSP-1に結合する。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、TSP-1に結合できない。

40

【0154】

インテグリンとの相互作用

CD47の初期の研究は、胎盤から精製されたCD47タンパク質に対して産生されたモノクローナル抗体（mAb）の使用に基づいていた。これらの研究は、RGD含有リガンド、例えば、フィブロネクチン、フィブリノゲン、ビトロネクチン、またはコラーゲンIV型の存在下でのIgGにより媒介される貪食反応の増強におけるCD47の役割を示した。同じmAbは、インターロイキン8（IL-8）または細菌ペプチドであるNホルミルメチオニルロイシルフェニルアラニン（f-Met-Leu-Phe）により刺激される好中球経内皮遊走を阻害すること、及び腫瘍壊死因子α（TNFα）で刺激された内皮細胞を横断する好中球遊走を阻害することも発見された。これらの研究は、好

50

中球及び内皮細胞の両方のCD47が重要であることを明らかにした。上皮膜調製物に対して産生された他の抗CD47 mAbsの作製は、CD47が上皮細胞単層の側底膜に存在すること、好中球または上皮細胞のいずれかのCD47を遮断するmAbが好中球経上皮遊走を遅延させること、及び効率的な好中球走化性が好中球細胞表面のCD47発現の増加と相関することを示した。RGD配列を含有する基底膜タンパク質エンタクチンが、インビトロにおいてCD47依存の様式で好中球接着及び走化性を刺激することも発見された。CD47欠損マウスの作製は、細菌性腹膜炎における好中球蓄積の遅延に起因する細菌感染に対する感受性の増加を示すことにより、好中球炎症応答の調節におけるこのタンパク質の重要性を更に証明した。CD47欠損好中球は、RGDにより刺激される好中球接着、貪食、及び呼吸バーストの強い障害も示す。細胞外マトリックスタンパク質であるビトロネクチンに対する $\alpha_v\beta_3$ インテグリンにより媒介される細胞応答については、CD47が、ビトロネクチンでコーティングされたビーズへの $\alpha_v\beta_3$ により媒介される結合に必要とされるが、ビトロネクチンでコーティングされた表面への $\alpha_v\beta_3$ により媒介される接着には必要とされないことが発見された。CD47は、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンとの当初の関連性に加えて、血小板上のインテグリン $\alpha_2\beta_1$ 及び $\alpha_{IIb}\beta_3$ 、平滑筋細胞上の $\alpha_2\beta_1$ インテグリン、鎌形赤血球及びBリンパ球上の $\alpha_4\beta_1$ インテグリン、ミクログリアの $\alpha_6\beta_1$ インテグリン、ならびに軟骨細胞の α_5 インテグリンと相互作用し、それを調節することも示した。

10

【0155】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、野生型ヒトCD47タンパク質と比較して1個以上のインテグリン結合部位（複数可）を欠く。幾つかの実施形態では、野生型ヒトCD47タンパク質のインテグリン結合部位内の1個以上のアミノ酸（複数可）が、遺伝子操作されたCD47タンパク質において欠失しているか、または置換されている。

20

【0156】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、野生型ヒトCD47タンパク質と比較してより低い親和性でインテグリンに結合する。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、約0.1 μ M、0.2 μ M、0.3 μ M、0.4 μ M、0.5 μ M、0.6 μ M、0.7 μ M、0.8 μ M、0.9 μ M、1 μ M、2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、6 μ M、7 μ M、8 μ M、9 μ M、10 μ M、20 μ M、30 μ M、40 μ M、50 μ M、60 μ M、70 μ M、80 μ M、90 μ M、100 μ Mより高いKDでインテグリンに結合する。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、インテグリンに結合できない。

30

【0157】

幾つかの実施形態では、インテグリンは、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリン、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ インテグリン、 $\alpha_2\beta_1$ インテグリン、 $\alpha_4\beta_1$ インテグリン、 $\alpha_6\beta_1$ インテグリン、及び α_5 インテグリンからなる群から選択される。

【0158】

SIRPタンパク質との相互作用

シグナル調節タンパク質（SIRP）ファミリーは、3つのメンバーを含み、これらのうちSIRP α 及びSIRP γ は、既知のCD47受容体である。SIRPタンパク質は、細胞表面糖タンパク質のIgファミリーに属し、同定される最初のメンバーは、SIRP α （SHP-1、CD172a、BIT、MFR、またはP84としても公知）であった。SIRP α は、骨髄性細胞及び神経細胞だけでなく内皮細胞及び線維芽細胞においても高度に発現し、1個の遠位のIgV様ドメイン及び2個の膜近傍のIgC様ドメインの3個の細胞外Ig様ドメインを有する。加えて、1個のIgVドメインのみを有する選択的スプライシングされた形態も報告されている。SIRP α は、その細胞内尾部に2個の免疫受容体チロシンベース抑制性モチーフ（ITIM）を有し、これはリン酸化されると、Src相同性2（SH2）ドメイン含有タンパク質チロシンホスファターゼであるSHP-1及びSHP-2に結合することができる。SIRP α の更なる細胞質内結合パー

40

50

トナーは、アダプター分子である55kDaホモログのSrcキナーゼ関連タンパク質／SKAP2 (SKAP55hom/R)、Fyn結合タンパク質／130kDaのSLP-76関連リンタンパク質 (FYB/SLAP-130)、及びチロシンキナーゼPYK2である。SIRPαは、インスリン、EGF、及びbPDGF受容体のキナーゼ活性の基質でもある。線維芽細胞におけるSIRPαの過剰発現は、インスリン、EGF、及びbPDGFに応答した増殖及び他の下流現象を減少させる。またSIRPαは、M-CSFの受容体であるc-fmsと恒常的に会合しているため、SIRPαの過剰発現は、v-fms表現型を部分的に逆転させる。

【0159】

CD47は、SIRPαのリガンドである。CD47またはSIRPαのグリコシル化は、それらの相互作用に必要とされないようであるが、SIRPαのN-グリコシル化のレベルは、過剰なグリコシル化がCD47の結合を低減するように相互作用に影響を及ぼす。CD47 IgVドメインのCys³³とCD47膜貫通ドメインのCys²⁶³との間の長距離のジスルフィド結合も、SIRPαへの結合を増強するCD47 IgVドメインの配置を確立するために重要である。この段落におけるアミノ酸の番号付けは、配列番号3 (すなわち、成熟した全長野生型CD47タンパク質) に基づく。

【0160】

CD47及びCD47/SIRPα複合体の構造が明らかにされている (Hatherley et al., 2008)。配列番号3のアミノ酸92~100及び103~113に対応する2本のβ鎖が、CD47/SIRPα相互作用の中心であることが確認された。配列番号3のアミノ酸97 (Glu)、99 (Thr)、100 (Glu)、103 (Arg)、104 (Glu)、及び106 (Glu)は、CD47/SIRPα相互作用における接触残基として同定された。これらは、SIRPαに対するCD47の結合親和性に関与する (Hatherley et al., 2008)。好ましい実施形態では、2本のβ鎖及びそれらの6個の接触残基は、SIRPα結合能力を維持するために、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質において保持されている。

【0161】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、その細胞外ドメインに少なくとも1個のSIRPα相互作用モチーフを含む。幾つかの実施形態では、配列番号3のアミノ酸97、99、100、103、104、106に対応するアミノ酸が、遺伝子操作されたCD47タンパク質において保持されている。幾つかの実施形態では、2本のβ鎖が、遺伝子操作されたCD47タンパク質において保持されている。

【0162】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、ヒトCD47細胞外ドメイン内またはその一部内のシステインと、ヒトCD47膜貫通ドメイン (複数可) 内またはその間のシステインとの間のジスルフィド結合を含む。幾つかの実施形態では、2個のシステインは、細胞外ドメインにおけるCys³³及び膜貫通ドメインにおけるCys²⁶³であり、ここで、番号付けは配列番号3に基づく。

【0163】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、SIRPαに結合することができる。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、野生型ヒトCD47タンパク質と同程度の結合親和性でSIRPαに結合することができる。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、約0.01μM、0.02μM、0.03μM、0.04μM、0.05μM、0.06μM、0.07μM、0.08μM、0.09μM、0.1μM、0.2μM、0.3μM、0.4μM、0.5μM、0.6μM、0.7μM、0.8μM、0.9μM、1μM、2μM、3μM、4μM、5μMより低いKDでSIRPαに結合する。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、野生型ヒトCD47タンパク質と比べてより高い結合親和性でSIRPαに結合することができる。

10

20

30

40

50

【0164】

直接結合の研究により、TSP-1がSIRPαのCD47を発現する細胞への結合を阻害することが示されている（Isenberg et al., 2009）。このデータは、CD47上の単一部位に対するTSP-1及びSIRPαの競合的結合、異なるが、近位の部位への結合の立体阻害、またはアロステリック阻害と一致している。ヘパラン硫酸鎖によるSer⁶⁴でのグリコシル化がTSP-1結合に必要とされるが、SIRPα結合には必要とされない（Soto-Pantoja et al., 2015）。従って、幾つかの実施形態では、Ser⁶⁴でのグリコシル化を欠く遺伝子操作されたCD47タンパク質は、TSP-1結合が妨げられるため、増強されたSIRPα結合能力を有する。

10

【0165】

CD47/SIRPα相互作用は、免疫系などの多数の身体システムにおいて多数の細胞間相互作用を調節し、免疫系では、CD47/SIRPα相互作用は、リンパ球恒常性、樹状細胞（DC）成熟及び活性化、二次リンパ器官における特定のDCサブセットの適切な局在化、ならびに細胞の遊出を調節する。CD47/SIRPα相互作用は、神経系の細胞も調節する。これら2つのタンパク質間の相互作用は、骨再形成においても重要な役割を果たす。CD47/SIRPα相互作用により調節される細胞応答は、多くの場合、両方の受容体を介した両方向のシグナル伝達に依存する。

【0166】

宿主細胞上のCD47は、「自己のマーカー」として機能することができ、循環免疫細胞表面上のSIRPαに結合して、抑制性の「私を殺さないで」シグナルを伝達することにより貪食を調節することができる。上記に開示されるように、SIRPαは、マクロファージ及び樹状細胞の表面に発現されるIgスーパーファミリー受容体をコードし、その細胞質領域は、カスケードを引き起こして、貪食を阻害することができる免疫受容体チロシンベース抑制性モチーフ（ITIM）を含む。CD47-SIRPα結合は、SIRPα上のITIMのリン酸化をもたらし、このことが、SHP1及びSHP2（Src相同ホスファターゼ）の動員を引き起こす。次に、これらのホスファターゼは、貪食シナプスでのミオシンIIの蓄積を阻害し、これにより、貪食を防止する（Fujio et al., 1996）。マクロファージにより標的細胞の貪食は、最終的に活性化シグナル（FcγR、CRT、LRP-1）及び抑制性シグナル（SIRPα-CD47）のバランスにより調節される。CD47発現の上昇は、細胞が免疫監視及びその後の破壊を回避するのを補助し得る。CD47発現の上昇は、細胞が自然免疫細胞による殺傷を回避するのを補助し得る。

20

30

【0167】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、免疫寛容誘導因子である。本明細書で使用する場合、免疫寛容誘導因子は、正常な免疫応答の病的活性化または望ましくない活性化が存在する場合に免疫寛容を誘発する作用物質である。これは、例えば、同種異系間移植もしくは同種異系細胞療法を受けた後に患者がドナー抗原に対する免疫反応を発症する場合、または身体が自己免疫疾患に関与する自己抗原に対して不適当に反応する場合に、起こり得る。幾つかの実施形態では、「免疫寛容誘導因子」は、低免疫因子（hyp immunity factor）、補体阻害因子、及び投与、移植（transplantation）、または移植（engraftment）された際に細胞が宿主またはレシピエント対象の免疫系により認識される能力を調節するか、またはそれに影響を及ぼす他の因子が挙げられる。幾つかの実施形態では、免疫寛容誘導因子は、追加の機能を提供するために遺伝子改変される。

40

【0168】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、貪食、細胞傷害性物質の放出、及び／または細胞媒介性殺傷の他のメカニズムを阻害することができる。

【0169】

CD47分子間の相互作用

50

CD47は、いかなる既知のCD47リガンドの非存在下でも細胞接着相互作用を媒介することも示されている。CD47を必要とするが、その既知のリガンドのいずれも必要としないこの細胞間接着は、相対する細胞上のCD47のIgVドメイン間で同種結合も起こり得ることを示唆する(Rebres et al., 2005)。この相互作用は、細胞間接着を媒介するための未知のトリプシン感受性タンパク質(X)を必要とする可能性があるが、この細胞間相互作用及びタンパク質分解により脱落したCD47 IgVドメイン(Maile et al., 2010)またはエキソソームのCD47(Kaur et al., 2014)の細胞表面CD47との同種結合がCD47シグナル伝達を誘発することができる可能性は考慮されるべきである。しかしながら、CD47-CD47結合及びCD47同種結合によりもたらされるシグナル伝達の直接的な証拠は欠如している。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、別のCD47分子と相互作用できない。

10

【0170】

III. ポリヌクレオチド

別の態様では、本開示は、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質をコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0171】

本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、当該技術分野において公知の方法により得られ得る。例えば、ポリヌクレオチドは、(例えば、DNAライブラリーから)クローニングされたDNAから、化学合成により、cDNAクローニングにより、または目的の細胞から精製されたゲノムDNAまたはその断片をクローニングすることにより得られ得る。ポリヌクレオチドが組換え手段により生成される場合、目的の遺伝子をコードする核酸の同定のための任意の公知の方法が使用され得る。細胞または組織の供給源から目的のヒトCD47タンパク質をコードする全長(すなわち、コード領域全体を含む)cDNAまたはゲノムDNAを採取するために、当該技術分野における利用可能な任意の方法が使用され得る。本明細書において提供されるような切断型のCD47が含まれる、改変されたポリヌクレオチドまたはバリエーションポリヌクレオチドは、標準的な組換えDNA法を使用して野生型ポリヌクレオチドから開発され得る。ポリヌクレオチドは、核酸分子をクローニング及び単離するための当該技術分野において公知の利用可能な任意の方法を使用してクローニングまたは単離され得る。かかる方法としては、核酸のPCR増幅及びライブラリーのスクリーニング、例えば、核酸ハイブリダイゼーションスクリーニング、抗体ベースのスクリーニング、及び活性ベースのスクリーニングが挙げられる。

20

30

【0172】

例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法が含まれる、ポリヌクレオチドの増幅方法は、目的のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを単離するために使用され得る。PCRは、当該技術分野における任意の公知の方法または手順を使用して実行され得る。例示的な方法は、Perkin-Elmer Cetusサーマルサイクラー及びTaqポリメラーゼ(Gene Amp)の使用を含む。関心対象の遺伝子を含む核酸が原料物質として使用され得、当該原料物質から目的のポリペプチドをコードする核酸分子が増幅され得る。例えば、DNA及びmRNA調製物、適切な供給源(例えば、精巣、前立腺、乳房)からの細胞抽出物、組織抽出物、液体試料(例えば、血液、血清、唾液)、健全な対象及び/または疾患のある対象由来の試料が増幅方法に使用され得る。供給源は、限定されるものではないが、脊椎動物、哺乳動物、ヒト、ブタ、ウシ、ネコ、鳥類、ウマ、イヌ、及び他の霊長類供給源が含まれる、任意の真核生物種由来であり得る。核酸ライブラリーも原料物質として使用され得る。プライマーは、目的のポリヌクレオチドを増幅するように設計され得る。例えば、プライマーは、目的のポリヌクレオチドが生成される発現配列に基づいて設計され得る。プライマーは、ポリペプチドアミノ酸配列の逆翻訳に基づいて設計され得る。必要に応じて、縮重プライマーが増幅に使用され得る。目的の配列の3'及び5'末端の配列にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマーが、PCR法に

40

50

より核酸試料から増幅するためのプライマーとして使用され得る。プライマーは、全長ポリヌクレオチドの全体またはその短縮された配列を増幅するために使用され得る。増幅により生成された核酸分子は、配列決定され得、目的のポリペプチドをコードすることが確認され得る。

【0173】

IV. ベクター

別の態様では、本開示は、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。

【0174】

DNA断片をベクターに挿入するための当業者に公知の任意の方法が、本明細書において開示されるポリヌクレオチドを含む発現ベクターを構築するために使用され得る。これらの方法としては、インビトロ組換えDNA技術及び合成技術及びインビボ（遺伝的）組換えが挙げられる。本明細書において開示されるポリヌクレオチドは、遺伝子操作されたCD47タンパク質を確実に発現させるために、発現ベクター（複数可）において制御配列に作動可能に連結され得る。かかる制御配列としては、限定されるものではないが、リーダーまたはシグナル配列、プロモーター（例えば、天然に結合しているか、または異種のプロモーター）、リボソーム結合部位、エンハンサーまたはアクチベーターエレメント、翻訳開始及び終止配列、ならびに転写開始及び終止配列が挙げられ、当該制御配列は、遺伝子操作されたCD47タンパク質を発現させるために選択される宿主細胞と適合可能となるように選択される。当該技術分野において公知の構成的または誘導性プロモーターも意図される。プロモーターは、天然に存在するプロモーター、2つ以上のプロモーターのエレメントを組み合わせるハイブリッドプロモーター、または合成プロモーターのいずれかであり得る。発現構築物は、細胞内のプラスミドなどのエピソーム上に存在し得るか、または発現構築物は、染色体、例えば、遺伝子座に挿入され得る。幾つかの実施形態で、発現ベクターは、形質転換宿主細胞の選択を可能にするための選択マーカー遺伝子を含む。幾つかの実施形態は、少なくとも1つの制御調節配列に作動可能に連結された、バリエーションポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む。本明細書において使用される制御調節配列としては、プロモーター、エンハンサー、及び他の発現調節エレメントが挙げられる。ある特定の実施形態では、発現ベクターは、形質転換される宿主細胞の選択、発現されることが望ましい特定のバリエーションポリペプチド、ベクターのコピー数、そのコピー数を制御する能力、及び／またはベクターがコードする任意の他のタンパク質の発現、例えば、抗生物質マーカーに応じて設計される。

【0175】

好適な哺乳動物プロモーターの例としては、例えば、以下の遺伝子由来のプロモーターが挙げられる：伸長因子1 α （EF1 α ）プロモーター、CAGプロモーター、ハムスターのユビキチン/S27aプロモーター（WO97/15664）、サル空胞ウイルス40（SV40）初期プロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター、マウスメタロチオネイン-Iプロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）の末端反復配列領域、マウス乳癌ウイルスプロモーター（MMTV）、モロニー Maus 白血病ウイルス末端反復配列領域、及びヒトサイトメガロウイルス（CMV）の初期プロモーター。他の異種哺乳動物プロモーターの例は、アクチン、免疫グロブリン、または熱ショックプロモーター（複数可）である。更なる実施形態では、哺乳動物宿主細胞に使用されるプロモーターは、ウイルス、例えば、ポリオマウイルス、鶏痘ウイルス（1989年7月5日に公開されたUK2, 211, 504）、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、及びシミアンウイルス40（SV40）のゲノムから取得され得る。更なる実施形態では、異種哺乳動物のプロモーターが使用される。例としては、アクチンプロモーター、免疫グロブリンプロモーター、及び熱ショックプロモーターが挙げられる。SV40の初期及び後期プロモーターは、SV40ウイルス複製開始点も含むSV40制限断片として簡便に得られる（Fiers et al., Nature 273: 113-120 (1978)）。ヒトサイトメガロウイルスの最初期

10

20

30

40

50

プロモーターは、HindIII制限酵素断片として簡便に得られる（Greenaway et al., Gene 18:355-360 (1982)）。前述の参考文献は、それらの全体が参照により組み込まれる。

【0176】

幾つかの実施形態では、ベクターは、外来性ポリヌクレオチドを保有する偽型化された自己不活性化レンチウイルスベクターである。幾つかの実施形態では、ベクターは、水疱性口内炎VSV-Gエンベロープで偽型化された、外来性ポリヌクレオチドを保有する自己不活性化レンチウイルスベクターである。

【0177】

ベクターとしては、限定されるものではないが、ウイルスベクター及びプラスミドDNAが挙げられ得る。ウイルスベクターとしては、限定されるものではないが、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、及びアデノ随伴ウイルスベクターが挙げられ得る。通常、発現ベクターは、所望のDNA配列で形質転換された細胞の検出を可能にするための選択マーカー、例えば、アンピシリン耐性、ハイグロマイシン耐性、テトラサイクリン耐性、カナマイシン耐性、またはネオマイシン耐性を含む。好適なベクター、プロモーター、及びエンハンサーエレメントは、当技術分野において公知であり、多数が主題の組換え構築物を作製するために市販されている。幾つかの実施形態では、ベクターは、多シストロン性ベクターである。幾つかの実施形態では、ベクターは、バイシストロン性ベクターまたはトリシストロン性ベクターである。バイシストロン性または多シストロン性発現ベクターは、（1）オープンリーディングフレームの各々に融合された複数のプロモーター；（2）遺伝子間のスプライシングシグナルの挿入；（3）発現が単一のプロモーターにより駆動される遺伝子の融合物；及び（4）遺伝子間のタンパク質切断部位（自己切断ペプチド）の挿入または遺伝子間の内部リボソーム侵入部位（IRES）の挿入を含み得る。

【0178】

多シストロン性ベクターは、同一の細胞において複数の遺伝子を共発現させるために使用される。多シストロン性ベクターを構築するために、2つの戦略が最も一般的に使用される。1つ目に、典型的には内部リボソーム進入部位（IRES）エレメントがバイシストロン性ベクターに使用される。別のリボソーム動員部位として作用するIRESエレメントは、mRNAの内部領域からの翻訳開始を可能にする。これにより、2つのタンパク質が1つのmRNAから翻訳される。IRESエレメントは非常に大きい（通常500～600bp）（Pelletier et al., 1988; Jang et al., 1988）。本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質は、野生型全長ヒトCD47と比較してより小さいサイズを有し、従って、パッケージング容量が制限された多シストロン性ベクターにおいてIRESエレメントと共に使用することができる。

【0179】

第2の戦略は、「自己切断型」2Aペプチドに基づく。ピコルナウイルスにおいて最初に発見されたこれらのペプチドは短く（約20アミノ酸）、同じmRNAから等モル濃度の複数の遺伝子を生じる。用語「自己切断型」は、これらのペプチドが2AエレメントのC末端でリボソームにペプチド結合の合成をスキップさせ、これにより、2A配列の末端と下流の次のペプチドとの間の分離をもたらすことにより機能すると考えられているため、完全には正確ではない（Kim et al., 2011）。「切断」は、C末端に見出されるグリシンとプロリン残基との間で発生する。従って、上流のシストロンは、末端に付加された幾つかの追加の残基を有する一方で、下流のシストロンは、プロリンから開始する。

【0180】

幾つかの実施形態では、本開示の文脈において使用される多シストロン性ベクターは、米国出願第63/270,956号及び同第63/222,954号で記載されている多シストロン性ベクターである。

10

20

30

40

50

【0181】

幾つかの実施形態では、本明細書におけるベクターは、別の核酸分子を、例えば、細胞または細胞のゲノムに導入または輸送することができる核酸分子である。導入される核酸は、通常、ベクター核酸分子に連結、例えば、挿入されている。ベクターは、細胞における自律増殖を誘導する配列を含み得るか、または宿主細胞DNAへの組込みを可能にするのに十分な配列を含み得る。有用なベクターとしては、例えば、プラスミド（例えば、DNAプラスミドまたはRNAプラスミド）、トランスポゾン、コスミド、細菌人工染色体、及びウイルスベクターが挙げられる。有用なウイルスベクターとしては、例えば、複製欠損レトロウイルス及びレンチウイルスが挙げられる。非ウイルスベクターは、核酸分子の細胞への侵入を促進するための送達媒体を必要とし得る。

10

【0182】

ウイルスベクターは、通常、核酸分子の導入または細胞のゲノムへの組込みもしくは核酸の導入を媒介するウイルス粒子への組込みを促進するウイルス由来の核酸エレメントを含む核酸分子を含み得る。ウイルス粒子は、通常、核酸（複数可）に加えて、様々なウイルス成分及び場合により、宿主細胞成分も含む。ウイルスベクターは、例えば、核酸を細胞内に導入することができるか、または導入された核酸に（例えば、裸のDNAとして）移すことができるウイルスまたはウイルス粒子を含み得る。ウイルスベクター及び導入プラスミドは、主にウイルスに由来する構造的及び／または機能的な遺伝的エレメントを含み得る。レトロウイルスベクターは、主にレトロウイルスに由来する構造的及び機能的な遺伝的エレメントまたはその一部を含むウイルスベクターまたはプラスミドを含み得る。

20

【0183】

本明細書に記載される幾つかのベクターでは、複製に寄与するか、または複製に必須である1つ以上のタンパク質コード領域の少なくとも一部が、対応する野生型ウイルスと比較して存在しなくてもよい。これにより、ウイルスベクターの複製欠損が生じる。幾つかの実施形態では、ベクターは、標的の非分裂性宿主細胞に形質導入することができ、及び／またはそのゲノムを宿主ゲノムに組込むことができる。

【0184】

幾つかの実施形態では、レトロウイルス核酸は、以下のうちの1つ以上（例えば、以下のうちの全て）を含む：（例えば、パッケージングされた全てのRNAの発現を制御するための）5'プロモーター、（例えば、R（ポリアデニル化尾部シグナル）、及び／またはプライマー活性化シグナルを含むU5を含む）5'LTR、プライマー結合部位、psiパッケージングシグナル、核外移行のためのRREエレメント、導入遺伝子の発現を制御するための導入遺伝子のすぐ上流のプロモーター、導入遺伝子（または他の外来性作用物質要素）、ポリプリントラクト、及び（例えば、変異型U3、R、及びU5を含む）3'LTR。幾つかの実施形態では、レトロウイルス核酸は、cPPT、WPRE、及び／またはインスレーターエレメント（例えば、Browning et al., "Insulators to Improve the Safety of Retroviral Vectors for HIV Gene Therapy," Biomedicines, 4 (1): 4 (2016) に記載されている）のうちの1つ以上を更に含む。

30

40

【0185】

レトロウイルスは、通常、そのゲノムRNAの直鎖状二本鎖DNAコピーへの逆転写により複製し、その後そのゲノムDNAを共有結合により宿主ゲノムに組込む。野生型レトロウイルスゲノムの構造は、多くの場合、5'末端反復配列（LTR）及び3'LTRを含み、それらの間または内部に、ゲノムのパッケージングを可能にするパッケージングシグナル、プライマー結合部位、宿主細胞ゲノムへの組込みを可能にするための組込み部位、ならびにウイルス粒子のアセンブリを促進するパッケージング成分をコードするgag、pol、及びenv遺伝子が存在する。より複雑なレトロウイルスは、追加の特徴、例えば、組み込まれたプロウイルスのRNA転写物の核から感染標的細胞の細胞質への効率的な輸出を可能にするHIVのrev及びRRE配列を有する。プロウイルスでは、ウイ

50

ルス遺伝子の両端が末端反復配列（LTR）と称される領域に挟まれている。LTRは、プロウイルスの組込み及び転写に關与する。LTRはエンハンサー・プロモーター配列としても機能し、ウイルス遺伝子の発現を制御することができる。レトロウイルスRNAのキャプシド形成は、ウイルスゲノムの5'末端に存在するpsi配列により発生する。

【0186】

LTRそれ自体は、通常、類似した（例えば、同一の）配列であり、U3、R、及びU5と称される3つのエレメントに分割され得る。U3は、RNAの3'末端に固有の配列に由来する。RはRNAの両末端で反復される配列に由来し、U5はRNAの5'末端に固有の配列に由来する。3つのエレメントのサイズは、異なるレトロウイルス間で大きく異なり得る。

10

【0187】

ウイルスゲノムでは、転写開始部位は、通常、一方のLTRのU3とRとの境界に存在し、ポリ（A）付加（終結）部位はもう一方のLTRのRとU5との境界に存在する。U3は、プロウイルスの転写調節エレメントの大部分を含み、これには、細胞及び場合によってはウイルスの転写活性化タンパク質に応答するプロモーター及び複数のエンハンサー配列が含まれる。幾つかのレトロウイルスは、遺伝子発現の調節に關与するタンパク質をコードする以下の遺伝子のうちの任意の1つ以上を含む：tot、rev、tax、及びrex。

【0188】

構造遺伝子gag、pol、及びenvに関して、gagはウイルスの内部構造タンパク質をコードする。gagタンパク質は、タンパク質分解により成熟タンパク質MA（マトリックス）、CA（カプシド）、及びNC（ヌクレオカプシド）にプロセッシングされる。pol遺伝子は、DNAポリメラーゼを含む逆転写酵素（RT）、關連するRNAアーゼH、及びインテグラーゼ（IN）をコードし、これらはゲノムの複製を媒介する。env遺伝子は、ウイルス粒子の表面（SU）糖タンパク質及び膜貫通（TM）タンパク質をコードし、これらは、細胞の受容体タンパク質と特異的に相互作用する複合体を形成する。この相互作用は、例えば、ウイルス膜の細胞膜との融合により、感染を促進する。

20

【0189】

複製欠損レトロウイルスベクターゲノムでは、gag、pol、及びenvは、存在しなくてもよいが、または機能していなくてもよい。RNAの両端のR領域は、通常、反復配列である。U5及びU3は、RNAゲノムのそれぞれ5'及び3'末端のユニーク配列である。レトロウイルスは、gag、pol、及びenv以外のタンパク質をコードする追加の遺伝子も含み得る。追加の遺伝子の例としては、（HIVでは）vif、vpr、vpx、vpu、tat、rev、及びnefのうちの1つ以上が挙げられる。EIAVは（とりわけ）追加の遺伝子S2を有する。

30

【0190】

特定の実施形態に使用するのに適した例示的レトロウイルスとしては、限定されるものではないが、以下が挙げられる：モロニー Maus 白血病ウイルス（MoMuLV）、モロニー Maus 肉腫ウイルス（MoMSV）、ハーベイ Maus 肉腫ウイルス（HaMuSV）、マウス乳癌ウイルス（MuMTV）、テナガザル白血病ウイルス（GaLV）、ネコ白血病ウイルス（FeLV）、スプマウイルス、フレンド Maus 白血病ウイルス、マウス幹細胞ウイルス（MSCV）、及びラウス肉腫ウイルス（RSV）、及びヒト免疫不全ウイルス（HIV）。

40

【0191】

幾つかの実施形態では、レトロウイルスは、ガンマレトロウイルスである。幾つかの実施形態では、レトロウイルスは、イプシロンレトロウイルスである。幾つかの実施形態では、レトロウイルスは、アルファレトロウイルスである。幾つかの実施形態では、レトロウイルスは、ベータレトロウイルスである。幾つかの実施形態では、レトロウイルスは、ガンマレトロウイルスである。幾つかの実施形態では、レトロウイルスは、スプーマレトロウイルスである。幾つかの実施形態では、レトロウイルスは、内在性レトロウイルスで

50

ある。幾つかの実施形態では、レトロウイルスは、レンチウイルスである。

【0192】

幾つかの実施形態では、レトロウイルスまたはレンチウイルスベクターは、1つ以上のインスレーターエレメント、例えば、Browning et al., “Insulators to Improve the Safety of Retroviral Vectors for HIV Gene Therapy,” Biomedicine, 4 (1): 4 (2016)に記載されているインスレーターエレメントを更に含む。種々の実施形態では、ベクターは、外来性作用物質をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを含む。ベクターは、1つ以上のLTRを有し得、ここで、いずれかのLTRは、1種以上の改変、例えば、1種以上のヌクレオチド置換、付加、または欠失を含む。ベクターは、形質導入効率（例えば、cPPT/FLAP）、ウイルスパッケージング（例えば、Psi(Y)パッケージングシグナル、RRE）を増加させる1つ以上の補助的エレメント、及び／または外来性遺伝子の発現（例えば、ポリ(A)配列）を増加させる他のエレメントを更に含み得、WPREまたはHPREを任意に含み得る。幾つかの実施形態では、レンチウイルス核酸は、例えば、5'から3'までに、プロモーター（例えば、CMV）、R配列（例えば、TARを含む）、U5配列（例えば、組込みのため）、PBS配列（例えば、逆転写のため）、DIS配列（例えば、ゲノム二量体化のため）、psiパッケージングシグナル、一部分のgag配列、RRE配列（例えば、核外移行のため）、cPPT配列（例えば、核内移行のため）、外来性作用物質の発現を駆動するためのプロモーター、外来性作用物質をコードする遺伝子、WPRE配列（例えば、効率的な導入遺伝子の発現のため）、PPT配列（例えば、逆転写のため）、R配列（例えば、ポリアデニル化及び終結のため）、及びU5シグナル（例えば、組込みのため）のうちの1つ以上、例えば、そのうちの全てを含む。

10

20

【0193】

例示的なレンチウイルスとしては、限定されるものではないが、以下が挙げられる：HIV（ヒト免疫不全ウイルス；HIV1型及びHIV2型が含まれる）；ビスナ・マエディウイルス（VMV）；ヤギ関節炎脳炎ウイルス（CAEV）；ウマ伝染性貧血ウイルス（EIAV）；ネコ免疫不全ウイルス（FIV）；ウシ免疫不全ウイルス（BIV）；及びサル免疫不全ウイルス（SIV）。幾つかの実施形態では、HIVベースのベクター骨格（すなわち、HIVシス作用配列エレメント）が使用される。レンチウイルスベクターは、LTRを含まれる、主にレンチウイルスに由来する構造的及び機能的な遺伝的エレメントまたはその一部を含むウイルスベクターまたはプラスミドを含み得る。

30

【0194】

実施形態では、レンチウイルスベクター（例えば、レンチウイルス発現ベクター）は、（例えば、裸のDNAとしての）レンチウイルス導入プラスミドまたは感染性レンチウイルス粒子を含み得る。エレメント、例えば、クローニング部位、プロモーター、調節エレメント、異種核酸などに関して、これらのエレメントの配列は、レンチウイルス粒子ではRNA形態で存在し得、DNAプラスミドではDNA形態で存在し得ると理解されたい。

【0195】

実施形態では、レンチウイルスベクターは、パッケージング成分の存在下で、標的細胞に感染することができるウイルス粒子へのRNAゲノムのパッケージングを可能にするのに十分なレトロウイルス遺伝子情報を有するベクターである。標的細胞の感染は、逆転写及び標的細胞ゲノムへの組込みを含み得る。組換えレンチウイルスベクター（RLV）は、通常、ベクターにより標的細胞に送達されるべき非ウイルスコード配列を保有する。実施形態では、RLVは、標的細胞内で感染性レトロウイルス粒子を生成するための独立した複製ができない。通常、RLVは、機能的gag-pol及び／またはenv遺伝子及び／または複製に関与する他の遺伝子を欠く。ベクターは、例えば、PCT特許出願第WO99/15683号（これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるような、スプリットイントロンベクターとして設計され得る。

40

【0196】

50

幾つかの実施形態では、レンチウイルスベクターは、最小限のウイルスゲノムを含み、例えば、ウイルスベクターは、例えば、WO 98/17815に記載（これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）されているように、感染し、形質導入し、関心対象のヌクレオチド配列を標的宿主細胞に送達するのに必要とされる機能を提供するために、必須ではないエレメントを除去し、必須のエレメントを保持するように遺伝子操作されている。

【0197】

最小限のレンチウイルスゲノムは、例えば、(5') R-U5-1つ以上の第1のヌクレオチド配列-U3-R(3')を含み得る。しかしながら、供給源細胞内でレンチウイルスのゲノムを産生させるために使用されるプラスミドベクターは、供給源細胞におけるゲノムの転写を誘導するために、レンチウイルスゲノムに作動可能に連結された転写制御調節配列も含み得る。これらの調節配列は、転写されるレトロウイルス配列に関連する天然の配列、例えば、5' U3領域を含み得るか、またはそれらは異種プロモーター、例えば、別のウイルスプロモーター、例えば、CMVプロモーターを含み得る。幾つかのレンチウイルスゲノムは、効率的なウイルス産生を促進するための追加の配列を含む。例えば、HIVの場合、rev及びRRE配列が含まれ得る。

【0198】

V. 細胞

別の態様では、本開示は、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質をコードするポリヌクレオチド、及び／または本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含む細胞を提供する。

【0199】

別の態様では、本開示は、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質を含む細胞を提供する。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、遺伝子操作されたCD47タンパク質をコードする核酸分子の形態で細胞に導入される。核酸分子を細胞に導入するプロセスは、任意の好適な技術により達成され得る。好適な技術としては、リン酸カルシウムまたは脂質により媒介される形質移入、エレクトロポレーション、及びウイルスベクターを使用した形質導入または感染が挙げられる。幾つかの実施形態では、核酸分子は、DNAを含む。幾つかの実施形態では、核酸分子は、修飾DNAを含む。幾つかの実施形態では、核酸分子は、mRNAを含む。幾つかの実施形態では、核酸分子は、修飾mRNAを含む。

【0200】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、例えば、ベクターを用いたウイルス形質導入を使用して送達される。幾つかの実施形態では、ベクターは、外来性ポリヌクレオチドを保有する偽型化された自己不活性化レンチウイルスベクターである。幾つかの実施形態では、ベクターは、水疱性口内炎VSV-Gエンベロープで偽型化された、外来性ポリヌクレオチドを保有する自己不活性化レンチウイルスベクターである。

【0201】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、1つ以上の遺伝子編集システムを使用して送達される。幾つかの実施形態では、遺伝子編集システムは、CRISPR/Casである。幾つかの実施形態では、遺伝子編集システムは、本明細書に記載されるCRISPR/Casシステムのうちの1つ以上である。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)による方法を使用して送達される。幾つかの実施形態では、遺伝子編集システムは、本明細書に記載されるTALENによる方法のうちの1つ以上である。

【0202】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)を使用して送達される。幾つかの実施形態では、遺伝子編集システ

ムは、本明細書に記載される ZFN による方法のうちの 1 つ以上である。

【0203】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された CD47 タンパク質は、メガヌクレアーゼを使用して送達される。幾つかの実施形態では、遺伝子編集システムは、本明細書に記載されるメガヌクレアーゼによる方法のうちの 1 つ以上である。

【0204】

幾つかの実施形態では、細胞は、幹細胞である。

【0205】

幾つかの実施形態では、細胞は、多能性幹細胞である。多能性幹細胞は、分裂により自己複製する能力、及び初期胚の 3 つの主な生殖細胞層に発達し、従って、成人の身体全ての細胞に発達するが、胎盤などの胚外組織には発達しない能力を有する細胞である。胚性幹細胞及び人工多能性幹細胞は、多能性幹細胞である。

【0206】

幾つかの実施形態では、細胞は、胚性幹細胞 (ESC) である。胚性幹細胞は、着床前の初期胚である胚盤胞の内部細胞塊に由来する多能性幹細胞である。

【0207】

幾つかの実施形態では、細胞は、人工多能性幹細胞 (iPSC) である。iPSC は、治療的に必要とされる任意の種類の細胞の制限のない供給源の開発を可能にする胚様の多能性状態に遺伝的に初期化された成人体細胞に由来する。

【0208】

本明細書で使用する場合、「多能性幹細胞」は、以下の 3 つの胚葉のいずれかに分化する能力を有する：内胚葉（例えば、胃壁、消化管、肺など）、中胚葉（例えば、筋肉、骨、血液、泌尿生殖器組織など）、または外胚葉（例えば、表皮組織及び神経系組織）。本明細書で使用する場合、用語「多能性幹細胞」は、人工多能性幹細胞 (iPSC または iPS 細胞)、または非多能性細胞に由来する多能性幹細胞種も包含する。幾つかの実施形態では、多能性幹細胞は、多能性細胞ではない細胞から生成または作製される。換言すれば、多能性幹細胞は、非多能性細胞の直接的または間接的な子孫であり得る。親細胞の例としては、様々な手段によって、多能性の未分化表現型を誘導するために初期化された体細胞が挙げられる。かかる「iPS」または「iPSC」細胞は、ある特定の調節遺伝子の発現を誘発することにより、またはある特定の外来性タンパク質の適用により作製され得る。iPS 細胞の誘導方法は、当技術分野において公知であり、以下で更に記載される。例えば、Zhou et al., Stem Cells 27 (11): 2667-74 (2009)、Huangfu et al., Nature Biotechnol. 26 (7): 795 (2008)、Woltjen et al., Nature 458 (7239): 766-770 (2009)、及び Zhou et al., Cell Stem Cell 8: 381-384 (2009) (これらの各々は参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる) を参照のこと。幾つかの実施形態では、「多能性幹細胞」は、本明細書で使用する場合、間葉系幹細胞 (MSC) 及び／または胚性幹細胞 (ESC) も包含する。

【0209】

幾つかの実施形態では、細胞は、臍島細胞である。幾つかの実施形態では、細胞は、初代臍島細胞である。

【0210】

幾つかの実施形態では、細胞は、多能性幹細胞から分化している。幾つかの実施形態では、多能性幹細胞は、iPSC または ESC である。

【0211】

幾つかの実施形態では、細胞は、T 細胞である。幾つかの実施形態では、細胞は、初代 T 細胞である。幾つかの実施形態では、細胞は、キメラ抗原受容体 (CAR) を含む T 細胞、例えば、CAR をコードするポリヌクレオチドを含み、及び／または CAR を含むか、またはそうでなければポリヌクレオチドから CAR を発現する T 細胞である。幾つかの

実施形態では、細胞は、CAR-T細胞である。幾つかの実施形態では、T細胞は、多能性幹細胞から分化している。幾つかの実施形態では、多能性幹細胞は、iPSCまたはESCである。

【0212】

T細胞はリンパ球の一種である。T細胞は、免疫系の白血球の1つであり、適応免疫応答において中心的役割を果たす。CAR-T細胞は、人工T細胞受容体を産生するように遺伝子操作されたT細胞である。キメラ抗原受容体（CAR、キメラ免疫受容体、キメラT細胞受容体、または人工T細胞受容体としても公知）は、特定のタンパク質を標的とする能力をT細胞に与えるように遺伝子操作された受容体タンパク質である。この受容体は、それらが抗原結合機能及びT細胞活性化機能を単一の受容体に組み込んでいるため、キメラである。CAR-T細胞は、CD4+及びCD8+の両方であり得、両方の細胞種の1対1の比率が相乗作用的な抗腫瘍効果をもたらす。CAR-T細胞は、患者自身の血液中のT細胞に由来し得る（自家）か、または別の健常なドナーのT細胞に由来し得る（同種異系）。T細胞は、限定されるものではないが、末梢血単核細胞、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位由来の組織、腹水、胸水、脾臓組織、及び腫瘍が含まれる、多数の供給源から取得され得る。ある特定の実施形態では、T細胞は、対象から採取された血液単位から、当業者に公知の任意の数の技術、例えば、沈降、例えば、FICOLL（商標）分離、抗体コンジュゲートビーズベースの方法、例えば、MACS（商標）分離（Miltenyi）を使用して取得され得る。

10

【0213】

幾つかの実施形態では、細胞は、限定されるものではないが、心臓細胞、心臓前駆細胞、神経細胞、グリア前駆細胞、内皮細胞、T細胞、B細胞、膵島細胞、網膜色素上皮細胞、肝実質細胞、甲状腺細胞、皮膚細胞、血液細胞、形質細胞、血小板、腎細胞、上皮細胞、CAR-T細胞、NK細胞、及びCAR-NK細胞から選択される。

20

【0214】

幾つかの実施形態では、細胞は初代細胞である。初代細胞は、酵素による方法または機械的方法を使用してヒトまたは動物組織から直接単離される。単離されると、それらは、増殖を補助するための必須栄養素及び増殖因子を含有する特殊な培地で補助されたプラスチックまたはガラス容器内の人工的環境に置かれる。初代細胞は、接着細胞または懸濁細胞の2種類であり得る。接着細胞は、増殖に付着を必要とし、接着依存性細胞であると言われる。接着細胞は、通常、器官の組織に由来する。懸濁細胞は、増殖に付着を必要とせず、接着非依存性細胞であると言われている。ほとんどの懸濁細胞は血液系から単離されるが、一部の組織由来の細胞、例えば、肝実質細胞または腸細胞は、懸濁液中でも使用され得る。初代細胞は、通常、限られた寿命を有するが、それらは細胞株と比較して多数の利点を提供する。初代細胞は、研究者が細胞だけではなく、ドナーを研究することを可能にする。幾つかの因子、例えば、年齢、病歴、人種、及び性別が実験モデルを構築する際に考慮され得る。個別化医療に向かう傾向が高まっており、かかるドナー多様性及び組織の複雑性は、初代細胞を使用して達成することができるが、その性質がより系統的かつ均一であり、生体組織の実際の多様性を捕捉しない細胞株で再現するのは困難である。

30

【0215】

幾つかの実施形態では、細胞は、分化した細胞である。分化した細胞は、分化を起こした細胞である。それらは特殊な機能を実行する成熟細胞である。分化した細胞の幾つかの例は、上皮細胞、皮膚線維芽細胞、血管を裏打ちする内皮細胞、平滑筋細胞、肝細胞、神経細胞、ヒト心筋細胞などである。通常、これらの細胞は、固有の形態、代謝活性、膜電位、及び身体組織または器官におけるそれらの機能を促進するシグナルに対する反応性を有する。

40

【0216】

低免疫原性細胞

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される細胞は、低免疫原性細胞である。細胞を特徴付けるために本明細書で使用する場合、用語「低免疫原性」は、一般に、かかる細胞

50

が、かかる細胞が移植される対象による自然免疫または適応免疫拒絶反応をより受けにくいこと、例えば、細胞が、かかる細胞が移植される対象による同種異系拒絶反応をより受けにくいことを意味する。例えば、幾つかの実施形態では、このような低免疫原性細胞は、改変を含まない同じ細胞種の細胞と比較して、約 2.5%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97.5%、99%、100%、またはそれらの間の任意の程度、かかる細胞が移植される対象による適応免疫拒絶反応をより受けにくくてもよい。幾つかの実施形態では、ゲノム編集技術は、MHC I 及び MHC II 遺伝子の発現を調節するために使用され、これにより、低免疫原性細胞の作製に寄与する。幾つかの実施形態では、低免疫原性細胞は、MHC 不適合の同種異系レシピエントにおいて免疫拒絶反応を回避する。幾つかの実施形態では、本明細書において概説される低免疫原性幹細胞から作製される分化細胞は、MHC 不適合の同種異系レシピエントに投与（例えば、移植（transplanted）または移植（grafted））された場合、免疫拒絶反応を回避する。幾つかの実施形態では、低免疫原性細胞は、T 細胞性適応免疫拒絶反応及び／または自然免疫細胞による拒絶反応から保護される。低免疫原性細胞、かかる細胞を作製する方法、及びかかる細胞の使用の詳細な説明は、2015 年 5 月 9 日に出願された WO 2016 183041、2018 年 1 月 14 日に
10
出願された WO 2018 132783、2018 年 3 月 20 日に
出願された WO 2018 176390、2019 年 7 月 17 日に
出願された WO 2020 018615、2019 年 7 月 17 日に
出願された WO 2020 018620、2020 年 7 月 31 日に
出願された PCT/US 2020/44635、2019 年 8 月 1 日に
出願された US 62/881,840、2019 年 8 月 23 日に
出願された US 62/891,180、2020 年 4 月 27 日に
出願された US 63/016,190、及び 2020 年 7 月 15 日に
出願された US 63/052,360（これらの開示は、実施例、配列表、及び図を含め、参
照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）に見出される。

【0217】

細胞の低免疫原性は、細胞が適応免疫応答及び自然免疫応答を誘発する能力またはかかる適応免疫応答及び自然免疫応答の誘発を回避する能力などの細胞の免疫原性を評価することにより決定され得る。かかる免疫応答は、当業者により理解されるアッセイを使用して測定され得る。幾つかの実施形態では、免疫応答アッセイは、T 細胞増殖、T 細胞活性化、T 細胞による殺傷、ドナー特異的抗体生成、NK 細胞増殖、NK 細胞活性化、及びマ
30
クロファージ活性に対する低免疫原性細胞の効果を測定する。幾つかの例では、低免疫原性細胞及びその派生物は、対象に投与されると T 細胞及び／または NK 細胞による低減された殺傷を受ける。幾つかの例では、細胞及びその派生物は、未改変または野生型細胞と比較して低減されたマクロファージによる貪食を示す。幾つかの実施形態では、低免疫原性細胞は、レシピエント対象において、対応する未改変の野生型細胞と比較して低減または減弱された免疫応答を誘発する。幾つかの実施形態では、低免疫原性細胞は、非免疫原性であるか、またはレシピエント対象において免疫応答を誘発することができない。

【0218】

幾つかの実施形態では、主要組織適合性（MHC）クラス I 及び MHC クラス II タンパク質の発現が細胞において妨害される。MHC クラス I 及びクラス II タンパク質は、免疫系の適応部門において役割を果たす。両方のクラスのタンパク質が、T 細胞による認識のためのペプチドを細胞表面に提示するタスクを共有する。免疫原性ペプチド-MHC
40
クラス I（pMHC I）複合体は、有核細胞上に提示され、細胞傷害性 CD8+T 細胞により認識される。一方で、抗原提示細胞（例えば、樹状細胞（DC）、マクロファージ、または B 細胞）によるペプチド-MHC クラス II（pMHC II）の提示は、CD4+T 細胞を活性化することができ、これにより、エフェクター細胞の協調及び調節をもたらす。いずれの場合も、所与の pMHC 複合体と相互作用するクローン型 T 細胞受容体であり、持続的な細胞間接触の形成及び T 細胞活性化をもたらす可能性がある。

【0219】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される細胞は、野生型または対照細胞と比較し

10

20

30

40

50

て低減されたレベルのMHCクラスIタンパク質を発現する。幾つかの実施形態では、細胞は、野生型または対照細胞と比較して低減されたレベルのMHCクラスIIタンパク質を発現する。幾つかの実施形態では、細胞は、野生型または対照細胞と比較して低減されたレベルのMHCクラスI及びクラスIIタンパク質の両方を発現する。

【0220】

幾つかの実施形態では、細胞は、いずれのMHCクラスIタンパク質も発現しない。幾つかの実施形態では、細胞は、いずれのMHCクラスIIタンパク質も発現しない。幾つかの実施形態では、細胞は、いずれのMHCクラスIも発現せず、いずれのMHCクラスIIタンパク質も発現しない。

【0221】

幾つかの実施形態では、本明細書に述べるMHCタンパク質は、HLAタンパク質である。

【0222】

「HLA」または「ヒト白血球抗原」複合体は、ヒトにおけるMHCタンパク質をコードする遺伝子複合体である。HLA複合体を構成する細胞表面タンパク質は、抗原に対する免疫応答の調節を担う。ヒトにおいては、クラスI及びクラスIIまたは「HLA-I」及び「HLA-II」の2つのMHCが存在する。HLA-Iは、HLA-A、HLA-B、及びHLA-Cの3つのタンパク質を含み、これらは細胞内部からのペプチドを提示し、HLA-I複合体により提示された抗原は、キラーT細胞（CD8+T細胞または細胞傷害性T細胞としても公知）を引き寄せる。HLA-Iタンパク質は、β-2ミクログロブリン（B2M）と会合している。HLA-IIは、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOB、HLA-DQ、及びHLA-DRの5つのタンパク質を含み、これらは細胞外部からの抗原をTリンパ球に提示する。HLA-IIタンパク質は、クラスIIトランス活性化因子（CIITA）と会合している。これは、CD4+細胞（ヘルパーT細胞としても公知）を刺激する。用語「HLA」は、通常、この遺伝子がヒト由来であることを示すが、「MHC」または「HLA」のいずれかの使用が、限定することを意図しないことを理解すべきである。従って、哺乳動物細胞に関して、これらの用語は、本明細書において互換的に使用され得る。

【0223】

幾つかの実施形態では、MHCクラスIIタンパク質の発現は、CIITAをノックアウトすること、またはその発現を低減することにより低減される。幾つかの実施形態では、MHCII遺伝子の発現は、クラスIIトランス活性化因子（CIITA）の発現を標的とすること、及びそれを調節すること（例えば、低減または除去すること）により調節される（例えば、低減または除去される）。幾つかの実施形態では、調節は、CRISPR/Casシステムを使用して行われる。CIITAは、タンパク質のLRファミリーまたはヌクレオチド結合ドメイン（NBD）、ロイシンリッチリピート（LRR）ファミリーのメンバーであり、MHCエンハンセオソームと会合することによりMHCIIの転写を調節する。幾つかの実施形態では、調節の標的とされるポリヌクレオチド配列は、CIITAのバリエーション、CIITAのホモログ、またはCIITAのオーソログである。

【0224】

幾つかの実施形態では、CIITAの発現の低減または除去は、以下のMHCクラスII分子のうちの1つ以上の発現を低減または除去する：HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、及びHLA-DR。

【0225】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される細胞は、CIITAタンパク質をコードする遺伝子座に遺伝子改変を含む。換言すれば、細胞は、CIITA遺伝子座での遺伝子改変を含む。幾つかの例では、CIITAタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、RefSeq番号：NM_000246.4及びNCBI Genbank番号：U18259に記載されている。幾つかの例では、CIITA遺伝子座は、NCBI遺伝子番号：4261に記載されている。ある特定の例では、CIITAのアミノ酸配列は、NCB

10

20

30

40

50

I GenBank 番号：AAA88861.1として示される。CIITAタンパク質及び遺伝子座の追加の説明は、Uniprot 番号：P33076、HGNC 参照番号：7067、及びOMIM 参照番号：600005に見出され得る。

【0226】

幾つかの実施形態では、本明細書において概説される低免疫原性細胞は、CIITA遺伝子を標的とする遺伝子改変を含む。幾つかの実施形態では、CIITA遺伝子を標的とする遺伝子改変は、Casタンパク質を含むレアカットエンドヌクレアーゼまたはCasタンパク質をコードするポリヌクレオチド、及びCIITA遺伝子を特異的に標的とするための少なくとも1種のガイドリボ核酸配列により生成される。幾つかの実施形態では、CIITA遺伝子を特異的に標的とするための少なくとも1種のガイドリボ核酸配列は、WO2016183041（これは参照により本明細書に組み込まれる）の表12の配列番号5184～36352からなる群から選択される。幾つかの実施形態では、細胞は、レシピエント対象において自然免疫応答及び／または適応免疫応答を誘発する能力が低減されている。幾つかの実施形態では、本明細書において開示されるポリペプチド（例えば、本明細書において開示されるキメラ抗原受容体、CD47、または別の免疫寛容誘導因子）をコードする外来性核酸は、CIITA遺伝子に挿入される。

10

【0227】

CIITA遺伝子が不活性化されたかどうかを試験するためのアッセイは公知であり、本明細書に記載されている。幾つかの実施形態では、CIITA遺伝子の得られた遺伝子改変は、PCRにより確認され得、HLA-II発現の低減は、FACS分析により確認され得る。別の実施形態では、CIITAタンパク質発現は、CIITAタンパク質に対する抗体でプローブされた細胞溶解物のウェスタンブロットを使用して検出される。別の実施形態では、遺伝子不活性化改変の存在を確認するために、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）が使用される。幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドは、例えば、ベクターを用いて、ウイルス形質導入により細胞の少なくとも1つのアレルに挿入される。幾つかの実施形態では、ベクターは、外来性ポリヌクレオチドを保有する偽型化された自己不活性化レンチウイルスベクターである。幾つかの実施形態では、ベクターは、水疱性口内炎VSV-Gエンベロープで偽型化された、外来性ポリヌクレオチドを保有する自己不活性化レンチウイルスベクターである。幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドは、ウイルス形質導入を使用して細胞の少なくとも1つのアレルに挿入される。幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドは、レンチウイルスベースのウイルスベクターを使用して細胞の少なくとも1つのアレルに挿入される。

20

30

【0228】

幾つかの実施形態では、MHCクラスIIタンパク質の発現は、B2Mの発現をノックアウトまたは低減することにより低減される。幾つかの実施形態では、MHCII遺伝子の発現は、アクセサリ鎖B2Mの発現を標的とし、調節（例えば、低減または除去）することにより調節される（例えば、低減または除去される）。幾つかの実施形態では、調節は、CRISPR/Casシステムを使用して行われる。B2Mの発現を調節（例えば、低減または除去）することにより、MHCII分子の表面輸送が遮断され、細胞が低免疫原性になる。幾つかの実施形態では、細胞は、レシピエント対象において自然免疫応答及び／または適応免疫応答を誘発する能力が低減されている。

40

【0229】

幾つかの実施形態では、調節の標的とされるポリヌクレオチド配列は、B2Mのバリエーション、B2Mのホモログ、またはB2Mのオーソログである。

【0230】

幾つかの実施形態では、B2Mの発現の減少または除去は、以下のMHCII分子のうちの1つ以上の発現を低減または除去する：HLA-A、HLA-B、及びHLA-C。

【0231】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される細胞は、B2Mタンパク質をコードする遺伝子座に遺伝子改変を含む。換言すれば、細胞は、B2M遺伝子座での遺伝子改変を含

50

む。幾つかの例では、B2Mタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、RefSeq 番号：NM__004048.4 及び Genbank 番号：AB021288.1 に記載されている。幾つかの例では、B2M遺伝子座は、NCBI 遺伝子番号：567 に記載されている。ある特定の例では、B2Mのアミノ酸配列は、NCBI GenBank 番号：BAA35182.1 に記載されている。B2Mタンパク質及び遺伝子座の追加の説明は、UniProt 番号：P61769、HGNC 参照番号：914、及び OMIM 参照番号：109700に見出され得る。

【0232】

幾つかの実施形態では、本明細書において概説される低免疫原性細胞は、B2M遺伝子を標的とする遺伝子改変を含む。幾つかの実施形態では、B2M遺伝子を標的とする遺伝子改変は、Cas タンパク質を含むレアカットエンドヌクレアーゼまたは Cas タンパク質をコードするポリヌクレオチド、及び B2M 遺伝子の特異的に標的とするための少なくとも1種のガイドリボ核酸配列により生成される。幾つかの実施形態では、B2M 遺伝子の特異的に標的とするための少なくとも1種のガイドリボ核酸配列は、WO2016/183041（これは参照により本明細書に組み込まれる）の表15の配列番号81240～85644からなる群から選択される。幾つかの実施形態では、本明細書において開示されるポリペプチド（例えば、本明細書において開示されるキメラ抗原受容体、CD47、または別の免疫寛容誘導因子）をコードする外来性核酸は、B2M 遺伝子に挿入される。幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドは、例えば、ベクターを用いて、ウイルス形質導入を使用して細胞の少なくとも1つのアレルに挿入される。幾つかの実施形態では、ベクターは、外来性ポリヌクレオチドを保有する偽型化された自己不活性化レンチウイルスベクターである。幾つかの実施形態では、ベクターは、水疱性口内炎 VSV-G エンベロープで偽型化された、外来性ポリヌクレオチドを保有する自己不活性化レンチウイルスベクターである。幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドは、ウイルス形質導入を使用して細胞の少なくとも1つのアレルに挿入される。幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドは、レンチウイルスベクターのウイルスベクターを使用して細胞の少なくとも1つのアレルに挿入される。

【0233】

B2M 遺伝子が不活性化されたかどうかを試験するためのアッセイは公知であり、本明細書に記載されている。幾つかの実施形態では、B2M 遺伝子の得られた遺伝子改変は、PCR により確認され得、HLA-I 発現の低減は、FACS 分析により確認され得る。別の実施形態では、B2M タンパク質発現は、B2M タンパク質に対する抗体でプロービングされた細胞溶解物のウェスタンブロットを使用して検出される。別の実施形態では、遺伝子不活性化改変の存在を確認するために、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）が使用される。

【0234】

本明細書に記載される T 細胞、iPSC、または ESC の幾つかの実施形態では、細胞において T 細胞受容体 α 鎖（TRAC）及び／または T 細胞受容体 β 鎖（TRBC）遺伝子がノックアウトされているか、またはそれらの発現が低減されている。

【0235】

T 細胞受容体（TCR）は、MHC 分子に結合したペプチドとしての抗原断片の認識を担う、T 細胞表面に見出されるタンパク質複合体である。TCR は、不変の CD3 鎖分子との複合体の一部として発現される、通常、高度に可変的なアルファ（ α ）鎖及び β （ β ）鎖（それぞれ TRAC 及び TRBC 遺伝子によりコードされる）からなるジスルフィド結合した膜係留型ヘテロ二量体タンパク質である。この受容体を発現する T 細胞は、 α ： β （または $\alpha\beta$ ）T 細胞と称されるが、少数の T 細胞は、可変ガンマ（ γ ）及びデルタ（ δ ）鎖により形成される代替の受容体を発現し、 $\gamma\delta$ T 細胞と称される。各鎖は、可変領域及び定常領域の2個の細胞外ドメインから構成され、これらの両方が、逆平行 β シートを形成する免疫グロブリンスーパーファミリー（IgSF）ドメインである。定常領域は細胞膜に近接しており、これの後に膜貫通領域及び短い細胞質尾部が続き、一方で可変

領域はペプチド／MHC複合体に結合する。内在性TRAC及び／またはTRBC遺伝子のノックアウトは、トランスジェニックT細胞受容体を発現するT細胞の発現及び機能を増殖し得ることが報告されている。幾つかの実施形態では、本明細書に記載される細胞は、野生型または対照細胞と比較して低減されたレベルのMHCクラスIIタンパク質及び／またはMHCクラスIIタンパク質を発現する。

【0236】

幾つかの実施形態では、細胞は、野生型細胞または同じ細胞種の対照細胞と比較して増加した野生型及び／または遺伝子操作されたCD47タンパク質の発現を含む。幾つかの実施形態では、野生型細胞または対照細胞は、出発材料である。本明細書で使用する場合、出発材料は、本明細書に記載されるような遺伝子操作されたCD47タンパク質、本明細書に記載されるような遺伝子操作されたCD47タンパク質をコードするポリヌクレオチド、本明細書に記載されるようなベクター、本明細書に記載されるような遺伝子操作されたCD47タンパク質を含む細胞、または本明細書に記載されるような遺伝子操作されたCD47タンパク質もしくは細胞を含む組成物を作製するために、本明細書に記載される変更のうちの1つ以上がなされる原材料を指す。

【0237】

本明細書で使用する場合、「野生型細胞」または「wt細胞」は、自然界に見出される任意の細胞を意味する。幾つかの実施形態では、野生型細胞としては、自然界に見出される初代細胞及びT細胞が挙げられる。本明細書で使用する場合、「対照細胞」は、CD47遺伝子が未変更であるが、他の変更がなされていてもよい細胞である。幾つかの実施形態では、対照細胞は、MHCIIタンパク質及び／またはMHCIIタンパク質及び／またはT細胞受容体の発現の減少をもたらす核酸の変化を有し得る遺伝子操作された細胞である。幾つかの実施形態では、対照細胞は、B2Mがノックアウトされているか、またはB2Mの低減された発現を含む遺伝子操作された細胞である。幾つかの実施形態では、対照細胞は、CIITAがノックアウトされているか、またはCIITAの低減された発現を含む遺伝子操作された細胞である。幾つかの実施形態では、対照細胞は、TRAC及び／またはTRBCがノックアウトされているか、またはTRAC及び／またはTRBCの低減された発現を含む遺伝子操作された細胞である。

【0238】

幾つかの実施形態では、対照細胞は、多能性をもたらす核酸の変化を有するiPSC、ESC、または子孫である。幾つかの実施形態では、対照細胞は、B2Mがノックアウトされているか、またはB2Mの低減された発現を含むiPSC、ESC、または子孫である。幾つかの実施形態では、対照細胞は、CIITAがノックアウトされているか、またはCIITAの低減された発現を含むiPSC、ESC、または子孫である。幾つかの実施形態では、対照細胞は、TRAC及び／またはTRBCがノックアウトされているか、またはTRAC及び／またはTRBCの低減された発現を含むiPSC、ESC、または子孫である。

【0239】

幾つかの実施形態では、対照細胞は、MHCIIタンパク質及び／またはMHCIIタンパク質及び／またはT細胞受容体の発現の減少をもたらす核酸の変化を有する初代T細胞または後代である。幾つかの実施形態では、対照細胞は、B2Mがノックアウトされているか、またはB2Mの低減された発現を含む初代T細胞または後代である。幾つかの実施形態では、対照細胞は、CIITAがノックアウトされているか、またはCIITAの低減された発現を含む初代T細胞または後代である。幾つかの実施形態では、対照細胞は、TRAC及び／またはTRBCがノックアウトされているか、またはTRAC及び／またはTRBCの低減された発現を含む初代T細胞または後代である。

【0240】

幾つかの実施形態では、出発材料は、ドナーから採取される初代細胞である。幾つかの実施形態では、出発材料は、例えば、ロイコパックを介して、ドナーから採取された初代血液細胞である。例えば、幾つかの実施形態では、出発材料は、ドナーから採取された未

10

20

30

40

50

改変T細胞である。幾つかの実施形態では、出発材料は、iPSC細胞株である。幾つかの実施形態では、出発材料は、ヒトCD47遺伝子以外の1つ以上の遺伝子の変化した発現を有するように別様に改変または遺伝子操作される。

【0241】

幾つかの実施形態では、記載される遺伝子操作された低免疫原性細胞は、iPSCまたはその子孫に由来する。本明細書で使用する場合、用語「iPSCまたはその子孫に由来する」は、作製される最初のiPSC及びその任意の後続の子孫を包含する。本明細書で使用する場合、用語「子孫」は、例えば、第1世代子孫を包含し、すなわち、子孫は、例えば、従来の増殖方法により、最初のiPSCから直接誘導されるか、取得されるか、取得可能であるか、または誘導可能である。用語「子孫」は、後続の世代、例えば、第2、第3、第4、第5、第6、第7、またはそれ以降の世代、すなわち、例えば、従来の増殖方法により、前の世代から誘導されるか、取得されるか、取得可能であるか、または誘導可能である細胞の世代も包含する。用語「子孫」は、最初のiPSCまたはその子孫の改変または変化により得られる改変された細胞も包含する。

10

【0242】

幾つかの実施形態では、遺伝子発現のノックダウン（例えば、減少、除去、または阻害）は、RNAサイレンシングまたはRNA干渉（RNAi）により達成され得る。有用なRNAi法は、合成RNAi分子、低分子干渉RNA（siRNA）、PIWI相互作用RNA（piRNA）、低分子ヘアピン型RNA（shRNA）、マイクロRNA（miRNA）、及び当業者に認識される他の一過性ノックダウン法を利用するものを含む。配列特異的shRNA、siRNA、miRNAなどを含めたRNAiのための試薬は、市販されている。

20

【0243】

本明細書で使用する場合、用語「遺伝子操作された細胞」は、遺伝子操作された細胞が野生型細胞と異なるように、ヒトによる介入により、例えば、遺伝子変化または改変により少なくとも何らかの形で改変された細胞を指す。

【0244】

用語「減少させる」、「低減される」、「低減」、及び「減少する」は全て、統計的に有意な量の低下を意味するように本明細書において一般に使用される。しかしながら、誤解を避けるために言及すると、「減少させる」、「低減される」、「低減」、及び「減少する」は、参照レベルと比較して少なくとも10%の低下、例えば、少なくとも約20%、もしくは少なくとも約30%、もしくは少なくとも約40%、もしくは少なくとも約50%、もしくは少なくとも約60%、もしくは少なくとも約70%、もしくは少なくとも約80%、もしくは少なくとも約90%の低下、または100%までの低下（すなわち、参照試料と比較して存在しないレベル）、または10~100%の間の任意の低下を意味する。幾つかの実施形態では、細胞は、未変化または未改変の野生型細胞と比較して低減された1つ以上の標的の発現を有するように遺伝子操作される。

30

【0245】

幾つかの実施形態では、提供される改変された細胞は、患者（例えば、レシピエント対象）に投与される場合に、それらが免疫認識及び応答を回避することができるよう改変される。細胞は、インビトロ及びインビボで免疫細胞による殺傷を回避することができる。幾つかの実施形態では、細胞は、マクロファージ及びNK細胞による殺傷を回避する。幾つかの実施形態では、細胞は、免疫細胞または対象の免疫系により無視される。換言すれば、本明細書に記載される方法により投与される細胞は、免疫系の免疫細胞によって検出可能ではない。幾つかの実施形態では、細胞は、隠蔽され、これにより、免疫拒絶反応を回避する。

40

【0246】

本明細書において提供される改変細胞が免疫認識を回避するかどうかを決定する方法としては、限定されるものではないが、IFN- γ ELISpotアッセイ、マイクログリア殺傷アッセイ、細胞移植動物モデル、サイトカイン放出アッセイ、ELISA、生物発

50

光イメージング使用した殺傷アッセイ、またはクロム放出アッセイ、または x C E L L i g e n c e 解析、混合リンパ球反応、免疫蛍光分析などが挙げられる。

【0247】

幾つかの実施形態では、細胞の免疫原性は、補体依存性細胞傷害（CDC）アッセイで評価される。CDCは、補体を含む血清の存在下で、細胞表面に発現されるHLA非依存的な抗原を標的とするIgGまたはIgM抗体と共に細胞をインキュベートし、細胞殺傷を分析することによりインビトロで分析され得る。幾つかの実施形態では、CDCは、ABO式血液型不適合血清と共に細胞をインキュベートすることにより分析され得、ここで、細胞はA抗原またはB抗原を含み、血清は、細胞のA抗原及び／またはB抗原に対する抗体を含む。

10

【0248】

幾つかの実施形態では、改変細胞が本明細書に記載されるように改変または作製されたら、それらは低免疫原性について分析され得る。種々のアッセイのいずれかが、細胞が低免疫原性かどうか、または免疫系を回避することができるかどうかを評価するために使用され得る。例示的なアッセイとしては、WO2016183041及びWO2018132783に記載されるような任意のものが挙げられる。

【0249】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される改変細胞は、宿主免疫応答を刺激することなく、宿主において1週間以上（例えば、1週間、2週間、1ヵ月、2ヵ月、3ヵ月、6ヵ月、1年、2年、3年、4年、5年、またはそれ以上、例えば、細胞及び／またはその子孫の生存期間の間）生存する。細胞は、それらが宿主内で生存する間、導入遺伝子の発現を維持し、及び／または標的遺伝子の発現が欠失しているか、もしくは低減される。幾つかの態様では、導入遺伝子がもはや発現されない場合、及び／または標的遺伝子が発現される場合、改変細胞は、宿主の免疫系により除去され得る。幾つかの実施形態では、改変細胞の持続性または生存は、細胞がインビボで検出されることを可能にするタンパク質（例えば、GFPなどの蛍光タンパク質、短縮された受容体もしくは他の代替マーカー、または他の検出可能なマーカー）をコードする導入遺伝子を更に発現させることにより、レシピエントへのそれらの投与後にモニタリングされ得る。

20

【0250】

低免疫原性細胞は、それらが意図される組織部位に生着し、機能的に欠損した領域を再構成または再生するのを可能にする様式で投与される。幾つかの実施形態では、低免疫原性細胞は、生着（例えば、生着の成功）について分析される。幾つかの実施形態では、低免疫原性細胞の生着は、事前に選択した期間の後に評価される。幾つかの実施形態では、生着した細胞は、細胞生存についてモニタリングされる。例えば、細胞生存は、生物発光イメージング（BLI）によりモニタリングされ得、ここで、細胞は、細胞生存をモニタリングするためにルシフェラーゼ発現構築物で形質導入される。幾つかの実施形態では、生着した細胞は、当該技術分野において公知の免疫染色及びイメージング法により可視化される。幾つかの実施形態では、生着した細胞は、生着の成功を確認するために検出され得る既知のバイオマーカーを発現する。例えば、フローサイトメトリーが特定のバイオマーカーの表面発現を確認するために使用され得る。幾つかの実施形態では、低免疫原性細胞は、期待通りに意図される組織部位に生着される（例えば、低免疫原性細胞の生着の成功）。幾つかの実施形態では、低免疫原性細胞は、必要に応じて意図される組織部位、例えば、細胞の欠損部位に生着される。幾つかの実施形態では、低免疫原性細胞は、改変を含まない同じ種類の細胞と同じ様式で意図される組織部位に生着される。

30

40

【0251】

幾つかの実施形態では、改変細胞の集団（例えば、CD142発現の低減が含まれる改変を含む改変されたβ脾島細胞）または組み合わせ（例えば、抗凝固剤と組み合わせた改変細胞の集団の投与）の投与は、移植の間に細胞が血液に曝露される結果として起こるIBMIRを細胞が回避または低減するのを可能にすることにより、生存及び生着を改善する。幾つかの実施形態では、IBMIRの低減は、移植の間に起こる細胞喪失（例えば、

50

移植された膵島の喪失)の量を低減する。

【0252】

幾つかの実施形態では、低免疫原性細胞は、機能について分析される。幾つかの実施形態では、低免疫原性細胞は、意図される組織部位へのそれらの生着前に機能について分析される。幾つかの実施形態では、低免疫原性細胞は、意図される組織部位への生着後に機能について分析される。幾つかの実施形態では、低免疫原性細胞の機能は、事前に選択した量の後に評価される。幾つかの実施形態では、生着した細胞の機能は、検出可能な表現型をもたらす細胞の能力により評価される。例えば、生着した β 膵島細胞の機能は、糖尿病により失われたグルコース制御の回復に基づいて評価され得る。幾つかの実施形態では、低免疫原性細胞の機能は、期待通りである(例えば、低免疫原性細胞が良好に機能すると同時に、抗体媒介性拒絶反応を回避する)。幾つかの実施形態では、低免疫原性細胞の機能は、必要に応じたものであり、例えば、細胞の欠損部位で十分に機能と同時に、抗体媒介性拒絶反応を回避する。幾つかの実施形態では、改変細胞は、同じ種類の未改変細胞と同様に機能する。

10

【0253】

即時型血液媒介性炎症反応

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される改変細胞は、即時型血液媒介性炎症反応を回避する。臨床的膵島移植の不良な結果の主な要因は、有害な即時型血液媒介性炎症反応(IBMIR)の発生であり、これは、膵島が門脈の血液に遭遇する際に移植組織の喪失をもたらす(Bennet et al., (1995) Diabetes 48:1907-1914、Moberg et al., (2002) Lancet 360:2039-2045)。この反応は、膵島の内分泌細胞による組織因子(TF)の発現と一連の他の炎症誘発性事象、例えば、MCP-1(Piemonti et al., (2002) Diabetes 51:55-65)、IL-8、及びMIF(Waeber et al., (1997) Proc Natl Acad Sci U S A 94:4782-4787、Johansson et al., (2006) Am J Transplantation 6(2):305)の発現の組み合わせにより引き起こされる。

20

【0254】

即時型血液媒介性炎症反応(IBMIR)は、CD142を発現する細胞が血液と接触する場合に発生し得る非特異的な炎症性かつ血栓性の反応である。IBMIRは、門脈のヒト血液への曝露により急速に惹起される。これは、補体、血小板、及び凝固経路の活性化を特徴とし、次に、好中球の動員をもたらす。IBMIRは、移植された膵島の有意な喪失を引き起こす。幾つかの実施形態では、本明細書において、細胞の移植または細胞の血液への曝露に伴うIBMIRを低減する組成物(例えば、CD142の低減された発現と本明細書に記載される1種以上の他の改変との組み合わせを含む改変細胞)、組み合わせ(例えば、本明細書に記載される改変細胞の集団のいずれか及び凝固を低減する抗凝固剤を含む組み合わせ)、及び方法(例えば、本明細書に記載される改変細胞の集団のいずれか及び凝固を低減する抗凝固剤を投与することを含む、患者を処置する方法)が提供される。

30

40

【0255】

幾つかの実施形態では、IBMIRは、インビトロで、例えば、米国特許第7,045,502号(これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)において以前に記載されたIBMIRのインビトロチュービンググループモデルで分析され得る。

【0256】

幾つかの実施形態では、IBMIRは、周移植期の際に血液試料を採取し、トロンビン-アンチトロンビンIII複合体(TAT)、C-ペプチド、第XIa因子-アンチトロンビン(FXIa-AT)、第XIIIa因子-アンチトロンビン(FXIIIa-AT)、トロンビン-アンチトロンビン(TAT)、プラスミン- α 2アンチプラスミン(PAP)、及び/または補体C3aの血漿レベルを評価することによりインビボで(例えば、哺

50

乳動物またはヒト患者で)分析され得る。幾つかの実施形態では、IBMIRは、移植される細胞の注入時、及び／または移植後の一定時間(例えば、移植後の3時間、5時間、10時間、または10時間超まで)におけるTAT、C-ペプチド、FXIa-AI、FXIIa-AI、PAP、及び／または補体C3aのレベルの増加と関連する。幾つかの実施形態では、IBMIRは、遊離循環血小板のカウント数をモニタリングすることにより分析され得、ここで、移植時または移植後の血小板のカウント数の減少は、IBMIRに関連する(例えば、IBMIRに起因する血小板の消費による)。

【0257】

補体依存性細胞傷害

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される改変細胞(例えば、β臍島)は、補体依存性細胞傷害(CDC)を回避する。幾つかの実施形態では、CDCは、IBMIRの血栓性反応に起因する。幾つかの実施形態では、CDCは、IBMIRとは独立して発生する。

【0258】

幾つかの実施形態では、細胞のCDCに対する感受性は、当業者により理解される標準的なプロトコールによりインビトロで分析され得る。幾つかの実施形態では、CDCは、補体系の成分を含む血清(例えば、ヒト血清)を、抗体(例えば、IgGまたはIgM抗体)により結合された標的細胞と混合し、次いで、細胞死を測定することによりインビトロで分析され得る。幾つかの実施形態では、細胞のCDCに対する感受性は、補体系の成分ならびにABO血液型A抗原、ABO血液型B抗原、及び／または細胞のRh因子抗原に対する抗体を含む、ABO不適合またはRh因子不適合の血清の存在下で細胞をインキュベートすることによりインビトロで分析され得る。

【0259】

一般的なCDCアッセイは、標的細胞に放射性化合物を事前に供給することにより細胞死を測定する。細胞が死亡する場合、放射性化合物がそれらから放出される。これにより、抗体が細胞死を媒介する効力が放射能レベルにより測定される。放射性CDCアッセイと異なり、非放射性CDCアッセイは、多くの場合、GAPDHなどの多量の細胞成分の放出を蛍光または発光測定により測定する。幾つかの実施形態では、CDCによる細胞殺傷は、ラベルフリーのプラットフォーム、例えば、xCeLLigence(商標)(Agilent)を使用して分析され得る。

【0260】

VI. 組成物

別の態様では、本開示は、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質を含む組成物を提供する。

【0261】

別の態様では、本開示は、本明細書において開示される遺伝子操作されたCD47タンパク質をコードするポリヌクレオチド、及び／または当該ポリヌクレオチドを含むベクターを含む細胞を含む組成物を提供する。

【0262】

本明細書で使用する場合、用語「組成物」は、限定されるものではないが、医薬組成物を包含する。「医薬組成物」は、単独でまたは1種以上の他の治療モダリティと組み合わせて細胞または動物に投与するために、薬学的に許容されるか、または生理学的に許容される溶液に製剤化された活性医薬品を指す。必要に応じて、本発明の組成物は、他の薬剤、例えば、サイトカイン、成長因子、ホルモン、低分子、化学療法薬、プロドラッグ、薬物、抗体、または他の様々な薬学的活性薬剤などと組み合わせて投与され得ることも理解されるであろう。追加の薬剤が、意図される治療を送達する組成物の能力に悪影響を与えないという条件で、組成物に含まれてもよい他の成分への制限は実質的でない。語句「薬学的に許容される」は、健全な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー応答、または他の問題もしくは合併症を伴わずにヒト及び動物の組織と接触させて使用するのに好適であり、妥当な利益／リスク比に見合う化合物、物質、組成物、及び／または剤

10

20

30

40

50

形を指すために本明細書において使用される。

【0263】

組成物は、薬学的に許容される担体、希釈液、または賦形剤も含み得る。本明細書で使用する場合、「薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤」としては、限定されるものではないが、ヒトまたは家庭用動物での使用が許容可能であるとアメリカ食料医薬品局（United States Food and Drug Administration）により認められている、任意の補助剤、担体、賦形剤、グリダント、甘味剤、希釈剤、防腐剤、色素／着色剤、調味料、界面活性剤、湿潤剤、分散剤、懸濁剤、安定剤、等張剤、溶媒、界面活性剤、または乳化剤が挙げられる。例示的な薬学的に許容される担体としては、限定されるものではないが、糖、例えば、ラクトース、グルコース、及びスクロース；デンプン、例えば、トウモロコシデンプン及びジャガイモデンプン；セルロース及びその誘導体、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、及び酢酸セルロース；トラガカント；麦芽；ゼラチン；タルク；ココアバター；蠟；動物性及び植物性脂肪；パラフィン；シリコン；ベントナイト；ケイ酸；酸化亜鉛；油、例えば、落花生油、綿実油、サフラワー油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油、及び大豆油；グリコール、例えば、プロピレングリコール；ポリオール、例えば、グリセリン、ソルビトール、マンニトール、及びポリエチレングリコール；エステル、例えば、オレイン酸エチル及びラウリン酸エチル；寒天；緩衝剤、例えば、水酸化マグネシウム及び水酸化アルミニウム；アルギン酸；発熱物質を含まない水；等張食塩水；リンガー液；エチルアルコール；リン酸緩衝液；ならびに医薬製剤に用いられる任意の他の適合可能な物質が挙げられる。

10

20

【0264】

液体医薬組成物は、それらが溶液、懸濁液、または他の同様の形態であるかにかかわらず、以下のうちの1つ以上を含み得る：無菌の希釈剤、例えば、注射用水、食塩水、好ましくは、生理的食塩水、リンガー液、等張食塩液；不揮発性油、例えば、溶媒または懸濁媒として機能し得る合成のモノグリセリドまたはジグリセリド；ポリエチレングリコール；グリセリン、プロピレングリコール、または他の溶媒；抗菌剤、例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン；抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム；キレート剤、例えば、エチレンジアミン四酢酸；緩衝液、例えば、酢酸塩、クエン酸塩、またはリン酸塩；及び張度調整のための薬剤、例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロース。非経口調製物は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨て注射器、または多人数用バイアルに入れられ得る。注射用医薬組成物は、好ましくは無菌である。

30

【0265】

組成物は、好適には、静脈内、腫瘍内、経口、直腸、腔内、非経口、局所、肺、鼻腔内、口腔内、眼、または別の投与経路用に開発され得る。

【0266】

VII. 遺伝子編集の方法

幾つかの実施形態では、細胞を遺伝子改変して、1つ以上の遺伝子をノックアウト、ノックダウン、または別様に改変するための方法は、例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、メガヌクレアーゼ、トランスポザーゼ、及びクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（CRISPR）／Casシステム、ならびにニッカーゼシステム、塩基編集システム、プライム編集システム、及び当該技術分野において公知の任意の他の遺伝子編集システムが含まれる、部位特異的ヌクレアーゼを使用することを含む。

40

【0267】

ZFNは、細菌のFokI制限酵素のエンドヌクレアーゼドメインに結合された、ジンクフィンガー含有転写因子から応用された一連の部位特異的DNA結合ドメインを含む融合タンパク質である。ZFNは、1個以上（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上）のDNA結合ドメインまたはジンクフィンガードメインを

50

有し得る。例えば、Carroll et al., Genetics Society of America (2011) 188:773-782、Kim et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93:1156-1160を参照のこと。個々のDNA結合ドメインは、通常、「フィンガー」または「ジンクフィンガー」と称される。各ジンクフィンガードメインは、1個以上の亜鉛イオンにより安定化された小さなタンパク質構造モチーフであり、通常、3~4bpのDNA配列を認識する。従って、タンデムドメインは、細胞のゲノム内で固有である拡張されたヌクレオチド配列に結合できる可能性がある。各フィンガーは、2~4塩基対のDNA、通常は3または4塩基対のDNAに結合する。DNA結合ドメインは、標的部位または標的セグメントと称される核酸配列に結合する。各フィンガーは、通常、約30アミノ酸の亜鉛キレート性DNA結合サブドメインを含む。研究により、このクラスの単一のジンクフィンガーが、単一のβターンの2個のシステイン残基と共に亜鉛に配位される2個の不変のヒスチジン残基を含有するαヘリックスからなることが実証されている（例えば、Berg & Shi, Science 271:1081-1085 (1996)を参照のこと）。

【0268】

特異性が既知の種々のジンクフィンガーを組み合わせて、約6、9、12、15、または18bpの配列を認識するマルチフィンガーポリペプチドを作製することができる。ファジーディスプレイ、酵母ワンハイブリッドシステム、細菌ワンハイブリッド及びツーハイブリッドシステム、ならびに哺乳動物細胞が含まれる、特定の配列を認識するジンクフィンガー（及びその組み合わせ）を作製するための種々の選択及びモジュール式組立て技術が利用可能である。ジンクフィンガーは、所定の核酸配列に結合するように遺伝子操作され得る。所定の核酸配列に結合するようにジンクフィンガーを遺伝子操作するための条件は、当該技術分野において公知である。例えば、Sera et al., Biochemistry (2002) 41:7074-7081、Liu et al., Bioinformatics (2008) 24:1850-1857を参照のこと。

【0269】

FokIヌクレアーゼドメインまたは他の二量体ヌクレアーゼドメインを含有するZFNは、二量体として機能する。従って、非回文構造のDNA部位を標的とするために一对のZFNが必要とされる。2つの個々のZFNは、それらのヌクレアーゼが適切に離れた状態でDNAの対向する鎖に結合しなければならない。Bitinaite et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 95:10570-10575を参照のこと。ゲノム内の特定の部位を切断するために、一对のZFNは、当該部位に隣接する2つの配列を認識するように設計され、一方が順鎖に存在し、他方が逆鎖上に存在する。ZFNが当該部位の両側に結合すると、ヌクレアーゼドメインは二量体化し、当該部位にてDNAを切断し、5'オーバーハングを伴うDSBを生じさせる。次いで、相同性アームに挟まれた所望の変異を含む修復テンプレートを用いて特定の変異を導入するために、HDRが利用され得る。修復テンプレートは、通常、細胞に導入される外来性二本鎖DNAベクターである。Miller et al., Nat. Biotechnol. (2011) 29:143-148、Hockemeyer et al., Nat. Biotechnol. (2011) 29:731-734を参照のこと。

【0270】

TALENは、標的遺伝子を編集するために使用され得る人工ヌクレアーゼの別の例である。「TALEヌクレアーゼ」(TALEN)は、転写活性化因子様エフェクター(TALE)に通常由来する核酸結合ドメイン、及び核酸標的配列を切断するための1つのヌクレアーゼ触媒ドメインからなる融合タンパク質である。触媒ドメインは、好ましくは、ヌクレアーゼドメイン、より好ましくは、エンドヌクレアーゼ活性を有するドメイン、例えば、I-TevI、CoLE7、NucA、及びFokIである。多数の実施形態では、TALEドメインは、メガヌクレアーゼ、例えば、I-CreI及びI-OnuIまたはそれらの機能的バリエーションに融合され得る。より好ましい実施形態では、上記ヌクレアーゼは、単量体TALEヌクレアーゼである。単量体ヌクレアーゼは、特異的認識及び

切断のために二量体化を必要としないヌクレアーゼ、例えば、WO 2012138927 に記載される遺伝子操作された TALE リピートと I-Tev I の触媒ドメインとの融合物である。

【0271】

転写活性化因子様エフェクター (TALE) は、Xanthomonas 属細菌種に由来するタンパク質であり、複数の反復配列を含む。各リピートが、33~35 アミノ酸の長さであり、標的核酸配列の各ヌクレオチド塩基に特異的な 2 個の隣接するアミノ酸を 12 位及び 13 位に有する (反復可変二残基または RVD と称される)。同様のモジュール式塩基対塩基核酸結合特性 (modular base-pair-base nucleic acid binding properties、MBBD) を有する結合ドメインは、異なる細菌種において最近発見された新規のモジュール型タンパク質に由来してもよい。この新規のモジュール型タンパク質は、TALE リピートよりも高い配列可変性を示すという利点を有する。好ましくは、異なるヌクレオチドの認識に関連する RVD は、C を認識するための HD、T を認識するための NG、A を認識するための NI、G または A を認識するための NN、A、C、G、または T を認識するための NS、T を認識するための HG、T を認識するための IG、G を認識するための NK、C を認識するための HA、C を認識するための ND、C を認識するための HI、G を認識するための HN、G を認識するための NA、G または A を認識するための SN、及び T を認識するための YG、A を認識するための TL、A または G を認識するための VT、及び A を認識するための SW である。別の実施形態では、重要なアミノ酸 12 及び 13 は、それらの特異性をヌクレオチド A、T、C、及び G に向けて調節するため、ならびに特にこの特異性を増強するために、他のアミノ酸残基に向けて変異され得る。TALEN キットは市販されている。

【0272】

TALEN は、1 個以上の TALE DNA 結合ドメイン (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個、またはそれ以上) をヌクレアーゼドメイン、例えば、FokI エンドヌクレアーゼドメインと融合させることによって人工的に作製される。Zhang, Nature Biotech. (2011) 29:149-153 を参照のこと。TALEN における使用に向けて FokI に対する幾つかの変異が作製されており、これらは、例えば、切断特異性または活性を改善する。Cermak et al., Nucleic Acids Res. (2011) 39:e82、Miller et al., Nature Biotech. (2011) 29:143-148、Hockemeyer et al., Nature Biotech. (2011) 29:731-734、Wood et al., Science (2011) 333:307、Doyon et al., Nature Methods (2010) 8:74-79、Szczepiek et al., Nature Biotech (2007) 25:786-793、Guo et al., J. Mol. Biol. (2010) 200:96 を参照のこと。FokI ドメインは、二量体として機能し、適切な配置及び間隔を有する標的ゲノム部位に対する固有の DNA 結合ドメインを有する 2 つの構築物を必要とする。TALE DNA 結合ドメインと FokI エンドヌクレアーゼドメインとの間のアミノ酸残基の数、及び 2 つの個々の TALEN 結合部位間の塩基の数の両方が、高レベルの活性を達成するのに重要なパラメータであるようである。Miller et al., Nature Biotech. (2011) 29:143-148。

【0273】

遺伝子操作された TALE リピートをヌクレアーゼドメインと組み合わせることにより、任意の所望の DNA 配列に特異的な部位特異的なヌクレアーゼを作製され得る。ZFN と同様に、TALEN は、ゲノム内の所望の標的部位で DSB を生じさせるために細胞に導入され得るため、同様の HDR により媒介される経路で遺伝子をノックアウトまたは変異をノックインするために使用され得る。Boch, Nature Biotech. (2011) 29:135-136、Boch et al., Science (2009) 326:1509-1512、Moscou et al.,

10

20

30

40

50

Science (2009) 326:3501を参照のこと。

【0274】

メガヌクレアーゼは、大きなDNA配列(14~40塩基対)を認識し、それを切断する能力を特徴とするエンドヌクレアーゼファミリーの配列特異的酵素である(Chevalier, B. S. and B. L. Stoddard, Nucleic Acids Res., 2001, 29, 3757-3774)。それらは、生細胞内の特異な部位を切断することができ、これにより、切断部位の近くへの遺伝子標的化を1000倍以上増強する(Puchta et al., Nucleic Acids Res., 1993, 21, 5034-5040、Rouet et al., Mol. Cell. Biol., 1994, 14, 8096-8106、Choulika et al., Mol. Cell. Biol., 1995, 15, 1968-1973、Puchta et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 5055-5060、Sargent et al., Mol. Cell. Biol., 1997, 17, 267-77、Donoho et al., Mol. Cell. Biol., 1998, 18, 4070-4078、Elliot et al., Mol. Cell. Biol., 1998, 18, 93-101、Cohen-Tannoudji et al., Mol. Cell. Biol., 1998, 18, 1444-1448)。

10

【0275】

メガヌクレアーゼは、ヌクレアーゼ活性及び／またはDNA認識に影響を及ぼすそれらの構造モチーフに基づいてファミリーに分類される。最も広範囲かつ最もよく知られているメガヌクレアーゼは、LAGLIDADGファミリーのタンパク質であり、それらの名称は保存されたアミノ酸配列に由来する。Chevalier et al., Nucleic Acids Res. (2001) 29(18):3757-3774を参照のこと。一方で、GIY-YIGファミリーメンバーは、70~100残基の長さであるGIY-YIGモジュールを有し、4つの不変残基を有する4または5つの保存された配列モチーフを含み、そのうちの2つが活性に必要とされる。Van Roey et al., Nature Struct. Biol. (2002) 9:806-811を参照のこと。His-Cysファミリーメガヌクレアーゼは、数百のアミノ酸残基を包含する領域にわたる高度に保存されたヒスチジン及びシステインの配列を特徴とする。Chevalier et al., Nucleic Acids Res. (2001) 29(18):3757-3774を参照のこと。NHNファミリーのメンバーは、アスパラギン残基によって囲まれた2対の保存されたヒスチジンを含有するモチーフによって定義される。Chevalier et al., Nucleic Acids Res. (2001) 29(18):3757-3774を参照のこと。

20

30

【0276】

高い特異性が要求されることに起因して、特定の標的DNA配列のための天然メガヌクレアーゼを同定する可能性は低いため、変異誘発及びハイスループットスクリーニング法を含む様々な方法が、ユニーク配列を認識するメガヌクレアーゼバリエーションを作製するために使用されてきた。例えば、所定の核酸配列に結合するようにDNA結合特異性が変化したメガヌクレアーゼを開発するための戦略は、当技術分野において公知である。例えば、Chevalier et al., Mol. Cell. (2002) 10:895-905、Epinat et al., Nucleic Acids Res (2003) 31:2952-2962、Silva et al., J Mol. Biol. (2006) 361:744-754、Seligman et al., Nucleic Acids Res (2002) 30:3870-3879、Sussman et al., J Mol Biol (2004) 342:31-41、Doyon et al., J Am Chem Soc (2006) 128:2477-2484、Chen et al., Protein Eng Des Sel (2009) 22:249-256、Arnould et al., J Mol Biol. (200

40

50

6) 355:443-458、Smith et al., Nucleic Acids Res. (2006) 363(2):283-294を参照のこと。

【0277】

ZFN及びTALENと同様に、メガヌクレアーゼは、ゲノムDNAにDSBを生じさせることができ、これは、例えば、NHEJにより不適当に修復される場合にフレームシフト変異を生じさせ得、これにより、細胞における標的遺伝子の発現の減少をもたらす。代替的に、外来DNAがメガヌクレアーゼと共に細胞に導入され得る。外来DNAの配列及び染色体配列に応じて、このプロセスは、標的遺伝子を改変するために使用され得る。Silva et al., Current Gene Therapy (2011) 11:11-27を参照のこと。

10

【0278】

トランスポザーゼは、トランスポゾンの末端に結合し、カット&ペーストメカニズムまたは複製的転移メカニズムによりゲノムの別の部分へのその移動を触媒する酵素である。トランスポザーゼを他のシステム、例えば、CRISPR/Casシステムに連結させることにより、ゲノムDNAの部位特異的挿入または操作を可能にするための新たな遺伝子編集ツールが開発され得る。トランスポゾンを使用する2つの公知のDNA組み込み方法が存在し、これらは触媒活性のないCasエフェクタータンパク質及びTn7様トランスポゾンを使用する。トランスポザーゼ依存的DNA組み込みは、ゲノムにDSBを誘発せず、このことは、より安全かつより特異的なDNA組み込みを保証し得る。

20

【0279】

CRISPRシステムは、侵入したファージ及びプラスミドに対する防御に関与する、獲得免疫の一形態を提供するシステムとして原核生物（例えば、細菌及び古細菌）において最初に発見された。現在では、研究及び臨床用途において一般的な遺伝子編集ツールとして応用及び使用されている。

【0280】

CRISPR/Casシステムは、通常、以下の少なくとも2つの構成要素を含む：1種以上のガイドRNA (gRNA) 及びCasタンパク質。Casタンパク質は、標的部位にDSBを導入するヌクレアーゼである。CRISPR-Casシステムは、2つの主要なクラスに分類され、クラス1システムは、核酸を分解するために複数のCasタンパク質の複合体を使用し、クラス2システムは、同じ目的のために単一の大きなCasタンパク質を使用する。クラス1は、I型、III型、及びIV型に分類され、クラス2は、II型、V型、及びVI型に分類される。遺伝子編集用途に適した種々のCasタンパク質としては、限定されるものではないが、Cas3、Cas4、Cas5、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a (Cpf1)、Cas12b (C2c1)、Cas12c (C2c3)、Cas12d (CasY)、Cas12e (CasX)、Cas12f (C2c10)、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k (C2c5)、Cas13、Cas13a (C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr5、Cse1、Cse2、Csf1、Csm2、Csn2、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3、及びMad7が挙げられる。最も広く使用されているCas9は、例示として本明細書に記載されている。これらのCasタンパク質は、異なる供給源種に由来し得る。例えば、Cas9は、S. pyogenesまたはS. aureusに由来し得る。

30

40

【0281】

元の微生物ゲノムにおいて、II型CRISPRシステムは、宿主ゲノム内でアレイとしてコードされるCRISPRリピート配列の間に侵入したDNA由来の配列を組み込んでいる。CRISPRリピートアレイからの転写物は、侵入したDNAから転写された「プロトスペーサー」配列として公知の可変配列、及びCRISPRリピートの一部を各々が保有するCRISPR RNA (crRNA) へとプロセッシングされる。各crRNAは、第2のトランス活性化CRISPR RNA (tracrRNA) とハイブリダイズ

50

し、これらの2つのRNAは、Cas9ヌクレアーゼと複合体を形成する。crRNAのプロトスペーサーによりコードされる部分は、相補的な標的DNA配列を切断するようにCas9複合体を誘導するが、ただし、相補的な標的DNA配列は、「プロトスペーサー隣接モチーフ」(PAM)として公知の短い配列に隣接している。

【0282】

その発見以来、CRISPRシステムは、細菌からヒト細胞を含め真核細胞にわたる広範囲の細胞及び生物において配列特異的DSB及び標的ゲノム編集を誘発するために応用されてきた。遺伝子編集用途でのその使用において、人工的に設計された合成gRNAが、本来のcrRNA:tracrRNA複合体と置き換わっている。例えば、gRNAは、crRNA、テトラループ、及びtracrRNAから構成されるシングルガイドRNA(sgRNA)であり得る。crRNAは、通常、関心対象の標的DNAを認識するように使用者が設計した相補的領域(スペーサーとも称され、通常は約20ヌクレオチドの長さである)を含む。tracrRNA配列は、Casヌクレアーゼ結合のための足場領域を含む。crRNA配列及びtracrRNA配列は、テトラループにより連結されており、各々が互いにハイブリダイゼーションするための短いリピート配列を有し、これにより、キメラsgRNAが生成される。gRNAに存在するスペーサーまたは相補的領域配列を単純に変更することによりCasヌクレアーゼのゲノム標的を変更することができる。相補的領域は、標準的なRNA-DNA相補的塩基対形成則によりCasヌクレアーゼを標的DNA部位に誘導する。

【0283】

Casヌクレアーゼが機能するためには、ゲノムDNAの標的配列のすぐ下流にPAMが存在しなければならない。Casタンパク質によるPAMの認識は、隣接するゲノム配列を不安定化し、これにより、gRNAによる配列の調査を可能にし、一致する配列が存在する場合にgRNA-DNA対合をもたらすと考えられている。PAMの具体的な配列は、Cas遺伝子の種に応じて異なる。例えば、S.pyogenesに由来する最も一般的に使用されるCas9ヌクレアーゼは、5'-NGG-3'のPAM配列、またはより効率の低い速度で5'-NAG-3'のPAM配列を認識し、ここで、「N」は任意のヌクレオチドであり得る。代替的PAMを有する他のCasヌクレアーゼバリエーションも特徴付けられ、ゲノム編集に成功裏に使用されており、それらを以下の表4に要約する。

【表4】

表4. 例示的なCasヌクレアーゼバリエーション及びそれらのPAM配列

CRISPRヌクレアーゼ	供給源生物	PAM配列 (5' → 3')
SpCas9	<i>Streptococcus pyogenes</i>	NGGまたはNAG
SaCas9	<i>Staphylococcus aureus</i>	NGRRTまたはNGRRN
NmeCas9	<i>Neisseria meningitidis</i>	NNNGATT
CjCas9	<i>Campylobacter jejuni</i>	NNNNRYAC
StCas9	<i>Streptococcus thermophilus</i>	NNAGAAW
TdCas9	<i>Treponema denticola</i>	NAAAAC
LbCas12a (Cpf1)	<i>Lachnospiraceae bacterium</i>	TTTV
AsCas12a (Cpf1)	<i>Acidaminococcus sp.</i>	TTTV
AacCas12b	<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	TTN
BhCas12b v4	<i>Bacillus hisashii</i>	ATTN、TTTN、またはGTTN

R=AまたはG; Y=CまたはT; W=AまたはT; V=AまたはCまたはG; N=任意の塩基

【0284】

幾つかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、それらの活性、特異性、認識、及び/または他の特徴を変化させるための1つ以上の変異を含み得る。例えば、Casヌクレアーゼは、オフターゲット効果を軽減するためにその忠実度を変化させる1つ以上の変異を

有し得る（例えば、SpCas9のeSpCas9、SpCas9-HF1、HypasCas9、HeFSpCas9、及びevoSpCas9高忠実度バリエーション）。別の例では、Casヌクレアーゼは、そのPAM特異性を変化させる1つ以上の変異を有し得る。

【0285】

Casヌクレアーゼ、特にCas9ヌクレアーゼのヌクレアーゼドメインは、DNA「ニッカーゼ」と称される酵素を作製するために独立して変異され得る。ニッカーゼは、例えば、CRISPR/Cas9が含まれる、通常のCRISPR/Casヌクレアーゼシステムと同じ特異性で一本鎖切断を導入することができる。ニッカーゼは、二本鎖切断を生成するために用いられ得、遺伝子編集システムに有用であり得る（Mali et al., Nat Biotech, 31 (9): 833-838 (2013)、Mali et al. Nature Methods, 10: 957-963 (2013)、Mali et al., Science, 339 (6121): 823-826 (2013)）。幾つかの例では、2つのCasニッカーゼが使用される場合、平滑末端の代わりに切断末端の各々に長いオーバーハングが生成され、このことが正確な遺伝子組み込み及び挿入の更なる制御を可能にする（Mali et al., Nat Biotech, 31 (9): 833-838 (2013)、Mali et al. Nature Methods, 10: 957-963 (2013)、Mali et al., Science, 339 (6121): 823-826 (2013)）。両方のニッキングCas酵素が、それらの標的DNAに効果的に切れ目を入れなければならないため、対になったニッカーゼは、二本鎖を切断するCasベースのシステムと比較してより少ないオフターゲット効果を示し得る（Ran et al., Cell, 155 (2): 479-480 (2013)、Mali et al., Nat Biotech, 31 (9): 833-838 (2013)、Mali et al. Nature Methods, 10: 957-963 (2013)、Mali et al., Science, 339 (6121): 823-826 (2013)）。

【0286】

CRISPR/Casシステムが細胞内の標的ポリヌクレオチド配列を変化させるのを可能にするかかCasタンパク質の分子機構は、RNA結合タンパク質、エンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼ、ヘリカーゼ、ならびにポリメラーゼを含む。幾つかの実施形態では、CRISPR/Casシステムは、Casタンパク質、及び標的ポリヌクレオチド配列の標的モチーフにCasタンパク質を誘導し、それにハイブリダイズすることができる少なくとも1〜2種のリボ核酸を含む。本明細書で使用する場合、「タンパク質」及び「ポリペプチド」は、ペプチド結合により連結された一連のアミノ酸残基（すなわち、アミノ酸のポリマー）を指すために互換的に使用され、修飾アミノ酸（例えば、リン酸化、糖化、グリコシル化など）及びアミノ酸アナログを含む。例示的なポリペプチドまたはタンパク質としては、遺伝子産物、天然に存在するタンパク質、上記のホモログ、パラログ、断片及び他の等価物、バリエーション、ならびにアナログが挙げられる。

【0287】

幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、1つ以上のアミノ酸置換または修飾を含む。幾つかの実施形態では、1つ以上アミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換を含む。幾つかの例では、置換及び／または修飾は、細胞内でのポリペプチドのタンパク質分解を予防もしくは低減することができ、及び／またはその半減期を延長することができる。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、ペプチド結合置換（例えば、尿素、チオ尿素、カルバメート、スルホニル尿素など）を含み得る。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、天然に存在するアミノ酸を含み得る。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、代替アミノ酸（例えば、D-アミノ酸、β-アミノ酸、ホモシステイン、ホスホセリンなど）を含み得る。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、部分を含ませるための修飾を含み得る（例えば、PEG化、グリコシル化、脂質化、アセチル化、末端キャップ形成など）。

【0288】

幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、コアCasタンパク質、そのアイソフォーム、または任意のCasタンパク質もしくはそのアイソフォームと同様の機能もしくは活性を有する任意のCas様タンパク質を含む。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、コアCasタンパク質を含む。例示的なCasコアタンパク質としては、限定されるものではないが、Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、及びCas9が挙げられる。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、V型Casタンパク質を含む。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、E.coliサブタイプのCasタンパク質(CASS2としても公知)を含む。例示的なE.coliサブタイプのCasタンパク質としては、限定されるものではないが、Cse1、Cse2、Cse3、Cse4、及びCas5eが挙げられる。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、YpestサブタイプのCasタンパク質(CASS3としても公知)を含む。例示的なYpestサブタイプのCasタンパク質としては、限定されるものではないが、Csy1、Csy2、Csy3、及びCsy4が挙げられる。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、NmeniサブタイプのCasタンパク質(CASS4としても公知)を含む。例示的なNmeniサブタイプのCasタンパク質としては、限定されるものではないが、Csn1及びCsn2が挙げられる。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、DvulgサブタイプのCasタンパク質(CASS1としても公知)を含む。例示的なDvulgサブタイプのCasタンパク質としては、Csd1、Csd2、及びCas5dが挙げられる。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、TneapサブタイプのCasタンパク質(CASS7としても公知)を含む。例示的なTneapサブタイプのCasタンパク質としては、限定されるものではないが、Cst1、Cst2、Cas5tが挙げられる。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、HmariサブタイプのCasタンパク質を含む。Hmariサブタイプの例示的なCasタンパク質としては、限定されるものではないが、Csh1、Csh2、及びCas5hが挙げられる。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、ApernサブタイプのCasタンパク質(CASS5としても公知)を含む。例示的なApernサブタイプのCasタンパク質としては、限定されるものではないが、Csa1、Csa2、Csa3、Csa4、Csa5、及びCas5aが挙げられる。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、MtubeサブタイプのCasタンパク質(CASS6としても公知)を含む。例示的なMtubeサブタイプのCasタンパク質としては、限定されるものではないが、Csm1、Csm2、Csm3、Csm4、及びCsm5が挙げられる。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、RAMPモジュールCasタンパク質を含む。例示的なRAMPモジュールCasタンパク質としては、限定されるものではないが、Cmr1、Cmr2、Cmr3、Cmr4、Cmr5、及びCmr6が挙げられる。例えば、Klompe et al., Nature 571, 219-225 (2019)、Strecker et al., Science 365, 48-53 (2019)を参照のこと。Casタンパク質の例としては、限定されるものではないが、以下が挙げられる：Cas3、Cas8a、Cas5、Cas8b、Cas8c、Cas10d、Cse1、Cse2、Csy1、Csy2、Csy3、及び／またはGSU0054。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、Cas3、Cas8a、Cas5、Cas8b、Cas8c、Cas10d、Cse1、Cse2、Csy1、Csy2、Csy3、及び／またはGSU0054を含む。Casタンパク質の例としては、限定されるものではないが、以下が挙げられる：Cas9、Csn2、及び／またはCas4。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、Cas9、Csn2、及び／またはCas4を含む。幾つかの実施形態では、Casタンパク質の例としては、限定されるものではないが、Cas10、Csm2、Cmr5、Cas10、Csx11、及び／またはCsx10が挙げられる。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、Cas10、Csm2、Cmr5、Cas10、Csx11、及び／またはCsx10を含む。幾つかの実施形態では、Casタンパク質の例としては、限定されるものではないが、Csf1が挙げられる。幾つ

10

20

30

40

50

かの実施形態では、Casタンパク質は、Cs f 1を含む。幾つかの実施形態では、Casタンパク質の例としては、限定されるものではないが、Cas 12 a、Cas 12 b、Cas 12 c、C 2 c 4、C 2 c 8、C 2 c 5、C 2 c 10、及びC 2 c 9、ならびにCas X (Cas 12 e) 及びCas Y (Cas 12 d) が挙げられる。例えば、Koonin et al., Curr Opin Microbiol. 2017; 37: 67-78: “Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems” も参照のこと。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、Cas 12 a、Cas 12 b、Cas 12 c、Cas 12 d、Cas 12 e、Cas 12 d、及び／またはCas 12 eを含む。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、Cas 13、Cas 13 a、C 2 c 2、Cas 13 b、Cas 13 c、及び／またはCas 13 dを含む。幾つかの実施形態では、CRISPR/Casシステムは、以下からなる群から選択されるCasエフェクタータンパク質を含む：a) Cas 3、Cas 8 a、Cas 5、Cas 8 b、Cas 8 c、Cas 10 d、Cse 1、Cse 2、Csy 1、Csy 2、Csy 3、及びGSU0054；b) Cas 9、Csn 2、及びCas 4；c) Cas 10、Csm 2、Cmr 5、Cas 10、Csx 11、及びCsx 10；d) Cs f 1；e) Cas 12 a、Cas 12 b、Cas 12 c、C 2 c 4、C 2 c 8、C 2 c 5、C 2 c 10、C 2 c 9、Cas X (Cas 12 e)、及びCas Y (Cas 12 d)；ならびにf) Cas 13、Cas 13 a、C 2 c 2、Cas 13 b、Cas 13 c、及びCas 13 d。

10

20

30

40

50

【0289】

幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、本明細書に記載されるCasタンパク質またはその機能部分のいずれかを含む。本明細書で使用する場合、「機能部分」は、少なくとも1種のリボ核酸（例えば、ガイドRNA (gRNA)）と複合体を形成し、標的ポリヌクレオチド配列を切断するペプチドの能力を保持しているそのペプチドの一部を指す。幾つかの実施形態では、機能部分は、DNA結合ドメイン、少なくとも1つのRNA結合ドメイン、ヘリカーゼドメイン、及びエンドヌクレアーゼドメインからなる群から選択される作動可能に連結されたCas 9タンパク質機能ドメインの組み合わせを含む。幾つかの実施形態では、機能部分は、DNA結合ドメイン、少なくとも1つのRNA結合ドメイン、ヘリカーゼドメイン、及びエンドヌクレアーゼドメインからなる群から選択される作動可能に連結されたCas 12 a (Cpf 1としても公知) タンパク質機能ドメインの組み合わせを含む。幾つかの実施形態では、機能ドメインは、複合体を形成する。幾つかの実施形態では、Cas 9タンパク質の機能部分は、RuvC様ドメインの機能部分を含む。幾つかの実施形態では、Cas 9タンパク質の機能部分は、HNHヌクレアーゼドメインの機能部分を含む。幾つかの実施形態では、Cas 12 aタンパク質の機能部分は、RuvC様ドメインの機能部分を含む。

【0290】

幾つかの実施形態では、外来性Casタンパク質は、ポリペプチド形態で細胞に導入され得る。ある特定の実施形態では、Casタンパク質は、細胞膜透過性ポリペプチドまたは細胞貫通ペプチドとコンジュゲートまたは融合され得る。本明細書で使用する場合、「細胞膜透過性ポリペプチド」及び「細胞貫通ペプチド」は、それぞれ、細胞内への分子の取り込みを促進するポリペプチドまたはペプチドを指す。細胞膜透過性ポリペプチドは、検出可能な標識を含有し得る。

【0291】

多数の実施形態では、Casタンパク質は、荷電したタンパク質（例えば、正電荷、負電荷、または全体として中性電荷を有するもの）とコンジュゲートまたは融合され得る。かかる結合は共有結合であり得る。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、Casタンパク質が細胞を透過する能力を顕著に増強するために、正に超荷電したGFPと融合され得る (Cronican et al., ACS Chem Biol. 2010; 5 (8): 747-52)。ある特定の実施形態では、Casタンパク質は、Casタンパク質の細胞への進入を促進するために、タンパク質導入ドメイン (PTD) と融合さ

れ得る。例示的なPTDとしては、Tat、オリゴアルギニン、及びペネトラチンが挙げられる。幾つかの実施形態では、Cas9タンパク質は、細胞貫通ペプチドに融合されたCas9ポリペプチドを含む。幾つかの実施形態では、Cas9タンパク質は、PTDに融合されたCas9ポリペプチドを含む。幾つかの実施形態では、Cas9タンパク質は、Tatドメインに融合されたCas9ポリペプチドを含む。幾つかの実施形態では、Cas9タンパク質は、オリゴアルギニンドメインに融合されたCas9ポリペプチドを含む。幾つかの実施形態では、Cas9タンパク質は、ペネトラチンドメインに融合されたCas9ポリペプチドを含む。幾つかの実施形態では、Cas9タンパク質は、正に超荷電したGFPに融合されたCas9ポリペプチドを含む。幾つかの実施形態では、Cas12aタンパク質は、細胞貫通ペプチドに融合されたCas12aポリペプチドを含む。幾つかの実施形態では、Cas12aタンパク質は、PTDに融合されたCas12aポリペプチドを含む。幾つかの実施形態では、Cas12aタンパク質は、tatドメインに融合されたCas12aポリペプチドを含む。幾つかの実施形態では、Cas12aタンパク質は、オリゴアルギニンドメインに融合されたCas12aポリペプチドを含む。幾つかの実施形態では、Cas12aタンパク質は、ペネトラチンドメインに融合されたCas12aポリペプチドを含む。幾つかの実施形態では、Cas12aタンパク質は、正に超荷電したGFPに融合されたCas12aポリペプチドを含む。

10

【0292】

幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、Casタンパク質をコードする核酸の形態で標的ポリヌクレオチド配列を含有する細胞に導入され得る。核酸を細胞に導入するプロセスは、任意の好適な技術により達成され得る。好適な技術としては、本明細書に記載されるものが挙げられる。

20

【0293】

幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、1～2つのリボ核酸と複合体を形成している。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、2つのリボ核酸と複合体を形成している。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、1つのリボ核酸と複合体を形成している。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、本明細書に記載されるような修飾核酸（例えば、合成修飾mRNA）によりコードされる。

【0294】

本開示の方法は、標的ポリヌクレオチド配列の標的モチーフにCasタンパク質を誘導し、それにハイブリダイズすることができる任意のリボ核酸の使用を意図する。幾つかの実施形態では、リボ核酸のうちの少なくとも1種は、tracrRNAを含む。幾つかの実施形態では、リボ核酸のうちの少なくとも1種は、CRISPR RNA (crRNA) を含む。幾つかの実施形態では、単一のリボ核酸が、細胞内の標的ポリヌクレオチド配列の標的モチーフにCasタンパク質を誘導し、それにハイブリダイズするガイドRNAを含む。幾つかの実施形態では、リボ核酸のうちの少なくとも1種が、細胞内の標的ポリヌクレオチド配列の標的モチーフにCasタンパク質を誘導し、それにハイブリダイズするガイドRNAを含む。幾つかの実施形態では、1～2種のリボ核酸の両方が、細胞内の標的ポリヌクレオチド配列の標的モチーフにCasタンパク質を誘導し、それにハイブリダイズするガイドRNAを含む。当業者によって理解されるように、本開示のリボ核酸は、用いられる特定のCRISPR/Casシステム及び標的ポリヌクレオチドの配列に応じて、種々の異なる標的モチーフにハイブリダイズするように選択され得る。また1～2種のリボ核酸は、標的ポリヌクレオチド配列以外の核酸配列とのハイブリダイゼーションを最小限にするように選択され得る。幾つかの実施形態では、1～2種のリボ核酸は、細胞内の他の全てのゲノムヌクレオチド配列と比較した場合に少なくとも2つのミスマッチを有する標的モチーフにハイブリダイズする。幾つかの実施形態では、1～2種のリボ核酸は、細胞内の他の全てのゲノムヌクレオチド配列と比較した場合に少なくとも1つのミスマッチを有する標的モチーフにハイブリダイズする。幾つかの実施形態では、1～2種のリボ核酸は、Casタンパク質により認識されるデオキシリボ核酸モチーフに直接隣接する標的モチーフにハイブリダイズするように設計される。幾つかの実施形態では、1～2

30

40

50

種のリボ核酸の各々は、C a s タンパク質により認識されるデオキシリボ核酸モチーフに直接隣接する標的モチーフにハイブリダイズするように設計され、当該デオキシリボ核酸モチーフは、当該標的モチーフの間に存在する変異アレルに隣接する。

【0295】

幾つかの実施形態では、1～2種のリボ核酸の各々は、細胞内の標的ポリヌクレオチド配列の標的モチーフにC a s タンパク質を誘導し、それにハイブリダイズするガイドRNAを含む。

【0296】

幾つかの実施形態では、1または2種のリボ核酸（例えば、ガイドRNA）は、標的ポリヌクレオチド配列の同じ鎖上の配列に相補的であり、及び／またはそれにハイブリダイズする。幾つかの実施形態では、1または2種のリボ核酸（例えば、ガイドRNA）は、標的ポリヌクレオチド配列の対向する鎖上の配列に相補的であり、及び／またはそれにハイブリダイズする。幾つかの実施形態では、1または2種のリボ核酸（例えば、ガイドRNA）は、標的ポリヌクレオチド配列の対向する鎖上の配列に相補的ではなく、及び／またはそれにハイブリダイズしない。幾つかの実施形態では、1または2種のリボ核酸（例えば、ガイドRNA）は、標的ポリヌクレオチド配列の重複する標的モチーフに相補的であり、及び／またはそれにハイブリダイズする。幾つかの実施形態では、1または2種のリボ核酸（例えば、ガイドRNA）は、標的ポリヌクレオチド配列のオフセットをもつ標的モチーフに相補的であり、及び／またはそれにハイブリダイズする。

【0297】

V I I I . 遺伝子操作されたC D 4 7 タンパク質を発現させる方法

本明細書において提供される遺伝子操作されたC D 4 7 タンパク質は、インビボ及びインビトロでの方法が含まれる、当業者に公知の任意の方法により産生され得る。目的のタンパク質は、必要な量及び形態のタンパク質を産生させるのに適した任意の生物で発現され得る。発現宿主としては、原核生物及び真核生物、例えば、E . c o l i、酵母、植物、昆虫細胞、ヒト細胞株及びトランスジェニック動物が含まれる、哺乳動物細胞が挙げられる。発現宿主は、それらのタンパク質産生のレベル及び発現されるタンパク質に存在する翻訳後修飾の種類が異なり得る。発現宿主の選択は、これら及び他の要因、例えば、調節性及び安全性の考慮、産生のコスト、ならびに精製の必要性及び方法に基づいてなされ得る。

【0298】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子操作されたC D 4 7 タンパク質をコードするポリヌクレオチドの細胞への導入は、任意の好適な技術により達成され得る。好適な技術としては、本明細書において述べるように、リン酸カルシウム、脂質により媒介される形質移入、エレクトロポレーション、フソゲン、及びウイルスベクターを使用した形質導入または感染が挙げられる。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、ウイルス形質導入により細胞に導入されるか（例えば、AAV形質導入、レンチウイルス形質導入）、またはそうでなければウイルスベクターで送達される（例えば、フソゲンにより媒介される送達）。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、フソゲンにより媒介される送達、または条件付きもしくは誘導性条件的トランスポザーゼ、コンディショナルもしくは誘導性P i g g y B a c トランスポゾン、コンディショナルもしくは誘導性S l e e p i n g B e a u t y (S B 1 1) トランスポゾン、コンディショナルもしくは誘導性M o s 1 トランスポゾン、及びコンディショナルもしくは誘導性T o l 2 トランスポゾンからなる群から選択されるトランスポザーゼシステムにより細胞に導入される。

【0299】

多数の発現ベクターが利用可能であり、当業者に公知であり、タンパク質の発現のために使用され得る。発現ベクターの選択は、宿主発現系の選択による影響を受ける。一般に、発現ベクターは、転写プロモーター及び任意にエンハンサー、翻訳シグナル、ならびに転写及び翻訳終結シグナルを含むことができる。安定形質転換に使用される発現ベクターは、通常、形質転換した細胞の選択及び維持を可能にする選択可能なマーカーを有する。

幾つかの例では、ベクターのコピー数を増幅するために、複製開始点を使用され得る。

【0300】

発現ベクターは、例えば、形質転換、形質移入、形質導入、感染、エレクトロポレーション、及びソノポレーションにより宿主細胞に導入され得る。当業者は、宿主細胞に発現ベクターを導入するのに適した方法及び条件を選択することができる。

【0301】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、例えば、ベクターを用いたウイルス形質導入を使用して送達される。幾つかの実施形態では、ベクターは、外来性ポリヌクレオチドを保有する偽型化された自己不活性化レンチウイルスベクターである。幾つかの実施形態では、ベクターは、水疱性口内炎VSV-Gエンベロープで偽型化された、外来性ポリヌクレオチドを保有する自己不活性化レンチウイルスベクターである。

10

【0302】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、1つ以上の遺伝子編集システムを使用して送達される。幾つかの実施形態では、遺伝子編集システムは、CRISPR/Casである。幾つかの実施形態では、遺伝子編集システムは、TALENを含む。幾つかの実施形態では、遺伝子編集システムは、ジンクフィンガーヌクレアーゼを含む。幾つかの実施形態では、遺伝子編集システムは、メガヌクレアーゼを含む。

【0303】

選択マーカを含むベクターの導入後、細胞は、選択培地に移される前に、強化培地で1～2日間増殖させられ得る。選択マーカの目的は、選択に対する耐性を付与することであり、その存在は、導入された配列を正常に発現する細胞の増殖及び回収を可能にする。安定的に形質転換した細胞の耐性クローンは、細胞種に適した組織培養技術を使用して増殖させられ得る。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、哺乳動物発現系で発現される。発現構築物は、ウイルス感染、例えば、アデノウイルス構築物により、またはDNAの直接導入、例えば、リポソーム、リン酸カルシウム、DEAE-デキストランにより、及び物理的手段、例えば、エレクトロポレーション及びマイクロインジェクションにより哺乳動物細胞に導入され得る。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、例えば、ベクターを用いたウイルス形質導入を使用して送達される。幾つかの実施形態では、ベクターは、外来性ポリヌクレオチドを保有する偽型化された自己不活性化レンチウイルスベクターである。幾つかの実施形態では、ベクターは、水疱性口内炎VSV-Gエンベロープで偽型化された、外来性ポリヌクレオチドを保有する自己不活性化レンチウイルスベクターである。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたCD47タンパク質は、1つ以上の遺伝子編集システムを使用して送達される。幾つかの実施形態では、遺伝子編集システムは、CRISPR/Casである。幾つかの実施形態では、遺伝子編集システムは、TALENを含む。幾つかの実施形態では、遺伝子編集システムは、ジンクフィンガーヌクレアーゼを含む。幾つかの実施形態では、遺伝子編集システムは、メガヌクレアーゼを含む。

20

30

【0304】

幾つかの実施形態では、本開示の文脈において使用される発現系は、米国出願第63/270,454号に開示されている。

40

【0305】

哺乳動物細胞での発現ベクターは、通常、mRNAキャップ部位、TATAボックス、翻訳開始配列(kozakコンセンサス配列)、及びポリアデニル化エレメントを含む。選択マーカなどの別の遺伝子とのバイストロン性発現を可能にするために、IRESエレメントも追加され得る。かかるベクターは、多くの場合、高レベル発現のための転写プロモーター-エンハンサー、例えば、SV40プロモーター-エンハンサー、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、及びラウス肉腫ウイルス(RSV)の末端反復配列を含む。これらのプロモーター-エンハンサーは、多数の細胞種において活性である。組織及び細胞種プロモーター及びエンハンサー領域も発現のために使用され得る。例

50

示的なプロモーター／エンハンサー領域としては、限定されるものではないが、エラスターゼⅠ、インスリン、免疫グロブリン、マウス乳癌ウイルス、アルブミン、 α フェトプロテイン、 α 1アンチトリプシン、 β グロビン、ミエリン塩基性タンパク、ミオシン軽鎖2、及び性腺刺激ホルモン放出ホルモン遺伝子制御などの遺伝子由来のものが挙げられる。選択マーカーは、発現構築物を有する細胞を選択し、維持するために使用され得る。選択マーカー遺伝子の例としては、限定されるものではないが、ヒグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ、アデノシンデアミナーゼ、キサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）、及びチミジンキナーゼが挙げられる。例えば、発現は、DHFR遺伝子を発現する細胞のみを選択するために、メトトレキサートの存在下で実行され得る。

10

【0306】

ベクターが適切な宿主細胞に取り込まれたら、宿主細胞は、取り込まれたポリヌクレオチドによりコードされる遺伝子操作されたCD47タンパク質の発現に適した条件下で維持される。当業者は、遺伝子操作されたCD47タンパク質の発現に適した条件を選択することができる。

【0307】

IX. 他の特徴

細胞療法を作製する過程で、細胞療法製品に望ましいと考えられるある特定の改変が細胞に導入されることが理解されよう。ドナーの能力についてプロファイリングされる細胞は、編集された細胞または未編集の細胞であり得る。細胞のプロファイリングは、細胞編集の前または後に行われ得る。編集された細胞は、1種以上の改変、例えば、HIP改変（免疫回避を可能にする低免疫遺伝子改変）を含む。免疫抑制なしでインビボ移植される場合、HIP改変細胞は、MHCクラスⅠ及び／またはMHCクラスⅡ分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現を有し、これにより、全身性免疫応答の証拠が存在しなくてもよく、例えば、T細胞活性化、抗体産生、またはNK細胞活性が起こらない。編集された細胞に関する開示は、本明細書において提供される。かかる開示は、本明細書に記載される方法、使用、及び細胞に適用可能である。本明細書において開示されるドナーの能力について細胞集団をプロファイリングするための方法は、本明細書に記載される多数の細胞種に有利である。幾つかの実施形態では、細胞は、T細胞（例えば、CAR-T細胞）である。

20

30

【0308】

遺伝子操作された細胞及び細胞を遺伝子操作する方法

細胞療法製品に望ましいと考えられる1つの改変は、遺伝子操作された細胞及びその集団が、MHCクラスⅠ及び／またはMHCクラスⅡ分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現を示すことである。細胞療法製品に望ましいと考えられる更なる改変は、遺伝子操作された細胞及びその集団が、少なくとも1種の免疫寛容誘導因子、例えば、本明細書に記載される免疫寛容誘導因子の増加した発現を示すことである。

【0309】

本明細書において、同種異系移植片に対する免疫系反応の効果を軽減及び／または回避するための方法及び組成物が提供される。細胞に由来する移植片及び／または組織移植片の免疫拒絶反応の問題を克服するために、任意の移植可能な細胞種の生存可能な供給源となる遺伝子操作された免疫回避細胞（例えば、遺伝子操作された初代低免疫原性細胞）、またはその集団もしくは医薬組成物が本明細書において開示される。本明細書において開示される遺伝子操作された細胞は、対象の遺伝的構成、あるいは1つ以上の以前の同種異系移植片に対する対象内での任意の既存の反応、以前の自家キメラ抗原受容体（CAR）T拒絶反応、及び／または導入遺伝子が発現される他の自家もしくは同種異系治療法にかかわらず、レシピエント対象の免疫系による認識の低減を提供する。遺伝子操作された細胞としては、としては、限定されるものではないが、 β 脾島細胞、B細胞、T細胞、NK細胞、網膜色素上皮細胞、グリア前駆細胞、内皮細胞、肝実質細胞、甲状腺細胞、皮膚細胞、及び血液細胞（例えば、形質細胞または血小板）が挙げられ得る。

40

50

【0310】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子操作された細胞は、1種以上の補体阻害因子の増加した発現及び／または過剰発現を更に含む。幾つかの実施形態では、1種以上の補体阻害因子は、CD46、CD59、及びDAF／CD55から選択される。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、2種以上の補体阻害因子の組み合わせの増加した発現、例えば、CD46及びCD59の増加した発現、またはCD46、CD59、及びCD55の増加した発現を含む。

【0311】

本明細書において提供される遺伝子操作された細胞は、免疫寛容誘導因子の発現を利用し、1種以上のMHCクラスI分子及び／または1種以上のMHCクラスII分子の発現（例えば、表面発現）も調節（例えば、低減または除去）し得る。幾つかの実施形態では、レアカットエンドヌクレアーゼ（例えば、CRISPR／Cas、TALEN、ジungkフィンガーヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、及びホーミングエンドヌクレアーゼシステム）を利用するゲノム編集技術も（例えば、重要な免疫遺伝子のゲノムDNAを欠失させることにより）ヒト細胞における重要な免疫遺伝子の発現を低減または除去するために使用される。ある特定の実施形態では、ゲノム編集技術または他の遺伝子調節技術が、ヒト細胞に免疫寛容を誘発する因子（免疫寛容誘導因子）（例えば、CD47）に挿入し、これにより、レシピエント対象への移植時に免疫認識を回避することができる遺伝子操作された細胞を作製するために使用される。従って、本明細書において提供される遺伝子操作された細胞は、1種以上のMHCクラスI分子及び／または1種以上のMHCクラスII分子に影響を及ぼす1種以上の遺伝子及び因子の調節された発現（例えば、低減または除去された発現）、免疫寛容誘導因子、例えば、CD47の調節された発現（例えば、低減または及び調節された発現（例えば、過剰発現））を示し、レシピエント対象の免疫系による認識の低減を提供する。幾つかの実施形態では、本明細書において提供される遺伝子操作された細胞は、CD142の調節された発現（例えば、低減された発現）を示す。幾つかの実施形態では、本明細書において提供される遺伝子操作された細胞は、CD46、CD59、及びDAF／CD55から選択される1種以上の補体阻害因子の調節された発現（例えば、増加した発現）を示す。

【0312】

幾つかの態様では、本明細書において提供される遺伝子操作された細胞は、低減された自然免疫細胞による拒絶反応及び／または適応免疫細胞による拒絶反応を示す（例えば、低免疫原性細胞）。例えば、幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、NK細胞媒介性溶解及び／またはマクロファージ貪食に対する低減された感受性を示す。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、免疫抑制剤をほとんどまたは全く必要とせずにレシピエント対象へと移植される普遍的に適合可能な細胞または組織（例えば、ユニバーサルドナー細胞または組織）の供給源として有用である。かかる低免疫原性細胞は、移植時に細胞特異的な特性及び特徴を保持する。

【0313】

また本明細書において、MHC不一致の同種異系レシピエントにおける免疫拒絶反応を回避する遺伝子操作された細胞（例えば、遺伝子操作された初代細胞）を投与することを含む障害を処置する方法も提供される。幾つかの実施形態では、本明細書に記載される方法のいずれかにより作製された遺伝子操作された細胞は、MHC不一致の同種異系レシピエントに繰り返し投与される（例えば、移植または移植される（transplanted or grafted））場合に、免疫拒絶反応を回避する。

【0314】

本明細書に記載される実施形態の実施は、特に反対の規定がない限り、当該技術分野の技術の範囲内である化学、生化学、有機化学、分子生物学、微生物学、組換えDNA技術、遺伝学、免疫学、及び細胞生物学の従来の方法を用い、それらのうちの多くが説明のために後述される。このような技術は、文献において詳細に説明されている。例えば、Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory

tory Manual (3rd Edition, 2001)、Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989)、Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982)、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, updated July 2008)、Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience、Glover, DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II (IRL Press, Oxford, 1985)、Anand, Techniques for the Analysis of Complex Genomes, (Academic Press, New York, 1992)、Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984)、Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984)、Harlow and Lane, Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1998) Current Protocols in Immunology Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, eds., 1991)、Annual Review of Immunology、及び学術誌、例えば、Advances in Immunologyにおける研究論文を参照のこと。

10

20

30

【0315】

本出願において引用される特許文献、科学論文、及びデータベースを含まれる、全ての刊行物は、各個別の刊行物が参照により個別に組み込まれたかのような程度まで、全ての目的のためにそれらの全体が参照により組み込まれる。本明細書に記載される定義が、参照により本明細書に組み込まれる特許、出願、公開された出願、及び他の刊行物に記載される定義に反するか、またはそれと矛盾する場合、本開示に記載される定義が、参照により本明細書に組み込まれる定義に優先する。

【0316】

本明細書において使用される見出しは、単に編成のためであり、記載される主題を限定するものとして解釈されるべきではない。当業者は、幾つかの実施形態が本開示の範囲及び趣旨の範囲内で可能であることを理解するであろう。以下の説明は、本開示を例示し、当然のことながら、本明細書に記載される意図する実施形態の範囲を如何様にも限定するものと解釈されるべきではない。

【0317】

本明細書において、1種以上の改変を含む遺伝子操作された細胞が記載される。幾つかの実施形態では、提供される遺伝子操作された細胞は、1種以上のMHCクラスI分子、1種以上のMHCクラスII分子、または1種以上のMHCクラスI分子及び1種以上のMHCクラスII分子の発現を調節する1種以上の標的ポリヌクレオチド配列の改変も含有する。

40

【0318】

幾つかの実施形態では、提供される遺伝子操作された細胞は、1種以上の免疫寛容誘導因子の発現を増加させるための改変も含む。幾つかの実施形態では、免疫寛容誘導因子は、A20/TNFAIP3、B2M-HLA-E、CD16、CD16 Fc受容体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、CD52、CD55、CD59、CD64、CD200、CCL21、CCL22、CTLA4-Ig、C1阻害因子、CR1、DUX4、FASL、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鎖、HLA

50

－F、HLA－G、H2－M3、IDO1、IL－10、IL15－RF、IL－35、IL－39、MANF、Mfge8、PD－L1、Serpnb9、またはそれらの任意の組み合わせのうちの1つ以上である。幾つかの実施形態では、1種以上の免疫寛容誘導因子の発現を増加させるための改変は、CD47の増加した発現であるか、またはそれを含む。幾つかの実施形態では、1種以上の免疫寛容誘導因子の発現を増加させるための改変は、PD－L1の増加した発現であるか、またはそれを含む。幾つかの実施形態では、1種以上の免疫寛容誘導因子の発現を増加させるための改変は、HLA－Eの増加した発現であるか、またはそれを含む。幾つかの実施形態では、1種以上の免疫寛容誘導因子の発現を増加させるための改変は、HLA－Gの増加した発現であるか、またはそれを含む。幾つかの実施形態では、1種以上の免疫寛容誘導因子の発現を増加させるための改変は、CCl21、PD－L1、FasL、Serpnb9、H2－M3（HLA－G）、CD47、CD200、及びMfge8の増加した発現であるか、またはそれを含む。

10

【0319】

幾つかの実施形態では、細胞は、1種以上のMHCクラスI分子の発現を低減する1種以上のゲノム改変、及びCD47の発現を増加させる改変を含む。換言すれば、遺伝子操作された細胞は、外来性CD47タンパク質を含み、1種以上のMHCクラスI分子の低減またはサイレンシングされた表面発現を示す。幾つかの実施形態では、細胞は、1種以上のMHCクラスII分子の発現を低減する1種以上のゲノム改変、及びCD47の発現を増加させる改変を含む。幾つかの例では、遺伝子操作された細胞は、外来性CD47核酸及びタンパク質を含み、1種以上のMHCクラスI分子の低減またはサイレンシングされた表面発現を示す。幾つかの実施形態では、細胞は、1種以上のMHCクラスII分子の発現を低減または除去する1種以上のゲノム改変、1種以上のMHCクラスII分子の発現を低減または除去する1種以上のゲノム改変、及びCD47の発現を増加させる改変を含む。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、外来性CD47タンパク質を含み、1種以上のMHCクラスI分子の低減またはサイレンシングされた表面発現を示し、1種以上のMHCクラスII分子の低減された表面発現を示すか、または1種以上のMHCクラスII分子の表面発現を欠く。多数の実施形態では、細胞は、B2Mインデル／インデル、CIITAインデル／インデル、CD47tg細胞である。

20

【0320】

幾つかの実施形態では、記載されるような1種以上の標的ポリヌクレオチドまたは標的タンパク質の発現を低減するために、遺伝子編集技術のいずれかが使用され得る。幾つかの実施形態では、遺伝子編集技術としては、ヌクレアーゼ、インテグラーゼ、トランスポザゼ、リコンビナーゼを含むシステムが挙げられ得る。幾つかの実施形態では、遺伝子編集技術は、遺伝子のノックアウトまたはノックダウンのために使用され得る。幾つかの実施形態では、遺伝子編集技術は、ゲノムの領域へのDNAのノックインまたは組込みのために使用され得る。幾つかの実施形態では、遺伝子編集技術は、一本鎖切断（SSB）をもたらす。幾つかの実施形態では、遺伝子編集技術は、非相同末端結合（NHEJ）または相同組換え修復（HDR）を伴うものが含まれる、二本鎖切断（DSB）をもたらす。幾つかの実施形態では、遺伝子編集技術は、DNAベースの編集またはプライム編集を含み得る。幾つかの実施形態では、遺伝子編集技術は、部位特異的標的化エレメントによるプログラム化可能な付加（PASTE）を含み得る。

30

40

【0321】

幾つかの実施形態では、遺伝子編集技術は、塩基編集を伴う。塩基エディター（BE）は、通常、Cas（「CRISPR関連」）ドメイン及び核酸塩基修飾ドメイン（例えば、天然または進化させたデアミナーゼ、例えば、APOBEC1（「アポリポタンパク質B mRNA編集酵素、触媒ポリペプチド1」）、CDA（「シチジンデアミナーゼ」）、及びAID（「活性化誘導シチジンデアミナーゼ」）が挙げられるシチジンデアミナーゼ）の融合物である。幾つかの例では、塩基エディターは、細胞内DNA修復過程を変化させて、得られる単一ヌクレオチド変化の効率及び／または安定性を増加させるタンパク質またはドメインも含み得る。

50

【0322】

幾つかの態様では、現在利用可能な塩基エディターとしては、標的C・GをT・Aに変換するシチジン塩基エディター（例えば、BE4）、及び標的A・TをG・Cに変換するアデニン塩基エディター（例えば、ABE7.10）が挙げられる。幾つかの態様では、Cas9により標的化される脱アミノ化は、二本鎖DNA切断を導入することなく塩基変化を誘発するように設計された塩基エディター（BE）システムと共に最初の実証された。更に、不活性化Cas9（dCas9）に融合されたラットデアミナーゼAPOBEC1（rAPOBEC1）が、sgRNAのPAMの上流でシチジンをチミンに成功裡に変換するために使用された。幾つかの態様では、この最初のBEシステムは、dCas9を、脱アミノ化シチジンの反対鎖にニックを入れる「ニッカーゼ」Cas9 D10Aに 10
変化させることにより最適化された。理論に拘束されるものではないが、これは、脱アミノ化された鎖を修復の鋳型にするために優先的に使用して、U:A塩基対を生じさせ、次いで、これがDNA複製時にT:Aに変換されるロングパッチ塩基除去修復（BER）を誘導すると予想される。

【0323】

幾つかの実施形態では、塩基エディターは、触媒活性のない第1のDNA結合タンパク質ドメイン、塩基編集活性を有するドメイン、及びニッカーゼ活性を有する第2のDNA結合タンパク質ドメインを含有する核酸塩基エディターであり、ここで、DNA結合タンパク質ドメインは、単一の融合タンパク質で発現されるか、または（例えば、別個の発現ベクターで）別々に発現される。幾つかの実施形態では、塩基エディターは、塩基編集活 20
性を有するドメイン（例えば、シチジンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼ）及び2つの核酸によりプログラム化可能なDNA結合タンパク質（napDNAbp）ドメインを含む融合タンパク質であり、第1のドメインがニッカーゼ活性を含み、第2のドメインが触媒活性のないnapDNAbpを含み、ここで、少なくとも当該2つのnapDNAbpは、リンカーにより連結されている。幾つかの実施形態では、塩基エディターは、ニッカーゼ活性を有するCRISPR-Cas（例えば、Cas9）のDNAドメイン（nCAs；nCAs9）、核酸によりプログラム化可能なDNA結合活性を有するCRISPR-Casタンパク質（例えば、Cas9）の触媒活性のないドメイン（dCas；例えば、dCas9）、及びデアミナーゼドメインを含む融合タンパク質であり、こ 30
こで、当該dCasは、リンカーにより当該nCAsに連結されており、当該dCasは、当該デアミナーゼドメインに直接隣接する。幾つかの実施形態では、塩基エディターは、アデニン→チミンまたは「ATBE」（またはチミン→アデニンもしくは「TABE」）トランスバージョン塩基エディターである。例示的な塩基エディター及び塩基エディターシステムとしては、特許出願公開第US20220127622、同US20210079366号、同US20200248169号、同US20210093667号、同US20210071163号、同WO2020181202、同WO2021158921号、同WO2019126709号、WO2020181178号、同WO2020181195号、同WO2020214842号、同WO2020181193号（これらはその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるようないずれかが挙げられる。

【0324】

幾つかの実施形態では、遺伝子編集技術は、標的プライムド逆転写（TPRT）または「プライム編集」である。幾つかの実施形態では、プライム編集は、DSBまたはドナーDNAテンプレートを必要とすることなく、ヒト細胞における標的挿入、欠失、全12通りの可能な塩基-塩基変換、及びそれらの組み合わせを媒介する。

【0325】

プライム編集は、ポリメラーゼと共同して機能する（すなわち、融合タンパク質の形態の、またはそうでなければnapDNAbpと共にトランスで提供される）、核酸によりプログラム化可能なDNA結合タンパク質（「napDNAbp」）を使用して指定されたDNA部位に新たな遺伝子情報を直接書き込むゲノム編集方法であり、ここで、プライム編集システムは、標的部位を指定し、ガイドRNA上に（例えば、5'もしくは3'末端 50

、またはガイドRNAの内部に)設計された延長部(DNAまたはRNAのいずれか)による置換DNA鎖の形態での目的とする編集の合成の鋳型にもなるプライム編集(PE)ガイドRNA(「PEgRNA」)によりプログラム化される。目的の編集(例えば、単一核酸塩基置換)を含有する置換鎖は、(それが目的の編集を含むことを除いて)編集されるべき標的部位の内在性鎖と同じ配列を共有する。DNA修復及び/または複製機構により、標的部位の内在性鎖は、目的の編集を含有する新たに合成された置換鎖と置き換えられる。場合によっては、プライム編集は、プライムエディターが編集されるべき目的の標的部位を検索及び検出し、同時に、該当する標的部位の内在性DNA鎖の代わりに導入される目的の編集を含有する置換鎖をコードするため、「検索及び置換」によるゲノム編集技術とみなされ得る。例えば、プライム編集は、正確なCRISPR/Casベースのゲノム編集を実施するために、二本鎖切断を回避する目的で採用され得る。幾つかの実施形態では、相同タンパク質は、ガイドRNAにより特定のDNA配列を標的とし、標的部位で一本鎖ニックを生じさせ、ニックの入ったDNAをガイドRNAにより組込まれる遺伝子操作された逆転写酵素テンプレートの逆転写のためのプライマーとして使用するためのCasタンパク質-逆転写酵素融合物または関連するシステムであるか、またはそれをコードする。幾つかの実施形態では、プライムエディタータンパク質は、ゲノムDNAの対向する鎖での相補的DNAフラップの合成の鋳型となる2つのプライム編集ガイドRNA(pegRNAs)と組み合わせられ、これにより、PEにより誘発されたニック部位とpegRNAによりコードされる配列との間での内在性DNA配列の置換をもたらす。

10

20

【0326】

幾つかの実施形態では、遺伝子編集技術は、逆転写酵素または当該技術分野において公知の任意のDNAポリメラーゼであるプライムエディターを伴う。従って、一態様では、プライムエディターは、標的DNAの相補的なプロトスペーサーにアニーリングするスペーサー配列を含有する特殊なガイドRNA(すなわち、PEgRNA)と会合させることによりDNA配列を標的とするようにプログラムされるCas9(または同等のnapDNAbp)を含み得る。かかる方法としては、Anzalone et al., (doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4)、またはPCT公開第WO2020191248号、同WO2021226558号、または同WO2022067130号(これらはその全体が本明細書に組み込まれる)に開示されるいずれかが挙げられる。

30

【0327】

幾つかの実施形態では、遺伝子編集技術は、部位特異的標的化エレメントによるプログラム化可能な付加(PASTE)である。幾つかの態様では、PASTEは、逆転写酵素及びセリンインテグラーゼの両方に融合されたCRISPR-Cas9ニッカーゼによりゲノム挿入が誘導されるプラットフォームである。Ioannidi et al. (doi.org/10.1101/2021.11.01.466786)に記載されているように、PASTEは、二本鎖切断を生じさせないが、約36kbもの大きさの配列の組込みを可能にする。幾つかの実施形態では、セリンインテグラーゼは、当該技術分野において公知のいずれかであり得る。幾つかの実施形態では、セリンインテグラーゼは、少なくとも2つのゲノム位置で少なくとも2つの異なる遺伝子を同時に組込む多重化された遺伝子組込みにPASTEを使用することができるよう、十分な直交性を有する。幾つかの実施形態では、PASTEは、相同組換え修復または非相同末端結合に基づく組込みの方法と同等か、またはそれより高い編集効率を有し、非分裂細胞において活性であり、検出可能なオフターゲット事象がより少ない。

40

【0328】

幾つかの実施形態では、本開示のCRISPRシステムは、TnpBポリペプチドを含む。幾つかの実施形態では、TnpBポリペプチドは、RuvC様ドメインを含み得る。RuvCドメインは、RuvC-I、RuvC-II、及びRuvC-IIISubドメインを含む分割されたRuvCドメインであり得る。幾つかの実施形態では、TnpBは、HTHドメイン、ブリッジヘリックスドメイン、及びジンクフィンガードメインのうちの

50

1つ以上更に含み得る。TnpBポリペプチドは、HNHDメインを含まない。幾つかの実施形態では、TnpBタンパク質は、N末端から開始して、HTHDメイン、RuvC-Iサブドメイン、ブリッジヘリックスドメイン、RuvC-IIサブドメイン、ジンクフィンガードメイン、及びRuvC-IIISubドメインを含む。幾つかの実施形態では、RuvC-IIISubドメインは、TnpBポリペプチドのC末端を形成する。幾つかの実施形態では、TnpBポリペプチドは、*Escherichia coli* 網の細菌、*Actinoplanes lobatus* DSM 43150株、*Actinomadura cellulolytica* DSM 45823株、*Actinomadura namibiensis* DSM 44197株、*Alicyclobacillus macrosprangii* DSM 17980株、*Lipingzhangella halophila* DSM 102030株、または*Ktedonobacter racemifer*に由来する。幾つかの実施形態では、TnpBポリペプチドは、*Ktedonobacter racemifer*に由来するか、または*K. racemifer*のTnpB遺伝子座の5' ITRとの類似性を有する保存されたRNA領域を含む。幾つかの実施形態では、TnpBは、真核生物ゲノムに見出されるTnpBホモログであるFanzorタンパク質を含み得る。幾つかの実施形態では、TnpBポリペプチドを含むCRISPRシステムは、標的ポリヌクレオチドの5'側の標的隣接モチーフ(TAM)配列に結合する。幾つかの実施形態では、TAMは、トランスポゾン関連モチーフである。幾つかの実施形態では、TAM配列は、TCAを含む。幾つかの実施形態では、TAM配列は、TTCANを含む。幾つかの実施形態では、TAM配列は、TTGATを含む。幾つかの実施形態では、TAM配列は、ATAAを含む。

10

20

30

40

50

【0329】

幾つかの実施形態では、記載される遺伝子操作された細胞の集団は、レシピエント対象に投与された際に低減されたレベルの免疫活性化を誘発するか、または免疫活性化を誘発しない。幾つかの実施形態では、細胞は、レシピエント対象における低減されたレベルの全身性TH1活性化を誘発するか、または全身性TH1活性化を誘発しない。幾つかの実施形態では、細胞は、レシピエント対象における低減されたレベルの末梢血単核細胞(PBMC)の免疫活性化を誘発するか、またはPBMCの免疫活性化を誘発しない。幾つかの実施形態では、細胞は、レシピエント対象に投与された際に低減されたレベルのドナー特異的IgG抗体を誘発するか、または細胞に対するドナー特異的IgG抗体を誘発しない。幾つかの実施形態では、細胞は、レシピエント対象における低減されたレベルのIgM及びIgG抗体産生を誘発するか、または細胞に対するIgM及びIgG抗体産生を誘発しない。幾つかの実施形態では、細胞は、レシピエント対象に投与された際に低減されたレベルの細胞傷害性T細胞による細胞の殺傷を誘発する。

【0330】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される遺伝子操作された細胞は、「自殺遺伝子」または「自殺スイッチ」を含む。自殺遺伝子または自殺スイッチは、例えば、遺伝子操作された細胞が対象に投与された後に、ならびに万が一それら細胞が望ましくない様式で増殖及び分裂した場合に、遺伝子操作された細胞(例えば、遺伝子操作された初代細胞または遺伝子操作された多能性幹細胞から分化した細胞)の死滅を引き起こすことができる「安全スイッチ」として機能するように組み込まれ得る。「自殺遺伝子」による除去アプローチは、特定の化合物により活性化される場合にのみ細胞殺傷をもたらすタンパク質をコードする、遺伝子導入ベクター内の自殺遺伝子を含む。自殺遺伝子は、無毒の化合物を毒性の強い代謝産物に選択的に変換する酵素をコードし得る。これにより、酵素を発現する細胞の特異的な除去がもたらされる。幾つかの実施形態では、自殺遺伝子は、ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(HSV-tk)遺伝子であり、トリガーは、ガンシクロビルである。他の実施形態では、自殺遺伝子は、*Escherichia coli*のシトシンデアミナーゼ(EC-CD)遺伝子であり、トリガーは、5-フルオロシトシン(5-FU)である(Baresse et al, Mol. Therap. 20(10))

：1932-1943（2012）、Xu et al, Cell Res. 8：73-8（1998）（両方は参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる））。

【0331】

他の実施形態では、自殺遺伝子は、誘導性カスパーゼタンパク質である。誘導性カスパーゼタンパク質は、アポトーシスを誘発することができるカスパーゼタンパク質の少なくとも一部を含む。幾つかの実施形態では、誘導性カスパーゼタンパク質は、iCasp9である。これは、ヒトFK506結合タンパク質であるFKBP12の配列を含み、これはF36V変異を有し、一連のアミノ酸を介してヒトカスパーゼ9をコードする遺伝子に連結されている。FKBP12-F36Vは、低分子二量体化薬剤であるAPI 903に高親和性で結合する。これにより、二量体化の化学誘導物質（CID）の投与によってiCasp9の自殺機能が誘発される。幾つかの実施形態では、CIDは、低分子薬物API 903である。二量体化は、アポトーシスの急速な誘導を引き起こす（WO2011146862、Stasi et al, N. Engl. J. Med 365；18（2011）、Tey et al, Biol. Blood Marrow Transplant. 13：913-924（2007）（これらの各々は参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと）。

10

【0332】

安全スイッチまたは自殺遺伝子を含めることにより、レシピエントに対して細胞傷害性があるか、または他の悪影響が生じた場合に、細胞の制御された殺傷が可能となり、これにより、免疫寛容誘導因子を使用するものが含まれる、細胞療法の安全性が高まる。

20

【0333】

幾つかの実施形態では、安全スイッチは、例えば、細胞が望ましくない様式で増殖及び分裂するか、または宿主に過度の毒性をもたらす場合に、当該安全スイッチを含有する遺伝子操作された細胞の死滅またはアポトーシスを誘発する能力を提供するために、本明細書において提供される遺伝子操作された細胞に組み込まれ得、例えば、導入され得る。従って、安全スイッチの使用は、インビボで異常な細胞を条件的に除去することを可能にし、臨床での細胞療法の適用に重要なステップであり得る。安全スイッチ及びそれらのそれらの使用は、例えば、Duzgunes, Origins of Suicide Gene Therapy（2019）、Duzgunes (eds), Suicide Gene Therapy. Methods in Molecular Biology, vol. 1895（Humana Press, New York, NY）（HSV-tk、シトシンデアミナーゼ、ニトロレダクターゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、及びワサビペルオキシダーゼについて）、Zhou and Brenner, Exp Hematol 44（11）：1013-1019（2016）（iCaspase9について）、Wang et al., Blood 18（5）：1255-1263（2001）（huEGFRについて）、米国特許出願公開第20180002397号（HER1について）、及びPhilip et al., Blood 124（8）：1277-1287（2014）（RQR8について）に記載されている。

30

【0334】

幾つかの実施形態では、安全スイッチは、例えば、薬物またはプロドラッグの存在下で、または選択的な外来性化合物による活性化時に、制御された様式で細胞死を引き起こすことができる。幾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チミジンキナーゼ（HSV-tk）、シトシンデアミナーゼ（CyD）、ニトロレダクターゼ（NTR）、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ（PNP）、ワサビペルオキシダーゼ、誘導性カスパーゼ9（iCasp9）、ラパマイシン活性化カスパーゼ9（rapaCasp9）、CCR4、CD16、CD19、CD20、CD30、EGFR、GD2、HER1、HER2、MUC1、PSMA、及びRQR8からなる群から選択される。

40

【0335】

幾つかの実施形態では、安全スイッチは、薬物またはプロドラッグにより活性化される場合に、例えば、細胞内で非毒性のプロドラッグを有毒な代謝産物に変化させることによ

50

る、細胞殺傷能力を有する生成物をコードする導入遺伝子であり得る。これらの実施形態では、細胞殺傷は、遺伝子操作された細胞を薬物またはプロドラッグと接触させることにより活性化される。幾つかの例では、安全スイッチは、ガンシクロビル（GCV）をGCV三リン酸に変換し、これにより、DNA合成を妨害し、分裂細胞を死滅させるHSV-tkである。幾つかの例では、安全スイッチは、シトシンのウラシルへの加水分解脱アミノ化を触媒することにより、抗真菌薬である5-フルオロシトシン（5-FC）を細胞傷害性の5-フルオロウラシル（5-FU）に変換するCydまたはそのバリエーションである。5-FUは、細胞の酵素により強力な代謝拮抗物質（5-FdUMP、5-FdUTP、5-FUTP）に更に変換される。これらの化合物は、チミジル酸シンターゼならびにRNA及びDNAの生成を阻害し、これにより、細胞死をもたらす。幾つかの例では、安全スイッチは、ニトロ基の還元によりプロドラッグCB1954に作用し、増殖性細胞及び非増殖性細胞に有毒な反応性のN-ヒドロキシシルアミン中間体にする事ができるNTRまたはそのバリエーションである。幾つかの例では、安全スイッチは、プロドラッグ6-メチルプリンデオキシリボシドまたはフルダラビンを増殖性細胞及び非増殖性細胞の両方に対して有毒な代謝産物に変化させる事ができるPNPまたはそのバリエーションである。幾つかの例では、安全スイッチは、インドール-3-酢酸（IAA）を強力な細胞毒素に変化させることができ、これにより、細胞殺傷を達成するワサビペルオキシダーゼまたはそのバリエーションである。

10

【0336】

幾つかの実施形態では、安全スイッチは、iCasp9であり得る。カスパーゼ9は、生理的条件下で、損傷したミトコンドリアからのシトクロムCの放出により活性化される内在性ミトコンドリアアポトーシス経路の成分である。次いで、活性カスパーゼ9は、末端エフェクター分子を作動させるカスパーゼ3を活性化し、これにより、アポトーシスをもたらす。iCasp9は、短縮されたカスパーゼ9（その生理学的二量体化ドメインまたはカスパーゼ活性化ドメインを有さない）をペプチドリンカーを介してFKBP結合タンパク質（FKBP）であるFKBP12-F36Vに融合させることにより作製され得る。iCasp9は、低い二量体非依存的定常活性を有し、宿主細胞（例えば、ヒトT細胞）において、その表現型、機能、または抗原特異性を損なうことなく安定的に発現させることができる。しかしながら、二量体化の化学誘導物質（CID）、例えば、リミデュシド（AP1903）、AP20187、及びラパマイシンの存在下では、iCasp9は、誘導性二量体化を起こし得、下流カスパーゼ分子を活性化し得、これにより、iCasp9を発現する細胞のアポトーシスをもたらす。PCT出願公開第WO2011/146862号、Stasi et al., N. Engl. J. Med. 365; 18 (2011)、Tey et al., Biol. Blood Marrow Transplant 13: 913-924 (2007)を参照のこと。例えば、ラパマイシン誘導性カスパーゼ9バリエーションは、rapaCasp9と称される。Stavrou et al., Mol. Ther. 26 (5): 1266-1276 (2018)を参照のこと。従って、iCasp9は、宿主細胞の制御された殺傷を達成するための安全スイッチとして使用することができる。

20

30

【0337】

幾つかの実施形態では、安全スイッチは、膜発現タンパク質であって、そのタンパク質に対する特異的抗体の投与後に細胞枯渇を可能にする、当該膜発現タンパク質であり得る。このカテゴリーの安全スイッチは、例えば、CCR4、CD16、CD19、CD20、CD30、EGFR、GD2、HER1、HER2、MUC1、PSMA、またはRQR8をコードする1つ以上の導入遺伝子をそれらの表面発現のために含み得る。これらのタンパク質は、特異的抗体により標的とされ得る表面エピトープを有し得る。幾つかの実施形態では、安全スイッチは、抗CCR4抗体により認識され得るCCR4を含む。好適な抗CCR4抗体の非限定的な例としては、モガムリズマブ及びそのバイオシミラーが挙げられる。幾つかの実施形態では、安全スイッチは、抗CD16または抗CD30抗体により認識され得るCD16またはCD30を含む。かかる抗CD16または抗CD30抗

40

50

体の非限定的な例としては、A F M 1 3 及びそのバイオシミラーが挙げられる。幾つかの実施形態では、抗 C D 1 9 抗体により認識され得る安全スイッチは、C D 1 9 を含む。かかる抗 C D 1 9 抗体の非限定的な例としては、M O R 2 0 8 及びそのバイオシミラーが挙げられる。幾つかの実施形態では、抗 C D 2 0 抗体により認識され得る安全スイッチは、C D 2 0 を含む。かかる抗 C D 2 0 抗体の非限定的な例としては、オビヌツズマブ、ウブリツキシマブ、オカラツズマ、リツキシマブ、リツキシマブー R l l b、及びそれらのバイオシミラーが挙げられる。従って、安全スイッチを発現する細胞は、C D 2 0 陽性であり、記載されるように抗 C D 2 0 抗体の投与により殺傷の標的とされ得る。幾つかの実施形態では、安全スイッチは、抗 E G F R 抗体により認識され得る E G F R を含む。かかる抗 E G F R 抗体の非限定的な例としては、トムゾツキシマブ、R O 5 0 8 3 9 4 5 (G A 2 0 1)、セツキシマブ、及びそれらのバイオシミラーが挙げられる。幾つかの実施形態では、安全スイッチは、抗 G D 2 抗体により認識され得る G D 2 を含む。かかる抗 G D 2 抗体の非限定的な例としては、H u l 4 . 1 8 K 3 2 2 A、H u l 4 . 1 8 - I L 2、H u 3 F 8、ジニツキシマブ、c . 6 0 C 3 - R l l c、及びそれらのバイオシミラーが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0338】

幾つかの実施形態では、安全スイッチは、遺伝子操作された細胞の表面上の1種以上の免疫寛容誘導因子を認識する外来的に投与される薬剤であり得る。幾つかの実施形態では、外来的に投与される薬剤は、免疫寛容誘導物質に対して作られたか、またはそれに対して特異的な抗体、例えば、抗 C D 4 7 抗体である。遺伝子操作された細胞上の免疫寛容誘導因子を認識し、それを遮断することにより、外来的に投与された抗体は、免疫寛容誘導因子の免疫抑制機能を阻害し得、これにより、免疫系を遺伝子操作された細胞に対して再度感作させる。例えば、C D 4 7 を過剰発現する遺伝子操作された細胞では、外来的に投与される抗 C D 4 7 抗体が、対象に投与され得、これにより、遺伝子操作された細胞上の C D 4 7 のマスキングがもたらされ、遺伝子操作された細胞に対する免疫応答が誘発される。

【0339】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞を作製する方法であって、(a) 当該細胞における1種以上の M H C クラス I 分子及び／または1種以上の M H C クラス I I 分子の発現を低減または除去すること、(b) 当該細胞における免疫寛容誘導因子の発現を増加させることを含む、当該方法が本明細書において提供される。幾つかの実施形態では、1種以上の免疫寛容誘導因子は、A 2 0 / T N F A I P 3、B 2 M - H L A - E、C D 1 6、C D 1 6 F c 受容体、C D 2 4、C D 2 7、C D 3 5、C D 3 9、C D 4 6、C D 4 7、C D 5 2、C D 5 5、C D 5 9、C D 6 4、C D 2 0 0、C C L 2 1、C C L 2 2、C T L A 4 - I g、C 1 阻害因子、C R 1、D U X 4、F A S L、H L A - C、H L A - E、H L A - E 重鎖、H L A - F、H L A - G、H 2 - M 3、I D O 1、I L - 1 0、I L 1 5 - R F、I L - 3 5、I L - 3 9、M A N F、M f g e 8、P D - L 1、及び S e r p i n b 9 から選択される。幾つかの実施形態では、1種以上の免疫寛容誘導因子は、C D 4 7 である。幾つかの実施形態では、本方法は、1種以上の M H C クラス I 分子及び1種以上の M H C クラス I I 分子の発現を低減または除去することを含む。幾つかの実施形態では、発現の低減または除去は、誘導型ヌクレアーゼ（例えば、C R I S P R / C a s システム）を使用して細胞に対して1種以上の改変を実行することを含む。幾つかの実施形態では、本方法は、誘導性自殺スイッチを含む発現ベクターを細胞に導入することを更に含む。

【0340】

幾つかの実施形態では、発現の低減または除去は、誘導型ヌクレアーゼ（例えば、C R I S P R / C a s システム）を使用して細胞に対して1種以上の改変を実行することを含む。幾つかの実施形態では、本方法は、誘導性自殺スイッチを含む発現ベクターを細胞に導入することを更に含む。幾つかの実施形態では、本方法は、上記細胞における D A F / C D 5 5 の発現を増加させることを更に含む。

【0341】

幾つかの実施形態では、免疫寛容誘導因子はCD47であり、細胞はCD47タンパク質をコードする外来性ポリヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、細胞は、外来性CD47ポリペプチドを発現する。

【0342】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される方法は、投与する必要がある対象にCD47-SIRPα遮断薬を投与することを含み、ここで、当該対象は、外来性CD47ポリペプチドを発現するように遺伝子操作された細胞の集団を以前に投与されたことがある。幾つかの実施形態では、CD47-SIRPα遮断薬は、CD47結合ドメインを含む。幾つかの実施形態では、CD47結合ドメインは、シグナル調節タンパク質α(SIRPα)またはその断片を含む。幾つかの実施形態では、CD47-SIRPα遮断薬は、免疫グロブリンG(IgG)Fcドメインを含む。幾つかの実施形態では、IgG Fcドメインは、IgG1 Fcドメインを含む。幾つかの実施形態では、IgG1 Fcドメインは、ヒト抗体の断片を含む。幾つかの実施形態では、CD47-SIRPα遮断薬は、TTI-621、TTI-622、及びALX148からなる群から選択される。幾つかの実施形態では、CD47-SIRPα遮断薬は、TTI-621、TTI-622、及びALX148である。幾つかの実施形態では、CD47-SIRPα遮断薬は、TTI-622である。幾つかの実施形態では、CD47-SIRPα遮断薬は、ALX148である。幾つかの実施形態では、IgG Fcドメインは、IgG4 Fcドメインを含む。幾つかの実施形態では、CD47-SIRPα遮断薬は、抗体である。幾つかの実施形態では、抗体は、MIAP410、B6H12、及びマグロリマブからなる群から選択される。幾つかの実施形態では、抗体は、MIAP410である。幾つかの実施形態では、抗体は、B6H12である。幾つかの実施形態では、抗体は、マグロリマブである。幾つかの実施形態では、抗体は、AO-176、IBI188(レタプリマブ)、STI-6643、及びZL-1201からなる群から選択される。幾つかの実施形態では、抗体は、AO-176(Arch)である。幾つかの実施形態では、抗体は、IBI188(レタプリマブ)(Innovent)である。幾つかの実施形態では、抗体は、STI-6643(Sorrento)である。幾つかの実施形態では、抗体は、ZL-1201(Zai)である。

【0343】

幾つかの実施形態では、CD47に結合する有用な抗体またはその断片は、マグロリマブ(Hu5F9-G4)(Forty Seven, Inc., Gilead Sciences, Inc.)、ウラブレリマブ、CC-90002(Celgene, Bristol-Myers Squibb)、IBI-188(Innovent Biologics)、IBI-322(Innovent Biologics)、TG-1801(TG Therapeutics; NI-1701としても公知、Novimmune SA)、ALX148(ALX Oncology)、TJ011133(TJC4としても公知、I-Mab Biopharma)、FA3M3、ZL-1201(Zai Lab Co., Ltd)、AK117(Akesbio Australia Pty, Ltd.)、AO-176(Arch Oncology)、SRF231(Surface Oncology)、GenSci-059(GeneScience)、C47B157(Janssen Research and Development)、C47B161(Janssen Research and Development)、C47B167(Janssen Research and Development)、C47B222(Janssen Research and Development)、C47B227(Janssen Research and Development)、Vx-1004(Corvus Pharmaceuticals)、HMBD004(Hummingbird Bioscience Pte Ltd)、SHR-1603(Hengrui)、AMMS4-G4(Beijing Institute of Biotechnology)、RTX-CD47(Univer

10

20

30

40

50

sity of Groningen)、及びIMC-002 (Samsung Biologics、ImmuneOncia Therapeutics)を含む群から選択され得る。幾つかの実施形態では、抗体またはその断片は、CD47結合について、マグロリマブ、ウラブレリマブ、CC-90002、IBI-188、IBI-322、TG-1801 (NI-1701)、ALX148、TJ011133、FA3M3、ZL1201、AK117、AO-176、SRF231、GenSci-059、C47B157、C47B161、C47B167、C47B222、C47B227、Vx-1004、HMBD004、SHR-1603、AMMS4-G4、RTX-CD47、及びIMC-002を含む群から選択される抗体と競合しない。幾つかの実施形態では、抗体またはその断片は、CD47結合について、マグロリマブ、ウラブレリマブ、CC-90002、IBI-188、IBI-322、TG-1801 (NI-1701)、ALX148、TJ011133、FA3M3、ZL1201、AK117、AO-176、SRF231、GenSci-059、C47B157、C47B161、C47B167、C47B222、C47B227、Vx-1004、HMBD004、SHR-1603、AMMS4-G4、RTX-CD47、及びIMC-002から選択される抗体と競合する。幾つかの実施形態では、CD47に結合する抗体またはその断片は、CD47に対する単鎖Fv断片(scFv)、CD47に対するFab、CD47に対するVHHナノボディ、CD47に対するDARPin、及びそれらのバリエーションを含む群から選択される。幾つかの実施形態では、CD47に対するscFv、CD47に対するFab、及びそれらのバリエーションは、マグロリマブ、ウラブレリマブ、CC-90002、IBI-188、IBI-322、TG-1801 (NI-1701)、ALX148、TJ011133、FA3M3、ZL1201、AK117、AO-176、SRF231、GenSci-059、C47B157、C47B161、C47B167、C47B222、C47B227、Vx-1004、HMBD004、SHR-1603、AMMS4-G4、RTX-CD47、及びIMC-002を含む群から選択される抗体のいずれかの抗原結合ドメインに基づく。

10

20

30

40

50

【0344】

幾つかの実施形態では、CD47アンタゴニストは、CD47遮断薬を提供する。CD47遮断のための方法及び薬剤は、PCT/US2021/054326 (これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されている。

【0345】

改変されたら、本明細書に記載される分子のいずれかの発現の存在は、公知の技術、例えば、ウェスタンブロット、ELISAアッセイ、FACSアッセイなどを使用して分析され得る。

【0346】

幾つかの実施形態では、特定の細胞種に関連する特徴、例えば、細胞マーカーの特徴付け、バイオマーカー、細胞内マーカー、細胞外マーカー、細胞サイトカイン産生、抗体産生も細胞品質に関する情報として使用され得る。幾つかの実施形態では、細胞内マーカーは、細胞内タンパク質レベルの変化であり得る。幾つかの実施形態では、細胞内マーカーは、細胞内RNAレベルの変化であり得る。幾つかの実施形態では、細胞内マーカーは、細胞内DNAレベルの変化であり得る。幾つかの実施形態では、細胞外のマーカーは、細胞外ペプチド (例えば、1種以上のサイトカイン、1種以上のホルモン、1種以上の抗体など)のレベルの変化であり得る。幾つかの実施形態では、細胞外のマーカーは、細胞外シグナル伝達分子 (例えば、1種以上のシグナル伝達ペプチド、1種以上の代謝産物、1種以上のリガンド、1種以上の有機化合物、1種以上のイオンなど)のレベルの変化であり得る。

【0347】

A. 標的遺伝子の発現の低減

1. 標的遺伝子

a. MHCクラスI分子及び／またはMHCクラスII分子

幾つかの実施形態では、提供される遺伝子操作された細胞は、1種以上のMHCクラスI分子、1種以上のMHCクラスII分子、または1種以上のMHCクラスI分子及び1種以上のMHCクラスII分子のいずれかの発現を調節する（例えば、低減または除去する）1種以上の標的ポリヌクレオチドまたはタンパク質配列（互換的に標的遺伝子とも称される）の改変（例えば、遺伝子改変）を含む。幾つかの実施形態では、改変または遺伝子操作される細胞は、以前に1種以上の改変を導入されていない未改変細胞または遺伝子操作されていない細胞である。幾つかの実施形態では、1種以上のMHCクラスI分子、1種以上のMHCクラスII分子、または1種以上のMHCクラスI分子及びMHCクラスII分子のいずれかの発現を調節する（例えば、低減または除去する）1種以上の標的ポリヌクレオチド配列を改変するために、遺伝子編集システムが使用される。ある特定の
10 実施形態では、細胞のゲノムは、HLA発現、例えば、1種以上のMHCクラスI分子及び／または1種以上のMHCクラスII分子の細胞表面での発現の促進に必要とされるか、または関与する成分を低減または除去するように改変されている。例えば、幾つかの実施形態では、細胞におけるβ2-ミクログロブリン（B2M）、MHCクラスI分子の成分の発現が低減または除去され、これにより、遺伝子操作された細胞による1種以上のMHCクラスI分子のタンパク質発現（例えば、細胞表面発現）が低減または除去される。

【0348】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞における1種以上の標的ポリヌクレオチドまたはタンパク質の発現を調節する（例えば、低減または除去する）、遺伝子操作された細胞における記載される改変のいずれかは、セクションII.Bに記載されるポリヌクレオチド（例えば、免疫寛容誘導因子、例えば、CD47）を過剰発現させるための1種
20 以上の改変と共に組み合わせられ得る。

【0349】

幾つかの実施形態では、1種以上のMHCクラスI分子及び／または1種以上のMHCクラスII分子の発現の低減は、例えば、以下のうちの1つ以上により達成され得る：（1）多型のHLAアレル（HLA-A、HLA-B、HLA-C）及びMHCクラスII遺伝子を直接標的とすること；（2）B2Mの除去（これにより、全てのMHCクラスI分子の表面輸送が低減される）；及び／または（3）HLA発現に重要であるMHCエンハンセオソームの1つ以上の成分、例えば、LRC5、RFX-5、RFXANK、RFXAP、IRF1、NF- γ （NFY-A、NFY-B、NFY-Cが含まれる）、及び
30 CITAの欠失。

【0350】

ある特定の実施形態では、HLA発現は、妨害される。幾つかの実施形態では、HLA発現は、個々のHLAを標的とすること（例えば、HLA-A、HLA-B、及び／またはHLA-Cの発現をノックアウトすること）、HLA発現の転写調節因子を標的とすること（例えば、NLRC5、CITA、RFX5、RFXAP、RFXANK、NFY-A、NFY-B、NFY-C、及び／またはIRF-1の発現をノックアウトすること）、MHCクラスI分子の表面輸送を阻害すること（例えば、B2M及び／またはTAP1の発現をノックアウトすること）、及び／またはHLA-Razor（例えば、WO2016183041を参照のこと）を用いて標的とすることにより妨害される。
40

【0351】

ヒト白血球抗原（HLA）複合体は、ヒトMHCと同義である。幾つかの実施形態では、本明細書において開示される遺伝子操作された細胞は、ヒト細胞である。ある特定の態様では、本明細書において開示される遺伝子操作された細胞は、1種以上のMHCクラスI分子及び／または1種以上のMHCクラスII分子に対応する1種以上のヒト白血球抗原（例えば、HLA-A、HLA-B、及び／またはHLA-C）を発現せず、従って、低免疫原性であることを特徴とする。例えば、ある特定の態様では、本明細書において開示される遺伝子操作された細胞は、任意の幹細胞またはそれから調製された分化した幹細胞が含まれる、細胞が、以下のMHCクラスI分子のうちの1つ以上を発現しないか、またはその低減された発現を示すように改変されている：HLA-A、HLA-B、及びH
50

L A - C。幾つかの実施形態では、H L A - A、H L A - B、及びH L A - Cのうちの1つ以上が、細胞から「ノックアウト」されていてもよい。H L A - A遺伝子、H L A - B遺伝子、及び／またはH L A - C遺伝子がノックアウトされた細胞は、各ノックアウトされた遺伝子の発現の低減または除去を示し得る。

【0352】

ある特定の実施形態では、1種以上のM H CクラスI分子及び／または1種以上のM H CクラスII分子の発現は、ゲノムDNAの連続した区間を標的とし、それを欠失させ、これにより、B 2 M、C I I T A、及びN L R C 5からなる群から選択される標的遺伝子の発現を低減または除去することにより調節される。

【0353】

幾つかの実施形態では、提供される遺伝子操作された細胞は、1種以上のM H CクラスI分子を調節する1種以上の標的ポリヌクレオチド配列の改変を含む。1種以上のM H CクラスI分子の発現を低減するための例示的な方法は、以下のセクションに記載される。幾つかの実施形態では、標的とされるポリヌクレオチド配列は、B 2 M及びN L R C 5のうちの一方または両方である。幾つかの実施形態では、細胞は、B 2 M遺伝子の遺伝子編集による改変（例えば、インデル）を含む。幾つかの実施形態では、細胞は、N L R C 5遺伝子の遺伝子編集による改変（例えば、インデル）を含む。幾つかの実施形態では、細胞は、B 2 M及びC I I T A遺伝子の遺伝子編集による改変（例えば、インデル）を含む。

【0354】

幾つかの実施形態では、1種以上のM H CクラスI分子の発現を低減する改変は、B 2 Mの発現を低減する改変である。幾つかの実施形態では、B 2 M発現を低減する改変は、B 2 M m R N A発現を低減する。幾つかの実施形態では、B 2 Mのm R N A発現の低減は、改変を含まない同じ細胞種の未改変または野生型細胞と比較したものである。幾つかの実施形態では、B 2 Mのm R N A発現は、約5%超低減され、例えば、約10%超低減されるか、約20%超低減されるか、約30%超低減されるか、約40%超低減されるか、約50%超低減されるか、約60%超低減されるか、約70%超低減されるか、約80%超低減されるか、約90%超低減されるか、またはそれ以上低減されるかのいずれかである。幾つかの実施形態では、B 2 Mのm R N A発現は、最大約100%低減され、例えば、最大約90%低減されるか、最大約80%低減されるか、最大約70%低減されるか、最大約60%低減されるか、最大約50%低減されるか、最大約40%低減されるか、最大約30%低減されるか、最大約20%低減されるか、最大約10%低減されるか、最大約5%低減されるか、またはそれ以下低減されるかのいずれかである。幾つかの実施形態では、B 2 Mのm R N A発現は、約5%低減されるか、約10%低減されるか、約20%低減されるか、約30%低減されるか、約40%低減されるか、約50%低減されるか、約60%低減されるか、約70%低減されるか、約80%低減されるか、約90%低減されるか、または約100%低減されるかのいずれかである。幾つかの実施形態では、B 2 Mのm R N A発現は、除去される（例えば、B 2 M m R N Aの0%の発現）。幾つかの実施形態では、B 2 M m R N A発現を低減する改変は、B 2 M遺伝子活性を除去する。

【0355】

幾つかの実施形態では、B 2 M発現を低減する改変は、B 2 Mタンパク質発現を低減する。幾つかの実施形態では、B 2 Mのタンパク質発現の低減は、改変を含まない同じ細胞種の未改変または野生型細胞と比較したものである。幾つかの実施形態では、B 2 Mのタンパク質発現は、約5%超低減され、例えば、約10%超低減されるか、約20%超低減されるか、約30%超低減されるか、約40%超低減されるか、約50%超低減されるか、約60%超低減されるか、約70%超低減されるか、約80%超低減されるか、約90%超低減されるか、またはそれ以上低減されるかのいずれかである。幾つかの実施形態では、B 2 Mのタンパク質発現は、最大約100%低減され、例えば、最大約90%低減されるか、最大約80%低減されるか、最大約70%低減されるか、最大約60%低減されるか、最大約50%低減されるか、最大約40%低減されるか、最大約30%低減される

か、最大約 20 % 低減されるか、最大約 10 % 低減されるか、最大約 5 % 低減されるか、またはそれ以下低減されるかのいずれかである。幾つかの実施形態では、B2M のタンパク質発現は、約 5 % 低減されるか、約 10 % 低減されるか、約 20 % 低減されるか、約 30 % 低減されるか、約 40 % 低減されるか、約 50 % 低減されるか、約 60 % 低減されるか、約 70 % 低減されるか、約 80 % 低減されるか、約 90 % 低減されるか、または約 100 % 低減されるかのいずれかである。幾つかの実施形態では、B2M のタンパク質発現は、除去される（例えば、B2M タンパク質の 0 % の発現）。幾つかの実施形態では、B2M タンパク質発現を低減する改変は、B2M 遺伝子活性を除去する。

【0356】

幾つかの実施形態では、B2M 発現を低減する改変は、B2M 遺伝子の不活性化または破壊を含む。幾つかの実施形態では、B2M 発現を低減する改変は、B2M 遺伝子の一方のアレルの不活性化または破壊を含む。幾つかの実施形態では、B2M 発現を低減する改変は、B2M 遺伝子の両方のアレルの不活性化または破壊を含む。

【0357】

幾つかの実施形態では、改変は、細胞における 1 つ以上の B2M コード配列の不活性化または破壊を含む。幾つかの実施形態では、改変は、細胞における全ての B2M コード配列の不活性化または破壊を含む。幾つかの実施形態では、改変は、不活性化または破壊は、B2M 遺伝子におけるインデルを含む。幾つかの実施形態では、改変は、B2M 遺伝子のゲノム DNA のフレームシフト変異である。幾つかの実施形態では、改変は、B2M 遺伝子のゲノム DNA の欠失である。幾つかの実施形態では、改変は、B2M 遺伝子のゲノム DNA の連続した区間の欠失である。幾つかの実施形態では、B2M 遺伝子は、ノックアウトされる。

【0358】

幾つかの実施形態では、提供される遺伝子操作された細胞は、1 種以上の MHC クラス II 分子を調節する 1 種以上の標的ポリヌクレオチド配列の改変を含む。1 種以上の MHC クラス II 分子の発現を低減するための例示的な方法は、以下のセクションに記載される。幾つかの実施形態では、細胞は、CIITA 遺伝子の遺伝子編集による改変を含む。

【0359】

幾つかの実施形態では、1 種以上の MHC クラス II 分子の発現を低減する改変は、CIITA の発現を低減する改変である。幾つかの実施形態では、CIITA 発現を低減する改変は、CIITA mRNA 発現を低減する。幾つかの実施形態では、CIITA の mRNA 発現の低減は、改変を含まない同じ細胞種の未改変または野生型細胞と比較したものである。幾つかの実施形態では、CIITA の mRNA 発現は、約 5 % 超低減され、例えば、約 10 % 超低減されるか、約 20 % 超低減されるか、約 30 % 超低減されるか、約 40 % 超低減されるか、約 50 % 超低減されるか、約 60 % 超低減されるか、約 70 % 超低減されるか、約 80 % 超低減されるか、約 90 % 超低減されるか、またはそれ以上低減されるかのいずれかである。幾つかの実施形態では、CIITA の mRNA 発現は、最大約 100 % 低減され、例えば、最大約 90 % 低減されるか、最大約 80 % 低減されるか、最大約 70 % 低減されるか、最大約 60 % 低減されるか、最大約 50 % 低減されるか、最大約 40 % 低減されるか、最大約 30 % 低減されるか、最大約 20 % 低減されるか、最大約 10 % 低減されるか、最大約 5 % 低減されるか、またはそれ以下低減されるかのいずれかである。幾つかの実施形態では、CIITA の mRNA 発現は、約 5 % 低減されるか、約 10 % 低減されるか、約 20 % 低減されるか、約 30 % 低減されるか、約 40 % 低減されるか、約 50 % 低減されるか、約 60 % 低減されるか、約 70 % 低減されるか、約 80 % 低減されるか、約 90 % 低減されるか、または約 100 % 低減されるかのいずれかである。幾つかの実施形態では、CIITA の mRNA 発現は、除去される（例えば、CIITA mRNA の 0 % の発現）。幾つかの実施形態では、CIITA mRNA 発現を低減する改変は、CIITA 遺伝子活性を除去する。

【0360】

幾つかの実施形態では、CIITA 発現を低減する改変は、CIITA タンパク質発現

を低減する。幾つかの実施形態では、C I I T A のタンパク質発現の低減は、改変を含まない同じ細胞種の未改変または野生型細胞と比較したものである。幾つかの実施形態では、C I I T A のタンパク質発現は、約 5 % 超低減され、例えば、約 10 % 超低減されるか、約 20 % 超低減されるか、約 30 % 超低減されるか、約 40 % 超低減されるか、約 50 % 超低減されるか、約 60 % 超低減されるか、約 70 % 超低減されるか、約 80 % 超低減されるか、約 90 % 超低減されるか、またはそれ以上低減されるかのいずれかである。幾つかの実施形態では、C I I T A のタンパク質発現は、最大約 100 % 低減され、例えば、最大約 90 % 低減されるか、最大約 80 % 低減されるか、最大約 70 % 低減されるか、最大約 60 % 低減されるか、最大約 50 % 低減されるか、最大約 40 % 低減されるか、最大約 30 % 低減されるか、最大約 20 % 低減されるか、最大約 10 % 低減されるか、最大約 5 % 低減されるか、またはそれ以下低減されるかのいずれかである。幾つかの実施形態では、C I I T A のタンパク質発現は、約 5 % 低減されるか、約 10 % 低減されるか、約 20 % 低減されるか、約 30 % 低減されるか、約 40 % 低減されるか、約 50 % 低減されるか、約 60 % 低減されるか、約 70 % 低減されるか、約 80 % 低減されるか、約 90 % 低減されるか、または約 100 % 低減されるかのいずれかである。幾つかの実施形態では、C I I T A のタンパク質発現は、除去される（例えば、C I I T A タンパク質の 0 % の発現）。幾つかの実施形態では、C I I T A タンパク質発現を低減する改変は、C I I T A 遺伝子活性を除去する。

10

【0361】

幾つかの実施形態では、B 2 M 発現を低減する改変は、C I I T A 遺伝子の不活性化または破壊を含む。幾つかの実施形態では、C I I T A 発現を低減する改変は、C I I T A 遺伝子の一方のアレルの不活性化または破壊を含む。幾つかの実施形態では、C I I T A 発現を低減する改変は、C I I T A 遺伝子の両方のアレルの不活性化または破壊を含む。

20

【0362】

幾つかの実施形態では、改変は、細胞における 1 つ以上の B 2 M コード配列の不活性化または破壊を含む。幾つかの実施形態では、改変は、細胞における全ての B 2 M コード配列の不活性化または破壊を含む。幾つかの実施形態では、改変は、不活性化または破壊は、B 2 M 遺伝子におけるインデルを含む。幾つかの実施形態では、改変は、B 2 M 遺伝子のゲノム DNA のフレームシフト変異である。幾つかの実施形態では、改変は、B 2 M 遺伝子のゲノム DNA の欠失である。幾つかの実施形態では、改変は、B 2 M 遺伝子のゲノム DNA の連続した区間の欠失である。幾つかの実施形態では、C I I T A 遺伝子は、ノックアウトされる。

30

【0363】

幾つかの実施形態では、提供される遺伝子操作された細胞は、1 種以上の M H C クラス I 分子及び／または 1 種以上の M H C クラス II 分子を調節する 1 種以上の標的ポリヌクレオチド配列の改変を含む。1 種以上の M H C クラス I 分子及び／または 1 種以上の M H C クラス II 分子の発現を低減する例示的な方法は、以下のセクションに記載されている。幾つかの実施形態では、細胞は、B 2 M 及び N L R C 5 遺伝子の遺伝子編集による改変を含む。幾つかの実施形態では、細胞は、C I I T A 及び N L R C 5 遺伝子の遺伝子編集による改変を含む。実施形態では、細胞は、B 2 M、C I I T A、及び N L R C 5 遺伝子の遺伝子編集による改変を含む。

40

【0364】

2. 発現を低減する方法

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞は、記載されるような 1 種以上の標的ポリヌクレオチドまたはタンパク質の発現を低減するように改変（例えば、遺伝子改変）される。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドまたはタンパク質の発現を低減する（例えば、除去する）ように 1 種以上の改変で遺伝子操作されている細胞は、本明細書に記載される任意の供給源細胞である。幾つかの実施形態では、供給源細胞は、セクション II. C に記載される任意の細胞である。ある特定の実施形態では、本明細書において開示される細胞（例えば、幹細胞、人工多能性幹細胞、分化した細胞、例えば、β 脾

50

島細胞もしくは肝実質細胞、または初代細胞)は、1種以上の標的ポリヌクレオチドの発現を低減するための1種以上の改変を含む。1種以上の標的ポリヌクレオチドの非限定的な例としては、上記に記載される任意のもの、例えば、C I I T A、B 2 M、N L R C 5、H L A - A、H L A - B、H L A - C、L R C 5、R F X - A N K、R F X 5、R F X - A P、N F Y - A、N F Y - B、N F Y - C、I R F 1、及びT A P 1のうちの1つ以上が挙げられる。幾つかの実施形態では、1種以上の標的ポリヌクレオチドの発現を低減するための改変は、目的の導入遺伝子、例えば、セクションII.Bに記載される任意のものの発現を増加させるための1種以上の改変と組み合わせられる。幾つかの実施形態では、改変により、免疫特権のある細胞または低免疫原性細胞である遺伝子操作された細胞が作製される。1種または複数種の標的ポリヌクレオチドの発現を調節する(例えば、低減または除去する)ことにより、かかる細胞は、レシピエント対象に移植される場合に、低減された免疫活性化を示す。幾つかの実施形態では、細胞は、投与された際に、例えば、レシピエント対象または患者において、低免疫原性であるとみなされる。

10

【0365】

標的ポリヌクレオチドの発現を低減するための任意の方法が使用され得る。幾つかの実施形態では、改変は、標的ポリヌクレオチドの発現の永続的な除去または低減をもたらす。例えば、幾つかの実施形態では、標的ポリヌクレオチドまたは遺伝子は、例えば、標的化エンドヌクレアーゼを使用することによって、標的ポリヌクレオチドのDNA切断を導入することにより破壊される。他の実施形態では、改変は、標的ポリヌクレオチドの発現の一過性の低減をもたらす。例えば、幾つかの実施形態では、遺伝子抑制は、遺伝子の発現を選択的に阻害または抑制するための、標的ポリヌクレオチドに相補的な抑制性核酸を使用して、例えば、アンチセンス技術を使用して、例えば、RNA干渉(RNAi)、低分子干渉RNA(s iRNA)、短鎖ヘアピン(s hRNA)、及び／またはリボザイムにより達成される。

20

【0366】

幾つかの実施形態では、標的ポリヌクレオチド配列は、ゲノム配列である。幾つかの実施形態では、標的ポリヌクレオチド配列は、ヒトゲノム配列である。幾つかの実施形態では、標的ポリヌクレオチド配列は、哺乳動物ゲノム配列である。幾つかの実施形態では、標的ポリヌクレオチド配列は、脊椎動物ゲノム配列である。

【0367】

幾つかの実施形態では、遺伝子破壊は、通常は標的化した様式での遺伝子における1つ以上の二本鎖切断及び／または1つ以上の一本鎖切断の導入により実行される。幾つかの実施形態では、二本鎖または一本鎖切断は、ヌクレアーゼ、例えば、エンドヌクレアーゼ、例えば、遺伝子標的化ヌクレアーゼにより作られる。幾つかの実施形態では、標的化ヌクレアーゼは、遺伝子またはその一部の配列に標的化されるように専用に設計された、ジंकフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、及びRNA誘導型ヌクレアーゼ、例えば、CRISPR関連ヌクレアーゼ(Cas)から選択される。幾つかの実施形態では、標的化ヌクレアーゼは、二本鎖または一本鎖切断を生成し、次いで、これはエラーを起こしやすい非相同末端結合(NHEJ)、または場合によっては、テンプレートが使用される正確な相同組換え修復(HDR)による修復を受ける。幾つかの実施形態では、標的化ヌクレアーゼは、DNA二本鎖切断(DSB)を生成する。幾つかの実施形態では、切断を生じさせ、それを修復するプロセスは、通常、エラーを起こしやすく、NHEJ修復によるDNA塩基の挿入及び欠失(インデル)をもたらす。幾つかの実施形態では、改変は、標的遺伝子のヌクレオチド配列の欠失、挿入、または変異を誘発し得る。幾つかの例では、改変は、フレームシフト変異をもたらし得、これは未成熟終止コドンをもたらし得る。ヌクレアーゼにより媒介される遺伝子編集の例では、標的編集は、遺伝子の両方のアレルで発生し、これにより、遺伝子の両アレル破壊または編集をもたらす。幾つかの実施形態では、遺伝子の全てのアレルが遺伝子編集による標的とされる。幾つかの実施形態では、例えば、CRISPR/Casシステムを使用する、標的化ヌクレアーゼによる改変は、遺伝子の完全なノックアウトをも

30

40

50

たらず。

【0368】

幾つかの実施形態では、ヌクレアーゼ、例えば、レアカットエンドヌクレアーゼが、標的ポリヌクレオチド配列を含有する細胞に導入される。ヌクレアーゼは、ヌクレアーゼをコードする核酸の形態で細胞に導入され得る。核酸を細胞に導入するプロセスは、任意の好適な技術により達成され得る。好適な技術としては、リン酸カルシウムまたは脂質により媒介される形質移入、エレクトロポレーション、及びウイルスベクターを使用した形質導入または感染が挙げられる。幾つかの実施形態では、細胞に導入される核酸は、DNAである。幾つかの実施形態では、ヌクレアーゼは、タンパク質の形態で細胞に導入される。例えば、CRISPR/Casシステムの場合、リボ核タンパク質(RNP)が細胞に導入され得る。

10

【0369】

幾つかの実施形態では、改変は、CRISPR/Casシステムを使用して行われる。細胞内の標的ポリヌクレオチド配列を変化させることができる任意のCRISPR/Casシステムが使用され得る。かかるCRISPR-Casシステムは、種々のCasタンパク質を用い得る(Haft et al., PLoS Comput Biol. 2005; 1(6)e60)。CRISPR/Casシステムが細胞内の標的ポリヌクレオチド配列を変化させるのを可能にするかかるCasタンパク質の分子機構は、RNA結合タンパク質、エンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼ、ヘリカーゼ、ならびにポリメラーゼを含む。幾つかの実施形態では、CRISPR/Casシステムは、I型CRISPRシステムである。幾つかの実施形態では、CRISPR/Casシステムは、II型CRISPRシステムである。幾つかの実施形態では、CRISPR/Casシステムは、V型CRISPRシステムである。

20

【0370】

CRISPR/Casシステムは、細胞内の任意の標的ポリヌクレオチド配列を変化させるために使用され得る標的化システムを含む。幾つかの実施形態では、本明細書において提供されるCRISPR/Casシステムは、Casタンパク質、及び標的ポリヌクレオチド配列の標的モチーフにCasタンパク質を誘導し、それにハイブリダイズすることができる1種以上、例えば、少なくとも1~2種のリボ核酸(例えば、ガイドRNA(gRNA))を含む。

30

【0371】

幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、1つ以上のアミノ酸置換または修飾を含む。幾つかの実施形態では、1つ以上アミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換を含む。幾つかの例では、置換及び/または修飾は、細胞内でのポリペプチドのタンパク質分解を予防もしくは低減することができ、及び/またはその半減期を延長することができる。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、ペプチド結合置換(例えば、尿素、チオ尿素、カルバメート、スルホニル尿素など)を含み得る。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、天然に存在するアミノ酸を含み得る。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、代替アミノ酸(例えば、D-アミノ酸、β-アミノ酸、ホモシステイン、ホスホセリンなど)を含み得る。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、部分を含ませるための修飾を含み得る(例えば、PEG化、グリコシル化、脂質化、アセチル化、末端キャップ形成など)。

40

【0372】

幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、コアCasタンパク質を含む。例示的なCasコアタンパク質としては、限定されるものではないが、Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、及びCas9が挙げられる。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、E. coli サブタイプのCasタンパク質(CASS2としても公知)を含む。例示的なE. coli サブタイプのCasタンパク質としては、限定されるものではないが、Cse1、Cse2、Cse3、Cse4、及びCas5eが挙げられる。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、Ypes

50

t サブタイプの Cas タンパク質 (CASS3 としても公知) を含む。例示的な Ypest サブタイプの Cas タンパク質としては、限定されるものではないが、Csy1、Csy2、Csy3、及び Csy4 が挙げられる。幾つかの実施形態では、Cas タンパク質は、Nmen1 サブタイプの Cas タンパク質 (CASS4 としても公知) を含む。例示的な Nmen1 サブタイプの Cas タンパク質としては、限定されるものではないが、Csn1 及び Csn2 が挙げられる。幾つかの実施形態では、Cas タンパク質は、Dvulg サブタイプの Cas タンパク質 (CASS1 としても公知) を含む。例示的な Dvulg サブタイプの Cas タンパク質としては、Csd1、Csd2、及び Cas5d が挙げられる。幾つかの実施形態では、Cas タンパク質は、Tneap サブタイプの Cas タンパク質 (CASS7 としても公知) を含む。例示的な Tneap サブタイプの Cas タンパク質としては、限定されるものではないが、Cst1、Cst2、Cas5t が挙げられる。幾つかの実施形態では、Cas タンパク質は、Hmar1 サブタイプの Cas タンパク質を含む。Hmar1 サブタイプの例示的な Cas タンパク質としては、限定されるものではないが、Csh1、Csh2、及び Cas5h が挙げられる。幾つかの実施形態では、Cas タンパク質は、Apern サブタイプの Cas タンパク質 (CASS5 としても公知) を含む。例示的な Apern サブタイプの Cas タンパク質としては、限定されるものではないが、Csa1、Csa2、Csa3、Csa4、Csa5、及び Cas5a が挙げられる。幾つかの実施形態では、Cas タンパク質は、Mtube サブタイプの Cas タンパク質 (CASS6 としても公知) を含む。例示的な Mtube サブタイプの Cas タンパク質としては、限定されるものではないが、Csm1、Csm2、Csm3、Csm4、及び Csm5 が挙げられる。幾つかの実施形態では、Cas タンパク質は、RAMP モジュール Cas タンパク質を含む。例示的な RAMP モジュール Cas タンパク質としては、限定されるものではないが、Cmr1、Cmr2、Cmr3、Cmr4、Cmr5、及び Cmr6 が挙げられる。例えば、Klompe et al., Nature 571, 219–225 (2019)、Strecker et al., Science 365, 48–53 (2019) を参照のこと。

10

20

30

40

50

【0373】

幾つかの実施形態では、本開示の CRISPR システムは、TnpB ポリペプチドを含む。幾つかの実施形態では、TnpB ポリペプチドは、RuvC 様ドメインを含み得る。RuvC ドメインは、RuvC-I、RuvC-II、及び RuvC-IIII サブドメインを含む分割された RuvC ドメインであり得る。幾つかの実施形態では、TnpB は、HTH ドメイン、ブリッジヘリックスドメイン、及びジンクフィンガードメインのうちの 1 つ以上更に含み得る。TnpB ポリペプチドは、HNH ドメインを含まない。幾つかの実施形態では、TnpB タンパク質は、N 末端から開始して、HTH ドメイン、RuvC-I サブドメイン、ブリッジヘリックスドメイン、RuvC-II サブドメイン、ジンクフィンガードメイン、及び RuvC-IIII サブドメインを含む。幾つかの実施形態では、RuvC-IIII サブドメインは、TnpB ポリペプチドの C 末端を形成する。幾つかの実施形態では、TnpB ポリペプチドは、Epsilonproteobacteria 綱の細菌、Actinoplanes lobatus DSM 43150 株、Actinomadura cellulosilytica DSM 45823 株、Actinomadura namibiensis DSM 44197 株、Alicyclobacillus macrosprangiidus DSM 17980 株、Lipingzhangelia halophila DSM 102030 株、または Ktedonobacter racemifer に由来する。幾つかの実施形態では、TnpB ポリペプチドは、Ktedonobacter racemifer に由来するか、または K. racemifer の TnpB 遺伝子座の 5' ITR との類似性を有する保存された RNA 領域を含む。幾つかの実施形態では、TnpB は、真核生物ゲノムに見出される TnpB ホモログである Fanzor タンパク質を含み得る。幾つかの実施形態では、TnpB ポリペプチドを含む CRISPR システムは、標的ポリヌクレオチドの 5' 側の標的隣接モチーフ (TAM) 配列に結合する。幾つかの実施形態では、TAM は

、トランスポゾン関連モチーフである。幾つかの実施形態では、T A M配列は、T C Aを含む。幾つかの実施形態では、T A M配列は、T T C A Nを含む。幾つかの実施形態では、T A M配列は、T T G A Tを含む。幾つかの実施形態では、T A M配列は、A T A A Aを含む。

【0374】

幾つかの実施形態では、細胞を遺伝子改変して、1つ以上の遺伝子をノックアウト、ノックダウン、または別様に改変するための方法は、例えば、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)、メガヌクレアーゼ、トランスポザーゼ、及びクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート (C R I S P R) / C a sシステムが含まれる、部位特異的ヌクレアーゼを使用することを含む。

10

【0375】

Z F Nは、細菌の F o k I制限酵素のエンドヌクレアーゼドメインに結合された、ジンクフィンガー含有転写因子から応用された一連の部位特異的DNA結合ドメインを含む融合タンパク質である。Z F Nは、1個以上 (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上) のDNA結合ドメインまたはジンクフィンガードメインを有し得る。例えば、Carroll et al., Genetics Society of America (2011) 188:773-782、Kim et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93:1156-1160を参照のこと。各ジンクフィンガードメインは、1個以上の亜鉛イオンにより安定化された小さなタンパク質構造モチーフであり、通常、3~4 bpのDNA配列を認識する。従って、タンデムドメインは、細胞のゲノム内で固有である拡張されたヌクレオチド配列に結合できる可能性がある。

20

【0376】

特異性が既知の種々のジンクフィンガーを組み合わせ、約6、9、12、15、または18 bpの配列を認識するマルチフィンガーポリペプチドを作製することができる。ファジーディスプレイ、酵母ワンハイブリッドシステム、細菌ワンハイブリッド及びツーハイブリッドシステム、ならびに哺乳動物細胞が含まれる、特定の配列を認識するジンクフィンガー (及びその組み合わせ) を作製するための種々の選択及びモジュール式組立て技術が利用可能である。ジンクフィンガーは、所定の核酸配列に結合するように遺伝子操作され得る。所定の核酸配列に結合するようにジンクフィンガーを遺伝子操作するための条件は、当該技術分野において公知である。例えば、Sera et al., Biochemistry (2002) 41:7074-7081、Liu et al., Bioinformatics (2008) 24:1850-1857を参照のこと。

30

【0377】

F o k Iヌクレアーゼドメインまたは他の二量体ヌクレアーゼドメインを含有するZ F Nは、二量体として機能する。従って、非回文構造のDNA部位を標的とするために一对のZ F Nが必要とされる。2つの個々のZ F Nは、それらのヌクレアーゼが適切に離れた状態でDNAの対向する鎖に結合しなければならない。Bitinaite et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 95:10570-10575を参照のこと。ゲノム内の特定の部位を切断するために、一对のZ F Nは、当該部位に隣接する2つの配列を認識するように設計され、一方が順鎖に存在し、他方が逆鎖上に存在する。Z F Nが当該部位の両側に結合すると、ヌクレアーゼドメインは二量体化し、当該部位にてDNAを切断し、5' オーバーハングを伴うDSBを生じさせる。次いで、相同性アームに挟まれた所望の変異を含む修復テンプレートを用いて特定の変異を導入するために、HDRが利用され得る。修復テンプレートは、通常、細胞に導入される外来性二本鎖DNAベクターである。Miller et al., Nat. Biotechnol. (2011) 29:143-148、Hockemeyer et al., Nat. Biotechnol. (2011) 29:731-734を参照のこと。

40

50

【0378】

T A L E N は、標的遺伝子を編集するために使用され得る人工ヌクレアーゼの別の例である。T A L E N は、通常、10～30リピートを有するタンデムアレイを含むT A L E リピートと称されるDNA結合ドメインに由来し、当該タンデムアレイは、拡張されたDNA配列に結合し、それを認識する。各リピートは、33～35アミノ酸の長さであり、4つのDNA塩基対のうちの1つに対する特異性を付与する2個の隣接するアミノ酸（反復可変二残基またはRVDと称される）を有する。従って、リピートと標的DNA配列の塩基対との間には1対1の対応が存在する。

【0379】

T A L E N は、1個以上のT A L E DNA結合ドメイン（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上）をヌクレアーゼドメイン、例えば、FokIエンドヌクレアーゼドメインと融合させることによって人工的に作製される。Zhang, Nature Biotech. (2011) 29:149-153を参照のこと。T A L E Nにおける使用に向けてFokIに対する幾つかの変異が作製されており、これらは、例えば、切断特異性または活性を改善する。Cermak et al., Nucleic Acids Res. (2011) 39:e82、Miller et al., Nature Biotech. (2011) 29:143-148、Hockemeyer et al., Nature Biotech. (2011) 29:731-734、Wood et al., Science (2011) 333:307、Doyon et al., Nature Methods (2010) 8:74-79、Szczepiek et al., Nature Biotech (2007) 25:786-793、Guo et al., J. Mol. Biol. (2010) 200:96を参照のこと。FokIドメインは、二量体として機能し、適切な配置及び間隔を有する標的ゲノム部位に対する固有のDNA結合ドメインを有する2つの構築物を必要とする。T A L E DNA結合ドメインとFokIヌクレアーゼドメインとの間のアミノ酸残基の数、及び2つの個々のT A L E N結合部位間の塩基の数の両方が、高レベルの活性を達成するのに重要なパラメータであるようである。Miller et al., Nature Biotech. (2011) 29:143-148。

【0380】

遺伝子操作されたT A L E リピートをヌクレアーゼドメインと組み合わせることにより、任意の所望のDNA配列に特異的な部位特異的ヌクレアーゼを作製され得る。ZFNと同様に、T A L E N は、ゲノム内の所望の標的部位でDSBを生じさせるために細胞に導入され得るため、同様のHDRにより媒介される経路で遺伝子をノックアウトまたは変異をノックインするために使用され得る。Boch, Nature Biotech. (2011) 29:135-136、Boch et al., Science (2009) 326:1509-1512、Moscov et al., Science (2009) 326:3501を参照のこと。

【0381】

メガヌクレアーゼは、大きなDNA配列（14～40塩基対）を認識し、それを切断する能力を特徴とするエンドヌクレアーゼファミリーの酵素である。メガヌクレアーゼは、ヌクレアーゼ活性及び／またはDNA認識に影響を及ぼすそれらの構造モチーフに基づいてファミリーに分類される。最も広範囲かつ最もよく知られているメガヌクレアーゼは、LAGLIDADGファミリーのタンパク質であり、それらの名称は保存されたアミノ酸配列に由来する。Chevalier et al., Nucleic Acids Res. (2001) 29(18):3757-3774を参照のこと。一方で、GIY-YIGファミリーメンバーは、70～100残基の長さであるGIY-YIGモジュールを有し、4つの不変残基を有する4または5つの保存された配列モチーフを含み、そのうちの2つが活性に必要とされる。Van Roey et al., Nature Struct. Biol. (2002) 9:806-811を参照のこと。His-Cysファミリーメガヌクレアーゼは、数百のアミノ酸残基を包含する領域にわたる高度に保

存されたヒスチジン及びシステインの配列を特徴とする。Chevalier et al., Nucleic Acids Res. (2001) 29 (18) : 3757-3774を参照のこと。NHNファミリーのメンバーは、アスパラギン残基によって囲まれた2対の保存されたヒスチジンを含有するモチーフによって定義される。Chevalier et al., Nucleic Acids Res. (2001) 29 (18) : 3757-3774を参照のこと。

【0382】

高い特異性が要求されることに起因して、特定の標的DNA配列のための天然メガヌクレアーゼを同定する可能性は低いため、変異誘発及びハイスループットスクリーニング法を含む様々な方法が、ユニーク配列を認識するメガヌクレアーゼバリエーションを作製するために使用されてきた。例えば、所定の核酸配列に結合するようにDNA結合特異性が変化したメガヌクレアーゼを開発するための戦略は、当技術分野において公知である。例えば、Chevalier et al., Mol. Cell. (2002) 10:895-905、Epinat et al., Nucleic Acids Res (2003) 31:2952-2962、Silva et al., J Mol Biol. (2006) 361:744-754、Seligman et al., Nucleic Acids Res (2002) 30:3870-3879、Sussman et al., J Mol Biol (2004) 342:31-41、Doyon et al., J Am Chem Soc (2006) 128:2477-2484、Chen et al., Protein Eng Des Sel (2009) 22:249-256、Arnould et al., J Mol Biol. (2006) 355:443-458、Smith et al., Nucleic Acids Res. (2006) 363 (2) : 283-294を参照のこと。

【0383】

ZFN及びTALENと同様に、メガヌクレアーゼは、ゲノムDNAにDSBを生じさせることができ、これは、例えば、NHEJにより不適当に修復される場合にフレームシフト変異を生じさせ得、これにより、細胞における標的遺伝子の発現の減少をもたらす。代替的に、外来DNAがメガヌクレアーゼと共に細胞に導入され得る。外来DNAの配列及び染色体配列に応じて、このプロセスは、標的遺伝子を改変するために使用され得る。Silva et al., Current Gene Therapy (2011) 11:11-27を参照のこと。

【0384】

トランスポザーゼは、トランスポゾンの末端に結合し、カット&ペーストメカニズムまたは複製的転移メカニズムによりゲノムの別の部分へのその移動を触媒する酵素である。トランスポザーゼを他のシステム、例えば、CRISPR/Casシステムに連結させることにより、ゲノムDNAの部位特異的挿入または操作を可能にするための新たな遺伝子編集ツールが開発され得る。トランスポゾンを使用する2つの公知のDNA組み込み方法が存在し、これらは触媒活性のないCasエフェクタータンパク質及びTn7様トランスポゾンを使用する。トランスポザーゼ依存的DNA組み込みは、ゲノムにDSBを誘発せず、このことは、より安全かつより特異的なDNA組み込みを保証し得る。

【0385】

CRISPRシステムは、侵入したファージ及びプラスミドに対する防御に関与する、獲得免疫の一形態を提供するシステムとして原核生物（例えば、細菌及び古細菌）において最初に発見された。現在では、研究及び臨床用途において一般的な遺伝子編集ツールとして応用及び使用されている。

【0386】

CRISPR/Casシステムは、通常、以下の少なくとも2つの構成要素を含む：1種以上のガイドRNA (gRNA) 及びCasタンパク質。Casタンパク質は、標的部位にDSBを導入するヌクレアーゼである。CRISPR-Casシステムは、2つの主要なクラスに分類され、クラス1システムは、核酸を分解するために複数のCasタンパ

ク質の複合体を使用し、クラス2システムは、同じ目的のために単一の大きなCasタンパク質を使用する。クラス1は、I型、III型、及びIV型に分類され、クラス2は、II型、V型、及びVI型に分類される。遺伝子編集用途に適した種々のCasタンパク質としては、限定されるものではないが、Cas3、Cas4、Cas5、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a (Cpf1)、Cas12b (C2c1)、Cas12c (C2c3)、Cas12d (CasY)、Cas12e (CasX)、Cas12f (C2c10)、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k (C2c5)、Cas13、Cas13a (C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr5、Cse1、Cse2、Csf1、Csm2、Csn2、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3、及びMad7が挙げられる。最も広く使用されているCas9は、II型Casタンパク質であり、例示として本明細書に記載されている。これらのCasタンパク質は、異なる供給源種に由来し得る。例えば、Cas9は、*S. pyogenes*または*S. aureus*に由来し得る。

10

20

30

40

50

【0387】

元の微生物ゲノムにおいて、II型CRISPRシステムは、宿主ゲノム内でアレイとしてコードされるCRISPRリピート配列の間に侵入したDNA由来の配列を組み込んでいる。CRISPRリピートアレイからの転写物は、侵入したDNAから転写された「プロトスペーサー」配列として公知の可変配列、及びCRISPRリピートの一部を各々が保有するCRISPR RNA (crRNA) へとプロセッシングされる。各crRNAは、第2のトランス活性化CRISPR RNA (tracrRNA) とハイブリダイズし、これらの2つのRNAは、Cas9ヌクレアーゼと複合体を形成する。crRNAのプロトスペーサーによりコードされる部分は、相補的な標的DNA配列を切断するようにCas9複合体を誘導するが、ただし、相補的な標的DNA配列は、「プロトスペーサー隣接モチーフ」(PAM)として公知の短い配列に隣接している。

【0388】

その発見以来、CRISPRシステムは、細菌からヒト細胞を含め真核細胞にわたる広範囲の細胞及び生物において配列特異的DSB及び標的ゲノム編集を誘発するために応用されてきた。遺伝子編集用途でのその使用において、人工的に設計された合成gRNAが、本来のcrRNA:tracrRNA複合体と置き換わっている。例えば、gRNAは、crRNA、テトラループ、及びtracrRNAから構成されるシングルガイドRNA (sgRNA) であり得る。crRNAは、通常、関心対象の標的DNAを認識するように使用者が設計した相補的領域(スペーサーとも称され、通常は約20ヌクレオチドの長さである)を含む。tracrRNA配列は、Casヌクレアーゼ結合のための足場領域を含む。crRNA配列及びtracrRNA配列は、テトラループにより連結されており、各々が互いにハイブリダイゼーションするための短いリピート配列を有し、これにより、キメラsgRNAが生成される。gRNAに存在するスペーサーまたは相補的領域配列を単純に変更することによりCasヌクレアーゼのゲノム標的を変更することができる。相補的領域は、標準的なRNA-DNA相補的塩基対形成則によりCasヌクレアーゼを標的DNA部位に誘導する。

【0389】

Casヌクレアーゼが機能するためには、ゲノムDNAの標的配列のすぐ下流にPAMが存在しなければならない。Casタンパク質によるPAMの認識は、隣接するゲノム配列を不安定化し、これにより、gRNAによる配列の調査を可能にし、一致する配列が存在する場合にgRNA-DNA対合をもたらすと考えられている。PAMの具体的な配列は、Cas遺伝子の種に応じて異なる。例えば、*S. pyogenes*に由来する最も一般的に使用されるCas9ヌクレアーゼは、5'-NGG-3'のPAM配列、またはより効率の低い速度で5'-NAG-3'のPAM配列を認識し、ここで、「N」は任意のヌクレオチドであり得る。代替的PAMを有する他のCasヌクレアーゼバリエーションも特徴付けられ、ゲノム編集に成功裏に使用されており、それらを以下の表1aに要約する。表5

・ 例示的な Cas ヌクレアーゼバリエーション及びそれらの PAM 配列

【表 5】

表 5. 例示的な Cas ヌクレアーゼバリエーション及びそれらの PAM 配列

CRI SPR ヌクレアーゼ	供給源生物	PAM 配列 (5' → 3')
SpCas9	<i>Streptococcus pyogenes</i>	NGG または NAG
SaCas9	<i>Staphylococcus aureus</i>	NGRRT または NGRRN
NmeCas9	<i>Neisseria meningitidis</i>	NNNGATT
CjCas9	<i>Campylobacter jejuni</i>	NNNRYAC
StCas9	<i>Streptococcus thermophilus</i>	NNAGAAW
TdCas9	<i>Treponema denticola</i>	NAAAAC
LbCas12a (Cpf1)	<i>Lachnospiraceae bacterium</i>	TTTV
AsCas12a (Cpf1)	<i>Acidaminococcus sp.</i>	TTTV
AacCas12b	<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	TTN
BhCas12b v4	<i>Bacillus hisashii</i>	ATTN、TTTN、または GTTN

R=A または G ; Y=C または T ; W=A または T ; V=A または C または G ; N=任意の塩基

10

【0390】

幾つかの実施形態では、Cas ヌクレアーゼは、それらの活性、特異性、認識、及び／または他の特徴を変化させるための 1 つ以上の変異を含み得る。例えば、Cas ヌクレアーゼは、オフターゲット効果を軽減するためにその忠実度を変化させる 1 つ以上の変異を有し得る（例えば、SpCas9 の eSpCas9、SpCas9-HF1、HypaSpCas9、HeFSpCas9、及び evoSpCas9 高忠実度バリエーション）。別の例では、Cas ヌクレアーゼは、その PAM 特異性を変化させる 1 つ以上の変異を有し得る。

20

【0391】

幾つかの実施形態では、Cas タンパク質は、本明細書に記載される Cas タンパク質またはその機能部分のいずれかを含む。本明細書で使用する場合、「機能部分」は、少なくとも 1 種のリボ核酸（例えば、ガイド RNA (gRNA)）と複合体を形成し、標的ポリヌクレオチド配列を切断するペプチドの能力を保持しているそのペプチドの一部を指す。幾つかの実施形態では、機能部分は、DNA 結合ドメイン、少なくとも 1 つの RNA 結合ドメイン、ヘリカーゼドメイン、及びエンドヌクレアーゼドメインからなる群から選択される作動可能に連結された Cas9 タンパク質機能ドメインの組み合わせを含む。幾つかの実施形態では、機能部分は、DNA 結合ドメイン、少なくとも 1 つの RNA 結合ドメイン、ヘリカーゼドメイン、及びエンドヌクレアーゼドメインからなる群から選択される作動可能に連結された Cas12a (Cpf1 としても公知) タンパク質機能ドメインの組み合わせを含む。幾つかの実施形態では、機能ドメインは、複合体を形成する。幾つかの実施形態では、Cas9 タンパク質の機能部分は、RuvC 様ドメインの機能部分を含む。幾つかの実施形態では、Cas9 タンパク質の機能部分は、HNH ヌクレアーゼドメインの機能部分を含む。幾つかの実施形態では、Cas12a タンパク質の機能部分は、RuvC 様ドメインの機能部分を含む。

30

40

【0392】

幾つかの実施形態では、好適な Cas タンパク質としては、限定されるものではないが、Cas0、Cas12a（すなわち、Cpf1）、Cas12b、Cas12i、CasX、及び Mad7 が挙げられる。

【0393】

幾つかの実施形態では、外来性 Cas タンパク質は、ポリペプチド形態で細胞に導入され得る。ある特定の実施形態では、Cas タンパク質は、細胞膜透過性ポリペプチドまたは細胞貫通ペプチドとコンジュゲートまたは融合され得る。本明細書で使用する場合、「

50

細胞膜透過性ポリペプチド」及び「細胞貫通ペプチド」は、それぞれ、細胞内への分子の取り込みを促進するポリペプチドまたはペプチドを指す。細胞膜透過性ポリペプチドは、検出可能な標識を含有し得る。

【0394】

ある特定の実施形態では、Casタンパク質は、荷電したタンパク質（例えば、正電荷、負電荷、または全体として中性電荷を有するもの）とコンジュゲートまたは融合され得る。かかる結合は共有結合であり得る。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、Casタンパク質が細胞を透過する能力を顕著に増強するために、正に超荷電したGFPと融合され得る（Cronican et al., ACS Chem Biol. 2010; 5(8): 747-52）。ある特定の実施形態では、Casタンパク質は、Casタンパク質の細胞への進入を促進するために、タンパク質導入ドメイン（PTD）と融合され得る。例示的なPTDとしては、Tat、オリゴアルギニン、及びペネトラチンが挙げられる。幾つかの実施形態では、Cas9タンパク質は、細胞貫通ペプチドに融合されたCas9ポリペプチドを含む。幾つかの実施形態では、Cas9タンパク質は、PTDに融合されたCas9ポリペプチドを含む。幾つかの実施形態では、Cas9タンパク質は、Tatドメインに融合されたCas9ポリペプチドを含む。幾つかの実施形態では、Cas9タンパク質は、オリゴアルギニンドメインに融合されたCas9ポリペプチドを含む。幾つかの実施形態では、Cas9タンパク質は、ペネトラチンドメインに融合されたCas9ポリペプチドを含む。幾つかの実施形態では、Cas9タンパク質は、正に超荷電したGFPに融合されたCas9ポリペプチドを含む。幾つかの実施形態では、Cas12aタンパク質は、細胞貫通ペプチドに融合されたCas12aポリペプチドを含む。幾つかの実施形態では、Cas12aタンパク質は、PTDに融合されたCas12aポリペプチドを含む。幾つかの実施形態では、Cas12aタンパク質は、tatドメインに融合されたCas12aポリペプチドを含む。幾つかの実施形態では、Cas12aタンパク質は、オリゴアルギニンドメインに融合されたCas12aポリペプチドを含む。幾つかの実施形態では、Cas12aタンパク質は、ペネトラチンドメインに融合されたCas12aポリペプチドを含む。幾つかの実施形態では、Cas12aタンパク質は、正に超荷電したGFPに融合されたCas12aポリペプチドを含む。

【0395】

幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、Casタンパク質をコードする核酸の形態で標的ポリヌクレオチド配列を含有する細胞に導入され得る。核酸を細胞に導入するプロセスは、任意の好適な技術により達成され得る。好適な技術としては、リン酸カルシウムまたは脂質により媒介される形質移入、エレクトロポレーション、及びウイルスベクターを使用した形質導入または感染が挙げられる。幾つかの実施形態では、核酸は、DNAを含む。幾つかの実施形態では、核酸は、本明細書に記載されるように、修飾DNAを含む。幾つかの実施形態では、核酸は、mRNAを含む。幾つかの実施形態では、核酸は、本明細書に記載されるように、修飾mRNA（例えば、合成の修飾mRNA）を含む。

【0396】

提供される実施形態では、CRISPR/Casシステムは、通常、以下の2つの構成要素を含む：1種以上のガイドRNA（gRNA）及びCasタンパク質。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、1種以上、例えば、1～2種のリボ核酸（例えば、ガイドRNA（gRNA））と複合体を形成している。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、2つのリボ核酸と複合体を形成している。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、1つのリボ核酸と複合体を形成している。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、本明細書に記載されるような修飾核酸（例えば、合成修飾mRNA）によりコードされる。

【0397】

幾つかの実施形態では、gRNAは、Cas結合のための足場配列、及び使用者により設計されたcrRNAと称されるスペーサーまたは相補的部分から構成される合成短鎖RNAである。crRNAは、改変されるべきゲノム標的を規定するcrRNA標的化配列（

以下で gRNA 標的化配列とも称される；通常約 20 ヌクレオチドの長さ）及び crRNA リピートの領域（例えば、GUUUUAGAGCUA；配列番号 19）から構成される。gRNA に存在する相補的部分の配列（例えば、gRNA 標的化配列）を単純に変更することにより Cas タンパク質のゲノム標的を変更することができる。幾つかの実施形態では、Cas 結合のための足場配列は、tracrRNA 配列（例えば、UAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU；配列番号 20）から構成され、tracrRNA は、そのアンチリピート配列により crRNA にハイブリダイズする。crRNA：tracrRNA 間の複合体は、Cas ヌクレアーゼ（例えば、Cas 9）を動員し、プロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）の上流で切断する。Cas タンパク質が機能するためには、ゲノム DNA の標的配列のすぐ下流に PAM が存在しなければならない。Cas タンパク質による PAM の認識は、隣接するゲノム配列を不安定化し、これにより、gRNA による配列の調査を可能にし、一致する配列が存在する場合に gRNA-DNA 対合をもたらすと考えられている。PAM の具体的な配列は、Cas 遺伝子の種に応じて異なる。例えば、S. pyogenes に由来する最も一般的に使用される Cas 9 ヌクレアーゼは、NGG の PAM 配列を認識する。代替的 PAM を有する他の Cas 9 バリエーション及び他のヌクレアーゼも特徴付けられ、ゲノム編集に成功裏に使用されている。従って、CRISPR/Cas システムは、標的位置用に設計された gRNA に相補的な特定のゲノム位置で標的化 DSB を生じさせるために使用され得る。crRNA 及び tracrRNA は、キメラ単鎖ガイド RNA（sgRNA；Hsu et al., 2013）である gRNA の作製のために、ループ配列（例えば、テトラループ；GAAA）により互いに連結され得る。

10

20

【0398】

幾つかの実施形態では、gRNA の相補的部分の配列（例えば、gRNA 標的化配列）は、関心対象の標的部位に応じて異なる。幾つかの実施形態では、gRNA は、表 1a に記載される遺伝子の配列に特異的な相補的部分を含む。幾つかの実施形態では、gRNA により標的とされるゲノム遺伝子座は、記載される遺伝子座のいずれかの 4000 bp の範囲内、3500 bp の範囲内、3000 bp の範囲内、2500 bp の範囲内、2000 bp の範囲内、1500 bp の範囲内、1000 bp の範囲内、または 500 bp の範囲内に存在する。

30

【0399】

本明細書において開示される方法は、標的ポリヌクレオチド配列の標的モチーフに Cas タンパク質を誘導し、それにハイブリダイズすることができる任意のリボ核酸の使用を意図する。幾つかの実施形態では、リボ核酸のうちの少なくとも 1 種は、を含む

【0400】

幾つかの実施形態では、Cas タンパク質は、1～2 つのリボ核酸（例えば、ガイド RNA（gRNA））と複合体を形成している。幾つかの実施形態では、Cas タンパク質は、2 つのリボ核酸と複合体を形成している。幾つかの実施形態では、Cas タンパク質は、1 つのリボ核酸と複合体を形成している。幾つかの実施形態では、Cas タンパク質は、本明細書に記載されるような修飾核酸（例えば、合成修飾 mRNA）によりコードされる。

40

【0401】

本明細書において開示される方法は、標的ポリヌクレオチド配列の標的モチーフに Cas タンパク質を誘導し、それにハイブリダイズすることができる任意のリボ核酸の使用を意図する。幾つかの実施形態では、リボ核酸のうちの少なくとも 1 種は、tracrRNA を含む。幾つかの実施形態では、リボ核酸のうちの少なくとも 1 種は、CRISPR RNA（crRNA）を含む。幾つかの実施形態では、単一のリボ核酸が、細胞内の標的ポリヌクレオチド配列の標的モチーフに Cas タンパク質を誘導し、それにハイブリダイズするガイド RNA を含む。幾つかの実施形態では、リボ核酸のうちの少なくとも 1 種が、細胞内の標的ポリヌクレオチド配列の標的モチーフに Cas タンパク質を誘導し、それに

50

ハイブリダイズするガイドRNAを含む。幾つかの実施形態では、1～2種のリボ核酸の両方が、細胞内の標的ポリヌクレオチド配列の標的モチーフにCasタンパク質を誘導し、それにハイブリダイズするガイドRNAを含む。当業者によって理解されるように、本明細書において提供されるリボ核酸は、用いられる特定のCRISPR/Casシステム及び標的ポリヌクレオチドの配列に応じて、種々の異なる標的モチーフにハイブリダイズするように選択され得る。また1～2種のリボ核酸は、標的ポリヌクレオチド配列以外の核酸配列とのハイブリダイゼーションを最小限にするように選択され得る。幾つかの実施形態では、1～2種のリボ核酸は、細胞内の他の全てのゲノムヌクレオチド配列と比較した場合に少なくとも2つのミスマッチを有する標的モチーフにハイブリダイズする。幾つかの実施形態では、1～2種のリボ核酸は、細胞内の他の全てのゲノムヌクレオチド配列と比較した場合に少なくとも1つのミスマッチを有する標的モチーフにハイブリダイズする。幾つかの実施形態では、1～2種のリボ核酸は、Casタンパク質により認識されるデオキシリボ核酸モチーフに直接隣接する標的モチーフにハイブリダイズするように設計される。幾つかの実施形態では、1～2種のリボ核酸の各々は、Casタンパク質により認識されるデオキシリボ核酸モチーフに直接隣接する標的モチーフにハイブリダイズするように設計され、当該デオキシリボ核酸モチーフは、当該標的モチーフの間に存在する変異アレルに隣接する。

10

【0402】

幾つかの実施形態では、1～2種のリボ核酸の各々は、細胞内の標的ポリヌクレオチド配列の標的モチーフにCasタンパク質を誘導し、それにハイブリダイズするガイドRNAを含む。

20

【0403】

幾つかの実施形態では、1または2種のリボ核酸（例えば、ガイドRNA）は、標的ポリヌクレオチド配列の同じ鎖上の配列に相補的であり、及び／またはそれにハイブリダイズする。幾つかの実施形態では、1または2種のリボ核酸（例えば、ガイドRNA）は、標的ポリヌクレオチド配列の対向する鎖上の配列に相補的であり、及び／またはそれにハイブリダイズする。幾つかの実施形態では、1または2種のリボ核酸（例えば、ガイドRNA）は、標的ポリヌクレオチド配列の対向する鎖上の配列に相補的ではなく、及び／またはそれにハイブリダイズしない。幾つかの実施形態では、1または2種のリボ核酸（例えば、ガイドRNA）は、標的ポリヌクレオチド配列の重複する標的モチーフに相補的であり、及び／またはそれにハイブリダイズする。幾つかの実施形態では、1または2種のリボ核酸（例えば、ガイドRNA）は、標的ポリヌクレオチド配列のオフセットをもつ標的モチーフに相補的であり、及び／またはそれにハイブリダイズする。

30

【0404】

幾つかの実施形態では、Casタンパク質をコードする核酸、及び少なくとも1～2種のリボ核酸をコードする核酸は、ウイルス形質導入（例えば、レンチウイルス形質導入）により細胞に導入される。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、1～2つのリボ核酸と複合体を形成している。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、2つのリボ核酸と複合体を形成している。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、1つのリボ核酸と複合体を形成している。幾つかの実施形態では、Casタンパク質は、本明細書に記載されるような修飾核酸（例えば、合成修飾mRNA）によりコードされる。

40

【0405】

本明細書に記載される遺伝子へのCRISPR/Casベースの標的化に有用な例示的なgRNA標的化配列を表6に示す。配列は、2016年5月9日に出願されたWO2016183041に見出され得、その開示は、表、付録、及び配列表を含め、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

50

【表 6】

表 6. 遺伝子標的化に有用な例示的な gRNA 標的化配列

遺伝子名	WO2016183041における配列番号	WO2016183041
HLA-A	配列番号2~1418	表8、付録1
HLA-B	配列番号1419~3277	表9、付録2
HLA-C	配列番号3278~5183	表10、付録3
RFX-ANK	配列番号95636~102318	表11、付録4
NFY-A	配列番号102319~121796	表13、付録6
RFX5	配列番号85645~90115	表16、付録9
RFX-AP	配列番号90116~95635	表17、付録10
NFY-B	配列番号121797~135112	表20、付録13
NFY-C	配列番号135113~176601	表22、付録15
IRF1	配列番号176602~182813	表23、付録16
TAP1	配列番号182814~188371	表24、付録17
CIITA	配列番号5184~36352	表12、付録5
B2M	配列番号81240~85644	表15、付録8
NLRC5	配列番号36353~81239	表14、付録7

10

【0406】

本明細書に記載される遺伝子へのCRISPR/Casベースの標的化に有用な追加の例示的なCas9ガイドRNA配列を表7に示す。表7. 遺伝子標的化に有用な追加の例示的なCas9ガイドRNA配列

【表 7】

表 7. 遺伝子標的化に有用な追加の例示的なCas9ガイドRNA配列

遺伝子	ガイド配列	PAM	標的部位	gRNA切断位置	配列番号
ABO	UCUCUCCAUGUG CAGUAGGA	AGG	エキソン7	chr9:133,257,541	201
FUT1	CUGGAUGUCGGA GGAGUACG	CGG	エキソン4	chr19:48,750,822	202
RHD	GUCUCGGAAC UCGAGGUG	AGG	エキソン2	chr1:25,284,622	203
F3 (CD142)	ACAGUGUAGACU UGAUUGAC	GGG	エキソン2	chr1:94,540,281	204
B2M	CGUGAGUAAACC UGAAUCUU	TGG	エキソン2	chr15:44,715,434	205
CIITA	GAUAUUGGCAUA AGCCUCCC	TGG	エキソン3	chr16:10,895,747	206
TRAC	AGAGUCUCUCAG CUGGUACA	CGG	エキソン1	chr14:22,5547,533	207

20

【0407】

幾つかの実施形態では、記載されるように遺伝子の発現を低減または除去するために、遺伝的破壊の方法に使用される新規の位置及び／またはgRNA標的化配列を同定することは当業者のレベルの範囲内である。例えば、CRISPR/Casシステムでは、（例えば、表1に示す標的遺伝子内の）特定の位置に対する既存のgRNA標的化配列が公知である場合、ゲノム全体で約100塩基対（bp）毎に通常出現するPAM配列の遺伝子座の両側の隣接領域を調査することにより、導入遺伝子の標的化挿入のための追加の位置を同定する「インチワーム」手法が使用され得る。異なるヌクレアーゼが異なる対応するPAM配列を通常有するため、PAM配列は、使用される特定のCasヌクレアーゼに依存する。遺伝子座の両側の隣接領域は、約500~4000bpの長さ、例えば、約500bp、約1000bp、約1500bp、約2000bp、約2500bp、約3000bp、約3500bp、または約4000bpの長さであり得る。PAM配列が調査範囲内で同定される場合、遺伝子破壊法に使用される新規のガイドがその遺伝子座の配列に従って設計され得る。CRISPR/Casシステムが例示として記載されているが、ZFN、TALEN、メガヌクレアーゼ、及びトランスポザーゼを使用するものが含まれる、記載されている任意の遺伝子編集手法が新規の遺伝子座を同定する方法に使用され得る。

30

40

【0408】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される細胞は、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）による方法を使用して作製される。「TALENヌクレアーゼ」（TALEN）は、転写活性化因子様エフェクター（TALE）に通常由来する核酸結

50

合ドメイン、及び核酸標的配列を切断するための1つのヌクレアーゼ触媒ドメインからなる融合タンパク質を意図する。触媒ドメインは、ヌクレアーゼドメインなどであり得、実施形態では、例えば、I-Tev I、Col E7、Nuc A、及びFok Iのようなエンドヌクレアーゼ活性を有するドメインであり得る。実施形態では、TALEドメインは、例えば、I-Cre I及びI-Onu Iのようなメガヌクレアーゼまたはその機能的バリエーションに融合され得る。幾つかの実施形態では、上記ヌクレアーゼは、単量体TALEヌクレアーゼである。単量体ヌクレアーゼは、特異的認識及び切断のために二量体化を必要としないヌクレアーゼ、例えば、WO 2012/138927に記載される遺伝子操作されたTALリピートとI-Tev Iの触媒ドメインとの融合物である。転写活性化因子様エフェクター (TALE) は、*Xanthomonas* 属細菌種に由来するタンパク質であり、複数の反復配列を含み、各リピートは、標的核酸配列の各ヌクレオチド塩基に特異的な二残基を12位及び13位に含む (RVD)。同様のモジュール式塩基対塩基核酸結合特性 (modular base-pair-base nucleic acid binding properties, MBBBD) を有する結合ドメインは、異なる細菌種において出願人により最近発見された新規のモジュール型タンパク質に由来してもよい。この新規のモジュール型タンパク質は、TALリピートよりも高い配列可変性を示すという利点を有する。実施形態では、異なるヌクレオチドの認識に関連するRVDは、Cを認識するためのHD、Tを認識するためのNG、Aを認識するためのNI、GまたはAを認識するためのNN、A、C、G、またはTを認識するためのNS、Tを認識するためのHG、Tを認識するためのIG、Gを認識するためのNK、Cを認識するためのHA、Cを認識するためのND、Cを認識するためのHI、Gを認識するためのHN、Gを認識するためのNA、GまたはAを認識するためのSN、及びTを認識するためのYG、Aを認識するためのTL、AまたはGを認識するためのVT、及びAを認識するためのSWである。幾つかの実施形態では、重要なアミノ酸12及び13は、それらの特異性をヌクレオチドA、T、C、及びGに向けて調節するため、ならびにこの特異性を増強するために、他のアミノ酸残基に向けて変異され得る。TALENキットは市販されている。

10

20

30

40

50

【0409】

幾つかの実施形態では、細胞は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) を使用して操作される。「ジンクフィンガー結合タンパク質」は、亜鉛イオンの配位によるタンパク質構造の安定化の結果として、例えば、配列特異的様式で、DNA、RNA、及び／またはタンパク質に結合するタンパク質またはポリペプチドである。ジンクフィンガー結合タンパク質という用語は、多くの場合、ジンクフィンガータンパク質またはZFPと略される。個々のDNA結合ドメインは、通常、「フィンガー」と称される。ZFPは、少なくとも1個のフィンガー、通常は2個のフィンガー、3個のフィンガー、または6個のフィンガーを有する。各フィンガーは、2～4塩基対のDNA、通常は3または4塩基対のDNAに結合する。ZFPは、標的部位または標的セグメントと称される核酸配列に結合する。各フィンガーは、通常、約30アミノ酸の亜鉛キレート性DNA結合サブドメインを含む。研究により、このクラスの単一のジンクフィンガーが、単一のβターンの2個のシステイン残基と共に亜鉛に配位される2個の不変のヒスチジン残基を含有するαヘリックスからなることが実証されている (例えば、Berg & Shi, Science 271:1081-1085 (1996) を参照のこと)。

【0410】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される細胞は、ホーミングエンドヌクレアーゼを使用して作製される。かかるホーミングエンドヌクレアーゼは、当該技術において周知である (Stoddard 2005)。ホーミングエンドヌクレアーゼは、DNA標的配列を認識し、一本鎖または二本鎖切断を生成する。ホーミングエンドヌクレアーゼは、非常に特異的であり、12～45塩基対 (bp) の長さの範囲、通常、14～40bpの長さの範囲のDNA標的部位を認識する。ホーミングエンドヌクレアーゼは、例えば、LAGLIDADGエンドヌクレアーゼ、HNHエンドヌクレアーゼ、またはGIY-YIGエンドヌクレアーゼに相当し得る。幾つかの実施形態では、ホーミングエンドヌクレア

ーゼは、I-CreIバリエーションであり得る。

【0411】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される細胞は、メガヌクレアーゼを使用して作製される。定義上、メガヌクレアーゼは、大きな配列を認識する配列特異的エンドヌクレアーゼである (Chevalier, B. S. and B. L. Stoddard, Nucleic Acids Res., 2001, 29, 3757-3774)。それらは、生細胞内の特異な部位を切断することができ、これにより、切断部位の近くへの遺伝子標的化を1000倍以上増強する (Puchta et al., Nucleic Acids Res., 1993, 21, 5034-5040、Rouet et al., Mol. Cell. Biol., 1994, 14, 8096-8106、Choulík et al., Mol. Cell. Biol., 1995, 15, 1968-1973、Puchta et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 5055-5060、Sargent et al., Mol. Cell. Biol., 1997, 17, 267-77、Donoho et al., Mol. Cell. Biol., 1998, 18, 4070-4078、Elliot et al., Mol. Cell. Biol., 1998, 18, 93-101、Cohen-Tannoudji et al., Mol. Cell. Biol., 1998, 18, 1444-1448)。

10

【0412】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞は、ポリペプチドの発現をノックダウンするための (例えば、減少させるか、除去するか、または阻害するための) RNAサイレンシングまたはRNA干渉 (RNAi) を使用して作製される。有用なRNAi法は、合成RNAi分子、低分子干渉RNA (siRNA)、PIWI相互作用RNA (piRNA)、低分子ヘアピン型RNA (shRNA)、マイクロRNA (miRNA)、及び当業者に認識される他の一過性ノックダウン法を利用するものを含む。配列特異的shRNA、siRNA、miRNAなどを含めたRNAiのための試薬は、市販されている。例えば、標的ポリヌクレオチド、例えば、上記に記載される任意のもの、例えば、CIITA、B2M、またはNLRC5は、標的ポリヌクレオチドの標的モチーフに相補的な抑制性核酸、例えば、siRNAを細胞に導入することによるRNA干渉により、当該細胞においてノックダウンされ得る。幾つかの実施形態では、標的ポリヌクレオチド、例えば、上記に記載される任意のもの、例えば、CIITA、B2M、またはNLRC5は、shRNAを発現するウイルスを細胞に形質導入することにより当該細胞においてノックダウンされ得る。幾つかの実施形態では、CIITA、B2M、及びNLRC5からなる群から選択される少なくとも1つの発現を低減または阻害するためにRNA干渉が用いられる。

20

30

【0413】

3. 例示的な標的ポリヌクレオチド及び発現を低減する方法

a. MHCクラスI分子

ある特定の実施形態では、改変は、アクセサリー鎖B2Mを標的とすることにより、1種以上のMHCクラスI分子 (例えば、1種以上のMHCクラスI分子をコードする1種以上のMHCクラスI遺伝子) の発現を低減または除去し、例えば、ノックアウトする。幾つかの実施形態では、改変は、CRISPR/Casシステムを使用して行われる。B2Mの発現を低減または除去すること、例えば、ノックアウトすることにより、1種以上のMHCクラスI分子の表面輸送が阻害され、かかる細胞は、レシピエント対象に移植される場合に免疫寛容を示す。幾つかの実施形態では、細胞は、投与された際に、例えば、レシピエント対象または患者において、低免疫原性であるとみなされる。

40

【0414】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される標的ポリヌクレオチド配列は、B2Mのバリエーションである。幾つかの実施形態では、標的ポリヌクレオチド配列は、B2Mのホモログである。幾つかの実施形態では、標的ポリヌクレオチド配列は、B2Mのオー

50

ソログである。

【0415】

幾つかの実施形態では、B2Mの発現の減少または除去は、以下のMHCクラスI分子のうちの1つ以上の発現を低減または除去する：HLA-A、HLA-B、及びHLA-C。

【0416】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、B2M遺伝子を標的とする改変を含む。幾つかの実施形態では、B2M遺伝子を標的とする改変は、Casタンパク質またはCasタンパク質をコードするポリヌクレオチド、及びB2M遺伝子を特異的に標的とするための少なくとも1種のガイドリボ核酸配列を含む標的化ヌクレアーゼシステムを使用することによるものである。幾つかの実施形態では、B2M遺伝子を特異的に標的とするための少なくとも1種のガイドリボ核酸配列（例えば、gRNA標的化配列）は、WO2016/183041（その開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる）の付録2または表15の配列番号81240～85644からなる群から選択される。

【0417】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示されるポリペプチド（例えば、キメラ抗原受容体、CD47、または本明細書において開示される別の免疫寛容誘導因子）をコードする外来性核酸または導入遺伝子は、B2M遺伝子に挿入される。B2M遺伝子座での標的化挿入のための例示的な導入遺伝子としては、セクションII.Bに記載される任意のものが挙げられる。

【0418】

B2M遺伝子が不活性化されたかどうかを試験するためのアッセイは公知であり、本明細書に記載されている。幾つかの実施形態では、PCRによるB2M遺伝子の得られた改変及びHLA-I発現の低減は、フローサイトメトリー、例えば、FACS分析により分析され得る。幾つかの実施形態では、B2Mタンパク質発現は、B2Mタンパク質に対する抗体でプロービングされた細胞溶解物のウェスタンブロットを使用して検出される。幾つかの実施形態では、不活性化改変の存在を確認するために、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）が使用される。

【0419】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞における1種以上のMHCクラスI分子（細胞がヒト細胞に由来する場合はHLA-I）の発現または機能の低減は、当該技術分野において公知の技術、例えば、HLA複合体に結合する標識抗体を使用した、例えば、ヒトの主要組織適合HLAクラスI抗原のα鎖に結合する市販のHLA-A、B、C抗体を使用したFACS技術を使用して測定され得る。加えて、細胞は、HLA-I複合体が細胞表面に発現しないことを確認するために試験され得る。これは、上記のように1種以上のHLA細胞表面成分に対する抗体を使用したFACS分析により分析され得る。HLA-I（またはMHCクラスI）の低減に加えて、本明細書において提供される遺伝子操作された細胞は、マクロファージによる貪食及びNK細胞による殺傷に対する低減された感受性を有する。遺伝子操作された細胞の低免疫原性表現型について分析する方法は、以下で更に記載される。

【0420】

b. MHCクラスI分子

ある特定の態様では、改変は、クラスIIトランス活性化因子（CIITA）の発現を標的とすることにより、1種以上のMHCクラスII分子の発現を低減または除去し、例えば、ノックアウトする。幾つかの実施形態では、改変は、CRISPR/Casシステムを使用して行われる。CIITAは、タンパク質のLRファミリーまたはヌクレオチド結合ドメイン（NBD）、ロイシンリッチリピート（LRR）ファミリーのメンバーであり、MHCエンハンセオソームと会合することにより1種以上のMHCクラスII遺伝子の転写を調節する。CIITAの発現を低減または除去すること、例えば、ノックアウトすることにより、1種以上のMHCクラスII分子の発現が低減され、これにより、表面

発現も低減される。幾つかの例では、かかる細胞は、レシピエント対象に移植される場合に免疫寛容を示す。幾つかの実施形態では、細胞は、投与された際に、例えば、レシピエント対象または患者において、低免疫原性であるとみなされる。

【0421】

幾つかの実施形態では、標的ポリヌクレオチド配列は、C I I T A のバリエーションである。幾つかの実施形態では、標的ポリヌクレオチド配列は、C I I T A のホモログである。幾つかの実施形態では、標的ポリヌクレオチド配列は、C I I T A のオーソログである。

【0422】

幾つかの実施形態では、C I I T A の発現の低減または除去は、以下のMHCクラスII分子のうちの1つ以上の発現を低減または除去する：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、及びH L A - D R。

【0423】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、C I I T A 遺伝子を標的とする改変を含む。幾つかの実施形態では、C I I T A 遺伝子を標的とする改変は、C a s タンパク質またはC a s タンパク質をコードするポリヌクレオチド、及びC I I T A 遺伝子を特異的に標的とするための少なくとも1種のガイドリボ核酸配列を含む標的化ヌクレアーゼシステムによるものである。幾つかの実施形態では、C I I T A 遺伝子を特異的に標的とするための少なくとも1種のガイドリボ核酸配列（例えば、g R N A 標的化配列）は、W O 2 0 1 6 1 8 3 0 4 1（その開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる）の付録1または表12の配列番号5184～36352からなる群から選択される。

【0424】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示されるポリペプチド（例えば、キメラ抗原受容体、C D 4 7、または本明細書において開示される別の免疫寛容誘導因子）をコードする外来性核酸または導入遺伝子は、C I I T A 遺伝子に挿入される。B 2 M 遺伝子座での標的化挿入のための例示的な導入遺伝子としては、セクションII. B に記載される任意のものが挙げられる。

【0425】

C I I T A 遺伝子が不活性化されたかどうかを試験するためのアッセイは公知であり、本明細書に記載されている。幾つかの実施形態では、P C R によるC I I T A 遺伝子の得られた改変及びH L A - I I 発現の低減は、フローサイトメトリー、例えば、F A C S 分析により分析され得る。幾つかの実施形態では、C I I T A タンパク質発現は、C I I T A タンパク質に対する抗体でプローブされた細胞溶解物のウェスタンブロットを使用して検出される。幾つかの実施形態では、不活性化改変の存在を確認するために、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（R T - P C R）が使用される。

【0426】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞における1種以上のMHCクラスII分子（細胞がヒト細胞に由来する場合はH L A - I I）の発現または機能の低減は、当該技術分野において公知の技術、例えば、タンパク質に対する抗体を使用したウェスタンブロット法、F A C S 技術、R T - P C R 技術などを使用して測定され得る。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、H L A - I I 複合体が細胞表面に発現しないことを確認するために試験され得る。表面発現を評価する方法としては、当該技術分野において公知の方法が挙げられ（例えば、W O 2 0 1 8 1 3 2 7 8 3 の図21を参照のこと）、通常、ヒトH L A クラスII H L A - D R、D P、及びほとんどのD Q 抗原に結合する市販の抗体に基づくウェスタンブロットまたはF A C S 分析のいずれかを使用して行われ得る。H L A - I I（またはMHCクラスII）の低減に加えて、本明細書において提供される遺伝子操作された細胞は、マクロファージによる貪食及びN K 細胞による殺傷に対する低減された感受性を有する。遺伝子操作された細胞の低免疫原性表現型について分析する方法は、以下で更に記載される。

【0427】

B. ポリヌクレオチドの過剰発現

10

20

30

40

50

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される遺伝子操作された細胞は、例えば、細胞において目的のポリヌクレオチドを過剰発現させるための細胞への1種以上の改変の導入により、遺伝子改変または遺伝子操作されている。幾つかの実施形態では、改変または遺伝子操作される細胞は、以前に1種以上の改変を導入されていない未改変細胞または遺伝子操作されていない細胞である。幾つかの実施形態では、本明細書において提供される遺伝子操作された細胞は、外来性タンパク質をコードする1種以上の外来性ポリヌクレオチド（用語「導入遺伝子」とも互換的に使用される）を含むように遺伝子改変される。幾つかの実施形態では、記載されるように、細胞は、レシピエントにおける免疫認識及び免疫寛容に影響を及ぼす免疫寛容誘導因子（例えば、免疫学的因子）である特定の遺伝子の発現を増加させるために改変される。幾つかの実施形態では、提供される遺伝子操作された細胞、例えば、T細胞またはNK細胞は、キメラ抗原受容体（CAR）も発現する。1種以上のポリヌクレオチド、例えば、外来性ポリヌクレオチドは、上記のセクションI.Aに記載された標的ポリヌクレオチド、例えば、MHCクラスI及び／またはMHCクラスII分子の発現を低減するための1つ以上の遺伝子改変と共に、遺伝子操作された細胞において発現（例えば、過剰発現）され得る。幾つかの実施形態では、提供される遺伝子操作された細胞は、レシピエント対象に投与された際に免疫応答を誘発または活性化しない。

10

【0428】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10種以上の異なる過剰発現されるポリヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10種以上の異なる過剰発現されるポリヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、過剰発現されるポリヌクレオチドは、外来性ポリヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10種以上の異なる外来性ポリヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10種以上の異なる外来性ポリヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、過剰発現されるポリヌクレオチドは、細胞においてエピソームから発現される外来性ポリヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、過剰発現されるポリヌクレオチドは、遺伝子操作された細胞の1つ以上のゲノム遺伝子座に挿入または組込まれている外来性ポリヌクレオチドである。

20

30

【0429】

幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドの発現は、DNA標的化ドメイン及び転写活性化因子を含有する融合タンパク質を使用して増強され、すなわち、ポリヌクレオチドは、過剰発現される。トランス活性化因子ドメインを使用して発現を増加させる標的化方法は、当業者に公知である。

【0430】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、1種以上の外来性ポリヌクレオチドを含有し、ここで、当該1種以上の外来性ポリヌクレオチドは、非標的化挿入法により、例えば、レンチウイルスベクターを用いた形質導入により細胞のゲノム遺伝子座に挿入されているか、または組込まれている。幾つかの実施形態では、1種以上の外来性ポリヌクレオチドは、標的化挿入法により、例えば、相同組換え修復（HDR）を使用することにより細胞のゲノムに挿入されているか、または組込まれている。本明細書に記載される遺伝子編集法（例えば、CRISPR/Casシステム）が含まれる、遺伝子操作される細胞のゲノム遺伝子座にHDRにより外来性ポリヌクレオチドを挿入するための任意の好適な方法が使用され得る。幾つかの実施形態では、1種以上の外来性ポリヌクレオチドが、1つ以上のゲノム遺伝子座、例えば、本明細書に記載される任意のゲノム遺伝子座（例えば、表2）に挿入される。幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドは、同じゲノム遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドは、異なるゲノム遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドのうちの2種以上が、同じゲノム遺伝子座、例えば、本明細書に記載される任意のゲノム遺伝子座（

40

50

例えば、表 2) に挿入される。幾つかの実施形態では、2 種以上の外来性ポリヌクレオチドが、異なるゲノム遺伝子座、例えば、本明細書に記載される 2 つ以上のゲノム遺伝子座（例えば、表 2) に挿入される。

【0431】

幾つかの実施形態では、記載されるような 1 種以上の標的ポリヌクレオチドまたは標的タンパク質の発現を増加させるために、遺伝子編集技術のいずれかが使用され得る。幾つかの実施形態では、遺伝子編集技術としては、ヌクレアーゼ、インテグラーゼ、トランスポザーゼ、リコンビナーゼを含むシステムが挙げられ得る。幾つかの実施形態では、遺伝子編集技術は、（例えば、遺伝子に作動可能に連結されたプロモーターまたはエンハンサーを改変または活性化することにより）内在性遺伝子の活性を増強するための改変に使用され得る。幾つかの実施形態では、遺伝子編集技術は、DNA のゲノム領域へのノックインまたは組込みのために（例えば、標的ポリヌクレオチドまたは標的タンパク質をコードする構築物、例えば、免疫寛容誘導因子のいずれかまたは遺伝子操作された細胞における発現の増強のための本明細書に記載される他の分子のいずれかをコードする構築物を導入するために）使用され得る。幾つかの実施形態では、遺伝子編集技術は、一本鎖切断（SSB）をもたらす。幾つかの実施形態では、遺伝子編集技術は、非相同末端結合（NHEJ）または相同組換え修復（HDR）を伴うものが含まれる、二本鎖切断（DSB）をもたらす。幾つかの実施形態では、遺伝子編集技術は、DNA ベースの編集またはプライム編集を含み得る。幾つかの実施形態では、遺伝子編集技術は、部位特異的標的化エレメントによるプログラム化可能な付加（PASTE）を含み得る。例示的なポリヌクレオチドまたは過剰発現、及びそれを過剰発現させるための方法は、以下のサブセクションに記載される。

【0432】

1. 免疫寛容誘導因子

幾つかの実施形態では、免疫寛容誘導因子の発現が、細胞において過剰発現されるか、または増強される。免疫寛容誘導因子の発現に関して改変された細胞に関する実施形態は、本明細書に記載されるような任意の細胞種、ならびに H I P 細胞、C A R 細胞、安全スイッチ、及び本明細書に記載されるような他の改変／遺伝子編集された細胞に容易に適用され得ることが理解されよう。

【0433】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、少なくとも 1 種の免疫寛容誘導因子の増加した発現、すなわち、過剰発現を含む。幾つかの実施形態では、免疫寛容誘導因子は、免疫系（例えば、自然免疫系または適応免疫系）による遺伝子操作された細胞に対する免疫寛容を促進するか、またはその促進もしくは誘発に寄与する任意の因子である。幾つかの実施形態では、免疫寛容誘導因子は、A 2 0 / T N F A I P 3、B 2 M - H L A - E、C D 1 6、C D 1 6 F c 受容体、C D 2 4、C D 2 7、C D 3 5、C D 3 9、C D 4 6、C D 4 7、C D 5 2、C D 5 5、C D 5 9、C D 6 4、C D 2 0 0、C C L 2 1、C C L 2 2、C T L A 4 - I g、C 1 阻害因子、C R 1、D U X 4、F A S L、H L A - C、H L A - E、H L A - E 重鎖、H L A - F、H L A - G、H 2 - M 3、I D O 1、I L - 1 0、I L 1 5 - R F、I L - 3 5、I L - 3 9、M A N F、M f g e 8、P D - L 1、または S e r p i n b 9 である。幾つかの実施形態では、免疫寛容誘導因子は、C D 4 7、P D - L 1、H L A - E もしくは H L A - G、C C L 2 1、F a s L、S e r p i n b 9、C D 2 0 0 もしくは M f g e 8、またはそれらの任意の組み合わせである。幾つかの実施形態では、細胞は、免疫寛容誘導因子をコードするポリヌクレオチドを含む少なくとも 1 種の外来性ポリヌクレオチドを含む。例えば、幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドのうちの少なくとも 1 種は、C D 4 7 をコードするポリヌクレオチドである。本明細書において、レシピエント対象に投与された際に免疫応答を誘発または活性化しない細胞が提供される。幾つかの実施形態では、上記のように、細胞は、レシピエントにおける免疫認識及び免疫寛容に影響を及ぼす遺伝子及び免疫寛容誘導因子（例えば、免疫学的因子）の発現を増加させるために改変される。

【0434】

幾つかの実施形態では、本開示は、免疫寛容誘導因子（例えば、免疫調節性ポリペプチド）、例えば、CD47を発現するように改変された細胞またはその集団を提供する。幾つかの実施形態では、本開示は、免疫寛容誘導因子（例えば、免疫調節性ポリペプチド）、例えば、CD47を発現するように細胞ゲノムを改変するための方法を提供する。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、外来性免疫寛容誘導因子（例えば、免疫調節性ポリペプチド）、例えば、外来性CD47を発現する。幾つかの例では、外来性ポリヌクレオチドの過剰発現または発現の増強は、ヒトCD47ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを細胞に導入すること（例えば、細胞に形質導入すること）により達成される。幾つかの実施形態では、発現ベクターは、ウイルスベクター、例えば、レンチウイルスベクターであり得るか、または非ウイルスベクターであり得る。幾つかの実施形態では、細胞は、1種以上の外来性ポリヌクレオチドを含有するように遺伝子操作され、ここで、当該外来性ポリヌクレオチドのうちの少なくとも1種は、免疫寛容誘導因子をコードするポリヌクレオチドを含む。任意の実施形態のうちの幾つかでは、免疫寛容誘導因子は、A20/TNFAIP3、B2M-HLA-E、CD16、CD16Fc受容体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、CD52、CD55、CD59、CD64、CD200、CCL21、CCL22、CTLA4-Ig、C1阻害因子、CR1、DUX4、FASL、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鎖、HLA-F、HLA-G、H2-M3、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、IL-39、MANF、Mfge8、PD-L1、またはSerpina9である。幾つかの実施形態では、免疫寛容誘導因子は、CD47、PD-L1、HLA-EもしくはHLA-G、CCL21、FasL、Serpina9、CD200もしくはMfge8、またはそれらの任意の組み合わせから選択される。例えば、幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドのうちの少なくとも1種は、CD47をコードするポリヌクレオチドである。

10

20

【0435】

幾つかの実施形態では、免疫寛容誘導因子は、CD47である。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、CD47、例えば、ヒトCD47をコードする外来性ポリヌクレオチドを含有する。幾つかの実施形態では、CD47が細胞において過剰発現される。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞におけるCD47の発現は、改変により遺伝子操作されていない同じ細胞種の類似の細胞、例えば、参照細胞または未改変細胞、例えば、CD47をコードする外来性ポリヌクレオチドで遺伝子操作されていない細胞と比較して過剰発現されるか、または増強される。CD47は、白血球表面抗原であり、細胞接着及びインテグリンの調節における役割を有する。これは、通常、細胞表面に発現し、その細胞を食べないように循環マクロファージにシグナルを伝達する。ヒトCD47に関する有用なゲノム、ポリヌクレオチド、及びポリペプチド情報は、例えば、NP_001768.1、NP_942088.1、NM_001777.3、及びNM_198793.2において提供される。

30

【0436】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、少なくとも1種の免疫寛容誘導因子の増加した発現、すなわち、過剰発現を含む。幾つかの実施形態では、細胞は、免疫寛容誘導因子をコードするポリヌクレオチドを含む少なくとも1種の外来性ポリヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、免疫寛容誘導因子としては、A20/TNFAIP3、B2M-HLA-E、CD16、CD16Fc受容体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、CD52、CD55、CD59、CD64、CD200、CCL21、CCL22、CTLA4-Ig、C1阻害因子、CR1、DUX4、FASL、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鎖、HLA-F、HLA-G、H2-M3、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、IL-39、MANF、Mfge8、PD-L1、Serpina9、またはそれらの任意の組み合わせが挙げられる。例えば、幾つかの実施形態では、過剰発現される（例えば、外来性）ポリヌクレオチド

40

50

のうちの少なくとも1種は、CD47をコードするポリヌクレオチドである。

【0437】

幾つかの実施形態では、本開示は、免疫寛容誘導因子（例えば、免疫調節性ポリペプチド）、例えば、CD47を発現するように改変された細胞またはその集団を提供する。幾つかの実施形態では、本開示は、免疫寛容誘導因子（例えば、免疫調節性ポリペプチド）、例えば、CD47を発現するように細胞ゲノムを改変するための方法を提供する。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、外来性免疫寛容誘導因子（例えば、免疫調節性ポリペプチド）、例えば、外来性CD47を発現する。幾つかの例では、細胞は、ヒトCD47ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを発現する。

【0438】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、CD47、例えば、ヒトCD47をコードする過剰発現されるポリヌクレオチドを含有する。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、CD47、例えば、ヒトCD47をコードする外来性ポリヌクレオチドを含有する。幾つかの実施形態では、CD47が細胞において過剰発現される。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞においてCD47の発現が、類似の参照細胞または未改変細胞（任意の他の改変を有するが含まれる）と比較して増強されており、ただし、当該参照細胞または未改変細胞は、CD47をコードする外来性ポリヌクレオチドを含まない。CD47は、白血球表面抗原であり、細胞接着及びインテグリンの調節における役割を有する。これは、通常、細胞表面に発現し、その細胞を食べないように循環マクロファージにシグナルを伝達する。ヒトCD47に関する有用なゲノム、ポリヌクレオチド、及びポリペプチド情報は、例えば、NP__001768.1、NP__942088.1、NM__001777.3、及びNM__198793.2において提供される。

【0439】

幾つかの実施形態では、本明細書において概説される細胞は、NCBI参照配列番号：NP__001768.1及びNP__942088.1に記載されるようなアミノ酸配列に対する少なくとも95%（例えば、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上）の配列同一性を有するCD47ポリペプチドをコードする外来性ヌクレオチド配列を含む。幾つかの実施形態では、本明細書において概説される細胞は、NCBI参照配列番号：NP__001768.1及びNP__942088.1に記載されるようなアミノ酸配列を有するCD47ポリペプチドをコードする外来性ヌクレオチド配列を含む。幾つかの実施形態では、細胞は、NCBI参照番号NM__001777.3及びNM__198793.2に記載される配列に対する少なくとも85%（例えば、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上）の配列同一性を有するCD47の外来性ヌクレオチド配列を含む。幾つかの実施形態では、細胞は、NCBI参照配列番号：NM__001777.3及びNM__198793.2に記載されるようなCD47の外来性ヌクレオチド配列を含む。

【0440】

幾つかの実施形態では、本明細書において概説される細胞は、NCBI参照配列番号：NP__001768.1及びNP__942088.1に記載されるようなアミノ酸配列に対する少なくとも95%（例えば、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上）の配列同一性を有するCD47ポリペプチドをコードする外来性ヌクレオチド配列を含む。幾つかの実施形態では、本明細書において概説される細胞は、NCBI参照配列番号：NP__001768.1及びNP__942088.1に記載されるようなアミノ酸配列を有するCD47ポリペプチドをコードする外来性ヌクレオチド配列を含む。幾つかの実施形態では、細胞は、NCBI参照番号NM__001777.3及びNM__198793.2に記載される配列に対する少なくとも85%（例えば、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上）の配列同一性を有するCD47の外来性ヌクレオチド配列を含む。幾つかの実施形態では、細胞は、NCBI参照配列番号：NM__001

777.3及びNM__198793.2に記載されるようなCD47の外來性ヌクレオチド配列を含む。

【0441】

幾つかの実施形態では、細胞は、NCBI参照配列番号：NP__001768.1及びNP__942088.1に記載されるようなアミノ酸配列に対する少なくとも95%（例えば、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上）の配列同一性を有する外來性CD47ポリペプチドを含む。幾つかの実施形態では、本明細書において概説される細胞は、NCBI参照配列番号：NP__001768.1及びNP__942088.1に記載されるようなアミノ酸配列を有する外來性CD47ポリペプチドを含む。

【0442】

幾つかの実施形態では、細胞は、配列番号1に記載されるようなアミノ酸配列に対する少なくとも95%（例えば、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上）の配列同一性を有するCD47ポリペプチドをコードする過剰発現されるポリヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、細胞は、配列番号1に記載されるようなアミノ酸配列に対する少なくとも95%（例えば、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上）の配列同一性を有するCD47ポリペプチドをコードする外來性ポリヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、細胞は、配列番号1に記載されるようなアミノ酸配列を有するCD47ポリペプチドをコードする過剰発現されるポリヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、細胞は、配列番号1に記載されるようなアミノ酸配列を有するCD47ポリペプチドをコードする外來性ポリヌクレオチドを含む。

【0443】

幾つかの実施形態では、細胞は、配列番号2に記載されるようなアミノ酸配列に対する少なくとも95%（例えば、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上）の配列同一性を有する過剰発現されるCD47ポリペプチドを含む。幾つかの実施形態では、細胞は、配列番号2に記載されるようなアミノ酸配列に対する少なくとも95%（例えば、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上）の配列同一性を有する外來性CD47ポリペプチドを含む。幾つかの実施形態では、細胞は、配列番号2に記載されるようなアミノ酸配列を有する過剰発現されるCD47ポリペプチドを含む。幾つかの実施形態では、細胞は、配列番号2に記載されるようなアミノ酸配列を有する外來性CD47ポリペプチドを含む。幾つかの実施形態では、CD47をコードする外來性ポリヌクレオチドは、例えば、以下で更に記載される、標的化挿入または非標的化挿入の方法により細胞のゲノムに組み込まれる。幾つかの実施形態では、標的化挿入は、標的遺伝子座への相同性依存的挿入、例えば、表2に示される遺伝子座のいずれか、例えば、B2M遺伝子、CIEITA遺伝子、TRAC遺伝子、TRBC遺伝子への挿入によるものである。幾つかの実施形態では、標的化挿入は、相同性非依存的挿入、例えば、セーフハーバー遺伝子座への挿入によるものである。幾つかの例では、CD47をコードするポリヌクレオチドは、セーフハーバー遺伝子座、例えば、限定されるものではないが、AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26、及びSHS231から選択される遺伝子座に挿入される。実施形態では、CD47をコードするポリヌクレオチドは、CCR5遺伝子座、PPP1R12C（AAVS1としても公知）遺伝子座、またはCLYBL遺伝子座に挿入される。

【0444】

幾つかの実施形態では、CD47の全ての部分または機能部分が、他の構成要素、例えば、シグナルペプチド、リーダー配列、分泌シグナル、標識（例えば、レポーター遺伝子）、またはそれらの任意の組み合わせに連結され得る。幾つかの実施形態では、CD47のシグナルペプチドをコードする核酸配列は、異種タンパク質由来のシグナルペプチドをコードする核酸配列と置き換えられる。異種タンパク質は、例えば、CD8 α 、CD28、組織プラスミノゲン活性化因子（tPA）、成長ホルモン、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、GM-CSF受容体（GM-CSFR α ）、または免疫グロブリン（例えば、IgEまたはIgK）であり得る。幾つかの実施形態では、シグ

10

20

30

40

50

ナルペプチドは、免疫グロブリン（例えば、IgG重鎖またはIgG-κ軽鎖）、サイトカイン（例えば、インターロイキン-2（IL-2）またはCD33）、血清アルブミンタンパク質（例えば、HSAまたはアルブミン）、ヒトアズロシジンプレタンパク質シグナル配列、ルシフェラーゼ、トリプシノーゲン（例えば、キモトリプシノーゲンまたはトリプシノーゲン）由来のシグナルペプチド、または細胞にもしくは細胞上にタンパク質を効率的に発現させることができる他のシグナルペプチドである。

【0445】

ある特定の実施形態では、CD47をコードする外来性ポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可能に連結される。

【0446】

幾つかの実施形態では、CD47をコードする外来性ポリヌクレオチドは、表2に示される遺伝子座のいずれかに挿入される。幾つかの例では、CD47をコードする外来性ポリヌクレオチドは、セーフハーバー遺伝子座、例えば、限定されるものではないが、AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26、及びSHS231から選択される遺伝子座に挿入される。実施形態では、CD47をコードする外来性ポリヌクレオチドは、CCR5遺伝子座、PPP1R12C（AAVS1としても公知）遺伝子座、またはCLYBL遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、CD47をコードする外来性ポリヌクレオチドは、B2M遺伝子座またはCIITA遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、T細胞であり、CD47をコードする外来性ポリヌクレオチドは、TRAC遺伝子座またはTRBC遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、好適な遺伝子編集システム（例えば、CRISPR/Casシステムまたは本明細書に記載される遺伝子編集システムのいずれか）が、CD47をコードするポリヌクレオチドの細胞のゲノム遺伝子座への挿入を促進するために使用される。

【0447】

幾つかの実施形態では、CD47タンパク質発現は、CD47タンパク質に対する抗体でプローブされた細胞溶解物のウェスタンブロットを使用して検出される。幾つかの実施形態では、外来性CD47 mRNAの存在を確認するために、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）が使用される。

【0448】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、CD200、例えば、ヒトCD200をコードする外来性ポリヌクレオチドを含有する。幾つかの実施形態では、CD200が細胞において過剰発現される。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞においてCD200の発現が、類似の参照細胞または未改変細胞（任意の他の改変を有するが含まれる）と比較して増強されており、ただし、当該参照細胞または未改変細胞は、CD200をコードする外来性ポリヌクレオチドを含まない。ヒトCD200に関する有用なゲノム、ポリヌクレオチド、及びポリペプチド情報は、例えば、GeneCard識別番号：GC03P112332、HGNC番号：7203、NCBI遺伝子番号：4345、UniProt番号：P41217、ならびにNCBI参照配列番号：NP_001004196.2、NM_001004196.3、NP_001305757.1、NM_001318828.1、NP_005935.4、NM_005944.6、XP_005247539.1、及びXM_005247482.2において提供される。ある特定の実施形態では、CD200をコードするポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可能に連結される。

【0449】

幾つかの実施形態では、CD200をコードするポリヌクレオチドは、表2に示される遺伝子座のいずれかに挿入される。幾つかの例では、CD200をコードするポリヌクレオチドは、セーフハーバー遺伝子座、例えば、限定されるものではないが、AAVS1（PPP1R12Cとしても公知）、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3（CD142としても公知）、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1（CD91としても公知）、MICA、MICB、RHD、ROSA26、及びSHS231

遺伝子座から選択される遺伝子座に挿入される。実施形態では、CD200をコードするポリヌクレオチドは、CCR5遺伝子座、PPP1R12C（AAVS1としても公知）遺伝子座、またはCLYBL遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、CD200をコードするポリヌクレオチドは、B2M遺伝子座またはCIITA遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、T細胞であり、CD200をコードするポリヌクレオチドは、TRAC遺伝子座またはTRBC遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、好適な遺伝子編集システム（例えば、CRISPR/Casシステムまたは本明細書に記載される遺伝子編集システムのいずれか）が、CD200をコードするポリヌクレオチドの細胞のゲノム遺伝子座への挿入を促進するために使用される。

【0450】

10

幾つかの実施形態では、CD200タンパク質発現は、CD200タンパク質に対する抗体でプローブされた細胞溶解物のウェスタンブロットを使用して検出される。幾つかの実施形態では、外来性CD200 mRNAの存在を確認するために、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）が使用される。

【0451】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、HLA-E、例えば、ヒトHLA-Eをコードする外来性ポリヌクレオチドを含有する。幾つかの実施形態では、HLA-Eが細胞において過剰発現される。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞においてHLA-Eの発現が、類似の参照細胞または未改変細胞（任意の他の改変を有するが含まれる）と比較して増強されており、ただし、当該参照細胞または未改変細胞は、HLA-Eをコードする外来性ポリヌクレオチドを含まない。ヒトHLA-Eに関する有用なゲノム、ポリヌクレオチド、及びポリペプチド情報は、例えば、GeneCard識別番号：GC06P047281、HGNC番号：4962、NCBI遺伝子番号3133、UniProt番号：P13747、ならびにNCBI参照配列番号：NP_005507.3及びNM_005516.5において提供される。ある特定の実施形態では、HLA-Eをコードするポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可能に連結される。

20

【0452】

幾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、表2に示される遺伝子座のいずれかに挿入される。幾つかの例では、HLA-Eをコードするポリヌクレオチドは、セーフハーバー遺伝子座、例えば、限定されるものではないが、AAVS1（PPP1R12Cとしても公知）、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3（CD142としても公知）、FUT1、HMG B1、KDM5D、LRP1（CD91としても公知）、MICA、MICB、RHD、ROSA26、及びSHS231

30

遺伝子座から選択される遺伝子座に挿入される。実施形態では、HLA-Eをコードするポリヌクレオチドは、CCR5遺伝子座、PPP1R12C（AAVS1としても公知）遺伝子座、またはCLYBL遺伝子座に挿入される。幾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遺伝子座またはCIITA遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、T細胞であり、HLA-Eをコードするポリヌクレオチドは、TRAC遺伝子座またはTRBC遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、好適な遺伝子編集システム（例えば、CRISPR/Casシステムまたは本明細書に記載される遺伝子編集システムのいずれか）が、HLA-Eをコードするポリヌクレオチドの細胞のゲノム遺伝子座への挿入を促進するために使用される。

40

【0453】

幾つかの実施形態では、HLA-Eタンパク質発現は、HLA-Eタンパク質に対する抗体でプローブされた細胞溶解物のウェスタンブロットを使用して検出される。幾つかの実施形態では、外来性HLA-E mRNAの存在を確認するために、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）が使用される。

【0454】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、HLA-G、例えば、ヒトHLA-Gをコードする外来性ポリヌクレオチドを含有する。幾つかの実施形態では、HLA-G

50

が細胞において過剰発現される。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞において H L A - G の発現が、類似の参照細胞または未改変細胞（任意の他の改変を有するが含まれる）と比較して増強されており、ただし、当該参照細胞または未改変細胞は、H L A - G をコードする外来性ポリヌクレオチドを含まない。H L A - G に関する有用なゲノム、ポリヌクレオチド、及びポリペプチド情報は、例えば、GeneCard 識別番号：G C 0 6 P 0 4 7 2 5 6、HGNC 番号：4 9 6 4、NCBI 遺伝子番号：3 1 3 5、UniProt 番号：P 1 7 6 9 3、ならびに NCBI 参照配列番号：N P _ 0 0 2 1 1 8 . 1 及び N M _ 0 0 2 1 2 7 . 5 において提供される。ある特定の実施形態では、H L A - G をコードするポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可能に連結される。

【0455】

10

幾つかの実施形態では、H L A - G をコードするポリヌクレオチドは、表 2 に示される遺伝子座のいずれかに挿入される。幾つかの例では、H L A - G をコードするポリヌクレオチドは、セーフハーバー遺伝子座、例えば、限定されるものではないが、A A V S 1（P P P 1 R 1 2 C としても公知）、A B O、C C R 5、C L Y B L、C X C R 4、F 3（C D 1 4 2 としても公知）、F U T 1、H M G B 1、K D M 5 D、L R P 1（C D 9 1 としても公知）、M I C A、M I C B、R H D、R O S A 2 6、及び S H S 2 3 1 遺伝子座から選択される遺伝子座に挿入される。実施形態では、H L A - G をコードするポリヌクレオチドは、C C R 5 遺伝子座、P P P 1 R 1 2 C（A A V S 1 としても公知）遺伝子座、または C L Y B L 遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、H L A - G をコードするポリヌクレオチドは、B 2 M 遺伝子座または C I I T A 遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、T 細胞であり、H L A - G をコードするポリヌクレオチドは、T R A C 遺伝子座または T R B C 遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、好適な遺伝子編集システム（例えば、C R I S P R / C a s システムまたは本明細書に記載される遺伝子編集システムのいずれか）が、H L A - G をコードするポリヌクレオチドの細胞のゲノム遺伝子座への挿入を促進するために使用される。

20

【0456】

幾つかの実施形態では、H L A - G タンパク質発現は、H L A - G タンパク質に対する抗体でプローブされた細胞溶解物のウェスタンブロットを使用して検出される。幾つかの実施形態では、外来性 H L A - G m R N A の存在を確認するために、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（R T - P C R）が使用される。

30

【0457】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、P D - L 1、例えば、ヒト P D - L 1 をコードする外来性ポリヌクレオチドを含有する。幾つかの実施形態では、P D - L 1 が細胞において過剰発現される。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞において P D - L 1 の発現が、類似の参照細胞または未改変細胞（任意の他の改変を有するが含まれる）と比較して増強されており、ただし、当該参照細胞または未改変細胞は、P D - L 1 をコードする外来性ポリヌクレオチドを含まない。ヒト P D - L 1 または C D 2 7 4 に関する有用なゲノム、ポリヌクレオチド、及びポリペプチド情報は、例えば、GeneCard 識別番号：G C 0 9 P 0 0 5 4 5 0、HGNC 番号：1 7 6 3 5、NCBI 遺伝子番号：2 9 1 2 6、UniProt 番号：Q 9 N Z Q 7、ならびに NCBI 参照配列番号：N P _ 0 0 1 2 5 4 6 3 5 . 1、N M _ 0 0 1 2 6 7 7 0 6 . 1、N P _ 0 5 4 8 6 2 . 1、及び N M _ 0 1 4 1 4 3 . 3 において提供される。ある特定の実施形態では、P D - L 1 をコードするポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可能に連結される。

40

【0458】

幾つかの実施形態では、P D - L 1 をコードするポリヌクレオチドは、表 2 に示される遺伝子座のいずれかに挿入される。幾つかの例では、P D - L 1 をコードするポリヌクレオチドは、セーフハーバー遺伝子座、例えば、限定されるものではないが、A A V S 1（P P P 1 R 1 2 C としても公知）、A B O、C C R 5、C L Y B L、C X C R 4、F 3（C D 1 4 2 としても公知）、F U T 1、H M G B 1、K D M 5 D、L R P 1（C D 9 1 としても公知）、M I C A、M I C B、R H D、R O S A 2 6、及び S H S 2 3 1 遺伝子座

50

から選択される遺伝子座に挿入される。実施形態では、PD-L1をコードするポリヌクレオチドは、CCR5遺伝子座、PPP1R12C(AAVS1としても公知)遺伝子座、またはCLYBL遺伝子座に挿入される。幾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遺伝子座またはCIITA遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、T細胞であり、PD-L1をコードするポリヌクレオチドは、TRAC遺伝子座またはTRBC遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、好適な遺伝子編集システム(例えば、CRISPR/Casシステムまたは本明細書に記載される遺伝子編集システムのいずれか)が、PD-L1をコードするポリヌクレオチドの細胞のゲノム遺伝子座への挿入を促進するために使用される。

【0459】

10

幾つかの実施形態では、PD-L1タンパク質発現は、PD-L1タンパク質に対する抗体でプローブされた細胞溶解物のウェスタンブロットを使用して検出される。幾つかの実施形態では、外来性PD-L1 mRNAの存在を確認するために、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)が使用される。

【0460】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、FasL、例えば、ヒトFasLをコードする外来性ポリヌクレオチドを含有する。幾つかの実施形態では、FasLが細胞において過剰発現される。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞においてFasLの発現が、類似の参照細胞または未改変細胞(任意の他の改変を有するが含まれる)と比較して増強されており、ただし、当該参照細胞または未改変細胞は、FasLをコードする外来性ポリヌクレオチドを含まない。ヒトFasリガンド(FasL、FASLG、CD178、TNFSF6などとして公知である)に関する有用なゲノム、ポリヌクレオチド、及びポリペプチド情報は、例えば、GeneCard識別番号:GC01P172628、HGNC番号:11936、NCBI遺伝子番号:356、Uniprot番号:P48023、ならびにNCBI参照配列番号:NP_000630.1、NM_000639.2、NP_001289675.1、及びNM_001302746.1において提供される。ある特定の実施形態では、FasLをコードするポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可能に連結される。

20

【0461】

幾つかの実施形態では、FasLをコードするポリヌクレオチドは、表2に示される遺伝子座のいずれかに挿入される。幾つかの例では、FasLをコードするポリヌクレオチドは、セーフハーバー遺伝子座、例えば、限定されるものではないが、AAVS1(PPP1R12Cとしても公知)、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3(CD142としても公知)、FUT1、HMBG1、KDM5D、LRP1(CD91としても公知)、MICA、MICB、RHD、ROSA26、及びSHS231遺伝子座から選択される遺伝子座に挿入される。実施形態では、FasLをコードするポリヌクレオチドは、CCR5遺伝子座、PPP1R12C(AAVS1としても公知)遺伝子座、またはCLYBL遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、FasLをコードするポリヌクレオチドは、B2M遺伝子座またはCIITA遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、T細胞であり、FasLをコードするポリヌクレオチドは、TRAC遺伝子座またはTRBC遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、好適な遺伝子編集システム(例えば、CRISPR/Casシステムまたは本明細書に記載される遺伝子編集システムのいずれか)が、FasLをコードするポリヌクレオチドの細胞のゲノム遺伝子座への挿入を促進するために使用される。

30

40

【0462】

幾つかの実施形態では、FasLタンパク質発現は、FasLタンパク質に対する抗体でプローブされた細胞溶解物のウェスタンブロットを使用して検出される。幾つかの実施形態では、外来性FasL mRNAの存在を確認するために、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)が使用される。

【0463】

50

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、CCL21、例えば、ヒトCCL21をコードする外来性ポリヌクレオチドを含有する。幾つかの実施形態では、CCL21が細胞において過剰発現される。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞においてCCL21の発現が、類似の参照細胞または未改変細胞（任意の他の改変を有するが含まれる）と比較して増強されており、ただし、当該参照細胞または未改変細胞は、CCL21をコードする外来性ポリヌクレオチドを含まない。ヒトCCL21に関する有用なゲノム、ポリヌクレオチド、及びポリペプチド情報は、例えば、GeneCard識別番号：GC09M034709、HGNC番号：10620、NCBI遺伝子番号：6366、Uniprot番号：O00585、ならびにNCBI参照配列番号：NP_002980.1及びNM_002989.3において提供される。ある特定の実施形態では、CCL21をコードするポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可能に連結される。

10

【0464】

幾つかの実施形態では、CCL21をコードするポリヌクレオチドは、表2に示される遺伝子座のいずれかに挿入される。幾つかの例では、CCL21をコードするポリヌクレオチドは、セーフハーバー遺伝子座、例えば、限定されるものではないが、AAVS1（PPP1R12Cとしても公知）、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3（CD142としても公知）、FUT1、HMGBl、KDM5D、LRP1（CD91としても公知）、MICA、MICB、RHD、ROSA26、及びSHS231遺伝子座から選択される遺伝子座に挿入される。実施形態では、CCL21をコードするポリヌクレオチドは、CCR5遺伝子座、PPP1R12C（AAVS1としても公知）遺伝子座、またはCLYBL遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、CCL21をコードするポリヌクレオチドは、B2M遺伝子座またはCIITA遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、T細胞であり、CCL21をコードするポリヌクレオチドは、TRAC遺伝子座またはTRBC遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、好適な遺伝子編集システム（例えば、CRISPR/Casシステムまたは本明細書に記載される遺伝子編集システムのいずれか）が、CCL21をコードするポリヌクレオチドの細胞のゲノム遺伝子座への挿入を促進するために使用される。

20

【0465】

幾つかの実施形態では、CCL21タンパク質発現は、CCL21タンパク質に対する抗体でプローブされた細胞溶解物のウェスタンブロットを使用して検出される。幾つかの実施形態では、外来性CCL21 mRNAの存在を確認するために、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）が使用される。

30

【0466】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、CCL22、例えば、ヒトCCL22をコードする外来性ポリヌクレオチドを含有する。幾つかの実施形態では、CCL22が細胞において過剰発現される。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞においてCCL22の発現が、類似の参照細胞または未改変細胞（任意の他の改変を有するが含まれる）と比較して増強されており、ただし、当該参照細胞または未改変細胞は、CCL22をコードする外来性ポリヌクレオチドを含まない。ヒトCCL22に関する有用なゲノム、ポリヌクレオチド、及びポリペプチド情報は、例えば、GeneCard識別番号：GC16P057359、HGNC番号：10621、NCBI遺伝子番号：6367、Uniprot番号：O00626、ならびにNCBI参照配列番号：NP_002981.2、NM_002990.4、XP_016879020.1、及びXM_017023531.1において提供される。ある特定の実施形態では、CCL22をコードするポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可能に連結される。

40

【0467】

幾つかの実施形態では、CCL22をコードするポリヌクレオチドは、表2に示される遺伝子座のいずれかに挿入される。幾つかの例では、CCL22をコードするポリヌクレオチドは、セーフハーバー遺伝子座、例えば、限定されるものではないが、AAVS1（PPP1R12Cとしても公知）、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3（

50

C D 1 4 2としても公知)、F U T 1、H M G B 1、K D M 5 D、L R P 1 (C D 9 1としても公知)、M I C A、M I C B、R H D、R O S A 2 6、及びS H S 2 3 1 遺伝子座から選択される遺伝子座に挿入される。実施形態では、C C L 2 2をコードするポリヌクレオチドは、C C R 5 遺伝子座、P P P 1 R 1 2 C (A A V S 1としても公知) 遺伝子座、またはC L Y B L 遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、C C L 2 2をコードするポリヌクレオチドは、B 2 M 遺伝子座またはC I I T A 遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、T 細胞であり、C C L 2 2をコードするポリヌクレオチドは、T R A C 遺伝子座またはT R B C 遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、好適な遺伝子編集システム (例えば、C R I S P R / C a s システムまたは本明細書に記載される遺伝子編集システムのいずれか) が、C C L 2 2をコードするポリヌクレオチドの細胞のゲノム遺伝子座への挿入を促進するために使用される。

10

【0468】

幾つかの実施形態では、C C L 2 2 タンパク質発現は、C C L 2 2 タンパク質に対する抗体でプローブされた細胞溶解物のウェスタンブロットを使用して検出される。幾つかの実施形態では、外来性C C L 2 2 mRNAの存在を確認するために、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R) が使用される。

【0469】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、M f g e 8、例えば、ヒトM f g e 8をコードする外来性ポリヌクレオチドを含有する。幾つかの実施形態では、M f g e 8が細胞において過剰発現される。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞においてM f g e 8の発現が、類似の参照細胞または未改変細胞 (任意の他の改変を有するが含まれる) と比較して増強されており、ただし、当該参照細胞または未改変細胞は、M f g e 8をコードする外来性ポリヌクレオチドを含まない。ヒトM f g e 8に関する有用なゲノム、ポリヌクレオチド、及びポリペプチド情報は、例えば、GeneCard識別番号: G C 1 5 M 0 8 8 8 9 8、HGNC番号: 7 0 3 6、NCBI遺伝子番号: 4 2 4 0、UniProt番号: Q 0 8 4 3 1、ならびにNCBI参照配列番号: N P _ 0 0 1 1 0 8 0 8 6 . 1、N M _ 0 0 1 1 1 4 6 1 4 . 2、N P _ 0 0 1 2 9 7 2 4 8 . 1、N M _ 0 0 1 3 1 0 3 1 9 . 1、N P _ 0 0 1 2 9 7 2 4 9 . 1、N M _ 0 0 1 3 1 0 3 2 0 . 1、N P _ 0 0 1 2 9 7 2 5 0 . 1、N M _ 0 0 1 3 1 0 3 2 1 . 1、N P _ 0 0 5 9 1 9 . 2、及びN M _ 0 0 5 9 2 8 . 3において提供される。ある特定の実施形態では、M f g e 8をコードするポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可能に連結される。

20

30

【0470】

幾つかの実施形態では、M f g e 8をコードするポリヌクレオチドは、表2に示される遺伝子座のいずれかに挿入される。幾つかの例では、M f g e 8をコードするポリヌクレオチドは、セーフハーバー遺伝子座、例えば、限定されるものではないが、A A V S 1 (P P P 1 R 1 2 Cとしても公知)、A B O、C C R 5、C L Y B L、C X C R 4、F 3 (C D 1 4 2としても公知)、F U T 1、H M G B 1、K D M 5 D、L R P 1 (C D 9 1としても公知)、M I C A、M I C B、R H D、R O S A 2 6、及びS H S 2 3 1 遺伝子座から選択される遺伝子座に挿入される。実施形態では、M f g e 8をコードするポリヌクレオチドは、C C R 5 遺伝子座、P P P 1 R 1 2 C (A A V S 1としても公知) 遺伝子座、またはC L Y B L 遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、M f g e 8をコードするポリヌクレオチドは、B 2 M 遺伝子座またはC I I T A 遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、T 細胞であり、M f g e 8をコードするポリヌクレオチドは、T R A C 遺伝子座またはT R B C 遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、好適な遺伝子編集システム (例えば、C R I S P R / C a s システムまたは本明細書に記載される遺伝子編集システムのいずれか) が、M f g e 8をコードするポリヌクレオチドの細胞のゲノム遺伝子座への挿入を促進するために使用される。

40

【0471】

幾つかの実施形態では、M f g e 8 タンパク質発現は、M f g e 8 タンパク質に対する抗体でプローブされた細胞溶解物のウェスタンブロットを使用して検出される。幾つかの

50

実施形態では、外来性 *M f g e 8* mRNA の存在を確認するために、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) が使用される。

【0472】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、*S e r p i n B 9*、例えば、ヒト *S e r p i n B 9* をコードする外来性ポリヌクレオチドを含有する。幾つかの実施形態では、*S e r p i n B 9* が細胞において過剰発現される。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞において *S e r p i n B 9* の発現が、類似の参照細胞または未改変細胞（任意の他の改変を有するが含まれる）と比較して増強されており、ただし、当該参照細胞または未改変細胞は、*S e r p i n B 9* をコードする外来性ポリヌクレオチドを含まない。ヒト *S e r p i n B 9* に関する有用なゲノム、ポリヌクレオチド、及びポリペプチド情報は、例えば、GeneCard 識別番号: GC06M002887、HGNC 番号: 8955、NCBI 遺伝子番号: 5272、Uniprot 番号: P50453、ならびに NCBI 参照配列番号: NP_004146.1、NM_004155.5、XP_005249241.1、及び XM_005249184.4 において提供される。ある特定の実施形態では、*S e r p i n B 9* をコードするポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可能に連結される。

10

【0473】

幾つかの実施形態では、*S e r p i n B 9* をコードするポリヌクレオチドは、表 2 に示される遺伝子座のいずれかに挿入される。幾つかの例では、*S e r p i n B 9* をコードするポリヌクレオチドは、セーフハーバー遺伝子座、例えば、限定されるものではないが、AAVS1 (PPP1R12C としても公知)、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3 (CD142 としても公知)、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1 (CD91 としても公知)、MICA、MICB、RHD、ROSA26、及び SHS231 遺伝子座から選択される遺伝子座に挿入される。実施形態では、*S e r p i n B 9* をコードするポリヌクレオチドは、CCR5 遺伝子座、PPP1R12C (AAVS1 としても公知) 遺伝子座、または CLYBL 遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、*S e r p i n B 9* をコードするポリヌクレオチドは、B2M 遺伝子座または CIITA 遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、T 細胞であり、*S e r p i n B 9* をコードするポリヌクレオチドは、TRAC 遺伝子座または TRBC 遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、好適な遺伝子編集システム（例えば、CRISPR/Cas システムまたは本明細書に記載される遺伝子編集システムのいずれか）が、*S e r p i n B 9* をコードするポリヌクレオチドの細胞のゲノム遺伝子座への挿入を促進するために使用される。

20

30

【0474】

幾つかの実施形態では、*S e r p i n B 9* タンパク質発現は、*S e r p i n B 9* タンパク質に対する抗体でプローブされた細胞溶解物のウェスタンブロットを使用して検出される。幾つかの実施形態では、外来性 *S e r p i n B 9* mRNA の存在を確認するために、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) が使用される。

【0475】

2. キメラ抗原受容体

幾つかの実施形態では、提供される遺伝子操作された細胞は、キメラ抗原受容体 (CAR) を発現するように更に改変されている。CAR 改変細胞に関する実施形態は、本明細書に記載されるような任意の好適な細胞種、ならびに HIP 細胞、安全スイッチ、及び本明細書に記載されるような他の改変／遺伝子編集された細胞に容易に適用され得ることが理解されよう。

40

【0476】

幾つかの実施形態では、提供される細胞は、1 種以上の MHC クラス I 分子、1 種以上の MHC クラス II 分子、または 1 種以上の MHC クラス I 分子及び 1 種以上の MHC クラス II 分子の発現を調節する 1 種以上の標的ポリヌクレオチド配列の遺伝子改変を含有し、本明細書に記載されるような免疫寛容誘導因子（例えば、CD47）を過剰発現し、

50

CARを発現する。幾つかの実施形態では、細胞は、B2Mが低減または除去（例えば、ノックアウト）されており、CIITAが低減または除去（例えば、ノックアウト）されており、CD47が過剰発現し、CARが発現する細胞である。幾つかの実施形態では、細胞は、B2M^{-/-}、CIITA^{-/-}、CD47tg、CAR⁺である。幾つかの実施形態では、細胞（例えば、T細胞）は、TRACが低減または除去（例えば、ノックアウト）されている更なる細胞であり得る。幾つかの実施形態では、細胞は、B2^{-/-}、CIITA、CD47tg、TRAC^{-/-}、CAR⁺である。

【0477】

幾つかの実施形態では、CARをコードするポリヌクレオチドが細胞に導入される。幾つかの実施形態では、細胞は、T細胞、例えば、初代T細胞または多能性細胞（例えば、iPSC）から分化したT細胞である。幾つかの実施形態では、細胞は、ナチュラルキラー（NK）細胞、例えば、初代NK細胞または多能性細胞（例えば、iPSC）から分化したNK細胞である。

【0478】

幾つかの実施形態では、CARは、第1世代CAR、第2世代CAR、第3世代CAR、及び第4世代CARからなる群から選択される。幾つかの実施形態では、CARは、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、及び少なくとも1個のシグナル伝達ドメイン（例えば、1、2、または3個のシグナル伝達ドメイン）を含む第1世代CARであるか、またはそれを含む。幾つかの実施形態では、CARは、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、及び少なくとも2個のシグナル伝達ドメインを含む第2世代CARを含む。幾つかの実施形態では、CARは、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、及び少なくとも3個のシグナル伝達ドメインを含む第3世代CARを含む。幾つかの実施形態では、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、3または4個のシグナル伝達ドメイン、及びCARのシグナル伝達の成功時にサイトカイン遺伝子の発現を誘発するドメインを含む第4世代CAR。幾つかの実施形態では、抗原結合ドメインは、抗体、抗体断片、scFv、またはFabであるか、またはそれを含む。

【0479】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される細胞のいずれかは、CARまたは第1世代CARをコードする核酸を含む。幾つかの実施形態では、第1世代CARは、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、及びシグナル伝達ドメインを含む。幾つかの実施形態では、シグナル伝達ドメインは、T細胞活性化において下流シグナル伝達を媒介する。

【0480】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される細胞のいずれかは、CARまたは第2世代CARをコードする核酸を含む。幾つかの実施形態では、第2世代CARは、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、及び2個のシグナル伝達ドメインを含む。幾つかの実施形態では、シグナル伝達ドメインは、T細胞活性化において下流シグナル伝達を媒介する。幾つかの実施形態では、シグナル伝達ドメインは、共刺激ドメインである。幾つかの実施形態では、共刺激ドメインは、を増強するサイトカイン産生、CAR T細胞増殖、及び／またはCAR T細胞持続性を増強する。

【0481】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される細胞のいずれかは、CARまたは第3世代CARをコードする核酸を含む。幾つかの実施形態では、第3世代CARは、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、及び少なくとも3個のシグナル伝達ドメインを含む。幾つかの実施形態では、シグナル伝達ドメインは、T細胞活性化において下流シグナル伝達を媒介する。幾つかの実施形態では、シグナル伝達ドメインは、共刺激ドメインである。幾つかの実施形態では、共刺激ドメインは、を増強するサイトカイン産生、CAR T細胞増殖、及び／またはCAR T細胞持続性を増強する。幾つかの実施形態では、第3世代CARは、少なくとも2個の共刺激ドメインを含む。幾つかの実施形態では、少なくとも2個の共刺激ドメインは、同じではない。

【0482】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される細胞のいずれかは、CARまたは第4世代CARをコードする核酸を含む。幾つかの実施形態では、第4世代CARは、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、及び少なくとも2、3、または、4個のシグナル伝達ドメインを含む。幾つかの実施形態では、シグナル伝達ドメインは、T細胞活性化において下流シグナル伝達を媒介する。幾つかの実施形態では、シグナル伝達ドメインは、共刺激ドメインである。幾つかの実施形態では、共刺激ドメインは、を増強するサイトカイン産生、CAR T細胞増殖、及び／またはCAR T細胞持続性を増強する。

【0483】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される遺伝子操作された細胞（例えば、初代T細胞もしくはiPSCに由来するT細胞または初代NK細胞もしくはiPSCに由来するNK細胞）は、CARをコードするポリヌクレオチドを含み、ここで、当該ポリヌクレオチドは、ゲノム遺伝子座に挿入されている。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、セーフハーバー遺伝子座、例えば、限定されるものではないが、AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26、SHS231、F3（CD142としても公知）、MICA、MICB、LRP1（CD91としても公知）、HMGB1、ABO、RHD、FUT1、またはKDM5D遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、B2M、CIITA、TRAC、TRB、PD1、またはCTLA4遺伝子に挿入される。本明細書に記載される遺伝子編集法（例えば、CRISPR/Casシステム）が含まれる、低免疫原性細胞のゲノム遺伝子座にCARを挿入するための任意の好適な方法が使用され得る。

【0484】

幾つかの実施形態では、第1、第2、第3、または第4世代CARは、CARのシグナル伝達の成功時にサイトカイン遺伝子の発現を誘発するドメインを更に含む。幾つかの実施形態では、サイトカイン遺伝子は、CARのシグナル伝達の成功時にサイトカイン遺伝子の発現を誘発するドメインを含むCARを含む標的細胞に内在するか、またはその外部に由来する。幾つかの実施形態では、サイトカイン遺伝子は、炎症誘発性サイトカインをコードする。幾つかの実施形態では、サイトカイン遺伝子は、IL-1、IL-2、IL-9、IL-12、IL-18、TNF、またはIFN- γ 、またはその機能断片をコードする。幾つかの実施形態では、CARのシグナル伝達の成功時にサイトカイン遺伝子の発現を誘発するドメインは、転写因子またはその機能ドメインもしくは断片であるか、またはそれを含む。幾つかの実施形態では、CARのシグナル伝達の成功時にサイトカイン遺伝子の発現を誘発するドメインは、転写因子またはその機能ドメインもしくは断片であるか、またはそれを含む。幾つかの実施形態では、転写因子またはその機能ドメインもしくは断片は、活性化T細胞核因子（NFAT）、NF- κ B、またはその機能ドメインもしくは断片であるか、またはそれを含む。例えば、Zhang.

C. et al., Engineering CAR-T cells. Biomarker Research. 5:22 (2017)、WO2016126608、Sha, H. et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy for tumour immunotherapy. Bioscience Reports Jan 27, 2017, 37 (1)を参照のこと。

【0485】

当業者は、CARならびにCARの種々の構成要素及び立体構造に精通している。任意の公知のCARが提供される実施形態と共に用いられ得る。本明細書に記載されるCARに加えて、様々なCAR及びそれをコードするヌクレオチド配列が当技術分野において公知であり、本明細書に記載されるように細胞を遺伝子操作するのに適している。例えば、WO2013040557、WO2012079000、WO2016030414、Smith T, et al., Nature Nanotechnology. 2017. DOI:10.1038/NNANO.2017.57（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）を参照のこと。CARの例示的な特徴及び構成要素は、以下のサブセクションに記載される。

【0486】

a. 抗原結合ドメイン

幾つかの実施形態では、CAR抗原結合ドメイン(ABD)は、抗体またはその抗原結合部分であるか、またはそれを含む。幾つかの実施形態では、CAR抗原結合ドメインは、scFvまたはFabであるか、またはそれを含む。

【0487】

幾つかの実施形態では、抗原結合ドメインは、細胞の細胞表面抗原に結合する。幾つかの実施形態では、細胞表面抗原は、特定の細胞種または特異的な細胞種に特徴的である(例えば、それらにより発現される)。幾つかの実施形態では、細胞表面抗原は、2つ以上の種類の細胞に特徴的である。

【0488】

幾つかの実施形態では、抗原は、腫瘍細胞上に排他的もしくは優先的に発現される抗原、または自己免疫もしくは炎症性疾患に特徴的な抗原であり得る。幾つかの実施形態では、抗原結合ドメイン(ABD)は、腫瘍細胞に特徴的な抗原を標的とする。例えば、抗原結合ドメインは、腫瘍細胞またはがん細胞により発現される抗原を標的とする。幾つかの実施形態では、ABDは、腫瘍関連抗原を結合する。幾つかの実施形態では、腫瘍細胞に特徴的な抗原(例えば、腫瘍細胞またはがん細胞に関連する抗原)または腫瘍関連抗原は、細胞表面受容体、イオンチャネル連結型受容体、酵素連結型受容体、Gタンパク質共役受容体、受容体型チロシンキナーゼ、チロシンキナーゼ関連受容体、受容体様チロシンホスファターゼ、受容体セリン／トレオニンキナーゼ、受容体グアニリルシクラーゼ、ヒスチジンキナーゼ関連受容体から選択される。

【0489】

幾つかの実施形態では、標的抗原は、限定されるものではないが、上皮成長因子受容体(EGFR)(ErbB1／EGFR、ErbB2／HER2、ErbB3／HER3、及びErbB4／HER4が含まれる)、線維芽細胞成長因子受容体(FGFR)(FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF5、FGF6、FGF7、FGF18、及びFGF21が含まれる)、血管内皮成長因子受容体(VEGFR)(VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、及びPIGFが含まれる)、RET受容体及びEph受容体ファミリー(EphA1、EphA2、EphA3、EphA4、EphA5、EphA6、EphA7、EphA8、EphA9、EphA10、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、及びEphB6が含まれる)、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR6、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR8、CFTTR、CIC-1、CIC-2、CIC-4、CIC-5、CIC-7、CIC-Ka、CIC-Kb、ベストロフィン、TMEM16A、GABA受容体、グリシン受容体、ABC輸送体、NAV1.1、NAV1.2、NAV1.3、NAV1.4、NAV1.5、NAV1.6、NAV1.7、NAV1.8、NAV1.9、スフィンゴシン-1-リン酸受容体(S1P1R)、NMDAチャネル、膜貫通タンパク質、複数回膜貫通タンパク質、T細胞受容体モチーフ、T細胞α鎖、T細胞β鎖、T細胞γ鎖、T細胞δ鎖、CCR7、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD11b、CD11c、CD16、CD19、CD20、CD21、CD22、CD25、CD28、CD34、CD35、CD40、CD45RA、CD45RO、CD52、CD56、CD62L、CD68、CD80、CD95、CD117、CD127、CD133、CD137(4-1BB)、CD163、F4／80、IL-4Ra、Scα-1、CTLA-4、GITR、GARP、LAP、グランザイムB、LFA-1、トランスフェリン受容体、NKp46、パーフォリン、CD4+、Th1、Th2、Th17、Th40、Th22、Th9、Tfh、カノニカルTreg、FoxP3+、Tr1、Th3、Treg17、TREG、CDCP、NT5E、EpCAM、CEA、gpA33、ムチン、TAG-72、炭酸脱水酵素IX、PSMA、葉酸結合タンパク質、ガングリオシド(例えば、CD2、CD3、GM2)、ルイスーγ2、VEGF、VEGFR1／2／3、αVβ3、α5β1、ErbB1／EGFR、ErbB1／HER2、E

10

20

30

40

50

r B 3、c-MET、IGF1R、EphA3、TRAIL-R1、TRAIL-R2、RANKL、FAP、テネイシン、PDL-1、BAFF、HDAC、ABL、FLT3、KIT、MET、RET、IL-1 β 、ALK、RANKL、mTOR、CTLA-4、IL-6、IL-6R、JAK3、BRAF、PTCH、スムーズンド、PIGF、ANPEP、TIMP1、PLAUR、PTPRJ、LTBR、もしくはANTXR1、葉酸受容体 α (FR α)、ERBB2 (Her2/neu)、EphA2、IL-13Ra2、上皮成長因子受容体 (EGFR)、メソテリン、TSHR、CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1、CLL-1、CD33、EGFRvIII、GD2、GD3、BCMA、MUC16 (CA125)、L1CAM、LeY、MSLN、IL13R α 1、L1-CAM、Tn Ag、前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、ROR1、FLT3、FAP、TAG72、CD38、CD44v6、CEA、EPCAM、B7H3、KIT、インターロイキン-11受容体 (IL-11Ra)、PSCA、PRSS21、VEGFR2、ルイスY、CD24、血小板由来成長因子受容体- β (PDGFR- β)、SSEA-4、CD20、MUC1、NCAM、プロスターゼ、PAP、ELF2M、エフリンB2、IGF-1受容体、CAIX、LMP2、gp100、bcr-abl、チロシナーゼ、フコシルGM1、sLe、GM3、TGS5、HMWMAA、 α -アセチル-GD2、葉酸受容体 β 、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、GPRC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、ポリシアル酸、PLACL、GloboH、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TARP、WT1、NY-ESO-1、LAGE-1a、MAGE-A1、レグマイン、HPV E6、E7、ETV6-AML、精子タンパク質17、XAGE1、Tie2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、主要組織適合複合体クラスI関連遺伝子タンパク質 (MR1)、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子受容体 (uPAR)、Fos関連抗原1、p53、p53変異体、プロステイン、サバイビン、テロメラゼ、PCTA-1/ガレクチン8、メランA/MART1、Ras変異体、hTERT、肉腫転座切断点、ML-IAP、ERG (TMPRSS2-ETS融合遺伝子)、NA17、PAX3、アンドロゲン受容体、サイクリンB1、MYCN、RhoC、TRP-2、CYP1B1、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、ヒトテロメラゼ逆転写酵素、RU1、RU2、腸カルボキシルエステラーゼ、mut hsp70-2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5、IGLL1、新生抗原、CD133、CD15、CD184、CD24、CD56、CD26、CD29、CD44、HLA-A、HLA-B、HLA-C (HLA-A、B、C)、CD49f、CD151、CD340、CD200、tkrA、trkB、もしくはtrkC、またはそれらの抗原性断片もしくは抗原性部分が挙げられる抗原である。

10

20

30

40

50

【0490】

幾つかの実施形態では、例示的な標的抗原としては、限定されるものではないが、CD5、CD19、CD20、CD22、CD23、CD30、CD70、 κ 、 λ 、及びB細胞成熟物質 (BCMA) (白血病に関連する)；CS1/SLAMF7、CD38、CD138、GPRC5D、TACI、及びBCMA (骨髄腫に関連する)；GD2、HER2、EGFR、EGFRvLL1、B7H3、PSMA、PSCA、CAIX、CD171、CEA、CSPG4、EPHA2、FAP、FR α 、IL-13Ra、メソテリン、MUC1、MUC16、及びROR1 (固形腫瘍に関連する) が挙げられる。

【0491】

幾つかの実施形態では、CARは、CD19 CARである。幾つかの実施形態では、CD19 CARの細胞外結合ドメインは、CD19、例えば、ヒトCD19に特異的に結合する抗体を含む。幾つかの実施形態では、CD19 CARの細胞外結合ドメインは、FMC63モノクローナル抗体 (FMC63) に由来するscFv抗体断片を含み、当

該 s c F v 抗体断片は、リンカーペプチドにより連結された F M C 6 3 の重鎖可変領域 (V H) 及び軽鎖可変領域 (V L) を含む。幾つかの実施形態では、リンカーペプチドは、「Whitlow」リンカーペプチドである。F M C 6 3 及びそれに由来する s c F v は、Nicholson et al., Mal. Immun. 34 (16-17): 1157-1165 (1997) 及び PCT 出願公開第 WO 2018/213337 A1 号 (これらの各々の全内容は参照により本明細書に組み込まれる) に記載されている。

【0492】

幾つかの実施形態では、CD19 CAR の細胞外結合ドメインは、例えば、SJ25 C1 (Bejcek et al., Cancer Res. 55: 2346-2351 (1995))、HD37 (Pezutto et al., J. Immunol. 138 (9): 2793-2799 (1987))、4G7 (Meeker et al., Hybridoma 3: 305-320 (1984))、B43 (Bejcek (1995))、BLY3 (Bejcek (1995))、B4 (Freedman et al., 70: 418-427 (1987))、B4 HB12b (Kansas & Tedder, J. Immunol. 147: 4094-4102 (1991))、Yazawa et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 15178-15183 (2005)、Herbst et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 335: 213-222 (2010))、BU12 (Gallard et al., J. Immunology, 148 (10): 2983-2987 (1992))、及び CLB-CD19 (De Rie Cell. Immunol. 118: 368-381 (1989)) が含まれる、CD19 特異的抗体のうちの 1 つに由来する抗体を含む。

【0493】

幾つかの実施形態では、CAR は、CD22 CAR である。成熟 B 細胞の表面上に見出される膜貫通タンパク質である CD22 は、B 細胞受容体 (BCR) シグナル伝達の抑制性受容体として機能する。CD22 は、B 細胞リンパ腫及び白血病 (例えば、B 慢性リンパ球性白血病、毛様細胞性白血病、急性リンパ球性白血病 (ALL)、及びバーキットリンパ腫) の 60~70% において発現し、B 細胞発生の初期段階の細胞表面または幹細胞上には存在しない。幾つかの実施形態では、CD22 CAR は、CD22 に特異的に結合する細胞外結合ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメイン、及び / または細胞内共刺激ドメインを含む。幾つかの実施形態では、CD22 CAR の細胞外結合ドメインは、リンカーにより連結された m971 の重鎖可変領域 (VH) 及び軽鎖可変領域 (VL) を含む、m971 モノクローナル抗体 (m971) に由来する s c F v 抗体断片を含む。幾つかの実施形態では、CD22 CAR の細胞外結合ドメインは、親抗体 m971 と比較して CD22 結合親和性が著しく改善した (約 2 nM から 50 pM 未満まで改善した) m971 の親和性成熟したバリエーションである m971-L7 に由来する s c F v 抗体断片を含む。幾つかの実施形態では、m971-L7 に由来する s c F v 抗体断片は、3xG4S リンカーにより連結された m971-L7 の VH 及び VL を含む。幾つかの実施形態では、CD22 CAR の細胞外結合ドメインは、免疫毒素 HA22 または BL22 を含む。免疫毒素 BL22 及び HA22 は、細菌毒素に融合された CD22 に特異的な s c F v を含む治療薬であり、従って、CD22 を発現するがん細胞の表面に結合することができ、がん細胞を死滅させることができる。BL22 は、シュードモナス外毒素 A の 38 kDa の短縮型に融合された、抗 CD22 抗体である RFB4 の d s F v を含む (Bang et al., Clin. Cancer Res., 11: 1545-50 (2005))。HA22 (CAT8015、モキセツモマブパスードトクス) は、BL22 より高親和の変異型バージョンである (Ho et al., J. Biol. Chem., 280 (1): 607-17 (2005))。CD22 に特異的な HA22 及び BL22 の抗原結合ドメインの好適な配列は、例えば、米国特許第 7,541,034 号、第 7,355,012 号、及び第 7,982,011 号 (これらは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) に開示されている。

10

20

30

40

50

【0494】

幾つかの実施形態では、CARは、BCMA CARである。BCMAは、B細胞系列の細胞上に発現する腫瘍壊死ファミリー受容体（TNFR）のメンバーであり、終末分化したB細胞または成熟Bリンパ球で最も発現が高い。BCMAは、長期の体液性免疫を維持するために形質細胞の生存を媒介することに関与する。近年、BCMAの発現は、多数の癌、例えば、多発性骨髄腫、ホジキン及び非ホジキンリンパ腫、様々な白血病、ならびに神経膠芽腫に関連付けられている。幾つかの実施形態では、BCMA CARは、BCMAを特異的に結合する細胞外結合ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメイン、及び／または細胞内共刺激ドメインを含む。幾つかの実施形態では、BCMA CARの細胞外結合ドメインは、BCMA、例えば、ヒトBCMAに特異的に結合する抗体を含む。BCMAに対して指向されたCARは、PCT出願公開第WO2016/014789号、第WO2016/014565号、第WO2013/154760号、及び第WO2015/128653号に記載されている。BCMA結合性抗体もPCT出願公開第WO2015/166073号及び第WO2014/068079号に開示されている。幾つかの実施形態では、BCMA CARの細胞外結合ドメインは、Carpenter et al., Clin. Cancer Res. 19 (8): 2048-2060 (2013)に記載されるようなマウスモノクローナル抗体に由来するscFv抗体断片を含む。幾つかの実施形態では、scFv抗体断片は、マウスモノクローナル抗体のヒト化バージョンである（Sommermeyer et al., Leukemia 31: 2191-2199 (2017)）。幾つかの実施形態では、BCMA CARの細胞外結合ドメインは、Zhao et al., J. Hematol. Oncol. 11 (1): 141 (2018)に記載されるようなBCMAの2つのエピトープに結合することができる2本の重鎖（VHH）の単一可変断片を含む。幾つかの実施形態では、BCMA CARの細胞外結合ドメインは、Lam et al., Nat. Commun. 11 (1): 283 (2020)に記載されるような完全ヒト重鎖可変ドメイン（FHVH）を含む。

10

20

【0495】

幾つかの実施形態では、抗原結合ドメインは、自己免疫疾患または炎症性疾患に特徴的な抗原を標的とする。幾つかの実施形態では、ABDは、自己免疫疾患または炎症性疾患に関連する抗原を結合する。幾つかの例では、抗原は、自己免疫疾患または炎症性疾患に関連する細胞により発現される。幾つかの実施形態では、自己免疫疾患または炎症性疾患は、慢性移植片対宿主病（GVHD）、ループス、関節炎、免疫複合体糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、ブドウ膜炎、肝炎、全身性硬化症または強皮症、I型糖尿病、多発性硬化症、寒冷凝集素症、尋常性天疱瘡、グレーブス病、自己免疫溶血性貧血、血友病A、原発性シェーグレン症候群、血栓性血小板減少性紫斑病、視神経脊髄炎、エバンス症候群、IgM媒介性神経障害、クリオグロブリン血症、皮膚筋炎、特発性血小板減少症、強直性脊椎炎、水疱性類天疱瘡、後天性血管性浮腫、慢性蕁麻疹、抗リン脂質脱髄性多発神経炎、及び自己免疫血小板減少症または好中球減少症または赤芽球癆から選択され、一方で、同種免疫性疾患の典型的な非限定的例としては、造血器官または固体臓器移植、輸血による同種感作（例えば、Blazar et al., 2015, Am. J. Transplant, 15 (4): 931-41を参照のこと）または異種感作、胎児性同種感作を伴う妊娠、新生児同種免疫性血小板減少症、新生児溶血性疾患が挙げられ、外来抗原への感作は、例えば、酵素またはタンパク質補充療法、血液製剤、及び遺伝子療法で処置される遺伝性または後天性欠損障害の補充に伴って起こり得る。同種感作とは、一部の例では、レシピエント対象または妊娠している対象の免疫系が非自己抗原と見なすヒト白血球抗原に対する免疫応答（例えば、循環抗体）の発生を指す。幾つかの実施形態では、自己免疫疾患または炎症性疾患に特徴的な抗原は、細胞表面受容体、イオンチャネル連結型受容体、酵素連結型受容体、Gタンパク質共役受容体、受容体型チロシンキナーゼ、チロシンキナーゼ関連受容体、受容体様チロシンホスファターゼ、受容体セリン／トレオニンキナーゼ、受容体グアニリルシクラーゼ、またはヒスチジンキナーゼ関連受容体から選択

30

40

50

される。

【0496】

幾つかの実施形態では、CARの抗原結合ドメインは、B細胞、形質細胞、または形質芽細胞上に発現されるリガンドに結合する。幾つかの実施形態では、CARの抗原結合ドメインは、CD10、CD19、CD20、CD22、CD24、CD27、CD38、CD45R、CD138、CD319、BCMA、CD28、TNF、インターフェロン受容体、GM-CSF、ZAP-70、LFA-1、CD3γ、CD5、またはCD2に結合する。US2003/0077249、WO2017/058753、WO2017/058850（その内容は参照により本明細書に組み込まれる）を参照のこと。幾つかの実施形態では、CARは、抗CD19 CARである。幾つかの実施形態では、CARは、抗BCMA CARである。

10

【0497】

幾つかの実施形態では、抗原結合ドメインは、老化細胞に特徴的な抗原、例えば、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子受容体（uPAR）を標的とする。幾つかの実施形態では、ABDは、老化細胞に関連する抗原を結合する。幾つかの例では、抗原は、老化細胞により発現される。幾つかの実施形態では、CARは、老化細胞の異常な蓄積を特徴とする障害、例えば、肝線維症及び肺線維症、アテローム硬化症、糖尿病、及び変形性関節炎の処置または予防に使用され得る。

【0498】

幾つかの実施形態では、抗原結合ドメインは、感染性疾患に特徴的な抗原を標的とする。幾つかの実施形態では、ABDは、感染性疾患に関連する抗原を結合する。幾つかの例では、抗原は、感染性疾患による影響を受けた細胞により発現される。幾つかの実施形態では、感染性疾患は、HIV、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ヒトヘルペスウイルス、ヒトヘルペスウイルス8（HHV-8、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス（KSHV））、ヒトT細胞白血病ウイルス1型（HTLV-1）、メルケル細胞ポリオーマウイルス（MCV）、シミアンウイルス40（SV40）、エプスタイン・バーウイルス、CMV、ヒトパピローマウイルスから選択される。幾つかの実施形態では、感染性疾患に特徴的な抗原は、細胞表面受容体、イオンチャネル連結型受容体、酵素連結型受容体、Gタンパク質共役受容体、受容体型チロシンキナーゼ、チロシンキナーゼ関連受容体、受容体様チロシンホスファターゼ、受容体セリン／トレオニンキナーゼ、受容体グアニリルシクラーゼ、ヒスチジンキナーゼ関連受容体、HIV Env、gp120、またはHIV-1 Env上のCD4誘導エピトープから選択される。

20

30

【0499】

これらの実施形態のいずれかでは、CARの細胞外結合ドメインは、宿主細胞における発現のためにコドン最適化され得るか、または細胞外結合ドメインの機能を増強するためのバリエーション配列を有し得る。

【0500】

幾つかの実施形態では、CARは、2つの標的抗原に対して二重特異性である。幾つかの実施形態では、標的抗原は、異なる標的抗原である。任意のかかる実施形態のうちの幾つかでは、2つの異なる標的抗原は、任意の2つの上記の異なる抗原である。幾つかの実施形態では、細胞外結合ドメインは異なり、(i) CD19及びCD20、(ii) CD20及びL1-CAM、(iii) L1-CAM及びGD2、(iv) EGFR及びL1-CAM、(v) CD19及びCD22、(vi) EGFR及びC-MET、(vii) EGFR及びHER2、(viii) C-MET及びHER2、または(ix) EGFR及びROR1の2つの異なる抗原に結合する。幾つかの実施形態では、2つの異なる抗原結合ドメインの各々は、scFvである。幾つかの実施形態では、第1のscFvの一方の変域ドメイン（VHまたはVL）のC末端は、ポリペプチドリンカーにより第2のscFv（それぞれVLまたはVH）のN末端に係留されている。幾つかの実施形態では、リンカーは、VHのN末端をVLのC末端と連結するか、またはVHのC末端をVLのN末端と連結する。これらのscFvは、天然抗体の重鎖及び軽鎖に存在する定常領域（Fc

40

50

）を欠く。少なくとも2つの異なる抗原に特異的なs c F vが直列に配置され、膜貫通ドメインにより共刺激ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインに連結される。幾つかの実施形態では、細胞外スペーサドメインが、抗原特異的結合領域と膜貫通ドメインとの間に連結され得る。

【0501】

幾つかの実施形態では、CARの各抗原特異的標的化領域は、二価（divalent）（または二価（bivalent））の単鎖可変断片（ジs c F v、ビスc F v）を含む。ジs c F Vsを含むCARにおいて、各抗原に特異的な2つのs c F vは、2つのVH領域及び2つのVL領域を有する単一のペプチド鎖を産生させ、タンデム型s c F vを生じさせることにより互いに連結されている（Xiong, Cheng-Yi; Natarajan, A; Shi, X B; Denardo, G L; Denardo, S J (2006). “Development of tumor targeting anti-MUC-1 multimer: effects of di-s c F v unpaired cysteine location on PEGylation and tumor binding”. Protein Engineering Design and Selection 19 (8): 359-367、Kufer, Peter; Lutterbuse, Ralf; Baeuerle, Patrick A. (2004). “A revival of bispecific antibodies”. Trends in Biotechnology 22 (5): 238-244）。少なくとも2つの抗原特異的標的化領域を含むCARは、2つの抗原の各々に特異的な2つのs c F vを発現する。少なくとも2つの異なる抗原に特異的な得られる抗原特異的標的化領域は、膜貫通ドメインにより共刺激ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインに連結されている。幾つかの実施形態では、細胞外スペーサドメインが、抗原特異的結合ドメインと膜貫通ドメインとの間に連結され得る。

【0502】

幾つかの実施形態では、CARの各抗原特異的標的化領域は、ダイアボディを含む。ダイアボディにおいて、s c F vは、2つの可変領域と一緒に折り畳まれるには短すぎるリンカーペプチドを用いて作製され、これにより、s c F vの二量体化が引き起こされる。更に短いリンカー（1または2アミノ酸）は、三量体、いわゆるトリアボディまたはトリボディの形成を引き起こす。テトラボディも使用され得る。

【0503】

幾つかの実施形態では、細胞は、2種以上のCAR、例えば、2種の異なるCARを発現するように遺伝子操作され、ここで、各CARは、異なる標的抗原に対して指向された抗原結合ドメインを有する。任意のかかる実施形態のうちの幾つかでは、2つの異なる標的抗原は、任意の2つの上記の異なる抗原である。幾つかの実施形態では、細胞外結合ドメインは異なり、（i）CD19及びCD20、（ii）CD20及びL1-CAM、（iii）L1-CAM及びGD2、（iv）EGFR及びL1-CAM、（v）CD19及びCD22、（vi）EGFR及びC-MET、（vii）EGFR及びHER2、（viii）C-MET及びHER2、または（ix）EGFR及びROR1の2つの異なる抗原に結合する。

【0504】

幾つかの実施形態では、提供される改変を含有する2種の異なる遺伝子操作された細胞が調製され、各々が異なるCARで遺伝子操作されている。幾つかの実施形態では、2つの異なるCARの各々は、異なる標的抗原に対して指向された抗原結合ドメインを有する。任意のかかる実施形態のうちの幾つかでは、2つの異なる標的抗原は、任意の2つの上記の異なる抗原である。幾つかの実施形態では、細胞外結合ドメインは異なり、（i）CD19及びCD20、（ii）CD20及びL1-CAM、（iii）L1-CAM及びGD2、（iv）EGFR及びL1-CAM、（v）CD19及びCD22、（vi）EGFR及びC-MET、（vii）EGFR及びHER2、（viii）C-MET及びHER2、または（ix）EGFR及びROR1の2つの異なる抗原に結合する。幾つか

の実施形態では、第1の標的抗原に対して指向された第1のCARを発現する遺伝子操作された（例えば、低免疫原性）細胞の集団、及び第2の標的抗原に対して指向された第2のCARを発現する遺伝子操作された（例えば、低免疫原性）細胞の集団が対象に個別に投与される。幾つかの実施形態では、第1及び第2の細胞集団は、任意の順序で逐次投与される。例えば、第2のCARを発現する細胞集団は、第1のCARを発現する細胞集団の投与後に投与される。

【0505】

b. スペーサー

幾つかの実施形態では、CARは、1個以上のスペーサーを更に含み、ここで、例えば、スペーサーは、抗原結合ドメインと膜貫通ドメインとの間の第1のスペーサーである。幾つかの実施形態では、第1のスペーサーは、免疫グロブリン定常領域またはそのバリエーションもしくは改変型の少なくとも一部を含む。幾つかの実施形態では、スペーサーは、膜貫通ドメインとシグナル伝達ドメインとの間の第2のスペーサーである。幾つかの実施形態では、第2のスペーサーは、オリゴペプチドであり、ここで、例えば、当該オリゴペプチドは、グリシン及びセリン残基、例えば、限定されるものではないが、グリシン-セリンダブレットを含む。幾つかの実施形態では、CARは、2つ以上のスペーサー、例えば、抗原結合ドメインと膜貫通ドメインとの間のスペーサー、及び膜貫通ドメインとシグナル伝達ドメインとの間のスペーサーを含む。

【0506】

c. 膜貫通ドメイン

幾つかの実施形態では、CARの膜貫通ドメインは、T細胞受容体の α 、 β 、もしくは ζ 鎖、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD28、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、またはそれらの機能的バリエーションの少なくとも膜貫通領域を含む。幾つかの実施形態では、膜貫通ドメインは、CD8 α 、CD8 β 、4-1BB/CD137、CD28、CD34、CD4、Fc ϵ RI γ 、CD16、OX40/CD134、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 、TCR β 、TCR ζ 、CD32、CD64、CD64、CD45、CD5、CD9、CD22、CD37、CD80、CD86、CD40、CD40L/CD154、VEGFR2、FAS、及びFGFR2B、またはそれらの機能的バリエーションの少なくとも膜貫通領域（複数可）を含む。

【0507】

d. シグナル伝達ドメイン（複数可）

幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるCARは、B7-1/CD80、B7-2/CD86、B7-H1/PD-L1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、B7-H7、BTLA/CD272、CD28、CTLA-4、Gi24/VISTA/B7-H5、ICOS/CD278、PD-1、PD-L2/B7-DC、PDCD6、4-1BB/TNFSF9/CD137、4-1BBリガンド/TNFSF9、BAFF/BLyS/TNFSF13B、BAFFR/TNFRSF13C、CD27/TNFRSF7、CD27リガンド/TNFSF7、CD30/TNFRSF8、CD30リガンド/TNFSF8、CD40/TNFRSF5、CD40/TNFSF5、CD40リガンド/TNFSF5、DR3/TNFRSF25、GITR/TNFRSF18、GITRリガンド/TNFSF18、HVEM/TNFRSF14、LIGHT/TNFSF14、リンホトキシン- α /TNF- β 、OX40/TNFRSF4、OX40リガンド/TNFSF4、RELTT/TNFRSF19L、TACI/TNFRSF13B、TL1A/TNFSF15、TNF- α 、TNFR1/TNFRSF1B、2B4/CD244/SLAMF4、BLAME/SLAMF8、CD2、CD2F-10/SLAMF9、CD48/SLAMF2、CD58/LFA-3、CD84/SLAMF5、CD229/SLAMF3、CRACC/SLAMF7、NTB-A/SLAMF6、SLAM/CD150、CD2、CD7、CD53、CD82/Kai-1、CD90/

10

20

30

40

50

Thy 1、CD 96、CD 160、CD 200、CD 300 a / LMIR 1、HLA クラス I、HLA-DR、Ik ar os、インテグリン $\alpha 4$ / CD 49 d、インテグリン $\alpha 4 \beta 1$ 、インテグリン $\alpha 4 \beta 7$ / LPAM-1、LAG-3、TCL 1A、TCL 1B、CRTAM、DAP 12、デクチン-1 / CLEC 7A、DPP IV / CD 26、Eph B 6、TIM-1 / KIM-1 / HAVCR、TIM-4、TSLP、TSLP R、リンパ球機能関連抗原 1 (LFA-1)、NKG 2C、CD 3 ζ ドメイン、免疫受容体活性化チロシンモチーフ (ITAM)、CD 27、CD 28、4-1BB、CD 134 / OX 40、CD 30、CD 40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原 1 (LFA-1)、CD 2、CD 7、LIGHT、NKG 2C、B7-H3、CD 83 に特異的に結合するリガンド、またはそれらの機能断片のうちの 1 つ以上から選択される 1 個または少なくとも 1 個のシグナル伝達ドメインを含む。

10

【0508】

幾つかの実施形態では、少なくとも 1 個のシグナル伝達ドメインは、CD 3 ζ ドメインもしくは免疫受容体活性化チロシンモチーフ (ITAM) またはそれらの機能的バリエーションを含む。

【0509】

幾つかの実施形態では、CAR は、共刺激ドメインであるシグナル伝達ドメインを含む。幾つかの実施形態では、CAR は、第 2 の共刺激ドメインを含む。幾つかの実施形態では、CAR は、少なくとも 2 個の共刺激ドメインを含む。幾つかの実施形態では、CAR は、少なくとも 3 個の共刺激ドメインを含む。幾つかの実施形態では、CAR は、CD 27、CD 28、4-1BB、CD 134 / OX 40、CD 30、CD 40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原 1 (LFA-1)、CD 2、CD 7、LIGHT、NKG 2C、B7-H3、CD 83 に特異的に結合するリガンドのうちの 1 つ以上から選択される共刺激ドメインを含む。幾つかの実施形態では、CAR が 2 個以上の共刺激ドメインを含む場合、2 個の共刺激ドメインは異なる。幾つかの実施形態では、CAR が 2 個以上の共刺激ドメインを含む場合、2 個の共刺激ドメインは同じである。

20

【0510】

他の実施形態では、少なくとも 1 個のシグナル伝達ドメインは、(i) CD 3 ζ ドメインもしくは免疫受容体活性化チロシンモチーフ (ITAM) またはそれらの機能的バリエーション、及び (ii) CD 28 ドメインもしくは 4-1BB ドメインまたはそれらの機能的バリエーションを含む。更なる他の実施形態では、少なくとも 1 個のシグナル伝達ドメインは、(i) CD 3 ζ ドメインもしくは免疫受容体活性化チロシンモチーフ (ITAM) またはそれらの機能的バリエーション、(ii) CD 28 ドメインまたはその機能的バリエーション、及び (iii) 4-1BB ドメインもしくは CD 134 ドメインまたはそれらの機能的バリエーションを含む。幾つかの実施形態では、少なくとも 1 個のシグナル伝達ドメインは、(i) CD 3 ζ ドメインもしくは免疫受容体活性化チロシンモチーフ (ITAM) またはそれらの機能的バリエーション、(ii) CD 28 ドメインまたはその機能的バリエーション、(iii) 4-1BB ドメインもしくは CD 134 ドメインまたはそれらの機能的バリエーション、及び (iv) サイトカインまたは共刺激リガンド導入遺伝子を含む。

30

【0511】

幾つかの実施形態では、少なくとも 2 個のシグナル伝達ドメインは、CD 3 ζ ドメインもしくは免疫受容体活性化チロシンモチーフ (ITAM) またはそれらの機能的バリエーションを含む。他の実施形態では、少なくとも 2 個のシグナル伝達ドメインは、(i) CD 3 ζ ドメインもしくは免疫受容体活性化チロシンモチーフ (ITAM) またはそれらの機能的バリエーション、及び (ii) CD 28 ドメインもしくは 4-1BB ドメインまたはそれらの機能的バリエーションを含む。更なる他の実施形態では、少なくとも 1 個のシグナル伝達ドメインは、(i) CD 3 ζ ドメインもしくは免疫受容体活性化チロシンモチーフ (ITAM) またはそれらの機能的バリエーション、(ii) CD 28 ドメインまたはその機能的バリエーション、及び (iii) 4-1BB ドメインもしくは CD 134 ドメインまたはそれらの機能的バリエーションを含む。幾つかの実施形態では、少なくとも 2 個のシグナル伝達ドメインは、(i) CD 3 ζ ドメインもしくは免疫受容体活性化チロシンモチーフ (ITAM) またはそれらの機能的バリエーション、(ii) CD 28 ドメインまたはその機能的バリエーション、(iii) 4-1BB ドメインもしくは CD 134 ドメインまたはそれらの機能的バリエーション、及び (iv) サイトカインまたは共刺激リガンド導入遺伝子を含む。

40

50

ンは、(i) CD3ζドメインもしくは免疫受容体活性化チロシンモチーフ (ITAM) またはそれらの機能的バリエーション、(ii) CD28ドメインまたはその機能的バリエーション、(iii) 4-1BBドメインもしくはCD134ドメインまたはそれらの機能的バリエーション、及び(iv) サイトカインまたは共刺激リガンド導入遺伝子を含む。

【0512】

幾つかの実施形態では、少なくとも3個のシグナル伝達ドメインは、CD3ζドメインもしくは免疫受容体活性化チロシンモチーフ (ITAM) またはそれらの機能的バリエーションを含む。他の実施形態では、少なくとも3個のシグナル伝達ドメインは、(i) CD3ζドメインもしくは免疫受容体活性化チロシンモチーフ (ITAM) またはそれらの機能的バリエーション、及び(ii) CD28ドメインもしくは4-1BBドメインまたはそれらの機能的バリエーションを含む。更なる他の実施形態では、少なくとも3個のシグナル伝達ドメインは、(i) CD3ζドメインもしくは免疫受容体活性化チロシンモチーフ (ITAM) またはそれらの機能的バリエーション、(ii) CD28ドメインまたはその機能的バリエーション、及び(iii) 4-1BBドメインもしくはCD134ドメインまたはそれらの機能的バリエーションを含む。幾つかの実施形態では、少なくとも3個のシグナル伝達ドメインは、(i) CD3ζドメインもしくは免疫受容体活性化チロシンモチーフ (ITAM) またはそれらの機能的バリエーション、(ii) CD28ドメインまたはその機能的バリエーション、(iii) 4-1BBドメインもしくはCD134ドメインまたはそれらの機能的バリエーション、及び(iv) サイトカインまたは共刺激リガンド導入遺伝子を含む。

【0513】

幾つかの実施形態では、CARは、CD3ζドメインもしくは免疫受容体活性化チロシンモチーフ (ITAM) またはそれらの機能的バリエーションを含む。幾つかの実施形態では、CARは、(i) CD3ζドメインもしくは免疫受容体活性化チロシンモチーフ (ITAM) またはそれらの機能的バリエーション、及び(ii) CD28ドメインもしくは4-1BBドメインまたはそれらの機能的バリエーションを含む。

【0514】

幾つかの実施形態では、CARは、(i) CD3ζドメインもしくは免疫受容体活性化チロシンモチーフ (ITAM) またはそれらの機能的バリエーション、(ii) CD28ドメインまたはその機能的バリエーション、及び(iii) 4-1BBドメインもしくはCD134ドメインまたはそれらの機能的バリエーションを含む。

【0515】

幾つかの実施形態では、CARは、(i) CD3ζドメインもしくは免疫受容体活性化チロシンモチーフ (ITAM) またはそれらの機能的バリエーション、(ii) CD28ドメインもしくは4-1BBドメインまたはそれらの機能的バリエーション、及び／または(iii) 4-1BBドメインもしくはCD134ドメインまたはそれらの機能的バリエーションを含む。

【0516】

幾つかの実施形態では、CARは、(i) CD3ζドメインもしくは免疫受容体活性化チロシンモチーフ (ITAM) またはそれらの機能的バリエーション、(ii) CD28ドメインまたはその機能的バリエーション、(iii) 4-1BBドメインもしくはCD134ドメインまたはそれらの機能的バリエーション、及び(iv) サイトカインまたは共刺激リガンド導入遺伝子を含む。

【0517】

e. 例示的なCAR

幾つかの実施形態では、CARは、抗原 (例えば、腫瘍抗原) に結合する細胞外抗原結合ドメイン (例えば、抗体または抗体断片、例えば、scFv)、スペーサー (例えば、本明細書に記載される任意のものなどのヒンジドメインを含有する)、膜貫通ドメイン (例えば、本明細書に記載される任意のもの)、及び細胞内シグナル伝達ドメイン (例えば、任意の細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、本明細書に記載されるような一次シグナル伝達ドメインまたは共刺激シグナル伝達ドメイン) を含む。幾つかの実施形態では、細

10

20

30

40

50

胞内シグナル伝達ドメインは、一次細胞質シグナル伝達ドメインであるか、またはそれを含む。幾つかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメイン（例えば、共刺激ドメイン）を追加的に含む。かかる構成要素のいずれかは、上記に記載される任意のものであり得る。

【0518】

CARの例示的な構成要素の例は、表8に記載される。提供される態様では、CARにおける各構成要素の配列は、表8に列挙される任意の組み合わせを含み得る。

表8．CARの構成要素及び例示的な配列

【表8－1】

表8．CARの構成要素及び例示的な配列

構成要素	配列	配列番号
細胞外結合ドメイン		
抗CD19 s c F v (FMC63)	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCR ASQDISKYL N WYQKPDGTVKLL IYHTSRLHSGVPSRFSGSGSG TD YSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL PYTFGGGT KLEITGSTSGSGKPG SGEGSTKGEVKLQESGPG L VAPS QSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQ PPRKGL EWLGVWGETTYNSA LKSRLTIKDNSKSQVF LKMNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGG SYAMDYW GQGTSTVTSS	208
抗CD19 s c F v (FMC63)	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCR ASQDISKYL N WYQKPDGTVKLL IYHTSRLHSGVPSRFSGSGSG TD YSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL PYTFGGGT KLEITGGGSGGGGS GGGGSEVKLQESGPG LVA PSQSL SVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPR KGLEW LGVIWGETTYNSALKS RLTIKDNSKSQVFLK MNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQ GTSVTSS	209
スパーサー（例えば、ヒンジ）		
I g G4ヒンジ	ESKYGPPCPPCP	210
CD8ヒンジ	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRP E	211
CD28	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKG KHLCPSP LFP G PSKP	212
膜貫通		
CD8	ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW APLAGTCGV LLSLVITLYC	213

【表8－2】

CD28	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFI I FWV	214
CD28	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFI I FWV	215
共刺激ドメイン		
CD28	RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTR KHYQPYAPP R DFAAYRS	216
4-1BB	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQE EDGCSCRFPE EEEGGCEL	217
一次シグナル伝達ドメイン		
CD3ζ	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL NLGRREEY DVLDKRRGRDP EMGG KPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEA YSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLS TA TKD TYDALHMQALPPR	217
CD3ζ	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNEL NLGRREEY DVLDKRRGRDP EMGG KPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEA YSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLS TA TKD TYDALHMQALPPR	218

【0519】

（キメラ免疫受容体、キメラT細胞受容体、または人工T細胞受容体としても公知）は、特定のタンパク質を標的とする新たな能力を宿主細胞（例えば、T細胞）に与えるように遺伝子操作された受容体タンパク質である。この受容体は、それらが抗原結合機能及び

T細胞活性化機能を単一の受容体に組み込んでいるため、キメラである。CARは、標的抗原に特異的に結合する細胞外結合ドメイン（「結合剤」とも称される）、膜貫通ドメイン、及び細胞内シグナル伝達ドメインを含み得る。ある特定の実施形態では、CARは、1個以上のシグナルペプチド、1個以上の細胞外のヒンジドメイン、及び／または1個以上の細胞内共刺激ドメインが含まれる、1個以上の追加の構成要素を更に含み得る。ドメインは、互いに直接隣接していてもよく、またはドメインを連結する1個以上のアミノ酸が存在してもよい。CARをコードするヌクレオチド配列は、哺乳動物配列、例えば、マウス配列、霊長類配列、ヒト配列、またはそれらの組み合わせに由来し得る。CARをコードするヌクレオチド配列が非ヒトである場合、CARの配列はヒト化され得る。CARをコードするヌクレオチド配列は、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞での発現のためにコドン最適化され得る。これらの実施形態のいずれかでは、CARをコードするヌクレオチド配列は、本明細書において開示されるヌクレオチド配列のいずれかと少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）であり得る。配列多様性は、コドン最適化、ヒト化、制限酵素によるクローニングスカー、及び／または機能ドメインを連結する追加のアミノ酸残基などに起因し得る。

10

【0520】

ある特定の実施形態では、CARは、N末端にシグナルペプチドを含み得る。シグナルペプチドの非限定的な例としては、CD8 α シグナルペプチド、IgKシグナルペプチド、及び顆粒球マクロファージコロニー刺激因子受容体サブユニット α （GMCSFR- α 、コロニー刺激因子2受容体サブユニット α （CSF2RA）としても公知）シグナルペプチド、ならびにそれらのバリエーションが挙げられ、それらのアミノ酸配列を以下の表9に示す。

20

【表9】

表9. シグナルペプチドの例示的な配列

配列番号	配列	説明
219	MALPVTALLPLALLL HAARP	CD8 α シグナルペプチド
220	METDTLLWVLLWVP GSTG	IgKシグナルペプチド
221	MLLLVTSLLCELPHP AFLLIIP	GMCSFR- α (CSF2RA) シグナルペプチド

30

【0521】

ある特定の実施形態では、CARの細胞外結合ドメインは、1種の標的抗原または複数の標的抗原に特異的な1種以上の抗体を含み得る。抗体は、抗体断片、例えば、scFv、または単ドメイン抗体断片、例えば、VHHであり得る。ある特定の実施形態では、scFvは、リンカーにより連結された抗体の重鎖可変領域（VH）及び軽鎖可変領域（VL）を含み得る。VH及びVLは、いずれかの順序、すなわち、VH-リンカー-VLまたはVL-リンカー-VHの順序で連結され得る。リンカーの非限定的な例としては、Whitlowリンカー、（G4S）_nリンカー（nは正の整数、例えば、1、2、3、4、5、6などであり得る）、及びそれらのバリエーションが挙げられる。ある特定の実施形態では、抗原は、腫瘍細胞上に排他的もしくは優先的に発現される抗原、または自己免疫もしくは炎症性疾患に特徴的な抗原であり得る。例示的な標的抗原としては、限定されるものではないが、CD5、CD19、CD20、CD22、CD23、CD30、CD33、CD70、 κ 、 λ 、B細胞成熟物質（BCMA）、及びGタンパク質共役受容体ファミリーCグループ5メンバーD（GPRC5D）（白血病に関連する）；CS1/SLAMF7、CD38、CD138、GPRC5D、TACI、及びBCMA（骨髄腫に関連する）；CD123、LeY、NKG2Dリガンド、及びWT1（他の血液癌に関連する）；GD2、HER2、EGFR、EGFRvIII、B7H3、PSMA、PSCA、CAIX、CD171、CEA、CSPG4、EPHA2、FAP、FR α 、IL-1

40

50

3 R α 、メソテリン、MUC1、MUC16、ROR1、C-Met、CD133、Ep-CAM、GPC3、HPV16-E6、IL13Ra2、MAGEA3、MAGEA4、MART1、NY-ESO-1、VEGFR2、 α 葉酸受容体、CD24、CD44v7/8、EGP-2、EGP-40、erb-B2、erb-B2, 3, 4、FBP、胎児アセチルコリン受容体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-11R α 、KDR、ルイスY、L1細胞接着分子、MAGE-A1、癌胎児性抗原(h5T4)、及びTAG-72(固形腫瘍に関連する)；A*02(臓器移植に関連する)；線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)(線維症に関連する)；ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子受容体(uPAR)(老化に関連する)が挙げられる。ある特定の実施形態では、CARは、自己反応性免疫細胞を選択的に枯渇させるためのキメラ自己抗体受容体(CAAR)として再設計され得る。ある特定の実施形態では、CAARは、免疫細胞に存在する自己抗体を標的とするように遺伝子操作される。CAARの例示的な標的抗原としては、限定されるものではないが、DSG3(尋常性天疱瘡に関連する)；第VII因子(FVII)(血友病に関連する)が挙げられる。これらの実施形態のいずれかでは、CARの細胞外結合ドメインは、宿主細胞における発現のためにコドン最適化され得るか、または細胞外結合ドメインの機能を増強するためのバリエーション配列を有し得る。

10

20

30

40

50

【0522】

ある特定の実施形態では、CARは、スペーサーとも称されるヒンジドメインを含み得る。用語「ヒンジ」及び「スペーサー」は、本開示において互換的に使用され得る。ヒンジドメインの非限定的な例としては、CD8 α ヒンジドメイン、CD28ヒンジドメイン、IgG4ヒンジドメイン、IgG4ヒンジ-CH2-CH3ドメイン、及びそれらのバリエーションが挙げられ、それらのアミノ酸配列を以下の表10に示す。

【表10】

表10. ヒンジドメインの例示的な配列

配列番号	配列	説明
222	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAV HTRGLDFA CD	CD8 α ヒンジドメイン
223	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIHV KGKHLCPSPFLPG PSKP	CD28ヒンジドメイン
224	AAAIIEVMYPPPYLDNEKSNGTI IHVKGKHLCPSPFL FPGPSKP	CD28ヒンジドメイン
225	ESKYGPPCPPCP	IgG4ヒンジドメイン
226	ESKYGPPCPSCP	IgG4ヒンジドメイン
227	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMIS RTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHN AKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEY KCKVSN KGLPSSIEKTIKAKGQPREPQ VYTLPPS QEEMTKNQVSLTCL VKGFPYPSDIAVEWESNGQPE N NYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLT VDKSRWQEGNV FSCVMHEAL HNHYTQKSLSLGLGK	IgG4ヒンジ-CH2-CH3ドメイン

【0523】

ある特定の実施形態では、CARの膜貫通ドメインは、T細胞受容体の α 、 β 、または ζ 鎖、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、またはそれらの機能的バリエーション(これらの配列の各々のヒトバージョンが含まれる)の膜貫通領域を含み得る。他の実施形態では、膜貫通ドメインは、CD8 α 、CD8 β 、4-1BB/CD137、CD28、CD34、CD4、Fc ϵ RI γ 、CD16、OX40/CD134、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 、TCR β 、TCR ζ 、CD32、CD64、CD64、CD45、CD5、CD9、CD22、CD37、CD80、CD86、CD40、CD40L/CD154、VEGFR2、FAS、及びFGFR2B、またはそれらの機能的バリエーション(これらの配列の各々のヒトバージョンが含まれる)の膜貫通領域を含み得る。表11は、幾つかの例示的な膜貫通ドメインのアミノ酸配列を示す。

【表 1 1】

表 1 1. 膜貫通ドメインの例示的な配列

配列番号	配列	説明
228	IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC	CD8 α 膜貫通ドメイン
229	FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28膜貫通ドメイン
230	MFWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28膜貫通ドメイン

【0524】

ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメイン及び／または細胞内共刺激ドメインは、B7-1/CD80、B7-2/CD86、B7-H1/PD-L1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、B7-H7、BTLA/CD272、CD28、CTLA-4、Gi24/VISTA/B7-H5、ICOS/CD278、PD-1、PD-L2/B7-DC、PDCD6、4-1BB/TNFSF9/CD137、4-1BBリガンド/TNFSF9、BAFF/BLyS/TNFSF13B、BAFF R/TNFRSF13C、CD27/TNFRSF7、CD27リガンド/TNFSF7、CD30/TNFRSF8、CD30リガンド/TNFSF8、CD40/TNFRSF5、CD40/TNFSF5、CD40リガンド/TNFSF5、DR3/TNFRSF25、GITR/TNFRSF18、GITRリガンド/TNFSF18、HVEM/TNFRSF14、LIGHT/TNFSF14、リンホトキシン- α /TNF β 、OX40/TNFRSF4、OX40リガンド/TNFSF4、RELT/TNFRSF19L、TACI/TNFRSF13B、TL1A/TNFSF15、TNF α 、TNFR1/TNFRSF1B、2B4/CD244/SLAMF4、BLAME/SLAMF8、CD2、CD2F-10/SLAMF9、CD48/SLAMF2、CD58/LFA-3、CD84/SLAMF5、CD229/SLAMF3、CRACC/SLAMF7、NTB-A/SLAMF6、SLAM/CD150、CD2、CD7、CD53、CD82/Kai-1、CD90/Thy1、CD96、CD160、CD200、CD300a/LMIR1、HLAクラスI、HLA-DR、Ikaros、インテグリン α 4/CD49d、インテグリン α 4 β 1、インテグリン α 4 β 7/LPAM-1、LAG-3、TCL1A、TCL1B、CRTAM、DAP12、デクチン1/CLEC7A、DPPIV/CD26、EphB6、TIM-1/KIM-1/HAVCR、TIM-4、TSLP、TSLP R、リンパ球機能関連抗原1(LFA-1)、NKG2C、CD3 ζ 、免疫受容体活性化チロシンモチーフ(ITAM)、CD27、CD28、4-1BB、CD134/OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83に特異的に結合するリガンド、及びそれらの機能的バリエーション(これらの配列の各々のヒトバージョンが含まれる)から選択される1個以上のシグナル伝達ドメインを含み得る。幾つかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメイン及び／または細胞内共刺激ドメインは、CD3 ζ ドメイン、ITAM、CD28ドメイン、4-1BBドメイン、またはそれらの機能的バリエーションから選択される1個以上のシグナル伝達ドメインを含む。表12は、幾つかの例示的な細胞内共刺激及び／またはシグナル伝達ドメインのアミノ酸配列を示す。ある特定の実施形態では、以下に記載されるチサゲンレクルユーセルの場合のように、配列番号233のCD3 ζ シグナル伝達ドメインは、アミノ酸位14に変異、例えば、グルタミン(Q)からリジン(K)への変異を有し得る(配列番号234を参照のこと)。

10

20

30

40

50

【表 1 2】

表 1 2. 細胞内共刺激及び／またはシグナル伝達ドメインの例示的な配列

配列番号	配列	説明
2 3 1	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQE EDGCSCRFPEEEEGGCEL	4-1BB共刺激ド メイン
2 3 2	RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTR KHYQPYAPPRDFAAYRS	CD28共刺激ドメ イン
2 3 3	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPPR	CD3 ζ シグナル伝 達ドメイン
2 3 4	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNEL NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPPR	CD3 ζ シグナル伝 達ドメイン(14位 にQからKへの変異 を有する)

10

【0 5 2 5】

f. CD19 CAR

幾つかの実施形態では、CARは、CD19 CARであり、これらの実施形態では、第2の導入遺伝子は、CD19 CARをコードするヌクレオチド配列を含む。幾つかの実施形態では、CD19 CARは、シグナルペプチド、CD19に特異的に結合する細胞外結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内共刺激ドメイン、及び／または細胞内シグナル伝達ドメインを直列に含み得る。

【0 5 2 6】

幾つかの実施形態では、CD19 CARのシグナルペプチドは、CD8 α シグナルペプチドを含む。幾つかの実施形態では、CD8 α シグナルペプチドは、配列番号219に記載されるアミノ酸配列、または配列番号219に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、シグナルペプチドは、IgKシグナルペプチドを含む。幾つかの実施形態では、IgKシグナルペプチドは、配列番号220に記載されるアミノ酸配列、または配列番号220に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、シグナルペプチドは、GMC SFR- α またはCSF2RAシグナルペプチドを含む。幾つかの実施形態では、GMC SFR- α またはCSF2RAシグナルペプチドは、配列番号221に記載されるアミノ酸配列、または配列番号221に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

20

30

【0 5 2 7】

幾つかの実施形態では、CD19 CARの細胞外結合ドメインは、CD19、例えば、ヒトCD19に特異的である。CD19 CARの細胞外結合ドメインは、宿主細胞における発現のためにコドン最適化され得るか、または細胞外結合ドメインの機能を増強するためのバリエーション配列を有し得る。幾つかの実施形態では、細胞外結合ドメインは、免疫グロブリン分子の免疫原性活性部分、例えば、scFvを含む。

40

【0 5 2 8】

幾つかの実施形態では、CD19 CARの細胞外結合ドメインは、FMC63モノクローナル抗体（FMC63）に由来するscFvを含み、当該scFvは、リンカーにより連結されたFMC63の重鎖可変領域（V_H）及び軽鎖可変領域（V_L）を含む。FMC63及びそれに由来するscFvは、Nicholson et al., Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-1165 (1997) 及びPCT出願公開第

50

WO 2018 / 213337号（これらの各々の全内容は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。幾つかの実施形態では、FMC63に由来するs c F v（FMC63 s c F vとも称される）の全体及びその異なる部分のアミノ酸配列を以下の表13に示す。幾つかの実施形態では、CD19特異的s c F vは、配列番号235、236、もしくは241に記載されるアミノ酸配列、または配列番号235、236、もしくは241に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、CD19特異的s c F vは、配列番号237、238、239、及び241、243、244に記載されるアミノ酸配列を有する1個以上のCDRを含み得る。幾つかの実施形態では、CD19特異的s c F vは、配列番号237、238、239に記載されるアミノ酸配列を有する1個以上のCDRを有する軽鎖を含み得る。幾つかの実施形態では、CD19特異的s c F vは、配列番号242、243、244に記載されるアミノ酸配列を有する1個以上のCDRを有する重鎖を含み得る。これらの実施形態のいずれかでは、CD19特異的s c F vは、1つ以上のアミノ酸置換を含むか、または同定された配列のいずれかと少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）な配列を含む1個以上のCDRを含み得る。幾つかの実施形態では、CD19 CARの細胞外結合ドメインは、本明細書に記載される1個以上のCDRを含むか、またはそれからなる。

10

20

【0529】

幾つかの実施形態では、s c F vのV_H及びV_L部分を連結するリンカーは、配列番号240に記載されるアミノ酸配列を有するWhitlowリンカーである。幾つかの実施形態では、Whitlowリンカーは、異なるリンカー、例えば、配列番号246に記載されるアミノ酸配列を有する3xG4Sリンカーと置き換えられ得、これにより、配列番号245に記載されるアミノ酸配列を有する、FMC63に由来する異なるs c F vが得られ得る。これらの実施形態の幾つかでは、CD19特異的s c F vは、配列番号245に記載されるアミノ酸配列、または配列番号245に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

30

40

【表13-1】

表13. 抗CD19 s c F v及び構成要素の例示的な配列

配列番号	アミノ酸配列	説明
235	DIQMTQTSSLSASLGDRVTIS CRASQDISKYL N WYQQKPDGT VKLLIYHTSRLHSGVPSRFSG SGSGTDYSLTISNLEQEDIATY FCQQGNTLPY TFGGGTKLEIT GSTSGSGKPGSGEGSTKG LQESGPGLVAPSSQSLSVTCTVS GVSLPDYGVS WIRQPPRKGLE WLGVIWGSETTYNSALKSRLT IIKDNSKSKVFLKMNSLQTD AIYYCAKH YYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSS	抗CD19 FMC63 Whitlowリンカー を有するs c F v全体の 配列
236	DIQMTQTSSLSASLGDRVTIS CRASQDISKYL N WYQQKPDGT VKLLIYHTSRLHSGVPSRFSG SGSGTDYSLTISNLEQEDIATY FCQQGNTLPY TFGGGTKLEIT	抗CD19 FMC63 s c F v軽鎖可変領域
237	QDISKY	抗CD19 FMC63 s c F v軽鎖CDR1
238	HTS	抗CD19 FMC63 s c F v軽鎖CDR2
239	QQGNTLPYT	抗CD19 FMC63 s c F v軽鎖CDR3
240	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Whitlowリンカー

50

【表 13-2】

241	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTC TVSGVSLPDY GVSWIRQPPRK GLEWLGVIWGSETTYNSAL K SRLTI IKDNSKSQVFLKMNSLQ TDDTAIYYC AKHYYYGGSYAM DYWGQGTSTVTVSS	抗CD19 FMC63 s c Fv 重鎖可変領域
242	GVSLPDYG	抗CD19 FMC63 s c Fv 重鎖CDR1
243	IWGSETT	抗CD19 FMC63 s c Fv 重鎖CDR2
244	AKHYYYGGSYAMDY	抗CD19 FMC63 s c Fv 重鎖CDR3
245	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTIS CRASQDISKYL NWYQQKPDGT VKLLIYHTSRLHSGVPSRFSG SGSGTDYSLTISNLEQEDIATY FCQQGNTLPY TFGGGTKLEIT GGGSGGGSGGGGSEVKLQ E SGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVS LPDYGVS WI RQPPRKGLEWLG VIWGSETTYNSALKSRLT II KDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAI YYCAKHY YYGGSYAMDYWGQG TSVTVSS	抗CD19 FMC63 3xG4Sリンカーを有 するs c Fv全体の配列
246	GGGSGGGSGGGGS	3xG4Sリンカー

10

【0530】

幾つかの実施形態では、CD19 CARの細胞外結合ドメインは、例えば、SJ25C1 (Bejcek et al., Cancer Res. 55:2346-2351 (1995))、HD37 (Pezutto et al., J. Immunol. 138(9):2793-2799 (1987))、4G7 (Meeker et al., Hybridoma 3:305-320 (1984))、B43 (Bejcek (1995))、BLY3 (Bejcek (1995))、B4 (Freedman et al., 70:418-427 (1987))、B4 HB12b (Kansas & Tedder, J. Immunol. 147:4094-4102 (1991))、Yazawa et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:15178-15183 (2005)、Herbst et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 335:213-222 (2010))、BU12 (Callard et al., J. Immunology, 148(10):2983-2987 (1992))、及びCLB-CD19 (De Rie Cell. Immunol. 118:368-381 (1989))が含まれる、CD19に特異的な抗体に由来する。これらの実施形態のいずれかでは、CD19 CARの細胞外結合ドメインは、抗体のいずれかのV_H、V_L、及び／または1個以上のCDRを含み得るか、またはそれからなり得る。

20

30

【0531】

幾つかの実施形態では、CD19 CARのヒンジドメインは、CD8αヒンジドメイン、例えば、ヒトCD8αヒンジドメインを含む。幾つかの実施形態では、CD8αヒンジドメインは、配列番号222に記載されるアミノ酸配列、または配列番号222に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、ヒンジドメインは、CD28ヒンジドメイン、例えば、ヒトCD28ヒンジドメインを含む。幾つかの実施形態では、CD28ヒンジドメインは、配列番号223に記載されるアミノ酸配列、または配列番号223に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、ヒンジドメインは、IgG4ヒンジドメイン、例えば、ヒトIgG4ヒンジドメインを含む。幾つかの実施形態では、IgG4ヒンジド

40

50

メインは、配列番号 1 2 A もしくは配列番号 1 3 A に記載されるアミノ酸配列、または配列番号 1 2 A もしくは配列番号 1 3 A に記載されるアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % 同一（例えば、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % 同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、ヒンジドメインは、I g G 4 ヒンジ-C h 2-C h 3 ドメイン、例えば、ヒト I g G 4 ヒンジ-C h 2-C h 3 ドメインを含む。幾つかの実施形態では、I g G 4 ヒンジ-C h 2-C h 3 ドメインは、配列番号 2 2 7 に記載されるアミノ酸配列、または配列番号 2 2 7 に記載されるアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % 同一（例えば、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % 同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

10

【0532】

幾つかの実施形態では、C D 1 9 C A R の膜貫通ドメインは、C D 8 α 膜貫通ドメイン、例えば、ヒト C D 8 α 膜貫通ドメインを含む。幾つかの実施形態では、C D 8 α 膜貫通ドメインは、配列番号 1 5 A に記載されるアミノ酸配列、または配列番号 1 5 A に記載されるアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % 同一（例えば、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % 同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、膜貫通ドメインは、C D 2 8 膜貫通ドメイン、例えば、ヒト C D 2 8 膜貫通ドメインを含む。幾つかの実施形態では、C D 2 8 膜貫通ドメインは、配列番号 2 2 9 に記載されるアミノ酸配列、または配列番号 2 2 9 に記載されるアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % 同一（例えば、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % 同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

20

【0533】

幾つかの実施形態では、C D 1 9 C A R の細胞内共刺激ドメインは、4-1 B B 共刺激ドメインを含む。C D 1 3 7 としても公知の 4-1 B B は、強い共刺激シグナルを T 細胞に伝達し、これにより、分化を促進し、T リンパ球の長期生存を増強する。幾つかの実施形態では、4-1 B B 共刺激ドメインは、ヒトである。幾つかの実施形態では、4-1 B B 共刺激ドメインは、配列番号 2 3 1 に記載されるアミノ酸配列、または配列番号 2 3 1 に記載されるアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % 同一（例えば、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % 同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、細胞内共刺激ドメインは、C D 2 8 共刺激ドメインを含む。C D 2 8 は、T 細胞上の別の共刺激分子である。幾つかの実施形態では、C D 2 8 共刺激ドメインは、ヒトである。幾つかの実施形態では、C D 2 8 共刺激ドメインは、配列番号 2 3 2 に記載されるアミノ酸配列、または配列番号 2 3 2 に記載されるアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % 同一（例えば、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % 同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、C D 1 9 C A R の細胞内共刺激ドメインは、記載されるような 4-1 B B 共刺激ドメイン及び C D 2 8 共刺激ドメインを含む。

30

40

【0534】

幾つかの実施形態では、C D 1 9 C A R の細胞内シグナル伝達ドメインは、C D 3 ゼータ (ζ) シグナル伝達ドメインを含む。C D 3 ζ は、T 細胞受容体 (T C R) と会合して、シグナルを生じ、免疫受容体活性化チロシンモチーフ (I T A M) を含有する。C D 3 ζ シグナル伝達ドメインは、T 細胞活性化に必要な初期シグナルを機能的に伝達するのに十分な、 ζ 鎖の細胞質ドメイン由来のアミノ酸残基を指す。幾つかの実施形態では、C

50

D3シグナル伝達ドメインは、ヒトである。幾つかの実施形態では、CD3シグナル伝達ドメインは、配列番号233に記載されるアミノ酸配列、または配列番号233に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

【0535】

幾つかの実施形態では、第2の導入遺伝子は、例えば、配列番号235もしくは配列番号245に記載される配列を有するCD19特異的scFv、配列番号222のCD8αヒンジドメイン、配列番号15AのCD8α膜貫通ドメイン、配列番号231の4-1BB共刺激ドメイン、配列番号233のCD3シグナル伝達ドメイン、及び／またはそれらのバリエーション（すなわち、本開示の配列と少なくとも80%同一な、例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一な配列を有する）を含むCD19 CARが含まれる、CD19 CARをコードするヌクレオチド配列を含む。これらの実施形態のいずれかでは、CD19 CARは、記載されるようなシグナルペプチド（例えば、CD8αシグナルペプチド）を追加的に含み得る。

【0536】

幾つかの実施形態では、第2の導入遺伝子は、例えば、配列番号235もしくは配列番号245に記載される配列を有するCD19特異的scFv、配列番号12Aもしくは配列番号13AのIgG4ヒンジドメイン、配列番号229のCD28膜貫通ドメイン、配列番号231の4-1BB共刺激ドメイン、配列番号233のCD3シグナル伝達ドメイン、及び／またはそれらのバリエーション（すなわち、本開示の配列と少なくとも80%同一な、例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一な配列を有する）を含むCD19 CARが含まれる、CD19 CARをコードするヌクレオチド配列を含む。これらの実施形態のいずれかでは、CD19 CARは、記載されるようなシグナルペプチド（例えば、CD8αシグナルペプチド）を追加的に含み得る。

【0537】

幾つかの実施形態では、第2の導入遺伝子は、例えば、配列番号235もしくは配列番号245に記載される配列を有するCD19特異的scFv、配列番号223のCD28ヒンジドメイン、配列番号229のCD28膜貫通ドメイン、配列番号232のCD28共刺激ドメイン、配列番号233のCD3シグナル伝達ドメイン、及び／またはそれらのバリエーション（すなわち、本開示の配列と少なくとも80%同一な、例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一な配列を有する）を含むCD19 CARが含まれる、CD19 CARをコードするヌクレオチド配列を含む。これらの実施形態のいずれかでは、CD19 CARは、記載されるようなシグナルペプチド（例えば、CD8αシグナルペプチド）を追加的に含み得る。

【0538】

幾つかの実施形態では、第2の導入遺伝子は、配列番号247に記載されるようなCD19 CARをコードするヌクレオチド配列を含むか、または配列番号247に記載されるヌクレオチド配列と少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）である（表14を参照のこと）。コードされるCD19 CARは、配列番号248に記載される対応するアミノ酸配列を有するか、または配列番号248に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または

100%同一)であり、以下の構成要素を有する：CD8 α シグナルペプチド、FMC63 scFv (V_L-Whitlowリンカー-V_H)、CD8 α ヒンジドメイン、CD8 α 膜貫通ドメイン、4-1BB共刺激ドメイン、及びCD3 ζ シグナル伝達ドメイン。
【0539】

幾つかの実施形態では、第2の導入遺伝子は、CD19 CARの商業的に入手可能な具体的実例をコードするヌクレオチド配列を含む。T細胞により発現され、及び／またはコードされるCD19 CARの商業的に入手可能な具体的実例の非限定的な例としては、チサゲンレクルユーセル、リソカブタゲンマラルユーセル、アキシカブタゲンシロルユーセル、及びブレクスカブタジェンアウトルーセルが挙げられる。

【0540】

幾つかの実施形態では、第2の導入遺伝子は、チサゲンレクルユーセルまたはその一部をコードするヌクレオチド配列を含む。チサゲンレクルユーセルは、以下の構成要素を有するCD19 CARを含む：CD8 α シグナルペプチド、FMC63 scFv (V_L-3xG4Sリンカー-V_H)、CD8 α ヒンジドメイン、CD8 α 膜貫通ドメイン、4-1BB共刺激ドメイン、及びCD3 ζ シグナル伝達ドメイン。チサゲンレクルユーセルのCD19 CARのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を表14に示し、配列の注釈を表15に示す。

【0541】

幾つかの実施形態では、第2の導入遺伝子は、リソカブタゲンマラルユーセルまたはその一部をコードするヌクレオチド配列を含む。リソカブタゲンマラルユーセルは、以下の構成要素を有するCD19 CARを含む：GMCSFR- α またはCSF2RAシグナルペプチド、FMC63 scFv (V_L-Whitlowリンカー-V_H)、IgG4ヒンジドメイン、CD28膜貫通ドメイン、4-1BB共刺激ドメイン、及びCD3 ζ シグナル伝達ドメイン。リソカブタゲンマラルユーセルのCD19 CARのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を表14に示し、配列の注釈を表16に示す。

【0542】

幾つかの実施形態では、第2の導入遺伝子は、アキシカブタゲンシロルユーセルまたはその一部をコードするヌクレオチド配列を含む。アキシカブタゲンシロルユーセルは、以下の構成要素を有するCD19 CARを含む：GMCSFR- α またはCSF2RAシグナルペプチド、FMC63 scFv (V_L-Whitlowリンカー-V_H)、CD28ヒンジドメイン、CD28膜貫通ドメイン、CD28共刺激ドメイン、及びCD3 ζ シグナル伝達ドメイン。アキシカブタゲンシロルユーセルのCD19 CARのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を表14に示し、配列の注釈を表17に示す。

【0543】

幾つかの実施形態では、第2の導入遺伝子は、ブレクスカブタジェンアウトルーセルまたはその一部をコードするヌクレオチド配列を含む。ブレクスカブタジェンアウトルーセルは、以下の構成要素を有するCD19 CARを含む：GMCSFR- α シグナルペプチド、FMC63 scFv、CD28ヒンジドメイン、CD28膜貫通ドメイン、CD28共刺激ドメイン、及びCD3 ζ シグナル伝達ドメイン。

【0544】

幾つかの実施形態では、第2の導入遺伝子は、配列番号249、251、もしくは253に記載されるようなCD19 CARをコードするヌクレオチド配列を含むか、または配列番号249、251、もしくは253に記載されるヌクレオチド配列と少なくとも80%同一(例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一)である。

コードされるCD19 CARは、それぞれ配列番号250、252、もしくは254に記載される対応するアミノ酸配列を有するか、またはそれぞれ配列番号250、252、もしくは254に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一(例えば、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96%、

10

20

30

40

50

少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一) である。

【表 14-1】

表 14. CD19 CAR の例示的な配列

配列番号	配列	説明
247	atggccttaccagtgaccgacctgtgct cctgccgctggccttgcctgctccacg c cggcaggcgagacatccagatgae acagactacatcctccctgtctgacct ct ctgggagacagagtcacccatcag ttgcaggcgcaagtcaggacattagta aa tatttaaatgtggtatcagcagaa accagatggaaactgtttaacctctga tctac catacatcaagattacactc aggagtcccatcaaggttcagtggtca gtgggt ctggaacagattattctct caccattagcaacctggagcagaag atattgcc acttacttttgccaaca gggtaatacgccttcggtacacgttcg gagggggga ceaagctggagatcac aggcgccacctctggatccggcgaagc cgggattctg gcgagggtccacca gggcgagggtgaaactgcaggagtcag gacctggg cctgggtggcgccctcac gagcctgttcggtcacatgcaactgtct cagggggtc tcattaccggactatgg tghtaagctggattcggccagcctccac gaaagggtct ggaggtggctgggagt aatatggggtagtgaaaccacatact ataattcagct ctcaaatccagact gaccatcatcaaggacaactccaaga gccaaagttttctt aaaaaatgaacag tctgcaaacctgatgacacagccattt actactgtgccaaac attattacta cgggtggtagctatgctaaggactact ggggccaaaggaaacctca	例示的な CD19 CAR のスクレオ チド配列

10

20

【表 14-2】

gtaccgctctcctcaaccacgacgcc agcgcccgcgaccccaacacggcg cccaccatcgctcgccagccctgtc cctgcgccccagagcgctgccggc ca gcggcgggggggcgagtgacacgag ggggctggacttcgacctgtga tate tacatctggggcgcccttgccgggac ttgtggggtccttctcctgtcact g gttatcaccccttactgcaaacgggg cagaaagaaactcctgtatatattca acaaccatttatgagaccagtacaa actactcaagagggaagatggctgtag ctgccgatttccagaagaagaagaag gaggatgtgaactgagagtgaaagt cagcaggagcgagacgcccccgct accagcaggggcagaaaccagctctat acgagctcaatctaggacgaagaga ggagtacgatgttttggacaag aga cgtggcggggacccctgagatgggggg aaagccgagaaggagaagaac ctcag gaaggcctgtgtaaatgaaactgcagaa agataagatggcgagggc ctacagt gagattgggagtgaaggcgaggcgccg gaggggcaagggggac gatggcctt taccagggtctcagtaacgcaacca gagacacctacgacgcc ctteacatg caggccccggccccctcg	

30

40

【表 1 4 - 3】

248	MALPVTALLLPLALLLHAARPD IQMT QTTSSLSA SLGDRVITISCRASQDIS KYLNWYQQKPDGTVKL LIYHTSRLH SGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE DIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT GSTSGSGK PGSGEGSTKGEVKLQES GPGLVAPSQSLSVTCTV SGVSLPDY GVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETT YYNSALKSRLTI IKDNSKSQVFLKMN SLQTDDTA IYYCAKHYYYGGSYAMD YWGQGTSTVVSSTTT PAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLV ITLYCKRG RKKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFPEEEE GGCEL RVK FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLG R REEYDVLDKRRGRDPEMGKPRRKNP QEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGE RRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR	例示的なCD19 CARのアミノ酸 配列

10

【表 1 4 - 4】

249	atggccttaccagtgaccgcttgct ectgccgctggccttgctgctccacg c cgccaggcccgacatccagatgac acagactacatcctcctgctgctgct ct ctgggagacagagtcacccatcag ttgcaggggcaagtcaggacattagta aa tattttaaatgtgtatcagcagaa accagatgggaactgittaactcciga tctac catacatcaagattacactc aggagtcccatcaagggttcagtgcca gtgggt ctggaacagattattctct caccattagcaacctggagcaagaag atatlgcc acttactttlgccaaca gggtaatacgttccgtacacgttcg gagggggga ccaagctggagatcac agggtggcgggtggctcgggcgggtgggtg ggtcgggt ggcggcggatctgaggt gaaactgcaggagtcaggacctggcc tggtgggc gccctcacagagcctgtc cgtcacatgcaactgtctcaggggtct cattaccc gactatgggtgaagctg gattcgccagcctccacgaaagggtc tgagtggt ctgggagtaatatgggg tagtgaaaccacatactataattcag ctctcaaatc cagactgacccatcat caaggacaactccaagagccaagttt tcttaaaaaatga acagcttgcaaac tgatgacacagccatttactactgtg ccaaacattattact acgggtggtag ctatgctatggactactggggccaag gaacctcagtcaccgt ctectcaac cacgacggcagcgccggcagaccacca caccggcgccacc atcgcgctcgca gcccctgtccttgcgccagagggct gccggcagcggc	チサゲンレクルユ ーセルのCD19 CARのヌクレオ チド配列

20

30

40

50

【表 1 4 − 5】

	g g g g g g c g c a g t g c a c a c g a g g g g g c t g g a c t t t c g c c t g t g a t a t c t a c a t c t g g g c g c c c t t g g c c g g g a c t t g t g g g g t c c t t c t c c t g t c a c t g g t t a t c a c c c t t t a c t g c a a a c g g g g c a g a a a g a a a c t c c t g t a t a t a t t c a a a c a a c c a t t t a t g a g a c c a g t a c a a a c t a c t c a a g a g g a a g a t g g c t g t a g c t g c c g a t t t c c a g a a g a a g a a g a g g a g g a t g t g a a c t g a g a g t g a a g t t c a g c a g g a g c g c a g a c g c c c c c g c g t a c a a g c a g g g c c a g a a c c a g c t c t a t a a c g a g c t c a a t c t a g g a c g a a g a g a g g a g t a c g a t g t t t t g g a c a a g a g a c g t g g c c g g g a c c c t g a g a t g g g g g a a a g c c g a g a a g g a a g a a c c c t c a g g a a g g c c t g t a c a a t g a a c t g c a g a a a g a t a a g a t g g c g g a g g c c t a c a g t g a g a t t g g g a t g a a a g g c g a g c g c c g g a g g g g c a a g g g g c a c g a t g g c c t t t a c c a g g g t c t c a g t a c a g c c a c c a a g g a c a c c t a c g a c g c c c t t c a c a t g c a g g c c c t g c c c c c t c g c	

10

【表 1 4 − 6】

250	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMT QTTSSLSA SLGDRVITISCRASQDIS KYLNWYQQKPDGTVKL LIYHTSRLH SGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE DIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT GGGSGGG GSGGGSEVKLQESGPG LVAPSQSLSVTCTVSG VSLPDYGV WIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYY N SALKSRLTI IKDNSKSQVFLKMNSLQ TDDTAIY YCAKHYYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSSTTTTPA PRPPTPAPTIA SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL D FACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITL YCKRGRK KLLYIFKQPFMRPVQTTQ EEDGCSCRFPEEEEG CELRVKFSR SADAPAYKQGQNQLYNELNLGRRE E YDVLDKRRGRDPEMGKPRRKNPQEG LYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA LPPR	チサゲンレクルユ 一セルのCD19 CARの アミノ酸配列

20

30

40

50

【表 1 4 - 7】

251	atgctgctgctgggtgaccagccctgct gctgtgctgagctgccccaccccgccct ttctgctgattcccgacatccagatg acccagaccacctccagcctgagcgc cagcctggggcgaccgggtgaccatca gctgcccggccagccaggacatcagc aagtaacctgaactgggtatcagcagaa gcccgaacggcaecgtcaagctgctga tctaccacacccagccggctgcaacagc ggcgtgcccagccgggttttagcggcag cggttcggcaecgactacagcctga ccatcttccaaacctggaaacaggagat atcgccacctaacttttggccagcagg caacacactgcccatacactttggcg gcggaacaaagctggaaatcacccggc agcacctccggcagcggcgaagcctgg cagcggcgagggcagcaccaggggcg aggtagaagctgcaaggaaagcggccct ggcctgggtggccccagccagagcct gagcgtgac c tgcacccgtgagcggc gtgagcctgcccgaactacggcgtgag ctggaatccggcagccccccaggaaagg gcttgggaatggctggggcgtgattctgg ggcagcggagaccacctaactacaacag cgccctgaaagagccggctgaccatca tcaaggacaacagcaagagccagggtg ttcctgaaagatgaaacagcctgcagac cgacgacacccgccatctactactgcg ccaagcactactactacggcggcagc tagcccatggactactggggccaggcg caccagcgtgaccgtgagcagcgaat ctaagtagcggaccgcccctgccccct tgccctatgttctggggtgctgggtgg ggtcgaggcgctgctggcctgctaca gcctgctgggtcacccgtggccttcatc atcttttgggtgaaacgg	リソカプタゲンマ ラルユーセルのC D19 CARの スクレオチド配列

10

20

【表 1 4 - 8】

	ggcagaaagaaactcctgtatatatt caaacaaacatttatgagaccagtac aaactactcaagagggaagatggctgt agctgcccgat t tccagaaagaagaaga aggaggatgtgaaactgcccgtgaagt tcagcagaaaggccgacgcccctgccc taccagcaggggccagaatcagctgta caacgagctgaaacctgggcagaaagg aagagtagcagctcctggataagcgg agaggccgggaccctgagatgggcgg caagcctcggcgggaagaaccccgagg aaggcctgtataacgaactgcagaaa gacaagatggccgagggcctacagcga gatcggcatgaaggcgagcgggagc ggggcaaggggcaccgacggcctgtat caggggcctgtccacggccaccaaggga tacctacgacgcccctgcacatgcagg ccctgcccccaagg	
252	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPIQM TQTTSSLSA SLGDRVITISCRASQDI SKYLNWYQQKPDGTVKL LIYHTSRL HSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQ E DIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLE ITGSTSGSGK PGSGEGSTKGEVKLQ ESGPGLVAPSQSLSVTCTV SGVSLP DYGVSIRQPPRKGLEWLGVIWGSET T YYNSALKSRLTI IKDNSKSKVFLK MNSLQTD DTA IYYCAKHYYYGGSYA MDYWGGT SVTVSSESK YGPCCPPC PMFWVLVVGGVLACYSLLVTVAFI FWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ EEDGCSC RFEEEEGGCCLRVKFSR SADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN PQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA LPPR	リソカプタゲンマ ラルユーセルのC D19 CARの アミノ酸配列

30

40

50

【表 1 4 - 9】

253	atgcttctctctgggtgacaagccctctct gctctgtgtgagttaccacacccagcat tcctectgatcccagacatccagat gacacagactacatcctcctgtctgt cctctcttgggagacagagtcacccat cagttgcaagggaagtcaggacattta gtaaataatttaaattgggtatcagca gaaaccagatggaactgttaaacctcc tgatctacatacatcaagatttaca ctcaggaggtcccatcaagggttcagt gcagtgggtcttggaaacagattatct tctcaccattagcaacctggagcaag aagataattgcaccttacttttgcca acagggttaatacgcttccgtacaagt tcggaggggggactaagttggaaat aacaggctccacctcttggtatccggca agcccggatctg gcgagggaatccac caaggggcagggtgaaactgcaggagt caggacctggccttgggtggcgccctc acagagcctgtccgtcacatgcactg tctcagggggtc tcaattcccgacta tggtgttaagctggatttcgccagcctc caggaagggtctt ggagtggttggtg agtaataatgggggtagtgaaccacat actataatcagctctcaaatccag actgaaccatcatcaaggacaactcca agagcccaagttttctt aaaaatgaa cagttctgcaaactgatgacacagcca tttactactgtgccc aaac atttatta ctacgggtggtagcttatgctatggact actgggggtcaaggaaacctca gtcac cgtctcctcagcggccgcaattigaag ttatgtatcctcctccttaacctga caatgagaagagcaatggaaccattta tccatgtgaaagggaacacacctt	アキシカブタゲン シロルユーセルの CD19 CAR のスクレオチド配 列

10

20

【表 1 4 - 1 0】

	gtccaagtccectatlttcccggaacct tctaagcccttttgggtgctgggtgggt gg t tggggggagtcctggcttgctat agcttgctagtaacagtggcctttat tattttcttgggtgaggagtaaggagg agcaggctcctgcacagtgaetacat gaacatg actccccggcccccgggg ccaccccgcaagcatttaccagcccta tgcccc accacgcgacttcgcagcc tatcgctccagagtgaaagttcagcag gagcgc agacgcccccggtaccag caggggccagaaaccagctctataacga gctca atctaggacgaagagaggag tacgatgttttggacaagagacgtgg ccgg gacccctgagatgggggggaaag ccgagaaaggaagaacctcagggaagg c ctgtacaatgaactgcagaaagat aagatggcggaggccctacagtgaat t gggaatgaaaggcgagcgccggagg ggcaagggggacgagtggcctttacc agggtctcagtacagccaccaaggac acctacgacgccccttcacatgcaggc cctgccccctcgc	

30

40

50

【表 1 4 - 1 1】

254	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLLIPDIQM TQTTSSLASLGDRTVITISCRASQDIS KYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQED IATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITG STSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGP GLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGV WIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNS ALKSRLTIIKDNSKSKVFLKMNSLQT DDTAIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQG TSVTVSSAAAEVMPYPYLDNEKSN GTIIHVKGKHLCPSPLPFGPSKPFV LVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRS KRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHQ PYAPPRDFAAYRSRVKFSRSDAPAY QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGKPRRKNPQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR	アキシカブタゲン シロルユーセルの CD19 CAR のアミノ酸配列

10

【表 1 5】

表 1 5. チサゲンレクルユーセルの CD19 CAR 配列の注釈

特徴	ヌクレオチド配列位置	アミノ酸配列位置
CD8 α シグナルペプチド	1~63	1~21
FMC63 scFv (V _L -3xG ₄ S リンカー-V _H)	64~789	22~263
CD8 α ヒンジドメイン	790~924	264~308
CD8 α 膜貫通ドメイン	925~996	309~332
4-1BB 共刺激ドメイン	997~1122	333~374
CD3 ζ シグナル伝達ドメイン	1123~1458	375~486

20

【表 1 6】

表 1 6. リソカブタゲンマラルユーセルの CD19 CAR 配列の注釈

特徴	ヌクレオチド配列位置	アミノ酸配列位置
GMCSFR- α シグナルペプチド	1~66	1~22
FMC63 scFv (V _L -Whitlow リンカー-V _H)	67~801	23~267
IgG4 ヒンジドメイン	802~837	268~279
CD28 膜貫通ドメイン	838~921	280~307
4-1BB 共刺激ドメイン	922~1047	308~349
CD3 ζ シグナル伝達ドメイン	1048~1383	350~461

30

【表 1 7】

表 1 7. アキシカブタゲンシロルユーセルの CD19 CAR 配列の注釈

特徴	ヌクレオチド配列位置	アミノ酸配列位置
CSF2RA シグナルペプチド	1~66	1~22
FMC63 scFv (V _L -Whitlow リンカー-V _H)	67~801	23~267
CD28 ヒンジドメイン	802~927	268~309
CD28 膜貫通ドメイン	928~1008	310~336
CD28 共刺激ドメイン	1009~1131	337~377
CD3 ζ シグナル伝達ドメイン	1132~1467	378~489

40

【0545】

幾つかの実施形態では、第 2 の導入遺伝子は、配列番号 244、246、もしくは 248 に記載されるような CD19 CAR をコードするヌクレオチド配列を含むか、または配列番号 244、246、もしくは 248 に記載されるヌクレオチド配列と少なくとも 80% 同一（例えば、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 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一）である。コードされる CD19 CAR は、それぞれ配列番号 245、247、もしくは 249 に記載される対応するアミノ酸配列を有するか、またはそ

50

れぞれ配列番号 245、247、もしくは 249 に記載されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 同一（例えば、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 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一）である。

【0546】

g. CD20 CAR

幾つかの実施形態では、CAR は、CD20 CAR であり、これらの実施形態では、第 2 の導入遺伝子は、CD20 CAR をコードするヌクレオチド配列を含む。CD20 は、B 細胞の表面上に早ければプロ B 細胞の段階で見出され、B 細胞成熟まで次第に増加するレベルで見出されるだけでなく、ほとんどの B 細胞新生物の細胞上にも見出される抗原である。CD20 陽性細胞は、ホジキン病、骨髄腫、及び胸腺腫の症例において見出される場合もある。幾つかの実施形態では、CD20 CAR は、シグナルペプチド、CD20 に特異的に結合する細胞外結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内共刺激ドメイン、及び／または細胞内シグナル伝達ドメインを直列に含み得る。

10

【0547】

幾つかの実施形態では、CD20 CAR のシグナルペプチドは、CD8 α シグナルペプチドを含む。幾つかの実施形態では、CD8 α シグナルペプチドは、配列番号 6A に記載されるアミノ酸配列、または配列番号 6A に記載されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 同一（例えば、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 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、シグナルペプチドは、IgK シグナルペプチドを含む。幾つかの実施形態では、IgK シグナルペプチドは、配列番号 7A に記載されるアミノ酸配列、または配列番号 7A に記載されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 同一（例えば、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 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、シグナルペプチドは、GMCSFR- α または CSF2RA シグナルペプチドを含む。幾つかの実施形態では、GMCSFR- α または CSF2RA シグナルペプチドは、配列番号 8A に記載されるアミノ酸配列、または配列番号 8A に記載されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 同一（例えば、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 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

20

30

【0548】

幾つかの実施形態では、CD20 CAR の細胞外結合ドメインは、CD20、例えば、ヒト CD20 に特異的である。CD20 CAR の細胞外結合ドメインは、宿主細胞における発現のためにコドン最適化され得るか、または細胞外結合ドメインの機能を増強するためのバリエーション配列を有し得る。幾つかの実施形態では、細胞外結合ドメインは、免疫グロブリン分子の免疫原性活性部分、例えば、scFv を含む。

【0549】

幾つかの実施形態では、CD20 CAR の細胞外結合ドメインは、例えば、Leu16、IF5、1.5.3、リツキシマブ、オビヌツズマブ、イブリツモマブ、オフアツムマブ、トシツモマブ、オドロネクスタマブ、ベルツズマブ、ウブリツキシマブ、及びオクレリズマブが含まれる、CD20 に特異的な抗体に由来する。これらの実施形態のいずれかでは、CD20 CAR の細胞外結合ドメインは、抗体のいずれかの V_H、V_L、及び／または 1 個以上の CDR を含み得るか、またはそれからなり得る。

40

【0550】

幾つかの実施形態では、CD20 CAR の細胞外結合ドメインは、Leu16 モノクローナル抗体に由来する scFv を含み、当該 scFv は、リンカーにより連結された Leu16 の重鎖可変領域（V_H）及び軽鎖可変領域（V_L）を含む。Wu et al.

50

、Protein Engineering. 14 (12) : 1025-1033 (2001)を参照のこと。幾つかの実施形態では、リンカーは、3xG₄Sリンカーである。他の実施形態では、リンカーは、本明細書に記載されるようなWhitlowリンカーである。幾つかの実施形態では、Leu16に由来するscFv (Leu16 scFvとも称される)の全体の異なる部分及びその異なる部分のアミノ酸配列を以下の表18に示す。幾つかの実施形態では、CD20特異的scFvは、配列番号255、256、もしくは260に記載されるアミノ酸配列、または配列番号255、256、もしくは260に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、CD20特異的scFvは、配列番号257、258、259、261、及び262に記載されるアミノ酸配列を有する1個以上のCDRを含み得る。幾つかの実施形態では、CD20特異的scFvは、配列番号257、258、259に記載されるアミノ酸配列を有する1個以上のCDRを有する軽鎖を含み得る。幾つかの実施形態では、CD20特異的scFvは、配列番号261、262に記載されるアミノ酸配列を有する1個以上のCDRを有する重鎖を含み得る。これらの実施形態のいずれかでは、CD20特異的scFvは、1つ以上のアミノ酸置換を含むか、または同定された配列のいずれかと少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）な配列を含む1個以上のCDRを含み得る。幾つかの実施形態では、CD20 CARの細胞外結合ドメインは、本明細書に記載される1個以上のCDRを含むか、またはそれからなる。

10

20

30

40

50

【表18】

表18. 抗CD20 scFv及び構成要素の例示的な配列

配列番号	アミノ酸配列	説明
255	DIVLTQSPAILLSASPGKEVTMT CRASSSVNYM DWYQKKPGSSP KPWIYATSNLASGVPARFSGS GSGTSYSLTISRVEAEDAATYY CQQWSFNPT FGGGTKLEIKG STSGSGKPGSGEGSTKGEVQL QSGAELVKPGASVKMSCKASG YTFTSYNMH WVKQTPGQGLEW IGAIPGNGDTSYNQKFKG KA TLTADKSSSTAYMQLSSLTSED SADYYCAR SNYYGSSYWFFDV WGAGTTTVTSS	Whitlowリンカーを 有する抗CD20 Leu 16 scFv全体の配列
256	DIVLTQSPAILLSASPGKEVTMT CRASSSVNYM DWYQKKPGSSP KPWIYATSNLASGVPARFSGS GSGTSYSLTISRVEAEDAATYY CQQWSFNPT FGGGTKLEIK	抗CD20 Leu16 scFv軽鎖可変領域
257	RASSSVNYMD	抗CD20 Leu16 scFv軽鎖CDR1
258	ATSNLAS	抗CD20 Leu16 scFv軽鎖CDR2
259	QQWSFNPT	抗CD20 Leu16 scFv軽鎖CDR3
260	EVQLQQSGAELVKPGASVKMSC KASGYTFTS YNMHWVKQTPGQ GLEWIGAIPGNGDTSYNQKFKG GKATLTADKSSSTAYMQLSSLT SEDSAD YYCARSNYYGSSYWF FDVWGAGTTTVTSS	抗CD20 Leu16 scFv重鎖
261	SYNMH	抗CD20 Leu16 scFv重鎖CDR1
262	AIYPGNGDTSYNQKFKG	抗CD20 Leu16 scFv重鎖CDR2

【0551】

幾つかの実施形態では、CD20 CARのヒンジドメインは、CD8 α ヒンジドメイン、例えば、ヒトCD8 α ヒンジドメインを含む。幾つかの実施形態では、CD8 α ヒンジドメインは、配列番号9Aに記載されるアミノ酸配列、または配列番号9Aに記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、ヒンジドメインは、CD28ヒンジドメイン、例

例えば、ヒトCD28ヒンジドメインを含む。幾つかの実施形態では、CD28ヒンジドメインは、配列番号223に記載されるアミノ酸配列、または配列番号223に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、ヒンジドメインは、IgG4ヒンジドメイン、例えば、ヒトIgG4ヒンジドメインを含む。幾つかの実施形態では、IgG4ヒンジドメインは、配列番号12Aもしくは配列番号13Aに記載されるアミノ酸配列、または配列番号12Aもしくは配列番号13Aに記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、ヒンジドメインは、IgG4ヒンジーCh2-Ch3ドメイン、例えば、ヒトIgG4ヒンジーCh2-Ch3ドメインを含む。幾つかの実施形態では、IgG4ヒンジーCh2-Ch3ドメインは、配列番号227に記載されるアミノ酸配列、または配列番号227に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

10

20

30

40

50

【0552】

幾つかの実施形態では、CD20 CARの膜貫通ドメインは、CD8 α 膜貫通ドメイン、例えば、ヒトCD8 α 膜貫通ドメインを含む。幾つかの実施形態では、CD8 α 膜貫通ドメインは、配列番号15Aに記載されるアミノ酸配列、または配列番号15Aに記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、膜貫通ドメインは、CD28膜貫通ドメイン、例えば、ヒトCD28膜貫通ドメインを含む。幾つかの実施形態では、CD28膜貫通ドメインは、配列番号229に記載されるアミノ酸配列、または配列番号229に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

【0553】

幾つかの実施形態では、CD20 CARの細胞内共刺激ドメインは、4-1BB共刺激ドメイン、例えば、ヒト4-1BB共刺激ドメインを含む。幾つかの実施形態では、4-1BB共刺激ドメインは、配列番号231に記載されるアミノ酸配列、または配列番号231に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、細胞内共刺激ドメインは、CD28共刺激ドメイン、例えば、ヒトCD28共刺激ドメインを含む。幾つかの実施形態では、CD28共刺激ドメインは、配列番号232に記載されるアミノ酸配列、または配列番号232に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

【0554】

幾つかの実施形態では、CD20 CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ゼータ（ ζ ）シグナル伝達ドメイン、例えば、ヒトCD3 ζ シグナル伝達ドメインを含む。

幾つかの実施形態では、CD3 ζ シグナル伝達ドメインは、配列番号233に記載されるアミノ酸配列、または配列番号233に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

【0555】

幾つかの実施形態では、第2の導入遺伝子は、例えば、配列番号255に記載される配列を有するCD20特異的scFv、配列番号9AのCD8 α ヒンジドメイン、配列番号15AのCD8 α 膜貫通ドメイン、配列番号231の4-1BB共刺激ドメイン、配列番号233のCD3 ζ シグナル伝達ドメイン、及び／またはそれらのバリエーション（すなわち、本開示の配列と少なくとも80%同一な、例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一な配列を有する）を含むCD20 CARが含まれる、CD20 CARをコードするヌクレオチド配列を含む。

【0556】

幾つかの実施形態では、第2の導入遺伝子は、例えば、配列番号255に記載される配列を有するCD20特異的scFv、配列番号223のCD28ヒンジドメイン、配列番号15AのCD8 α 膜貫通ドメイン、配列番号231の4-1BB共刺激ドメイン、配列番号233のCD3 ζ シグナル伝達ドメイン、及び／またはそれらのバリエーション（すなわち、本開示の配列と少なくとも80%同一な、例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一な配列を有する）を含むCD20 CARが含まれる、CD20 CARをコードするヌクレオチド配列を含む。

【0557】

幾つかの実施形態では、第2の導入遺伝子は、例えば、配列番号255に記載される配列を有するCD20特異的scFv、配列番号12Aもしくは配列番号13AのIgG4ヒンジドメイン、配列番号15AのCD8 α 膜貫通ドメイン、配列番号231の4-1BB共刺激ドメイン、配列番号233のCD3 ζ シグナル伝達ドメイン、及び／またはそれらのバリエーション（すなわち、本開示の配列と少なくとも80%同一な、例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一な配列を有する）を含むCD20 CARが含まれる、CD20 CARをコードするヌクレオチド配列を含む。

【0558】

幾つかの実施形態では、第2の導入遺伝子は、例えば、配列番号255に記載される配列を有するCD20特異的scFv、配列番号9AのCD8 α ヒンジドメイン、配列番号229のCD28膜貫通ドメイン、配列番号231の4-1BB共刺激ドメイン、配列番号233のCD3 ζ シグナル伝達ドメイン、及び／またはそれらのバリエーション（すなわち、本開示の配列と少なくとも80%同一な、例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一な配列を有する）を含むCD20 CARが含まれる、CD20 CARをコードするヌクレオチド配列を含む。

【0559】

幾つかの実施形態では、第2の導入遺伝子は、例えば、配列番号255に記載される配列を有するCD20特異的scFv、配列番号223のCD28ヒンジドメイン、配列番号229のCD28膜貫通ドメイン、配列番号231の4-1BB共刺激ドメイン、配列番号233のCD3 ζ シグナル伝達ドメイン、及び／またはそれらのバリエーション（すなわち、本開示の配列と少なくとも80%同一な、例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一な配列を有する）を含むCD20 CARが

含まれる、CD20 CARをコードするヌクレオチド配列を含む。

【0560】

幾つかの実施形態では、第2の導入遺伝子は、例えば、配列番号255に記載される配列を有するCD20特異的scFv、配列番号12Aもしくは配列番号13AのIgG4ヒンジドメイン、配列番号229のCD28膜貫通ドメイン、配列番号231の4-1BB共刺激ドメイン、配列番号233のCD3 ζ シグナル伝達ドメイン、及び／またはそれらのバリエーション（すなわち、本開示の配列と少なくとも80%同一な、例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一な配列を有する）を含むCD20 CARが含まれる、CD20 CARをコードするヌクレオチド配列を含む。

10

【0561】

h. CD22 CAR

幾つかの実施形態では、CARは、CD22 CARであり、これらの実施形態では、第2の導入遺伝子は、CD22 CARをコードするヌクレオチド配列を含む。成熟B細胞の表面上に主に見出される膜貫通タンパク質であるCD22は、B細胞受容体（BCR）シグナル伝達の抑制性受容体として機能する。CD22は、B細胞リンパ腫及び白血病（例えば、B慢性リンパ球性白血病、毛様細胞性白血病、急性リンパ球性白血病（ALL）、及びバーキットリンパ腫）の60~70%において発現し、B細胞発生の初期段階の細胞表面または幹細胞上には存在しない。幾つかの実施形態では、CD22 CARは、シグナルペプチド、CD22に特異的に結合する細胞外結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内共刺激ドメイン、及び／または細胞内シグナル伝達ドメインを直列に含み得る。

20

【0562】

幾つかの実施形態では、CD22 CARのシグナルペプチドは、CD8 α シグナルペプチドを含む。幾つかの実施形態では、CD8 α シグナルペプチドは、配列番号6Aに記載されるアミノ酸配列、または配列番号6Aに記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、シグナルペプチドは、IgKシグナルペプチドを含む。幾つかの実施形態では、IgKシグナルペプチドは、配列番号7Aに記載されるアミノ酸配列、または配列番号7Aに記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、シグナルペプチドは、GMCSFR- α またはCSF2RAシグナルペプチドを含む。幾つかの実施形態では、GMCSFR- α またはCSF2RAシグナルペプチドは、配列番号8Aに記載されるアミノ酸配列、または配列番号8Aに記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

30

40

【0563】

幾つかの実施形態では、CD22 CARの細胞外結合ドメインは、CD22、例えば、ヒトCD22に特異的である。CD22 CARの細胞外結合ドメインは、宿主細胞における発現のためにコドン最適化され得るか、または細胞外結合ドメインの機能を増強するためのバリエーション配列を有し得る。幾つかの実施形態では、細胞外結合ドメインは、免疫グロブリン分子の免疫原性活性部分、例えば、scFvを含む。

【0564】

幾つかの実施形態では、CD22 CARの細胞外結合ドメインは、例えば、SMO3

50

、イノツズマブ、エブラツズマブ、モキセツモマブ、及びピナツズマブが含まれる、CD 22 に特異的な抗体に由来する。これらの実施形態のいずれかでは、CD 22 CAR の細胞外結合ドメインは、抗体のいずれかの V_H、V_L、及び／または 1 個以上の CDR を含み得るか、またはそれからなり得る。

【0565】

幾つかの実施形態では、CD 22 CAR の細胞外結合ドメインは、リンカーにより連結された m971 の重鎖可変領域 (V_H) 及び軽鎖可変領域 (V_L) を含む、m971 モノクローナル抗体 (m971) に由来する s c F v を含む。幾つかの実施形態では、リンカーは、3 x G4S リンカーである。他の実施形態では、代わりに W h i t l o w リンカーが使用され得る。幾つかの実施形態では、m971 に由来する s c F v (m971 s c F v と称される) の全体及びその異なる部分のアミノ酸配列を以下の表 19 に示す。幾つかの実施形態では、CD 22 特異的 s c F v は、配列番号 263、264、もしくは 268 に記載されるアミノ酸配列、または配列番号 263、264、もしくは 268 に記載されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 同一 (例えば、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 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一) なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、CD 22 特異的 s c F v は、配列番号 265、266、267、及び 269、270、271 に記載されるアミノ酸配列を有する 1 個以上の CDR を含み得る。幾つかの実施形態では、CD 22 特異的 s c F v は、配列番号 265、266、267 に記載されるアミノ酸配列を有する 1 個以上の CDR を有する重鎖を含み得る。幾つかの実施形態では、CD 22 特異的 s c F v は、配列番号 269、270、271 に記載されるアミノ酸配列を有する 1 個以上の CDR を有する軽鎖を含み得る。これらの実施形態のいずれかでは、CD 22 特異的 s c F v は、1 つ以上のアミノ酸置換を含むか、または同定された配列のいずれかと少なくとも 80% 同一 (例えば、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 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一) な配列を含む 1 個以上の CDR を含み得る。幾つかの実施形態では、CD 22 CAR の細胞外結合ドメインは、本明細書に記載される 1 個以上の CDR を含むか、またはそれからなる。

【0566】

幾つかの実施形態では、CD 22 CAR の細胞外結合ドメインは、親抗体 m971 と比較して CD 22 結合親和性が著しく改善した (約 2 nM から 50 pM 未満まで改善した) m971 の親和性成熟したバリエーションである m971-L7 に由来する s c F v を含む。幾つかの実施形態では、m971-L7 に由来する s c F v は、3 x G4S リンカーにより連結された m971-L7 の V_H 及び V_L を含む。他の実施形態では、代わりに W h i t l o w リンカーが使用され得る。幾つかの実施形態では、m971-L7 に由来する s c F v (m971-L7 s c F v と称される) の全体及びその異なる部分のアミノ酸配列を以下の表 19 に示す。幾つかの実施形態では、CD 22 特異的 s c F v は、配列番号 272、273、もしくは 277 に記載されるアミノ酸配列、または配列番号 272、273、もしくは 277 に記載されるアミノ酸配列と少なくとも 80% 同一 (例えば、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 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一) なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、CD 22 特異的 s c F v は、配列番号 274、275、276、及び 278、279、280 に記載されるアミノ酸配列を有する 1 個以上の CDR を含み得る。幾つかの実施形態では、CD 22 特異的 s c F v は、配列番号 274、275、276 に記載されるアミノ酸配列を有する 1 個以上の CDR を有する重鎖を含み得る。幾つかの実施形態では、CD 22 特異的 s c F v は、配列番号 278、279、280 に記載されるアミノ酸配列を有する 1 個以上の CDR を有する軽鎖を含み得る。これらの実施形態のいずれかでは、CD 22 特異的 s c F v は、1 つ以上のアミノ酸置換を含むか、または同定された配列のいずれかと少な

くとも 80% 同一（例えば、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 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一）な配列を含む 1 個以上の CDR を含み得る。幾つかの実施形態では、CD22 CAR の細胞外結合ドメインは、本明細書に記載される 1 個以上の CDR を含むか、またはそれからなる。

【表 19-1】

表 19. 抗 CD22 scFv 及び構成要素の例示的な配列

配列番号	アミノ酸配列	説明
263	QVQLQQSGPGLVKPSQTLTCAISG DSVSSNSA AWWIRQSPSRGLEWLG RTYYRSKWYNDYAV SVKSRITINPD TSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYC AR EVTGDLEDAFDIWGGGTMVTVSSGGG GSGG GSGGGGSDIQMTQSPSSLSA SVGDRVTITCRAS QTIWSYLNWYQQ RPGKAPNLLIYAASSLQSGVP SRFSGRSGTDFTLTISSLQAEDFAT YYCQSYS IPQTFGGQTKLEIK	3xG4 リンカー を有する抗 CD22 m971 scFv 全体の配列
264	QVQLQQSGPGLVKPSQTLTCAISG DSVSSNSA AWWIRQSPSRGLEWLG RTYYRSKWYNDYAV SVKSRITINPD TSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYC AR EVTGDLEDAFDIWGGGTMVTVSS	抗 CD22 m97 1 scFv 重鎖可 変領域
265	GDSVSSNSAA	抗 CD22 m97 1 scFv 重鎖 C DR1
266	TYYSRWYN	抗 CD22 m97 1 scFv 重鎖 C DR2
267	AREVTGDLEDAFDI	抗 CD22 m97 1 scFv 重鎖 C DR3
268	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QTIWSYLN WYQRPKAPNLLIYAA SSLQSGVPSRFSGRGS GTDFTLTISLQAEDFATYYCQSYS IPQTFGGQ TKLEIK	抗 CD22 m97 1 scFv 軽鎖
269	QTIWSY	抗 CD22 m97 1 scFv 軽鎖 C DR1

10

20

【表 19-2】

270	AAS	抗 CD22 m97 1 scFv 軽鎖 C DR2
271	QSYSIPQT	抗 CD22 m97 1 scFv 軽鎖 C DR3
272	QVQLQQSGPGMVKPSQTLTCAISG DSVSSNS VAWNIRQSPSRGLEWLG RTYYRSTWYNDYA VSMKSRITINPD TNKNQFSLQLNSVTPEDTAVY YCAR EVTGDLEDAFDIWGGGTMVTVSSGGG GS GGGGGGGGSDIQMIQSPSSLSA SVGDRVTITCR ASQTIWSYLNWYRQ RPGEAPNLLIYAASSLQSG VPSRFS GRSGTDFTLTISSLQAEDFATYYCQ QS YSIPQTFGGQTKLEIK	3xG4 リンカー を有する抗 CD22 m971-L7 scFv 全体の配列
273	QVQLQQSGPGMVKPSQTLTCAISG DSVSSNS VAWNIRQSPSRGLEWLG RTYYRSTWYNDYA VSMKSRITINPD TNKNQFSLQLNSVTPEDTAVY YCAR EVTGDLEDAFDIWGGGTMVTVSS	抗 CD22 m97 1-L7 scFv 重鎖可変領域
274	GDSVSSNSVA	抗 CD22 m97 1-L7 scFv 重鎖 CDR1
275	TYRSTWYN	抗 CD22 m97 1-L7 scFv 重鎖 CDR2
276	AREVTGDLEDAFDI	抗 CD22 m97 1-L7 scFv 重鎖 CDR3

30

40

50

【表 19-3】

277	DIQMIQSPSSLSASVGDRVITTCRAS QTIWSYLN WYRQRPGEAPNLLIYAA SSLQSGVPSRFSGRGS GTDFTLTIS SLQAEDFATYYCQSYSIPQTFGQG TKLEIK	抗CD22 m97 1-L7 scFv 軽鎖可変領域
278	QTIWSY	抗CD22 m97 1-L7 scFv 軽鎖CDR1
279	AAS	抗CD22 m97 1-L7 scFv 軽鎖CDR2
280	QSYSIPQT	抗CD22 m97 1-L7 scFv 軽鎖CDR3

10

【0567】

幾つかの実施形態では、CD22 CARの細胞外結合ドメインは、免疫毒素HA22またはBL22を含む。免疫毒素BL22及びHA22は、細菌毒素に融合されたCD22に特異的なscFvを含む治療薬であり、従って、CD22を発現するがん細胞の表面に結合することができ、がん細胞を死滅させることができる。BL22は、シュードモナス外毒素Aの38kDaの短縮型に融合された、抗CD22抗体であるRFB4のdsFvを含む（Bang et al., Clin. Cancer Res., 11:1545-50 (2005)）。HA22（CAT8015、モキセツモマブパスードトクス）は、BL22より高親和の変異型バージョンである（Ho et al., J. Biol. Chem., 280(1):607-17 (2005)）。CD22に特異的なHA22及びBL22の抗原結合ドメインの好適な配列は、例えば、米国特許第7,541,034号、第7,355,012号、及び第7,982,011号（これらは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に開示されている。

20

【0568】

幾つかの実施形態では、CD22 CARのヒンジドメインは、CD8αヒンジドメイン、例えば、ヒトCD8αヒンジドメインを含む。幾つかの実施形態では、CD8αヒンジドメインは、配列番号9Aに記載されるアミノ酸配列、または配列番号9Aに記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、ヒンジドメインは、CD28ヒンジドメイン、例えば、ヒトCD28ヒンジドメインを含む。幾つかの実施形態では、CD28ヒンジドメインは、配列番号223に記載されるアミノ酸配列、または配列番号223に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、ヒンジドメインは、IgG4ヒンジドメイン、例えば、ヒトIgG4ヒンジドメインを含む。幾つかの実施形態では、IgG4ヒンジドメインは、配列番号12Aもしくは配列番号13Aに記載されるアミノ酸配列、または配列番号12Aもしくは配列番号13Aに記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、ヒンジドメインは、IgG4ヒンジ-C_H2-C_H3ドメイン、例えば、ヒトIgG4ヒンジ-C_H2-C_H3ドメインを含む。幾つかの実施形態では、IgG4ヒンジ-C_H2-C_H3ドメインは、配列番号227に記載されるアミノ酸配列、または配列番号227に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも80%、少なくとも

30

40

50

85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一)なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

【0569】

幾つかの実施形態では、CD22 CARの膜貫通ドメインは、CD8 α 膜貫通ドメイン、例えば、ヒトCD8 α 膜貫通ドメインを含む。幾つかの実施形態では、CD8 α 膜貫通ドメインは、配列番号228に記載されるアミノ酸配列、または配列番号228に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一(例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一)なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、膜貫通ドメインは、CD28膜貫通ドメイン、例えば、ヒトCD28膜貫通ドメインを含む。幾つかの実施形態では、CD28膜貫通ドメインは、配列番号229に記載されるアミノ酸配列、または配列番号229に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一(例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一)なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

10

【0570】

幾つかの実施形態では、CD22 CARの細胞内共刺激ドメインは、4-1BB共刺激ドメイン、例えば、ヒト4-1BB共刺激ドメインを含む。幾つかの実施形態では、4-1BB共刺激ドメインは、配列番号231に記載されるアミノ酸配列、または配列番号231に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一(例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一)なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、細胞内共刺激ドメインは、CD28共刺激ドメイン、例えば、ヒトCD28共刺激ドメインを含む。幾つかの実施形態では、CD28共刺激ドメインは、配列番号232に記載されるアミノ酸配列、または配列番号232に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一(例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一)なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

20

30

【0571】

幾つかの実施形態では、CD22 CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ゼータ(ζ)シグナル伝達ドメイン、例えば、ヒトCD3 ζ シグナル伝達ドメインを含む。幾つかの実施形態では、CD3 ζ シグナル伝達ドメインは、配列番号233に記載されるアミノ酸配列、または配列番号233に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一(例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一)なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

【0572】

幾つかの実施形態では、第2の導入遺伝子は、例えば、配列番号263もしくは配列番号272に記載される配列を有するCD22特異的scFv、配列番号9AのCD8 α ヒンジドメイン、配列番号228のCD8 α 膜貫通ドメイン、配列番号231の4-1BB共刺激ドメイン、配列番号233のCD3 ζ シグナル伝達ドメイン、及び／またはそれらのバリエーション(すなわち、本開示の配列と少なくとも80%同一な、例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一な配列を有する)を含むCD22 CARが含まれる、CD22 CARをコードするヌクレオチド配列を含む。

40

【0573】

幾つかの実施形態では、第2の導入遺伝子は、例えば、配列番号263もしくは配列番

50

号 272 に記載される配列を有する CD22 特異的 scFv、配列番号 223 の CD28 ヒンジドメイン、配列番号 228 の CD8 α 膜貫通ドメイン、配列番号 231 の 4-1BB 共刺激ドメイン、配列番号 233 の CD3 ζ シグナル伝達ドメイン、及び／またはそれらのバリエーション（すなわち、本開示の配列と少なくとも 80% 同一な、例えば、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 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、または少なくとも 99% 同一な配列を有する）を含む CD22 CAR が含まれる、CD22 CAR をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0574】

幾つかの実施形態では、第 2 の導入遺伝子は、例えば、配列番号 263 もしくは配列番号 272 に記載される配列を有する CD22 特異的 scFv、配列番号 12A もしくは配列番号 13A の IgG4 ヒンジドメイン、配列番号 228 の CD8 α 膜貫通ドメイン、配列番号 231 の 4-1BB 共刺激ドメイン、配列番号 233 の CD3 ζ シグナル伝達ドメイン、及び／またはそれらのバリエーション（すなわち、本開示の配列と少なくとも 80% 同一な、例えば、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 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、または少なくとも 99% 同一な配列を有する）を含む CD22 CAR が含まれる、CD22 CAR をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0575】

幾つかの実施形態では、第 2 の導入遺伝子は、例えば、配列番号 263 もしくは配列番号 272 に記載される配列を有する CD22 特異的 scFv、配列番号 9A の CD8 α ヒンジドメイン、配列番号 229 の CD28 膜貫通ドメイン、配列番号 231 の 4-1BB 共刺激ドメイン、配列番号 233 の CD3 ζ シグナル伝達ドメイン、及び／またはそれらのバリエーション（すなわち、本開示の配列と少なくとも 80% 同一な、例えば、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 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、または少なくとも 99% 同一な配列を有する）を含む CD22 CAR が含まれる、CD22 CAR をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0576】

幾つかの実施形態では、第 2 の導入遺伝子は、例えば、配列番号 263 もしくは配列番号 272 に記載される配列を有する CD22 特異的 scFv、配列番号 223 の CD28 ヒンジドメイン、配列番号 229 の CD28 膜貫通ドメイン、配列番号 231 の 4-1BB 共刺激ドメイン、配列番号 233 の CD3 ζ シグナル伝達ドメイン、及び／またはそれらのバリエーション（すなわち、本開示の配列と少なくとも 80% 同一な、例えば、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 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、または少なくとも 99% 同一な配列を有する）を含む CD22 CAR が含まれる、CD22 CAR をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0577】

幾つかの実施形態では、第 2 の導入遺伝子は、例えば、配列番号 263 もしくは配列番号 272 に記載される配列を有する CD22 特異的 scFv、配列番号 12A もしくは配列番号 13A の IgG4 ヒンジドメイン、配列番号 229 の CD28 膜貫通ドメイン、配列番号 231 の 4-1BB 共刺激ドメイン、配列番号 233 の CD3 ζ シグナル伝達ドメイン、及び／またはそれらのバリエーション（すなわち、本開示の配列と少なくとも 80% 同一な、例えば、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 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、または少なくとも 99% 同一な配列を有する）を含む CD22 CAR が含まれる、CD22 CAR をコードするヌクレオチド配列を含む。

i. BCMA CAR

【0578】

幾つかの実施形態では、CAR は、BCMA CAR であり、これらの実施形態では、

10

20

30

40

50

第2の導入遺伝子は、BCMA CARをコードするヌクレオチド配列を含む。BCMAは、B細胞系列の細胞上に発現する腫瘍壊死ファミリー受容体（TNFR）のメンバーであり、終末分化したB細胞または成熟Bリンパ球で最も発現が高い。BCMAは、長期の体液性免疫を維持するために形質細胞の生存を媒介することに関与する。近年、BCMAの発現は、多数の癌、例えば、多発性骨髄腫、ホジキン及び非ホジキンリンパ腫、様々な白血病、ならびに神経膠芽腫に関連付けられている。幾つかの実施形態では、BCMA CARは、シグナルペプチド、BCMAに特異的に結合する細胞外結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内共刺激ドメイン、及び／または細胞内シグナル伝達ドメインを直列に含み得る。

【0579】

幾つかの実施形態では、BCMA CARのシグナルペプチドは、CD8αシグナルペプチドを含む。幾つかの実施形態では、CD8αシグナルペプチドは、配列番号6Aに記載されるアミノ酸配列、または配列番号6Aに記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、シグナルペプチドは、IgKシグナルペプチドを含む。幾つかの実施形態では、IgKシグナルペプチドは、配列番号7Aに記載されるアミノ酸配列、または配列番号7Aに記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、シグナルペプチドは、GMCSFR-αまたはCSF2RAシグナルペプチドを含む。幾つかの実施形態では、GMCSFR-αまたはCSF2RAシグナルペプチドは、配列番号8Aに記載されるアミノ酸配列、または配列番号8Aに記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

【0580】

幾つかの実施形態では、BCMA CARの細胞外結合ドメインは、BCMA、例えば、ヒトBCMAに特異的である。BCMA CARの細胞外結合ドメインは、宿主細胞における発現のためにコドン最適化され得るか、または細胞外結合ドメインの機能を増強するためのバリエーション配列を有し得る。

【0581】

幾つかの実施形態では、細胞外結合ドメインは、免疫グロブリン分子の免疫原性活性部分、例えば、scFvを含む。幾つかの実施形態では、BCMA CARの細胞外結合ドメインは、例えば、ベランタマブ、エルラナタマブ、テクリスタマブ、LCAR-B38M、及びシルタカブタジンが含まれる、BCMAに特異的な抗体に由来する。これらの実施形態のいずれかでは、BCMA CARの細胞外結合ドメインは、抗体のいずれかのV_H、V_L、及び／または1個以上のCDRを含み得るか、またはそれからなり得る。

【0582】

幾つかの実施形態では、BCMA CARの細胞外結合ドメインは、Carpenter et al., Clin. Cancer Res. 19(8):2048-2060 (2013)に記載されるようなマウスモノクローナル抗体であるC11D5.3に由来するscFvを含む。PCT出願公開第WO2010/104949号も参照のこと。C11D5.3に由来するscFvは、Whitlowリンカーにより連結されたC11D5.3の重鎖可変領域（V_H）及び軽鎖可変領域（V_L）を含み得る。そのアミノ酸配列を以下の表20に示す。幾つかの実施形態では、BCMA特異的細胞外結合ドメインは、配列番号281、282、もしくは286に記載されるアミノ酸配列、または配列番号281、282、もしくは286に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例え

10

20

30

40

50

ば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一)なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、BCMA特異的細胞外結合ドメインは、配列番号283、284、285、及び287、288、289に記載されるアミノ酸配列を有する1個以上のCDRを含み得る。幾つかの実施形態では、BCMA特異的細胞外結合ドメインは、配列番号283、284、285、及び287、288、289に記載されるアミノ酸配列を有する1個以上のCDRを含み得る。幾つかの実施形態では、BCMA特異的細胞外結合ドメインは、配列番号287、288、289に記載されるアミノ酸配列を有する1個以上のCDRを有する重鎖を含み得る。これらの実施形態のいずれかでは、BCMA特異的scFvは、1つ以上のアミノ酸置換を含むか、または同定された配列のいずれかと少なくとも80%同一(例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一)な配列を含む1個以上のCDRを含み得る。幾つかの実施形態では、BCMA CARの細胞外結合ドメインは、本明細書に記載される1個以上のCDRを含むか、またはそれからなる。

10

【0583】

幾つかの実施形態では、BCMA CARの細胞外結合ドメインは、Carpenter et al., Clin. Cancer Res. 19(8):2048-2060(2013)及びPCT出願公開第WO2010/104949号に記載されるような別のマウスモノクローナル抗体であるC12A3.2に由来するscFvを含む。そのアミノ酸配列も以下の表20に示す。幾つかの実施形態では、BCMA特異的細胞外結合ドメインは、配列番号290、291、もしくは295に記載されるアミノ酸配列、または配列番号290、291、もしくは295に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一(例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一)なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、BCMA特異的細胞外結合ドメインは、配列番号292、293、294、及び296、297、298に記載されるアミノ酸配列を有する1個以上のCDRを含み得る。幾つかの実施形態では、BCMA特異的細胞外結合ドメインは、配列番号292、293、294に記載されるアミノ酸配列を有する1個以上のCDRを有する軽鎖を含み得る。幾つかの実施形態では、BCMA特異的細胞外結合ドメインは、配列番号296、297、298に記載されるアミノ酸配列を有する1個以上のCDRを有する重鎖を含み得る。これらの実施形態のいずれかでは、BCMA特異的scFvは、1つ以上のアミノ酸置換を含むか、または同定された配列のいずれかと少なくとも80%同一(例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一)な配列を含む1個以上のCDRを含み得る。幾つかの実施形態では、BCMA CARの細胞外結合ドメインは、本明細書に記載される1個以上のCDRを含むか、またはそれからなる。

20

30

【0584】

幾つかの実施形態では、BCMA CARの細胞外結合ドメインは、Friedman et al., Hum. Gene Ther. 29(5):585-601(2018)においてBB2121と称される、ヒトBCMAに対する高い特異性を有するマウスモノクローナル抗体を含む。PCT出願公開第WO2012163805号も参照のこと。

40

【0585】

幾つかの実施形態では、BCMA CARの細胞外結合ドメインは、Zhao et al., J. Hematol. Oncol. 11(1):141(2018)に記載されるような、LCAR-B38Mとも称される、BCMAの2つのエピトープに結合することができる2本の重鎖(VHH)の単鎖可変断片を含む。PCT出願公開第WO2018/028647号も参照のこと。

50

【0586】

幾つかの実施形態では、BCMA CARの細胞外結合ドメインは、Lam et al., Nat. Commun. 11 (1) : 283 (2020)に記載されるような、FHVH33とも称される完全ヒト重鎖可変ドメイン(FHVH)を含む。PCT出願公開第WO2019/006072号も参照のこと。FHVH33及びそのCDRのアミノ酸配列を以下の表20に示す。幾つかの実施形態では、BCMA特異的細胞外結合ドメインは、配列番号299に記載されるアミノ酸配列、または配列番号299に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一(例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一)なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、BCMA特異的細胞外結合ドメインは、配列番号300、301、302に記載されるアミノ酸配列を有する1個以上のCDRを含み得る。これらの実施形態のいずれかでは、BCMA特異的細胞外結合ドメインは、1つ以上のアミノ酸置換を含むか、または同定された配列のいずれかと少なくとも80%同一(例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一)な配列を含む1個以上のCDRを含み得る。幾つかの実施形態では、BCMA CARの細胞外結合ドメインは、本明細書に記載される1個以上のCDRを含むか、またはそれからなる。

10

【0587】

幾つかの実施形態では、BCMA CARの細胞外結合ドメインは、米国特許第11,026,975 B2号に記載されるようなCT103A(またはCAR0085)に由来するscFvを含む。そのアミノ酸配列を以下の表20に示す。幾つかの実施形態では、BCMA特異的細胞外結合ドメインは、配列番号303、304、もしくは308に記載されるアミノ酸配列、または配列番号303、304、もしくは308に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一(例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一)なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、BCMA特異的細胞外結合ドメインは、配列番号305、306、307、及び309、310、311に記載されるアミノ酸配列を有する1個以上のCDRを含み得る。幾つかの実施形態では、BCMA特異的細胞外結合ドメインは、配列番号305、306、307に記載されるアミノ酸配列を有する1個以上のCDRを有する軽鎖を含み得る。幾つかの実施形態では、BCMA特異的細胞外結合ドメインは、配列番号309、310、311に記載されるアミノ酸配列を有する1個以上のCDRを有する重鎖を含み得る。これらの実施形態のいずれかでは、BCMA特異的scFvは、1つ以上のアミノ酸置換を含むか、または同定された配列のいずれかと少なくとも80%同一(例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一)な配列を含む1個以上のCDRを含み得る。幾つかの実施形態では、BCMA CARの細胞外結合ドメインは、本明細書に記載される1個以上のCDRを含むか、またはそれからなる。

20

30

40

【0588】

更に、BCMAに対して指向されたCAR及び結合剤が、米国特許出願公開第2020/0246381 A1号及び同第2020/0339699 A1号(これらの各々の全内容は参照により本明細書に組み込まれる)に記載されている。

50

【表 20-1】

表 20. 抗BCMA結合剤及び構成要素の例示的な配列

配列番号	アミノ酸配列	説明
281	DIVLTQSPASLAMS LGKRATISCRASESVSVIGA HLIHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLETGVPARFS GSGSGTDFTLTIDPVEEDDVAIYSC LQSRIFPRT FGGG TKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLV QSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVK RAPGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFA FSLETSASTAYLQINN LKYEDTATYFCALDYSY AMDYWGGQTSVTVSS	Whitlowリンカーを有する抗BCMA C1D5.3 scFv全体の配列
282	DIVLTQSPASLAMS LGKRATISCRASESVSVIGA HLIHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLETGVPARFS GSGSGTDFTLTIDPVEEDDVAIYSC LQSRIFPRT FGGG TKLEIK	抗BCMA C11D5.3 scFv軽鎖可変領域
283	RASESVSVIGAHLIH	抗BCMA C11D5.3 scFv軽鎖CDR1
284	LASNLET	抗BCMA C11D5.3 scFv軽鎖CDR2
285	LQSRIFPRT	抗BCMA C11D5.3 scFv軽鎖CDR3
286	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSI NWVKRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAYDF RGRFAFSLETSASTAYLQINN LKYEDTATYFCALDYSYAMDYWGGQTSVTVSS	抗BCMA C11D5.3 scFv重鎖可変領域
287	DYSIN	抗BCMA C11D5.3 scFv重鎖CDR1

10

20

【表 20-2】

288	WINTETREPAYAYDFRG	抗BCMA C11D5.3 scFv重鎖CDR2
289	DYSYAMDY	抗BCMA C11D5.3 scFv重鎖CDR3
290	DIVLTQSPPSLAMS LGKRATISCRASESVTILGS HLIYWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFS GSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPR TFGG TKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFRHYSMNW VKQAPGKGLKWMGRINTESGVPIYADDFKGRF AFSVETSASTAYLVINN LKDEDTASYFCSNDYL YSLDFWGQGTALT VSS	Whitlowリンカーを有する抗BCMA C12A3.2 scFv全体の配列
291	DIVLTQSPPSLAMS LGKRATISCRASESVTILGS HLIYWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFS GSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPR TFGG TKLEIK	抗BCMA C12A3.2 scFv軽鎖可変領域
292	RASESVTILGSHLIY	抗BCMA C12A3.2 scFv軽鎖CDR1
293	LASNVQT	抗BCMA C12A3.2 scFv軽鎖CDR2
294	LQSRTIPRT	抗BCMA C12A3.2 scFv軽鎖CDR3

30

40

50

【表 20-3】

295	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKAS GYTFRHYS MNWVKQAPGKGLKWMG RINTESGVPIYADDF KGRFAFSVE TSASTAYLVINNLDKEDTASYFCS NDYLYSLDFWQGQTALT VSS	抗BCMA C12 A3.2 scFv重 鎖可変領域
296	HYSMN	抗BCMA C12 A3.2 scFv重 鎖CDR1
297	RINTESGVPIYADDFKG	抗BCMA C12 A3.2 scFv重 鎖CDR2
298	DYLYSLDF	抗BCMA C12 A3.2 scFv重 鎖CDR3
299	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVS SISGSGDYIYYADSV KGRFTISR ISKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC A KEGTGANSSLDYRGQGT LVT VSS	抗BCMA FHV H33全体の配列
300	GFTFSSYA	抗BCMA FHV H33 CDR1
301	SISGSGDYI	抗BCMA FHV H33 CDR2
302	AKETGANSSLDY	抗BCMA FHV H33 CDR3
303	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRA SQSISSYL N WYQKPKGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTL TISSLQPEDFATYYCQKYLDTFG GG	Whitlowリン カーを有する抗BC MA CT103A scFv全体の配列

10

20

【表 20-4】

	TKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQ LQLQESGP GLVKPSETLSLTCTVS GGSISSSSYYWGWRQP PGKGLEW IGSISYSGSTYYNPSLKS RVTISV DTS KNQFSLKLSVTAADTAVYYCA RDRGDTILDV WQGTMTVTVSS	
304	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRA SQSISSYL N WYQKPKGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTL TISSLQPEDFATYYCQKYLDTFG GGG TKVEIK	抗BCMA CT1 03A scFv軽 鎖可変領域
305	QSISSY	抗BCMA CT1 03A scFv軽 鎖CDR1
306	AAS	抗BCMA CT1 03A scFv軽 鎖CDR2
307	QKYLDT	抗BCMA CT1 03A scFv軽 鎖CDR3
308	QQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GGSISSSSYYWGWRQPPGKGLEW IGSISYSGSTYYNPSLKS RVTISV DTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCA R DRGDTILDVWQGTMTVTVSS	抗BCMA CT1 03A scFv重 鎖可変領域
309	GGSISSSSYY	抗BCMA CT1 03A scFv重 鎖CDR1
310	ISYSGST	抗BCMA CT1 03A scFv重 鎖CDR2
311	ARDRGDTILDV	抗BCMA CT1 03A scFv重 鎖CDR3

30

40

【0589】

幾つかの実施形態では、BCMA CARのヒンジドメインは、CD8αヒンジドメイン、例えば、ヒトCD8αヒンジドメインを含む。幾つかの実施形態では、CD8αヒンジドメインは、配列番号9Aに記載されるアミノ酸配列、または配列番号9Aに記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも80%、少なくとも85%

50

、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一)なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、ヒンジドメインは、CD28ヒンジドメイン、例えば、ヒトCD28ヒンジドメインを含む。幾つかの実施形態では、CD28ヒンジドメインは、配列番号223に記載されるアミノ酸配列、または配列番号223に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一(例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一)なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、ヒンジドメインは、IgG4ヒンジドメイン、例えば、ヒトIgG4ヒンジドメインを含む。幾つかの実施形態では、IgG4ヒンジドメインは、配列番号225もしくは配列番号226に記載されるアミノ酸配列、または配列番号225もしくは配列番号226に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一(例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一)なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、ヒンジドメインは、IgG4ヒンジ-C_h2-C_h3ドメイン、例えば、ヒトIgG4ヒンジ-C_h2-C_h3ドメインを含む。幾つかの実施形態では、IgG4ヒンジ-C_h2-C_h3ドメインは、配列番号227に記載されるアミノ酸配列、または配列番号227に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一(例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一)なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

10

20

30

40

50

【0590】

幾つかの実施形態では、BCMA CARの膜貫通ドメインは、CD8 α 膜貫通ドメイン、例えば、ヒトCD8 α 膜貫通ドメインを含む。幾つかの実施形態では、CD8 α 膜貫通ドメインは、配列番号228に記載されるアミノ酸配列、または配列番号228に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一(例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一)なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、膜貫通ドメインは、CD28膜貫通ドメイン、例えば、ヒトCD28膜貫通ドメインを含む。幾つかの実施形態では、CD28膜貫通ドメインは、配列番号229に記載されるアミノ酸配列、または配列番号229に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一(例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一)なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

【0591】

幾つかの実施形態では、BCMA CARの細胞内共刺激ドメインは、4-1BB共刺激ドメイン、例えば、ヒト4-1BB共刺激ドメインを含む。幾つかの実施形態では、4-1BB共刺激ドメインは、配列番号231に記載されるアミノ酸配列、または配列番号231に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一(例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一)なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。幾つかの実施形態では、細胞内共刺激ドメインは、CD28共刺激ドメイン、例えば、ヒトCD28共刺激ドメインを含む。幾つかの実施形態では、CD28共刺激ドメインは、配列番号232に記載されるアミノ酸配列、または配列番号232に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一(例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一)なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

【0592】

幾つかの実施形態では、BCMA CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ゼータ（ ζ ）シグナル伝達ドメイン、例えば、ヒトCD3 ζ シグナル伝達ドメインを含む。幾つかの実施形態では、CD3 ζ シグナル伝達ドメインは、配列番号233に記載されるアミノ酸配列、または配列番号233に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）なアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

【0593】

幾つかの実施形態では、第2の導入遺伝子は、例えば、記載されるようなBCMA特異的細胞外結合ドメインのいずれか、配列番号9AのCD8 α ヒンジドメイン、配列番号228のCD8 α 膜貫通ドメイン、配列番号231の4-1BB共刺激ドメイン、配列番号233のCD3 ζ シグナル伝達ドメイン、及び／またはそれらのバリエーション（すなわち、本開示の配列と少なくとも80%同一な、例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一な配列を有する）を含むBCMA CARが含まれる、BCMA CARをコードするヌクレオチド配列を含む。これらの実施形態のいずれかでは、BCMA CARは、記載されるようなシグナルペプチド（例えば、CD8 α シグナルペプチド）を追加的に含み得る。

【0594】

幾つかの実施形態では、第2の導入遺伝子は、例えば、記載されるようなBCMA特異的細胞外結合ドメインのいずれか、配列番号9AのCD8 α ヒンジドメイン、配列番号228のCD8 α 膜貫通ドメイン、配列番号232のCD28共刺激ドメイン、配列番号233のCD3 ζ シグナル伝達ドメイン、及び／またはそれらのバリエーション（すなわち、本開示の配列と少なくとも80%同一な、例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一な配列を有する）を含むBCMA CARが含まれる、BCMA CARをコードするヌクレオチド配列を含む。これらの実施形態のいずれかでは、BCMA CARは、記載されるようなシグナルペプチドを追加的に含み得る。

【0595】

幾つかの実施形態では、第2の導入遺伝子は、配列番号312に記載されるようなBCMA CARをコードするヌクレオチド配列を含むか、または配列番号312に記載されるヌクレオチド配列と少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）である（表21を参照のこと）。コードされるBCMA CARは、配列番号313に記載される対応するアミノ酸配列を有するか、または配列番号313に記載されるアミノ酸配列と少なくとも80%同一（例えば、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一）であり、以下の構成要素を有する：CD8 α シグナルペプチド、CT103A scFv（VL-Whitlowリンカー-VH）、CD8 α ヒンジドメイン、CD8 α 膜貫通ドメイン、4-1BB共刺激ドメイン、及びCD3 ζ シグナル伝達ドメイン。

【0596】

幾つかの実施形態では、第2の導入遺伝子は、例えば、イデカブタゲンビクルユーセル（ide-cel、bb2121とも称される）が含まれる、BCMA CARの商業的に入手可能な具体的実例をコードするヌクレオチド配列を含む。幾つかの実施形態では、第2の導入遺伝子は、イデカブタゲンビクルユーセルまたはその一部をコードするヌクレオチド配列を含む。イデカブタゲンビクルユーセルは、以下の構成要素を有するBCMA CARを含む：BB2121結合剤、CD8 α ヒンジドメイン、CD8 α 膜貫通ドメイン

10

20

30

40

50

、４－１ＢＢ共刺激ドメイン、及びＣＤ３ζシグナル伝達ドメイン。
【表２１－１】

表２１．ＢＣＭＡ－ＣＡＲの例示的な配列

配列番号	配列	説明
312	atggcctttaccagtgaccgccttgctcctgcccgtgctgctcca cgccgccagggccggacatccagatgacccagttccatcctccctgtct gcatctgtaggagacagagtcaaccatcacttgccggcagtcagagca ttagcagctatttaatttggtatcagcagaaaccagggaagccctaa gctcctgattctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatcaagg ttcagtggcagtggtatctgggacagatttctactctcaccatcagcagtc tgcacacctgaaga ttttgcaacttactactgtcagcaaaaatacgaacct cctcacttttgccggaggggaccaaagggtlgagatcaaaggcagcaccagc ggctccggcgaagcctggctctggcggaggcagcacaaggagacagctgc agctgcaggagtgaggccacaggactggtgaagccttcggagaccctgtc cctcaccctgcactgtctctgggtggctccatcagcagtagtagtactae tggggcttggaatccggcagccccaagggaaggggctggagtggaattggga gtatctcctatagtgggagcaccctactacaaccggctccctcaagagtcg agtcaccatataccgtagacacgtccaagaaaccagttctcctgaagctg agttctgtgaccggccgacagacacggcgggtgactactgcccagagatc gtggagacaccatactagacgtatg	例示的なＢＣＭＡ－ＣＡＲヌクレオチド配列

10

20

【表２１－２】

gggtcagggtacaaagggtcaccgtcagctcatctcgtgcccgtgttccctgc ccgccaaaacctaccaccacccctgcccctagacctcccacccagcccc aacaatcgccagccagcctctgtctctgtcggcccgaagcctgtagacct gctgcggccggagccgtgacacccagaggcctggacttcgctgacgaca tctacatctgggcccctctggccggcaccctgtggcgtgctgctgctgag cctggtgattcacccctgtagctgcaaaccaccggaaacaaaggggcagaag aaactcctgtatataattcaaacacatttatgagaccagtaacaaactac tcaaggaggaa gatggctgtagctgccgatttccagaagagaagaaggga ggatgtgaactgagagtgaagttagcagatccgccgacggccctgccct accagcagggaacagaaccagctgtacaacgagctgaacctgggacagacg ggaaaggtagacgacgtgctggaacaggcggagaggccgggacccgagatg ggccggaaagcccagacgggaagaccccagggaaggcctgtataacgaac tgcagaaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcggcatgaagggg cgagcggaggcggcggcgaagggccacgatggcctgtaccaggggcctgagc accggcca ccaaggacacctaagacgccctgcacatgcaggccctgcccc ccaga	

30

40

50

【表 2 1 - 3】

313	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIM TQSPSSL ASVGDRVTITCRASQS ISSYLNWYQQKPGKAPK LLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS LQP EDFATYYCQKYLDTFGGGT KVEIKGSTSGSG KPGSGEGSTKGQ LQLQESGPGLVKPSSETLSLTCT VS GGSISSSSYWGWIRQPPGKLEWI GSISYSG STYYNPSLKSRTISVD TSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCA RDRGDTILDVWGQGTMTVSSFPV FLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQP LSLRPEACRP AAGGAVHTRGLDFA CDIYIWAPLAGTCGVLLLS LVITL YCNHRNKRGRKKLLYIFKQPFMRPV QTT QEEDGCSCRFP EEEEGGCELR VKFSRSADAPAY QGQGNQLYNELN LGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKP RRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEI G MKGERRRGKGHDLGYQGLSTATK DTYDALHM QALPPR	例示的なBCMA CARアミノ酸配 列

10

【0597】

j. 複数のCAR

幾つかの実施形態では、第2の導入遺伝子は、各々が特異的な標的抗原を標的とするCARをコードする2つ以上のヌクレオチド配列を含む。これらの実施形態では、第2の導入遺伝子は、異なる標的抗原（例えば、CD19 CAR及びCD22 CAR）に特異的な2種以上の異なるCARをコードする。2種以上のCARは、各々が特異的な標的抗原に特異的な細胞外結合ドメインを含み得、同じか、または1個以上の異なる非抗原結合ドメインを含み得る。例えば、2種以上のCARは、配列類似性に起因する組換えのリスクを最小限にするために、異なるシグナルペプチド、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン、及び／または細胞内シグナル伝達ドメインを含み得る。あるいは、2種以上のCARは、同じ非抗原結合ドメインを含み得る。同じ非抗原結合ドメイン（複数可）及び／または骨格が使用される場合、組換えのリスクを最小限にするために、ヌクレオチド配列レベルでのコドン多様化が任意により導入される。1つの非限定的な例として、第2の導入遺伝子は、CD19 CARをコードするヌクレオチド配列及びCD22 CARをコードするヌクレオチド配列を含み得る。CD19 CARは、1個の膜貫通ドメイン（例えば、CD28膜貫通ドメイン）を含み得、一方でCD22 CARは、異なる膜貫通ドメイン（例えば、CD8α膜貫通ドメイン）を含むか、またはその逆である。別の非限定的な例として、CD19 CARは、1個の共刺激ドメイン（例えば、4-1BB共刺激ドメイン）を含み得、一方でCD22 CARは、異なる共刺激ドメイン（例えば、CD28共刺激ドメイン）を含むか、またはその逆である。あるいは、CD22 CAR及びCD19 CARは、同じ非抗原結合ドメインを含み得るが、組換えのリスクを最小限にするために、ヌクレオチド配列レベルでコドン多様化が導入されている。これらの実施形態のいずれかでは、第2の導入遺伝子の2つ以上のヌクレオチド配列は、本明細書に記載されるような多シストロン性構築物の形態で、記載される1つ以上の切断部位（例えば、2A部位及び／またはフューリン部位）により連結されていてもよい。

20

30

40

【0598】

3. 調節エレメント

幾つかの実施形態では、CARをコードする第2の導入遺伝子は、例えば、プロモーター、インスレーター、エンハンサー、ポリアデニル化（ポリ（A））尾部、及び／または遍在性クロマチンオープニングエレメントが含まれる、記載されるCARをコードする配列に作動可能に連結された追加の調節エレメントを含み得る。

【0599】

4. ゲノム挿入

幾つかの実施形態では、CARをコードする第2の導入遺伝子は、宿主ゲノムへの挿入のためのベクターの形態で宿主細胞に送達され得る。挿入は、ランダム（すなわち、宿主

50

細胞のゲノム遺伝子座へのランダムな挿入)であり得るか、または標的化され得(すなわち、宿主細胞の特定のゲノム遺伝子座への挿入)、本明細書に記載されるランダム挿入法または部位特異的挿入法のいずれかを使用する。

【0600】

幾つかの実施形態では、免疫寛容誘導因子をコードする第1の導入遺伝子及びCARをコードする第2の導入遺伝子は、ゲノム挿入のために別々に宿主に導入され得る。幾つかの実施形態では、免疫寛容誘導因子をコードする第1の導入遺伝子及びCARをコードする第2の導入遺伝子は、単一のベクターまたは複数のベクターによりゲノム挿入のために同時に宿主に導入され得る。第1及び第2の導入遺伝子が単一のベクターで同時に宿主細胞に送達される場合、第1及び第2の導入遺伝子は、下記で述べる様に多シストロン性構築物として設計され得る。

10

【0601】

5. 多シストロン性構築物

幾つかの実施形態では、免疫寛容誘導因子をコードする第1の導入遺伝子及びCARをコードする第2の導入遺伝子、及び／または第2の導入遺伝子の複数のCARをコードする配列は、多シストロン性構築物の形態であり得る。多シストロン性構築物は、宿主細胞における2種以上の関心対象のタンパク質の共発現のための2つ以上の発現カセットを有する。幾つかの実施形態では、多シストロン性構築物は、2つの発現カセットを含み、すなわち、バイシストロン性である。幾つかの実施形態では、多シストロン性構築物は、3つの発現カセットを含み、すなわち、トリシストロン性である。幾つかの実施形態では、多シストロン性構築物は、4つの発現カセットを含み、すなわち、クアドシストロン性である。幾つかの実施形態では、多シストロン性構築物は、4つ超の発現カセットを含む。これらの実施形態のいずれかでは、発現カセットの各々は、関心対象のタンパク質(例えば、免疫寛容誘導因子またはCAR)をコードするヌクレオチド配列を含む。ある特定の実施形態では、発現される2つ以上の遺伝子は、単一のプロモーターの制御下であり、1つの転写物からの関心対象のタンパク質の共発現を達成するための1つ以上の切断部位により互いに分離されている。他の実施形態では、2つ以上の遺伝子は、別個のプロモーターの制御下であり得る。

20

【0602】

幾つかの実施形態では、多シストロン性構築物の2つ以上の発現カセットは、1つ以上の切断部位により分離されていてもよい。名称が示唆するように、多シストロン性構築物は、宿主細胞における1つのmRNA転写物からの2つ以上の別個のタンパク質の同時発現を可能にする。複数の遺伝子のかかる共発現を達成するために、切断部位が多シストロン性構築物の設計に使用され得る。

30

【0603】

幾つかの実施形態では、1つ以上の切断部位は、1つ以上の自己切断型部位を含む。幾つかの実施形態では、自己切断型部位は、2A部位を含む。2Aペプチドは、ピコルナウイルスにおいて最初に発見された18~22アミノ酸長のペプチドの一種であり、タンパク質翻訳中にリボソームスキッピングを誘発することができ、これにより、同じmRNA転写物から等しい量の複数の遺伝子を生成させる。2Aペプチドは、C末端のグリシン(G)残基とプロリン(P)残基との間でリボソームにペプチド結合の合成をスキップさせ、これにより、2A配列の末端と下流の次のペプチドとの間の分離をもたらすことによりmRNA転写物を「切断」するように機能する。分子生物学において一般的に用いられる4つの2Aペプチド、T2A、P2A、E2A、及びF2Aが存在する。これらの配列を表22に要約する。切断効率を上昇させるために、グリシン-セリン-グリシン(GSG)リンカーが2AペプチドのN末端に任意に追加される。本開示における配列を囲む「()」の使用は、囲まれた配列が任意であることを意味する。

40

【表 2 2】

表 2 2. 2 A ペプチドの配列

配列番号	アミノ酸配列	2 A ペプチド
3 1 4	(G S G) E G R G S L L T C G D V E E N P G P	T 2 A
3 1 5	(G S G) A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P	P 2 A
3 1 6	(G S G) Q C T N Y A L L K L A G D V E S N P G P	E 2 A
3 1 7	(G S G) V K Q T L N F D L L K L A G D V E S N P G P	F 2 A

【0 6 0 4】

幾つかの実施形態では、1 つ以上の切断部位は、1 つ以上のプロテアーゼ部位を追加的に含む。1 つ以上のプロテアーゼ部位は、5' から 3' の順序で自己切断部位（例えば、2 A 部位）に先行するか、またはその後に続く。プロテアーゼ部位は、転写物全体の翻訳後に、または最初の発現産物が次の発現カセットの翻訳前に放出されるように各発現カセットの翻訳後にプロテアーゼにより切断され得る。これらの実施形態では、5' から 3' の順序で特に 2 A 部位の前に、2 A 部位に加えてプロテアーゼ部位を有することにより、発現される関心対象のタンパク質に結合される余分なアミノ酸残基の数が低減され得る。幾つかの実施形態では、プロテアーゼ部位は、塩基性アミノ酸対切断酵素（P A C E）部位としても公知のフューリン部位を含む。少なくとも 3 つのフューリン切断配列、F C 1、F C 2、及び F C 3 が存在する。これらのアミノ酸配列を表 2 3 に要約する。2 A 部位と同様に、1 つ以上の任意のグリシン-セリン-グリシン（G S G）配列が切断効率のために含まれ得る。

【表 2 3】

表 2 3. フューリン部位の配列

配列番号	アミノ酸配列	フューリン部位
3 1 8	R R R R (G S G)	F C 1
3 1 9	R K R R (G S G)	F C 2
3 2 0	R K R R (G S G) T P D P W (G S G)	F C 3

【0 6 0 5】

幾つかの実施形態では、1 つ以上の切断部位は、1 つ以上の自己切断型部位、1 つ以上のプロテアーゼ部位、及び／またはそれらの任意の組み合わせを含む。例えば、切断部位は、2 A 部位のみを含み得る。別の例では、切断部位は、F C 2 または F C 3 部位、これに続く 2 A 部位を含み得る。これらの実施形態では、1 つ以上の自己切断型部位は、同一であっても異なってもよい。同様に、1 つ以上のプロテアーゼ部位は、同一であっても異なってもよい。

【0 6 0 6】

幾つかの実施形態では、多シストロン性構築物は、ベクターの形態であり得る。例えば、プラスミド、アデノウイルスベクター、アデノウイルス関連ベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ファージ、及び相同組換え修復（H D R）に基づくドナーベクターが含まれる、宿主細胞へのヌクレオチド配列の導入に適した任意の種類のベクターが使用され得る。

【0 6 0 7】

6. ポリヌクレオチドの発現を増加させる（例えば、過剰発現させる）方法

幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドの発現の増強は、種々の技術のいずれかにより実行され得る。例えば、遺伝子及び因子（タンパク質）の発現を調節するための方法としては、ゲノム編集技術及び R N A またはタンパク質発現技術などが挙げられる。これらの技術の全てについて、本明細書において概説される組換え核酸を作製するための周知の組換え技術が使用される。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドの過剰発現または発現の増強のために 1 種以上の改変で遺伝子操作されている細胞は、本明細書に記載される任意の供給源細胞である。幾つかの実施形態では、供給源細胞は、セクション I I . C に記載される任意の細胞である。

【0 6 0 8】

幾つかの実施形態では、遺伝子の発現は、内在性遺伝子の活性を増強すること（例えば、外来性遺伝子の転写を増強すること）により増強される。幾つかの例では、内在性遺伝子の活性は、内在性遺伝子に作動可能に連結されたプロモーターまたはエンハンサーの活性を増強することにより増強される。幾つかの実施形態では、プロモーターまたはエンハンサーの活性の増強は、内在性プロモーターまたはエンハンサーの活性を増強する当該内在性プロモーターまたはエンハンサーの1種以上の改変をなすことを含む。幾つかの例では、内在性遺伝子の遺伝子活性の増強は、当該遺伝子の内在性プロモーターを改変することを含む。幾つかの実施形態では、内在性遺伝子の遺伝子活性の増強は、異種プロモーターを導入することを含む。幾つかの実施形態では、異種プロモーターは、CAGプロモーター、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、EF1aプロモーター、PGKプロモーター、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター、SV40プロモーター、HSVのtkプロモーター、マウス乳癌ウイルス（MMTV）プロモーター、HIVのLTRプロモーター、モロニーウイルスのプロモーター、エプスタイン・バーウイルス（EBV）プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）プロモーター、及びUBCプロモーターからなる群から選択される。

10

【0609】

幾つかの実施形態では、標的遺伝子（例えば、CD47または別の免疫寛容誘導因子）の発現は、（1）内在性CD47または他の遺伝子に特異的な部位特異的結合ドメイン及び（2）転写活性化因子を含有する融合タンパク質またはタンパク質複合体の発現により増強される。

20

【0610】

幾つかの実施形態では、調節因子は、部位特異的DNA結合性核酸分子、例えば、ガイドRNA（gRNA）から構成される。幾つかの実施形態では、本方法は、部位特異的DNA結合性標的化タンパク質、例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）としても公知のジンクフィンガータンパク質（ZFP）またはZFPを含有する融合タンパク質により達成される。

【0611】

幾つかの実施形態では、調節因子は、例えば、標的とされる領域で遺伝子に特異的に結合またはハイブリダイズするDNA結合タンパク質またはDNA結合核酸を使用する、部位特異的結合ドメインを含む。幾つかの実施形態では、提供されるポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、部位特異的ヌクレアーゼ、例えば、改変されたヌクレアーゼに連結されるか、またはそれと複合体を形成する。例えば、幾つかの実施形態では、投与は、改変されたヌクレアーゼ、例えば、メガヌクレアーゼまたはRNA誘導型ヌクレアーゼ、例えば、クラスター化して規則的な配置の短い回文核酸（CRISPR）-Casシステム、例えば、CRISPR-Cas9システムのDNA標的化タンパク質を含む融合物を使用して達成される。幾つかの実施形態では、ヌクレアーゼは、ヌクレアーゼ活性を欠くように改変されている。幾つかの実施形態では、改変されたヌクレアーゼは、触媒活性を失ったdCas9である。

30

【0612】

幾つかの実施形態では、部位特異的結合ドメインは、ヌクレアーゼに由来し得る。例えば、ホーミングエンドヌクレアーゼ及びメガヌクレアーゼ、例えば、I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII、及びI-TevIIIの認識配列。米国特許第5,420,032号、米国特許第6,833,252号、Belfort et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388、Dujon et al., (1989) Gene 82:115-118、Perler et al., (1994) Nucleic Acids Res. 22,1125-1127、Jasin (1996) Trends Genet. 12:224-228、Gimble et al., (1996) J. Mol. Biol. 263:163-180、Arga

40

50

st et al, (1998) J. Mol. Biol. 280:345-353、及び New England Biolabs のカタログも参照のこと。加えて、ホーミングエンドヌクレアーゼ及びメガヌクレアーゼのDNA結合特異性は、非天然の標的部位に結合するように遺伝子操作され得る。例えば、Chevalier et al, (2002) Molec. Cell 10:895-905、Epinat et al, (2003) Nucleic Acids Res. 31:2952-2962、Ashworth et al, (2006) Nature 441:656-659、Pagues et al, (2007) Current Gene Therapy 7:49-66、米国特許出願公開第2007/0117128号を参照のこと。

【0613】

ジンクフィンガー、TALE、及びCRISPRシステムの結合ドメインは、例えば、天然に存在するジンクフィンガーまたはTALEタンパク質の認識ヘリックス領域を遺伝子操作する（1個以上のアミノ酸を変化させる）ことにより、所定のヌクレオチド配列に結合するように「遺伝子操作」され得る。遺伝子操作されたDNA結合タンパク質（ジンクフィンガーまたはTALE）は、非天然タンパク質である。設計の合理的基準としては、置換規則ならびに既存のZFP及び／またはTALE設計の情報及び結合データを蓄積したデータベースの情報を処理するためのコンピュータによるアルゴリズムの適用が挙げられる。例えば、米国特許第6,140,081号、同第6,453,242号、及び同第6,534,261号を参照のこと。WO98/53058、WO98/53059、WO98/53060、WO02/016536、及びWO03/016496、ならびに米国特許公開第20110301073号も参照のこと。

【0614】

幾つかの実施形態では、部位特異的結合ドメインは、配列特異的様式でDNAに結合する1個以上のジンクフィンガータンパク質（ZFP）またはそのドメインを含む。ZFPまたはそのドメインは、1個以上のジンクフィンガーにより配列特異的様式でDNAに結合するタンパク質または大きなタンパク質内のドメインであり、ジンクフィンガーは、その構造が亜鉛イオンの配位により安定化される結合ドメイン内のアミノ酸配列領域である。

【0615】

ZFPには、個々のフィンガーのアセンブリにより作製された、通常9～18ヌクレオチド長の特定のDNA配列を標的とする人工ZFPドメインが存在する。ZFPとしては、単一のフィンガードメインが約30アミノ酸の長さであり、単一のβターンの2個のシステインと共に亜鉛により配位される2個の不変のヒスチジン残基を含有するαヘリックスを含有し、2、3、4、5、または6個のフィンガーを有するものが挙げられる。通常、ZFPの配列特異性は、ジンクフィンガー認識ヘリックスの4つのヘリックス上の位置（-1、2、3、及び6）でアミノ酸置換をすることにより改変され得る。従って、幾つかの実施形態では、ZFPまたはZFPを含有する分子は、非天然であり、例えば、選択される標的部位に結合するように遺伝子操作されている。例えば、Beerli et al. (2002) Nature Biotechnol. 20:135-141、Pabo et al. (2001) Ann. Rev. Biochem. 70:313-340、Isalan et al. (2001) Nature Biotechnol. 19:656-660、Segal et al. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637、Choo et al. (2000) Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411-416、米国特許第6,453,242号、同第6,534,261号、同第6,599,692号、同第6,503,717号、同第6,689,558号、同第7,030,215号、同第6,794,136号、同第7,067,317号、同第7,262,054号、同第7,070,934号、同第7,361,635号、同第7,253,273号、及び米国特許出願公開第2005/0064474号、同第2007/0218528号、同第2005/0267061号（全てが参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）を参

10

20

30

40

50

照のこと。

【0616】

多数の遺伝子操作された遺伝子特異的ジंकフィンガーが市販されている。例えば、Sangamo Biosciences (Richmond, CA, USA) は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) と協力して、研究者がジंकフィンガーの構築及び検証を完全に回避することを可能にするジंकフィンガー構築のためのプラットフォーム (CompOZr) を開発し、数千種ものタンパク質に特異的に標的化されたジंकフィンガーを提供している (Gaj et al., Trends in Biotechnology, 2013, 31 (7), 397-405)。幾つかの実施形態では、市販のジंकフィンガーが使用されるか、または特別に設計される。

10

【0617】

幾つかの実施形態では、部位特異的結合ドメインは、転写活性化因子様タンパク質エフェクター (TALE) タンパク質におけるような、天然に存在するか、または遺伝子操作された (非天然の) 転写活性化因子様タンパク質 (TAL) の DNA 結合ドメインを含む。例えば、米国特許出願公開第 20110301073 号 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) を参照のこと。

【0618】

幾つかの実施形態では、部位特異的結合ドメインは、CRISPR/Cas システムに由来する。一般に、「CRISPR システム」は、Cas 遺伝子をコードする配列、tracr (トランス活性化 CRISPR) 配列 (例えば、tracrRNA または活性な部分的 tracrRNA)、tracr メイト配列 (内在性 CRISPR システムの文脈における「ダイレトリビート」及び tracrRNA によりプロセシングされた部分的ダイレトリビートを包含する)、ガイド配列 (内在性 CRISPR システムの文脈における「スペーサー」、または「標的化配列」とも称される)、及び/または CRISPR 遺伝子座からの他の配列及び転写物が含まれる、CRISPR 関連 (「Cas」) 遺伝子の発現に関与するか、またはその活性を誘導する転写物及び他の要素を総称的に指す。

20

【0619】

一般に、ガイド配列は、標的配列とハイブリダイズし、CRISPR 複合体の当該標的配列への配列特異的な結合を誘導するのに十分な標的ポリヌクレオチド配列との相補性を有するポリヌクレオチド配列を含む標的化ドメインを含む。幾つかの実施形態では、ガイド配列とその対応する標的配列との間の相補性の程度は、好適なアラインメントアルゴリズムを使用して最適にアラインメントされる場合、約 50% もしくは約 50% 超、約 60% もしくは約 60% 超、約 75% もしくは約 75% 超、約 80% もしくは約 80% 超、約 85% もしくは約 85% 超、約 90% もしくは約 90% 超、約 95% もしくは約 95% 超、約 97.5% もしくは約 97.5% 超、約 99% もしくは約 99% 超、またはそれ以上である。幾つかの例では、gRNA の標的化ドメイン (例えば、標的化配列) は、標的核酸上の標的配列に相補的、例えば、少なくとも 80、85、90、95、98、または 99% 相補的、例えば、完全に相補的である。

30

【0620】

幾つかの実施形態では、gRNA は本明細書に記載される任意のものであり得る。実施形態では、gRNA は、配列番号 200784~231885 (WO2016183041 の表 29、付録 22) のいずれかに記載されるような CD47 の標的部位、配列番号 189859~193183 (WO2016183041 の表 19、付録 12) のいずれかに記載されるような HLA-E の標的部位、配列番号 688808~699754 (WO2016183041 の表 45、付録 38) のいずれかに記載されるような HLA-F の標的部位、配列番号 188372~189858 (WO2016183041 の表 18、付録 11) のいずれかに記載されるような HLA-G の標的部位、または配列番号 193184~200783 (WO2016183041 の表 21、付録 14) のいずれかに記載されるような PD-L1 の標的部位に相補的な標的化配列を有する。

40

【0621】

50

幾つかの実施形態では、標的部位は、標的遺伝子の転写開始部位の上流に存在する。幾つかの実施形態では、標的部位は、遺伝子の転写開始部位に隣接している。幾つかの実施形態では、標的部位は、遺伝子の転写開始部位の下流のRNAポリメラーゼ休止部位に隣接している。

【0622】

幾つかの実施形態では、標的化ドメインは、標的遺伝子のプロモーター領域を標的として、転写開始、1つ以上の転写エンハンサーもしくは活性化因子、及び／またはRNAポリメラーゼの結合を促進するように構成される。遺伝子のプロモーター領域を標的とするために、1種以上のgRNAが使用され得る。幾つかの実施形態では、遺伝子の1つ以上の領域が標的とされ得る。ある特定の態様では、標的部位は、遺伝子の転写開始点(TSS)の両側の600塩基対以内に存在する。

10

【0623】

エキソン配列ならびに調節領域、例えば、プロモーター及び活性化因子の配列が含まれる、遺伝子を標的とする配列であるか、またはそれを含むgRNA配列(すなわち、gRNA標的化配列)を設計または同定することは、当業者のレベルの範囲内である。CRISPRゲノム編集のためのゲノム全体にわたるgRNAデータベースが公開されており、これは、ヒトゲノムまたはマウスゲノムにおける遺伝子の構成的エキソンでの例示的なシングルガイドRNA(sgRNA)標的配列を含む(例えば、genescript.com/gRNA-database.htmlを参照のこと; Sanjana et al. (2014) Nat. Methods, 11:783-4、www.e-crisp.org/E-CRISP/、crispr.mit.edu/も参照のこと)。幾つかの実施形態では、gRNA配列は、非標的遺伝子へのオフターゲット結合を最小限にする標的化配列であるか、またはそれを含む。

20

【0624】

幾つかの実施形態では、調節因子は、機能ドメイン、例えば、転写活性化因子を更に含む。

【0625】

幾つかの実施形態では、転写活性化因子は、1つ以上の調節エレメント、例えば、標的遺伝子の1つ以上の転写調節エレメントであるか、またはそれを含むし、これにより、上記で提供された部位特異的ドメインが認識されて、かかる遺伝子の発現が駆動される。幾つかの実施形態では、転写活性化因子は、標的遺伝子の発現を駆動する。幾つかの例では、転写活性化因子は、異種トランス活性化ドメインの全体または一部であり得るか、またはそれを含むし得る。例えば、幾つかの実施形態では、転写活性化因子は、単純ヘルペス由来のトランス活性化ドメイン、Dnmt3aメチルトランスフェラーゼドメイン、p65、VP16、及びVP64から選択される。

30

【0626】

幾つかの実施形態では、調節因子は、ジンクフィンガー転写因子(ZF-TF)である。幾つかの実施形態では、調節因子は、VP64-p65-Rta(VPR)である。

【0627】

ある特定の実施形態では、調節因子は、転写調節ドメインを更に含む。一般的なドメインとしては、例えば、転写因子ドメイン(アクチベーター、リプレッサー、コアクチベーター、コリプレッサー)、サイレンサー、癌遺伝子(例えば、myc、jun、fos、myb、max、mad、rel、ets、bcl、myb、mosファミリーメンバーなど); DNA修復酵素ならびにそれらの関連因子及び修飾因子; DNA再構成酵素ならびにそれらの関連因子及び修飾因子; クロマチン関連タンパク質及びそれらの修飾因子(例えば、キナーゼ、アセチラーゼ、及びデアセチラーゼ); ならびにDNA修飾酵素(例えば、メチルトランスフェラーゼ、例えば、DNMTファミリーのメンバー(例えば、DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、DNMT3Lなど)、トポイソメラーゼ、ヘリカーゼ、リガーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、ポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼ)ならびにそれらの関連因子及び修飾因子が挙げられる。例えば、米国特許出願公開第201

40

50

3 / 0 2 5 3 0 4 0 号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと。
【0628】

活性化を達成するのに適したドメインとしては、HSV VP16 活性化ドメイン（例えば、Hagmann et al, J. Virol. 71, 5952-5962 (197)）を参照のこと）、核内ホルモン受容体（例えば、Torchia et al., Curr. Opin. Cell. Biol. 10:373-383 (1998)）を参照のこと）、核因子κBのp65サブユニット（Bitko & Bank, J. Virol. 72:5610-5618 (1998)）及びDoyle & Hunt, Neuroreport 8:2937-2942 (1997)、Liu et al., Cancer Gene Ther. 5:3-28 (1998)）、またはVP64などの人工キメラ機能的ドメイン（Beerli et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:14623-33）、及びデグロン（Molinari et al., (1999) EMBO J. 18, 6439-6447）が挙げられる。追加の例示的な活性化ドメインとしては、Oct1、Oct-2A、Spl、AP-2、及びCTF1（Seipel et al, EMBO J. 11, 4961-4968 (1992)）、ならびにp300、CBP、PCAF、SRC1 PVALF、AtHD2A、及びERF-2が挙げられる。例えば、Robyr et al, (2000) Mol. Endocrinol. 14:329-347、Collingwood et al, (1999) J. Mol. Endocrinol. 23:255-275、Leo et al, (2000) Gene 245:1-11、Manteuffel-Cymborowska (1999) Acta Biochim. Pol. 46:77-89、McKenna et al, (1999) J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 69:3-12、Malik et al, (2000) Trends Biochem. Sci. 25:277-283、及びLemon et al, (1999) Curr. Opin. Genet. Dev. 9:499-504を参照のこと。追加の例となる活性化ドメインには、Osgai、HALF-1、Cl、AP1、ARF-5、-6、-1、及び-8、CPRF1、CPRF4、MYC-RP/GP、ならびにTRAB1が含まれるが、これらに限定されない。例えば、Ogawa et al, (2000) Gene 245:21-29、Okanami et al, (1996) Genes Cells 1:87-99、Goff et al, (1991) Genes Dev. 5:298-309、Cho et al, (1999) Plant Mol Biol 40:419-429、Ulmason et al, (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:5844-5849、Sprenger-Hausseis et al, (2000) Plant J. 22:1-8、Gong et al, (1999) Plant Mol Biol. 41:33-44、及びHobo et al., (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:15, 348-15, 353を参照のこと。

【0629】

遺伝子抑制因子を作製するために使用され得る例示的な抑制ドメインとしては、限定されるものではないが、KRAB A/B、KOX、TGFβ誘導性初期遺伝子（TIEG）、verba、SID、MBD2、MBD3、DNMTファミリーのメンバー（例えば、DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、DNMT3Lなど）、Rb、及びMeCP2が挙げられる。例えば、Bird et al, (1999) Cell 99:451-454、Tyler et al, (1999) Cell 99:443-446、Knoepfler et al, (1999) Cell 99:447-450、及びRobertson et al, (2000) Nature Genet. 25:338-342を参照のこと。追加の例示的な抑制ドメインとしては、限定されるものではないが、ROM2及びAtHD2Aが挙げられる。例えば、Chem et al, (1996) Plant Cell 8:305-321、及びWu et al,

(2000) Plant J. 22:19-27を参照のこと。

【0630】

幾つかの例では、ドメインは、染色体のエピジェネティクス調節に関与する。幾つかの実施形態では、ドメインは、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT)、例えば、核局在型のA型、例えば、MYSTファミリーメンバーのMOZ、Ybf2/Sas3、MOF、及びTip60、GNATファミリーメンバーのGcn5またはpCAF、p300ファミリーメンバーのCBP、p300、またはRtt109である (Bemdsen and Denu (2008) Curr Opin Struct Biol 18 (6):682-689)。他の例では、ドメインは、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC)、例えば、クラスI (HDAC1、2、3、及び8)、クラスII (HDAC IIA (HDAC4、5、7、及び9)、HDAC IIB (HDAC6及び10)、クラスIV (HDAC11)、クラスIII (サーチュイン (SIRT) としても公知; SIRT1~7) である (Mottamal et al., (2015) Molecules 20 (3):3898-3941を参照のこと)。幾つかの実施形態で使用される別のドメインは、ヒストンホスホリラーゼまたはキナーゼであり、ここで、例としては、MSK1、MSK2、ATR、ATM、DNA-PK、Bub1、VprBP、IKK-α、PKCβ、Dik/Zip、JAK2、PKC5、WSTF、及びCK2が挙げられる。幾つかの実施形態では、メチル化ドメインが使用され、Ezh2、PRMT1/6、PRMT5/7、PRMT2/6、CARM1、Set7/9、MLL、ALL-1、Suv39h、G9a、SETDB1、Ezh2、Set2、Dot1、PRMT1/6、PRMT5/7、PR-Set7、及びSuv4-20hなどの群から選択され得る。SUMO化及びビオチン化に関与するドメイン (Lys9、13、4、18、及び12) も幾つかの実施形態において使用され得る (概説については、Kousarides (2007) Cell 128:693-705を参照のこと)。

【0631】

融合分子は、当業者に周知のクローニング及び生化学的コンジュゲーションの方法により構築される。融合分子は、DNA結合ドメイン及び機能ドメイン (例えば、転写活性化または抑制ドメイン) を含む。融合分子は、任意により、核局在化シグナル (例えば、SV40中型T抗原由来のものなど) 及びエピトープタグ (例えば、FLAG及びヘマグルチニンなど) も含む。融合タンパク質 (及びそれらをコードする核酸) は、融合物の構成要素の間で翻訳リーディングフレームが維持されるように設計される。

【0632】

一方の機能ドメイン (またはその機能断片) のポリペプチド構成要素と、他方の非タンパク質性DNA結合ドメイン (例えば、抗生物質、インターカレーター、副溝結合剤、核酸) との間の融合物は、当業者に公知の生化学的コンジュゲーションの方法により構築される。例えば、Pierce Chemical Company (Rockford, IL) のカタログを参照のこと。副溝結合剤とポリペプチドとの間の融合物を作製するための方法及び組成物が記載されている。Mapp et al., (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:3930-3935。同様に、sgRNA核酸成分をポリペプチド成分の機能ドメインと共に含むCRISPR/CasTF及びヌクレアーゼも当業者に公知であり、本明細書において詳述される。

【0633】

a. 外来性ポリペプチド

幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドの発現の増加 (すなわち過剰発現) は、過剰発現されるポリヌクレオチドをコードする外来性ポリヌクレオチドを細胞に導入することによりもたらされる。幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドは、組換え核酸である。本明細書において概説される組換え核酸を作製するために、周知の組換え技術が使用され得る。幾つかの実施形態では、本明細書における外来性ポリペプチドをコードする外来性ポリヌクレオチドは、コドン最適化された核酸配列を含む。

【0634】

10

20

30

40

50

ある特定の実施形態では、外来性ポリペプチド、例えば、免疫寛容誘導因子またはキメラ抗原受容体をコードする組換え核酸は、発現構築物の1つ以上の調節ヌクレオチド配列に作動可能に連結され得る。調節ヌクレオチド配列は、通常、宿主細胞及び処置されるレシピエント対象に適している。種々の宿主細胞について多数の種類の適切な発現ベクター及び好適な調節配列が当技術分野において公知である。典型的には、1つ以上の調節ヌクレオチド配列としては、限定されるものではないが、プロモーター配列、リーダーまたはシグナル配列、リボソーム結合部位、転写開始及び終結配列、翻訳開始及び終結配列、ならびにエンハンサーまたはアクチベーター配列が挙げられ得る。当該技術分野において公知の構成的または誘導性プロモーターも意図される。プロモーターは、天然に存在するプロモーター、または2つ以上のプロモーターの要素を組み合わせるハイブリッドプロモーターのいずれかであり得る。発現構築物は、細胞内のプラスミドなどのエピソーム上に存在し得るか、または発現構築物は、染色体に挿入され得る。幾つかの実施形態で、発現ベクターは、形質転換宿主細胞の選択を可能にするための選択マーカー遺伝子を含む。ある特定の実施形態は、少なくとも1つの調節配列に作動可能に連結された、バリエーションポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む。本明細書において使用される調節配列としては、プロモーター、エンハンサー、及び他の発現調節要素が挙げられる。ある特定の実施形態では、発現ベクターは、形質転換される宿主細胞の選択、発現されることが望ましい特定のバリエーションポリペプチド、ベクターのコピー数、そのコピー数を制御する能力、及び／またはベクターがコードする任意の他のタンパク質の発現、例えば、抗生物質マーカーに応じて設計される。

10

20

【0635】

幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドは、遺伝子操作された細胞における外来性ポリヌクレオチドの発現のためのプロモーターに作動可能に連結される。好適な哺乳動物プロモーターの例としては、例えば、以下の遺伝子由来のプロモーターが挙げられる：伸長因子1 α (EF1 α)プロモーター、ハムスターのユビキチン/S27aプロモーター(WO97/15664)、サル空胞ウイルス40 (SV40)初期プロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター、マウスメタロチオネイン-Iプロモーター、ラウス肉腫ウイルス(RSV)の末端反復配列領域、マウス乳癌ウイルスプロモーター(MMTV)、モロニー Maus 白血病ウイルス末端反復配列領域、及びヒトサイトメガロウイルス(CMV)の初期プロモーター。他の異種哺乳動物プロモーターの例は、アクチン、免疫グロブリン、または熱ショックプロモーター(複数可)である。更なる実施形態では、哺乳動物宿主細胞に使用されるプロモーターは、ウイルス、例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス(1989年7月5日に公開されたUK2, 211, 504)、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、及びシミアンウイルス40 (SV40)のゲノムから取得され得る。更なる実施形態では、異種哺乳動物のプロモーターが使用される。例としては、アクチンプロモーター、免疫グロブリンプロモーター、及び熱ショックプロモーターが挙げられる。SV40の初期及び後期プロモーターは、SV40ウイルス複製開始点も含むSV40制限断片として簡便に得られる(Fiers et al., Nature 273:113-120 (1978))。ヒトサイトメガロウイルスの最初期プロモーターは、HindIII制限酵素断片として簡便に得られる(Greenaway et al., Gene 18:355-360 (1982))。前述の参考文献は、それらの全体が参照により組み込まれる。

30

40

【0636】

幾つかの実施形態では、発現ベクターは、バイシストロン性または多シストロン性発現ベクターである。バイシストロン性または多シストロン性発現ベクターは、(1)オープンリーディングフレームの各々に融合された複数のプロモーター；(2)遺伝子間のスプライシングシグナルの挿入；(3)発現が単一のプロモーターにより駆動される遺伝子の融合物；及び／または(4)遺伝子間のタンパク質切断部位(自己切断ペプチド)の挿入もしくは遺伝子間の内部リボソーム侵入部位(IRES)の挿入を含み得る。

50

【0637】

幾つかの実施形態では、本明細書における発現ベクターまたは構築物は、多シストロン性構築物である。用語「多シストロン性構築物」及び「多シストロン性ベクター」は、本明細書において互換的に使用され、単一のmRNA分子に転写される組換えDNA構築物であって、当該単一のmRNA分子は、2つ以上の遺伝子（例えば、2つ以上の導入遺伝子）をコードする、当該組換えDNA構築物を指す。多シストロン性構築物は、それが2つの遺伝子をコードする場合、バイシストロン性構築物と称され、それが3つの遺伝子をコードする場合、トリシストロン性構築物と称され、それが4つの遺伝子をコードする場合、クアドシストロン性構築物と称され、以下同様に続く。

【0638】

幾つかの実施形態では、ベクターまたは構築物により含まれる2つ以上の外来性ポリヌクレオチド（例えば、導入遺伝子）は、それぞれ多シストロン性分離エレメントにより分離されている。幾つかの実施形態では、多シストロン性分離エレメントは、IRESまたは切断可能なペプチドもしくはリボソームスキップエレメントをコードする配列である。幾つかの実施形態では、多シストロン性分離エレメントは、IRES、例えば、脳心筋炎ウイルス（EMCV）IRESである。幾つかの実施形態では、多シストロン性分離エレメントは、切断可能なペプチド、例えば、2Aペプチドである。例示的な2Aペプチドとしては、P2Aペプチド、T2Aペプチド、E2Aペプチド、及びF2Aペプチドが挙げられる。幾つかの実施形態では、切断可能なペプチドは、T2Aである。幾つかの実施形態では、2つ以上の外来性ポリヌクレオチド（例えば、第1の外来性ポリヌクレオチド及び第2の外来性ポリヌクレオチド）は、プロモーターに作動可能に連結される。幾つかの実施形態では、第1の外来性ポリヌクレオチド及び第2の外来性ポリヌクレオチドは、それぞれがプロモーターに作動可能に連結される。幾つかの実施形態では、プロモーターは、同じプロモーターである。幾つかの実施形態では、プロモーターは、EF1プロモーターである。

【0639】

幾つかの例では、外来性ポリペプチドをコードする外来性ポリヌクレオチド（例えば、本明細書に記載される免疫寛容誘導因子または補体阻害因子をコードする外来性ポリヌクレオチド）は、多シストロン性ベクターによりコードされる外来性ポリペプチドのN末端またはC末端に切断可能なペプチドまたはリボソームスキップエレメント、例えば、T2Aをコードする。幾つかの実施形態では、切断可能なペプチドまたはリボソームスキップエレメントを含めることにより、単一の翻訳開始部位からの2つ以上のポリペプチドの発現が可能になる。幾つかの実施形態では、切断可能なペプチドは、T2Aである。幾つかの実施形態では、T2Aは、配列番号11に記載されるアミノ酸配列であるか、またはそれを含む。幾つかの実施形態では、T2Aは、配列番号12に記載されるアミノ酸配列であるか、またはそれを含む。幾つかの実施形態では、T2Aは、配列番号17に記載されるアミノ酸配列であるか、またはそれを含む。幾つかの実施形態では、T2Aは、配列番号18に記載されるアミノ酸配列であるか、またはそれを含む。

【0640】

幾つかの実施形態では、ベクターまたは構築物は、外来性ポリヌクレオチドの1つ以上の転写単位の発現を駆動する単一のプロモーターを含む。幾つかの実施形態では、かかるベクターまたは構築物は、多シストロン性（バイシストロン性またはトリシストロン性、例えば、米国特許第6,060,273号を参照のこと）であり得る。例えば、幾つかの実施形態では、転写単位は、単一のプロモーターから転写されたRNAからの遺伝子産物（例えば、1種以上の免疫寛容誘導因子、例えば、CD47及び／または1種以上の補体阻害因子、例えば、CD46、CD59、及びDAF／CD55）の同時発現を可能にするIRES（内部リボソーム進入部位）を含有するバイシストロン性単位として遺伝子操作され得る。幾つかの実施形態では、本明細書において提供されるベクターまたは構築物は、バイシストロン性であり、これにより、ベクターまたは構築物が2つの別個のポリペプチドを発現することが可能となる。幾つかの例では、ベクターまたは構築物によりコー

ドされる2つの別個のポリペプチドは、免疫寛容誘導因子（例えば、A20／TNFAIP3、B2M-HLA-E、CD16、CD16Fc受容体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、CD52、CD55、CD59、CD64、CD200、CCL21、CCL22、CTLA4-Ig、C1阻害因子、CR1、DUX4、FASL、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鎖、HLA-F、HLA-G、H2-M3、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、IL-39、MANF、Mfge8、PD-L1、及びSerpnb9から選択される2つの因子）である。幾つかの例では、ベクターまたは構築物によりコードされる2つの別個のポリペプチドは、CD46及びCD59である。幾つかの実施形態では、ベクターまたは構築物によりコードされる2つの別個のポリペプチドは、免疫寛容誘導因子（例えば、CD47）、ならびにCD46、CD59、及びDAF／CD55から選択される補体阻害因子である。幾つかの実施形態では、本明細書において提供されるベクターまたは構築物は、トリシストロン性であり、これにより、ベクターまたは構築物が3つの別個のポリペプチドを発現することが可能となる。幾つかの例では、トリシストロン性ベクターまたは構築物の3つの核酸配列は、免疫寛容誘導因子、例えば、CD47、CD46、及びCD59である。幾つかの例では、トリシストロン性ベクターまたは構築物の3つの核酸配列は、CD46、CD59、及びDAF／CD55である。幾つかの例では、トリシストロン性ベクターまたは構築物の3つの核酸配列は、A20／TNFAIP3、B2M-HLA-E、CD16、CD16Fc受容体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、CD52、CD55、CD59、CD64、CD200、CCL21、CCL22、CTLA4-Ig、C1阻害因子、CR1、DUX4、FASL、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鎖、HLA-F、HLA-G、H2-M3、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、IL-39、MANF、Mfge8、PD-L1、及びSerpnb9から選択される3つの免疫寛容誘導因子である。幾つかの実施形態では、本明細書において提供されるベクターまたは構築物は、クアドシストロン性であり、これにより、ベクターまたは構築物が4つの別個のポリペプチドを発現することが可能となる。幾つかの例では、クアドシストロン性ベクターまたは構築物の4つの別個のポリペプチドは、CD47、CD46、CD59、及びDAF／CD55である。幾つかの例では、クアドシストロン性ベクターまたは構築物の4つの別個のポリペプチドは、A20／TNFAIP3、B2M-HLA-E、CD16、CD16Fc受容体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、CD52、CD55、CD59、CD64、CD200、CCL21、CCL22、CTLA4-Ig、C1阻害因子、CR1、DUX4、FASL、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鎖、HLA-F、HLA-G、H2-M3、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、IL-39、MANF、Mfge8、PD-L1、及びSerpnb9から選択される4つの免疫寛容誘導因子である。

10

20

30

40

50

【0641】

幾つかの実施形態では、細胞は、1種以上のベクターまたは構築物を含み、ここで、各ベクターまたは構築物は、上記のようなモノシストロン性または多シストロン性構築物であり、当該モノシストロン性または多シストロン性構築物は、1種以上の免疫寛容誘導因子、補体阻害因子を任意の組み合わせまたは順序でコードする。

【0642】

幾つかの実施形態では、単一のプロモーターは、単一のオープンリーディングフレーム（ORF）に、自己切断ペプチド（例えば、2A配列）またはプロテアーゼ認識部位（例えば、フューリン）をコードする配列により互いに分離された2、3、または4つの遺伝子（例えば、免疫寛容誘導因子（例えば、CD47）及び／またはCD46、CD59、及びDAF／CD55から選択される1つ以上の補体阻害因子をコードする）を含有するRNAの発現を誘導する。従って、ORFは、翻訳中（2Aの場合）または翻訳後のいずれかに個々のタンパク質にプロセッシングされる単一のポリペプチドをコードする。幾つかの例では、T2Aなどのペプチドは、2AエレメントのC末端でリボソームにペプチド結

合の合成をスキップさせ（リボソームスキッピング）、これにより、2 A配列の末端と下流の次のペプチドとの間の分離をもたらすことができる（例えば、de Felipe, Genetic Vaccines and Ther. 2:13 (2004) 及び de Felipe et al. Traffic 5:616-626 (2004) を参照のこと）。多数の2 Aエレメントが当該技術分野において公知である。本明細書において開示される方法及び核酸に使用され得る2 A配列の例としては、限定されるものではないが、米国特許出願公開第20070116690号に記載されるような口蹄疫ウイルス（F2 A、例えば、配列番号16）、ウマ鼻炎Aウイルス（E2 A、例えば、配列番号15）、ゾセア・アシグナウイルス（thosea assigna virus）（T2 A、例えば、配列番号11、12、17、または18）、及びブタテスコウイルス-1（P2 A、例えば、配列番号13または14）由来の2 A配列が挙げられる。

10

【0643】

ベクターまたは構築物（例えば、導入遺伝子）がタンパク質をコードする2つ以上の核酸配列、例えば、CD46をコードする第1の外來性ポリヌクレオチド及びCD59をコードする第2の外來性ポリヌクレオチド、またはCD47をコードする第1の外來性ポリヌクレオチド、CD56をコードする第2の外來性ポリヌクレオチド、及びCD59をコードする第3の外來性ポリヌクレオチドを含有する場合、ベクターまたは構築物（例えば、導入遺伝子）は、第1及び第2の外來性ポリヌクレオチド配列の間にペプチドをコードする核酸配列を更に含み得る。幾つかの例では、第1及び第2の外來性ポリヌクレオチドの間に配置される核酸配列は、翻訳中または翻訳後に第1及び第2の外來性ポリヌクレオチドの翻訳産物を分離するペプチドをコードする。幾つかの実施形態では、ペプチドは、自己切断型ペプチドまたはリボソームスキッピングを引き起こすペプチド（リボソームスキップエレメント）、例えば、T2 Aペプチドを含有する。幾つかの実施形態では、切断可能なペプチドまたはリボソームスキップエレメントを含めることにより、単一の翻訳開始部位からの2つ以上のポリペプチドの発現が可能になる。幾つかの実施形態では、ペプチドは、T2 Aペプチドである自己切断型ペプチドである。幾つかの実施形態では、T2 Aは、配列番号11に記載されるアミノ酸配列であるか、またはそれを含む。幾つかの実施形態では、T2 Aは、配列番号12に記載されるアミノ酸配列であるか、またはそれを含む。幾つかの実施形態では、T2 Aは、配列番号17に記載されるアミノ酸配列であるか、またはそれを含む。幾つかの実施形態では、T2 Aは、配列番号18に記載されるアミノ酸配列であるか、またはそれを含む。

20

30

【0644】

本明細書に記載されるポリヌクレオチドを細胞に導入するプロセスは、任意の好適な技術により達成され得る。好適な技術としては、リン酸カルシウムまたは脂質により媒介される形質移入、エレクトロポレーション、フソゲン、及びウイルスベクターを使用した形質導入または感染が挙げられる。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、ウイルス形質導入により細胞に導入されるか（例えば、レンチウイルス形質導入）、またはそうでなければウイルスベクターで送達される（例えば、フソゲンにより媒介される送達）。好適な技術としては、リン酸カルシウムまたは脂質により媒介される形質移入、エレクトロポレーション、トランスポザーゼにより媒介される送達、及びウイルスベクターを使用した形質導入または感染が挙げられる。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、ウイルス形質導入により細胞に導入されるか（例えば、レンチウイルス形質導入）、またはそうでなければウイルスベクターで送達される（例えば、フソゲンにより媒介される送達）。幾つかの実施形態では、外來性ポリヌクレオチドをコードするポリヌクレオチドをパッケージングするベクターが、パッケージングされたポリヌクレオチドを細胞または細胞集団に送達するために使用され得る。これらのベクターは、DNAベクター、RNAベクター、プラスミド、ウイルスベクター及び粒子が含まれる、任意の種類のベクターであり得る。幾つかの実施形態では、外來性ポリヌクレオチドを細胞に送達するために、脂質ナノ粒子が使用され得る。幾つかの実施形態では、外來性ポリヌクレオチドを細胞に送達するために、ウイルスベクターが使用され得る。ウイルスベクター技術は周知であり、Sam

40

50

brook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)に記載されている。ベクターとして有用であるウイルスとしては、限定されるものではないが、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、レトロウイルスベクター、腫瘍溶解性ウイルスなどが挙げられる。幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドの細胞への導入は、特異的 (標的化される) または非特異的 (例えば、標的化されない) であり得る。幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドの細胞への導入は、細胞のゲノムへの組み込みまたは挿入をもたらす得る。他の実施形態では、導入された外来性ポリヌクレオチドは、細胞において非組み込み型またはエピソーム性であり得る。当業者は、本明細書に記載される例示的な方法のいずれかが含まれる、核酸導入遺伝子を細胞に導入する方法に精通しており、好適な方法を選択することができる。

10

【0645】

1) 非標的化送達

幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドは、種々の非標的化方法のいずれかにより細胞 (例えば、供給源細胞) に導入される。幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドは、宿主細胞のランダムなゲノム遺伝子座に挿入される。当業者に公知のように、例えば、レトロウイルスベクター及びレンチウイルスベクターが含まれる、ウイルスベクターは、遺伝物質を宿主細胞に送達するために一般的に使用され、異種遺伝子または外来性遺伝子を宿主細胞ゲノムにランダムに挿入して、遺伝子の安定した発現及び複製を促進する。幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドの細胞への非標的化導入は、細胞における外来性ポリヌクレオチドの安定した発現のための条件下への非標的化導入である。幾つかの実施形態では、細胞における安定した発現のために核酸を導入するための方法は、核酸が組み込まれた細胞が分裂する場合に、それが遺伝され得るように、細胞のゲノムへの当該核酸の安定した組み込みをもたらす任意の方法を必要とする。

20

【0646】

幾つかの実施形態では、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。レンチウイルスベクターは、それらが送達された核酸転写物内に含有される遺伝子の安定した発現を可能にするため、成功裡のウイルス形質導入に有用な手段である。レンチウイルスベクターは、送達された核酸転写物内に含有される遺伝子の安定した発現に必要とされる2つの酵素である逆転写酵素及びインテグラーゼを発現する。逆転写酵素はRNA転写物をDNAに変換する一方で、インテグラーゼはDNAを標的細胞のゲノムに挿入し、組み込む。DNAがゲノムに安定的に組み込まれると、当該DNAは宿主と一緒に分裂する。組み込まれたDNA内に含まれる関心対象の遺伝子は、恒常的に発現され得るか、またはそれは誘導性であり得る。宿主細胞ゲノムの一部として、当該関心対象の遺伝子は、活性化または抑制が含まれる、標的細胞における多数の因子に応じた細胞内調節の対象となり得る。

30

【0647】

レンチウイルスは、レトロウイルス科 (宿主ゲノムへの組み込み前にウイルスRNAゲノムのDNAへの逆転写が必要とされるために名付けられた) のウイルスのサブグループである。従って、レンチウイルス媒体/粒子の最も重要な特徴は、標的/宿主細胞のゲノムへのそれらの遺伝物質の組み込みである。レンチウイルスの幾つかの例としては、ヒト免疫不全ウイルス: HIV-1 及び HIV-2、サル免疫不全ウイルス (SIV)、ネコ免疫不全ウイルス (FIV)、ウシ免疫不全ウイルス (BIV)、ジェンブラナ病ウイルス (JDV)、ウマ伝染性貧血ウイルス (EIAV)、ウマ伝染性貧血ウイルス、ビスナ・マエディウイルス、及びヤギ関節炎脳炎ウイルス (CAEV) が挙げられる。

40

【0648】

通常、遺伝子送達媒体を構成するレンチウイルス粒子は、単独では複製欠損 (「自己不活型」とも称される) である。レンチウイルスは、インタクトな宿主核膜を通る侵入メカニズムにより分裂細胞及び非分裂細胞の両方に感染することができる (Naldini et al., Curr. Opin. Biotechnol., 1998, 9: 457

50

ー463)。組換えレンチウイルス媒体／粒子は、HIV病原性遺伝子を多重に弱毒化することにより作製されており、例えば、Env、Vif、Vpr、Vpu、Nef、及びTat遺伝子が欠失しており、これにより、ベクターが生物学的に安全となる。それに応じて、例えば、HIV-1／HIV-2に由来する、レンチウイルス媒体は、効率的な送達、導入遺伝子の非分裂細胞への組み込み及び長期の発現をもたらし得る。

【0649】

レンチウイルス粒子は、産生細胞、例えば、ヒトHEK293T細胞にウイルスパッケージング要素及びベクターゲノム自体を共発現させることにより生成され得る。これらの要素は、通常、(第2世代レンチウイルスシステムでは)3種または(第3世代レンチウイルスシステムでは)4種の別個のプラスミドで提供される。産生細胞は、ウイルスのコア成分(すなわち、構造タンパク質)及び酵素成分が含まれる、レンチウイルス成分、ならびにエンベロープタンパク質(複数可)をコードするプラスミド(パッケージングシステムと称される)、ならびに標的細胞に導入される外来導入遺伝子を含むゲノム、媒体それ自体をコードするプラスミド(トランスファーベクターとも称される)を同時形質移入される。通常、プラスミドまたはベクターは、産生細胞株に含まれる。プラスミド／ベクターは、産生細胞株への形質移入、形質導入、または感染により導入される。形質移入、形質導入、または感染の方法は、当業者に周知である。非限定的な例として、パッケージング構築物及びトランスファー構築物は、通常、優性選択マーカー、例えば、ネオマイシン(neo)、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)、グルタミンシンセターゼ、またはアデノシンデアミナーゼ(ADA)と共に、リン酸カルシウムトランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションにより産生細胞株に導入され得、適切な薬物の存在下での選択及びクローンの単離が後に続く。

【0650】

産生細胞は、外来遺伝子、例えば、外来性ポリヌクレオチドをコードするポリヌクレオチドを含有する組換えウイルス粒子を産生する。組換えウイルス粒子は、培養培地から回収され、当業者により使用される標準的方法により力価測定される。組換えレンチウイルス媒体は、標的細胞、例えば、セクションII.Cに記載される任意のものが含まれる、供給源細胞に感染させるために使用され得る。

【0651】

高力価レンチウイルス粒子を産生させるために使用され得る細胞としては、限定されるものではないが、HEK293T細胞、293G細胞、STAR細胞(Reland et al., Mol Ther. 2005, 11:452-459)、FreeStyle (商標) 293 Expression System (ThermoFisher, Waltham, MA)、及び他のHEK293Tベースの産生細胞株(例えば、Stewart et al., Hum Gene Ther. 2011, 22(3):357-369、Lee et al., Biotechnol Bioeng, 2012, 10996:1551-1560、Throm et al., Blood. 2009, 113(21):5104-5110)が挙げられ得る。

【0652】

レンチウイルス粒子に提供される追加の要素は、5'または3'末端のいずれかのレトロウイルスLTR(末端反復配列)、レトロウイルス輸送エレメント、任意のレンチウイルス逆応答エレメント(RRE)、プロモーターまたはその活性部分、及び遺伝子座制御領域(LCR)またはその活性部分を含み得る。他の要素としては、非分裂細胞における形質導入効率を改善するためのセントラルポリプリン配列(cPPT)、導入遺伝子の発現を増強し、力価を上昇させるウッドチャック肝炎ウイルス(WHP)転写後調節エレメント(WPRE)が挙げられる。

【0653】

組換えレンチウイルス粒子を生成させるための方法は当業者に公知である。例えば、米国特許第8,846,385号、同第7,745,179号、同第7,629,153号、同第7,575,924号、同第7,179,903号、

10

20

30

40

50

及び同第6, 808, 905号。使用されるレンチウイルスベクターは、限定されるものではないが、pLVX、pLenti、pLenti6、pLJML、FUGW、pWPXL、pWPI、pLenti CMV puro DEST、pLJML-EGFP、pULTRA、pInducer2Q、pHIV-EGFP、pCW57.1、pTRPE、pELPS、pRRR、及びpLionIIから選択され得る。任意の公知のレンチウイルス媒体も使用され得る（米国特許第9, 260, 725号、同第9, 068, 199号、同第9, 023, 646号、同第8, 900, 858号、同第8, 748, 169号、同第8, 709, 799号、同第8, 420, 104号、同第8, 329, 462号、同第8, 076, 106号、同第6, 013, 516号、及び同第5, 994, 136号、国際特許公開第WO2012079000号を参照のこと）。

10

【0654】

幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドは、細胞による一過性発現の条件下で、例えば、外来性ポリヌクレオチドのエピソームによる送達をもたらす方法により細胞に導入される。

【0655】

幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドをコードするポリヌクレオチドは、組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）ベクターにパッケージングされ得る。かかるベクターまたはウイルス粒子は、公知の血清型のカプシドまたは血清型のカプシドの組み合わせのいずれかを利用するように設計され得る。血清型のカプシドは、任意の同定されたAAV血清型及びそのバリエーション、例えば、AAV1、AAV2、AAV2G9、AAV3、AAV4、AAV4-4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、及びAAVrh10に由来するカプシドを含み得る。幾つかの実施形態では、AAV血清型は、米国特許出願公開第US20030138772号、Pulicherla et al. Molecular Therapy, 2011, 19(6):1070-1078、米国特許第6, 156, 303号、同第7, 198, 951号、米国特許出願公開第US2015/0159173号及び同第US2014/0359799号、ならびに国際特許公開第WO1998/011244号、WO2005/033321号、及びWO2014/14422号に記載されるような配列であり得るか、またはそれを有する。

20

【0656】

AAVベクターとしては、一本鎖ベクターだけでなく、自己相補的AAVベクター（scAAV）も挙げられる。scAAVベクターは、互いにアニーリングして、二本鎖ベクターゲノムを形成するDNAを含有する。第二鎖の合成を省略することにより、scAAVは、細胞における急速な発現を可能にする。rAAVベクターは、当該技術分野における標準的方法により、例えば、sf9昆虫細胞またはヒト細胞、例えば、HEK293細胞の懸濁細胞培養物でのトリプルトランスフェクションにより製造され得る。

30

【0657】

幾つかの実施形態では、非ウイルスベースの方法が使用され得る。例えば、幾つかの態様では、ポリヌクレオチドを含むベクターは、物理的方法、例えば、針、エレクトロポレーション、ソノポレーション、ハイドロポレーション；化学的担体、例えば、無機粒子（例えば、リン酸カルシウム、シリカ、金）、及び／または化学的方法による非ウイルス法により、細胞に導入され得る。他の態様では、合成または天然の生分解性薬剤、例えば、カチオン脂質、脂質ナノエマルジョン、ナノ粒子、ペプチドベースのベクター、またはポリマーベースのベクターが送達に使用され得る。

40

【0658】

幾つかの実施形態では、mRNAベースの方法が使用され得る。

【0659】

2) 非標的化送達

外来性ポリヌクレオチドは、細胞の任意の好適な標的ゲノム遺伝子座に挿入され得る。幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドは、標的遺伝子座への標的組込みにより

50

細胞に導入される。幾つかの実施形態では、標的組込みは、1種以上のヌクレアーゼ及び／またはニッカーゼならびにドナーテンプレートを使用する遺伝子編集により、相同性依存的組換えまたは相同性非依存的組換えを伴うプロセスで達成され得る。

【0660】

例えば、相同組換え修復（HOR）、ホモロジー媒介末端結合（HMEJ）、相同性非依存性標的組込み（HITI）、偏性ライゲーションゲート型組換え（ObliGare）、または標的染色体領域への正確な遺伝子挿入（PITCH）が含まれる、多数の遺伝子編集方法が、選択された特定のゲノム遺伝子座に外来性ポリヌクレオチドを挿入するために使用され得る。

【0661】

幾つかの実施形態では、ヌクレアーゼは、ゲノムの目的の位置（例えば、標的部位）で特異的な二本鎖切断（DSB）を生じさせ、誘発された切断を修復するための細胞の内在性メカニズムを利用する。ニッカーゼは、ゲノムの目的の位置で特異的な一本鎖切断を生じさせる。1つの非限定的な例では、標的DNAの対向する鎖上に2つの一本鎖切断を生じさせ、これにより、平滑末端または付着末端を生成するために、2種のニッカーゼが使用され得る。限定されるものではないが、CRISPR関連タンパク質（Cas）ヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、メガヌクレアーゼ、他のエンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼ、それらのバリエーション、それらの断片、及びそれらの組み合わせが含まれる、任意の好適なヌクレアーゼが標的DNA配列のゲノム編集を誘発するために細胞に導入され得る。幾つかの実施形態では、内在性標的ゲノム遺伝子座、例えば、セーフハーバー遺伝子座またはその付近の配列に相同な相同性配列（例えば、相同性アーム）に挟まれた外来性ポリヌクレオチド配列（導入遺伝子とも称される）を含有するドナーテンプレートと共に、ヌクレアーゼまたはニッカーゼが導入される場合、DNA損傷修復経路が細胞における標的部位での導入遺伝子配列の組込みをもたらす。これは、相同性依存的プロセスにより起こり得る。幾つかの実施形態では、ドナーテンプレートは、環状二本鎖プラスミドDNA、一本鎖ドナーオリゴヌクレオチド（ssODN）、直鎖状二本鎖ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）断片、またはインタクトな姉妹染色分体の相同配列である。ドナーテンプレートの形態に応じて、特定のDNA修復経路、例えば、相同組換え修復（HDR）、合成依存的DNA鎖アニリング（SDSA）、マイクロホモロジー媒介末端結合（MMEJ）、及びホモロジー媒介末端結合（HMEJ）により、ホモロジー媒介遺伝子挿入及び置換が実行され得る。

【0662】

例えば、DNA修復メカニズムは、ヌクレアーゼによる（i）2つのSSB（各鎖にSSBが存在し、これにより、一本鎖オーバーハングが誘発される）；または（ii）DSB（両方の鎖上に同じ切断部位で発生し、これにより、平滑末端切断が誘発される）の後に誘発され得る。これらの作用物質のうちの1つにより切断されると、SSBまたはDSBを有する標的遺伝子座は、DNA損傷修復のための以下の2つの主要な経路のうちの1つを起こす：（1）エラーを起こしやすい非相同末端結合（NHEJ）経路、または（2）忠実度の高い相同組換え修復（HDR）経路。幾つかの実施形態では、SSBまたはDSBが存在する細胞に導入されたドナーテンプレート（例えば、環状プラスミドDNAまたは直鎖状DNA断片、例えば、ssODN）は、HDR及びドナーテンプレートの標的遺伝子座への組込みをもたらす。通常、ドナーテンプレートの非存在下では、NHEJプロセスが、切断されたDNA鎖の末端を再度ライゲーションし、このことが、切断部位でのヌクレオチド欠失及び挿入をしばしばもたらす。

【0663】

幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドの細胞への部位特異的挿入は、HDRベースの手法により達成され得る。HDRは、細胞がDNAの二本鎖切断（DSB）を修復するためのメカニズムであり、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（CRISPR）／Casシステム、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活

10

20

30

40

50

性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（T A L E N）、メガヌクレアーゼ、及びトランスポザーゼが含まれる、様々な遺伝子編集システムを使用して多数の生物においてゲノムを改変するために利用され得る。

【0664】

幾つかの実施形態では、標的組込みは、DNA結合性標的化ヌクレアーゼ及び遺伝子編集ヌクレアーゼ、例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（Z F N）及び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）、ならびにRNA誘導型ヌクレアーゼ、例えば、C R I S P R関連ヌクレアーゼ（C a s）システムが含まれる、標的遺伝子の少なくとも1つの標的部位（複数可）配列に標的化されるように専用に設計された、1種以上の配列特異的または標的化ヌクレアーゼを導入することにより実行される。例示的なZ F N、T A L E、及びT A L E Nは、例えば、L l o y d e t a l . , F r o n t i e r s i n I m m u n o l o g y , 4 (2 2 1) : 1 - 7 (2 0 1 3) に記載されている。実施形態では、標的部位またはその付近での標的遺伝子破壊は、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（C R I S P R）及びC R I S P R関連（C a s）タンパク質を使用して実行される。S a n d e r a n d J o u n g , (2 0 1 4) N a t u r e B i o t e c h n o l o g y , 3 2 (4) : 3 4 7 - 3 5 5を参照のこと。

【0665】

セクションI I . A . 1に記載される遺伝子破壊のためのシステムのいずれかが使用され得、また外来性ポリヌクレオチド、例えば、導入遺伝子配列を有する適切なドナーテンプレートと共に導入される場合に、遺伝子破壊の標的部位またはその付近での当該外来性ポリヌクレオチドの標的組込みをもたらし得る。実施形態では、遺伝子破壊は、1種以上のガイドRNA（g R N A）及びC a sタンパク質を含むC R I S P R / C a sシステムを使用してもたらされる。例示的なC a sタンパク質及びg R N Aは、上記のセクションI I . Aに記載されており、それらのいずれかが、C R I S P R / C a sシステムが特異的な標的遺伝子座へのH D Rにより媒介される外来性ポリヌクレオチドの組込みに使用され得る。特定の標的遺伝子座及び標的部位などに応じて、切断及びH D Rによる外来性ポリヌクレオチドの組込みに適切なC a sヌクレアーゼ及びg R N Aを選択することは、当業者のレベルの範囲内である。更に、標的遺伝子座に応じて、当業者は、以下で更に記載されるような適切なドナーテンプレートを容易に調製することができる。

【0666】

幾つかの実施形態では、DNA編集システムは、RNA誘導型C R I S P R / C a sシステム（RNAベースのC R I S P R / C a sシステムなどの）であり、ここで、当該C R I S P R / C a sシステムは、標的遺伝子座（例えば、セーフハーバー遺伝子座）で二本鎖切断を生じさせて、標的遺伝子座への導入遺伝子の挿入を誘発することができる。幾つかの実施形態では、ヌクレアーゼシステムは、C R I S P R / C a s 9システムである。幾つかの実施形態では、C R I S P R / C a s 9システムは、プラスミドベースのC a s 9を含む。幾つかの実施形態では、C R I S P R / C a s 9システムは、RNAベースのC a s 9を含む。幾つかの実施形態では、C R I S P R / C a s 9システムは、C a s 9 m R N A及びg R N Aを含む。幾つかの実施形態では、C R I S P R / C a s 9システムは、タンパク質 / R N A複合体、またはプラスミド / R N A複合体、またはタンパク質 / プラスミド複合体を含む。幾つかの実施形態では、供給源細胞（例えば、初代細胞または多能性幹細胞、例えば、i P S C）に、導入遺伝子または外来性ポリヌクレオチド配列を含有するドナーテンプレート、ならびにDNAヌクレアーゼシステム（例えば、C a s 9）及び遺伝子座特異的なg R N Aを含むDNAヌクレアーゼシステムを導入することを含む、遺伝子操作された細胞を作製するための方法が提供される。幾つかの実施形態では、C a s 9は、m R N Aとして導入される。幾つかの実施形態では、C a s 9は、g R N Aとのリボ核タンパク質複合体として導入される。

【0667】

通常、挿入されるドナーテンプレートは、関心対象の外来性ポリヌクレオチド（例えば、免疫寛容誘導因子またはC A R）を含有する導入遺伝子カセットを少なくとも含み、任

意にプロモーターも含む。これらの実施形態の幾つかでは、外来性ポリヌクレオチド及び／またはプロモーターを含有する、挿入される導入遺伝子カセットは、ドナーテンプレートにおいて、標的切断部位のすぐ上流及びすぐ下流の配列に相同な配列を有する相同性アーム、すなわち、左相同性アーム（LHA）及び右相同性アーム（RHA）に挟まれている。通常、ドナーテンプレートの相同性アームは、HDRのためのテンプレートとして機能するように標的ゲノム遺伝子座のために専用に設計されている。各相同性アームの長さは、通常、導入される挿入断片のサイズに依存し、より大きな挿入物はより長い相同性アームを必要とする。

【0668】

幾つかの実施形態では、ドナーテンプレート（例えば、組換えドナー修復テンプレート）は、（i）外来性ポリヌクレオチド配列（例えば、プロモーター、例えば、異種プロモーターに作動可能に連結された導入遺伝子）を含む導入遺伝子カセット；及び（ii）当該導入遺伝子カセットに隣接しており、DNAヌクレアーゼ（例えば、Casヌクレアーゼ、例えば、Cas9またはCas12）切断部位の両側の標的遺伝子座（例えば、セーフハーバー遺伝子座）の一部に相同な2つの相同性アームを含む。ドナーテンプレートは、選択マーカー、検出可能なマーカー、及び／または精製用マーカーを更に含み得る。

【0669】

幾つかの実施形態では、相同性アームは同じ長さである。他の実施形態では、相同性アームは異なる長さである。相同性アームは、少なくとも約10塩基対（bp）、例えば、少なくとも約10bp、15bp、20bp、25bp、30bp、35bp、45bp、55bp、65bp、75bp、85bp、95bp、100bp、150bp、200bp、250bp、300bp、350bp、400bp、450bp、500bp、550bp、600bp、650bp、700bp、750bp、800bp、850bp、900bp、950bp、1000bp、1.1キロベース（kb）、1.2kb、1.3kb、1.4kb、1.5kb、1.6kb、1.7kb、1.8kb、1.9kb、2.0kb、2.1kb、2.2kb、2.3kb、2.4kb、2.5kb、2.6kb、2.7kb、2.8kb、2.9kb、3.0kb、3.1kb、3.2kb、3.3kb、3.4kb、3.5kb、3.6kb、3.7kb、3.8kb、3.9kb、4.0kb、またはそれ以上であり得る。相同性アームは、約10bp～約4kb、例えば、約10bp～約20bp、約10bp～約50bp、約10bp～約100bp、約10bp～約200bp、約10bp～約500bp、約10bp～約1kb、約10bp～約2kb、約10bp～約4kb、約100bp～約200bp、約100bp～約500bp、約100bp～約1kb、約100bp～約2kb、約100bp～約4kb、約500bp～約1kb、約500bp～約2kb、約500bp～約4kb、約1kb～約2kb、約1kb～約4kb、または約2kb～約4kbであり得る。

【0670】

幾つかの実施形態では、ドナーテンプレートは、発現ベクターにクローニングされ得る。当業者に公知の従来のウイルス及び非ウイルスベースの発現ベクターが使用され得る。

【0671】

幾つかの実施形態では、組込みの標的とされる標的遺伝子座は、外来性ポリヌクレオチドまたは導入遺伝子の組込みの標的とすることが許容されるか、または望ましい任意の遺伝子座であり得る。標的遺伝子座の非限定的な例としては、限定されるものではないが、CXCR4遺伝子、アルブミン遺伝子、SHS231遺伝子座、F3遺伝子（CD142としても公知）、MICA遺伝子、MICB遺伝子、LRP1遺伝子（CD91としても公知）、HMGB1遺伝子、ABO遺伝子、RHD遺伝子、FUT1遺伝子、KDM5D遺伝子（HYとしても公知）、B2M遺伝子、CIITA遺伝子、TRAC遺伝子、TRBC遺伝子、CCR5遺伝子、F3（すなわち、CD142）遺伝子、MICA遺伝子、MICB遺伝子、LRP1遺伝子、HMGB1遺伝子、ABO遺伝子、RHD遺伝子、FUT1遺伝子、KDM5D（すなわち、HY）遺伝子、PDGFRα遺伝子、OLIG2

遺伝子、及び／またはG F A P遺伝子が挙げられる。幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドは、例えば、イントロン、エキソン、及び／または遺伝子コード領域（コード配列または「C D S」としても公知）が含まれる、標的遺伝子座（例えば、セーフハーバー遺伝子座）の好適な領域に挿入され得る。幾つかの実施形態では、挿入は、標的ゲノム遺伝子座の一方のアレルで起こる。幾つかの実施形態では、挿入は、標的ゲノム遺伝子座の両方のアレルで起こる。これらの実施形態のいずれかでは、標的ゲノム遺伝子座に挿入される導入遺伝子の方向は、その遺伝子座における遺伝子の方向と同じであり得るか、または反対であり得る。

【0672】

幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドは、セーフハーバー遺伝子座のイントロン、エキソン、またはコード配列領域に挿入される。幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドは、内在性遺伝子に挿入され、ここで、当該挿入は、内在性遺伝子のサイレンシングまたは発現の低減を引き起こす。外来性ポリヌクレオチドの挿入のための例示的なゲノム遺伝子座を表24に示す。

【表24】

表24. 外来性ポリヌクレオチドの挿入のための例示的なゲノム遺伝子座

番号	種	名称	Ensembl ID	切断の標的領域	別名
1	ヒト	B2M	ENSG00000166710	CDS	
2	ヒト	CIITA	ENSG00000179583	CDS	
3	ヒト	TRAC	ENSG00000277734	CDS	
4	ヒト	PPP1R12C	ENSG00000125503	イントロン1及び2	AAVS1
5	ヒト	CLYBL	ENSG00000125246	イントロン2	
6	ヒト	CCR5	ENSG00000160791	エキソン1～3 イントロン1～2及びCDS	
7	ヒト	THUMP3-AS1	ENSG00000206573	イントロン1	ROSA26
8	ヒト	Ch-4:58, 976, 613		500bpウィンドウ	SHS231
9	ヒト	F3	ENSG00000117525	CDS	CD142
10	ヒト	MICA	ENSG00000204520	CDS	
11	ヒト	MICB	ENSG00000204516	CDS	
12	ヒト	LRP1	ENSG00000123384	CDS	
13	ヒト	HMGB1	ENSG00000189403	CDS	
14	ヒト	ABO	ENSG00000175164	CDS	
15	ヒト	RHD	ENSG00000187010	CDS	
16	ヒト	FUT1	ENSG00000174951	CDS	
17	ヒト	KDM5D	ENSG00000012817	CDS	HY

【0673】

幾つかの実施形態では、標的遺伝子座はセーフハーバー遺伝子座である。幾つかの実施形態では、セーフハーバー遺伝子座は、組み込まれたDNAの安定した発現を可能にし、近くのまたは隣接する内在性遺伝子、調節エレメントなどにほとんど影響を及ぼさないゲノム位置である。幾つかの例では、セーフハーバー遺伝子は、持続的な遺伝子発現を可能にし、初代細胞及び多能性幹細胞（その派生物及びその分化した細胞が含まれる）が含まれる、様々な細胞種での遺伝子改変のために遺伝子操作されたヌクレアーゼにより標的とされ得る。セーフハーバー遺伝子座の非限定的な例としては、限定されるものではないが、CCR5遺伝子座、PPP1R12C（AAVS1としても公知）遺伝子座、CLYBL遺伝子座、及び／またはRosa遺伝子座（例えば、ROSA26遺伝子座）が挙げられる。幾つかの実施形態では、セーフハーバー遺伝子座は、AAVS1遺伝子座、CCR5遺伝子座、及びCLYBL遺伝子座からなる群から選択される。幾つかの例では、多数の細胞種においてSHS231がセーフハーバー遺伝子座として標的とされ得る。幾つかの例では、ある特定の遺伝子座が、ある特定の細胞種におけるセーフハーバー遺伝子座と

して機能し得る。例えば、PDGFR α は、グリア前駆細胞（GPC）でのセーフハーバー遺伝子座であり、OLIG2は、オリゴデンドロサイトでのセーフハーバー遺伝子座であり、GFAPは、アストロサイトでのセーフハーバー遺伝子座である。特定の遺伝子操作される細胞種に応じて適切なセーフハーバー遺伝子座を選択することは、当業者のレベルの範囲内である。幾つかの例では、2つ以上のセーフハーバー遺伝子が標的とされ得、これにより、2つ以上の導入遺伝子が遺伝子改変される細胞に導入される。

【0674】

幾つかの実施形態では、供給源細胞（例えば、初代細胞または多能性幹細胞、例えば、iPSC）に、導入遺伝子または外来性ポリヌクレオチド配列を含有するドナーテンプレート、ならびにDNAヌクレアーゼシステム（例えば、Cas9）、ならびにCCR5遺伝子座、PPP1R12C（AAVS1としても公知）遺伝子座、CLYBL遺伝子座、及び／またはRosa遺伝子座（例えば、ROSA26遺伝子座）に特異的な相補的部分を含む遺伝子座特異的なgRNA（例えば、gRNA標的化配列）を含むDNAヌクレアーゼシステムを導入することを含む、遺伝子操作された細胞を作製するための方法が提供される。幾つかの実施形態では、gRNAにより標的とされるゲノム遺伝子座は、記載される遺伝子座のいずれかの4000bpの範囲内、3500bpの範囲内、3000bpの範囲内、2500bpの範囲内、2000bpの範囲内、1500bpの範囲内、1000bpの範囲内、または500bpの範囲内に存在する。

【0675】

幾つかの実施形態では、HDRにより媒介される導入遺伝子の挿入のために本明細書において使用されるgRNAは、AAVS1の標的配列を認識する相補的部分（例えば、gRNA標的化配列）を含む。これらの実施形態の幾つかでは、標的配列は、AAVS1のイントロン1に存在する。AAVS1は、19番染色体：55,090,918～55,117,637（リバース鎖）に存在し、AAVS1イントロン1（転写物ENS00000125503に基づく）は、19番染色体：55,117,222～55,112,796（リバース鎖）に存在する。ある特定の実施形態では、gRNAは、19番染色体：55,117,222～55,112,796の4000bpの範囲内、3500bpの範囲内、3000bpの範囲内、2500bpの範囲内、2000bpの範囲内、1500bpの範囲内、1000bpの範囲内、または500bpの範囲内のゲノム遺伝子座を標的とする。ある特定の実施形態では、gRNAは、19番染色体：55,115,674から4000bpの範囲内、3500bpの範囲内、3000bpの範囲内、2500bpの範囲内、2000bpの範囲内、1500bpの範囲内、1000bpの範囲内、または500bpの範囲内のゲノム遺伝子座を標的とする。ある特定の実施形態では、gRNAは、19番染色体：55,115,674で、または19番染色体：55,115,674から5,10,15,20,30,40、もしくは50ヌクレオチドの範囲内の位置で切断部位を生じるように設計される。ある特定の実施形態では、gRNAは、Li et al., Nat. Methods 16:866–869 (2019)に記載される「sgAAVS1-1」としても公知のGET000046である。このgRNAは、配列番号36（表25に示す）に記載される核酸配列を有する相補的部分（例えば、gRNA標的化配列）を含み、AAVS1（PPP1R12Cとしても公知）のイントロン1を標的とする。

【0676】

幾つかの実施形態では、HDRにより媒介される導入遺伝子の挿入のために本明細書において使用されるgRNAは、CLYBLの標的配列を認識する相補的部分（例えば、gRNA標的化配列）を含む。これらの実施形態の幾つかでは、標的配列は、CLYBLのイントロン2に存在する。CLYBLは、13番染色体：99,606,669～99,897,134（フォワード鎖）に存在し、CLYBLイントロン2（転写物ENST00000376355.7に基づく）は、13番染色体：99,773,011～99,858,860（フォワード鎖）に存在する。ある特定の実施形態では、gRNAは、13番染色体：99,773,011～99,858,860の4000bpの範囲内、3

10

20

30

40

50

500bpの範囲内、3000bpの範囲内、2500bpの範囲内、2000bpの範囲内、1500bpの範囲内、1000bpの範囲内、または500bpの範囲内のゲノム遺伝子座を標的とする。ある特定の実施形態では、gRNAは、13番染色体：99, 822, 980から4000bpの範囲内、3500bpの範囲内、3000bpの範囲内、2500bpの範囲内、2000bpの範囲内、1500bpの範囲内、1000bpの範囲内、または500bpの範囲内のゲノム遺伝子座を標的とする。ある特定の実施形態では、gRNAは、13番染色体：99, 822, 980で、または13番染色体：99, 822, 980から5, 10, 15, 20, 30, 40、もしくは50ヌクレオチドの範囲内の位置で切断部位を生じるように設計される。ある特定の実施形態では、gRNAは、配列番号36（表25に示す）に記載される核酸配列を有する相補的部分（例えば、gRNA標的化配列）を含むGET000047であり、CLYBLのイントロン2を標的とする。この標的部位は、Cerbini et al., PLoS One, 10(1): e0116032 (2015)に記載されるようなTALENの標的部位と同様である。

10

【0677】

幾つかの実施形態では、HDRにより媒介される導入遺伝子の挿入のために本明細書において使用されるgRNAは、CCR5の標的配列を認識する相補的部分（例えば、gRNA標的化配列）を含む。これらの実施形態の幾つかでは、標的配列は、CCR5のエキソン3に存在する。CCR5は、3番染色体：46, 370, 854～46, 376, 206（フォワード鎖）に存在し、CCR5エキソン3（転写物ENST00000292303.4に基づく）は、3番染色体：46, 372, 892～46, 376, 206（フォワード鎖）に存在する。ある特定の実施形態では、gRNAは、3番染色体：46, 372, 892～46, 376, 206の4000bpの範囲内、3500bpの範囲内、3000bpの範囲内、2500bpの範囲内、2000bpの範囲内、1500bpの範囲内、1000bpの範囲内、または500bpの範囲内のゲノム遺伝子座を標的とする。ある特定の実施形態では、gRNAは、3番染色体：46, 373, 180から4000bpの範囲内、3500bpの範囲内、3000bpの範囲内、2500bpの範囲内、2000bpの範囲内、1500bpの範囲内、1000bpの範囲内、または500bpの範囲内のゲノム遺伝子座を標的とする。ある特定の実施形態では、gRNAは、3番染色体：46, 373, 180で、または3番染色体：46, 373, 180から5, 10, 15, 20, 30, 40、もしくは50ヌクレオチドの範囲内の位置で切断部位を生じるように設計される。ある特定の実施形態では、gRNAは、Mandale et al., Cell Stem Cell 15: 643-652 (2014)に記載される「crCCR5_D」としても公知のGET000048である。このgRNAは、配列番号37（表17に示す）に記載される核酸配列を有する相補的部分を含み、CCR5のエキソン3（あるいはEnsemblゲノムデータベースにおいてエキソン2と注釈付けされる）を標的とする。Gomez-Ospina et al., Nat. Comm. 10(1): 4045 (2019)を参照のこと。

20

30

【0678】

表25は、例示的なgRNA標的化配列を記載する。幾つかの実施形態では、表17に記載される相補的部分配列において1個以上のチミンを含有し得るgRNA標的化配列は、ウラシルで置換される。リボ核酸の文脈において、ウラシルに「u」及びチミンに「t」を用いる代わりに、ウラシル及びチミンの両方が「t」で表され得ることが当業者によって理解されるであろう。特に明記しない限り、ウラシルを表すために「t」が使用されることが理解されよう。

40

【表 2 5】

表 2 5. CCR5での例示的な gRNA 標的化配列

説明	核酸配列	配列番号
GET000046ガイド	(5'→3') a c c c c a c a g t g g g g c c a c t a	321
GET000047ガイド	(5'→3') t g t t g g a a g g a t g a g g a a a t	322
GET000048ガイド	(5'→3') t c a c t a t g c t g c c g c c c a g t	323

【0679】

幾つかの実施形態では、標的遺伝子座は、細胞においてノックアウトされることが望ましい遺伝子座である。かかる実施形態では、このような標的遺伝子座は、例えば、細胞の表現型または機能を調節するために、破壊または除去することが細胞において望ましい任意の標的遺伝子座である。例えば、標的遺伝子の発現を低減するためのセクションII.Aに記載される遺伝子改変のいずれかは、外来性ポリヌクレオチドの標的化組込みのための望ましい標的遺伝子座であり得、ここで、標的遺伝子の遺伝子破壊またはノックアウト及び外来性ポリヌクレオチドの標的化挿入による過剰発現は、細胞内の同じ標的部位または遺伝子座で達成され得る。例えば、遺伝子破壊をもたらして、表1に記載される任意の標的遺伝子の発現を除去または低減（例えば、ノックアウト）すると同時に、遺伝子破壊の標的部位またはその付近の核酸配列に相同な相同性アームに挟まれたドナーテンプレートを使用して標的遺伝子座に外来性ポリヌクレオチドを組込む（例えば、ノックインする）ために、HDRプロセスが使用され得る。

【0680】

幾つかの実施形態では、供給源細胞（例えば、初代細胞または多能性幹細胞、例えば、iPSC）に、導入遺伝子または外来性ポリヌクレオチド配列を含有するドナーテンプレート、ならびにDNAヌクレアーゼシステム（例えば、Cas9）、及びB2M遺伝子座、CIIITA遺伝子座、TRAC遺伝子座、TRBC遺伝子座に特異的な相補的部分を含む遺伝子座特異的なgRNAを含むDNAヌクレアーゼシステムを導入することを含む、遺伝子操作された細胞を作製するための方法が提供される。幾つかの実施形態では、gRNAにより標的とされるゲノム遺伝子座は、記載される遺伝子座のいずれかの4000bpの範囲内、3500bpの範囲内、3000bpの範囲内、2500bpの範囲内、2000bpの範囲内、1500bpの範囲内、1000bpの範囲内、または500bpの範囲内に存在する。

【0681】

実施形態では、標的遺伝子座はB2Mである。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、B2M遺伝子を標的とする遺伝子改変を含む。幾つかの実施形態では、B2M遺伝子を標的とする遺伝子改変は、Casタンパク質またはCasタンパク質をコードするポリヌクレオチド、及びB2M遺伝子座を特異的に標的とするための少なくとも1種のガイドリボ核酸配列を含む標的化ヌクレアーゼシステムを使用することによるものである。幾つかの実施形態では、B2M遺伝子座を特異的に標的とするための少なくとも1種のガイドリボ核酸（gRNA）配列は、WO2016/183041（その開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる）の付録2または表15の配列番号81240～85644からなる群から選択される。幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドは、gRNAにより標的とされる標的部位に隣接する配列に相同な相同性アームに挟まれた外来性ポリヌクレオチド配列を含有するドナーテンプレートを導入することによって、HDRにより破壊されたB2M遺伝子座に組込まれる。

【0682】

実施形態では、標的遺伝子座はCIIITAである。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、CIIITA遺伝子を標的とする遺伝子改変を含む。幾つかの実施形態では、CIIITA遺伝子を標的とする遺伝子改変は、Casタンパク質またはCasタンパク質をコードするポリヌクレオチド、及びCIIITA遺伝子座を特異的に標的とするための少

なくとも1種のガイドリボ核酸配列を含む標的化ヌクレアーゼシステムによるものである。幾つかの実施形態では、C I I T A 遺伝子の特異的に標的とするための少なくとも1種のガイドリボ核酸配列は、W O 2 0 1 6 1 8 3 0 4 1（その開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる）の付録1または表12の配列番号5184～36352からなる群から選択される。幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドは、g R N A により標的とされる標的部位に隣接する配列に相同な相同性アームに挟まれた外来性ポリヌクレオチド配列を含有するドナーテンプレートを導入することによって、H D R により破壊されたC I I T A 遺伝子座に組込まれる。

【0683】

幾つかの実施形態では、細胞は、T細胞であり、遺伝子編集方法により内在性T R A C またはT R B C 遺伝子座の発現が細胞において低減または除去される。例えば、H D R プロセスは、遺伝子破壊をもたらして、T R A C またはT R B C 遺伝子の発現を除去または低減（例えば、ノックアウト）すると同時に、遺伝子破壊の標的部位またはその付近の核酸配列に相同な相同性アームに挟まれたドナーテンプレートを使用して同じ遺伝子座に外来性ポリヌクレオチドを組み込む（例えば、ノックインする）ために使用され得る。本明細書に記載される遺伝子へのC R I S P R / C a s ベースの標的化に有用な例示的なg R N A 配列を表26に示す。配列は、U S 2 0 1 6 0 3 4 8 0 7 3に見出され得、その開示は、配列表を含め、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【表26】

表26. 遺伝子標的化に有用な例示的なg R N A 標的化配列

遺伝子名	U S 2 0 1 6 0 3 4 8 0 7 3 における配列番号
T R A C	配列番号532～609及び9102～9797
T R B (T C R B 及びT R B C とも称される)	配列番号610～765及び9798～10532

【0684】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、T R A C 遺伝子を標的とする改変を含む。幾つかの実施形態では、T R A C 遺伝子を標的とする遺伝子改変は、C a s タンパク質またはC a s タンパク質をコードするポリヌクレオチド、及びT R A C 遺伝子の特異的に標的とするための少なくとも1種のガイドリボ核酸配列を含む標的化ヌクレアーゼシステムによるものである。幾つかの実施形態では、T R A C 遺伝子の特異的に標的とするための少なくとも1種のガイドリボ核酸配列（例えば、g R N A 標的化配列）は、U S 2 0 1 6 0 3 4 8 0 7 3（その開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる）の配列番号532～609及び9102～9797からなる。幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドは、g R N A により標的とされる標的部位に隣接する配列に相同な相同性アームに挟まれた外来性ポリヌクレオチド配列を含有するドナーテンプレートを導入することによって、H D R により破壊されたT R A C 遺伝子座に組込まれる。

【0685】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、T R B C 遺伝子を標的とする遺伝子改変を含む。幾つかの実施形態では、T R B C 遺伝子を標的とする遺伝子改変は、C a s タンパク質またはC a s タンパク質をコードするポリヌクレオチド、及びT R B C 遺伝子の特異的に標的とするための少なくとも1種のガイドリボ核酸配列を含む標的化ヌクレアーゼシステムによるものである。幾つかの実施形態では、T R B C 遺伝子の特異的に標的とするための少なくとも1種のガイドリボ核酸配列（例えば、g R N A 標的化配列）は、U S 2 0 1 6 0 3 4 8 0 7 3（その開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる）の配列番号610～765及び9798～10532からなる群から選択される。幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドは、g R N A により標的とされる標的部位に隣接する配列に相同な相同性アームに挟まれた外来性ポリヌクレオチド配列を含有するドナーテンプレートを導入することによって、H D R により破壊されたT R B C 遺伝子座に組込まれる。

【0686】

幾つかの実施形態では、記載されるHDRによる組込み手法に使用される新規の遺伝子座及び／またはgRNA配列を同定することは当業者のレベルの範囲内である。例えば、CRISPR/Casシステムでは、（例えば、表1に示す標的遺伝子内の）特定の位置に対する既存のgRNAが公知である場合、ゲノム全体で約100塩基対（bp）毎に通常出現するPAM配列の遺伝子座の両側の隣接領域を調査することにより、導入遺伝子の標的化挿入のための追加の位置を同定する「インテグレーション」手法が使用され得る。異なるヌクレアーゼが異なる対応するPAM配列を通常有するため、PAM配列は、使用される特定のCasヌクレアーゼに依存する。遺伝子座の両側の隣接領域は、約500～4000bpの長さ、例えば、約500bp、約1000bp、約1500bp、約2000bp、約2500bp、約3000bp、約3500bp、または約4000bpの長さであり得る。PAM配列が調査範囲内で同定される場合、遺伝子破壊法に使用される新規のガイドがその遺伝子座の配列に従って設計され得る。CRISPR/Casシステムが例示として記載されているが、ZFN、TALEN、メガヌクレアーゼ、及びトランスポザーゼを使用するものが含まれる、記載されているHDRによる任意の手法が新規の遺伝子座を同定する方法に使用され得る。

10

【0687】

幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドは、外来性CD47ポリペプチド（例えば、ヒトCD47ポリペプチド）をコードし、外来性ポリペプチドは、本明細書において開示されるセーフハーバー遺伝子座もしくはセーフハーバー部位、または内在性遺伝子のサイレンシングもしくは発現の低減を引き起こすゲノム遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、CD47をコードする外来性ポリヌクレオチドは、CCR5遺伝子座、PPP1R12C（AAVS1としても公知）遺伝子座、CLYBL遺伝子座、及び／またはRosa遺伝子座（例えば、ROSA26遺伝子座）に挿入される。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、B2M、CIITA、TRAC、TRBC、PD1、またはCTLA4遺伝子座に挿入される。

20

【0688】

C. 細胞

幾つかの実施形態では、本開示は、遺伝子操作された（または改変された）細胞（例えば、幹細胞、人工多能性幹細胞、かかる幹細胞から誘導もしくは作製された分化した細胞、造血幹細胞、または初代細胞）またはその集団であって、本明細書に記載される1種以上の遺伝子（例えば、1種以上のMHCクラスI分子または1種以上のMHCクラスII分子の発現を調節する遺伝子）の発現が低減もしくは除去されるように当該細胞のゲノムが改変されたか、または遺伝子もしくはポリヌクレオチド（例えば、免疫寛容誘導因子、例えば、CD47をコードするポリヌクレオチド）が過剰発現されているか、もしくはその発現が増強されている、当該細胞またはその集団を提供する。

30

【0689】

本明細書において開示される幹細胞に関する実施形態は、細胞がこのような幹細胞に由来する細胞である、対応する実施形態を開示するためにも用いられ得る。

【0690】

幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドを含む遺伝子操作された細胞は、β膵島細胞であり、CD47ポリペプチドをコードする第1の外来性ポリヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたβ膵島細胞は、1種以上の補体阻害因子または本明細書に記載される他の免疫寛容誘導ポリペプチドをコードする1種以上の追加の外来性ポリヌクレオチドを更に含む。幾つかの実施形態では、第1の外来性ポリヌクレオチド及び1種以上の追加の外来性ポリヌクレオチドは、同じゲノム遺伝子座に挿入されている。幾つかの実施形態では、第1の外来性ポリヌクレオチド及び1種以上の追加の外来性ポリヌクレオチドは、異なるゲノム遺伝子座に挿入されている。代表的実施形態では、遺伝子操作された（例えば、低免疫原性）細胞は、初代β膵島細胞、または遺伝子操作された（例えば、低免疫原性）多能性細胞（例えば、iPSC）に由来するβ膵島細胞である

40

50

。

【0691】

幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドを含む遺伝子操作された細胞は、肝実質細胞であり、CD47ポリペプチドをコードする第1の外来性ポリヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された肝実質細胞は、1種以上の補体阻害因子または本明細書に記載される他の免疫寛容誘導ポリペプチドをコードする1種以上の追加の外来性ポリヌクレオチドを更に含む。幾つかの実施形態では、第1の外来性ポリヌクレオチド及び1種以上の追加の外来性ポリヌクレオチドは、同じゲノム遺伝子座に挿入されている。幾つかの実施形態では、第1の外来性ポリヌクレオチド及び1種以上の追加の外来性ポリヌクレオチドは、異なるゲノム遺伝子座に挿入されている。代表的実施形態では、遺伝子操作された（例えば、低免疫原性）細胞は、初代肝実質細胞、または遺伝子操作された（例えば、低免疫原性）多能性細胞（例えば、iPSC）に由来する肝実質細胞である。

10

【0692】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供されるような遺伝子操作または改変されている細胞は、多能性幹細胞または多能性幹細胞から分化した細胞である。幾つかの実施形態では、本明細書において提供されるような遺伝子操作または改変されている細胞は、初代細胞である。

【0693】

細胞は、脊椎動物細胞、例えば、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞またはマウス細胞であり得る。細胞は、脊椎動物幹細胞、例えば、哺乳動物幹細胞、例えば、ヒト幹細胞（またはこのような幹細胞に由来する細胞）またはマウス幹細胞（またはこのような幹細胞に由来する細胞）であり得る。実施形態では、細胞もしくは幹細胞またはこのような幹細胞に由来する細胞は、改変に適している。

20

【0694】

実施形態では、細胞もしくは幹細胞、またはこのような幹細胞に由来する細胞は、治療的価値を有するか、または有すると考えられており、その結果、細胞もしくは幹細胞、またはかかる幹細胞に由来するか、もしくはそれから分化した細胞は、疾患、障害、異常、または損傷の処置を必要とする対象の疾患、障害、異常、または損傷を処置するために使用され得る。

30

【0695】

幾つかの実施形態では、細胞は、幹細胞または前駆細胞（例えば、iPSC、胚性幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、内皮幹細胞、上皮幹細胞、脂肪幹細胞もしくは前駆細胞、生殖系列幹細胞、肺幹細胞もしくは前駆細胞、乳腺幹細胞、成体嗅覚幹細胞、毛嚢幹細胞、多能性幹細胞、羊膜幹細胞、臍帯血幹細胞、または神経幹細胞もしくは前駆細胞）である。幾つかの実施形態では、幹細胞は、成体幹細胞（例えば、体性幹細胞または組織特異的幹細胞）である。幾つかの実施形態では、幹細胞または前駆細胞は、分化することができる（例えば、幹細胞は、全能性、多分化能性、または多能性である）。幾つかの実施形態では、細胞は、胎児組織または新生児組織から単離される。幾つかの実施形態では、細胞は、線維芽細胞、単球前駆体、B細胞、外分泌細胞、膵臓前駆細胞、内分泌前駆細胞、肝芽細胞、筋芽細胞、前脂肪細胞、前駆細胞、肝実質細胞、軟骨細胞、平滑筋細胞、K562ヒト赤血球白血病細胞株、骨細胞、滑膜細胞、腱細胞、靱帯細胞、半月板細胞、脂肪細胞、樹状細胞、またはナチュラルキラー細胞である。幾つかの実施形態では、細胞は、筋細胞、赤血球巨核球細胞、好酸球、iPS細胞、マクロファージ、T細胞、膵島β細胞、神経細胞、心筋細胞、血液細胞、内分泌前駆細胞、外分泌前駆細胞、導管細胞、腺房細胞、α細胞、β細胞、δ細胞、PP細胞、肝実質細胞、胆管細胞、または褐色脂肪細胞に操作される（例えば、変換または分化される）。幾つかの実施形態では、細胞は、筋細胞（例えば、骨格筋細胞、平滑筋細胞、または心筋細胞）、赤血球巨核球細胞、好酸球、iPS細胞、マクロファージ、T細胞、膵島β細胞、神経細胞、心筋細胞、血液細胞（例えば、赤血球、白血球、または血小板）、内分泌前駆細胞、外分泌前駆細胞、導管細胞、

40

50

腺房細胞、 α 細胞、 β 細胞、 δ 細胞、PP細胞、肝実質細胞、胆管細胞、または白色脂肪細胞もしくは褐色脂肪細胞である。幾つかの実施形態では、細胞は、ホルモン分泌細胞（例えば、インスリン、オキシトシン、エンドルフィン、バソプレシン、セロトニン、ソマトスタチン、ガストリン、セクレチン、グルカゴン、甲状腺ホルモン、ボンベシン、コレシストキニン、テストステロン、エストロゲン、またはプロゲステロン、レニン、グレリン、アミリン、または膵臓ポリペプチドを分泌する細胞）、表皮ケラチノサイト、上皮細胞（例えば、外分泌上皮細胞、甲状腺上皮細胞、角化上皮細胞、胆嚢上皮細胞、または角膜、舌、口腔、食道、肛門管、遠位尿道、もしくは腔の表面上皮細胞）、腎臓細胞、生殖細胞、骨格関節滑膜細胞、骨膜細胞、骨細胞（例えば、破骨細胞または造骨細胞）、軟骨膜細胞（例えば、軟骨芽細胞または軟骨細胞）、軟骨の細胞（例えば、軟骨細胞）、線維芽細胞、内皮細胞、心膜細胞、髄膜細胞、ケラチノサイト前駆細胞、ケラチノサイト幹細胞、周皮細胞、グリア細胞、上衣細胞、羊膜もしくは胎盤膜から単離される細胞、または漿膜細胞（例えば、体腔を覆う漿膜細胞）である。

10

【0696】

幾つかの実施形態では、細胞は体細胞である。幾つかの実施形態では、細胞は、皮膚または他の器官、例えば、心臓、脳もしくは脊髄、肝臓、肺、腎臓、膵臓、膀胱、骨髄、脾臓、腸管、または胃に由来する。細胞は、ヒトまたは他の哺乳動物に由来し得る（例えば、げっ歯類、非ヒト霊長類、ウシ、またはブタの細胞）。

【0697】

幾つかの実施形態では、細胞は、T細胞、NK細胞、 β 膵島細胞、内皮細胞、上皮細胞、例えば、RPE、甲状腺、皮膚、または肝実質細胞である。幾つかの実施形態では、細胞は、遺伝子操作されたiPSCから分化したiPSCに由来する細胞である。幾つかの実施形態では、細胞は、初代細胞から改変された遺伝子操作された細胞である。幾つかの実施形態では、細胞は、1種以上の免疫寛容誘導因子の増強された発現を含む。幾つかの実施形態では、1種以上の免疫寛容誘導因子は、CD47である。

20

【0698】

幾つかの実施形態では、細胞は、CD47をコードする外来性ポリヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、細胞は、1種以上の補体阻害因子の過剰発現または増強された発現を含む。

【0699】

幾つかの実施形態では、細胞は、本明細書に記載される改変（例えば、遺伝子改変）を含有するように遺伝子操作されているiPSCに由来するT細胞である。幾つかの実施形態では、細胞は、本明細書に記載される改変（例えば、遺伝子改変）を含有するように遺伝子操作されている初代T細胞である。幾つかの実施形態では、細胞は、1種以上の補体阻害因子の過剰発現または増強された発現を含む。幾つかの実施形態では、T細胞は、本明細書に記載される任意のものが含まれる、キメラ抗原受容体（CAR）で遺伝子操作されていてもよい。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された（例えば、低免疫原性）T細胞は、本明細書、例えば、セクションIVに記載される任意のものが含まれる、同種異系細胞療法の種々の適応症を処置するために使用され得る。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された（例えば、低免疫原性）T細胞は、がんを処置するために使用され得る。

30

40

【0700】

幾つかの実施形態では、細胞は、本明細書に記載される改変（例えば、遺伝子改変）を含有するように遺伝子操作されているiPSCに由来するNK細胞である。幾つかの実施形態では、細胞は、本明細書に記載される改変（例えば、遺伝子改変）を含有するように遺伝子操作されている初代NK細胞である。幾つかの実施形態では、細胞は、1種以上の補体阻害因子の過剰発現または増強された発現を含む。幾つかの実施形態では、NK細胞は、本明細書に記載される任意のものが含まれる、キメラ抗原受容体（CAR）で遺伝子操作されていてもよい。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された（例えば、低免疫原性）NK細胞は、本明細書、例えば、セクションVに記載される任意のものが含まれる、同種異系細胞療法の種々の適応症を処置するために使用され得る。幾つかの実施形態では、

50

遺伝子操作された（例えば、低免疫原性）NK細胞は、がんを処置するために使用され得る。

【0701】

幾つかの実施形態では、細胞は、本明細書に記載される改変（例えば、遺伝子改変）を含有するように遺伝子操作されているiPSCに由来するβ膵島細胞である。幾つかの実施形態では、細胞は、本明細書に記載される改変（例えば、遺伝子改変）を含有するように遺伝子操作されている初代β膵島細胞である。幾つかの実施形態では、細胞は、1種以上の補体阻害因子の過剰発現または増強された発現を含む。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された（例えば、低免疫原性）β膵島細胞は、本明細書、例えば、セクションVに記載される任意のものが含まれる、同種異系細胞療法の種々の適応症を処置するために使用され得る。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された（例えば、低免疫原性）β膵島細胞は、糖尿病、例えば、I型糖尿病を処置するために使用され得る。

10

【0702】

幾つかの実施形態では、細胞は、本明細書に記載される改変（例えば、遺伝子改変）を含有するように遺伝子操作されているiPSCに由来する内皮細胞である。幾つかの実施形態では、細胞は、本明細書に記載される改変（例えば、遺伝子改変）を含有するように遺伝子操作されている初代内皮細胞である。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された（例えば、低免疫原性）内皮細胞は、本明細書、例えば、セクションVに記載される任意のものが含まれる、同種異系細胞療法の種々の適応症を処置するために使用され得る。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された（例えば、低免疫原性）内皮細胞は、血管新生疾患または眼疾患を処置するために使用され得る。

20

【0703】

幾つかの実施形態では、細胞は、本明細書に記載される改変（例えば、遺伝子改変）を含有するように遺伝子操作されているiPSCに由来する上皮細胞である。幾つかの実施形態では、細胞は、本明細書に記載される改変（例えば、遺伝子改変）を含有するように遺伝子操作されている初代上皮細胞である。幾つかの実施形態では、上皮細胞は、RPEである。幾つかの実施形態では、上皮細胞は、甲状腺細胞である。幾つかの実施形態では、上皮細胞は、皮膚細胞である。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された（例えば、低免疫原性）上皮細胞は、本明細書、例えば、セクションVに記載される任意のものが含まれる、同種異系細胞療法の種々の適応症を処置するために使用され得る。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された（例えば、低免疫原性）上皮細胞は、甲状腺疾患または皮膚疾患を処置するために使用され得る。

30

【0704】

幾つかの実施形態では、細胞は、本明細書に記載される改変（例えば、遺伝子改変）を含有するように遺伝子操作されているiPSCに由来する肝実質細胞である。幾つかの実施形態では、細胞は、本明細書に記載される改変（例えば、遺伝子改変）を含有するように遺伝子操作されている初代肝実質細胞である。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された（例えば、低免疫原性）上皮細胞は、本明細書、例えば、セクションVに記載される任意のものが含まれる、同種異系細胞療法の種々の適応症を処置するために使用され得る。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された（例えば、低免疫原性）肝細胞は、肝疾患を処置するために使用され得る。

40

【0705】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される遺伝子操作または改変されている細胞は、健常な対象、例えば、処置されるべき特定の疾患または状態を有すると知られていないか、または有すると疑われていない対象由来の細胞である。例えば、糖尿病を処置するために、例えば、β膵島細胞がドナー対象から単離または採取される場合、当該ドナー対象は、対象が糖尿病または別の疾患もしくは状態に罹患していると知られていないか、または罹患していると疑われていない場合、健常な対象である。

【0706】

1. 初代細胞

50

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される遺伝子操作されている細胞は、1人以上の別個の対象またはドナーから採取または単離された初代細胞に由来する細胞を含む。幾つかの実施形態では、細胞は、1人以上（例えば、2人以上、3人以上、4人以上、5人以上、10人以上、20人以上、50人以上、または100人以上）の異なるドナー対象から採取された単離初代細胞のプールに由来する。幾つかの実施形態では、複数の異なるドナー対象（例えば、2人以上、3人以上、4人以上、5人以上、10人以上、20人以上、50人以上、または100人以上）から単離または採取された初代細胞は、まとめてバッチにプールされ、提供される方法に従って遺伝子操作される。

【0707】

幾つかの実施形態では、初代細胞は、レシピエント対象（例えば、細胞を投与される患者）と異なる1人以上のドナー対象からの初代細胞のプールに由来する。初代細胞は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、100人、またはそれ以上のドナー対象から採取され得、一緒にプールされ得る。初代細胞は、1人以上、2人以上、3人以上、4人以上、5人以上、6人以上、7人以上、8人以上、9人以上、10人以上、20人以上、50人以上、または100人以上のドナー対象から採取され得、一緒にプールされ得る。幾つかの実施形態では、初代細胞は、1人または複数人の個体から採取され、幾つかの例では、初代細胞または初代T細胞のプールは、インビトロで培養される。幾つかの実施形態では、初代細胞または初代T細胞のプールは、本明細書において提供される方法に従って遺伝子操作または改変される。

【0708】

幾つかの実施形態では、方法は、個々のドナー対象から目的の種類の初代細胞（例えば、T細胞、NK細胞、NKT細胞、内皮細胞、膵島細胞、β膵島細胞、肝実質細胞、または本明細書に記載される他の初代細胞）を採取または単離すること、細胞をプールして、初代細胞種のバッチを得ること、及び本明細書において提供される方法により細胞を遺伝子操作することを含む。幾つかの実施形態では、本方法は、目的の種類の初代細胞（例えば、T細胞、NK細胞、内皮細胞、β膵島細胞、肝実質細胞、または本明細書に記載される他の初代細胞）を採取または単離すること、個々のドナーの各々の細胞を本明細書において提供される方法により遺伝子操作すること、及び少なくとも2人の個体の試料の遺伝子操作（改変）された細胞をプールして、初代細胞種の遺伝子操作された細胞のバッチを得ることを含む。

【0709】

幾つかの実施形態では、初代細胞は、個体から単離もしくは採取されるか、または2人以上の個別のドナーから単離もしくは採取された初代細胞のプールから単離もしくは採取される。初代細胞は、セクションII.C.3に記載される任意のものが含まれる、本明細書に記載される任意の種類の初代細胞であり得る。幾つかの実施形態では、初代細胞は、T細胞、NK細胞、β膵島細胞、内皮細胞、上皮細胞、例えば、RPE、甲状腺、皮膚、または肝実質細胞から選択される。幾つかの実施形態では、個々のドナーまたは個々のドナーのプール由来の初代細胞は、本明細書に記載される改変（例えば、遺伝子改変）を含有するように遺伝子操作される。

【0710】

2. 人工多能性幹細胞の作製

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される遺伝子操作されている細胞は、人工多能性幹細胞であるか、または人工多能性幹細胞に由来するか、もしくはそれから分化した遺伝子操作された細胞である。マウス及びヒト多能性幹細胞（iPSC；マウス細胞ではmiPSCまたはヒト細胞ではhiPSCと一般に称される）の作製は、当該技術分野において一般に公知である。当業者によって理解されるように、iPSC作製のための種々の異なる方法が存在する。元々の誘導は、Oct3/4、Sox2、c-Myc、及びKlf4の4つの転写因子のウイルス導入を使用してマウス胎児線維芽細胞または成体線維芽細胞から行われた。Takahashi and Yamanaka Cell 126:663-676 (2006)（その全体が、特にその中で概説される技術につい

10

20

30

40

50

て参照により本明細書に組み込まれる)を参照のこと。それ以来、多数の方法が開発されてきた。概説について Seki et al, World J. Stem Cells 7 (1) : 116-125 (2015)、及び Lakshmipathy and Vermuri, editors, Methods in Molecular Biology: Pluripotent Stem Cells, Methods and Protocols, Springer 2013 (これらの両方は参照によりその全体が、特に hiPSC を作製するための方法について明示的に本明細書に組み込まれる)を参照のこと (例えば、後者の参考文献の第3章を参照のこと)。

【0711】

一般に、iPSCは、通常はエピソームベクターを使用して導入される、1つ以上の初期化因子の宿主細胞での一過性発現により作製される。これらの条件下では、少量の細胞が誘導されて、iPSCとなる (通常、選択マーカーが使用されないため、このステップの効率は低い)。細胞が「初期化」され、多能性になると、それらはエピソームベクター (複数可) を喪失し、内在性遺伝子を使用して初期化因子を産生する。

10

【0712】

同様に当業者によって理解されるように、使用され得るか、または使用される初期化因子の数は異なり得る。一般に、より少数の初期化因子が使用される場合、多能性状態への細胞の形質転換の効率だけでなく「多能性」も下がり、例えば、より少数の初期化因子は、完全に多能性でないが、より少数の細胞種に分化することのみ可能であり得る細胞をもたらす得る。

20

【0713】

幾つかの実施形態では、OCTの4単一の初期化因子が使用される。他の実施形態では、OCT4及びKLF4の2つの初期化因子が使用される。他の実施形態では、OCT4、KLF4、及びSOX2の3つの初期化因子が使用される。他の実施形態では、OCT4、KLF4、SOX2、及びc-Mycの4つの初期化因子が使用される。他の実施形態では、SOKMNL T、SOX2、OCT4 (POU5F1)、KLF4、MYC、NANOG、LIN28、及びSV40LT抗原から選択される5、6、または7つの初期化因子が使用され得る。通常、これらの初期化因子遺伝子は、エピソームベクター、例えば、当該技術分野において公知であり、市販されているエピソームベクターで提供される。

30

【0714】

幾つかの実施形態では、1つ以上の初期化因子を形質移入するために使用される宿主細胞は、非多能性幹細胞である。一般に、当該技術分野において公知のように、iPSCは、本明細書に記載される初期化因子を一過性に発現させることにより、非多能性細胞、例えば、限定されるものではないが、血液細胞、線維芽細胞などから作製される。幾つかの実施形態では、非多能性細胞、例えば、線維芽細胞は、細胞を初期化する前に1人以上の別個の対象またはドナーから採取または単離される。幾つかの実施形態では、iPSCは、1人以上 (例えば、2人以上、3人以上、4人以上、5人以上、10人以上、20人以上、50人以上、または100人以上) の異なるドナー対象から採取された単離非多能性幹細胞、例えば、線維芽細胞のプールから作製される。幾つかの実施形態では、非多能性細胞、例えば、線維芽細胞は、複数の異なるドナー対象 (例えば、2人以上、3人以上、4人以上、5人以上、10人以上、20人以上、50人以上、または100人以上) から単離または採取され、まとめてバッチにプールされ、iPSCとして初期化され、提供される方法に従って遺伝子操作される。

40

【0715】

幾つかの実施形態では、iPSCは、例えば、レシピエント対象 (例えば、細胞を投与される患者) と異なる1人以上のドナー対象からの非多能性細胞 (例えば、線維芽細胞) のプール由来の細胞に1つ以上の初期化因子を一過性に形質移入することにより、誘導される。iPSCに誘導される非多能性細胞 (例えば、線維芽細胞) は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、100人、またはそれ以上のドナー対象から採

50

取され得、一緒にプールされ得る。非多能性細胞（例えば、線維芽細胞）は、1人以上、2人以上、3人以上、4人以上、5人以上、6人以上、7人以上、8人以上、9人以上、10人以上、20以上、50人以上、または100人以上のドナー対象から採取され得、一緒にプールされ得る。幾つかの実施形態では、非多能性細胞（例えば、線維芽細胞）は、1人または複数の個体から採取され、幾つかの例では、非多能性細胞（例えば、線維芽細胞）または非多能性細胞（例えば、線維芽細胞）のプールは、インビトロで培養され、iPSCの生成を誘発するために、1つ以上の初期化因子を形質移入される。幾つかの実施形態では、非多能性細胞（例えば、線維芽細胞）または非多能性細胞（例えば、線維芽細胞）のプールは、本明細書において提供される方法に従って遺伝子操作または改変される。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたiPSCまたは遺伝子操作されたiPSCのプールは、次いで、生物及び組織の任意の細胞への分化のための分化プロセスに供される。

10

【0716】

遺伝子操作されたiPSC細胞が作製されたら、それらは、WO2016183041及びWO2018132783に記載されるように、低免疫原性及び／または多能性の保持について分析され得る。幾つかの実施形態では、低免疫原性は、WO2018132783の図13及び図15に例示されるような多数の技術を使用して分析される。これらの技術は、同種異系宿主への移植及び宿主免疫系を回避する低免疫原性多能性細胞の増殖（例えば、奇形腫）のモニタリングを含む。幾つかの例では、低免疫原性多能性細胞派生物は、ルシフェラーゼを発現するように形質導入され、次いで、生物発光イメージングを使用して追跡され得る。同様に、細胞が宿主動物において免疫応答を引き起こさないことを確認するために、かかる細胞に対する宿主動物のT細胞及び／またはB細胞の反応が試験される。T細胞応答は、Elispot、ELISA、FACS、PCR、またはマサイトメトリー（CYTOF）により評価され得る。B細胞応答または抗体応答は、FACSまたはLuminexを使用して評価される。追加的または代替的に、細胞は、自然免疫応答、例えば、NK細胞による殺傷を回避するそれらの能力について、WO2018132783の図14及び15に一般的に示されるように分析され得る。

20

【0717】

幾つかの実施形態では、細胞の免疫原性は、当業者により理解されるT細胞免疫アッセイ、例えば、T細胞増殖アッセイ、T細胞活性化アッセイ、及びT細胞殺傷アッセイを使用して評価される。幾つかの例では、T細胞増殖アッセイは、細胞をインターフェロニンγで前処理すること、及び細胞を標識されたT細胞と共培養すること、及び事前に設定した期間後にT細胞集団（または増殖性T細胞集団）の存在を分析することを含む。幾つかの例では、T細胞活性化アッセイは、T細胞を本明細書において概説される細胞と共培養すること、及びT細胞におけるT細胞活性化マーカーの発現レベルを測定することを含む。

30

【0718】

本明細書において概説される細胞の免疫原性を評価するために、インビボアッセイが実行され得る。幾つかの実施形態では、遺伝子操作または改変されたiPSCの生存及び免疫原性は、同種異系ヒト化免疫不全マウスモデルを使用して測定される。幾つかの例では、遺伝子操作または改変されたiPSCは、同種異系ヒト化NSG-SGM3マウスに移植され、細胞拒絶反応、細胞生存、及び奇形腫形成について分析される。幾つかの例では、移植された遺伝子操作されたiPSCまたはその分化した細胞は、マウスモデルにおいて長期生存を示す。

40

【0719】

細胞の低免疫原性が含まれる、免疫原性を測定するための更なる技術は、例えば、Deuse et al., Nature Biotechnology, 2019, 37, 252-258及びHan et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(21), 10441-10446に記載されており、それらの開示は、図、図の凡例、及び方法の説明を含め、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

50

【0720】

同様に、多能性の保持は多数の方法で試験される。幾つかの実施形態では、多能性は、本明細書において一般的に記載され、WO2018132783の図29に示されるような、ある特定の多能性特異的因子の発現により分析される。追加的または代替的に、多能性細胞は、多能性の指標として1つ以上の細胞種に分化される。

【0721】

遺伝子操作された多能性幹細胞（遺伝子操作されたiPSC）が作製されたら、それらは、iPSCの維持について公知のように、未分化状態で維持され得る。例えば、細胞は、分化を防止し、多能性を維持する培養培地を使用してマトリゲル上で培養され得る。加えて、それらは、多能性を維持するための条件下の培養培地中に存在し得る。

10

【0722】

本明細書に記載される多能性幹細胞のいずれかは、生物及び組織の任意の細胞に分化され得る。ある態様では、レシピエント対象へのその後の移植のためにiPSCと異なる細胞種に分化している遺伝子操作された細胞が本明細書において提供される。分化は、通常、細胞特異的マーカーの存在を評価することにより、当該技術分野において公知のように分析され得る。当業者によって理解されるように、分化した遺伝子操作された（例えば、低免疫原性）多能性細胞派生物は、細胞種及びこれらの細胞の最終的な用途の両方に依存する当該技術分野において公知の技術を使用して移植され得る。分化した細胞の例示的な種類及びそれを作製するための方法は、以下に記載される。幾つかの実施形態では、iPSCは、セクションII.C.3に記載される任意のものが含まれる、本明細書に記載される任意の種類の細胞に分化され得る。幾つかの実施形態では、iPSCは、T細胞、NK細胞、 β 膵島細胞、内皮細胞、上皮細胞、例えば、RPE、甲状腺、皮膚、または肝実質細胞から選択される細胞種に分化される。幾つかの実施形態では、個々のドナーまたは個々のドナーのプール由来の宿主細胞、例えば、非多能性細胞（例えば、線維芽細胞）が単離または採取され、iPSCに誘導され、ここで、当該iPSCは、次いで、本明細書に記載される改変（例えば、遺伝子改変）を含有するように遺伝子操作され、次いで、目的の細胞種に分化される。

20

【0723】

3. 細胞種

本開示の実施形態が多数の異なる細胞種に適用され得ることが本明細書の開示から理解されよう。本明細書に記載される任意の細胞種に関する実施形態は、安全スイッチを記載している実施形態、ならびに、HIP細胞、CAR細胞、及び本明細書に記載されるような他の改変／遺伝子編集された細胞を記載している実施形態と容易かつ適切に組み合わせられ得ることが理解されよう。

30

【0724】

本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、（例えば、ゲノム編集された）初代細胞を使用して実行され得る。製造される細胞療法製品が幹細胞に由来する細胞から構成される場合、本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、（例えば、ゲノム編集された）幹細胞（すなわち、分化前）を使用して、及び／または幹細胞に由来する細胞（すなわち、分化後）を使用して実行され得る。

40

【0725】

a. β 膵島細胞

膵臓は、ホルモンを産生する膵島として公知の細胞のクラスターを含有する。幾つかの異なる種類の細胞が膵島に存在する。例えば、 α 細胞はグルカゴンを産生し、 δ 細胞はソマトスタチンを産生し、 β 細胞はインスリンを産生する。初代膵島細胞の試料は、少なくとも α 細胞、 δ 細胞、及び β 細胞を含み得る。

【0726】

細胞療法製品に使用される本明細書に記載される β 膵島細胞は、細胞療法製品において

50

α細胞及びδ細胞と共に存在し得る。細胞療法製品に使用される膵島細胞は、細胞療法製品の製造プロセスの任意の段階でドナー能力についてプロファイリングされ得る。幾つかの実施形態では、細胞療法製品は、最大5、10、15、20、25、35、または40%のα細胞を含む。幾つかの実施形態では、細胞療法製品は、最大10、15、20、25、35、40、45、50、55、60、65、70、75、または80%のβ細胞を含む。幾つかの実施形態では、細胞療法製品は、最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、または25%のδ細胞を含む。

【0727】

細胞療法製品に使用されるβ膵島細胞は、細胞療法製品の製造プロセスの任意の段階でドナー能力についてプロファイリングされ得る。

【0728】

細胞療法製品に使用されるβ膵島細胞は、（例えば、ゲノム編集された）初代膵島細胞であり得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、（例えば、ゲノム編集された）初代膵島細胞で実行され得る。

【0729】

本明細書の他箇所で記載されるように、細胞療法製品に使用されるβ膵島細胞は、多能性幹細胞（iPSC）に由来するβ膵島細胞であり得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、分化して、β膵島細胞を形成することができる幹細胞でも実行され得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、幹細胞に由来する（例えば、ゲノム編集された）β膵島細胞でも実行され得る。

【0730】

細胞療法に使用される場合のβ膵島細胞の望ましい特徴に関するある特定の情報が含まれる、本開示の文脈において参照されるβ膵島細胞に関する関連情報は、当該技術分野において公知である。本明細書に記載されるβ膵島細胞に関する実施形態は、HIP細胞（例えば、MHCクラスI及び／またはMHCクラスII分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現ならび少なくとも1種の免疫寛容誘導因子の増強された発現を示す）を記載している実施形態、ならびに安全スイッチ、及び本明細書に記載されるような他の改変／遺伝子編集された細胞を記載している実施形態と容易かつ適切に組み合わせられ得ることが理解されよう。細胞療法製品に使用される膵島細胞は、細胞療法製品を製造する間の編集プロセスの任意の段階でドナー能力についてプロファイリングされ得る。

【0731】

本明細書に記載されるβ膵島細胞は、対象の疾患を処置または予防するために使用され得る。

【0732】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される遺伝子操作または改変されている細胞は、初代β膵島細胞（膵島細胞または膵β細胞とも称される）である。幾つかの実施形態では、初代β膵島細胞は、1人以上の個別のドナー対象、例えば、1人以上の個別の健常なドナー（例えば、疾患または感染症について知られていないか、またはそれを疑われていない、例えば、その臨床徴候を示さない対象）から単離または採取される。当業者によって理解されるように、個体からβ膵島細胞を単離または採取する方法は、公知の技術を使用して達成され得る。本明細書において、対象（例えば、レシピエント）へのその後の移植（transplantation）または移植（engraftment）のための、本明細書に記載される改変（例えば、遺伝子改変）を含有する遺伝子操作された初代β膵島細胞が提供される。

【0733】

幾つかの実施形態では、β膵島細胞は、対象または個体から取得される（例えば、収集されるか、抽出されるか、取り出されるか、または採取される）。幾つかの実施形態では

10

20

30

40

50

、初代β膵島細胞は、β膵島細胞が1人以上の対象（例えば、1人以上の健常なヒトが含まれる、1人以上のヒト）に由来するように、β膵島細胞のプールから作製される。幾つかの実施形態では、初代β膵島細胞のプールは、1～100人、1～50人、1～20人、1～10人、1人以上、2人以上、3人以上、4人以上、5人以上、10人以上、20人以上、30人以上、40人以上、50人以上、または100人以上の対象に由来する。幾つかの実施形態では、ドナー対象は、患者（例えば、治療細胞を投与されるレシピエント）と異なる。幾つかの実施形態では、β膵島細胞のプールは、患者由来の細胞を含まない。幾つかの実施形態では、β膵島細胞のプールが採取されるドナー対象のうちの1人以上は、患者と異なる。

【0734】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞は、本明細書に記載される改変（例えば、遺伝子改変）を含有し、β膵島細胞に分化している遺伝子操作されたiPSCに由来するβ膵島細胞である。当業者によって理解されるように、分化の方法は、公知の技術を使用する目的の細胞種に依存する。幾つかの実施形態では、様々なβ膵島細胞に分化した細胞は、対象（例えば、レシピエント）へのその後の移植（transplantation）または移植（engraftment）のために使用され得る。幾つかの実施形態では、膵島細胞は、本明細書に記載される遺伝子操作された多能性細胞に由来する。多能性幹細胞をβ膵島細胞に分化させるのに有用な方法は、例えば、米国特許第9,683,215号；米国特許第9,157,062号；米国特許第8,927,280号；米国特許出願公開第2021/0207099号；Hogrebe et al., “Generation of insulin-producing pancreatic beta cells from multiple human stem cell lines”, Nat. Protoc., 2021、及びHogrebe et al., “Targeting the cytoskeleton to direct pancreatic differentiation of human pluripotent stem cells”, Nat. Biotechnol., 2020, 38:460-470（それらの内容はその全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【0735】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子操作された多能性細胞は、I型真性糖尿病（T1DM）に対処するために、移植用のβ様細胞または膵島オルガノイドに分化される。細胞システムは、T1DMに対処するための有望な方法である。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Ellis et al., Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2017 Oct;14(10):612-628を参照のこと。更に、Pagliuca et al. (Cell, 2014, 159(2):428-39)は、hiPSCからのβ細胞分化の成功に関して報告している（その内容は、参照によりその全体が、特にヒト多能性幹細胞からの機能的ヒトβ細胞の大規模生産のためのそこで概説される方法及び試薬に関して本明細書に組み込まれる）。更に、Vegasらは、ヒト多能性幹細胞からのヒトβ細胞の作製、それに続く宿主による免疫拒絶反応を回避するためのカプセル化について示している（Vegas et al., Nat Med, 2016, 22(3):306-11（その全体が、特にヒト多能性幹細胞からの機能的ヒトβ細胞の大規模生産のためのそこで概説される方法及び試薬に関して参照により本明細書に組み込まれる））。

【0736】

幾つかの実施形態では、インビトロでの分化により遺伝子操作された多能性細胞の集団から遺伝子操作された膵島細胞の集団を作製する方法は、（a）インスリン様増殖因子、トランスフォーミング増殖因子、FGF、EGF、HGF、SHH、VEGF、トランスフォーミング増殖因子βスーパーファミリー、BMP2、BMP7、GSK阻害剤、ALK阻害剤、BMP1型受容体阻害剤、及びレチノイン酸からなる群から選択される1つ以上の因子を含む第1の培養培地で遺伝子操作されたiPSCの集団を培養して、未成熟膵

10

20

30

40

50

島細胞の集団を作製することと、ならびに（b）当該第1の培養培地と異なる第2の培養培地で当該未成熟膵島細胞の集団を培養して、低免疫膵島細胞の集団を作製することを含む。幾つかの実施形態では、GSK阻害剤は、CHIR-99021、その誘導体、またはそのバリエーションである。幾つかの例では、GSK阻害剤は、約2mM～約10mMの範囲の濃度である。幾つかの実施形態では、ALK阻害剤は、SB-431542、その誘導体、またはそのバリエーションである。幾つかの例では、ALK阻害剤は、約1pM～約10pMの範囲の濃度である。幾つかの実施形態では、第1の培養培地及び／または第2の培養培地は、動物血清を含まない。

【0737】

当該技術分野において公知のように、分化は、通常、限定されるものではないが、インスリンが含まれる、β細胞関連または特異的マーカーの存在を評価することにより分析される。分化は、糖代謝の測定など、機能的にも測定され得る。一般に、Muraro et al., Cell Syst. 2016 Oct 26; 3(4): 385-394 . e3（参照によりその全体が、特にそこで概説されるバイオマーカーに関して本明細書に組み込まれる）を参照のこと。β細胞が作製されたら、（細胞懸濁液としての、または本明細書において述べるようなゲルマトリックス中の）それらは、門脈／肝臓、大網、胃腸粘膜、骨髄、筋肉、または皮下嚢に移植され得る。

【0738】

本技術に使用されるものが含まれる、膵島細胞の追加の説明は、WO2020/018615（その開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる）に見出される。

【0739】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたβ膵島細胞、例えば、1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）から単離された初代β膵島細胞、または1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）に由来するiPSCから分化した内皮細胞の集団は、培養下で維持され、幾つかの例では、投与前に増殖される。ある特定の実施形態では、遺伝子操作されたβ膵島細胞の集団は、投与前に凍結保存される。

【0740】

例示的な膵島細胞の種類としては、限定されるものではないが、膵島前駆細胞、未成熟膵島細胞、成熟膵島細胞などが挙げられる。本明細書に記載される幾つかの実施形態では、膵臓細胞は、糖尿病を処置するために対象に投与される。

【0741】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される遺伝子操作された膵島細胞、例えば、1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）から単離された初代β膵島細胞、または1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）に由来するiPSCから分化したβ膵島細胞は、インスリンを分泌する。幾つかの実施形態では、膵島細胞は、内在性膵島細胞の少なくとも2つの特徴、例えば、限定されるものではないが、グルコースに応答したインスリンの分泌、及びβ細胞マーカーの発現を示す。

【0742】

例示的なβ細胞マーカーまたはβ細胞前駆細胞マーカーとしては、限定されるものではないが、c-ペプチド、Pdx1、グルコース輸送体2（Glut2）、HNF6、VEGF、グルコキナーゼ（GCK）、プロホルモン転換酵素（PC1/3）、Cdcpl、NeuroD、Ngn3、Nkx2.2、Nkx6.1、Nkx6.2、Pax4、Pax6、Ptf1a、Isl1、Sox9、Sox17、及びFoxA2が挙げられる。

【0743】

幾つかの実施形態では、膵島細胞、例えば、1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）から単離された初代β膵島細胞、または1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）に由来するiPSCから分化したβ膵島細胞は、グルコースの増加に応答してインスリンを産生する。種々の実施形態では、膵島細胞は、グルコースの増加に応答してインスリンを分泌する。幾つかの実施形態では、細胞は、特徴的な形態、例えば、数石状細胞形態及び／または約17pm～約25pmの直径を有する。

10

20

30

40

50

【0744】

幾つかの実施形態では、本技術は、免疫寛容誘導因子（例えば、CD47）を過剰発現し、1種以上のMHCクラスI分子及び／または1種以上のMHCクラスII分子（例えば、1種以上のMHCクラスIヒト白血球抗原及び／または1種以上のMHCクラスIIヒト白血球抗原）の低減された発現または発現の欠如を有する遺伝子操作されたβ膵島細胞、例えば、1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）から単離された初代β膵島細胞、または1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）に由来するiPSCから分化したβ膵島細胞を対象とする。幾つかの実施形態では、β膵島細胞は、1種以上の補体阻害因子を更に発現する。ある特定の実施形態では、遺伝子操作されたβ膵島細胞は、免疫寛容誘導因子（例えば、CD47）を過剰発現し、B2M遺伝子にゲノム改変を保有する。幾つかの実施形態では、β膵島細胞は、1種以上の補体阻害因子を更に発現する。ある特定の実施形態では、遺伝子操作されたβ膵島細胞は、免疫寛容誘導因子（例えば、CD47）を過剰発現し、B2M遺伝子にゲノム改変を保有する。幾つかの実施形態では、β膵島細胞は、免疫寛容誘導因子（例えば、CD47）を過剰発現し、B2M及びCIITA及び遺伝子のうちの1つ以上を破壊するゲノム改変を保有する。

10

【0745】

幾つかの実施形態では、提供される遺伝子操作されたβ膵島細胞は、免疫認識を回避する。幾つかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子操作されたβ膵島細胞、例えば、1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）から単離された初代β膵島細胞、または1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）に由来するiPSCから分化したβ膵島細胞は、患者（例えば、投与された際のレシピエント）において免疫応答を活性化しない。障害を処置する必要がある対象（例えば、レシピエント）または患者に本明細書に記載される遺伝子操作されたβ膵島細胞の集団を投与することにより障害を処置する方法が提供される。

20

【0746】

幾つかの実施形態では、投与される細胞の量は、免疫原性細胞（例えば、同じか、または類似の細胞種または表現型であるが、遺伝子操作された細胞の改変、例えば、遺伝子改変を含まない、例えば、内在性レベルの及び1種以上のMHCクラスI分子及び／または1種以上のMHCクラスII分子の発現を有する細胞の集団）で必要とされるよりも低い投与量である。

30

【0747】

b. 肝実質細胞

細胞療法製品に使用される肝実質細胞は、細胞療法製品の製造プロセスの任意の段階でドナー能力についてプロファイリングされ得る。

【0748】

細胞療法製品に使用される肝実質細胞は、初代肝実質細胞であり得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、（例えば、ゲノム編集された）初代肝実質細胞を使用して実行され得る。

【0749】

本明細書の他箇所で記載されるように、細胞療法製品に使用される肝実質細胞は、多能性幹細胞（iPSC）に由来する肝実質細胞であり得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、分化して、肝実質細胞を形成することができる幹細胞でも実行され得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、幹細胞に由来する（例えば、ゲノム編集された）肝実質細胞でも実行され得る。

40

【0750】

細胞療法に使用される場合の肝実質細胞の望ましい特徴に関するある特定の情報が含まれる、本開示の文脈において参照される肝実質細胞に関する関連情報は、当該技術分野において公知であり、例えば、WO2022081760、WO2022164807A2

50

、WO2016200340A1（その内容は参照により本明細書に組み込まれる）に見出され得る。本明細書に記載される肝実質細胞に関する実施形態は、HIP細胞（例えば、MHCクラスI及び／またはMHCクラスII分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現ならび少なくとも1種の免疫寛容誘導因子の増強された発現を示す）を記載している実施形態、ならびに安全スイッチ、及び本明細書に記載されるような他の改変／遺伝子編集された細胞を記載している実施形態と容易かつ適切に組み合わせられ得ることが理解されよう。細胞療法製品に使用される肝実質細胞は、細胞療法製品を製造する間の編集プロセスの任意の段階でドナー能力についてプロファイリングされ得る。

【0751】

本明細書に記載される肝実質細胞は、対象の疾患を処置または予防するために使用され得る。

10

【0752】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供されるような遺伝子操作または改変されている細胞は、初代肝実質細胞である。幾つかの実施形態では、初代肝実質細胞は、1人以上の個別のドナー対象、例えば、1人以上の個別の健常なドナー（例えば、疾患または感染症について知られていないか、またはそれを疑われていない、例えば、その臨床徴候を示さない対象）から単離または採取される。当業者によって理解されるように、個体から肝実質細胞を単離または採取する方法は、公知の技術を使用して達成され得る。本明細書において、対象（例えば、レシピエント）へのその後の移植（transplantation）または移植（engraftment）のための、本明細書に記載される改変（例えば、遺伝子改変）を含有する遺伝子操作された初代肝実質細胞が提供される。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された初代肝実質細胞は、肝実質細胞機能の喪失または肝硬変に対処するために、細胞療法として投与され得る。

20

【0753】

幾つかの実施形態では、初代肝実質細胞は、対象または個体から取得される（例えば、収集されるか、抽出されるか、取り出されるか、または採取される）。幾つかの実施形態では、初代肝実質細胞は、肝実質細胞が1人以上の対象（例えば、1人以上の健常なヒトが含まれる、1人以上のヒト）に由来するように、肝実質細胞のプールから作製される。幾つかの実施形態では、初代肝実質細胞のプールは、1～100人、1～50人、1～20人、1～10人、1人以上、2人以上、3人以上、4人以上、5人以上、10人以上、20人以上、30人以上、40人以上、50人以上、または100人以上の対象に由来する。幾つかの実施形態では、ドナー対象は、患者（例えば、治療細胞を投与されるレシピエント）と異なる。幾つかの実施形態では、肝実質細胞のプールは、患者由来の細胞を含まない。幾つかの実施形態では、肝実質細胞のプールが採取されるドナー対象のうちの1人以上は、患者と異なる。

30

【0754】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞は、本明細書に記載される改変（例えば、遺伝子改変）を含有し、肝実質細胞に分化している遺伝子操作されたiPSCから分化した肝実質細胞である。当業者によって理解されるように、分化の方法は、目的の細胞種に依存し、公知の技術を使用する。幾つかの実施形態では、肝実質細胞に分化した細胞は、対象（例えば、レシピエント）へのその後の移植（transplantation）または移植（engraftment）のために使用され得る。幾つかの実施形態では、多能性幹細胞から分化した遺伝子操作された肝実質細胞は、肝実質細胞機能の喪失または肝硬変に対処するために、細胞療法として投与され得る。

40

【0755】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される改変を含有する遺伝子操作された多能性細胞は、肝実質細胞に分化される。遺伝子操作された多能性細胞を肝実質細胞に分化させるために使用され得る多数の技術が存在する。例えば、Pettinato et al., doi:10.1038/spre32888, Snykers et al., Methods Mol Biol., 2011 698:305-314, Si-Tay

50

eb et al., *Hepatology*, 2010, 51:297-305、及び A
sgari et al., *Stem Cell Rev.*, 2013, 9(4):49
3-504 (これらの全ては、それらの全体が、かつ特に分化のための方法及び試薬につ
いて参照により本明細書に組み込まれる)を参照のこと。当該技術分野において公知のよ
うに、分化は、通常、限定されるものではないが、アルブミン、 α フェトプロテイン、及
びフィブリノゲンが含まれる、肝細胞関連マーカー及び／または特異的マーカーの存在を
評価することにより分析され得る。分化は、アンモニアの代謝、LDL貯蔵及び取り込み
、ICG取り込み及び放出、ならびにグリコーゲン蓄積など、機能的に測定することもで
きる。

【0756】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された肝実質細胞、例えば、1人以上の個別のドナ
ー（例えば、健常なドナー）から単離された初代肝実質細胞、または1人以上の個別のド
ナー（例えば、健常なドナー）に由来するiPSCから分化した肝実質細胞の集団は、培
養下で維持され、幾つかの例では、投与前に増殖される。ある特定の実施形態では、肝実
質細胞の集団は、投与前に凍結保存される。

【0757】

幾つかの実施形態では、本技術は、免疫寛容誘導因子（例えば、CD47）を過剰発現
し、1種以上のMHCクラスI分子及び／または1種以上のMHCクラスII分子（例え
ば、1種以上のMHCクラスIIヒト白血球抗原及び／または1種以上のMHCクラスII
ヒト白血球抗原）の低減された発現または発現の欠如を有する遺伝子操作された肝実質細
胞、例えば、1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）から単離された初代肝実
質細胞、または1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）に由来するiPSCか
ら分化した肝実質細胞を対象とする。

【0758】

幾つかの実施形態では、提供される遺伝子操作された肝実質細胞は、免疫認識を回避す
る。幾つかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子操作された肝実質細胞、例え
ば、1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）から単離された初代肝実質細胞、ま
たは1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）に由来するiPSCから分化した
肝実質細胞は、患者（例えば、投与された際のレシピエント）において免疫応答を活性化
しない。障害を処置する必要がある対象（例えば、レシピエント）または患者に本明細書
に記載される遺伝子操作された肝実質細胞の集団を投与することにより障害を処置する方
法が提供される。

【0759】

本明細書において開示される実施形態で使用される細胞は、肝実質細胞、例えば、肝実
質細胞の集団であり得る。下記での「細胞」、例えば、「肝実質細胞」への任意の言及は
、本出願に記載される「細胞集団」、例えば、「肝実質細胞の集団」にも適用されることが
理解されよう。

【0760】

肝実質細胞は、肝臓の主要な機能細胞である。肝実質細胞は中心静脈の周囲に密集して
おり、門脈三管（胆管、肝静脈、及び肝動脈からなる）が小葉の端に見出される。肝実質
細胞が小葉内の大部分の細胞を構成するが、幾つかの他の細胞種が、導管及び血管のネッ
トワークの形成ならびに器官の免疫監視に重要である。肝臓における他の主要な細胞種と
しては、胆管の細胞（胆管細胞）、肝類洞内皮細胞、血管系内皮細胞、ピット細胞、クッ
パー細胞が含まれる免疫細胞、及び肝星細胞が挙げられる。肝実質細胞は、中心静脈また
は小葉の端に存在する門脈三管に対するそれらの近接度により決定される肝小葉内の3つ
の異なる領域に分布する。異なる領域の肝実質細胞は、異なるニッチ環境に曝露されてお
り、肝臓において特定の機能的役割を果たす。それらは、異なるマーカーの発現、グルコ
ース及び脂質代謝機能により区別され得る。

【0761】

肝実質細胞は、驚くべき数の代謝機能、内分泌機能、及び分泌機能を果たす。肝臓の質

10

20

30

40

50

量のおよそ80%が肝実質細胞によりもたらされる。肝実質細胞の機能は、グルコース貯蔵、イオン取り込み、胆汁酸塩分泌、アミノ酸代謝機能、尿素合成、及び薬物代謝機能検査により評価され得る。

【0762】

用語「肝実質細胞」は、一般に、肝臓の細胞量の70~80%を構成する細胞の一種を指す。肝実質細胞は、タンパク質合成、炭水化物のタンパク質貯蔵及び変換、コレステロール、胆汁酸塩、及びリン脂質の合成、ならびに外来性及び内在性物質の解毒、修飾、及び排泄に関与する。肝実質細胞は胆汁の形成及び分泌も起こす。肝実質細胞は、血清アルブミン、フィブリノゲン、及び凝固因子のプロトロンビン群を生成し、リポタンパク質、セルロプラスミン、トランスフェリン、補体、及び糖タンパク質の合成の主要な部位である。加えて、肝実質細胞は、薬物及び殺虫剤などの外来性化合物、ならびにステロイドなどの内在性化合物を代謝、解毒、不活性化する能力を有する。

10

【0763】

肝実質細胞の薬物代謝機能は、チトクロームP450 (CYP) により媒介される。CYPは、ほとんどの薬物の酸化的生体内変換を触媒することができる主要な酵素ファミリーを構成する。90%の薬物が6つの主要なCYPにより代謝される (CYP3A4/5、CYP2C9、CYP2C19、CYP1A2、CYP2B6、及びCYP2D6)。CYPの機能は、特定の薬物による誘導により増強され得る。CYPの機能及び薬物による誘導応答は、研究室で作られた肝実質細胞の機能的成熟度を評価するために使用される主要な重要基準である。種々の方法を使用して胚組織及び胎児組織から肝実質細胞が誘導されてきたが、6つの主要なCYPの活性及び薬物による誘導に対するそれらの応答により決定されるこれらの肝実質細胞の成熟度及び機能は、それらが機能的に未成熟であることを示した。従って、当該技術分野において公知の肝実質細胞誘導の現行の方法は、産業用途及び臨床用途の両方のために多数の機能的に成熟した肝実質細胞を得るという問題を解決しない。

20

【0764】

本明細書において開示される細胞集団は、肝実質細胞及び／または肝実質細胞前駆細胞を含み得る。幾つかの例では、細胞集団は、肝実質細胞及び／または肝実質細胞前駆細胞が高度に濃縮されていてもよい。「高度に濃縮された」は、関心対象の細胞種 (複数可) が細胞組成のうちの70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、例えば、細胞組成の約95%以上、または98%以上となることを意味する。換言すれば、集団は、関心対象の細胞種 (複数可) の実質的に純粋な組成物であり得る。幾つかの例では、関心対象の細胞集団としては、粗製の調製物が挙げられ得る。幾つかの例では、細胞集団は、濾過されたか、または濾過されてない解離組織から調製され得る。肝実質細胞及び／または肝実質細胞前駆細胞を含有する細胞集団は、例えば、単離及び／または調製の方法に応じて、限定されるものではないが、例えば、肝非実質細胞 (NPC)、非肝実質細胞肝臓関連細胞 (例えば、星細胞、クッパー細胞、内皮細胞、胆管細胞など)、免疫細胞 (例えば、WBC)、RBCなどが含まれる、様々な非肝実質細胞の細胞種を含んでもよく、または含まなくてもよい。幾つかの例では、細胞集団は、肝実質細胞及び／または肝実質細胞前駆細胞の純粋なまたは本質的に純粋な調製物であり得る。

30

40

【0765】

本明細書において開示される肝実質細胞は、肝臓の新生細胞供給源から得られ得る。

【0766】

インビボにおいて、肝臓は、人体の最も再生能力の高い器官の1つである。ヒト肝臓は、その質量の最大2/3を失っても、その重要な機能を維持し、8~15日以内に元の質量に回復することができる。研究により、部分的な肝切除からの回復において、胆管細胞を含め、肝臓の全ての領域の肝細胞が増殖することが示されている。最近の系列追跡実験により、正常な肝臓恒常性及び肝臓損傷の両方における増殖性肝実質細胞が、肝臓の異なる領域、中心静脈または門脈三管の近くに同定された。肝実質細胞以外にも、損傷において損なわれた肝実質細胞を補充することができる増殖性細胞の候補が胆管領域に同定され

50

た。従って、本明細書において開示される肝実質細胞は、成体ヒト肝臓からの成体肝幹細胞の単離により取得され得る。

【0767】

肝幹細胞が多細胞起源であることは、肝臓から幹細胞を単離及び抽出するために異なる方法が使用され得ることを示唆する。臨床効果をもたらすための損傷肝臓における意味のある再増殖ために、肝臓幹細胞を成功裡に単離し、増殖させ、更にそれらを機能的肝実質細胞に分化させる能力は、肝幹細胞生物学者の最優先事項になった。現在まで、2つのグループが、インビトロで安定的に長期間増殖することができる幹細胞の成体肝組織からの単離を報告している。しかしながら、これらの幹細胞に由来する肝実質細胞は、機能的に未成熟であり、臨床用途及び産業用途に使用するのに適していない。

10

【0768】

幾つかの実施形態では、分化した肝実質細胞は、健常ヒトから単離された肝幹細胞から、またはiPSCから分化している。

【0769】

肝幹細胞またはiPSCは、健常な患者から得られ得る。

【0770】

幾つかの実施形態では、肝実質細胞または肝実質細胞集団は、例えば、ヒト肝臓などの1つ以上の哺乳動物肝臓から調製され得る。幾つかの例では、細胞集団もしくは複数の細胞集団、または遺伝子操作された細胞、例えば、複数の細胞集団のうちの1つの集団の全ての遺伝子操作された細胞は、全てが単一のヒト肝臓、例えば、単一の死体ドナー肝臓に由来し得るか、またはそれから調製され得る。細胞集団の細胞は、全てが1つの種（例えば、ヒト、マウス、ラット、ブタ、NHPなど）の細胞であり得るか、または2つ以上の種の混合物（すなわち、異種混合物）であり得る。肝臓の供給源は異なり、供給源としては、限定されるものではないが、例えば、切除された肝臓組織、ヒト死体肝臓、キメラ（例えば、ヒト化）肝臓、バイオリアクターによる肝臓などが挙げられ得る。細胞集団は、肝臓全体及び肝臓の一部が含まれる、肝臓から、任意の便利な方法、例えば、限定されるものではないが、例えば、解離、灌流、濾過、選別などにより、及び／またはそれを含む、調製され得る。幾つかの例では、細胞集団の全てまたは本質的に全ての肝実質細胞またはヒト肝実質細胞は、単一ドナーの肝臓または単一ドナーの肝臓の一部に由来し得る。幾つかの例では、細胞集団の全てまたは本質的に全ての肝実質細胞またはヒト肝実質細胞は、複数の異なるドナー肝臓または複数の異なるドナー肝臓の一部に由来し得る。幾つかの例では、例えば、単一ヒトドナーの肝臓から採取された初代ヒト肝細胞が、例えば、複数の対象を処置するのに有用な、複数の細胞集団を作製するために、何倍にも（2倍以上、5倍以上、10倍以上、20倍以上、50倍以上、100倍以上などが含まれる）増殖される場合を含め、複数の細胞集団は、単一ドナーの肝臓に由来し得る。

20

30

【0771】

幾つかの例では、肝実質細胞または肝実質細胞細胞集団は、培養された肝実質細胞及び／または培養された肝実質細胞前駆細胞から調製され得る。幾つかの例では、細胞集団は、例えば、初代ヒト肝実質細胞（PHH）を含むヒト肝臓から調製された細胞集団が含まれる、初代肝細胞調製物から調製され得る。ある特定の実施形態では、細胞集団は、例えば、ヒトドナーから、任意の供給源のための標準的な技術を使用して単離された肝実質細胞を含み得る。ある特定の実施形態では、肝実質細胞は、新鮮なPHHまたは凍結保存されたPHHが含まれる、スクリーニングされた死体ドナーから単離されたPHHである。幾つかの例では、細胞集団のPHHは、肝臓からの単離以降、細胞周期／分裂を経ていないか、または限定されるものではないが、例えば、1回以下、2回以下、3回以下、4回以下、5回以下、6回以下、7回以下、8回以下、9回以下、10回以下の周期／分裂が含まれる、最小限の回数の細胞周期／分裂を経ていない。

40

【0772】

幾つかの例では、肝実質細胞及び／または肝実質細胞前駆細胞を含有する細胞集団は、不死化細胞株ではないか、または別様に本質的に永続的に増殖される細胞株ではない細胞

50

から調製され得る。例えば、細胞集団の肝実質細胞及び／または肝実質細胞前駆細胞は、例えば、初代肝細胞の不死化されていない後代が含まれる、初代肝細胞及び初代肝細胞の後代に由来し得る。

【0773】

幾つかの例では、細胞集団は、肝実質細胞前駆細胞を含んでもよく、または特定の含まなくてもよい。本明細書で使用する場合、用語「肝実質細胞前駆細胞」及び「肝実質細胞の前駆細胞」などは、一般に、肝実質細胞が由来する細胞及び／または肝実質細胞に分化する細胞を指す。幾つかの例では、肝実質細胞前駆細胞は、分化が決定された前駆細胞であり得、これは、その前駆細胞が本質的に肝実質細胞のみに分化することを意味する。幾つかの例では、肝実質細胞前駆細胞は、異なる潜在的能力を有し得、例えば、多能性、多分化能性、または全能性前駆細胞であり得る。肝実質細胞前駆細胞は、幹細胞、人工多能性幹細胞（iPSC）、胚性幹細胞（ES）、肝実質細胞様細胞（HLC）などを含み得るか、またはそれに由来し得る。幾つかの例では、肝実質細胞前駆細胞は、例えば、肝実質細胞の脱分化及び／または他の肝細胞種もしくは非肝細胞種の分化転換により、成熟肝実質細胞及び／または他の非肝実質細胞から誘導され得る。

【0774】

肝実質細胞の増殖された細胞集団が含まれる、肝実質細胞または肝実質細胞集団もしくは亜集団（本明細書において開示される）は、例えば、単一ドナーから採取された複数の個々の肝実質細胞または複数のドナーから採取された複数の個々の肝実質細胞が含まれる、複数の個々の細胞に由来し得るか、かまたはその子孫であり得る。初代細胞の集団が単一ドナーに由来する場合、かかる複数の個々の細胞は、本質的に同じドナーゲノムを共有するが、しかしながら、クローンに由来せず、モノクローナルではなく、場合によっては、例えば、異なる遺伝的変異、異なるエピジェネティクス変異、ドナー肝臓における異なるゾーニング、遺伝子発現の差異などが含まれる、互いにある特定の差異を有し得る。従って、クローンに由来する細胞集団とは対照的に、単一のドナーまたは複数のドナーに由来する初代肝実質細胞が含まれる、複数の個々の初代肝実質細胞から増殖された細胞集団は、非モノクローナルと称され得るか、または場合によっては、かかる増殖された細胞は、ポリクローナルと称され得るか、もしくはクローン増殖されていないと言われる。幾つかの例では、本開示の遺伝子改変は、遺伝子操作された肝実質細胞の非モノクローナル集団を作製するために、個々の初代肝実質細胞（またはその後代）の集団に対して実行され得、かかる細胞は、遺伝子操作された非モノクローナル肝実質細胞の増殖された集団を作製するために増殖され得る。幾つかの例では、肝実質細胞の集団は、本質的にポリクローナルな集団を作製するために増殖され得、その後に遺伝子操作された非モノクローナル肝実質細胞の増殖された集団を作製するために遺伝子改変される。

【0775】

細胞療法に使用される場合の肝実質細胞の幾つかの望ましい特徴が本明細書に記載される。

【0776】

幾つかの実施形態では、肝実質細胞及び／または肝実質細胞前駆細胞、及び／またはかかる肝実質細胞及び／または肝実質細胞前駆細胞が由来する肝臓、対象、及び／または細胞培養物は、健常な肝実質細胞及び／または肝実質細胞前駆細胞であり得る。本明細書で使用する場合、「健常な肝実質細胞及び／または肝実質細胞前駆細胞」は、細胞は、WO 2022/164807 A2（その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるような、正常な肝臓及び／または肝実質細胞に付随する機能における機能的及び／または遺伝的な欠損または異常、あるいはそれに影響を及ぼすであろう機能的及び／または遺伝的な欠損または異常を本質的に含まない正常な肝実質細胞表現型及び／または遺伝子型を示すことを意味する。肝実質細胞に付随する機能としては、肝臓の肝実質細胞により主にまたは排他的に実行される機能、例えば、肝臓代謝（例えば、肝実質細胞代謝）、アンモニア代謝、アミノ酸代謝（生合成及び／または異化が含まれる）、解毒、肝臓タンパク質合成（例えば、アルブミン、フィブリノゲン、プロトロンビン、凝固因子（例え

ば、第Ⅴ因子、第ⅤⅠⅠ因子、第ⅠⅩ因子、第Ⅹ因子、第ⅩⅠ因子、及び第ⅩⅠⅠ因子)、プロテインC、プロテインS、アンチトロンビン、リポタンパク質、セルロプラスミン、トランスフェリン、補体タンパク質)が挙げられる。肝実質細胞及び／または肝実質細胞前駆細胞は、本明細書に記載されるような遺伝子改変(複数可)の前、その間、及び／またはその後で健常であり得る。例えば、幾つかの例では、肝実質細胞及び／または肝実質細胞前駆細胞は、例えば、異種導入遺伝子を機能的に組込むため、及び／または細胞の1つ以上の内在性遺伝子座を改変するための、遺伝子改変の前及び後で、健常細胞であり得る。幾つかの例では、肝実質細胞及び／または肝実質細胞前駆細胞は、欠損疾患関連アレルまたは遺伝子座の修正後で健常である。

【0777】

健常な肝実質細胞及び／または肝実質細胞前駆細胞は、通常、限定されるものではないが、例えば、遺伝性胆汁鬱滞性疾患、ウィルソン病、遺伝性ヘモクロマトーシス、チロシン血症、 α 1-アンチトリプシン欠乏症、尿素回路障害、クリグラー-ナジャー症候群、家族性アミロイド多発性神経障害、原発性過シュウ酸尿症1型、非定型溶血性尿毒症症候群-1などが含まれる、肝臓に関連する単一遺伝子疾患に関連する遺伝子異常を保有する細胞を除く。従って、健常な肝実質細胞及び／または肝実質細胞前駆細胞は、肝臓に関連する単一遺伝子疾患に対応する遺伝子座及び／または遺伝子、例えば、限定されるものではないが、例えば、ABCB11(BSEP)、AGXT、ARG、ASL、ASS、ATP7B、ATP8B1(FIC1としても公知)、CFH、CPS、FAH、HAMP、HFE、JAG1、JH、MDR3(ABCB4)、NAGS、OTC、PI、SLC40A1、TFR2、TTR、UGT1A1などに、正常な遺伝子／アレルを有し得る(すなわち、疾患に関連しない遺伝子／アレルを有し得、すなわち、疾患関連遺伝子／アレルを含有しない)。肝臓に関連する単一遺伝子疾患に対応する遺伝子の更なる例及び説明は、Fagioli et al. J Hepatol(2013) 59(3): 595-612(その開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる)に見出される。肝臓に関連する単一遺伝子疾患に関連する1つ以上の遺伝子異常を保有する細胞は、本明細書において「疾患」細胞、「罹患」細胞、「疾患関連」細胞、「機能不全」細胞、または「欠損」細胞などと称され得る。

【0778】

幾つかの実施形態では、本明細書において使用される細胞は、増強された尿素形成能を有する肝実質細胞様細胞である。尿素形成は、細胞が尿素回路を使用してアンモニアを変換して、尿素を生成するプロセスを指す。特定の実施形態では、肝実質細胞様細胞は、インビトロで増強された尿素形成を獲得し、それを示す。尿素形成が改善された肝実質細胞様細胞を開発するためにインビボでの変動的なプロセスに依存する以前の方法とは対照的に、本明細書において提供される細胞は、もう1つの尿素形成促進因子の存在下でのインビトロ分化プロセスの結果として、インビトロで増強された尿素形成を示す。当業者は、主題の肝実質細胞様細胞の増強された尿素形成を移植前に評価することができ、これにより、有利には、既存の方法を使用した肝実質細胞様細胞に関連する潜在的なバッチ間変動が低減される。

【0779】

本明細書で使用する場合、用語「増強された尿素形成能」は、基準と比較して改善された、尿素回路によりアンモニアを尿素に変換する能力を指す。尿素形成は、当該技術分野において公知の任意の好適なアッセイ、例えば、尿素比色アッセイ(例えば、Bioassay SystemsによるQuantichrom Assay Kit)を使用して測定され得る。幾つかの実施形態では、増強された尿素形成能は、参照細胞と比較される。特定の実施形態では、参照細胞は、本明細書において提供される尿素形成促進因子のうちの1つ以上の非存在下で分化した成熟肝実質細胞様細胞である。幾つかの実施形態では、特定の尿素形成促進因子の存在下で分化した成熟肝実質細胞様細胞の増強された尿素形成能は、尿素形成促進因子の非存在下で分化した参照成熟肝実質細胞様細胞と比較して少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50

10

20

30

40

50

%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%、または99%多い尿素形成である。代表的実施形態では、本明細書において提供される主題の成熟肝実質細胞様細胞は、野生型成熟肝実質細胞と同等のレベルの尿素形成を示す。代表的実施形態では、本明細書において提供される主題の成熟肝実質細胞様細胞は、参照野生型成熟肝実質細胞と比較して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%、または99%の尿素形成を示す。

【0780】

幾つかの実施形態では、肝実質細胞様細胞は、アンモニアにより刺激される場合に、尿素形成活性の促進を示す。例えば、肝実質細胞様細胞は、5mMまたは10mMのアンモニアによる刺激後に少なくとも3、4、5、6、8、10、12、15、20、または25nmol/分/10⁶個細胞の尿素形成速度を示す。幾つかの実施形態では、肝実質細胞様細胞は、5mMまたは10mMのアンモニアによる刺激後に3~50nmol/分/10⁶個細胞、3~40nmol/分/10⁶個細胞、3~30nmol/分/10⁶個細胞、4~50nmol/分/10⁶個細胞、4~40nmol/分/10⁶個細胞、4~30nmol/分/10⁶個細胞、5~50nmol/分/10⁶個細胞、5~40nmol/分/10⁶個細胞、5~30nmol/分/10⁶個細胞、6~50nmol/分/10⁶個細胞、6~40nmol/分/10⁶個細胞、6~30nmol/分/10⁶個細胞、8~50nmol/分/10⁶個細胞、8~40nmol/分/10⁶個細胞、8~30nmol/分/10⁶個細胞、10~50nmol/分/10⁶個細胞、10~40nmol/分/10⁶個細胞、10~30nmol/分/10⁶個細胞、12~50nmol/分/10⁶個細胞、12~40nmol/分/10⁶個細胞、12~30nmol/分/10⁶個細胞、15~50nmol/分/10⁶個細胞、15~40nmol/分/10⁶個細胞、15~30nmol/分/10⁶個細胞、20~50nmol/分/10⁶個細胞、20~40nmol/分/10⁶個細胞、または20~30nmol/分/10⁶個細胞の尿素形成速度を示す。

【0781】

幾つかの実施形態では、増強された尿素形成能を有する肝実質細胞様細胞は、1種以上の尿素回路経路酵素の増強された発現を示す。例示的な尿素回路経路酵素としては、限定されるものではないが、カルバモイルリン酸シンテターゼI (CPS1)、オルニチントランスカルバミラーゼ (OTC)、アルギニノコハク酸シンテターゼ (ASS1)、アルギニノコハク酸リアーゼ (ASL)、アルギナーゼ (ARG1)、N-アセチルグルタミン酸シンテターゼ (NAGS)、オルニチントランスロカーゼ (ORN1)、及びシトリンが挙げられる。特定の実施形態では、肝実質細胞様細胞は、以下の尿素回路酵素のうちの1つの発現を示す：CPS1、NAGS、ARG1、ASL、ASS1、またはOTC。幾つかの実施形態では、肝実質細胞様細胞は、1種以上の尿素回路経路酵素の増強されたRNA転写物発現を示す。代表的実施形態では、肝実質細胞様細胞は、1種以上の尿素回路経路酵素の増強されたタンパク質発現を示す。幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、尿素形成促進因子の非存在下で分化した参照成熟肝実質細胞様細胞と比べて少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%、または99%多い量で1種以上の尿素回路経路酵素の増強されたタンパク質発現を示す。幾つかの実施形態では、主題の成熟肝実質細胞様細胞は、参照野生型成熟肝実質細胞と比較して同程度の1種以上の尿素回路経路酵素の発現レベルを示す。代表的実施形態では、主題の成熟肝実質細胞様細胞は、参照野生型成熟肝実質細胞と比較して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%、または99%の1種以上の尿素回路経路酵素の発現レベルを示す。

【0782】

本明細書で使用する場合、「成熟肝実質細胞様細胞」は、限定されるものではないが、アルブミン分泌、α-1アンチトリプシン (A1AT) 分泌、チトクロームp450活性、グリコーゲン合成能及び/または貯蔵能、脂質 (例えば、低密度リポタンパク質 (LD

10

20

30

40

50

L)) 取り込み及び／または貯蔵能、インドシアニンググリーン (I C G) 取り込み及び／または排泄能、ならびに γ -グルタミルトランスペプチド活性が含まれる、成熟肝実質細胞の1つ以上の特徴を示す細胞を指す。代表的実施形態では、本明細書において提供される成熟肝実質細胞様細胞は、増強された尿素形成能、及び本明細書において開示される成熟肝実質細胞の他の特徴のうちの少なくとも1つ以上を示す。代表的実施形態では、主題の成熟肝実質細胞様細胞は、増強された尿素形成能、及び2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の追加の本明細書において開示される成熟肝実質細胞の特徴を示す。

【0783】

幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、アルブミン分泌を示す。幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、尿素形成促進因子の非存在下で分化した参照成熟肝実質細胞様細胞と比べて少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%、または99%多い量でアルブミンを分泌する。代表的実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、参照野生型成熟肝実質細胞（例えば、初代ヒト肝細胞）の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%、または99%のアルブミン分泌レベルを示す。アルブミン分泌は、任意の好適な技術を使用して評価され得、例えば、酵素結合免疫吸着測定法 (E L I S A) 及び免疫組織染色技術が挙げられる（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Wu et al., Cell Stem Cell 14:394-403 (2014) の特にアルブミン分泌評価に関連する部分を参照のこと）。ある特定の実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、アルブミン遺伝子 (A L B) の増強された発現を示す。

【0784】

幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、 α -1アンチトリプシン (A 1 A T) 分泌を示す。幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、尿素形成促進因子の非存在下で分化した参照成熟肝実質細胞様細胞と比べて少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%、または99%多い量でA1ATを分泌する。代表的実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、参照野生型成熟肝実質細胞（例えば、初代ヒト肝細胞）の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%、または99%のA1AT分泌レベルを示す。A1AT分泌は、任意の好適な技術を使用して評価され得、例えば、酵素結合免疫吸着測定法 (E L I S A) 及び免疫組織染色技術が挙げられる（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Wu et al., Cell Stem Cell 14:394-403 (2014) の特にA1AT分泌評価に関連する部分を参照のこと）。ある特定の実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、 α -1アンチトリプシン遺伝子 (S E R P I N A 1) の増強された発現を示す。幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、尿素形成促進因子の非存在下で分化した参照成熟肝実質細胞様細胞と比べて少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%、または99%多い量でS E R P I N A 1 遺伝子を発現する。代表的実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、S E R P I N A 1 遺伝子を発現する参照野生型成熟肝実質細胞（例えば、初代ヒト肝細胞）の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%、または99%のA1AT分泌レベル。

【0785】

幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、凝固第V因子分泌を示す。幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、尿素形成促進因子の非存在下で分化した参照成熟肝実質細胞様細胞と比べて少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%、または99%多い量で第V因子を分泌する。代表的実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、参照野生型成熟肝実質細胞（例えば、初代ヒト肝細胞）の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%、または99

%の第Ⅴ因子分泌レベルを示す。第Ⅴ因子分泌は、任意の好適な技術を使用して評価され得、例えば、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）及び免疫組織染色技術が挙げられる。ある特定の実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、凝固第Ⅴ因子遺伝子（F5）の増強された発現を示す。

【0786】

幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、グリコーゲン合成能及び／または貯蔵能を示す。幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、尿素形成促進因子の非存在下で分化した参照成熟肝実質細胞様細胞と比べて少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%、または99%高いグリコーゲン合成能及び／または貯蔵能を示す。代表的実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、参照野生型成熟肝実質細胞（例えば、初代ヒト肝細胞）の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%、または99%のレベルのグリコーゲン合成能及び／または貯蔵能を示す。グリコーゲン合成能及び／または貯蔵能は、例えば、免疫組織染色技術を使用して評価され得る（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Duet al., Cell Stem Cell 14:394-403 (2014) の特にグリコーゲン合成能及び／または貯蔵能の評価に関連する部分を参照のこと）。

10

【0787】

幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、脂質（例えば、VLDL、LDL、及びHDL）取り込み及び／または貯蔵能を示す。特定の実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、低密度リポタンパク質（LDL）取り込み及び／または貯蔵能を示す。幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、尿素形成促進因子の非存在下で分化した参照成熟肝実質細胞様細胞と比べて少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%、または99%多い脂質取り込み及び／または貯蔵能を示す。代表的実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、参照野生型成熟肝実質細胞（例えば、初代ヒト肝細胞）の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%、または99%の脂質取り込み及び／または貯蔵レベルを示す。

20

【0788】

幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、ICG取り込み及び／または排泄能を示す。幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、尿素形成促進因子の非存在下で分化した参照成熟肝実質細胞様細胞と比べて少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%、または99%多いICG取り込み及び／または排泄を示す。代表的実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、参照野生型成熟肝実質細胞（例えば、初代ヒト肝細胞）の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%、または99%の脂質取り込み及び／または貯蔵レベルを示す。脂質取り込み／貯蔵能ならびにICG取り込み及び／または排泄能は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Huang et al., Cell Stem Cell 14:370-384 (2014)、及びWang et al., Cell Stem Cell 19:449-461 (2016) の特にICG活性評価に関連する部分に記載されるような免疫組織染色技術を使用して評価され得る。

30

40

【0789】

幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、チトクロームp450活性を示す。かかる細胞は、CYP1A1、CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2B6、CYP2D6、CYP3A4、及び／またはCYP3A7が含まれる、1つ以上のチトクロームp450ファミリーメンバーの活性を示し得る。ある特定の実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、1つ以上のチトクロームp450ファミリーメンバーの遺伝子またはタンパク質発現を示す。幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、参照野生型成熟肝実質細胞（例えば、初代ヒト肝細胞）の少なくとも50%、55%、60%、

50

65%、70%、75%、85%、90%、95%、または99%のチトクロームp450活性レベルを示す。チトクロームp450活性は、核酸定量分析技術（例えば、qPCR）、発光アッセイ（例えば、Kim et al., Biomol Ther: 23 (5): 486-492 (2015)、及びP450-Gloアッセイキット、Promegaを参照のこと）、または液体クロマトグラフィー／質量分析技術（例えば、Duet al., Cell Stem Cell 14: 394-403 (2014)、及びLahoz et al., Methods in Molecular Biology 806: 97-97 (2012)を参照のこと）（これらの全ての特にチトクロームp450活性評価に関連する部分が参照により本明細書に組み込まれる）を使用して測定され得る。

10

【0790】

幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、アジア糖タンパク質受容体発現（例えば、ASGR1及び／またはASGR2発現）を示す。代表的実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、参照野生型成熟肝実質細胞（例えば、初代ヒト肝細胞）の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%、または99%のアシア糖タンパク質受容体発現レベルを示す。

【0791】

幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、αフェトプロテイン（AFP）発現を示す。代表的実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、参照野生型成熟肝実質細胞（例えば、初代ヒト肝細胞）の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%、または99%のαフェトプロテイン発現レベルを示す。

20

【0792】

幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、γ-グルタミルトランスぺプチダーゼ活性を示す。代表的実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、参照野生型成熟肝実質細胞（例えば、初代ヒト肝細胞）の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%、または99%のγ-グルタミルトランスぺプチダーゼ活性レベルを示す。γ-グルタミルトランスぺプチダーゼ活性は、例えば、免疫組織染色技術を使用して評価され得る（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Woo et al., Gastroenterology 42: 602-611 (2012)の特にγ-グルタミルトランスぺプチダーゼ活性の評価に関連する部分を参照のこと）。

30

【0793】

幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、SOX9発現を示す。代表的実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、参照野生型成熟肝実質細胞（例えば、初代ヒト肝細胞）の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%、または99%のSOX9発現レベルを示す。幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、参照野生型成熟肝実質細胞と比較して増強されたSOX9発現を示す。

【0794】

幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、I型細胞骨格ケラチン18（KRT18）発現を示す。幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、参照野生型成熟肝実質細胞（例えば、初代ヒト肝細胞）の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%、または99%のKRT18発現レベルを示す。幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、参照野生型成熟肝実質細胞と比較して増強されたKRT18発現を示す。

40

【0795】

幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、HNF4A（例えば、HNF4a及びHNF4α）発現を示す。幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、参照野生型成熟肝実質細胞（例えば、初代ヒト肝細胞）の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%、または99%のHNF4A発現レベルを示す。幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、参照野生型成熟肝実質細胞と比較して増強されたHNF4A発現を示す。

50

【0796】

幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、G6PC発現を示す。幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、参照野生型成熟肝実質細胞（例えば、初代ヒト肝細胞）の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%、または99%のG6PC発現レベルを示す。幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、参照野生型成熟肝実質細胞と比較して増強されたG6PC発現を示す。

【0797】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される分化した肝実質細胞は、肝実質細胞マーカーであるHNF4a、ALB、CYP2C9の発現を特徴とし、終末分化マーカーPEPCK1を発現し得る。密着結合マーカーであるZO1は、分化した細胞の間に発現され得る。幾つかの実施形態では、分化した肝実質細胞は、CYP3A4、CYP2C9、CYP2B6、CYP1A2、CYP1A1、CYP2D6、CYP3A7、及びCYP2E1が含まれる、機能的CYP酵素も発現し得る。分化した肝実質細胞は、機能的糖代謝（グリコーゲン合成及び貯蔵についてのPAS染色により測定される）、機能的脂質代謝（低密度リポタンパク質（LDL）取り込みアッセイにより測定される）、インドシアニングリーン（ICG）取り込み、及びアルブミン分泌が含まれる、成熟肝実質細胞の他の特徴を示し得る。ICG取り込みは、肝機能の診断に使用される医学的診断検査であり、肝実質細胞が肝実質細胞の内外にイオンを輸送するための機能的な輸送体機能を有することを示すために使用される。

【0798】

本明細書において開示される肝実質細胞は、肝臓の化合物代謝活性の大部分を占める主要なCYPであるCYP1A2、CYP3A4、CYP2B6、及びCYP2C9の代謝機能を示し得る。より重要なことに、肝実質細胞は、リファンピシンなどの公知のCYP誘導薬物に対して応答性であり得る。

【0799】

幾つかの実施形態では、分化した肝実質細胞は、以下の特徴のうちの少なくとも1つを含む：

- (i) マーカーであるHNF4a及びALBの発現する；
- (ii) CYP3A4、CYP2C9、CYP2B6、CYP1A2、CYP1A1、CYP2D6、CYP3A7、及びCYP2E1から選択されるCYP酵素のうちの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、または8つを発現する；
- (iii) 以下の機能のうちの少なくとも1、2、または3つを有する：a) 機能的糖代謝；b) 機能的脂質代謝；c) 機能的アルブミン分泌；
- (vi) インドシアニングリーン（ICG）取り込み；
- (vii) ならびに上皮を形成するのに十分な条件下で他の分化した肝実質細胞と共に培養される場合に密着結合を形成する。

【0800】

分化した肝実質細胞は、終末分化マーカーであるPEPCK1またはTATのうちの少なくとも1つも発現し得る。分化した肝実質細胞は、CYP3A4、CYP2C9、CYP2B6、CYP1A2、CYP1A1、CYP2D6、CYP3A7、及びCYP2E1から選択されるCYPのうちの少なくとも2、3、または4つについて誘導性CYP機能を有する。分化した肝実質細胞は、グリコーゲンを貯蔵することもでき、低密度リポタンパク質を取り込むこともできる。かかる肝実質細胞の特性は、WO2016200340A1（その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【0801】

ヒト肝幹細胞の単離及び長期培養は、WO2016200340A1（その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるように、以下の方法により実行され得る。

【0802】

WO2016200340A1における「材料及び方法」の説明：

【0803】

コラゲナーゼ消化溶液：10mMのHEPES、5%のFBS（Cloneteck）、2mg/mlのコラゲナーゼ（Sigma、C-5138）を含有するDEME/F12（Gibco）。コラゲナーゼ溶液を37摂氏温度に温め、コラゲナーゼが溶解した後、0.2ミクロンのフィルターを通して濾過滅菌する。この培地を新鮮なものと交換する（コラゲナーゼは高温及び長時間の経過で不活性化する）。

【0804】

洗浄溶液：10mMのHEPES（Gibco）、100U/mlのPen/Strep（Gibco）、100μg/mlのゲンタマイシン（Gibco）を含有するDEME/F12培地（溶液を0.2ミクロンのフィルターを通して濾過滅菌する）。

10

【0805】

コーティング媒体：Advanced F12/DMEM低血清培地（Gibco）で希釈した10%の増殖因子低減マトリゲル（Corning）。

【0806】

肝幹細胞培養培地：Advanced F12/DMEM低血清培地（1:1）（Gibco、12643）、10mMのHEPES（Gibco）、100U/mlのPen/Strep（Gibco）、2mMのL-グルタミン（Gibco）、1%のN2（Gibco）、2%のB27（Gibco）、50ng/mlのEGF（Millipore）、250ng/mlのR-スポンジン1（R&D）、2μMのSB431542（Tocris）、1μMのJagged-1（188-204）（Anaspec）、2μMのT3（3,3',5-トリヨード-L-サイロニン）（Sigma）、0.1μMのコレエントキシシン（Sigma）、10mMのニコチンアミド（Sigma）、1.25μMのN-アセチル-L-システイン（NAC）（Sigma）。

20

【0807】

WO2016200340A1に記載されるようなフィーダー細胞の調製：1. プレートは10%のマトリゲルでコーティングされ得る。マトリゲルは、Advanced F12/DMEM基礎培地で希釈され得る。プレートをコーティングした後、プレートは、37℃のインキュベーターで30分間保存され得る。2. 7×10^6 個細胞/バイアルを含有するバイアルが、各ウェルが2mLの培地を含有する3つの6ウェルプレートで解凍され得る。細胞は、ウォーターバスで素早く解凍され得、層流フードにそれらを持ち込む前に70%のアルコールで拭き取られ得る。細胞が50mLのチューブに添加され得、細胞を希釈するために暖かい培地が一滴ずつ添加された。3. 細胞を均一に分散させるために、プレートがインキュベーター内で振盪され得る（左右×2及び前後×2）。4. フィーダーは2日目に使用され得る。

30

【0808】

肝幹細胞は、新鮮なヒト肝臓組織から単離され得る。科学的目的での肝実質細胞調製のためのヒト肝臓試料の使用は、施設内倫理委員会（IRB）及び人を対象とする研究倫理審査委員会により承認された。正常な肝臓試料は、移植用のドナー肝臓から採取され得る。硬変肝臓試料は、移植用のレシピエント肝臓から採取され得る。組織は、切断され、小片に切り刻まれ、コラゲナーゼ溶液で消化され得る。消化された細胞は、肝幹細胞培養培地中に懸濁され得る。細胞はプールされ、フィーダー細胞と共に組織培養プレートにプレーティングされ、付着させられ得る。7～10日後、細胞は採取され、単一細胞として再懸濁され、フィーダー上にプレーティングされ得る。肝幹細胞コロニーは3日後に現れ始め得る。細胞は、長期間培養のために7～10日毎に継代培養され得る。培養培地は2日おきに交換され得る。

40

【0809】

単一細胞に由来する細胞株は、継続的培養用にフィーダー上の単一コロニーを採取することにより作製され得る。継代初期肝幹細胞が単一細胞に消化され、フローサイトメトリーにより回収され得る。選別された単一細胞は、96ウェルプレートで培養され、増殖のために48、24、及び6ウェルプレートに更に分割され得る。

50

【0810】

ある特定の実施形態では、消化された継代初期細胞は、 $40\mu\text{m}$ のストレーナーを通して濾過され、培養皿に低密度でプレーティングされ得る。10～14日後、単一細胞は、増殖して、他のコロニーと合併することなくコロニーを形成するはずである。単一細胞に由来するコロニーが、24ウェルプレートで培養を続けるために採取され得る。1%、10%、20%、30%、40%、及び50%の細胞が次の継代で再増殖した。

【0811】

単一細胞に由来する肝幹細胞株は、7～14日毎に継続的に継代され得、継代初期及び継代後期が核型分析で確認され得る。両方の継代細胞が正常な核型を有することが確認され得る。これは幹細胞ゲノムが長期間培養の間、安定していたことを示す。

10

【0812】

WO2016200340A1に記載される結果によれば、肝幹細胞は、成体幹細胞マーカーSOX9ならびに肝実質細胞マーカーHNF4a及びHNF3Pを発現し得る。胆管マーカーKRT19は、低発現され得、胆管マーカーKRT7は細胞において検出不可能であり得る（タンパク質レベル）。肝幹細胞は、他の肝幹細胞マーカーのEPCAM、CD24、PROM1、FOXA3、及びFOXQ1も発現し得る。幹細胞維持の間、分化した細胞のコロニーが観察され得る（コロニーの総数のうちの1～2%）。分化した肝細胞は、本来管になる分化した細胞と一致して、高レベルのECAD、KRT19、KRT7発現及びSOX9の減少した発現を示し得る。未分化細胞は、形態的に小型の丸い形状であり、互いに密接にクラスター形成していてもよい。肝幹細胞は極性をもたなくてもよい。散発的な分化した細胞は、大型かつ平らな形状であり得る。全ての細胞が細胞核にKI67を発現し得るため、ほとんど全ての細胞が培養下で増殖性であり得る。形態的にそれらの全てが小型の丸い形状であり得る。未分化細胞は、低レベルのKRT19を発現したが、検出可能なレベルのKRT7を発現しなくてもよい。

20

【0813】

肝幹細胞の肝実質細胞への分化は、WO2016200340A1（その内容はその全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように、以下の方法により実行され得る。

【0814】

WO2016200340A1に記載されるように、肝幹細胞は、肝実質細胞及び胆管細胞の両方にほぼ100%の効率で分化することが可能であり得る。肝実質細胞分化は、2D、3D、及び気液界面（ALI）フォーマットのいずれでも実施され得る。胆管分化は、3Dフォーマットであり得る。

30

【0815】

肝実質細胞分化培地は、 $0.5\mu\text{M}$ のA83-01（Tocris）、 $30\mu\text{M}$ のデキサメタゾン（Dex）（Sigma）、 20ng/ml のオンコスタチンM（OSM）（Prospectbio）、 $0.1\mu\text{M}$ のCompound Eとも称される γ -セクレターゼ阻害剤XXI（Santa Cruz）、 25ng/ml のBmp7、及び 25ng/ml のFgf9を補足したClonetics（商標）HCM（商標）肝細胞培養培地（Lonza）からなり得る。

40

【0816】

幾つかの実施形態では、Clonetics（商標）HCM（商標）肝細胞培養培地（Lonza）は、B27、N2を含有するAdvanced DMEM/F12（1：1）培地または10%のFBSを含有するDMEM/F12（1：1）培地と置き換えられ得る。

【0817】

幾つかの実施形態では、 γ -セクレターゼ阻害剤XXIは、Notch経路阻害剤のDAPT、DBZと置き換えられ得る。

【0818】

幾つかの実施形態では、BMP7、FGF19、及びオンコスタチンM（OSM）は任

50

意であった。それらのいずれか1つが取り除かれてもよく、細胞は、より低い効率で依然として肝実質細胞に分化することができる。

【0819】

2D肝実質細胞分化

肝幹細胞は、フィーダー上で7~10日間培養され得る。幹細胞が50%~70%コンフルエンスに到達した後、細胞培養培地に、20、50、100 ng/mlのBMP4及び10、20、50、100 ng/mlのFgf2が3~5日間添加され得、肝実質細胞分化を開始するために肝実質細胞分化培地に交換され得る。培地は14日間の間、2~3日毎に交換され得る。肝実質細胞分化培地での長期の培養は、肝実質細胞成熟を増強し得る。分化した細胞は、Clonetics (商標) HMM (商標) 肝実質細胞維持培地 (HMM) で30日間超、培養され続けられ得る。

10

【0820】

幾つかの実施形態では、肝幹細胞は、 1×10^5 個細胞/cm²の高密度で幹細胞培養培地のフィーダー上に播種され得る。肝幹細胞がコンフルエンスに到達した時に、培養培地が分化培地と交換され得る。成熟肝実質細胞は14~21日後に形成される。

【0821】

3D肝実質細胞分化

肝幹細胞は、フィーダー上で6~10日間培養され得る。細胞は、その後に回収され得、単一細胞として超低接着細胞培養皿のヒト肝幹細胞培養培地に 1×10^5 個細胞/cm²の密度で播種され得る。

20

【0822】

ある特定の実施形態では、細胞は、低接着96ウェルプレートに2~5 $\times 10^4$ 個/ウェルで播種され得る。

【0823】

2日目に、幹細胞は、球状構造を形成させるために、20、50、100 ng/mlのBMP4及び10、20、50、100 ng/mlのFgf2を含有する肝幹細胞培地で更に3~5日間培養され得る。肝実質細胞分化を開始するために、球状構造を低接着プレートで培養するための肝実質細胞分化培地が使用され得る。培地は2~3日毎に交換され得る。成熟肝実質細胞は、分化の8~14日目に誘導され得る。肝実質細胞分化培地での長期の培養は、3D肝実質細胞成熟を増強し得る。3D肝実質細胞は、30日もの長い間、2~3日毎に培地を交換して分化培地で培養され得る。3D肝実質細胞は、Clonetics (商標) HMM (商標) 肝実質細胞維持培地 (HMM) で2~3ヵ月間維持され得る。

30

【0824】

肝実質細胞気液界面 (ALI) 分化

肝幹細胞は、トランズウェル (Corning、0.4 μ m孔径、ポリエステル膜) 内の3T3J2フィーダー上に 3×10^4 個細胞/cm²の密度でプレーティングされ得る。トランズウェル内の細胞は、肝幹細胞培地で7~10日間培養され得る。インサート内の培地が除去され得、インサート外の培地が肝実質細胞分化培地に交換され得る。細胞は、更に14日間、2~3日毎に培地を交換して気液界面で培養され得る。成熟肝実質細胞は、10~14日目に誘導され得る。肝実質細胞分化培地での長期の培養は、肝実質細胞成熟を増強し得る。分化した細胞は、30日間超、培養され続けられ得る。

40

【0825】

全ての記載される肝実質細胞分化方法は、AFPなどの胎児及び未成熟肝実質細胞マーカーを発現しない機能的ヒト肝実質細胞をもたらすはずである (AFPを発現する肝臓癌患者由来のLSCに由来する肝実質細胞を除く)。

【0826】

WO2016200340A1に記載されるように、分化した肝実質細胞は、チトクロームp450による薬物代謝機能、グリコーゲン蓄積機能、及びLDL取り込み機能を有するはずである。2D及び3D分化の効率は、およそ80%~90%であり得る。3Dの

50

最高分化効率は、特定の個々の3D肝実質細胞球において100%に達し得る。3D分化肝実質細胞は、肝実質細胞終末分化マーカーPEPCK及びTATを発現し得る。WO2016200340A1に記載されるように、6つの主要なCYP p450ファミリーメンバーが増強されたRNA発現を有し得る。

【0827】

CYP1A2、2C9、2B6、及び3A4／5の機能は、代謝アッセイにより測定され得る。肝実質細胞は、CYP3A4及びCYP2C9活性の薬物誘導性応答も示し得る。

【0828】

肝幹細胞から分化した肝実質細胞は、WO2016200340A1に記載されるように、初代成体肝実質細胞の多数の特徴を示したが、それらは幾つかの側面で異なり得る。肝幹細胞から分化した肝実質細胞(dHep)は、初代成体肝実質細胞(aHep)よりも細胞サイズが小さくてもよい。aHepのサイズは、dHepより2～10倍大きくてもよい。dHepの大部分が単一核を有する二倍体であり得るが、かなりの数のaHepが多倍数体であり得、また二核性であり得る。aHepのCYP機能は、インビトロでの細胞培養下で24～48時間しか維持されない可能性があるが、dHepのCYP機能は30日間超えて維持され得る。

【0829】

WO2016200340A1に記載されるように、肝幹細胞の胆管細胞への分化は、以下の方法により実行され得る。

【0830】

胆管分化培地は、Advanced F12／DMEM低血清培地(1：1)(Gibco、12643)、10mMのHEPES(Gibco)、100U／mlのPen／Strep(Gibco)、2mMのL-グルタミン(Gibco)、1%のN2(Gibco)、2%のB27(Gibco)、10ng／mlのEGF(Millipore)、100ng／mlのFgf10(R&D)からなり得る。

【0831】

Tgfp阻害剤及びノッチ阻害剤は、培地中に存在しなくてもよい。胆管分化培地は、Tgfp3阻害剤及びノッチ阻害剤を含まなくてもよい。

【0832】

ある特定の実施形態では、Tgfp3及びNotchのリガンドであるJagged-1が、胆管形成を補助するために分化培地に添加された。それらのいずれかは任意であった。

【0833】

増殖因子低減マトリゲルは、1日前に4℃で解凍され得る。50ulのマトリゲルが8チャンバースライドの1つのウェルに配置された。マトリゲルを含有するチャンバースライドは、37℃でインキュベートされた。30分後、WO2016200340A1に記載されるように、マトリゲルは凝固し、各ウェルにドーム形状かつゼリー様の構造を形成し得る。肝幹細胞は、0.05%のトリプシンにより30～60秒間消化され得る。肝幹細胞は、3～5×10⁴個の密度で増殖因子低減マトリゲル懸濁液に播種され得る。

【0834】

3～5日後、球状構造が形成され得る場合、肝幹細胞培地が胆管分化培地に交換され得る。分化培地は1日おきに交換され得る。胆管細胞は14日後に形成され得る。

【0835】

WO2016200340A1に記載されるように、胆管分化方法は、胆管様三次元構造を生じさせ得る。この構造は、胆管細胞間に密着結合を有する胆管細胞に囲まれた閉じた内腔または空間を有する球状または管状構造に細胞が配置されている閉じた管に類似する。胆管様構造の幾つかのでは、粘液が内腔に分泌されているのが認められ得る。全ての細胞が胆管マーカーのKRT19及びKRT7について陽性染色されたことは、約100%の分化効率を示唆する。細胞は、完全に極性化していてもよく、構造の内腔頂端部分に

10

20

30

40

50

微絨毛を有する。細胞の核は、基底膜の近くに存在し得る。密着結合マーカーのZO-1が細胞の間に発現され得る。胆管オルガノイドは、インビボでの胆管構造を模倣した組織化を示し得る。

【0836】

胆管3D分化のプロセスは、以下のステップからなり得る：好適な容器に細胞外マトリックスを配置する（例えば、8ウェルチャンバースライドの1つのウェルに50～60μLのマトリゲルを配置する）ステップ；当該細胞外マトリックス（例えば、マトリゲル）を凝固させて、当該好適な容器（例えば、細胞培養チャンバー）内でドーム形状のゼリー様構造を形成するステップ；肝幹細胞を（任意により、トリプシンなどの好適な消化酵素と共に）当該細胞外マトリックス上に配置する（例えば、マトリゲル上に肝幹細胞を播種する）ステップ；当該細胞外マトリックス及び肝幹細胞をインキュベートし、凝集した細胞に当該細胞外マトリックス（例えば、マトリゲル）上で球状構造を形成させるステップ。理論に拘束されることを望むものではないが、細胞外マトリックス（例えば、マトリゲル）は、細胞が凝集し、胆管分化開始を補助する三次元構造を形成するのを補助し得ると考えられている。更に、細胞外マトリックス（例えば、マトリゲル）中のTGFβ及び他のサイトカインは、球状構造が更に胆管様構造に分化するのを促進し得ると考えられている。細胞外マトリックス（例えば、マトリゲル）は、球状構造形成を補助し得、胆管様構造に更に分化させるために球状構造の極性を補助し得る。肝幹細胞から分化した胆管細胞は、初代成体胆管細胞の多数の特徴を示し得るが、それらは幾つかの側面で異なり得る。LSCに由来する胆管細胞は、増殖能を有する立方体状の胆管細胞を欠き得る。LSC由来胆管細胞の増殖は観察されなくてもよい。成体初代胆管細胞におけるECAD発現は変動し得るが、培養物では全ての胆管細胞がECADを発現し得る。

【0837】

肝臓、例えば、ヒト肝臓またはその一部は、例えば、WO22164807A2（その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるように、採取され得、任意により、（例えば、肝臓の1つ以上の部分または葉（複数可）を単離するために）外科的に処理され得る。次いで、肝臓またはその一部は、例えば、機械的細胞損傷、凍結／解凍、1種以上の脱細胞化試薬（例えば、1種以上のプロテアーゼ（例えば、トリプシン）、1種以上のヌクレアーゼ（例えば、DNアーゼ）、1種以上の界面活性剤（例えば、ドデシル硫酸ナトリウム、トリトンX-100など）、1種以上の低張性試薬、1種以上の高張性試薬、それらの組み合わせなど）のカニキュレーション及び逆行性灌流が含まれる、任意の便利かつ適切な手段により脱細胞化される。脱細胞化された肝臓またはその一部は、肝実質細胞に適合可能な培地に保存及び／または予浸され得る。本明細書に記載されるようなエキスピボで操作された肝実質細胞生成細胞を含有する細胞懸濁液は、次いで、例えば、注射、灌流、（例えば、一滴ずつの）局所適用、またはそれらの組み合わせなどの任意の便利な手法により、脱細胞化された肝臓またはその一部に適用され得る。幾つかの例では、エキスピボで操作された肝実質細胞生成細胞は、例えば、50pL当たり 1×10^5 個細胞以下～ 1×10^7 個細胞以上、例えば、限定されるものではないが、50pL当たり $1 \sim 2 \times 10^6$ 個細胞の濃度が含まれる、任意の便利かつ適切な濃度で、調製された足場への播種のための細胞懸濁液中に存在し得る。播種された脱細胞化肝臓、その一部、及び／または他の無細胞化足場は、導入された細胞の生着／付着及び／または増殖のために好適な条件下で維持され得、ここで、かかる条件としては、好適な湿度、温度、ガス交換、栄養分などが挙げられ得る。幾つかの例では、播種された肝臓、その一部、及び／または他の無細胞化足場は、好適な培養培地で湿潤環境、37℃または約37℃、5%CO₂にて維持され得る。播種及び／または生成された肝実質細胞が、脱細胞化肝臓、その一部、もしくは他の無細胞化足場に、または脱細胞化肝臓、その一部、もしくは他の無細胞化足場内で付着及び／または増殖した後、この材料は、例えば、移植する必要がある対象、例えば、肝機能低下及び／または肝疾患を有するヒト対象への移植が含まれる、様々な用途に用いられ得る。ヒト肝臓が含まれる肝臓の脱細胞化及び肝実質細胞を受容する無細胞足場の作製に関する方法及び試薬は、例えば、Mazza et al. Sci

10

20

30

40

50

Rep 5, 13079 (2015)、Mango et al. Adv. Funct. Mater. 2000097 (2020)、Shimoda et al. Sci Rep 9, 1543 (2019)、Croce et al. Biomolecules. 2019, 9 (12) : 813、及び米国特許第10,688,221号(それらの開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載されている。

【0838】

本明細書に記載される方法により作製され、採取された細胞集団及びその治療用組成物または医薬組成物は、任意の好適な容器(例えば、培養容器、チューブ、フラスコ、バイアル、冷結保存バイアル、凍結バッグなど)内に存在し得、任意の好適な送達方法及び／またはデバイスを使用して用いられ得る(例えば、対象に投与される)。肝実質細胞のかかる集団及び医薬組成物は、新たに調製及び／または使用され得るか、または凍結保存され得る。幾つかの例では、肝実質細胞の集団及びその医薬組成物は、「すぐ使用できる」フォーマット、例えば、細胞が、好適な希釈液中に、及び／または望ましい送達濃度(例えば、単位剤形として)もしくは(例えば、好適な希釈液または培地を用いて)望ましい送達濃度に容易に希釈され得る濃度で存在するフォーマットで調製され得る。肝実質細胞の集団及びその医薬組成物は、送達デバイスまたは所望の送達機構もしくは所望の送達経路と適合可能なデバイス内に、例えば、限定されるものではないが、シリンジ、注入バッグ内などに調製され得る。

【0839】

幾つかの例では、本開示は、例えば、各々が好適な容器に收容された、複数用量の細胞療法、例えば、複数用量の遺伝子改変肝実質細胞の全てが、単一のヒトドナー肝臓から作製された肝実質細胞集団、例えば、マスターセルバンクに由来する(例えば、それから増殖された)細胞療法を含む。幾つかの例では、本開示は、例えば、各々が好適な容器に收容された、複数用量の細胞療法、例えば、複数用量の遺伝子改変肝実質細胞の全てが、複数(例えば、2つ、2つ以上、3つ以下、3つ、3つ以上、4つ以下、4つ、4つ以上、5つ以下、5つ、5つ以上、6つ以下、6つ、6つ以上、7つ以下、7つ、7つ以上、8つ以下、8つ、8つ以上、9つ以下、9つ、9つ以上、10つ以下、10つ以上など)のヒトドナー肝臓から作製された単一の肝実質細胞集団、例えば、マスターセルバンクに由来する(例えば、それから増殖された)細胞療法を含む。

【0840】

本明細書に記載される方法により作製された肝実質細胞様細胞のいずれかは、対象を処置するために使用され得る。一態様では、増強されたインビトロでの尿素形成能を有する主題の成熟肝実質細胞様細胞を含む医薬組成物が本明細書において提供される。幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞の尿素形成能は、医薬組成物の使用前に評価される。尿素形成は、当該技術分野において公知の任意の好適なアッセイ、例えば、尿素比色アッセイ(例えば、Bios Assay SystemsによるQuantichrom Assay Kit)を使用して測定され得る。代表的実施形態では、医薬組成物は、参照野生型成熟肝実質細胞と比較して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%、または99%の尿素形成を示す成熟肝実質細胞様細胞を含む。

【0841】

細胞分化

本明細書に記載される主題の成熟肝実質細胞様細胞は、分化期間における別個の時点で尿素形成促進因子の存在下で供給源細胞をインビトロで分化させることにより作製され得る。

【0842】

代表的実施形態では、1種以上の尿素形成促進因子を含む培養培地で、供給源細胞が中間型肝実質細胞様前駆細胞に分化され、肝実質細胞様前駆細胞が成熟肝実質細胞に分化される。本明細書で使用する場合、「肝実質細胞様前駆細胞」は、成熟肝実質細胞様細胞に分化することができ、肝実質細胞前駆細胞の1つ以上の特徴を有する細胞を指す。肝実

質細胞前駆細胞の特徴としては、限定されるものではないが、E p C A M発現、サイトケラチン-19発現、アジア糖タンパク質受容体1 (A S G P R 1) 発現、ならびにA F P、A L B、H N F 4 A、H N F 6、S E R P I N A 1、A L B、及び／またはC Y P 3 A 7の増強された遺伝子発現が挙げられる。特定の実施形態では、A F P、A L B、H N F 4 A、H N F 6、S E R P I N A 1、A L B、及び／またはC Y P 3 A 7の増強された遺伝子発現は、参照供給源細胞（例えば、本明細書に記載される幹細胞、線維芽細胞、または任意の供給源細胞）と比較される。ある特定の実施形態では、遺伝子発現の増強は、参照供給源細胞と比較して少なくとも10倍、100倍、 1×10^3 倍、 1×10^4 倍、 1×10^5 倍、または 1×10^6 倍の遺伝子発現の増強である。代表的実施形態では、肝実質細胞様前駆細胞は、1) E p C A M及び／またはサイトケラチン-19の発現；ならびに2) A F P、A L B、H N F 4 A、H N F 6、S E R P I N A 1、A L B、及び／またはC Y P 3 A 7の増強された遺伝子発現を示す。幾つかの実施形態では、肝実質細胞様前駆細胞は、1) E p C a m及びサイトケラチン-19の発現；ならびに2) A L B及びC Y P 3 A 7の増強された発現を示す。肝実質細胞様前駆細胞は、肝実質細胞または胆管細胞に分化することができる二分化能性前駆細胞である肝芽細胞様細胞も包含する。幾つかの実施形態では、1種以上の尿素形成促進因子が成熟肝実質細胞様細胞と接触させられる。

10

【0843】

幾つかの実施形態では、1種以上の尿素形成促進因子は、分化の特定の日を開始して、分化中の細胞と接触させられる。幾つかの実施形態では、1種以上の尿素形成促進因子は、分化の4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、または40日目に開始して、分化中の細胞と接触させられる。幾つかの実施形態では、1種以上の尿素形成促進因子は、成熟肝実質細胞様細胞への分化の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20日前に分化中の細胞と接触させられる。幾つかの実施形態では、1種以上の尿素形成促進因子は、本明細書に開示されるような成熟肝実質細胞の1つ以上の特徴を示す成熟肝実質細胞様細胞と接触させられる。幾つかの実施形態では、尿素形成促進因子は、分化中の細胞（例えば、肝実質細胞様前駆細胞）と少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、24、または36時間接触させられる。幾つかの実施形態では、尿素形成促進因子は、分化中の細胞と少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、または14日間接触させられる。幾つかの実施形態では、尿素形成促進因子は、分化中の細胞と少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10週間接触させられる。

20

30

【0844】

供給源細胞

限定されるものではないが、幹細胞（例えば、人工多能性幹細胞及び胚性幹細胞）、線維芽細胞、胃上皮細胞、肝実質細胞、及び導管細胞が含まれる、任意の好適な供給源細胞が、主題の肝実質細胞様細胞を作製するために使用され得る。

【0845】

幾つかの実施形態では、供給源細胞は、幹細胞である。幾つかの実施形態では、供給源細胞は、ヒト幹細胞である。幾つかの実施形態では、幹細胞は、多能性幹細胞である。本明細書で使用する場合、「多能性幹細胞」は、以下の3つの胚葉のいずれかに分化する能力を有する：内胚葉（例えば、胃壁、消化管、肺など）、中胚葉（例えば、筋肉、骨、血液、泌尿生殖器組織など）、または外胚葉（例えば、表皮組織及び神経系組織）。本明細書で使用する場合、用語「多能性幹細胞」は、非多能性細胞に由来する多能性幹細胞の一種である「人工多能性幹細胞」または「i P S C」も包含する。親細胞の例としては、様々な手段によって、多能性の未分化表現型を誘導するために初期化された体細胞が挙げられる。かかる「i P S」または「i P S C」細胞は、ある特定の調節遺伝子の発現を誘発することにより、またはある特定の外来性タンパク質の適用により作製され得る。i P S

40

50

細胞の誘導方法は、当該技術分野において公知である。例えば、Zhou et al., Stem Cells 27 (11): 2667-74 (2009)、Huangfu et al., Nature Biotechnol. 26 (7): 795 (2008)、Woltjen et al., Nature 458 (7239): 766-770 (2009)、及びZhou et al., Cell Stem Cell 8: 381-384 (2009)。ある特定の実施形態では、幹細胞は、胚性幹細胞である。幹細胞を使用した肝細胞分化の方法は、当該技術分野において公知である。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Blackford et al., Stem Cell Transl Med. 8 (2): 124-137 (2019)、Hannan et al., Nature Prot. 8 (2): 430-437 (2013)、Liu et al., Sci Transl Med. 3 (82): 82ra39 (2011)、Woo et al., Gastroenterology 42: 602-611 (2012)、及びCarpentier et al., J Clin Invest. 124 (11): 4953-4964 (2014) の特に肝実質細胞様細胞への分化方法に関連する部分を参照のこと。

10

20

30

40

50

【0846】

供給源細胞が人工多能性幹細胞である幾つかの実施形態では、人工多能性幹細胞は、以下の遺伝子のうちの1つ以上を発現する胚体内胚葉 (DE) に最初に分化される: CXCR4、SOX17、CER、及び／またはFOXA2。続いて、DEは、 $\alpha 1$ -フェトプロテイン (AFP) を発現する肝実質細胞様前駆細胞に分化される。その後、肝実質細胞様前駆細胞は、成熟肝実質細胞様細胞に分化される。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Liu et al., Sci Transl Med. 3 (82): 82ra39 (2011) の特に肝実質細胞様細胞分化に関連する部分を参照のこと。幾つかの実施形態では、肝実質細胞様前駆細胞は、増強された尿素形成能を有する成熟肝実質細胞様細胞を作製するために、本明細書に記載される尿素形成促進因子のうちの1つ以上の存在下で分化される。幾つかの実施形態では、肝実質細胞様前駆細胞は、1種以上の尿素形成促進因子及びオンコスタチンM (OSM) を含む培養培地で成熟肝実質細胞様細胞に分化される。幾つかの実施形態では、培養培地は、肝細胞増殖因子 (HGF) を更に含む。幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、1種以上の尿素形成促進因子の影響下に置かれる。

【0847】

供給源細胞がヒト胚性幹細胞またはヒト人工多能性幹細胞である幾つかの実施形態では、供給源細胞は、SOX17及び／またはFOXA2を発現する胚体内胚葉に最初に分化される。胚体内胚葉は、AFP及び／またはHNF4Aを発現する肝芽細胞様細胞に分化される。次いで、肝芽細胞様細胞は、以下の遺伝子のうちの1つまたは組み合わせを発現する成熟肝実質細胞様細胞に分化される: AFP、AAT、ALB、及びHNF3B。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Carpentier et al., J Clin Invest. 124 (11): 4953-4964 (2014) の特に肝実質細胞様細胞分化に関連する部分を参照のこと。幾つかの実施形態では、肝芽細胞様細胞は、増強された尿素形成能を有する成熟肝実質細胞様細胞を作製するために、本明細書に記載される尿素形成促進因子のうちの1つ以上の存在下で分化される。幾つかの実施形態では、肝芽細胞様の細胞は、1種以上の尿素形成促進因子、DMSO、及びHGFを含む培養培地で分化される。幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、1種以上の尿素形成促進因子の影響下に置かれる。

【0848】

供給源細胞がヒト多能性幹細胞である幾つかの実施形態では、供給源細胞は、SOX17及び／またはCXCR4を発現する胚体内胚葉に最初に分化される。胚体内胚葉は、EpCAM、サイトケラチン19、及び以下の遺伝子のうちの1つまたは組み合わせを発現する肝内胚葉に分化される: AFP、SERPINA2、及びHNF4A。次いで、肝内胚葉は、以下の遺伝子のうちの1つまたは組み合わせを発現する成熟肝実質細胞様細胞に

分化される：AFP、ASGR2、SERPINA2、CYP3A7、及びALB。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Blackford et al., Stem Cells Transl Med. 8 (2) : 124-137 (2019) の特に肝実質細胞様細胞分化に関連する部分を参照のこと。幾つかの実施形態では、肝内胚葉は、増強された尿素形成能を有する成熟肝実質細胞様細胞を作製するために、本明細書に記載される尿素形成促進因子のうちの1つ以上の存在下で分化される。幾つかの実施形態では、肝内胚葉は、1種以上の尿素形成促進因子及びオンコスタチンM (OSM) を含む細胞培養培地で分化される。幾つかの実施形態では、培養培地は、肝細胞増殖因子 (HGF) を更に含む。幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、1種以上の尿素形成促進因子の影響下に置かれる。

10

【0849】

幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、供給源細胞から分化転換される。分化転換は、中間の多能性段階なしに、分化した細胞種を別の細胞種に直接転換することを指す。成熟肝実質細胞様細胞への分化転換が可能な例示的な細胞としては、限定されるものではないが、線維芽細胞、胃上皮細胞、肝実質細胞、及び導管細胞が挙げられる。

【0850】

幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、線維芽細胞から分化転換される。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Zhu et al., Nature 508 (7494) : 93-7 (2014)、Du et al., Cell Stem Cell 14 (3) : 394-403 (2014)、及びHuang et al., Cell Stem Cell 4 (3) : 370-84 の特に分化転換の方法に関連する部分を参照のこと。かかる方法では、線維芽細胞から肝実質細胞への再プログラム化に有用な1種以上の遺伝子がレトロウイルス形質導入送達技術により線維芽細胞に導入され、形質導入された線維芽細胞は、肝実質細胞様前駆細胞の形成を支持する因子を含有する培地で培養され、その後、成熟肝実質細胞様細胞に分化する。線維芽細胞から肝実質細胞への再プログラム化に有用な遺伝子としては、限定されるものではないが、OCT4、SOX2、KLF4、HNF6、HNF1 α 、FOXA3、HNF1 β 、及び／またはHNF4 α が挙げられる。幾つかの実施形態では、肝実質細胞様前駆細胞は、増強された尿素形成能を有する成熟肝実質細胞様細胞を作製するために、本明細書に記載される尿素形成促進因子のうちの1つ以上の存在下で分化される。

20

30

【0851】

幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、成熟肝実質細胞から分化転換される。幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞は、増殖可能な肝実質細胞様前駆細胞に転換され、その後、成熟肝実質細胞様細胞に分化する。幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞の肝実質細胞様前駆細胞への転換は、以下のうちの1つまたは組み合わせを含む培養培地で実行される：Wntシグナル伝達アゴニスト（例えば、CHIR99021）、TGF β シグナル伝達阻害剤（例えば、A82-01及びA83-01）、及びROCKキナーゼ阻害剤（例えば、Y27632、A82-01）。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Kim et al., J. Hepatol. 70 (1) : 97-107 (2019)、及びFu et al., Cell Res. 29 (1) : 8-22 (2019) の特に分化転換の方法に関連する部分を参照のこと。幾つかの実施形態では、肝実質細胞様前駆細胞は、増強された尿素形成能を有する成熟肝実質細胞様細胞を作製するために、本明細書に記載される尿素形成促進因子のうちの1つ以上の存在下で分化される。

40

【0852】

幾つかの実施形態では、主題の成熟肝実質細胞様細胞は、胃上皮細胞（例えば、Wang et al., Cell Stem Cell 19 (4) : 449-61 (2016)）または導管細胞（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Huch et al., Cell 160 (1-2) : 299-312 (2015) の特に分化転換の方法に関連する部分を参照のこと）を参照のこと。幾つかの実施形態では、供給源細胞は、

50

増強された尿素形成能を有する成熟肝実質細胞様細胞を作製するために、本明細書に記載される尿素形成促進因子のうちの1つ以上の存在下で分化転換される。

【0853】

尿素形成促進因子

本明細書において提供される主題の成熟肝実質細胞様細胞は、インビトロでの尿素形成能の増強を促進する1つ以上の条件下で供給源細胞をインビトロで分化させることにより作製される。

【0854】

低分子促進因子

幾つかの実施形態では、分化は、1種以上の低分子尿素形成促進因子を含む少なくとも1種の培養培地で行われる。代表的実施形態では、このような分化ステップは、供給源細胞が中間肝実質細胞様前駆細胞に分化した後に行われる。ある特定の実施形態では、低分子促進因子は、本明細書において開示される成熟肝実質細胞の1つ以上の特徴を示す成熟肝実質細胞様細胞に添加する。幾つかの実施形態では、1種以上の低分子尿素形成促進因子の存在下での分化は、成熟肝実質細胞様細胞形成の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20日前に行われる。幾つかの実施形態では、低分子尿素形成促進因子は、分化中の細胞と少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、または14日間接触される。幾つかの実施形態では、低分子尿素形成促進因子は、分化中の細胞と

2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、または14日間接触される。幾つかの実施形態では、低分子尿素形成促進因子は、分化中の細胞と少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10週間接触される。

【0855】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される低分子促進因子は、少なくとも1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、100、250、500、または750 μM の濃度で培養培地に含まれる。幾つかの実施形態では、本明細書において開示される低分子促進因子は、1~800 μM 、1~750 μM 、1~700 μM 、1~650 μM 、1~600 μM 、1~550 μM 、1~500 μM 、1~500 μM 、1~450 μM 、1~400 μM 、1~350 μM 、1~300 μM 、1~250 μM 、1~200 μM 、1~150 μM 、1~100 μM 、1~50 μM 、50~800 μM 、50~750 μM 、50~700 μM 、50~650 μM 、50~600 μM 、50~550 μM 、50~500 μM 、50~500 μM 、50~450 μM 、50~400 μM 、50~350 μM 、50~300 μM 、50~250 μM 、50~200 μM 、50~150 μM 、50~100 μM 、100~800 μM 、100~750 μM 、100~700 μM 、100~650 μM 、100~600 μM 、100~550 μM 、100~500 μM 、100~500 μM 、100~450 μM 、100~400 μM 、100~350 μM 、100~300 μM 、100~250 μM 、100~200 μM 、100~150 μM 、200~800 μM 、200~750 μM 、200~700 μM 、200~650 μM 、200~600 μM 、200~550 μM 、200~500 μM 、200~500 μM 、200~450 μM 、200~400 μM 、200~350 μM 、200~300 μM 、200~250 μM 、300~800 μM 、300~750 μM 、300~700 μM 、300~650 μM 、300~600 μM 、300~550 μM 、300~500 μM 、300~500 μM 、300~450 μM 、300~400 μM 、300~350 μM 、400~800 μM 、400~750 μM 、400~700 μM 、400~650 μM 、400~600 μM 、400~550 μM 、400~500 μM 、400~500 μM 、400~450 μM 、500~800 μM 、500~750 μM 、500~700 μM 、500~650 μM 、500~600 μM 、500~550 μM 、600~800 μM 、600~750 μM 、600~700 μM 、600~650 μM 、700~800 μM 、700~750 μM 、または750~800 μM の濃度で培養培地に含まれる。

【0856】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示される低分子促進因子は、少なくとも1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、100、250、500、または750mMの濃度で培養培地に含まれる。幾つかの実施形態では、本明細書において開示される低分子促進因子は、1~800mM、1~750mM、1~700mM、1~650mM、1~600mM、1~550mM、1~500mM、1~500mM、1~450mM、1~400mM、1~350mM、1~300mM、1~250mM、1~200mM、1~150mM、1~100mM、1~50mM、50~800mM、50~750mM、50~700mM、50~650mM、50~600mM、50~550mM、50~500mM、50~500mM、50~500mM、50~450mM、50~400mM、50~350mM、50~300mM、50~250mM、50~200mM、50~150mM、50~100mM、100~800mM、100~750mM、100~700mM、100~650mM、100~600mM、100~550mM、100~500mM、100~500mM、100~450mM、100~400mM、100~350mM、100~300mM、100~250mM、100~200mM、100~150mM、200~800mM、200~750mM、200~700mM、200~650mM、200~600mM、200~550mM、200~500mM、200~500mM、200~450mM、200~400mM、200~350mM、200~300mM、200~250mM、300~800mM、300~750mM、300~700mM、300~650mM、300~600mM、300~550mM、300~500mM、300~500mM、300~450mM、300~400mM、300~350mM、400~800mM、400~750mM、400~700mM、400~650mM、400~600mM、400~550mM、400~500mM、400~500mM、400~450mM、500~800mM、500~750mM、500~700mM、500~650mM、500~600mM、500~550mM、600~800mM、600~750mM、600~700mM、600~650mM、700~800mM、700~750mM、または750~800mMの濃度で培養培地に含まれる。

10

20

【0857】

幾つかの実施形態では、低分子促進因子は、1種以上の尿素回路経路酵素の発現を増強する。例示的な尿素回路経路酵素としては、限定されるものではないが、カルバモイルリン酸シンテターゼI (CPS1)、オルニチントランスカルバミラーゼ (OTC)、アルギニノコハク酸シンテターゼ (ASS1)、アルギニノコハク酸リアーゼ (ASL)、アルギナーゼ (ARG1)、N-アセチルグルタミン酸シンテターゼ (NAGS)、オルニチントランスロカーゼ (ORN1)、及びシトリンが挙げられる。幾つかの実施形態では、低分子促進因子は、以下の尿素回路酵素のうちの1つの発現を増強する：CPS1、NAGS、ARG1、ASL、ASS1、またはOTC。幾つかの実施形態では、低分子促進因子は、1種以上の尿素回路経路酵素のRNA転写発現を増強する。幾つかの実施形態では、肝実質細胞様細胞は、1種以上の尿素回路経路酵素の増強されたタンパク質発現を示す。幾つかの実施形態では、低分子促進因子は、促進因子の非存在下で分化した参照成熟肝実質細胞様細胞と比べて少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、90%、95%、または99%多い量で1種以上の尿素回路経路酵素のタンパク質発現を増強する。

30

40

【0858】

幾つかの実施形態では、低分子促進因子は、細胞内サイクリックAMPを増加させる薬剤である。いかなる特定の作用理論にも拘束されるものではないが、本明細書において提供される例に開示されるように、細胞内サイクリックAMPを増加させる薬剤は、尿素回路の酵素の転写及び翻訳を増強し、これにより、成熟肝実質細胞様細胞のインビトロでの尿素形成能を増強する。細胞内サイクリックAMPを増加させる薬剤としては、限定され

50

るものではないが、フォルスコリン、グルカゴン、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1)、グルコース依存性インスリン分泌刺激ペプチド (GIP)、ホスホジエステラーゼ阻害剤、及び前述のうちのいずれかの類似体が挙げられる。例示的なホスホジエステラーゼ阻害剤としては、IBMX (3-イソブチル-1-メチルキサンチン)、テオフィリン、V11294A、ロリプラム、ミルリノン、CDP-840、パパベリン、シルデナフィル、タダラフィル、ロフルミラスト、アムリノン、シロスタゾール、及びジピリダモールが挙げられる。

【0859】

代表的実施形態では、促進因子はフォルスコリンである。幾つかの実施形態では、分化中の肝実質細胞様前駆細胞は、フォルスコリンを含む細胞培養培地中で分化している。幾つかの実施形態では、本明細書に記載される成熟肝実質細胞の1つ以上の特徴を示す肝実質細胞様細胞は、フォルスコリンを含む細胞培養培地中で分化される。幾つかの実施形態では、フォルスコリンは、少なくとも1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、または100 μM の濃度で培養培地に含まれる。幾つかの実施形態では、フォルスコリンは、少なくとも1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、または100 mM の濃度で培養培地に含まれる。幾つかの実施形態では、フォルスコリンは、0.5~800 μM 、0.5~750 μM 、0.5~700 μM 、0.5~650 μM 、0.5~600 μM 、0.5~550 μM 、0.5~500 μM 、0.5~500 μM 、0.5~450 μM 、0.5~400 μM 、0.5~350 μM 、0.5~300 μM 、0.5~250 μM 、0.5~200 μM 、0.5~150 μM 、0.5~100 μM 、0.5~95 μM 、0.5~90 μM 、0.5~85 μM 、0.5~80 μM 、0.5~75 μM 、0.5~70 μM 、0.5~65 μM 、0.5~60 μM 、0.5~55 μM 、0.5~50 μM 、0.5~45 μM 、0.5~40 μM 、0.5~35 μM 、0.5~30 μM 、0.5~25 μM 、0.5~20 μM 、0.5~15 μM 、0.5~10 μM 、0.5~9 μM 、0.5~8 μM 、0.5~7 μM 、0.5~6 μM 、0.5~5 μM 、0.5~2 μM 、0.5~1 μM 、1~30 μM 、5~30 μM 、10~30 μM 、1~20 μM 、5~20 μM 、または10~20 μM の濃度で培養培地に含まれる。幾つかの実施形態では、フォルスコリンは、5~20 μM の濃度で培養培地に含まれる。幾つかの実施形態では、細胞 (例えば、分化中の肝実質細胞様前駆細胞) は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、または24時間、フォルスコリンの影響下に置かれる。幾つかの実施形態では、分化中の細胞は、少なくとも8時間、フォルスコリンの影響下に置かれる。幾つかの実施形態では、細胞培養培地は、オンコスタチンM (OSM) 及び／または肝細胞増殖因子 (HGF) を更に含む。

【0860】

幾つかの実施形態では、低分子促進因子は、ビタミンK1である。幾つかの実施形態では、ビタミンKは、ビタミンK1である。幾つかの実施形態では、分化は、ビタミンK2及び／またはビタミンK3を実質的に含まない培養培地で行われる。いかなる特定の作用理論にも拘束されるものではないが、本明細書において提供される例に開示されるように、ビタミンKは、成熟肝実質細胞様細胞のインビトロでの尿素形成を増強することができる。幾つかの実施形態では、分化中の肝実質細胞様前駆細胞は、ビタミンK1を含む細胞培養培地中で分化している。幾つかの実施形態では、本明細書に記載される成熟肝実質細胞の1つ以上の特徴を示す肝実質細胞様細胞は、ビタミンK1を含む細胞培養培地中で分化される。幾つかの実施形態では、ビタミンK1は、少なくとも0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.75、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、100、250、500、または750 μM の濃度で培養培地に含まれる。幾つかの実施形態では、ビタミンKは、0.05~800 μM 、0.05~750 μM 、0.05~700 μM 、0.05~650 μM 、0.05~600 μM 、0.05~550 μM 、0

0.05~500 μ M、0.05~500 μ M、0.05~450 μ M、0.05~400 μ M、0.05~350 μ M、0.05~300 μ M、0.05~250 μ M、0.05~200 μ M、0.05~150 μ M、0.05~100 μ M、0.05~95 μ M、0.05~90 μ M、0.05~85 μ M、0.05~80 μ M、0.05~75 μ M、0.05~70 μ M、0.05~65 μ M、0.05~60 μ M、0.05~55 μ M、0.05~50 μ M、0.05~45 μ M、0.05~40 μ M、0.05~35 μ M、0.05~30 μ M、0.05~25 μ M、0.05~20 μ M、0.05~15 μ M、0.05~10 μ M、0.05~9 μ M、0.05~8 μ M、0.05~7 μ M、0.05~6 μ M、0.05~5 μ M、0.05~2 μ M、0.05~1 μ M、0.05~0.5 μ M、0.05~0.1 μ M、0.1~5 μ M、0.5~5 μ M、または1~5 μ Mの濃度で培養培地に含まれる。幾つかの実施形態では、細胞（例えば、分化中の肝実質細胞様前駆細胞）は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、または24時間、ビタミンK1の影響下に置かれる。幾つかの実施形態では、分化中の細胞は、少なくとも8時間、ビタミンの影響下に置かれる。幾つかの実施形態では、アルギニンがビタミンK1と共に培養培地に添加される。幾つかの実施形態では、アルギニンは、750 μ M~10 mMの濃度で添加される。幾つかの実施形態では、アルギニンは、ビタミンK1と同程度の濃度で培養培地に添加される。幾つかの実施形態では、細胞培養培地は、オンコスタチンM（OSM）及び／または肝細胞増殖因子（HGF）を更に含む。

10

20

【0861】

幾つかの実施形態では、低分子促進因子は、ビタミンK2である。代表的実施形態では、ビタミンKは、ビタミンK2である。幾つかの実施形態では、分化は、ビタミンK1及び／またはビタミンK3を実質的に含まない培養培地で行われる。

【0862】

幾つかの実施形態では、分化中の肝実質細胞様前駆細胞は、ビタミンK2を含む細胞培養培地中で分化している。実施形態では、本明細書に記載される成熟肝実質細胞の1つ以上の特徴を示す肝実質細胞様細胞は、ビタミンK2を含む細胞培養培地中で分化される。幾つかの実施形態では、ビタミンK2は、少なくとも0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.75、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、100、250、500、または750 μ Mの濃度で培養培地に含まれる。幾つかの実施形態では、ビタミンKは、0.05~800 μ M、0.05~750 μ M、0.05~700 μ M、0.05~650 μ M、0.05~600 μ M、0.05~550 μ M、0.05~500 μ M、0.05~500 μ M、0.05~450 μ M、0.05~400 μ M、0.05~350 μ M、0.05~300 μ M、0.05~250 μ M、0.05~200 μ M、0.05~150 μ M、0.05~100 μ M、0.05~95 μ M、0.05~90 μ M、0.05~85 μ M、0.05~80 μ M、0.05~75 μ M、0.05~70 μ M、0.05~65 μ M、0.05~60 μ M、0.05~55 μ M、0.05~50 μ M、0.05~45 μ M、0.05~40 μ M、0.05~35 μ M、0.05~30 μ M、0.05~25 μ M、0.05~20 μ M、0.05~15 μ M、0.05~10 μ M、0.05~9 μ M、0.05~8 μ M、0.05~7 μ M、0.05~6 μ M、0.05~5 μ M、0.05~2 μ M、0.05~1 μ M、0.05~0.5 μ M、0.05~0.1 μ M、0.1~5 μ M、0.5~5 μ M、または1~5 μ Mの濃度で培養培地に含まれる。幾つかの実施形態では、細胞（例えば、分化中の肝実質細胞様前駆細胞）は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、または24時間、ビタミンK2の影響下に置かれる。幾つかの実施形態では、分化中の細胞は、少なくとも8時間、ビタミンの影響下に置かれる。幾つかの実施形態では、アルギニンは、ビタミンK2と共に培養培地に添加される。幾つかの実施形態では、アルギニンは、750 μ M~10 mMの濃度で添加される。幾つかの実施形態では、アルギニンは、ビタミンK2と同程度の濃度で

30

40

50

培養培地に添加される。幾つかの実施形態では、細胞培養培地は、オンコスタチン M (OSM) 及び／または肝細胞増殖因子 (HGF) を更に含む。

【0863】

培養培地

成熟肝実質細胞様細胞への分化は、1 種以上の増殖因子を含む培養培地の存在下で行われ得る。幾つかの実施形態では、分化は、肝細胞増殖因子 (HGF) 及びオンコスタチン M (OSM) を含む培養培地で行われ得る。分化が中間肝実質細胞様前駆細胞を経由して行われる幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞への分化は、HGF の非存在下で行われる。幾つかの実施形態では、培養培地は、OSM を含むが、HGF を含まない。分化が中間肝実質細胞様前駆細胞を経由して行われる幾つかの実施形態では、中間肝実質細胞様前駆細胞から成熟肝実質細胞様細胞への分化は、最初は HGF の存在下で実行され、HGF は、分化の開始の 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、21、22、23、または 24 時間後に培養培地から除去される。幾つかの実施形態では、HGF は、肝実質細胞様前駆細胞の成熟肝実質細胞様細胞への分化の開始から 2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 日間、培養培地から除去される。

10

【0864】

高酸素条件

いかなる特定の作用理論にも拘束されるものではないが、本明細書において提供される例に示されるように、高酸素条件下で培養された肝実質細胞様細胞は、インビトロでの増強された尿素形成を示す。従って、幾つかの実施形態では、本明細書において提供される方法による成熟肝実質細胞様細胞への分化は、インビトロでの増強された尿素形成を促進する高酸素レベルで行われる。幾つかの実施形態では、分化は、正常酸素 (正常酸素圧) 条件 (約 20 % の O_2 ガス分圧) 下で行われる。幾つかの実施形態では、分化は、高酸素条件 (20 % 超のガス分圧) 下で行われる。幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞への分化は、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、または 40 % 超の O_2 ガス分圧で実行される。幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞への分化は、5 ~ 30 %、6 ~ 30 %、7 ~ 30 %、8 ~ 30 %、9 ~ 30 %、10 ~ 30 %、11 ~ 30 %、12 ~ 30 %、13 ~ 30 %、14 ~ 30 %、15 ~ 30 %、16 ~ 30 %、17 ~ 30 %、18 ~ 30 %、19 ~ 30 %、20 ~ 30 %、21 ~ 30 %、22 ~ 30 %、23 ~ 30 %、24 ~ 30 %、25 ~ 30 %、26 ~ 30 %、27 ~ 30 %、28 ~ 30 %、29 ~ 30 %、15 ~ 25 %、15 ~ 35 %、15 ~ 40 %、または 20 ~ 25 % の O_2 ガス分圧で実行される。

20

30

【0865】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される方法による成熟肝実質細胞様細胞への分化は、少なくとも 2 つの酸素条件下で行われる。幾つかの例では、一方の酸素条件は、酸素圧低下条件であり、他方の酸素条件は、正常酸素圧条件である。幾つかの実施形態では、酸素圧低下条件は、約 0 % ~ 約 5 % 酸素の酸素含量、例えば、約 0 % ~ 5 %、約 0 % ~ 4 %、約 0 % ~ 3 %、約 0 % ~ 2 %、約 0 % ~ 3 %、約 0 % ~ 4 %、約 1 % ~ 5 %、約 1 % ~ 4 %、約 1 % ~ 3 %、約 1 % ~ 2 %、約 2 % ~ 3 %、約 3 % ~ 4 %、約 4 % ~ 5 %、約 2 % ~ 5 %、及び約 3 % ~ 5 % の酸素含量を含む。幾つかの実施形態では、正常酸素圧条件は、約 20 % ~ 約 22 % 酸素の酸素含量、例えば、約 20 % ~ 22 %、約 20 % ~ 21 %、約 21 % ~ 22 %、約 20 %、約 21 %、及び約 22 % の酸素含量を含む。幾つかの実施形態では、分化中の細胞は、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36 日間、またはそれ以上の間、酸素圧低下条件に曝露される。幾つかの実施形態では、分化中の細胞は、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、2

40

50

6、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36日間、またはそれ以上の間、正常酸素圧条件に曝露される。

【0866】

培養システム

本明細書に記載される分化方法は、懸濁液中の細胞または2Dもしくは3D固体支持体に接着した細胞を用いて実行され得る。固体支持体としては、限定されるものではないが、ガラスまたはプラスチック培養皿、マルチウェルディッシュ、フラスコ、プレート、マイクロキャリア、ポリフッ化ビニリデン、ポリマーフィルム、例えば、金属フィルム及び3D足場が挙げられる。ある特定の実施形態では、分化は、2D培養システムで行われる。幾つかの実施形態では、分化は、合成または天然のハイドロゲルから構成される3D足場で行われる。代表的実施形態では、3D足場は、ポリ(エチレングリコール)(PEG)足場である。特定の実施形態では、3D足場は、逆コロイド結晶PEG足場である。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Shirahama et al., J Vis Exp. 114:54331(2016)の特に逆コロイド結晶PEG足場に関連する部分を参照のこと。

【0867】

幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞への分化は、1種以上の細胞外マトリックス成分を含む2Dまたは3D固体支持体で実行される。細胞外マトリックス成分としては、限定されるものではないが、I型、II型、及びIV型コラーゲン、コンカナバリンA、コンドロイチン硫酸、フィブロネクチン、「スーパーフィブロネクチン」、及び／またはフィブロネクチン様ポリマー、ゼラチン、ラミニン、ポリ-D-リジン及びポリ-L-リジン、Matrigel(商標)、トロンボスポンジン、及び／またはビトロネクチンが挙げられる。代表的実施形態では、固体支持体は、組換えラミニン(例えば、Laminin-521、BioLamina)でコーティングされる。幾つかの実施形態では、固体支持体は、ウシ胎児血清(FBS)を含まない。中間型肝実質細胞様前駆細胞を経由して分化が行われる幾つかの実施形態では、中間型肝実質細胞様前駆細胞は、成熟肝実質細胞様細胞への分化を促進するECM成分でコーティングされた固体支持体に移される。幾つかの実施形態では、分化は、最初はウシ胎児血清を含まない第1の支持体で行われ、次いで、分化中の細胞が、成熟肝実質細胞様細胞への分化を促進するためのラミニン及び／またはコラーゲンを含む第2の支持体に移される。幾つかの実施形態では、分化中の細胞は、分化の約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、または24日目に第2の支持体に移される。幾つかの実施形態では、第1の支持体は、ゼラチンを含む。幾つかの実施形態では、第2の支持体は、ウシ胎児血清を更に含む。成熟肝実質細胞様細胞への分化を促進する例示的なECM成分としては、例えば、組換えLaminin-411(BioLamina)が挙げられる。

【0868】

幾つかの実施形態では、分化は、ハイドロゲル支持体を使用して実行される。ハイドロゲル支持体は、2Dまたは3D培養システムの一部として提供される分化方法と共に使用され得る。幾つかの実施形態では、ハイドロゲルマトリックスは、2、1、0.5、または0.1kPa未満の弾性率を有する。幾つかの実施形態では、ハイドロゲルマトリックスは、10Pa~5kPa、10Pa~1kPa、8Pa~1kPa、50Pa~5kPa、100Pa~5kPa、200Pa~5kPa、250Pa~5kPa、500Pa~5kPa、750Pa~5kPa、1kPa~5kPa、10Pa~5kPa、10Pa~1kPa、10Pa~900Pa、10Pa~800Pa、10Pa~700Pa、10Pa~600Pa、10Pa~500Pa、10Pa~400Pa、10Pa~300Pa、10Pa~200Pa、10Pa~100Pa、10Pa~50Pa、または10Pa~25Paの弾性率を有する。幾つかの実施形態では、ハイドロゲルマトリックスは、少なくとも1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50kPaの弾性率を有する。幾つかの実施形態では、ハイドロゲルマトリックスは、1~100kPa、5~100kPa、10~100kPa、25~100kPa、50

～100kPa、1～100kPa、1～50kPa、1～40kPa、1～30kPa、
 1～25kPa、1～20kPa、1～15kPa、1～10kPa、10～50kPa、
 10～40kPa、10～35kPa、10～30kPa、10～25kPa、10
 ～20kPa、10～15kPa、1～10kPa、20～50kPa、20～40kPa、
 20～35kPa、20～30kPa、20～25kPa、30～50kPa、30
 ～40kPa、30～35kPa、または40～50kPaの弾性率を有する。ある特定
 の実施形態では、ハイドロゲルマトリックスは、Yes 関連タンパク質1 (YAP1) が
 成熟肝実質細胞様細胞への分化を妨げるのを防止する弾性率を有する。硬いマトリックス
 は、核YAP1による肝実質細胞様前駆細胞の細胞拡散を引き起こすと考えられている。
 かかる細胞拡散は肝実質細胞様前駆細胞を胆管細胞に分化させ、肝実質細胞への分化を妨
 げる。従って、幾つかの実施形態では、弾性ハイドロゲル支持体 (2kPa未満) は、有利
 には、成熟肝実質細胞様細胞への分化を促進する。幾つかの実施形態では、ハイドロゲ
 ル支持体は、1種以上のECM成分に結合している。幾つかの実施形態では、ECM成分
 は、少なくとも50、75、100、150、200、250、300、400、450
 、500、600、700、800、900、または1,000μMのECMの密度でハ
 イドロゲルマトリックスに結合している。幾つかの実施形態では、ECM成分は、50、
 75、100、150、200、250、300、400、450、500、600、7
 00、800、900、または1,000μM未満のECMの密度でハイドロゲルマトリ
 ックスに結合している。幾つかの実施形態では、ECM成分は、少なくとも50～5,0
 00μM、50～4,000μM、50～3,000μM、50～2,000μM、50
 ～1,000μM、50～500μM、50～400μM、1～300μM、50～20
 0μM、50～100μM、50～75μM、50～50μM、50～25μM、50～
 10μM、100～5,000μM、100～4,000μM、100～3,000μM
 、100～2,000μM、100～1,000μM、100～1000μM、100～
 400μM、1～300μM、100～200μM、250～5,000μM、500～
 5,000μM、750～5,000μM、1,000～5,000μM、2,000～
 5,000μM、3,000～5,000μM、4,000～5,000μM、250～
 5,000μM、500～5,000μM、750～5,000μM、1,000～5,
 000μM、2,000～5,000μM、3,000～5,000μM、4,000～
 5,000μM、100～1,000μM、200～900μM、300～800μM、
 400～700μM、または500～600μMのECMの密度でハイドロゲルマトリッ
 クスに結合している。幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞への分化は、高密度
 のECM成分を含有する弾性ハイドロゲルの存在下で行われる。低密度のECM成分を含
 む硬いハイドロゲル及び低密度のECM成分を含む弾性ハイドロゲルは、成熟肝実質細胞
 様細胞への成熟を促進する。幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞への分化は、
 高密度のECM成分を含む弾性ハイドロゲルの存在下で行われる。幾つかの実施形態では
 、成熟肝実質細胞様細胞への分化は、低密度のECM成分を含む硬いハイドロゲルの存在
 下で行われる。

10

20

30

40

50

【0869】

幾つかの実施形態では、分化中の細胞は、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUV EC) の存在
 下で共培養される。成熟肝実質細胞様細胞への分化は、インビトロでの尿素形成能を増強
 することが示されている。分化が中間型肝実質細胞様前駆細胞を経由して行われる幾つか
 の実施形態では、肝実質細胞様前駆細胞は、HUV ECの存在下で培養される。幾つかの
 実施形態では、肝実質細胞様前駆細胞は、培養物中でHUV ECと直接接触している。他
 の実施形態では、肝実質細胞様前駆細胞及びHUV ECは、多孔膜により分離された2つ
 の異なる区画 (例えば、トランスウェル培養システム) で培養される。

【0870】

2D接着培養での肝実質細胞分化プロトコール

多能性幹細胞に由来する肝実質細胞様細胞は、2D接着培養システムを使用した方法を
 使用して作製され得る。本方法は、シングルセル継代及びゼノフリーの構成要素を含む。

幾つかの実施形態では、多能性幹細胞は、分化前に多能性を維持するための標準的な細胞培養培地で維持される。

【0871】

幾つかの実施形態では、多能性幹細胞は、0日目に、限定されるものではないが、アクチビンA、bFGF、BMP4、LY294002、CHIR99021が含まれる、1種以上の因子を含む培地で培養される。幾つかの実施形態では、多能性幹細胞は、0日目に、アクチビンA、bFGF、BMP4、LY294002、CHIR99021を含む第1の培地で培養される。幾つかの例では、多能性幹細胞は、本明細書に記載されるものが含まれる、ECMの1種以上の成分上で培養される。

【0872】

幾つかの実施形態では、分化中の細胞は、1日目に、限定されるものではないが、アクチビンA、bFGF、BMP4、及びLY294002が含まれる、1種以上の因子を含む培地で培養される。幾つかの実施形態では、分化中の細胞は、1日目に、アクチビンA、bFGF、BMP4、及びLY294002を含む第2の培地で培養される。幾つかの実施形態では、1日目の培養細胞は、細胞のネットワークを形成する。

【0873】

幾つかの実施形態では、分化中の細胞は、2日目に、限定されるものではないが、アクチビンA及びbFGFが含まれる、1種以上の因子を含む培地で培養される。幾つかの実施形態では、分化中の細胞は、2日目に、アクチビンA及びbFGFを含む第3の培地で培養される。幾つかの例では、培地は、B27サプリメントを更に含む。幾つかの実施形態では、培養細胞は、2日目に、胚体内胚葉様の細胞形態及び／または活性を示す。

【0874】

幾つかの実施形態では、分化中の細胞は、3～7日目に、限定されるものではないが、アクチビンAが含まれる、1種以上の因子を含む培地で培養される。幾つかの実施形態では、分化中の細胞は、3～7日目に、アクチビンAを含む第4の培地で培養される。幾つかの実施形態では、培養細胞は、2～4日目に、中内胚葉様の細胞形態及び／または活性を示す。幾つかの実施形態では、培養細胞は、5～7日目に、胚体内胚葉様の細胞形態及び／または活性を示す。幾つかの実施形態では、約6～7日目の培養細胞は、肝芽細胞様細胞を含む。幾つかの実施形態では、培養細胞は、6～7日目に、肝芽細胞様の細胞形態及び／または活性を示す。

【0875】

幾つかの実施形態では、分化中の細胞は、8～27日目に、限定されるものではないが、オンコスタチンM及びHGFが含まれる、1種以上の因子を含む培地で培養される。幾つかの実施形態では、分化中の細胞は、8～27日目に、オンコスタチンM及びHGFを含む第5の培地で培養される。幾つかの実施形態では、培地は、B27サプリメントを更に含む。幾つかの実施形態では、培養細胞は、8～10日目に、明確な立方体様形態を示す。幾つかの実施形態では、培養細胞は、13～15日目に、多面体形態を示す。幾つかの実施形態では、分化方法の13～15日目に、細胞は肝内胚葉細胞の形態及び／または活性を示す。

【0876】

幾つかの実施形態では、分化中の細胞は、28～35日目に、限定されるものではないが、オンコスタチンM、HGF、及びフォスコリンが含まれる、1種以上の因子を含む培地で培養される。幾つかの実施形態では、分化中の細胞は、28～35日目に、オンコスタチンM、HGF、及びフォスコリンを含む第6の培地で培養される。幾つかの実施形態では、培地は、化学合成脂質、ならびにインスリン、トランスフェリン、及びセレニウムの混合物を更に含む。

【0877】

幾つかの実施形態では、細胞は、20～28日目に、肝実質細胞様細胞（未成熟肝実質細胞様細胞）の形態及び／または活性を示す。幾つかの実施形態では、細胞は、25～35日目に、肝実質細胞様細胞（成熟肝実質細胞様細胞）の形態及び／または活性を示す。

10

20

30

40

50

幾つかの実施形態では、細胞は、20～35日目に、未成熟肝実質細胞様細胞、成熟肝実質細胞様細胞、またはその両方が含まれる、肝実質細胞様細胞を含む。幾つかの実施形態では、本技術により分化された細胞は、少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上の未成熟肝実質細胞様細胞を含む。幾つかの実施形態では、本技術により分化された細胞は、少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上の成熟肝実質細胞様細胞を含む。

【0878】

幾つかの実施形態では、成熟肝実質細胞様細胞は、肝実質細胞、例えば、限定されるものではないが、初代肝実質細胞を維持するため、及び／または増殖させるための標準的な培地で培養される。本明細書に記載される培地組成物のいずれかは、限定されるものではないが、非必須アミノ酸、グルタミン、及びそれらの類似体が含まれる、健全な細胞を維持するのに必須の成分も含有し得る。

【0879】

幾つかの実施形態では、多能性幹細胞は、0日目に、アクチビンA、bFGF、BMP4、LY294002、CHIR99021を含む第1の培地で培養される。その後、幾つかの実施形態では、細胞は、1日目に、アクチビンA、bFGF、BMP4、及びLY294002を含む第2の培地で培養される。その後、幾つかの実施形態では、分化中の細胞は、2日目に、アクチビンA及びbFGFを含む第3の培地で培養される。その後、幾つかの実施形態では、分化中の細胞は、3～7日目に、アクチビンAを含む第4の培地で培養される。その後、幾つかの実施形態では、分化中の細胞は、8～27日目に、オンコスタチンM及びHGFを含む第5の培地で培養される。その後、幾つかの実施形態では、分化中の細胞は、28～35日目に、オンコスタチンM、HGF、及びフォルスコリンを含む第6の培地で培養される。

【0880】

幾つかの実施形態では、LY294002は、約1～20 μ M、約1～15 μ M、約1～10 μ M、約1～8 μ M、約1～5 μ M、約2～15 μ M、約2～10 μ M、約2～8 μ M、約1～5 μ M、約1 μ M、約2 μ M、約3 μ M、約4 μ M、約5 μ M、約6 μ M、約7 μ M、約8 μ M、約9 μ M、約10 μ M、約11 μ M、約12 μ M、約13 μ M、約14 μ M、約15 μ M、約16 μ M、約17 μ M、約18 μ M、約19 μ M、または約20 μ Mの濃度で存在する。多数の実施形態では、培地は、10 μ Mの濃度でLY294002を含む。

【0881】

幾つかの実施形態では、CHIR-99021は、約1～15 μ M、約1～10 μ M、約1～8 μ M、約1～5 μ M、約2～15 μ M、約2～10 μ M、約2～8 μ M、約1～5 μ M、約1 μ M、約2 μ M、約3 μ M、約4 μ M、約5 μ M、約6 μ M、約7 μ M、約8 μ M、約9 μ M、約10 μ M、約11 μ M、約12 μ M、約13 μ M、約14 μ M、または約15 μ Mの濃度で存在する。多数の実施形態では、培地は、3 μ Mの濃度でCHIR-99021を含む。

【0882】

幾つかの実施形態では、アクチビンAは、約20 ng/ml～200 ng/ml、約25 ng/ml～200 ng/ml、約30 ng/ml～200 ng/ml、約40 ng/ml～200 ng/ml、約50 ng/ml～200 ng/ml、約60 ng/ml～200 ng/ml、約70 ng/ml～200 ng/ml、約80 ng/ml～200 ng/ml、約90 ng/ml～200 ng/ml、約100 ng/ml～200 ng/ml、約20 ng/ml～100 ng/ml、約30 ng/ml～100 ng/ml、約40 ng/ml～100 ng/ml、約50 ng/ml～100 ng/ml、約60 ng/ml～100 ng/ml、約70 ng/ml～100 ng/ml、約20 ng/ml、約2

10

20

30

40

50

5 ng/ml、約30 ng/ml、約35 ng/ml、約40 ng/ml、約45 ng/ml、約50 ng/ml、約55 ng/ml、約60 ng/ml、約65 ng/ml、約70 ng/ml、約75 ng/ml、約80 ng/ml、約85 ng/ml、約90 ng/ml、約95 ng/ml、約100 ng/ml、約105 ng/ml、約110 ng/ml、約115 ng/ml、約120 ng/ml、約125 ng/ml、約130 ng/ml、約135 ng/ml、約140 ng/ml、約145 ng/ml、約150 ng/ml、約155 ng/ml、約160 ng/ml、約165 ng/ml、約170 ng/ml、約175 ng/ml、約180 ng/ml、約185 ng/ml、約190 ng/ml、約195 ng/ml、または約200 ng/mlの濃度で存在する。多数の実施形態では、培地は、50 ng/mlまたは100 ng/mlの濃度でアクチビンAを含む。

10

【0883】

幾つかの実施形態では、bFGFは、約5 ng/ml、約7 ng/ml、約8 ng/ml、約10 ng/ml、約13 ng/ml、約15 ng/ml、約17 ng/ml、約18 ng/ml、約20 ng/ml、約23 ng/ml、約25 ng/ml、約27 ng/ml、約28 ng/ml、約30 ng/ml、約35 ng/ml、約37 ng/ml、約38 ng/ml、約40 ng/ml、約43 ng/ml、約45 ng/ml、約47 ng/ml、約48 ng/ml、約50 ng/ml、約51 ng/ml、約52 ng/ml、約53 ng/ml、約55 ng/ml、約58 ng/ml、約5 ng/ml~40 ng/ml、約5 ng/ml~30 ng/ml、約10 ng/ml~40 ng/ml、約5 ng/ml~20 ng/ml、または約10 ng/ml~50 ng/mlの濃度で存在する。

20

幾つかの実施形態では、培地は、80 ng/mlの濃度でbFGFを含む。

【0884】

幾つかの実施形態では、BMP4は、約5 ng/ml、約7 ng/ml、約8 ng/ml、約10 ng/ml、約13 ng/ml、約15 ng/ml、約17 ng/ml、約18 ng/ml、約20 ng/ml、約23 ng/ml、約25 ng/ml、約27 ng/ml、約28 ng/ml、約30 ng/ml、約35 ng/ml、約37 ng/ml、約38 ng/ml、約40 ng/ml、約43 ng/ml、約45 ng/ml、約47 ng/ml、約48 ng/ml、約50 ng/ml、約51 ng/ml、約52 ng/ml、約53 ng/ml、約55 ng/ml、約58 ng/ml、約5 ng/ml~40 ng/ml、約5 ng/ml~30 ng/ml、約10 ng/ml~40 ng/ml、約5 ng/ml~20 ng/ml、または約10 ng/ml~50 ng/mlの濃度で存在する。

30

幾つかの実施形態では、培地は、10 ng/mlの濃度でBMP4を含む。

【0885】

幾つかの実施形態では、OSMは、約5 ng/ml、約7 ng/ml、約8 ng/ml、約10 ng/ml、約13 ng/ml、約15 ng/ml、約17 ng/ml、約18 ng/ml、約20 ng/ml、約23 ng/ml、約25 ng/ml、約27 ng/ml、約28 ng/ml、約30 ng/ml、約35 ng/ml、約37 ng/ml、約38 ng/ml、約40 ng/ml、約43 ng/ml、約45 ng/ml、約47 ng/ml、約48 ng/ml、約50 ng/ml、約51 ng/ml、約52 ng/ml、約53 ng/ml、約55 ng/ml、約58 ng/ml、約5 ng/ml~50 ng/ml、約5 ng/ml~40 ng/ml、約5 ng/ml~30 ng/ml、約30 ng/ml~40 ng/ml、約5 ng/ml~20 ng/ml、または約30 ng/ml~50 ng/mlの濃度で存在する。幾つかの実施形態では、培地は、10 ng/mlの濃度でOSMを含む。

40

【0886】

幾つかの実施形態では、HGFは、約25 ng/ml~200 ng/ml、約30 ng/ml~200 ng/ml、約40 ng/ml~200 ng/ml、約50 ng/ml~200 ng/ml、約60 ng/ml~200 ng/ml、約70 ng/ml~200 ng/ml、約80 ng/ml~200 ng/ml、約90 ng/ml~200 ng/ml、約100 ng/ml~200 ng/ml、約30 ng/ml~100 ng/ml、約4

50

0 ng/ml ~ 100 ng/ml、約 50 ng/ml ~ 100 ng/ml、約 60 ng/ml ~ 100 ng/ml、約 70 ng/ml ~ 100 ng/ml、約 25 ng/ml、約 30 ng/ml、約 35 ng/ml、約 40 ng/ml、約 45 ng/ml、約 50 ng/ml、約 55 ng/ml、約 60 ng/ml、約 65 ng/ml、約 70 ng/ml、約 75 ng/ml、約 80 ng/ml、約 85 ng/ml、約 90 ng/ml、約 95 ng/ml、約 100 ng/ml、約 105 ng/ml、約 110 ng/ml、約 115 ng/ml、約 120 ng/ml、約 125 ng/ml、約 130 ng/ml、約 135 ng/ml、約 140 ng/ml、約 145 ng/ml、約 150 ng/ml、約 155 ng/ml、約 160 ng/ml、約 165 ng/ml、約 170 ng/ml、約 175 ng/ml、約 180 ng/ml、約 185 ng/ml、約 190 ng/ml、約 195 ng/ml、または約 200 ng/ml の濃度で存在する。幾つかの実施形態では、培地は、50 ng/ml の濃度で HGF を含む。

10

【0887】

幾つかの実施形態では、フォルスコリンは、約 1 ~ 20 μ M、約 1 ~ 15 μ M、約 1 ~ 10 μ M、約 1 ~ 8 μ M、約 1 ~ 5 μ M、約 2 ~ 15 μ M、約 2 ~ 10 μ M、約 2 ~ 8 μ M、約 1 ~ 5 μ M、約 1 μ M、約 2 μ M、約 3 μ M、約 4 μ M、約 5 μ M、約 6 μ M、約 7 μ M、約 8 μ M、約 9 μ M、約 10 μ M、約 11 μ M、約 12 μ M、約 13 μ M、約 14 μ M、約 15 μ M、約 16 μ M、約 17 μ M、約 18 μ M、約 19 μ M、または約 20 μ M の濃度で存在する。幾つかの実施形態では、培地は、10 μ M の濃度でフォルスコリンを含む。

20

【0888】

3D 懸濁培養での肝実質細胞分化プロトコール

多能性幹細胞に由来する肝実質細胞様細胞は、3D 懸濁培養システムを使用した方法を使用して作製され得る。幾つかの実施形態では、多能性幹細胞は、分化前に多能性を維持するための標準的な細胞培養培地で維持される。

【0889】

幾つかの実施形態では、細胞は、0 日目に、限定されるものではないが、インスリン、PIK-90、アクチビン A、bFGF、BMP4、及び CHIR99021 が含まれる、1 種以上の因子を含む培地で培養される。幾つかの実施形態では、多能性幹細胞は、0 日目に、インスリン、PIK-90、アクチビン A、bFGF、BMP4、及び CHIR99021 を含む第 1 の培地で培養される。幾つかの実施形態では、多能性幹細胞は、本明細書に記載されるものが含まれる、支持体表面への低接着または無接着を促進する固体支持体上に培養される。幾つかの実施形態では、培地は、以下の成分のうちの 1 つ以上を更に含む：ヒト血清アルブミン、化学合成脂質、非必須アミノ酸、アスコルビン酸-2-ホスフェート、ホロトランスフェリン、亜セレン酸ナトリウム、ならびに肝実質細胞への分化及び／または細胞の健全性を促進するための任意の追加の試薬。

30

【0890】

幾つかの実施形態では、細胞は、1 mL 当たり約 500,000 ~ 約 5,000,000 個細胞、例えば、1 mL 当たり約 500,000 ~ 5,000,000、約 500,000 ~ 4,500,000、約 500,000 ~ 4,000,000、約 500,000 ~ 3,500,000、約 500,000 ~ 3,000,000、約 500,000 ~ 2,500,000、約 500,000 ~ 2,000,000、約 500,000 ~ 1,500,000、約 500,000 ~ 1,000,000、約 1,000,000 ~ 5,000,000、約 1,000,000 ~ 4,500,000、約 1,000,000 ~ 4,000,000、約 1,000,000 ~ 3,500,000、約 1,000,000 ~ 3,000,000、約 1,000,000 ~ 2,500,000、約 1,000,000 ~ 2,000,000、約 1,000,000 ~ 1,500,000 個細胞の細胞濃度（細胞密度）で培養される。

40

【0891】

幾つかの実施形態では、細胞は、酸素圧低下条件下で培養される。幾つかの実施形態で

50

は、酸素圧低下条件は、約 0 % ~ 約 5 % 酸素の酸素含量、例えば、約 0 % ~ 5 %、約 0 % ~ 4 %、約 0 % ~ 3 %、約 0 % ~ 2 %、約 0 % ~ 3 %、約 0 % ~ 4 %、約 1 % ~ 5 %、約 1 % ~ 4 %、約 1 % ~ 3 %、約 1 % ~ 2 %、約 2 % ~ 3 %、約 3 % ~ 4 %、約 4 % ~ 5 %、約 2 % ~ 5 %、及び約 3 % ~ 5 % の酸素含量を含む。幾つかの実施形態では、細胞は凝集塊を形成する。

【0892】

幾つかの実施形態では、細胞凝集塊は、約 100 ~ 250 μm の直径、例えば、約 100 ~ 250、約 100 ~ 240、約 100 ~ 230、約 100 ~ 220、約 100 ~ 210、約 100 ~ 200、約 110 ~ 250、約 120 ~ 250、約 130 ~ 250、約 140 ~ 250、約 150 ~ 250、約 160 ~ 250、約 100 ~ 200、約 100 ~ 190、約 100 ~ 180、約 100 ~ 170、約 140 ~ 250、約 140 ~ 250、約 140 ~ 240、約 140 ~ 230、約 140 ~ 220、約 140 ~ 210、約 140 ~ 200、約 140 ~ 190 μm の直径である。

【0893】

幾つかの実施形態では、分化中の細胞凝集塊は、1 日目に、限定されるものではないが、インスリン、PIK-90、アクチビン A、bFGF、及び BMP 4 が含まれる、1 種以上の因子を含む培地で培養される。幾つかの実施形態では、細胞凝集塊は、1 日目に、インスリン、PIK-90、アクチビン A、bFGF、及び BMP 4 を含む第 2 の培地で培養される。幾つかの実施形態では、培地は、以下の成分のうちの 1 つ以上を更に含む：ヒト血清アルブミン、化学合成脂質、非必須アミノ酸、アスコルビン酸-2-ホスフェート、ホロトランスフェリン、亜セレン酸ナトリウム、ならびに肝実質細胞への分化及び／または細胞の健全性を促進するための任意の追加の試薬。幾つかの実施形態では、概説される細胞は、0 ~ 21 日目まで酸素圧低下条件下で培養される。

【0894】

幾つかの実施形態では、分化中の細胞凝集塊は、2 日目に、限定されるものではないが、インスリン、PIK-90、アクチビン A、及び bFGF が含まれる、1 種以上の因子を含む培地で培養される。幾つかの実施形態では、細胞凝集塊は、2 日目に、インスリン、PIK-90、アクチビン A、及び bFGF を含む第 3 の培地で培養される。幾つかの実施形態では、培地は、以下の成分のうちの 1 つ以上を更に含む：ヒト血清アルブミン、化学合成脂質、非必須アミノ酸、アスコルビン酸-2-ホスフェート、ホロトランスフェリン、亜セレン酸ナトリウム、ならびに肝実質細胞への分化及び／または細胞の健全性を促進するための任意の追加の試薬。

【0895】

幾つかの実施形態では、分化中の細胞凝集塊は、3 ~ 5 日目に、限定されるものではないが、B27 サプリメント及びアクチビン A が含まれる、1 種以上の因子を含む培地で培養される。幾つかの実施形態では、細胞凝集塊は、3 ~ 5 日目に、B27 サプリメント及びアクチビン A を含む第 4 の培地で培養される。幾つかの実施形態では、培地は、幾つかの実施形態を更に含み、培地は、以下の成分のうちの 1 つ以上も含む：ヒト血清アルブミン、化学合成脂質、非必須アミノ酸、アスコルビン酸-2-ホスフェート、ホロトランスフェリン、亜セレン酸ナトリウム、ならびに肝実質細胞への分化及び／または細胞の健全性を促進するための任意の追加の試薬。培地は、毎日、1 日おきに、または必要に応じて、更新され得るか、交換され得るか、または取り替えられ得る。

【0896】

幾つかの実施形態では、分化中の細胞凝集塊は、6 ~ 9 日目に、限定されるものではないが、B27 サプリメント、BMP 4、及び FGF 10 が含まれる、1 種以上の因子を含む培地で培養される。幾つかの実施形態では、細胞凝集塊は、6 ~ 9 日目に、B27 サプリメント、BMP 4、及び FGF 10 を含む第 5 の培地で培養される。幾つかの実施形態では、培地は、以下の成分のうちの 1 つ以上を更に含む：ヒト血清アルブミン、化学合成脂質、非必須アミノ酸、アスコルビン酸-2-ホスフェート、ホロトランスフェリン、亜セレン酸ナトリウム、ならびに肝実質細胞への分化及び／または細胞の健全性を促進する

ための任意の追加の試薬。培地は、毎日、1日おきに、または必要に応じて、更新され得るか、交換され得るか、または取り替えられ得る。

【0897】

幾つかの実施形態では、分化中の細胞凝集塊は、10～14日目に、限定されるものではないが、HGFが含まれる、1種以上の因子を含む培地で培養される。幾つかの実施形態では、細胞凝集塊は、10～14日目に、HGFを含む第6の培地で培養される。幾つかの実施形態では、培地は、化学合成脂質、ならびにインスリン、トランスフェリン、及びセレンウムの混合物を更に含む。培地は、毎日、1日おきに、または必要に応じて、更新され得るか、交換され得るか、または取り替えられ得る。

【0898】

幾つかの実施形態では、分化中の細胞は、15～27日目に、限定されるものではないが、オンコスタチンMが含まれる、1種以上の因子を含む培地で培養される。幾つかの実施形態では、細胞凝集塊は、15～27日目に、オンコスタチンMを含む第7の培地で培養される。幾つかの実施形態では、分化のこの段階の培地は、HGFを含まない。幾つかの実施形態では、培地は、化学合成脂質、ならびにインスリン、トランスフェリン、及びセレンウムの混合物を更に含む。培地は、毎日、1日おきに、または必要に応じて、更新され得るか、交換され得るか、または取り替えられ得る。

【0899】

幾つかの実施形態では、分化中の細胞は、28～35日目に、限定されるものではないが、オンコスタチンM及びフォルスコリンが含まれる、1種以上の因子を含む培地で培養される。多数の実施形態では、細胞凝集塊は、28～35日目に、オンコスタチンM及びフォルスコリンを含む第8の培地で培養される。幾つかの実施形態では、分化のこの段階の培地は、HGFを含まない。幾つかの実施形態では、培地は、化学合成脂質、ならびにインスリン、トランスフェリン、及びセレンウムの混合物を更に含む。培地は、毎日、1日おきに、または必要に応じて、更新され得るか、交換され得るか、または取り替えられ得る。

【0900】

幾つかの実施形態では、細胞は、15～35日目に、未成熟肝実質細胞様細胞、成熟肝実質細胞様細胞、またはその両方が含まれる、肝実質細胞様細胞を含む。幾つかの実施形態では、本技術により分化された細胞は、少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上の未成熟肝実質細胞様細胞を含む。幾つかの実施形態では、本技術により分化された細胞は、少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上の成熟肝実質細胞様細胞を含む。

【0901】

幾つかの実施形態では、細胞凝集塊は、正常酸素圧条件（正常酸素条件）下で培養される。幾つかの実施形態では、正常酸素圧条件は、約20%～約22%酸素の酸素含量、例えば、約20%～22%、約20%～21%、約21%～22%、約20%、約21%、及び約22%の酸素含量を含む。換言すれば、正常酸素圧条件は、周囲濃度のO₂を含む。幾つかの実施形態では、細胞凝集塊は、少なくとも15～27日目、21～27日目、20～28日目、20～35、27～35日目、28～35日目、29～35日目、または30～35日目に正常酸素圧条件下で培養される。

【0902】

幾つかの実施形態では、多能性幹細胞は、0日目に、インスリン、PIK-90、アクチビンA、bFGF、BMP4、及びCHIR99021を含む第1の培地で培養される。細胞は0日目に凝集塊（スフェロイドとも称される）を形成する。その後、幾つかの実施形態では、細胞凝集塊は、1日目に、インスリン、PIK-90、アクチビンA、bFGF、及びBMP4を含む第2の培地で培養される。その後、幾つかの実施形態では、細

10

20

30

40

50

胞凝集塊は、2日目に、インスリン、PIK-90、アクチビンA、及びbFGFを含む第3の培地で培養される。その後、幾つかの実施形態では、細胞凝集塊は、3～5日目に、B27サプリメント及びアクチビンAを含む第4の培地で培養される。その後、幾つかの実施形態では、細胞凝集塊は、6～9日目に、B27サプリメント、BMP4、及びFGF10を含む第5の培地で培養される。その後、幾つかの実施形態では、細胞凝集塊は、10～14日目に、HGFを含む第6の培地で培養される。その後、幾つかの実施形態では、細胞凝集塊は、15～27日目に、オンコスタチンMを含む第7の培地で培養される。その後、幾つかの実施形態では、細胞凝集塊は、28～35日目に、オンコスタチンM及びフォスコリンを含む第8の培地で培養される。

【0903】

幾つかの実施形態では、分化中の細胞は、0～2日目に胚体内胚葉細胞の特徴を示す。幾つかの実施形態では、分化中の細胞は、3～5日目に前方胚体内胚葉細胞の特徴を示す。幾つかの実施形態では、分化中の細胞は、6～9日目に前腸内胚葉細胞の特徴を示す。幾つかの実施形態では、分化中の細胞は、10～14日目に肝内胚葉細胞の特徴を示す。幾つかの実施形態では、分化中の細胞は、15～35日目に未成熟肝実質細胞様細胞の特徴を示す。

【0904】

幾つかの実施形態では、インスリンは、約0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ～約0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ～約0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ～約0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ～約0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ～約0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、または約0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ～約0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で存在する。幾つかの実施形態では、培地は、0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でインスリンを含む。

【0905】

幾つかの実施形態では、PIK-90は、約0.1 μM 、約0.2 μM 、約0.3 μM 、約0.4 μM 、約0.5 μM 、約0.6 μM 、約0.1 μM ～約0.6 μM 、約0.1 μM ～約0.5 μM 、約0.1 μM ～約0.4 μM 、約0.2 μM ～約0.6 μM 、約0.2 μM ～約0.5 μM 、または約0.2 μM ～約0.4 μM の濃度で存在する。幾つかの実施形態では、培地は、0.1 μM の濃度でPIK-90を含む。

【0906】

幾つかの実施形態では、CHIR-99021は、約1～15 μM 、約1～10 μM 、約1～8 μM 、約1～5 μM 、約2～15 μM 、約2～10 μM 、約2～8 μM 、約1～5 μM 、約1 μM 、約2 μM 、約3 μM 、約4 μM 、約5 μM 、約6 μM 、約7 μM 、約8 μM 、約9 μM 、約10 μM 、約11 μM 、約12 μM 、約13 μM 、約14 μM 、または約15 μM の濃度で存在する。幾つかの実施形態では、培地は、3 μM の濃度でCHIR-99021を含む。

【0907】

幾つかの実施形態では、アクチビンAは、約20 ng/ml ～200 ng/ml 、約25 ng/ml ～200 ng/ml 、約30 ng/ml ～200 ng/ml 、約40 ng/ml ～200 ng/ml 、約50 ng/ml ～200 ng/ml 、約60 ng/ml ～200 ng/ml 、約70 ng/ml ～200 ng/ml 、約80 ng/ml ～200 ng/ml 、約90 ng/ml ～200 ng/ml 、約100 ng/ml ～200 ng/ml 、約20 ng/ml ～100 ng/ml 、約30 ng/ml ～100 ng/ml 、約40 ng/ml ～100 ng/ml 、約50 ng/ml ～100 ng/ml 、約60 ng/ml ～100 ng/ml 、約70 ng/ml ～100 ng/ml 、約20 ng/ml 、約25 ng/ml 、約30 ng/ml 、約35 ng/ml 、約40 ng/ml 、約45 ng/ml 、約50 ng/ml 、約55 ng/ml 、約60 ng/ml 、約65 ng/ml 、約70 ng/ml 、約75 ng/ml 、約80 ng/ml 、約85 ng/ml 、約90 ng/ml 、約95 ng/ml 、約100 ng/ml 、約105 ng/ml 、約110 ng/ml 、

ml、約115 ng/ml、約120 ng/ml、約125 ng/ml、約130 ng/ml、約135 ng/ml、約140 ng/ml、約145 ng/ml、約150 ng/ml、約155 ng/ml、約160 ng/ml、約165 ng/ml、約170 ng/ml、約175 ng/ml、約180 ng/ml、約185 ng/ml、約190 ng/ml、約195 ng/ml、または約200 ng/mlの濃度で存在する。幾つかの実施形態では、培地は、50 ng/mlまたは100 ng/mlの濃度でアクチビンAを含む。

【0908】

幾つかの実施形態では、bFGFは、約5 ng/ml、約7 ng/ml、約8 ng/ml、約10 ng/ml、約13 ng/ml、約15 ng/ml、約17 ng/ml、約18 ng/ml、約20 ng/ml、約23 ng/ml、約25 ng/ml、約27 ng/ml、約28 ng/ml、約30 ng/ml、約35 ng/ml、約37 ng/ml、約38 ng/ml、約40 ng/ml、約43 ng/ml、約45 ng/ml、約47 ng/ml、約48 ng/ml、約50 ng/ml、約51 ng/ml、約52 ng/ml、約53 ng/ml、約55 ng/ml、約58 ng/ml、約5 ng/ml~40 ng/ml、約5 ng/ml~30 ng/ml、約10 ng/ml~40 ng/ml、約5 ng/ml~20 ng/ml、または約10 ng/ml~50 ng/mlの濃度で存在する。幾つかの実施形態では、培地は、10 ng/mlまたは40 ng/mlの濃度でbFGFを含む。

【0909】

幾つかの実施形態では、BMP4は、約5 ng/ml、約7 ng/ml、約8 ng/ml、約10 ng/ml、約13 ng/ml、約15 ng/ml、約17 ng/ml、約18 ng/ml、約20 ng/ml、約23 ng/ml、約25 ng/ml、約27 ng/ml、約28 ng/ml、約30 ng/ml、約35 ng/ml、約37 ng/ml、約38 ng/ml、約40 ng/ml、約43 ng/ml、約45 ng/ml、約47 ng/ml、約48 ng/ml、約50 ng/ml、約51 ng/ml、約52 ng/ml、約53 ng/ml、約55 ng/ml、約58 ng/ml、約5 ng/ml~40 ng/ml、約5 ng/ml~30 ng/ml、約10 ng/ml~40 ng/ml、約5 ng/ml~20 ng/ml、または約10 ng/ml~50 ng/mlの濃度で存在する。幾つかの実施形態では、培地は、B10 ng/mlまたは20 ng/mlの濃度でBMP4を含む。

【0910】

幾つかの実施形態では、OSMは、約5 ng/ml、約7 ng/ml、約8 ng/ml、約10 ng/ml、約13 ng/ml、約15 ng/ml、約17 ng/ml、約18 ng/ml、約20 ng/ml、約23 ng/ml、約25 ng/ml、約27 ng/ml、約28 ng/ml、約30 ng/ml、約35 ng/ml、約37 ng/ml、約38 ng/ml、約40 ng/ml、約43 ng/ml、約45 ng/ml、約47 ng/ml、約48 ng/ml、約50 ng/ml、約51 ng/ml、約52 ng/ml、約53 ng/ml、約55 ng/ml、約58 ng/ml、約5 ng/ml~50 ng/ml、約5 ng/ml~40 ng/ml、約5 ng/ml~30 ng/ml、約30 ng/ml~40 ng/ml、約5 ng/ml~20 ng/ml、または約30 ng/ml~50 ng/mlの濃度で存在する。幾つかの実施形態では、培地は、30 ng/mlの濃度でOSMを含む。

【0911】

幾つかの実施形態では、HGFは、約25 ng/ml~200 ng/ml、約30 ng/ml~200 ng/ml、約40 ng/ml~200 ng/ml、約50 ng/ml~200 ng/ml、約60 ng/ml~200 ng/ml、約70 ng/ml~200 ng/ml、約80 ng/ml~200 ng/ml、約90 ng/ml~200 ng/ml、約100 ng/ml~200 ng/ml、約30 ng/ml~100 ng/ml、約40 ng/ml~100 ng/ml、約50 ng/ml~100 ng/ml、約60 ng/ml~

ml~100ng/ml、約70ng/ml~100ng/ml、約25ng/ml、約30ng/ml、約35ng/ml、約40ng/ml、約45ng/ml、約50ng/ml、約55ng/ml、約60ng/ml、約65ng/ml、約70ng/ml、約75ng/ml、約80ng/ml、約85ng/ml、約90ng/ml、約95ng/ml、約100ng/ml、約105ng/ml、約110ng/ml、約115ng/ml、約120ng/ml、約125ng/ml、約130ng/ml、約135ng/ml、約140ng/ml、約145ng/ml、約150ng/ml、約155ng/ml、約160ng/ml、約165ng/ml、約170ng/ml、約175ng/ml、約180ng/ml、約185ng/ml、約190ng/ml、約195ng/ml、または約200ng/mlの濃度で存在する。幾つかの実施形態では、培地は、50ng/mlの濃度でHGFを含む。

10

【0912】

幾つかの実施形態では、フォルスコリンは、約1~20μM、約1~15μM、約1~10μM、約1~8μM、約1~5μM、約2~15μM、約2~10μM、約2~8μM、約1~5μM、約1μM、約2μM、約3μM、約4μM、約5μM、約6μM、約7μM、約8μM、約9μM、約10μM、約11μM、約12μM、約13μM、約14μM、約15μM、約16μM、約17μM、約18μM、約19μM、または約20μMの濃度で存在する。幾つかの実施形態では、培地は、10μMの濃度でフォルスコリンを含む。

【0913】

本明細書に記載される肝実質細胞は、肝機能障害に関連する疾患または状態を処置するために使用され得る。

20

【0914】

肝疾患を有する対象を処置する方法が記載される。幾つかの実施形態では、本方法は、例えば、インビボで肝幹細胞を対象の肝臓と接触させることにより、または対象の肝臓に肝幹細胞を移植することにより、本明細書に記載される肝幹細胞を対象に投与することを含み、ここで、投与または移植された細胞は、対象の肝臓に統合され、それを再構築し、これにより、肝疾患を処置する。幾つかの実施形態では、本方法は、例えば、分化した肝幹細胞もしくは幹細胞に由来する細胞をインビボで対象の肝臓と接触させることにより、または肝幹細胞もしくは幹細胞に由来する細胞を対象の肝臓に移植することにより、本明細書に記載される分化した肝幹細胞または幹細胞に由来する細胞を対象に投与することを含み、ここで、投与または移植された細胞は、対象の肝臓に統合され、それを再構築し、これにより、肝疾患を処置する。幾つかの実施形態では、肝疾患は、代謝疾患、自己免疫疾患、感染性疾患、薬剤誘発性急性及び慢性肝不全、硬変、ならびに肝臓癌の群から選択される。

30

【0915】

例えば、本明細書に記載される肝実質細胞は、肝硬変を処置するために使用され得る。従って、かかる肝実質細胞は、肝硬変を有する患者の肝再生のために使用され得る。

【0916】

肝幹細胞(LSC)ならびにそれらの分化した肝実質細胞(dHep)及び胆管細胞は、異なる肝疾患により引き起こされた肝硬変を処置する能力を有する。インビトロで誘導された自家LSC、dHep、及び胆管細胞は、肝不全をレスキューし、肝硬変を低減するために同じ患者に送達され得る。LSCは、同じ患者に由来し得、増殖させるためにインビトロで培養され得る。dHep及び胆管細胞は、LSCからインビトロで分化される。これらの幹細胞及び分化した細胞は自家であり、患者において移植拒絶反応を誘発しない。

40

【0917】

肝幹細胞(LSC)ならびにそれらの分化した肝実質細胞(dHep)及び胆管細胞は、異なる肝疾患により引き起こされた肝硬変を処置する能力を有する。インビトロで誘導された同種異系LSC、dHep、及び胆管細胞は、肝不全をレスキューし、肝硬変を低

50

減するために患者に送達され得る。LSCは、ドナーに由来し得、増殖させるためにインビトロで培養され得る。dHep及び胆管細胞は、LSCからインビトロで分化され得る。これらの幹細胞及び分化した細胞は同種異系であり、本明細書に記載される低免疫改変の一部または全てに供される場合、患者において移植拒絶反応を誘発しない。

【0918】

WO2016200340A1は、肝幹細胞及び分化した肝幹細胞（dHep）が、マウスに肝硬変を誘発するためにチオアセタミドで処理されたマウスに移植される場合に、肝硬変表現型をレスキューしたことを実証する。チオアセタミド投与を2～3ヵ月間継続することにより、マウスは肝硬変を発症した。WO2016200340A1に記載されるように、肝幹細胞及び肝幹細胞から分化したdHep細胞は、脾臓内注射によりマウスに移植され得る。移植後、マウスは、更に3ヵ月間薬物投与を受け続け得る。マウスの肝臓機能は、3ヵ月目に試験され得る。移植されたマウス群は、移植されていない対照群より高い血清アルブミン値を有し得る。従って、それらの肝臓機能は、部分的にレスキューされ得る。dHEP細胞の移植を受けたマウスの肝臓は、対照群より少ない線維症及び炎症を有し得る。dHepは、移植されたマウス肝臓において再増殖し得る。肝幹細胞及びdHEP細胞の両方がマウス肝臓組織に統合され得、ヒト特異的アルブミンを発現し得る。

【0919】

本明細書に記載される肝実質細胞を使用して処置され得る疾患または障害としては、限定されるものではないが、クリグラールナジャー症候群1型；家族性高コレステロール血症；第V因子欠損症；糖原病I型；乳児レフサム病；進行性家族性肝内胆汁鬱滞症2型；遺伝性高チロシン血症1型；ならびに様々な尿素回路異常症；急性薬剤誘発性肝不全、ウイルス誘発性急性肝不全、特発性急性肝不全、キノコ中毒誘発性急性肝不全、手術後急性肝不全、急性妊娠脂肪肝により誘発される急性肝不全を有する若年及び成人患者が含まれる、急性肝不全；硬変及び／または線維症が含まれる、慢性肝疾患；アルコール摂取、薬剤服用、及び／またはB型肝炎の増悪の急性事象のうちの1つにより引き起こされる慢性肝疾患の急性増悪が挙げられる。従って、患者は、これらまたは他の肝臓状態のうちの1つ以上を有し得る。

【0920】

本明細書に記載される肝実質細胞を使用して処置され得る疾患または障害としては、肝実質細胞特異的な（肝実質細胞内因性の）機能障害が挙げられる。例えば、機能障害、ならびに疾患及び／または障害の病因は、対象内に存在する内在性肝実質細胞の機能障害によるものであり得るか、または主にそれに起因し得る。幾つかの実施形態では、肝実質細胞特異的な機能障害は、遺伝性であり得るか、または対象に受け継がれ得る。幾つかの実施形態では、疾患または障害の病因に、肝実質細胞以外の細胞種は実質的に関与しない。幾つかの実施形態では、疾患または障害は、肝臓機能低下、肝臓疾患（急性または慢性）、または内在性肝実質細胞に由来する他の有害な状態もたらす。従って、幾つかの実施形態では、例えば、疾患が内在性肝実質細胞集団に内因する場合、有効な処置としては、本明細書に記載される肝実質細胞による置換、補充、移植、または再構築が挙げられ得る。理論に拘束されるものではないが、肝実質細胞内因性の疾患／障害において、内在性肝実質細胞の置換及び／または補充は、疾患／障害が移植された肝実質細胞に悪影響を及ぼすことなく、顕著な臨床的改善をもたらし得る。例えば、対象が肝実質細胞機能に影響を及ぼす遺伝的障害（例えば、肝実質細胞のアミノ酸代謝、例えば、高チロシン血症）を有する場合、同種異系移植された肝実質細胞は、対象における疾患／障害の存在による影響をほとんど受けなくてもよい。従って、移植された肝実質細胞は、対象内で実質的に生着し、生存し、増殖し、及び／または再増殖し得、これにより、顕著な良い臨床転帰をもたらす。

【0921】

肝実質細胞特異的な（肝実質細胞内因性の）機能障害を特徴とする疾患または障害は、肝実質細胞に特異的ではなく、肝実質細胞外因的な要因が関与する病因を有する疾患または障害と対照をなすものであり得る。肝実質細胞外因的な要因及び／または病因を有する疾患の例としては、限定されるものではないが、例えば、アルコール性脂肪性肝炎、アル

10

20

30

40

50

コール性肝疾患（ALD）、脂肪肝／非アルコール性脂肪肝（NAFLD）などが挙げられる。肝実質細胞外因的疾患には、外来的であるか、または内在性肝実質細胞の外部に由来する肝臓侵襲、例えば、アルコール、食事、感染症などが関与する。幾つかの実施形態では、本明細書に記載される方法により処置される疾患または障害としては、肝実質細胞特異的な（肝実質細胞内因性の）機能障害ではない疾患または障害が挙げられ得る。

【0922】

肝実質細胞内因性かつ肝実質細胞に関連する疾患の例としては、肝臓関連酵素欠損症、肝実質細胞関連輸送疾患などが挙げられる。このような肝臓関連の欠損症は、後天性または遺伝性の疾患であり得、これには代謝疾患（例えば、肝臓に基づく代謝障害など）が挙げられ得る。遺伝性の肝臓に基づく代謝障害は、限定されるものではないが、例えば、Ishak, Clin Liver Dis (2002) 6: 455-479に記載される疾患のような、「肝臓の遺伝性代謝疾患」と称され得る。肝臓関連の欠損症は、場合によっては、急性及び／または慢性の肝疾患をもたらし得、これは例えば、急性及び／または慢性の肝疾患が、欠損症が未処置のままにされたか、または不十分に処置された結果である場合が含まれる。遺伝性肝臓関連酵素欠損症、肝細胞関連輸送疾患などの非限定的な例としては、クリグラー・ナジャー症候群1型、家族性高コレステロール血症、第VⅡ因子欠損症、糖原病Ⅰ型、乳児レフサム病、進行性家族性肝内胆汁鬱滞2型、遺伝性チロシン血症（例、遺伝性チロシン血症1型）、遺伝性尿素回路異常症、フェニルケトン尿症（PKU）、遺伝性ヘモクロマトーシス、α1アンチトリプシン欠損症（AATD）、ウィルソン病などが挙げられる。少なくとも幾つかの肝臓表現型、肝臓病理、及び／または肝臓関連症状（複数可）を有する代謝疾患が含まれる、肝臓の遺伝性代謝疾患の非限定的な例としては、5β-レダクターゼ欠損症、AAT欠損症、アースコグ症候群、無βリボタンパク質血症、副腎白質ジストロフィー、アルパース病、アルパース症候群、α1-アンチトリプシン欠損症、アンチトロンビンⅢ欠損症、アルギナーゼ欠損症、アルギニノコハク酸尿症、動脈肝異形成症、自己免疫性リンパ球増殖性症候群、良性再発性胆汁鬱滞、ベータサラセミア、ブルーム症候群、バッド・キアリー症候群、糖タンパク質糖鎖不全症候群、セラミダーゼ欠損症、セロイドリポフスチン症、コレステロールエステル蓄積症、コレステリルエステル蓄積症、慢性肉芽腫性、慢性C型肝炎、クリグラー・ナジャー症候群、嚢胞性線維症、シスチン症、真性糖尿病、デュビン・ジョンソン症候群、地方病性チロル肝硬変、赤芽球増殖性プロトポルフィリン症、ファブリー病、家族性高コレステロール血症、家族性脂肪性肝炎、フィブリノゲン蓄積症、ガラクトース血症、ガングリオシド蓄積症、ゴーシェ病、遺伝性ヘモクロマトーシス、1a型糖原病、2型糖原病、3型糖原病、4型糖原病、肉芽腫性疾患、家族性肝アミロイドーシス、遺伝性フルクトース不耐性、遺伝性球状赤血球症、ヘルマンズキー・パドラック症候群、ホモシスチン尿症、高シュウ酸尿症、低βリボタンパク血症、低フィブリノゲン血症、妊娠性肝内胆汁鬱滞、ラフォラ病、リポアミドデヒドロゲナーゼ欠損症、リボタンパク異常症、モーリアック症候群、異染性白質ジストロフィー、ミトコンドリア細胞症、ナバホ神経肝障害、ニーマン・ピック病、非症候性胆管減少症、北米インディアン小児肝硬変、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症、部分型リボジストロフィー、ピアソン症候群、晩発性皮膚ポルフィリン症、進行性家族性肝内胆汁鬱滞、進行性家族性肝内胆汁鬱滞1型、進行性家族性肝内胆汁鬱滞2型、プロテインC欠損症、シュバハマン症候群、タンジール病、血小板減少性紫斑病、全身型リボジストロフィー、1型糖原病、チロル肝硬変、チロシン血症、尿素回路異常症、静脈閉塞症、ウィルソン病、ウォルマン病、X連鎖高IgM症候群、及びツェルウェガー症候群が挙げられる。

【0923】

本明細書に記載される方法による対象の処置は、限定されるものではないが、例えば、生存期間の延長、疾患進行の遅延（例えば、肝不全の遅延）、肝不全の予防、肝機能の改善及び／または正常化、アミノ酸レベルの改善及び／または正常化、アンモニアレベルの改善及び／または正常化、アルブミンレベルの改善及び／または正常化、ビリルビンの改善及び／または正常化、成長障害表現型からの回復、嗜眠の低減、知覚鈍麻の低減、発作

10

20

30

40

50

の低減、黄疸の低減、血清グルコースの改善及び／または正常化、I N Rの改善及び／または正常化、尿検査結果の改善及び／または正常化などが含まれる、様々な臨床効果及び／または測定可能な結果をもたらし得る。

【0924】

例えば、幾つかの例では、本明細書に記載されるような遺伝子改変された肝実質細胞及び／または肝実質細胞前駆細胞の投与は、例えば、標準治療により処置され、及び／または本明細書に記載されるように遺伝子改変されなかった肝実質細胞及び／または肝実質細胞前駆細胞を投与された対象と比較して、肝疾患及び／または肝不全をもたらす状態を有する対象の生存期間の少なくとも5%の増加をもたらす。かかる対象における生存期間の増強の観察されるレベルは異なり得、限定されるものではないが、例えば、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、またはそれ以上の生存期間の増加が含まれる、少なくとも5%～60%以上の増加の範囲であり得る。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような遺伝子改変された肝実質細胞及び／またはその前駆細胞を投与された対象は、疾患の進行及び／または1つ以上の疾患症状の発症、例えば、限定されるものではないが、例えば、肝不全及び／またはそれに起因する任意の症状（複数可）の遅延を経験し得る。疾患の進行及び／または症状の発症のこのような遅延は、数日間、数週間、数ヶ月間、または数年間、例えば、限定されるものではないが、例えば、少なくとも1週間、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月、少なくとも3ヶ月、少なくとも4ヶ月、少なくとも5ヶ月、少なくとも6ヶ月、少なくとも1年、またはそれ以上持続し得る。患者に投与された本明細書に記載される肝実質細胞は、経時的に患者に有益な治療反応をもたらす。

【0925】

処置され得る肝臓疾患の非限定的な例としては、急性間欠性ポルフィリン症、急性肝不全、アラジール症候群、アルコール性脂肪肝疾患、アルコール性肝炎、アルコール肝硬変、アルコール性肝疾患、 $\alpha 1$ -アンチトリプシン欠損症、アメーバ性肝膿瘍、自己免疫性肝炎、胆汁性肝硬変、バット・キアリ症候群、化学物質及び薬物誘発性肝損傷、胆汁鬱滞、慢性肝炎、B型慢性肝炎、C型慢性肝炎、D型慢性肝炎、末期肝疾患、赤芽球増殖性プロトポルフィリン症、肝蛭症、脂肪肝疾患、限局性結節性過形成、肝包虫症、肝性脳症、肝梗塞、肝機能不全症、肝ポルフィリン症、肝結核、肝中心静脈閉塞症、肝炎、肝細胞癌、肝性骨髄性ポルフィリン症、肝レンズ核変性症、肝腫、肝肺症候群、肝腎症候群、遺伝性コプロポルフィリン症、肝膿瘍、肝細胞腺腫、肝硬変、肝不全、肝臓新生物、広範肝壊死、非アルコール性脂肪肝疾患、寄生虫性肝疾患、肝臓紫斑病、晩発性皮膚ポルフィリン症、門脈圧亢進症、化膿性肝膿瘍、ライ症候群、異型ポルフィリン症、ウイルス性肝炎、A型ウイルス性肝炎、B型ウイルス性肝炎、C型ウイルス性肝炎、D型ウイルス性肝炎、E型ウイルス肝炎、ならびにツェルウェガー症候群などが挙げられる。幾つかの例では、対象は、線維症または線維性状態が処置され得る。幾つかの例では、対象は、硬変または硬変状態が処置され得る。

【0926】

本明細書に記載される処置は、長期的に（すなわち、継続的に）または非長期的に（すなわち、非継続的に）実行され得、1種以上の薬剤の長期的（すなわち、継続的）または非長期的（すなわち、非継続的）投与を含み得る。本明細書に記載される方法による1種以上の薬剤の長期投与は、例えば、慢性的な肝臓病態（例えば、慢性肝疾患、硬変、アルコール性肝疾患、非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD／NASH）、慢性ウイルス性肝炎など）、慢性的な遺伝性肝臓病態（ $\alpha 1$ アンチトリプシン欠損症、遺伝性ヘモクロマトーシス、ウィルソン病など）、肝臓に関連する慢性的な自己免疫状態（例えば、原発性胆汁性肝硬変（PBC）、原発性硬化性胆管炎（PSC）、自己免疫性肝炎（AIH）など）などが含まれる、慢性的病態を対象が有する場合が含まれる、様々な例で用いられ得る。慢性的病態に対する1種以上の薬剤の投与としては、限定されるものではないが、複

数ヵ月、1年以上、複数年などにわたる薬剤の投与が挙げられ得る。かかる長期投与は、限定されるものではないが、例えば、毎日、1日2回、毎週、週2回、毎月、月2回などが含まれる、任意の便利かつ適切な投与スケジュールで実行され得る。幾つかの例では、例えば、遺伝子疾患の修正または他の持続型遺伝子治療の場合、慢性的病態は、単回または数回（例えば、2、3、4、または5回）の処置により処置され得る。1種以上の薬剤の非長期投与としては、限定されるものではないが、例えば、数週間の期間、1週間、数日の期間、限られた回数（例えば、10回未満の投与、例えば、単回投与が含まれる、9回以下の投与、8回以下の投与、7回以下の投与など）が含まれる、1ヵ月間以下の投与が挙げられ得る。

【0927】

幾つかの実施形態では、対象に投与される遺伝子改変された肝実質細胞の量としては、例えば、少なくとも1千万個、少なくとも2千5百万個、少なくとも5千万個、少なくとも7千5百万個、少なくとも1億個、少なくとも2億5千万個、少なくとも5億個、少なくとも7億5千万個、少なくとも10億個、少なくとも20億個、少なくとも30億個、少なくとも40億個、少なくとも50億個、少なくとも60億個、少なくとも70億個、少なくとも80億個、少なくとも90億個、少なくとも100億個、少なくとも150億個、少なくとも200億個、少なくとも300億個、少なくとも400億個、少なくとも500億個、少なくとも600億個、少なくとも700億個、少なくとも800億個、少なくとも900億個、または少なくとも1千億個の肝実質細胞が挙げられ得る。遺伝子改変された肝実質細胞は、送達される必要がある対象に単回投与または反復投与で送達され得る。

【0928】

任意の特定の対象での具体的な用量レベル及び投与頻度は異なり得、組成物（複数可）の細胞の活性、組成物の細胞の安定性及び作用時間、対象の年齢、体重、健康状態、性別、及び食事、投与様式及び投与時間、同時投与される薬剤の組み合わせ（複数可）、ならびに治療を受ける宿主の病態の重症度が含まれる、種々の因子に依存する。

【0929】

上記の列挙された治療法の例は、限定と解釈されるべきではなく、記載されるように特定された対象に望ましい治療結果をもたらす本質的に適切な任意の治療が用いられ得る。

【0930】

本明細書において提供される肝実質細胞様細胞は、肝機能が回復または補充される必要がある任意の対象の治療に使用され得る。かかる治療に適切であり得るヒトの病態としては、限定されるものではないが、任意の原因による劇症肝炎、ウイルス性肝炎、薬剤誘発性肝臓損傷、硬変、遺伝性肝不全（例えば、ウィルソン病、ジルベール症候群、または α 1-アンチトリプシン欠損症）、肝胆道癌、自己免疫性肝疾患（例えば、自己免疫性慢性肝炎または原発性胆汁性肝硬変）、及び肝臓機能障害をもたらす任意の他の病態が挙げられる。

【0931】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される肝実質細胞様細胞は、カプセル化されているか、またはバイオ人工肝臓デバイスの一部である。臨床使用のためのバイオ人工臓器は、長期治療の一部として、または劇症肝炎から肝臓再構築または肝移植までの間の橋渡しとして、肝臓機能の障害を有する個体を補助するよう設計されている。バイオ人工肝臓デバイスは、例えば、米国特許第5,290,684号、同第5,624,840号、同第5,837,234号、同第5,853,717号、同第及び5,935,849号に開示されている。懸濁剤型のバイオ人工肝臓は、プレート型透析器内の懸濁された細胞、好適な基質中にマイクロカプセル化された細胞、または細胞外マトリックスでコーティングされたマイクロキャリアビーズに接着した細胞を含む。あるいは、肝実質細胞は、充填層内、マルチプレートフラットベッド（*multiple flat bed*）内、マイクロチャネルスクリーン上、または全周型中空繊維キャピラリー内の固体支持体上に配置され得る。そのデバイスは、対象の血液が通過する入口及び出口、ならびに場

10

20

30

40

50

合により、細胞に栄養分を供給するための別個の出入口のセットを有する。

【0932】

肝実質細胞は、本明細書に記載される方法により調製され、次いで、デバイス内の好適な基質、例えば、Matrigel（登録商標）またはコラーゲンのマトリックス上にプレートングされる。デバイスの有効性は、輸入流路中の血液組成を輸出流路中のそれと比較することにより、輸入流から除去された代謝産物及び輸出流中の新たに合成されたタンパク質の観点で、評価され得る。

【0933】

この種類のデバイスは、血液などの体液を解毒するために使用され得、ここで、当該体液は、本技術のある特定の態様において提供される肝実質細胞が当該体液中の毒素を除去または修飾することを可能にする条件下で当該細胞と接触する。解毒は、通常は肝臓によってプロセッシングされる少なくとも1種のリガンド、代謝産物、または他の化合物（天然及び合成のいずれか）を除去するか、または変化させることを含み得る。かかる化合物としては、限定されるものではないが、ビリルビン、胆汁酸、尿素、ヘム、リポタンパク質、炭水化物、トランスフェリン、ヘモペキシン、アシアロ糖タンパク質、インスリン及びグルカゴンのようなホルモン、ならびに種々の低分子薬物が挙げられる。デバイスは、合成されたタンパク質、例えば、アルブミン、急性期反応物質、及び負荷されていないキャリアタンパク質について輸出液を濃縮するためにも使用され得る。デバイスは、種々のこれらの機能が果たされ、これにより、必要とされるだけの数の肝機能を回復させるように最適化され得る。治療的ケアの文脈において、このデバイスは、肝実質細胞不全の患者から流れる血液を処理し、次いで、血液がその患者に戻される。

【0934】

c. T細胞

細胞療法製品に使用されるT細胞は、細胞療法製品の製造プロセスの任意の段階でドナー能力についてプロファイリングされ得る。

【0935】

細胞療法製品に使用されるT細胞は、初代T細胞であり得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、（例えば、ゲノム編集された）初代T細胞で実行され得る。

【0936】

本明細書の他箇所で記載されるように、細胞療法製品に使用されるT細胞は、多能性幹細胞（iPSC）に由来するT細胞であり得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、分化して、T細胞を形成することができる幹細胞でも実行され得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、幹細胞に由来する（例えば、ゲノム編集された）T細胞でも実行され得る。

【0937】

細胞療法に使用される場合のT細胞の望ましい特徴に関するある特定の情報が含まれる、本開示の文脈において参照されるT細胞に関する関連情報は、当該技術分野において公知である。本明細書に記載されるT細胞に関する実施形態は、容易かつ適切に組み合わせられ得ることが理解されよう。本明細書に記載されるT細胞に関する実施形態は、H1P細胞（例えば、MHCクラスI及び／またはMHCクラスII分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現ならびに少なくとも1種の免疫寛容誘導因子の増強された発現を示す）を記載している実施形態、ならびに安全スイッチ、及び本明細書に記載されるような他の改変／遺伝子編集された（例えば、CAR導入遺伝子で編集された）細胞を記載している実施形態と容易かつ適切に組み合わせられ得ることが理解されよう。細胞療法製品に使用されるT細胞は、細胞療法製品の製造プロセスの任意の段階でドナー能力についてプロファイリングされ得る。細胞療法製品に使用されるT細胞は、細胞療法製品を製造する間の編集プロセスの任意の段階でドナー能力についてプロファイリングされ得る。

【0938】

10

20

30

40

50

本明細書に記載されるT細胞は、対象の疾患を処置または予防するために使用され得る。

【0939】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供されるような遺伝子操作または改変されている細胞は、初代Tリンパ球（T細胞とも称される）である。幾つかの実施形態では、初代Tリンパ球は、1人以上の個別のドナー対象、例えば、1人以上の個別の健常なドナー（例えば、疾患または感染症について知られていないか、またはそれを疑われていない、例えば、その臨床徴候を示さない対象）から単離または採取される。幾つかの例では、T細胞は、1人以上の個体由来の初代T細胞の集団である。幾つかの例では、T細胞は、1人以上の個体由来の初代T細胞の亜集団またはサブタイプまたはサブセットである。初代T細胞の亜集団及びサブタイプ及びサブセットは、以下で更に詳細に本明細書に記載される。当業者によって理解されるように、個体からTリンパ球を単離または採取する方法は、公知の技術を使用して達成され得る。本明細書において、対象（例えば、レシピエント）へのその後の移植（transplantation）または移植（engraftment）のための、本明細書に記載される改変（例えば、遺伝子改変）を含有する遺伝子操作された初代Tリンパ球が提供される。

【0940】

幾つかの実施形態では、初代T細胞は、対象または個体から取得される（例えば、収集されるか、抽出されるか、取り出されるか、または採取される）。幾つかの実施形態では、初代T細胞は、T細胞が1人以上の対象（例えば、1人以上の健常なヒトが含まれる、1人以上のヒト）に由来するように、T細胞のプールから作製される。幾つかの実施形態では、初代T細胞のプールは、1～100人、1～50人、1～20人、1～10人、1人以上、2人以上、3人以上、4人以上、5人以上、10人以上、20人以上、30人以上、40人以上、50人以上、または100人以上の対象に由来する。幾つかの実施形態では、ドナー対象は、患者（例えば、治療細胞を投与されるレシピエント）と異なる。幾つかの実施形態では、T細胞のプールは、患者由来の細胞を含まない。幾つかの実施形態では、T細胞のプールが採取されるドナー対象のうちの1人以上は、患者と異なる。

【0941】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞は、本明細書に記載される改変（例えば、遺伝子改変）を含有し、Tリンパ球に分化している遺伝子操作された多能性細胞から分化したTリンパ球である。当業者によって理解されるように、分化の方法は、目的の細胞種に依存し、公知の技術を使用する。幾つかの実施形態では、Tリンパ球に分化した細胞は、対象（例えば、レシピエント）へのその後の移植（transplantation）または移植（engraftment）のために使用され得る。

【0942】

T細胞を多能性幹細胞（例えば、iPSC）から作製するための方法は、例えば、Iriguchi et al., Nature Communications 12, 430 (2021)、Themeli et al. 16 (4): 357–366 (2015)、Themeli et al., Nature Biotechnology 31: 928–933 (2013)に記載されている。

【0943】

初代T細胞の非限定的な例としては、CD3+T細胞、CD4+T細胞、CD8+T細胞、ナイーブT細胞、制御性T（Treg）細胞、非制御性T細胞、Th1細胞、Th2細胞、Th9細胞、Th17細胞、濾胞性ヘルパーT（Tfh）細胞、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）、エフェクターT（Teff）細胞、セントラルメモリーT（Tcm）細胞、エフェクターメモリーT（Tem）細胞、CD45RAを発現するエフェクターメモリーT細胞（TEMRA細胞）、組織常在性メモリー（Trm）細胞、バーチャルメモリーT細胞、自然免疫メモリーT細胞、メモリー幹細胞（Tsc）、 $\gamma\delta$ T細胞、及びT細胞の任意の他のサブタイプが挙げられる。幾つかの実施形態では、初代T細胞は、細胞傷害性T細胞、ヘルパーT細胞、メモリーT細胞、制御性T細胞、腫瘍浸潤リンパ球、及び

それらの組み合わせを含む群から選択される。

【0944】

幾つかの実施形態では、初代T細胞は、T細胞サブセットまたはサブタイプまたは亜集団の初代T細胞である。かかるT細胞サブセットは、US2018/0319862A1及び／またはWO2016/090190A1に見出され得る（これらの全内容が参照により本明細書に組み込まれる）。従って、幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞の投与時に対象内で増加するT細胞サブセット、例えば、CD62L+T細胞サブセットは、メモリーT細胞またはその特定のサブセット、例えば、長寿命メモリーT細胞であるか、もしくはそれを含むか、またはそれと表現型の特徴を共有する。幾つかの実施形態では、かかるメモリーT細胞は、セントラルメモリーT細胞（T_{cm}）またはTメモリー幹細胞（T_{sc}）である。幾つかの実施形態では、メモリーT細胞は、T_{sc}細胞である。T_{sc}細胞は、他のメモリーT細胞サブセットと比較して、またはナイーブT細胞と比較して、1つ以上の表現型の相違または機能的特徴を有すると記載され得、例えば、低分化またはよりナイーブであると記載され得る（例えば、Ahlers and Belyakov (2010) Blood, 115:1678）、Cieri et al (2015) Blood, 125:2865、Flynn et al. (2014) Clinical & Translational Immunology, 3, e20、Gattinoni et al. (2012) Nat. Med., 17:1290–1297、Gattinoni et al. (2012) Nat. Reviews, 12:671、Li et al. (2013) PLOS ONE, 8:e67401、及びPCT出願公開第WO2014/039044号を参照のこと）。場合によっては、T_{sc}細胞は、エフェクターT細胞及びメモリーT細胞の3つ全てのサブセット（T_{sc}、T_{cm}、及びT_{em}）を生成することができる唯一のメモリーT細胞であると考えられる。幾つかの態様では、T_{sc}細胞は、全てのメモリーT細胞サブセットのうちで最も高い生存率及び抗原刺激または恒常的刺激に対する増殖応答を示し、同族抗原の非在下での消耗が最も少ない。幾つかの実施形態では、低分化のT_{sc}細胞は、他のメモリーT細胞と比べてより強い増殖、より高い長期生存率、及びより強い標的細胞破壊を養子移入後に示し得、従って、TCM細胞またはTEM細胞のいずれかで可能な処置と比べて、より少数の細胞の移入でより効果的な処置をもたらすことができ得る。

【0945】

T細胞及び／またはCD4+T細胞及び／またはCD8+T細胞のサブタイプ及び亜集団には、ナイーブT（T_n）細胞、エフェクターT細胞（T_{eff}）、メモリーT細胞及びそのサブタイプ、例えば、幹細胞メモリーT（T_{sc}）、セントラルメモリーT（T_{cm}）、エフェクターメモリーT（T_{em}）、または終末分化エフェクターメモリーT細胞、腫瘍浸潤リンパ球（T_{il}）、未成熟T細胞、成熟T細胞、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、粘膜関連インバリアントT（MAIT）細胞、天然及び適応性制御性T（T_{reg}）細胞、ヘルパーT細胞、例えば、TH1細胞、TH2細胞、TH3細胞、TH17細胞、TH9細胞、TH22細胞、濾胞ヘルパーT細胞、α/βT細胞、ならびにδ/γT細胞がある。

【0946】

幾つかの実施形態では、CD8+細胞は、例えば、各亜集団に関連する表面抗原に基づくポジティブまたはネガティブセレクションにより、ナイーブ細胞、セントラルメモリー細胞、エフェクターメモリー細胞、及び／またはセントラルメモリー幹細胞が更に濃縮されるか、またはそれらが更に除去される。幾つかの実施形態では、セントラルメモリーT（T_{cm}）細胞の濃縮は、有効性を増加させるために、例えば、投与後の長期生存、増殖、及び／または生着を改善するために、実行され、幾つかの実施形態では、当該有効性は、かかる亜集団において頑強である。Terakura et al. (2012) Blood. 1:72–82、Wang et al. (2012) J Immunother. 35 (9):689–701を参照のこと。幾つかの実施形態では、T_{cm}が濃縮されたCD8+T細胞及びCD4+T細胞を組み合わせることにより、有効性が更に

増強される。

【0947】

本開示は、例えば、複数の投与ステップによる、及び／または以前に投与を受けた対象への投与による、遺伝子操作された（組換え）受容体を発現する細胞の反復投与の実施を含む養子細胞療法に関する。処置方法及び細胞療法は、以下で更に詳細に本明細書に記載される。幾つかの実施形態では、認められる差異は、初回用量または初回投与の細胞における組換え分子、例えば、受容体の、2回目用量または投与と比較した唯一の差異または実質的もしくは本質的に唯一の差異である。幾つかの実施形態では、受容体の差異及び／または他の認められる差異を除いて、直前の投与及びその後の投与において投与される細胞及び／または細胞集団は、同じであるか、または本質的もしくは実質的に同じである。幾つかの実施形態では、1回の投与における検出可能な表面レベルの1種以上のマーカーを発現する細胞の比率は、その後の投与と比較して同じであるか、または同程度である。幾つかの実施形態では、別々の用量または投与における細胞の集団及び／または亜集団の百分率は、同じであるか、または実質的もしくは本質的に同じである。別々の用量は、同じ百分率のT細胞、CD8+及び／またはCD4+T細胞、特定の系列または活性化状態もしくは経路のT細胞、例えば、同じ相対的割合のエフェクター、ナイーブ、及び／またはメモリーT細胞、及び／またはそれらの亜集団、例えば、T_{cm}、T_{em}、T_{sc}細胞を含有し得、及び／または細胞は、同じ対象、試料、組織、及び／または体液もしくは区画に由来し得る。幾つかの実施形態では、例えば、組換え受容体をコードするベクターでの形質導入により、初回投与の細胞を遺伝子操作するために使用された細胞と同じ組成物の別の一部が、2回目投与の細胞を遺伝子操作するために使用される。幾つかの実施形態では、組成物は、2回目投与の前に、例えば、凍結保存により保存される。

10

20

【0948】

T細胞及び／またはCD4+T細胞及び／またはCD8+T細胞のサブタイプ及び亜集団には、ナイーブT（TN）細胞、エフェクターT細胞（TEFF）、メモリーT細胞、及びそのサブタイプ、例えば、幹細胞メモリーT（T_{sc}）、セントラルメモリーT（T_{cm}）、エフェクターメモリーT（T_{em}）、または終末分化エフェクターメモリーT細胞、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）、未成熟T細胞、成熟T細胞、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、粘膜関連インバリアントT（MAIT）細胞、天然型及び適応型制御性T（T_{reg}）細胞、ヘルパーT細胞、例えば、TH1細胞、TH2細胞、TH3細胞、TH17細胞、TH9細胞、TH22細胞、濾胞ヘルパーT細胞、α/βT細胞、ならびにδ/γT細胞がある。

30

【0949】

本開示の例示的なT細胞は、細胞傷害性T細胞、ヘルパーT細胞、メモリーT細胞、セントラルメモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞、エフェクターメモリーRA⁺T細胞、制御性T細胞、組織浸潤リンパ球、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。多数の実施形態では、T細胞は、CCR7、CD27、CD28、及びCD45RAを発現する。幾つかの実施形態では、セントラルT細胞は、CCR7、CD27、CD28、及びCD45ROを発現する。他の実施形態では、エフェクターメモリーT細胞は、PD-1、CD27、CD28、及びCD45ROを発現する。他の実施形態では、エフェクターメモリーRA⁺T細胞は、PD-1、CD57、及びCD45RAを発現する。

40

【0950】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子操作されたT細胞、例えば、1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）から単離された初代T細胞、または1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）に由来するiPSCから分化したT細胞は、限定されるものではないが、本明細書に記載されるキメラ抗原受容体が含まれる、キメラ抗原受容体を発現するように遺伝子操作された（例えば、改変されている）T細胞を含む。本明細書に記載されるCARが含まれる、任意の好適なCARがT細胞に含まれ得る。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたT細胞は、損傷した細胞、異型細胞、感染細胞、免疫原性細胞、炎症を起こした細胞、悪性細胞、化生細胞、変異細胞、及びそれらの組

50

み合わせのうちの少なくとも1つの表面に発現される関心対象の抗原またはエピトープに特異的に結合する少なくとも1種のキメラ抗原受容体を発現する。他の例では、遺伝子操作されたT細胞は、細胞が隣接する細胞、組織、または器官の近くに存在する場合に、当該隣接する細胞、組織、または器官における関心対象の生物学的効果を調節する少なくとも1種のタンパク質を当該細胞に発現させる改変を含む。初代T細胞が含まれる、T細胞の有用な改変は、US2016/0348073及びWO2020/018620（これらの開示はその全体が本明細書に組み込まれる）に詳細に記載されている。

【0951】

幾つかの実施形態では、T細胞は、CARをコードするポリヌクレオチドを含み、ここで、当該ポリヌクレオチドは、ゲノム遺伝子座に挿入されている。本明細書に記載されるレンチウイルスベースの形質導入法または遺伝子編集法（例えば、CRISPR/Casシステム）が含まれる、T細胞のゲノム遺伝子座にCARを挿入するための任意の好適な方法が使用され得る。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、セーフハーバー遺伝子座、例えば、限定されるものではないが、AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26、SHS231、F3（CD142としても公知）、MICA、MICB、LRP1（CD91としても公知）、HMGB1、ABO、RHD、FUT1、またはKDM5D遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、B2M、CIITA、TRAC、TRBC、PD1、またはCTLA4遺伝子に挿入される。

【0952】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるT細胞、例えば、遺伝子操作または改変されたT細胞は、内在性T細胞受容体の低減された発現を含む。幾つかの実施形態では、細胞におけるTRACまたはTRBC遺伝子座が、例えば、本明細書に記載される遺伝子編集法（例えば、CRISPR/Casシステム）により、破壊または除去される。幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドまたは導入遺伝子、例えば、CARをコードするポリヌクレオチドまたは記載される他のポリヌクレオチドが、破壊されたTRACまたはTRBC遺伝子座に挿入されている。

【0953】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるT細胞、例えば、遺伝子操作または改変されたT細胞は、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（CTLA4）の低減された発現を含む。幾つかの実施形態では、細胞におけるCTLA4遺伝子座が、例えば、本明細書に記載される遺伝子編集法（例えば、CRISPR/Casシステム）により、破壊または除去される。幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドまたは導入遺伝子、例えば、CARをコードするポリヌクレオチドまたは記載される他の外来性ポリヌクレオチドが、破壊されたCTLA4遺伝子座に挿入されている。

【0954】

他の実施形態では、本明細書に記載されるT細胞、例えば、遺伝子操作または改変されたT細胞は、プログラム細胞死（PD1）の低減された発現を含む。幾つかの実施形態では、細胞におけるPD1遺伝子座が、例えば、本明細書に記載される遺伝子編集法（例えば、CRISPR/Casシステム）により、破壊または除去される。幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドまたは導入遺伝子、例えば、CARをコードするポリヌクレオチドまたは記載される他の外来性ポリヌクレオチドが、破壊されたPD1遺伝子座に挿入されている。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されるT細胞、例えば、遺伝子操作または改変されたT細胞は、CTLA4及びPD1の低減された発現を含む。

【0955】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載されるT細胞、例えば、遺伝子操作または改変されたT細胞は、PD-L1の増強された発現を含む。幾つかの実施形態では、細胞におけるPD-L1遺伝子座が、例えば、本明細書に記載される遺伝子編集法（例えば、CRISPR/Casシステム）により、破壊または除去される。幾つかの実施形態では、外来性ポリヌクレオチドまたは導入遺伝子、例えば、CARをコードするポリヌクレオチドまたは記載される他の外来性ポリヌクレオチドが、破壊されたPD-L1遺伝子座に挿

入されている。

【0956】

幾つかの実施形態では、本技術は、免疫寛容誘導因子（例えば、CD47）を過剰発現し、1種以上のMHCクラスII分子及び／または1種以上のMHCクラスII分子（例えば、1種以上のMHCクラスIIヒト白血球抗原及び／または1種以上のMHCクラスIIヒト白血球抗原）の低減された発現または発現の欠如を有する遺伝子操作されたT細胞、例えば、1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）から単離された初代T細胞、または1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）に由来するiPSCから分化したT細胞を対象とする。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたT細胞は、1種以上の補体阻害因子を更に発現する。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたT細胞は、CARも発現するように遺伝子操作される。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたT細胞は、例えば、TRAC遺伝子またはTRBC遺伝子のゲノム改変（例えば、遺伝子破壊）により、TCR複合体分子の低減された発現または発現の欠如を有する。幾つかの実施形態では、T細胞は、免疫寛容誘導因子（例えば、CD47）及びCARを過剰発現し、以下の遺伝子のうちの1つ以上を破壊するゲノム改変を保有する：B2M、CIITA、TRAC、及びTRBC遺伝子。

10

【0957】

幾つかの実施形態では、提供される遺伝子操作されたT細胞は、免疫認識を回避する。幾つかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子操作されたT細胞、例えば、1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）から単離された初代T細胞、または1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）に由来するiPSCから分化したT細胞は、患者（例えば、投与された際のレシピエント）において免疫応答を活性化しない。障害を処置する必要がある対象（例えば、レシピエント）または患者に本明細書に記載される遺伝子操作されたT細胞の集団を投与することにより障害を処置する方法が提供される。

20

【0958】

本明細書において提供されるT細胞は、限定されるものではないが、B細胞急性リンパ芽球性白血病（B-ALL）、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、肝臓癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、結腸直腸癌、肺癌、非小細胞肺癌、急性骨髄性リンパ性白血病、多発性骨髄腫、胃癌、胃腺癌、膵臓腺癌、神経膠芽腫、神経芽細胞腫、肺扁平上皮細胞癌、肝細胞癌、及び膀胱癌が含まれる、好適な癌の処置に有用である。

30

【0959】

d. ナチュラルキラー細胞

細胞療法製品に使用されるNK細胞は、細胞療法製品の製造プロセスの任意の段階でドナー能力についてプロファイリングされ得る。

【0960】

細胞療法製品に使用されるNK細胞は、初代NK細胞であり得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、（例えば、ゲノム編集された）初代NK細胞で実行され得る。

【0961】

本明細書の他箇所で記載されるように、細胞療法製品に使用されるNK細胞は、多能性幹細胞（iPSC）に由来するNK細胞であり得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、分化して、NK細胞を形成することができる幹細胞でも実行され得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、幹細胞に由来する（例えば、ゲノム編集された）NK細胞でも実行され得る。

40

【0962】

細胞療法に使用される場合のNK細胞の望ましい特徴に関するある特定の情報が含まれる、本開示の文脈において参照されるNK細胞に関する関連情報は、当該技術分野において公知であり、例えば、WO2017214569A1、WO2011/068896A1（その内容は参照により本明細書に組み込まれる）に見出され得る。本明細書に記載さ

50

れるNK細胞に関する実施形態は、H1P細胞（例えば、MHCクラスI及び／またはMHCクラスII分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現ならび少なくとも1種の免疫寛容誘導因子の増強された発現を示す）を記載している実施形態、ならびに安全スイッチ、及び本明細書に記載されるような他の改変／遺伝子編集された（例えば、CAR導入遺伝子で編集された）細胞を記載している実施形態と容易かつ適切に組み合わせられ得ることが理解されよう。本明細書に記載されるNK細胞は、対象の疾患を処置または予防するために使用され得る。細胞療法製品に使用されるNK細胞は、細胞療法製品を製造する間の編集プロセスの任意の段階でドナー能力についてプロファイリングされ得る。

【0963】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される遺伝子操作または改変されている細胞は、ナチュラルキラー（NK）細胞である。幾つかの実施形態では、NK細胞は、1人以上の個別のドナー対象、例えば、1人以上の個別の健常なドナー（例えば、疾患または感染症について知られていないか、またはそれを疑われていない、例えば、その臨床徴候を示さない対象）から単離または採取される。幾つかの例では、NK細胞は、1人以上の個体由来のNK細胞の集団または亜集団である。当業者によって理解されるように、個体からNK細胞を単離または採取する方法は、公知の技術を使用して達成され得る。本明細書において、対象（例えば、レシピエント）へのその後の移植（transplantation）または移植（engraftment）のための、本明細書に記載される改変（例えば、遺伝子改変）を含有する遺伝子操作された初代NK細胞が提供される。例えば、遺伝子操作されたT細胞は、対象（例えば、患者などのレシピエント）への遺伝子操作されたNK細胞の注入により当該対象に投与される。

【0964】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞は、本明細書に記載される改変（例えば、遺伝子改変）を含有し、NK細胞に分化している遺伝子操作された多能性細胞から分化したNK細胞である。当業者によって理解されるように、分化の方法は、目的の細胞種に依存し、公知の技術を使用する。幾つかの実施形態では、NK細胞に分化した細胞は、例えば、分化したNK細胞の対象（例えば、患者などのレシピエント）への注入による、当該対象へのその後の投与に使用され得る。

【0965】

多能性幹細胞（例えば、iPSC）からNK細胞を作製するための方法は、例えば、米国特許第10626373号、Shankar et al. Stem Cell Res Ther. 2020; 11: 234、Euchner et al. Frontiers in Immunology, 2021; 12, Article 640672. doi=10.3389/fimmu.2021.640672に記載されている。

【0966】

幾つかの実施形態では、NK細胞は、対象または個体から取得される（例えば、収集されるか、抽出されるか、取り出されるか、または採取される）。幾つかの実施形態では、NK細胞は、NK細胞が1人以上の対象（例えば、1人以上の健常なヒトが含まれる、1人以上のヒト）に由来するように、NK細胞のプールから作製される。幾つかの実施形態では、初代NK細胞のプールは、1～100人、1～50人、1～20人、1～10人、1人以上、2人以上、3人以上、4人以上、5人以上、10人以上、20人以上、30人以上、40人以上、50人以上、または100人以上の対象に由来する。幾つかの実施形態では、ドナー対象は、患者（例えば、遺伝子操作されたNK細胞を投与されるレシピエント）と異なる。幾つかの実施形態では、NK細胞のプールは、患者由来の細胞を含まない。幾つかの実施形態では、NK細胞のプールが採取されるドナー対象のうちの1人以上は、患者と異なる。

【0967】

幾つかの実施形態では、1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）から単離された初代NK細胞、または1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）に由来するiPSCから分化したNK細胞が含まれる、NK細胞は、CD56を発現し（例えば、C

10

20

30

40

50

D56^{dim}またはCD56^{bright}）、CD3を欠く（例えば、CD3^{neg}）。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるNK細胞は、ADCCを媒介する低親和性Fcγ受容体CD16も発現し得る。幾つかの実施形態では、NK細胞は、1種以上のナチュラルキラー細胞受容体（NKGA及びNKGD）または1種以上の自然細胞傷害性受容体（NKP46、NKP44、NKP30）も発現する。例えば、初代NK細胞の場合、具体的な例では、初代細胞は、NK細胞の出発源、例えば、末梢血単核細胞（PBMC）を含有する試料から、CD3、CD14、及び／またはCD19について陽性の細胞の枯渇により単離され得る。例えば、細胞は、それぞれCD3、CD14、及び／またはCD19に対する抗体が結合した免疫磁気ビーズを使用した枯渇に供され得、これにより、NK細胞が濃縮された集団が作製される。他の場合では、初代NK細胞は、NK細胞上に1種以上のマーカー、例えば、CD56、CD16、NKP46、及び／またはNKGDが存在する細胞を選択することにより、混合集団（例えば、PBMC）である出発源から単離され得る。

10

【0968】

幾つかの実施形態では、NK細胞、例えば、単離された初代NK細胞は、本明細書に記載されるように遺伝子操作する前に、1つ以上の増殖または活性化ステップに供され得る。幾つかの実施形態では、増殖は、NK細胞をフィーダー細胞、例えば、放射線照射済であってもなくてもよい抗原提示細胞と共に培養することにより達成され得る。増殖ステップにおけるNK細胞対抗原提示細胞（APC）の比率は、ある特定の数の比率、例えば、1:1、1:1.5、1:2、または1:3であり得る。ある特定の態様では、APCは、膜結合型IL-21（mbIL-21）を発現するように遺伝子操作される。態様では、APCは、代替的にまたは追加的に、IL-21、IL-15、及び／またはIL-2を発現するように遺伝子操作される。実施形態では、増殖ステップ（複数可）が行われる培地は、増殖を促進するための1種以上の薬剤、例えば、1種以上の組換えサイトカインを含む。特定の実施形態では、培地は、IL-2、IL-15、IL-18、及び／またはIL-21由来の1種以上の組換えサイトカインを含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるように改変を導入することによるNK細胞の遺伝子操作のステップは、増殖開始の2〜12日後に、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、もしくは12日目またはその前後に実行される。

20

【0969】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子操作されたNK細胞、例えば、1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）から単離された初代NK細胞は、限定されるものではないが、本明細書に記載されるキメラ抗原受容体が含まれる、キメラ抗原受容体を発現するように遺伝子操作された（例えば、改変された）NK細胞を含む。本明細書に記載されるCARが含まれる、任意の好適なCARがNK細胞に含まれ得る。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたNK細胞は、損傷した細胞、異型細胞、感染細胞、免疫原性細胞、炎症を起こした細胞、悪性細胞、化生細胞、変異細胞、及びそれらの組み合わせのうちの少なくとも1つの表面に発現される関心対象の抗原またはエピトープに特異的に結合する少なくとも1種のキメラ抗原受容体を発現する。他の例では、遺伝子操作されたNK細胞は、細胞が隣接する細胞、組織、または器官の近くに存在する場合に、当該隣接する細胞、組織、または器官における関心対象の生物学的効果を調節する少なくとも1種のタンパク質を当該細胞に発現させる改変を含む。

30

40

【0970】

幾つかの実施形態では、NK細胞は、CARをコードするポリヌクレオチドを含み、ここで、当該ポリヌクレオチドは、ゲノム遺伝子座に挿入されている。本明細書に記載されるレンチウイルスベースの形質導入法または遺伝子編集法（例えば、CRISPR/Casシステム）が含まれる、NK細胞のゲノム遺伝子座にCARを挿入するための任意の好適な方法が使用され得る。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、セーフハーバー遺伝子座、例えば、限定されるものではないが、AAVS1、CCR5、CLYBL、ROSA26、SHS231、F3（CD142としても公知）、MICA、MICB、L

50

R P 1 (C D 9 1 としても公知) 、 H M G B 1 、 A B O 、 R H D 、 F U T 1 、 または K D M 5 D 遺伝子座に挿入される。

【 0 9 7 1 】

幾つかの実施形態では、本技術は、免疫寛容誘導因子（例えば、C D 4 7）を過剰発現し、1 種以上のM H C クラス I 分子及び／または1 種以上のM H C クラス I I 分子（例えば、1 種以上のM H C クラス I ヒト白血球抗原及び／または1 種以上のM H C クラス I I ヒト白血球抗原）の低減された発現または発現の欠如を有する遺伝子操作されたN K 細胞、例えば、1 人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）から単離された初代N K 細胞、または1 人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）に由来する i P S C から分化したN K 細胞を対象とする。

10

【 0 9 7 2 】

幾つかの実施形態では、提供される遺伝子操作されたN K 細胞は、免疫認識を回避する。幾つかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子操作されたN K 細胞、例えば、1 人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）から単離された初代N K 細胞は、患者（例えば、投与された際のレシピエント）において免疫応答を活性化しない。障害を処置する必要がある対象（例えば、レシピエント）または患者に本明細書に記載される遺伝子操作されたN K 細胞の集団を投与することにより障害を処置する方法が提供される。

【 0 9 7 3 】

本明細書において提供されるN K 細胞は、限定されるものではないが、B 細胞急性リンパ芽球性白血病（B - A L L）、びまん性大細胞型B 細胞リンパ腫、肝臓癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、結腸直腸癌、肺癌、非小細胞肺癌、急性骨髄性リンパ性白血病、多発性骨髄腫、胃癌、胃腺癌、膵臓腺癌、神経膠芽腫、神経芽細胞腫、肺扁平上皮細胞癌、肝細胞癌、及び膀胱癌が含まれる、好適な癌の処置に有用である。

20

【 0 9 7 4 】

本明細書において開示される細胞は、ナチュラルキラー（N K）細胞、例えば、N K 細胞の集団であり得る。下記での「細胞」、例えば、「N K 細胞」への任意の言及は、本出願に記載される「細胞集団」、例えば、「N K 細胞の集団」にも適用されることが理解されよう。

【 0 9 7 5 】

リンパ球系列から生じ、自然免疫系の一部であるN K 細胞は、それらが特定の種類の腫瘍細胞を検出し、死滅させることが分かっているため、抗がん療法に使用され得る。

30

【 0 9 7 6 】

ナチュラルキラー（N K）細胞は、ヒトにおいて免疫監視を行うことができる細胞傷害性リンパ球である。W O 2 0 1 7 2 1 4 5 6 9 A 1（その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）は、ゲノム編集された初代N K 細胞、それらの細胞を作製する方法、及びそれらの細胞を投与する方法を記載している。

【 0 9 7 7 】

幾つかの実施形態では、N K 細胞は、未成熟N K 細胞であり得、C D 5 6 + かつ C D 1 6 - であり得る。幾つかの実施形態では、N K 細胞は、成熟N K 細胞であり得、（W O 2 0 1 1 / 0 6 8 8 9 6 A 1（その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるように）C D 5 6 - かつ C D 1 6 +、またはC D 5 6 1 o かつ C D 1 6 + であり得る。

40

【 0 9 7 8 】

初代N K 細胞は、C D 1 6 及び／またはC D 5 6 を発現し得る。幾つかの実施形態では、N K 細胞は、C D 3 を発現しない。幾つかの実施形態では、「N K 細胞」は、好ましくは、C D 5 6 + かつ C D 3 - である細胞と定義される。幾つかの実施形態では、「N K 細胞」は、C D 1 6 + かつ C D 3 - である細胞と定義される。N K 細胞は、ウイルス感染した細胞または形質転換した細胞を死滅させる自然免疫系のリンパ球である。T 細胞と同様に、N K 細胞は細胞傷害性リンパ球である。T 細胞と異なり、N K 細胞は、それらの機能を実行するために抗原認識を必要とせず、多数の活性化受容体及び抑制性受容体からシグ

50

ナルの集積を必要とする。T細胞との類似性にもかかわらず、NK細胞は、刺激条件下で異なる振る舞いをし、(WO2017214569A1(その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されるように)T細胞と同じ方法でのエレクトロポレーションに耐えられない。

【0979】

ナチュラルキラー(NK)細胞を作製する方法は、当技術分野において公知であり、例えば、WO2011/068896A1(その内容はその全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載される、以下を含む方法である：血管芽細胞を提供すること；メチルセルロースならびにIL2、IL3、IL6、IL7、IL15、SCF、及びFLを含む第1のサイトカイン混合物上で当該血管芽細胞を培養すること；培養した細胞を採取すること；ならびにヒト血清、ならびにIL7、IL15、SCF、及びFLを含む第2のサイトカイン混合物を含む液体培地で採取した細胞を培養して、NK細胞を作製すること。

10

【0980】

初代NK細胞は、例えば、(WO2017214569A1(その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されるように)末梢血、臍帯細胞、腹水、及び／または固形腫瘍から単離され得る。幾つかの実施形態では、「初代NK細胞」は、新たに単離されたNK細胞である。幾つかの実施形態では、「初代NK細胞」は、単離された後の5回までの複製もしくは分裂、単離された後の10回までの複製もしくは分裂、単離された後の15回までの複製もしくは分裂、単離された後の20回までの複製もしくは分裂、単離された後の25回までの複製もしくは分裂、単離された後の30回までの複製もしくは分裂、単離された後の35回までの複製もしくは分裂、または単離された後の40回までの複製もしくは分裂を起こしたNK細胞である。幾つかの実施形態では、初代NK細胞は、非クローン細胞である。幾つかの実施形態では、初代NK細胞は、増殖性細胞である。幾つかの実施形態では、初代NK細胞は、増殖した細胞である。

20

【0981】

幾つかの実施形態では、NK細胞は、哺乳動物細胞である。幾つかの実施形態では、NK細胞は、好ましくはヒト細胞である。幾つかの実施形態では、NK細胞は、マウス細胞である。

【0982】

細胞療法に使用される場合のNK細胞の幾つかの望ましい特徴が本明細書に記載される。

30

【0983】

NK細胞は、例えば、WO2011/068896A1(その内容はその全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載されるような、多数のアッセイを使用して区別され得る。

【0984】

例えば、IL12-p70分泌が測定され得る。IL12-p70は、CD4+T細胞によるTh1介在性応答を誘発するために成熟DCにより分泌される。ヒトBMに由来するDCは、500pg/ml未満のIL12-p70を産生することができるが、芽細胞に由来するDCは、成熟時になんらの検出可能なIL12-p70を産生しなかった。混合リンパ球反応(MLR)アッセイ：MLRアッセイは、同種異系T細胞の増殖を刺激するDCの能力を測定する。臍帯血単核細胞(CBMC(T細胞を含む))が応答系として使用され、蛍光標識され、芽細胞に由来する未成熟または成熟DCとの4～5日間の共培養後にそれらの増殖が測定された。予備実験の結果は、応答系の細胞が成熟(m)DCに反応して増殖することを示す。血管芽細胞に由来するナチュラルキラー細胞：細胞表面マーカーであるCD45、CD7、CD94、CD56、CD16、及びNKGD2Dが、芽細胞に由来するNK細胞及びヒト骨髓に由来するNK細胞において評価された。

40

【0985】

NK細胞に分化させる方法は、例えば、WO2011/068896A1(その内容は

50

その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載されるように、当該技術分野において公知である。WO2011/068896A1に記載されるような例示的な方法を以下に述べる。

【0986】

WO2011/068896A1に記載されるような初期分化：両方の細胞種の初期分化手順は同じであり得、胚様体(EB)を生じさせるための、サイトカインを加えたStemline II(Sigma)でのhESCの4日間の培養を含み得る。サイトカイン、VEGF、及びBMP4は、EB培養の全体を通して使用され得るが、bFGFは最初の2日間の後に添加され得る。合計4日間の後、得られたEBは0.05%のトリプシンで脱凝集され、次いで、トリプシンが血清含有培地で不活性化され得る。その後、個々の細胞は、40µMのセルストレナーを通して濾過され得、計数され得、追加のサイトカイン、例えば、TPO(50µg/ml)、VEGF(50µg/ml)、FL(50µg/ml)、及びbFGF(20~50µg/ml)を含有するH4436またはH4536メチルセルロース(Stem Cell Technologies)に播種され得る。NKへの分化のために、サイトカインIL2(1~10µg/ml)、IL7(1~20µg/ml)、及び/またはIL15(1~10µg/ml)もこの段階で添加され得る。血管芽細胞集団の作製及び増殖のために、メチルセルロース培養物は、1ml当たり50,000~150,000個細胞の濃度でプレーティングされ得る。芽様細胞が6~10日目の間にメチルセルロースから採取され得、以下の手順の1つにより更に分化され得る。

10

20

【0987】

WO2011/068896A1に記載されるようなNKへの分化：芽球細胞は、IL2(5~10ng/ml)、IL3(1~10ng/ml)、IL6(1~10ng/ml)、IL7(5~20ng/ml)、IL15(5~10ng/ml)、SCF(10~50ng/ml)、及びFL(10~50ng/ml)を加えたH4236メチルセルロースに、または同じサイトカイン及び10~20%のヒト血清を含有する液体培養液に再度プレーティングされ得る。6~8日間の培養後、細胞が採取され得、10~20%のヒト血清ならびにサイトカインIL7(5~20ng/ml)、IL15(5~10ng/ml)、SCF(10~50ng/ml)、及びFL(10~50ng/ml)を加えた液体培地(aMEMまたはDMEM:F12)で更に14~21日間、再度培養され得る。サイトカインカクテルを新鮮なものと交換するために、週1回の培地交換が使用され得る。

30

【0988】

細胞の免疫表現型及びNK細胞表面マーカーの獲得を評価するために、フローサイトメトリーが分化手順の全体を通して断続的に使用され得る。細胞表面マーカーとしては、CD34、CD45、CD56、CD16、CD94、NKG2D、CD3、CD7、CD4、CD8a、及びCD45RAが挙げられる。血管芽細胞に由来するNK細胞の機能を調べるための試験としては、(1)K562赤白血病標的細胞を使用した自然細胞傷害性アッセイ、(2)IL12/IL18または酢酸ミリスチン酸ホルボール処理に応答したIFNγ産生、(3)パーフォリン及びグランザイムB酵素の存在についての細胞内フローサイトメトリー、ならびに(4)Raji細胞及び抗CD20抗体使用した抗体依存性細胞傷害アッセイが挙げられ得る。NK細胞は、H7 hESC及びHuES3 hESCの両方から作製され得る。血管芽細胞に由来するNK細胞が標準的な4時間の共培養後に標的のK562赤芽球白血病細胞のアポトーシスを効果的に誘発することができ得るため、非放射性細胞傷害性アッセイは、51Cr放出アッセイと同様に、それらが自然細胞傷害性機能を保有することを示し得る。

40

【0989】

WO2011/068896A1に記載されるような血管芽細胞増殖条件の変更：上記のNK及びDC分化処理は、H4436メチルセルロース中で増殖した血管芽細胞を使用して実行され得る。しかしながら、Stem Cell Technologies社の

50

エリスロポエチンを含まないメチルセルロースであるH4536も血管芽細胞を効率的に作製するために使用され得る。これらの「epoマイナス」での血管芽細胞は、元の「epoプラス」での芽細胞とかなり類似しており、それらは種々の造血細胞及び血管細胞種に分化することができる。WO2011/068896A1に記載されるように、予備実験の結果は、NK細胞及びDCが含まれる、種々の造血系列への血管芽細胞の分化に関して、H4536の使用がH4436メチルセルロースと比較して顕著な利点を提供し得ることを示唆する。芽細胞増殖培地中にepoが存在しないことにより、赤血球マーカーCD235aを発現する細胞の百分率が低減され、CD34、CD45、及びCD41aを発現する細胞の百分率が増加することが発見され得る。この細胞表面マーカー発現の差異により、「epoマイナス」の増殖条件は、骨髄細胞系列及び／またはリンパ球系列への分化を増強し得る。

10

【0990】

WO2011/068896A1に記載されるようなヒトESCからNK細胞への分化：

【0991】

分化処理は以下の通りに実行され得る。H7 ESCが4日間かけて胚様体（EB）に分化された。EBが採取され得、血管芽細胞の作製及び増殖のために、サイトカインに富むメチルセルロースに10～15日間移され得る。血管芽細胞が採取され得、10～20%ヒトAB血清をサイトカインパネルと共に加えたフィーダーフリーの液体培地に更に14～17日間入れられ得、培地は3～4日毎に半分交換される。

20

【0992】

WO2011/068896A1に記載されるような（フローサイトメトリーを使用した）免疫表現型検査：未成熟NK細胞は、CD56bright、CD161o、KIR1o、CD117+、CD94-、NKG2D+であり得る。上記手順の変形例を使用することにより、32日間の分化後の生存細胞の20～30%がCD56+ CD16-であり得る。成熟NK細胞は、CD56dim、CD16hi、KIRhi、CD1171o/-、CD94+、NKG2D+であり得る。上記手順を使用することにより、31日間の分化後の生存細胞の20%がCD56- CD16+であり得、それらの5%がCD56lo CD16+であった。

【0993】

WO2011/068896A1に記載されるような機能アッセイ：自然細胞傷害性：成熟NK細胞は、標的細胞、例えば、ヒトK562赤白血病細胞、MCF7細胞、U87細胞、PC3細胞、NTERA2細胞のアポトーシスを誘発することができる。「3FC」アッセイは、細胞傷害性の効率を評価するために使用され得る。これは51Cr放出アッセイと類似するが、放射活性を必要としない。Derby et al., Immunol. Letters 78:35-39 (2001)を参照のこと。上記の成熟NK細胞の不均一集団（項目B2-a）は、標準的な4時間の実験で、65～70%のK562細胞においてアポトーシスを誘発することが発見され得る。

30

【0994】

WO2011/068896A1に記載されるような抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）：NK細胞表面上のFcγRIII（CD16）は、標的細胞に結合した抗CD20抗体のFc領域に結合することができ、ADCCを誘発することができる。Raji細胞（パーケットリンパ腫に由来する）が抗CD20抗体と共にプレインキュベートされ得、ADCCアッセイにおける標的として使用され得る（Tsirigotis et al., J of Steroid Biochem and Mol Bio 108:267-271 (2008)）。

40

【0995】

WO2011/068896A1に記載されるようなIFNγサイトカイン産生：未成熟NK細胞は、PMA（酢酸ミリスチン酸ホルボール）+イオノマイシン、またはIL18+IL12での一晩の処理に応答して多量のIFNγを産生し得る。IFNγ分泌がブ

50

レフェルジン A により阻害され得、細胞内フローサイトメトリーを使用して細胞が細胞表面マーカー及び IFN γ について染色される。WoU et al. J. of Immunol. 175: 5095-5103 (2005) を参照のこと。

【0996】

WO2011/068896A1 に記載されるような、異種移植マウスモデルを使用した NK 細胞のインビボでの免疫治療能力：生物発光性 K562 細胞（ルシフェラーゼを含有する）が腫瘍の生着のために NOD/SCID マウスに注射され得、続いて、NK 細胞がボラス投与され得、IL2 及び IL15 が毎日腹腔内注射され得る。NK のインビボでの経時的な免疫治療能力をモニタリングするために、生物発光イメージングが使用され得る。WoU et al. Blood 113 (24): 6094-6101 (2009) を参照のこと。

10

【0997】

WO2011/068896A1 に記載されるように、臍帯血細胞及び末梢血単核細胞の両方が応答系として使用され得、発明者らは、ヒト骨髄に由来する DC を陽性対照エフェクターとして使用する。

【0998】

E4BP4 が NK 系列の発生に重要であり得 (Gascoyne et al. Nature Immunology 10 (10): 1118-1125, 2009 を参照のこと)、インビトロでのより高い効率に必要な転写プログラムを提供し得る。

【0999】

WO2011/068896A1 に記載されるような NK 細胞分化：E4BP4 cDNA が、血管芽細胞でのその過剰発現及び NK への分化を増加させる能力の評価のために、レトロウイルスベクターにクローニングされ得る。NK 細胞の機能に重要な種々の KIR 受容体アイソフォームならびにパーフォリン及びグランザイム B 酵素の発現をモニタリングするために、RT-PCR が使用され得る。機能アッセイについて、芽細胞に由来する NK 細胞は、自然細胞傷害性を示し得るため、それらの抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 能が評価され得る。ADCC アッセイに必要な試薬としては、バーキットリンパ腫に由来する Raji 細胞及び抗 CD20 抗体が挙げられ得る。CD20 を特徴とする Raji 細胞の NK 細胞との共培養は、フローサイトメトリー法によりモニタリングされ得る特異的な ADCC 反応を誘発するはずである。

20

【1000】

NK 細胞は、(例えば、WO2017214569A1 (その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) に記載されるように) 任意の好適な方法を使用して、任意の好適な時間刺激され得る。幾つかの実施形態では、刺激された NK 細胞としては、13-酢酸 12-ミリスチン酸ホルボール (PMA) に曝露された NK 細胞が挙げられる。幾つかの実施形態では、刺激された NK 細胞としては、例えば、IL-21、IL-2、IL-12、IL-15、I 型インターフェロンなどが含まれる、サイトカインに曝露された NK 細胞が挙げられる。幾つかの実施形態では、サイトカインとしては、可溶性サイトカインが挙げられ得る。幾つかの実施形態では、サイトカインは、結合したサイトカインである。幾つかの実施形態では、サイトカインは、表面 (例えば、組織培養フラスコの表面が含まれる) に結合していてもよい。

30

【1001】

幾つかの実施形態では、結合したサイトカインは、人工抗原提示細胞 (aAPC) に結合していてもよい。aAPC としては、例えば、Denman et al., PLoS One, 2012, 7 (1): e30264 doi: 10.1371/journal.pone.0030264 に記載されるクローン 9 が挙げられ得る。幾つかの実施形態では、aAPC は、ビーズであり得る。球状ポリスチレンビーズが NK 細胞の表面タンパク質に対する抗体でコーティングされ得、NK 細胞活性化に使用され得る。ビーズは、任意のサイズのものであり得る。幾つかの例では、ビーズは、3 及び 6 マイクロメートルであり得る。ビーズは、4.5 マイクロメートルのサイズであり得る。ビーズは、任意の細

40

50

胞対ビーズ比率で利用され得る。例えば、1ミリリットル当たり100万個の細胞で3対1のビーズ対細胞比率が使用され得る。幾つかの実施形態では、aAPCは、硬質球状粒子、ポリスチレンラテックスマイクロビーズ、磁性ナノ粒子または磁性マイクロ粒子、ナノサイズ量子ドット、ポリ乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA)マイクロスフェア、非球状粒子、カーボンナノチューブバンドル、楕円体のPLGAマイクロ粒子、ナノワーム、流体脂質二重層含有系、2D支持脂質二重層(2D-SLB5)、リポソーム、RAFTソーム/マイクロドメインリポソーム、支持脂質二重膜粒子、またはそれらの任意の組み合わせであり得る。

【1002】

幾つかの実施形態では、刺激されたNK細胞としては、例えば、CellXVivo Human NK Cell Expansion Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN)、Human NK Cell Expansion Activator Kit (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany)などが含まれる、市販のキットで処理されたNK細胞が挙げられる。

10

【1003】

幾つかの実施形態では、刺激されたNK細胞としては、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6倍、少なくとも7倍、または少なくとも8倍に増殖された集団のNK細胞が挙げられる。幾つかの実施形態では、刺激されたNK細胞としては、最大5倍、最大6倍、最大7倍、最大8倍、最大10倍、最大20倍、または最大30倍に増殖された集団のNK細胞が挙げられる。

20

【1004】

幾つかの実施形態では、NK細胞は、数時間刺激され得る。幾つかの実施形態では、NK細胞は、数日間刺激され得る。例えば、幾つかの実施形態では、NK細胞は、最長1日間、最長2日間、最長3日間、最長4日間、最長5日間、最長6日間、最長7日間、最長8日間、または最長9日間、最長2週間、最長3週間などの間、aAPCと共培養され得る。

【1005】

幾つかの実施形態では、本方法は、編集されたNK細胞を増殖させることを含む。幾つかの実施形態では、増殖は、NK細胞を選別した後に実行され得る。幾つかの実施形態では、NK細胞は、人工抗原提示細胞(aAPC)との共インキュベーションにより増殖され得る。幾つかの実施形態では、NK細胞は、サイトカインに結合したaAPCとの共インキュベーションにより増殖され得る。幾つかの実施形態では、NK細胞は、可溶性サイトカインとの共インキュベーションにより増殖され得る。サイトカインとしては、例えば、IL-21、IL-2、IL-12、IL-15、I型インターフェロンなどが挙げられ得る。幾つかの実施形態では、NK細胞は、好ましくは、IL-21に結合したaAPCまたは膜結合型IL-21を発現するaAPCとの共インキュベーションにより増殖され得る。

30

【1006】

血管芽細胞を骨髄再構築細胞として使用することにより、またはそれらを樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、T細胞、及び/または間葉系幹細胞(MSC)に分化させることにより、本発明者らは、がん、HIV、及び/または自己免疫疾患に対抗するための大規模な効果的細胞療法を提供することができる。

40

【1007】

ゲノム編集された初代NK細胞または幹細胞に由来するNK細胞は、(例えば、WO2017214569A1(その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されるような)対象の疾患を処置または予防するために使用され得る。本方法は、本明細書に記載されるゲノム編集された初代NK細胞もしくは幹細胞に由来するNK細胞または本明細書に記載される方法により作製されたゲノム編集された初代NK細胞もしくは幹細胞に由来するNK細胞を含む組成物を当該対象に投与することを含み得る。疾患とし

50

ては、例えば、がん、前がん状態、病原体（例えば、マラリアが含まれる）による感染症、またはウイルス感染症が挙げられ得る。幾つかの実施形態では、細胞が癌免疫療法に使用されることが好ましい。

【1008】

ゲノム編集された初代NK細胞または幹細胞に由来するNK細胞は、単独でまたは1種以上の他の治療法と組み合わせて対象に投与され得る。例えば、ゲノム編集された初代NK細胞または幹細胞に由来するNK細胞は、活性薬剤及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物と組み合わせて、及び／または例えば、キメラ抗原受容体T細胞（CAR-T）が含まれる、細胞療法と組み合わせて、対象に投与され得る。NK細胞は、所望の効果をもたらすのに有効な量で患者、好ましくは、哺乳動物、より好ましくは、ヒトに投与され得る。NK細胞は、例えば、静脈内経路、腫瘍内経路、動脈内経路、経皮経路、カテーテルまたはステントによる局所的送達による経路、腫瘍内注射のための針または他のデバイスによる経路、皮下経路などが含まれる、種々の経路で投与され得る。NK細胞は、1回または複数回投与され得る。当該技術分野における通常の技量を有する医師は、適応NK細胞及び任意により、必要とされる医薬組成物の有効量及び投与を決定及び処方することができる。

10

【1009】

がんとしては、例えば、骨癌、脳癌、乳癌、子宮頸癌、喉頭のがん、肺癌、膵臓癌、前立腺癌、皮膚癌、脊椎のがん、胃癌、子宮癌、造血器癌、及び／またはリンパ系癌などが挙げられ得る。造血器癌及び／またはリンパ系癌としては、例えば、急性骨髄性白血病（AML）、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、骨髄異形成症候群（MDS）、非ホジキンリンパ腫（NHL）、慢性骨髄性白血病（CML）、ホジキン病、及び／または多発性骨髄腫が挙げられ得る。がんは転移がんであり得る。

20

【1010】

ウイルスとしては、例えば、CMV、水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）、エプスタイン・バーウイルス（EBV）、単純ヘルペスウイルス（HSV）、もしくはカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス（KSHV）が含まれる、ヘルペスウイルス、または例えば、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）が含まれる、レンチウイルスが挙げられ得る。更なる態様では、ゲノム編集された初代NK細胞は、対象における腫瘍の成長を阻害するために投与され得る。幾つかの実施形態では、腫瘍としては、固形腫瘍が挙げられ得る。

30

【1011】

ゲノム編集された初代NK細胞または幹細胞に由来するNK細胞は、他の処置の前、その間、及び／またはその後に対象に投与され得るか、または調製され得る。かかる併用療法は、例えば、サイトカイン；ケモカイン；例えば、高親和性抗CMV IgG抗体が含まれる、治療用抗体；例えば、B i K EもしくはT R i K Eが含まれる、NK細胞受容体リガンド；アジュバント；抗酸化剤；化学療法薬；及び／または放射線が含まれる、他の抗がん剤及び／または抗ウイルス剤の使用の前、その間、及び／またはその後、ゲノム編集された初代NK細胞または幹細胞に由来するNK細胞を投与することを含み得る。投与または調製は、他の抗がん剤及び／または抗ウイルス剤の投与と、数時間、数日、または更には数週間、時間的に隔てられていてもよい。追加的または代替的に、投与または調製は、他の生物活性物質または治療法、例えば、限定されるものではないが、抗腫瘍剤、及び非薬物療法、例えば、限定されるものではないが、手術と組み合わせられ得る。

40

【1012】

e. 内皮細胞

細胞療法製品に使用される内皮細胞は、細胞療法製品の製造プロセスの任意の段階でドナー能力についてプロファイリングされ得る。

【1013】

細胞療法製品に使用される内皮細胞は、初代内皮細胞であり得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、（例えば、ゲノム編集された）初代内皮細胞で実行され得る。

50

【1014】

本明細書の他箇所記載されるように、細胞療法製品に使用される内皮細胞は、多能性幹細胞（iPSC）に由来する内皮細胞であり得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、分化して、内皮細胞を形成することができる幹細胞でも実行され得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、幹細胞に由来する（例えば、ゲノム編集された）内皮細胞でも実行され得る。

【1015】

細胞療法に使用される場合の内皮細胞の望ましい特徴に関するある特定の情報が含まれる、本開示の文脈において参照される内皮細胞に関する関連情報は、当該技術分野において公知である。本明細書に記載される内皮細胞に関する実施形態は、HIP細胞（例えば、MHCクラスI及び／またはMHCクラスII分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現ならびに少なくとも1種の免疫寛容誘導因子の増強された発現を示す）を記載している実施形態、ならびに安全スイッチ、及び本明細書に記載されるような他の改変／遺伝子編集された細胞を記載している実施形態と容易かつ適切に組み合わせられ得ることが理解されよう。細胞療法製品に使用される内皮細胞は、細胞療法製品を製造する間の編集プロセスの任意の段階でドナー能力についてプロファイリングされ得る。

【1016】

本明細書に記載される内皮細胞は、対象の疾患を処置または予防するために使用され得る。

【1017】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供されるような遺伝子操作または改変されている細胞は、初代内皮細胞である。幾つかの実施形態では、初代甲状腺細胞は、1人以上の個別のドナー対象、例えば、1人以上の個別の健常なドナー（例えば、疾患または感染症について知られていないか、またはそれを疑われていない、例えば、その臨床徴候を示さない対象）から単離または採取される。当業者によって理解されるように、個体から内皮細胞を単離または採取する方法は、公知の技術を使用して達成され得る。本明細書において、対象（例えば、レシピエント）へのその後の移植（transplantation）または移植（engraftment）のための、本明細書に記載される改変（例えば、遺伝子改変）を含有する遺伝子操作された初代内皮細胞種が提供される。

【1018】

幾つかの実施形態では、初代内皮細胞は、対象または個体から取得される（例えば、収集されるか、抽出されるか、取り出されるか、または採取される）。幾つかの実施形態では、初代内皮細胞は、内皮細胞が1人以上の対象（例えば、1人以上の健常なヒトが含まれる、1人以上のヒト）に由来するように、内皮細胞のプールから作製される。幾つかの実施形態では、初代内皮細胞のプールは、1～100人、1～50人、1～20人、1～10人、1人以上、2人以上、3人以上、4人以上、5人以上、10人以上、20人以上、30人以上、40人以上、50人以上、または100人以上の対象に由来する。幾つかの実施形態では、ドナー対象は、患者（例えば、治療細胞を投与されるレシピエント）と異なる。幾つかの実施形態では、内皮細胞のプールは、患者由来の細胞を含まない。幾つかの実施形態では、内皮細胞のプールが採取されるドナー対象のうちの1人以上は、患者と異なる。

【1019】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞は、本明細書に記載される改変（例えば、遺伝子改変）を含有し、内皮細胞種に分化している遺伝子操作されたiPSCから分化した内皮細胞である。当業者によって理解されるように、分化の方法は、公知の技術を使用する目的の細胞種に依存する。幾つかの実施形態では、様々な内皮細胞種に分化した細胞は、対象（例えば、レシピエント）へのその後の移植（transplantation）または移植（engraftment）のために使用され得る。

【1020】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子操作された多能性細胞は、末梢動脈疾患に対処するために、新たな血管を形成させるための内皮コロニー形成細胞（ECFC）に分化される。内皮細胞を分化させるための技術は公知である。例えば、Prasain et al., doi:10.1038/nbt.3048（その全体が、特にヒト多能性幹細胞からの内皮細胞の作製のための方法及び試薬について、ならびに更に移植技術について参照により本明細書に組み込まれる）を参照のこと。分化は、通常、内皮細胞関連マーカーもしくは特異的マーカーの存在を評価することにより、または機能を測定することにより、当該技術分野において公知のように分析され得る。

【1021】

幾つかの実施形態では、インビトロでの分化により遺伝子操作された多能性細胞の集団から遺伝子操作された内皮細胞の集団を作製する方法は、（a）遺伝子操作されたiPSC細胞の集団を、GSK阻害剤を含む第1の培養培地で培養すること；（b）遺伝子操作されたiPSC細胞の集団を、VEGF及びbFGFを含む第2の培養培地で培養して、内皮前駆細胞の集団を作製すること；ならびに（c）内皮前駆細胞の集団を、ROCK阻害剤及びALK阻害剤を含む第3の培養培地で培養して、本明細書に記載される改変を含むように遺伝子操作されている分化した内皮細胞の集団を作製することを含む。

【1022】

幾つかの実施形態では、GSK阻害剤は、CHIR-99021、その誘導体、またはそのバリエーションである。幾つかの例では、GSK阻害剤は、約1mM～約10mMの範囲の濃度である。幾つかの実施形態では、ROCK阻害剤は、Y-27632、その誘導体、またはそのバリエーションである。幾つかの例では、ROCK阻害剤は、約1pM～約20pMの範囲の濃度である。幾つかの実施形態では、ALK阻害剤は、SB-431542、その誘導体、またはそのバリエーションである。幾つかの例では、ALK阻害剤は、約0.5pM～約10pMの範囲の濃度である。

【1023】

幾つかの実施形態では、第1の培養培地は、2pM～約10pMのCHIR-99021を含む。幾つかの実施形態では、第2の培養培地は、50ng/mlのVEGF及び10ng/mlのbFGFを含む。他の実施形態では、第2の培養培地は、Y-27632及びSB-431542を更に含む。種々の実施形態では、第3の培養培地は、10pMのY-27632及び1pMのSB-431542を含む。ある特定の実施形態では、第3の培養培地は、VEGF及びbFGFを更に含む。複数の例において、第1の培養培地及び／または第2の培地は、インスリンを欠く。

【1024】

本明細書において提供される細胞は、多能性細胞の内皮細胞への分化を補助及び／または促進するために、表面上、例えば、合成表面上で培養され得る。幾つかの実施形態では、表面は、限定されるものではないが、選択された1種以上のアクリレートモノマーのホモポリマーまたはコポリマーが含まれる、ポリマー材料を含む。アクリレートモノマー及びメタクリレートモノマーの非限定的な例としては、テトラ（エチレングリコール）ジアクリレート、グリセロールジメタクリレート、1,4-ブタンジオールジメタクリレート、ポリ（エチレングリコール）ジアクリレート、ジ（エチレングリコール）ジメタクリレート、テトラ（エチレングリコール）ジメタクリレート、1,6-ヘキサジオールプロポキシレートジアクリレート、ネオペンチルグリコールジアクリレート、トリメチロールプロパンベンゾエートジアクリレート、トリメチロールプロパンエトキシレート（1E/O/QH）メチル、トリシクロ[5.2.1.0^{2,6}]デカンジメタノールジアクリレート、ネオペンチルグリコールエトキシレートジアクリレート、及びトリメチロールプロパントリアクリレートが挙げられる。アクリレートは、当該技術分野において公知のように合成されるか、または商業的販売業者、例えば、Polysciences, Inc.、Sigma Aldrich, Inc.、及びSartomer, Inc. から入手される。

【1025】

幾つかの実施形態では、内皮細胞は、ポリマーマトリックス上に播種され得る。幾つかの例では、ポリマーマトリックスは、生分解性である。好適な生分解性マトリックスは、当該技術分野において周知であり、これには、コラーゲン-GAG、コラーゲン、フィブリン、PLA、PGA、及びPLA/PGAコポリマーが挙げられる。追加の生分解性材料としては、ポリ（無水物）、ポリ（ヒドロキシ酸）、ポリ（オルトエステル）、ポリ（プロピルマレート）、ポリ（カプロラクトン）、ポリアミド、ポリアミノ酸、ポリアセタール、生分解性ポリシアノアクリレート、生分解性ポリウレタン、及び多糖類が挙げられる。

【1026】

非生分解性ポリマーも同様に使用され得る。他の非生分解性であるが、生体適合性であるポリマーとしては、ポリピロール、ポリアニブン（polyaniline）、ポリチオフェン、ポリスチレン、ポリエステル、非生分解性ポリウレタン、ポリ尿素、ポリ（エチレン酢酸ビニル）、ポリプロピレン、ポリメタクリレート、ポリエチレン、ポリカーボネート、及びポリ（エチレンオキシド）が挙げられる。ポリマーマトリックスは、任意の形状で形成され得、例えば、粒子、スポンジ、チューブ、球体、鎖、コイル状鎖、毛細管網、フィルム、繊維、メッシュ、またはシートとして形成され得る。ポリマーマトリックスは、天然または合成の細胞外マトリックス材料及び因子を含むように改変され得る。

【1027】

ポリマー材料は、支持材料の表面上に分散され得る。細胞を培養するのに適した有用な支持材料としては、セラミック物質、ガラス、プラスチック、ポリマーもしくはコポリマー、それらの任意の組み合わせ、または1つの材料の別の材料上へのコーティングが挙げられる。幾つかの例では、ガラスとしては、ソーダ石灰ガラス、パイレックスガラス、バイコールガラス、石英ガラス、ケイ素、またはこれらの誘導体などが挙げられる。

【1028】

幾つかの例では、プラスチック、または樹枝状ポリマーが含まれるポリマーとしては、ポリ（塩化ビニル）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（メチルメタクリレート）、ポリ（酢酸ビニル-無水マレイン酸）、ポリ（ジメチルシロキサン）モノメタクリレート、環状オレフィンポリマー、フルオロカーボンポリマー、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレンイミン、またはこれらの誘導体などが挙げられる。幾つかの例では、コポリマーとしては、ポリ（酢酸ビニル-無水マレイン酸）コポリマー、ポリ（スチレン-無水マレイン酸）コポリマー、ポリ（エチレン-アクリル酸）コポリマー、またはこれらの誘導体などが挙げられる。

【1029】

本明細書において提供される方法に使用するための内皮細胞及びそれらの分化の更なる説明は、WO2020/018615（その開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる）に見出される。

【1030】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された内皮細胞、例えば、1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）から単離された初代内皮細胞、または1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）に由来するiPSCから分化した内皮細胞の集団は、培養下で維持され、幾つかの例では、投与前に増殖される。ある特定の実施形態では、内皮細胞の集団は、投与前に凍結保存される。

【1031】

幾つかの実施形態では、本技術は、免疫寛容誘導因子（例えば、CD47）を過剰発現し、1種以上のMHCクラスI分子及び／または1種以上のMHCクラスII分子（例えば、1種以上のMHCクラスIヒト白血球抗原及び／または1種以上のMHCクラスIIヒト白血球抗原）の低減された発現または発現の欠如を有する遺伝子操作された内皮細胞、例えば、1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）から単離された初代内皮細胞、または1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）に由来するiPSCから分化した内皮細胞を対象とする。

10

20

30

40

50

【1032】

幾つかの実施形態では、提供される遺伝子操作された内皮細胞は、免疫認識を回避する。幾つかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子操作された内皮細胞、例えば、1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）から単離された初代内皮細胞、または1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）に由来するiPSCから分化した内皮細胞は、患者（例えば、投与された際のレシピエント）において免疫応答を活性化しない。障害を処置する必要がある対象（例えば、レシピエント）または患者に本明細書に記載される遺伝子操作された内皮細胞の集団を投与することにより障害を処置する方法が提供される。

【1033】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された内皮細胞、例えば、1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）から単離された初代内皮細胞、または1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）に由来するiPSCから分化した内皮細胞は、投与する必要がある患者、例えば、ヒト患者に投与される。遺伝子操作された内皮細胞は、疾患または状態、例えば、限定されるものではないが、心血管疾患、血管疾患、末梢血管疾患、虚血性疾患、心筋梗塞、うっ血性心不全、末梢血管閉塞性疾患、脳卒中、再灌流損傷、肢虚血、神経障害（例えば、末梢神経障害または糖尿病性神経障害）、臓器不全（例えば、肝不全、腎不全など）、糖尿病、関節リウマチ、骨粗鬆症、血管損傷、組織損傷、高血圧症、冠状動脈疾患に起因する狭心症及び心筋梗塞、腎血管性高血圧症、腎動脈狭窄に起因する腎不全、下肢の跛行などに罹患している患者に投与され得る。ある特定の実施形態では、患者は、一過性の虚血発作または虚血性脳卒中に罹患したことがあるか、またはそれに罹患しており、場合によっては、これは脳血管疾患に起因し得る。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された内皮細胞は、例えば、アテローム硬化症、心筋梗塞、及び肢虚血において起こるような組織虚血を処置するため、ならびに損傷した血管を修復するために投与される。幾つかの例では、細胞は、移植片の生体工学に使用される。

【1034】

例えば、遺伝子操作された内皮細胞は、虚血組織の修復、血管及び心臓弁の形成、人工血管の工学、損傷した血管の修復、ならびに（例えば、移植前の）工学的組織における血管形成の誘発のために、細胞療法において使用され得る。加えて、内皮細胞は、腫瘍を標的とし、それを処置するための薬剤を送達するように更に改変され得る。

【1035】

多数の実施形態では、血管細胞または血管新生を必要とする組織の修復または置換方法が本明細書において提供される。本方法は、かかる処置を必要とするヒト患者に、かかる組織における血管新生を促進するための遺伝子操作された内皮細胞、例えば、単離された初代内皮細胞または分化した内皮細胞を含有する組成物を投与することを含む。血管細胞または血管新生を必要とする組織は、とりわけ、心臓組織、肝臓組織、膵臓組織、腎臓組織、筋組織、神経組織、骨組織であり得、これらは、損傷を受けた、過剰な細胞死を特徴とする組織、損傷の危険性がある組織、または人工的に操作された組織であり得る。

【1036】

幾つかの実施形態では、心臓疾患または障害に関連し得る血管疾患は、内皮細胞、例えば、限定されるものではないが、本明細書に記載されるように誘導された完全な血管内皮細胞及び心内膜内皮細胞を投与することにより処置され得る。かかる血管疾患としては、限定されるものではないが、冠状動脈疾患、脳血管疾患、大動脈弁狭窄、大動脈瘤、末梢動脈疾患、アテローム硬化症、静脈瘤、血管障害、冠灌流を欠く心臓の梗塞領域、非治療性創傷、糖尿病性もしくは非糖尿病性潰瘍、または血管の形成を誘発することが望ましい任意の他の疾患もしくは障害が挙げられる。

【1037】

ある特定の実施形態では、内皮細胞は、血管再建手術で使用される人工インプラント（例えば、Dacron及びGortexなどの合成材料から作製された血管）を改善するために使用される。例えば、重要な臓器または肢を灌流する病変動脈を置換するために、

10

20

30

40

50

多くの場合、人工動脈移植片が使用される。他の実施形態では、操作された内皮細胞は、弁表面での血栓形成性を下げることにより塞栓形成のリスクを減少させるために、人工心臓弁の表面を覆うために使用される。

【1038】

概説される内皮細胞は、組織及び／または単離された細胞を血管に移植するための周知の外科的技術を使用して、患者に移植され得る。幾つかの実施形態では、細胞は、注射（例えば、心筋内注射、冠動脈内注射、経心内膜注射、経心外膜注射、経皮注射）、注入、移植、及び埋め込みにより患者の心臓組織に導入される。

【1039】

内皮細胞の投与（送達）としては、限定されるものではないが、静脈内、動脈内（例えば、冠動脈内）、筋肉内、腹腔内、心筋内、経心内膜、経心外膜、鼻腔内投与、ならびに髄腔内、及び注入技術が含まれる、皮下または非経口投与が挙げられる。

【1040】

当業者によって理解されるように、細胞は、細胞種及びこれらの細胞の最終的な用途の両方に依存する当該技術分野において公知の技術を使用して移植される。幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞は、静脈内に、または患者の特定の位置での注射により移植される。特定の位置で移植される場合、細胞は、それらが定着する間の分散を防止するためにゲルマトリックス中に懸濁され得る。

【1041】

例示的な内皮細胞種としては、限定されるものではないが、毛細血管内皮細胞、血管内皮細胞、大動脈内皮細胞、動脈内皮細胞、静脈内皮細胞、腎内皮細胞、脳血管内皮細胞、肝臓内皮細胞などが挙げられる。

【1042】

本明細書において概説される内皮細胞、例えば、単離された初代内皮細胞または分化した内皮細胞は、1種以上の内皮細胞マーカーを発現し得る。かかるマーカーの非限定的な例としては、VE-カドヘリン（CD144）、ACE（アンジオテンシン変換酵素）（CD143）、BNH9／BNF13、CD31、CD34、CD54（ICAM-1）、CD62E（E-セレクトリン）、CD105（エンドグリン）、CD146、エンドカン（ESM-1）、エンドグリクス-1、エンドムチン、エオタキシン-3、EPAS1（内皮PASドメインタンパク質1）、第VII因子関連抗原、FLI-1、Flk-1（KDR、VEGFR-2）、FLT-1（VEGFR-1）、GATA2、GBP-1（グアニル酸結合タンパク質-1）、GRO- α 、HEX、ICAM-2（細胞間接着分子2）、LMO2、LYVE-1、MRB（マジックラウンドアバウト（magic roundabout））、ヌクレオリン、PAL-E（病理解剖学的ライデン内皮（pathologische anatomie Leiden-endothelium））、RTK、sVCAM-1、TALI、TEM1（腫瘍内皮マーカー1）、TEM5（腫瘍内皮マーカー5）、TEM7（腫瘍内皮マーカー7）、トロンボモジュリン（TM、CD141）、VCAM-1（血管細胞接着分子-1）（CD106）、VEGF、vWF（フォン・ビルブラント因子）、ZOO-1、内皮細胞選択的接着分子（ESAM）、CD102、CD93、CD184、CD304、及びDLL4が挙げられる。

【1043】

幾つかの実施形態では、内皮細胞は、障害／病態を処置するか、または当該障害／病態の症状を改善するのに有用である関心対象のタンパク質、例えば、限定されるものではないが、酵素、ホルモン、受容体、リガンド、または薬物をコードする外来性遺伝子を発現するように更に遺伝子改変される。内皮細胞を遺伝子改変するための標準的方法は、例えば、US5,674,722に記載されている。

【1044】

かかる内皮細胞は、疾患の予防または処置に有用であるポリペプチドまたはタンパク質の構成的合成及び送達を提供するために使用され得る。このようにして、ポリペプチドは、個体の血流中または身体の他の領域（例えば、中枢神経系）に直接分泌される。幾つか

10

20

30

40

50

の実施形態では、内皮細胞は、インスリン、血液凝固因子（例えば、第ⅤⅠⅠⅠ因子またはフォン・ビルブラント因子）、 α 1アンチトリプシン、アデノシンデアミナーゼ、組織プラスミノゲン活性化因子、インターロイキン（例えば、IL-1、IL-2、IL-3）などを分泌するように改変され得る。

【1045】

ある特定の実施形態では、内皮細胞は、移植された移植片の文脈においてそれらの性能を改善するように改変され得る。非限定的な具体例としては、管腔内血餅形成を予防するための血栓溶解物質の分泌または発現、平滑筋肥大に起因する管腔狭窄を予防するための平滑筋増殖の阻害因子の分泌、ならびに内皮細胞増殖を刺激し、移植片管腔の内皮細胞による裏打ちの範囲または持続期間を改善するための内皮細胞分裂促進因子または自己分泌因子の発現及び／または分泌が挙げられる。

10

【1046】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された内皮細胞は、治療濃度の分泌産物を特定の器官または四肢に送達するために利用される。例えば、インビトロで遺伝子操作された（形質導入された）内皮細胞で裏打ちされた血管インプラントが、特定の器官または四肢に移植され得る。形質導入された内皮細胞の分泌産物は、灌流組織に高濃度で送達され、これにより、標的とする解剖学的位置に対する所望の効果が達成される。

【1047】

他の実施形態では、内皮細胞は、血管新生化している腫瘍において、内皮細胞により発現される場合に血管新生を妨害または阻害する遺伝子を含むように更に遺伝子改変される。幾つかの例では、内皮細胞は、腫瘍処置の完了時に移植された内皮細胞の負の選択を可能にする、本明細書に記載される選択可能な自殺遺伝子のうちのいずれかを発現するようにも遺伝子改変され得る。

20

【1048】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される内皮細胞、例えば、単離された初代内皮細胞または分化した内皮細胞は、血管損傷、心血管疾患、血管疾患、末梢血管疾患、虚血性疾患、心筋梗塞、うっ血性心不全、末梢血管閉塞性疾患、高血圧症、虚血性組織損傷、再灌流傷害、肢虚血、脳卒中、神経障害（例えば、末梢神経障害または糖尿病性神経障害）、臓器不全（例えば、肝不全、腎不全など）、糖尿病、関節リウマチ、骨粗鬆症、脳血管疾患、高血圧症、冠状動脈疾患に起因する狭心症及び心筋梗塞、腎血管性高血圧症、腎動脈狭窄に起因する腎不全、下肢の跛行、他の血管病態または疾患からなる群から選択される血管障害を処置するためにレシピエント対象に投与される。

30

【1049】

f. 上皮細胞

細胞療法製品に使用される上皮細胞は、細胞療法製品の製造プロセスの任意の段階でドナー能力についてプロファイリングされ得る。

【1050】

細胞療法製品に使用される上皮細胞は、初代上皮細胞であり得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、（例えば、ゲノム編集された）初代上皮細胞で実行され得る。

40

【1051】

本明細書のおける他箇所で記載されるように、細胞療法製品に使用される上皮細胞は、多能性幹細胞（iPSC）に由来する上皮細胞であり得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、分化して、上皮細胞を形成することができる幹細胞でも実行され得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、幹細胞に由来する（例えば、ゲノム編集された）上皮細胞でも実行され得る。

【1052】

細胞療法に使用される場合の上皮細胞の望ましい特徴に関するある特定の情報が含まれる、本開示の文脈において参照される上皮細胞に関する関連情報は、当該技術分野におい

50

て公知である。本明細書に記載される上皮細胞に関する実施形態は、H I P細胞（例えば、M H CクラスI及び／またはM H CクラスII分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現ならび少なくとも1種の免疫寛容誘導因子の増強された発現を示す）を記載している実施形態、ならびに安全スイッチ、及び本明細書に記載されるような他の改変／遺伝子編集された細胞を記載している実施形態と容易かつ適切に組み合わせられ得ることが理解されよう。細胞療法製品に使用される上皮細胞は、細胞療法製品を製造する間の編集プロセスの任意の段階でドナー能力についてプロファイリングされ得る。

【1053】

本明細書に記載される上皮細胞は、対象の疾患を処置または予防するために使用され得る。

【1054】

網膜色素上皮（R P E）細胞

細胞療法に使用される場合のR P E細胞の望ましい特徴に関するある特定の情報が含まれる、本開示の文脈において参照されるR P E細胞に関する関連情報は、当該技術分野において公知である。幾つかの実施形態では、本明細書において提供されるような遺伝子操作または改変されている細胞は、初代網膜色素上皮（R P E）細胞である。幾つかの実施形態では、初代R P E細胞は、1人以上の個別のドナー対象、例えば、1人以上の個別の健常なドナー（例えば、疾患または感染症について知られていないか、またはそれを疑われていない、例えば、その臨床徴候を示さない対象）から単離または採取される。当業者によって理解されるように、個体からR P E細胞を単離または採取する方法は、公知の技術を使用して達成され得る。本明細書において、対象（例えば、レシピエント）へのその後の移植（t r a n s p l a n t a t i o n）または移植（e n g r a f t m e n t）のための、本明細書に記載される改変（例えば、遺伝子改変）を含有する遺伝子操作された初代R P E細胞が提供される。

【1055】

幾つかの実施形態では、初代R P E細胞は、対象または個体から取得される（例えば、収集されるか、抽出されるか、取り出されるか、または採取される）。幾つかの実施形態では、初代R P E細胞は、R P E細胞が1人以上の対象（例えば、1人以上の健常なヒトが含まれる、1人以上のヒト）に由来するように、R P E細胞のプールから作製される。幾つかの実施形態では、初代R P E細胞のプールは、1～100人、1～50人、1～20人、1～10人、1人以上、2人以上、3人以上、4人以上、5人以上、10人以上、20人以上、30人以上、40人以上、50人以上、または100人以上の対象に由来する。幾つかの実施形態では、ドナー対象は、患者（例えば、治療細胞を投与されるレシピエント）と異なる。幾つかの実施形態では、R P E細胞のプールは、患者由来の細胞を含まない。幾つかの実施形態では、R P E細胞のプールが採取されるドナー対象のうちの1人以上は、患者と異なる。

【1056】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞は、本明細書に記載される改変（例えば、遺伝子改変）を含有し、R P E細胞に分化している遺伝子操作されたi P S Cから分化したR P E細胞である。当業者によって理解されるように、分化の方法は、目的の細胞種に依存し、公知の技術を使用する。幾つかの実施形態では、R P E細胞に分化した細胞は、対象（例えば、レシピエント）へのその後の移植（t r a n s p l a n t a t i o n）または移植（e n g r a f t m e n t）のために使用され得る。

【1057】

多能性幹細胞をR P E細胞に分化させるための有用な方法は、例えば、U S 9, 458, 428及びU S 9, 850, 463（それらの開示は、明細書を含めその全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。ヒト人工多能性幹細胞からR P E細胞を作製するための更なる方法は、例えば、L a m b a e t a l., P N A S, 2006, 103（34）：12769－12774、M e l l o u g h e t a l., S t e m C e l l s, 2012, 30（4）：673－686、I d e l s o n e t a l.

, Cell Stem Cell, 2009, 5 (4) : 396-408、Rowland et al, Journal of Cellular Physiology, 2012, 227 (2) : 457-466、Buchholz et al, Stem Cells Trans Med, 2013, 2 (5) : 384-393、及び da Cruz et al, Nat Biotech, 2018, 36 : 328-337に見出され得る。

【1058】

ヒト多能性幹細胞は、Kamao et al., Stem Cell Reports, 2014, 2 (2) : 205-18 (その全体が、特に分化技術及び試薬のためのそこで概説される方法及び試薬に関して参照により本明細書に組み込まれる) に概説される技術を使用してRPE細胞に分化されている。Mandai et al., N Engl J Med, 2017, 376 : 1038-1046 (その内容は、その全体がRPE細胞のシートの作製及び患者への移植のための技術として本明細書に組み込まれる) も参照のこと。当該技術分野において公知のように、分化は、通常、RPE関連マーカー及び／または特異的マーカーの存在を評価することにより、または機能を測定することにより分析され得る。例えば、Kamao et al., Stem Cell Reports, 2014, 2 (2) : 205-18 (その内容は、参照によりその全体が、特に結果セクションの第1段落で概説されるマーカーに関して本明細書に組み込まれる) を参照のこと。

【1059】

幾つかの実施形態では、インビトロでの分化により、遺伝子操作された多能性細胞の集団から遺伝子操作された網膜色素上皮 (RPE) 細胞の集団を作製する方法は、(a) 遺伝子操作された多能性細胞の集団を、アクチビンA、bFGF、BMP4 / 7、DKK1、IGF1、ノギン、BMP阻害剤、ALK阻害剤、ROCK阻害剤、及びVEGFR阻害剤からなる群から選択される因子のいずれかを含む第1の培養培地で培養して、RPE前駆細胞の集団を作製すること；ならびに (b) RPE前駆細胞の集団を、当該第1の培養培地と異なる第2の培養培地で培養して、遺伝子操作されたRPE細胞の集団を作製することを含む。幾つかの実施形態では、ALK阻害剤は、SB-431542、その誘導体、またはそのバリエーションである。幾つかの例では、ALK阻害剤は、約2mM～約10pMの範囲の濃度である。幾つかの実施形態では、ROCK阻害剤は、Y-27632、その誘導体、またはそのバリエーションである。幾つかの例では、ROCK阻害剤は、約1pM～約10pMの範囲の濃度である。幾つかの実施形態では、第1の培養培地及び／または第2の培養培地は、動物血清を含まない。

【1060】

分化は、通常、RPE関連マーカー及び／または特異的マーカーの存在を評価することにより、または機能を測定することにより、当該技術分野において公知のように分析され得る。例えば、Kamao et al., Stem Cell Reports, 2014, 2 (2) : 205-18 (その内容は、参照によりその全体が、特に結果セクションに関して本明細書に組み込まれる) を参照のこと。

【1061】

それらの分化方法及び本技術に使用するための方法が含まれる、RPE細胞の追加の説明は、WO2020 / 018615 (その開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる) に見出される。

【1062】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたRPE細胞、例えば、1人以上の個別のドナー (例えば、健常なドナー) から単離された初代RPE細胞、または1人以上の個別のドナー (例えば、健常なドナー) に由来するiPSCから分化したRPE細胞の集団は、培養下で維持され、幾つかの例では、投与前に増殖される。ある特定の実施形態では、RPE細胞の集団は、投与前に凍結保存される。

【1063】

例示的なRPE細胞種としては、限定されるものではないが、網膜色素上皮（RPE）細胞、RPE前駆細胞、未成熟RPE細胞、成熟RPE細胞、機能的RPE細胞などが挙げられる。

【1064】

幾つかの実施形態では、RPE細胞、例えば、1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）から単離された初代RPE細胞、または1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）に由来するiPSCから分化したRPE細胞は、天然RPE細胞の遺伝子発現プロファイルに類似するか、または実質的に類似する遺伝子発現プロファイルを有する。かかるRPE細胞は、平面基板上でコンフルエントの状態まで増殖させた場合に天然RPE細胞の多角形の形態、平面状シートの形態を有し得る。

10

【1065】

幾つかの実施形態では、本技術は、免疫寛容誘導因子（例えば、CD47）を過剰発現し、1種以上のMHCクラスI分子及び／または1種以上のMHCクラスII分子（例えば、1種以上のMHCクラスIヒト白血球抗原及び／または1種以上のMHCクラスIIヒト白血球抗原）の低減された発現または発現の欠如を有する遺伝子操作されたRPE細胞、例えば、1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）から単離された初代RPE細胞、または1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）に由来するiPSCから分化したRPE細胞を対象とする。

【1066】

幾つかの実施形態では、提供される遺伝子操作されたRPE細胞は、免疫認識を回避する。幾つかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子操作されたRPE細胞、例えば、1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）から単離された初代RPE細胞、または1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）に由来するiPSCから分化したRPE細胞は、患者（例えば、投与された際のレシピエント）において免疫応答を活性化しない。障害を処置する必要がある対象（例えば、レシピエント）または患者に本明細書に記載される遺伝子操作されたRPE細胞の集団を投与することにより障害を処置する方法が提供される。

20

【1067】

RPE細胞は、黄斑部変性に罹患している患者または損傷したRPE細胞を有する患者に移植され得る。幾つかの実施形態では、患者は、加齢性黄斑変性（AMD）、早期AMD、中期AMD、後期AMD、非新生血管型加齢性黄斑変性、ドライ型黄斑変性（ドライ型加齢性黄斑変性）、ウェット型黄斑変性（ウェット型加齢性黄斑変性）、若年性黄斑変性（JMD）（例えば、シュタルガルト病、ベスト病、及び若年性網膜分離症）、レーバー先天性黒内障、または網膜色素変性症を有する。他の実施形態では、患者は、網膜剥離に罹患している。

30

【1068】

治療用途では、開示される方法により調製される細胞は、通常、等張性賦形剤を含む医薬組成物の形態で供給され得、ヒトへの投与用に十分に滅菌された条件下で調製される。細胞組成物の医薬製剤における一般原則については、“Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy”, Morstyn & Sheridan eds, Cambridge University Press, 1996、及び“Hematopoietic Stem Cell Therapy”, E. D. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000を参照のこと。細胞は、流通または臨床用途に適したデバイスまたは容器に包装され得る。

40

甲状腺細胞

【1069】

細胞療法に使用される場合の甲状腺細胞の望ましい特徴に関するある特定の情報が含まれる、本開示の文脈において参照される甲状腺細胞に関する関連情報は、当該技術分野に

50

において公知である。幾つかの実施形態では、本明細書において提供されるような遺伝子操作または改変されている細胞は、初代甲状腺細胞である。幾つかの実施形態では、初代甲状腺細胞は、1人以上の個別のドナー対象、例えば、1人以上の個別の健常なドナー（例えば、疾患または感染症について知られていないか、またはそれを疑われていない、例えば、その臨床徴候を示さない対象）から単離または採取される。当業者によって理解されるように、個体から甲状腺細胞を単離または採取する方法は、公知の技術を使用して達成され得る。本明細書において、対象（例えば、レシピエント）へのその後の移植（*transplantation*）または移植（*engraftment*）のための、本明細書に記載される改変（例えば、遺伝子改変）を含有する遺伝子操作された初代甲状腺細胞が提供される。

10

【1070】

幾つかの実施形態では、初代甲状腺細胞は、対象または個体から取得される（例えば、収集されるか、抽出されるか、取り出されるか、または採取される）。幾つかの実施形態では、初代甲状腺細胞は、甲状腺細胞が1人以上の対象（例えば、1人以上の健常なヒトが含まれる、1人以上のヒト）に由来するように、甲状腺細胞のプールから作製される。幾つかの実施形態では、初代甲状腺細胞のプールは、1～100人、1～50人、1～20人、1～10人、1人以上、2人以上、3人以上、4人以上、5人以上、10人以上、20人以上、30人以上、40人以上、50人以上、または100人以上の対象に由来する。幾つかの実施形態では、ドナー対象は、患者（例えば、治療細胞を投与されるレシピエント）と異なる。幾つかの実施形態では、甲状腺細胞のプールは、患者由来の細胞を含まない。幾つかの実施形態では、甲状腺細胞のプールが採取されるドナー対象のうちの1人以上は、患者と異なる。

20

【1071】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞は、本明細書に記載される改変（例えば、遺伝子改変）を含有し、甲状腺細胞に分化している遺伝子操作された*iPSC*から分化した甲状腺細胞である。当業者によって理解されるように、分化の方法は、目的の細胞種に依存し、公知の技術を使用する。幾つかの実施形態では、甲状腺細胞に分化した細胞は、対象（例えば、レシピエント）へのその後の移植（*transplantation*）または移植（*engraftment*）のために使用され得る。

【1072】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される改変を含有する遺伝子操作された多能性細胞は、自己免疫性甲状腺炎に対処するために、甲状腺ホルモンを分泌することができる甲状腺前駆細胞及び甲状腺濾胞オルガノイドに分化される。甲状腺細胞を分化させるための技術は、当技術分野において公知である。例えば、Kurmann et al., *Cell Stem Cell*, 2015 Nov 5; 17(5): 527-42（参照によりその全体が、特にヒト多能性幹細胞から甲状腺細胞を作製するための方法及び試薬、ならびに更に移植技術に関して本明細書に組み込まれる）を参照のこと。分化は、通常、甲状腺細胞関連マーカーもしくは特異的マーカーの存在を評価することにより、または機能を測定することにより、当該技術分野において公知のように分析され得る。

30

【1073】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された甲状腺細胞、例えば、1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）から単離された初代甲状腺細胞、または1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）に由来する*iPSC*から分化した甲状腺細胞の集団は、培養下で維持され、幾つかの例では、投与前に増殖される。ある特定の実施形態では、甲状腺細胞の集団は、投与前に凍結保存される。

40

【1074】

幾つかの実施形態では、本技術は、免疫寛容誘導因子（例えば、*CD47*）を過剰発現し、1種以上の*MHC*クラスⅠ分子及び／または1種以上の*MHC*クラスⅡ分子（例えば、1種以上の*MHC*クラスⅠヒト白血球抗原及び／または1種以上の*MHC*クラスⅡヒト白血球抗原）の低減された発現または発現の欠如を有する遺伝子操作された甲状腺細胞

50

胞、例えば、1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）から単離された初代甲状腺細胞、または1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）に由来するiPSCから分化した甲状腺細胞を対象とする。

【1075】

幾つかの実施形態では、提供される遺伝子操作された甲状腺細胞は、免疫認識を回避する。幾つかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子操作された甲状腺細胞、例えば、1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）から単離された初代甲状腺細胞、または1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）に由来するiPSCから分化したβ膵島細胞は、患者（例えば、投与された際のレシピエント）において免疫応答を活性化しない。障害を処置する必要がある対象（例えば、レシピエント）または患者に本明細書に記載される遺伝子操作された内皮細胞の集団を投与することにより障害を処置する方法が提供される。

10

【1076】

g. 心臓細胞

細胞療法製品に使用される心臓細胞は、細胞療法製品の製造プロセスの任意の段階でドナー能力についてプロファイリングされ得る。

【1077】

細胞療法製品に使用される心臓細胞は、初代心臓細胞であり得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、（例えば、ゲノム編集された）初代心臓細胞で実行され得る。

20

【1078】

本明細書の他箇所で記載されるように、細胞療法製品に使用される心臓細胞は、多能性幹細胞（iPSC）に由来する心臓細胞であり得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、分化して、心臓細胞を形成することができる幹細胞でも実行され得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、幹細胞に由来する（例えば、ゲノム編集された）心臓細胞でも実行され得る。

【1079】

細胞療法に使用される場合の心臓細胞の望ましい特徴に関するある特定の情報が含まれる、本開示の文脈において参照される心臓細胞に関する関連情報は、当該技術分野において公知である。本明細書に記載される心臓細胞に関する実施形態は、HIP細胞（例えば、MHCクラスI及び／またはMHCクラスII分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現ならび少なくとも1種の免疫寛容誘導因子の増強された発現を示す）を記載している実施形態、ならびに安全スイッチ、及び本明細書に記載されるような他の改変／遺伝子編集された細胞を記載している実施形態と容易かつ適切に組み合わせられ得ることが理解されよう。細胞療法製品に使用される心臓細胞は、細胞療法製品を製造する間の編集プロセスの任意の段階でドナー能力についてプロファイリングされ得る。

30

【1080】

本明細書に記載される心臓細胞は、対象の疾患を処置または予防するために使用され得る。

40

【1081】

本明細書において、対象（例えば、レシピエント）へのその後の移植（transplantation）または移植（engraftment）用に、HIP細胞から分化させた心臓細胞種が提供される。当業者によって理解されるように、分化の方法は、目的の細胞種に依存し、公知の技術を使用する。例示的な心臓細胞種としては、限定されるものではないが、心筋細胞、結節性心筋細胞、伝導心筋細胞（conducting cardiomyocyte）、機能心筋細胞（working cardiomyocyte）、心筋細胞前駆体細胞、心筋細胞前駆細胞、心臓幹細胞、心筋細胞、心房性心臓幹細胞、心室性心臓幹細胞、心外膜細胞、造血細胞、血管内皮細胞、心内膜内皮細胞、心臓弁間質細胞、心臓ペースメーカー細胞などが挙げられる。

50

【1082】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される心臓細胞は、小児心筋症、加齢性心筋症、拡張型心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症、慢性虚血性心筋症、周産期心筋症、炎症性心筋症、特発性心筋症、他の心筋症、心筋虚血再灌流傷害、心室機能不全、心不全、うっ血性心不全、冠動脈疾患、末期心疾患、アテローム硬化症、虚血、高血圧症、再狭窄、狭心症、リウマチ性心臓、動脈炎症、心血管疾患、心筋梗塞、心筋虚血、うっ血性心不全、心筋梗塞、心虚血、心外傷、心筋虚血、血管疾患、後天性心疾患、先天性心疾患、アテローム硬化症、冠動脈疾患、伝導系機能不全、冠動脈機能不全、肺高血圧症、心不整脈、筋ジストロフィー、筋肉量異常、筋肉変性、心筋炎、感染性心筋炎、薬物または毒素誘発性筋肉異常、過敏性心筋炎、及び自己免疫性心内膜炎からなる群から選択される心臓障害を処置するために、レシピエント対象に投与される。

10

【1083】

従って、心外傷または心臓疾患もしくは障害を処置及び予防する必要がある対象における、心外傷または心臓疾患もしくは障害の処置及び予防のための方法が本明細書において提供される。本明細書に記載される方法は、多数の心臓疾患またはそれらの症状、例えば、心臓の構造及び／または機能への病理学的損傷をもたらすものを処置するか、改善するか、予防するか、またはその進行を緩徐化するために使用され得る。用語「心臓疾患」、「心臓障害」、及び「心外傷」は、本明細書において互換的に使用され、弁、内皮、梗塞領域、または心臓の他の構成要素もしくは構造が含まれる、心臓に関係する状態及び／または障害を指す。かかる心臓疾患または心臓関連疾患としては、限定されるものではないが、とりわけ、心筋梗塞、心不全、心筋症、先天性心臓欠陥、心臓弁疾患または機能不全、心内膜炎、リウマチ熱、僧帽弁逸脱症、感染性心内膜炎、肥大型心筋症、拡張型心筋症、心筋炎、心肥大症、及び／または僧帽弁閉鎖不全症が挙げられる。

20

【1084】

幾つかの実施形態では、心筋細胞前駆体としては、成熟（最終段階）心筋細胞を含む子孫を生じさせることができる細胞が挙げられる。心筋細胞前駆細胞は、多くの場合、GATA-4、Nkx2.5、及びMEF-2ファミリーの転写因子から選択される1つ以上のマーカーを使用して同定され得る。幾つかの例では、心筋細胞は、以下のリストからの1つ以上のマーカー（場合により、少なくとも2、3、4、または5つのマーカー）を発現する未成熟心筋細胞または成熟心筋細胞を指す：心筋トロポニンI（cTnI）、心筋トロポニンT（cTnT）、サルコメアミオシン重鎖（MHC）、GATA-4、Nkx2.5、N-カドヘリン、 β 2-アドレナリン受容体、ANF、MEF-2ファミリーの転写因子、クレアチンキナーゼMB（CK-MB）、ミオグロビン、及び心房性ナトリウム利尿因子（ANF）。幾つかの実施形態では、心臓細胞は、自発的な周期的収縮活動を示す。幾つかの例では、その心臓細胞が、適切な Ca^{2+} 濃度及び電解質均衡を有する好適な組織培養環境で培養される場合、細胞は、培養培地になんらの追加の成分も添加する必要なしに、細胞の一軸方向に周期的様式で収縮し、次いで、収縮を解除するのが認められ得る。幾つかの実施形態では、心臓細胞は、低免疫原性心臓細胞である。

30

【1085】

幾つかの実施形態では、インビトロでの分化により低免疫原性多能性（HIP）細胞の集団から低免疫原性心臓細胞の集団を作製する方法は、（a）GSK阻害剤を含む培養培地でHIP細胞の集団を培養すること；（b）WNTアンタゴニストを含む培養培地で当該HIP細胞の集団を培養して、心臓前駆細胞の集団を作製すること；及び（c）インスリンを含む培養培地で当該心臓前駆細胞の集団を培養して、低免疫心臓細胞の集団を作製することを含む。幾つかの実施形態では、GSK阻害剤は、CHIR-99021、その誘導体、またはそのバリエーションである。幾つかの例では、GSK阻害剤は、約2mM～約10mMの範囲の濃度である。幾つかの実施形態では、WNTアンタゴニストは、IWR1、その誘導体、またはそのバリエーションである。幾つかの例では、WNTアンタゴニストは、約2mM～約10mMの範囲の濃度である。

40

【1086】

50

幾つかの実施形態では、低免疫原性心臓細胞の集団は、非心臓細胞から単離される。幾つかの実施形態では、低免疫原性心臓細胞の単離された集団は、投与前に増殖される。ある特定の実施形態では、低免疫原性心臓細胞の単離された集団は、投与前に増殖され、凍結保存される。

【1087】

人工多能性幹細胞または多能性幹細胞を心臓細胞に分化させるための他の有用な方法は、例えば、US 2017/0152485、US 2017/0058263、US 2017/0002325、US 2016/0362661、US 2016/0068814、US 9,062,289、US 7,897,389、及びUS 7,452,718に記載されている。人工多能性幹細胞または多能性幹細胞から心臓細胞を作製するための追加の方法は、例えば、Xu et al, Stem Cells and Development, 2006, 15 (5): 631-9、Burridge et al, Cell Stem Cell, 2012, 10: 16-28、及びChen et al, Stem Cell Res, 2015, 15 (2): 365-375に記載されている。

10

【1088】

種々の実施形態では、低免疫原性心臓細胞は、BMP経路阻害剤、WNTシグナル伝達活性化剤、WNTシグナル伝達阻害剤、WNTアゴニスト、WNTアンタゴニスト、Src阻害剤、EGFR阻害剤、PCK活性化剤、サイトカイン、増殖因子、心臓作用性物質、化合物などを含む培養培地で培養され得る。

【1089】

20

WNTシグナル伝達活性化剤としては、限定されるものではないが、CHIR99021が挙げられる。PCK活性化剤としては、限定されるものではないが、PMAが挙げられる。WNTシグナル伝達阻害剤としては、限定されるものではないが、KY02111、SO3031 (KY01-I)、SO2031 (KY02-I)、及びSO3042 (KY03-I)、及びXAV939から選択される化合物が挙げられる。Src阻害剤としては、限定されるものではないが、A419259が挙げられる。EGFR阻害剤としては、限定されるものではないが、AG1478が挙げられる。

【1090】

iPSCから心臓細胞を作製するための薬剤の非限定的な例としては、アクチビンA、BMP4、Wnt3a、VEGF、可溶性Frizzedタンパク質、シクロスポリンA、アンジオテンシンII、フェニルエフリン、アスコルビン酸、ジメチルスルホキシド、5-アザ-2'-デオキシシチジンなどが挙げられる。

30

【1091】

本明細書において提供される細胞は、低免疫原性多能性細胞の心臓細胞への分化を補助及び／または促進するために、表面上、例えば、合成表面上で培養され得る。幾つかの実施形態では、表面は、限定されるものではないが、選択された1種以上のアクリレートモノマーのホモポリマーまたはコポリマーが含まれる、ポリマー材料を含む。アクリレートモノマー及びメタクリレートモノマーの非限定的な例としては、テトラ（エチレングリコール）ジアクリレート、グリセロールジメタクリレート、1,4-ブタンジオールジメタクリレート、ポリ（エチレングリコール）ジアクリレート、ジ（エチレングリコール）ジメタクリレート、テトラ（エチレングリコール）ジメタクリレート、1,6-ヘキサジオールプロポキシレートジアクリレート、ネオペンチルグリコールジアクリレート、トリメチロールプロパンベンゾエートジアクリレート、トリメチロールプロパンエトキシレート（1 EO/QH）メチル、トリシクロ[5.2.1.0^{2,6}]デカンジメタノールジアクリレート、ネオペンチルグリコールエトキシレートジアクリレート、及びトリメチロールプロパントリアクリレートが挙げられる。アクリレートは、当該技術分野において公知のように合成されるか、または商業的販売業者、例えば、Polysciences, Inc.、Sigma Aldrich, Inc.、及びSartomer, Inc.から入手される。

40

【1092】

50

ポリマー材料は、支持材料の表面上に分散され得る。細胞を培養するのに適した有用な支持材料としては、セラミック物質、ガラス、プラスチック、ポリマーもしくはコポリマー、それらの任意の組み合わせ、または1つの材料の別の材料上へのコーティングが挙げられる。幾つかの例では、ガラスとしては、ソーダ石灰ガラス、パイレックスガラス、バイコールガラス、石英ガラス、ケイ素、またはこれらの誘導体などが挙げられる。

【1093】

幾つかの例では、プラスチック、または樹枝状ポリマーが含まれるポリマーとしては、ポリ（塩化ビニル）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（メチルメタクリレート）、ポリ（酢酸ビニル-無水マレイン酸）、ポリ（ジメチルシロキサン）モノメタクリレート、環状オレフィンポリマー、フルオロカーボンポリマー、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレンイミン、またはこれらの誘導体などが挙げられる。幾つかの例では、コポリマーとしては、ポリ（酢酸ビニル-無水マレイン酸）コポリマー、ポリ（スチレン-無水マレイン酸）コポリマー、ポリ（エチレン-アクリル酸）コポリマー、またはこれらの誘導体などが挙げられる。

【1094】

本明細書に記載されるように調製された心臓細胞の有効性は、処置なしでは左室壁組織の55%が瘢痕組織となることをもたらす心臓凍結損傷の動物モデルにおいて評価され得る（Li et al, Ann. Thorac. Surg. 62:654, 1996、Sakai et al, Ann. Thorac. Surg. 8:2074, 1999、Sakai et al., Thorac. Cardiovasc. Surg. 118:715, 1999）。処置の成功は、瘢痕の面積を低減し得、瘢痕の拡大を制限し得、収縮期圧、拡張期圧、及び最大圧によって決定される心臓機能を改善し得る。心外傷は、左冠動脈前下行枝の遠位部において塞栓形成コイルを使用することによってもモデル化され得る（Watanabe et al., Cell Transplant. 7:239, 1998）、処置の有効性を組織学的検査及び心機能により評価され得る。

【1095】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された心臓細胞、例えば、1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）に由来するiPSCから分化した心臓細胞の集団は、培養下で維持され、幾つかの例では、投与前に増殖される。ある特定の実施形態では、心臓細胞の集団は、投与前に凍結保存される。

【1096】

幾つかの実施形態では、本技術は、免疫寛容誘導因子（例えば、CD47）を過剰発現し、1種以上のMHCクラスI分子及び／または1種以上のMHCクラスII分子（例えば、1種以上のMHCクラスIIヒト白血球抗原及び／または1種以上のMHCクラスIIヒト白血球抗原）の低減された発現または発現の欠如を有する遺伝子操作された心臓細胞、例えば、1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）に由来するiPSCから分化した心臓細胞を対象とする。

【1097】

幾つかの実施形態では、提供される遺伝子操作された心臓細胞は、免疫認識を回避する。幾つかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子操作された心臓細胞、例えば、1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）に由来するiPSCから分化した心臓細胞は、患者（例えば、投与された際のレシピエント）において免疫応答を活性化しない。障害を処置する必要がある対象（例えば、レシピエント）または患者に本明細書に記載される遺伝子操作された心臓細胞の集団を投与することにより障害を処置する方法が提供される。

【1098】

幾つかの実施形態では、投与は、対象の心臓組織への移植、静脈内注射、動脈内注射、冠動脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、心筋内注射、経心内膜注射、経心外膜注射、または輸注を含む。

【1099】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された心臓細胞を投与される患者は、心臓病薬も投与される。併用療法に使用される好適な心臓病薬の具体例としては、限定されるものではないが、増殖因子、増殖因子をコードするポリヌクレオチド、血管新生剤、カルシウムチャネル遮断薬、抗高血圧剤、有糸分裂阻害剤、変力作用剤、アテローム産生抑制剤、抗凝血薬、β遮断薬、抗不整脈剤、抗炎症剤、血管拡張剤、血栓溶解剤、強心配糖体、抗生物質、抗ウイルス剤、抗真菌剤、原虫を阻害する薬剤、硝酸塩、アンジオテンシン転換酵素（ACE）阻害剤、アンジオテンシンⅡ受容体アンタゴニスト、脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）、抗悪性腫瘍剤、ステロイドなどが挙げられる。

【1100】

本明細書において提供される方法による治療の効果は、種々の方法でモニタリングされ得る。例えば、心電図（ECG）またはホルターモニターは、処置の有効性を決定するために利用され得る。ECGは、心臓リズム及び電気インパルス の尺度であり、治療が対象の心臓における電気伝導を改善もしくは維持、その性能低下を予防、またはその性能低下を緩徐化したかどうかを決定するための非常に有効かつ非侵襲的な方法である。心臓異常、不整脈障害などをモニタリングするために長期間にわたって装着され得る携帯型ECGであるホルターモニターの使用も治療の有効性を評価するための信頼性の高い方法である。ECGまたは核医学検査は、心室機能の改善を測定するために使用され得る。

【1101】

心筋細胞

細胞療法製品に使用される心筋細胞は、細胞療法製品の製造プロセスの任意の段階でドナー能力についてプロファイリングされ得る。

【1102】

細胞療法製品に使用される心筋細胞は、初代心筋細胞であり得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、（例えば、ゲノム編集された）初代心筋細胞で実行され得る。

【1103】

本明細書の他箇所で記載されるように、細胞療法製品に使用される心筋細胞は、多能性幹細胞（iPSC）に由来する心筋細胞であり得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、分化して、心筋細胞を形成することができる幹細胞でも実行され得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、幹細胞に由来する（例えば、ゲノム編集された）心筋細胞でも実行され得る。

【1104】

細胞療法に使用される場合の心筋細胞の望ましい特徴に関するある特定の情報が含まれる、本開示の文脈において参照される心筋細胞に関する関連情報は、当該技術分野において公知である。本明細書に記載される心筋細胞に関する実施形態は、H1P細胞（例えば、MHCクラスⅠ及び／またはMHCクラスⅡ分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現ならび少なくとも1種の免疫寛容誘導因子の増強された発現を示す）を記載している実施形態、ならびに安全スイッチ、及び本明細書に記載されるような他の改変／遺伝子編集された細胞を記載している実施形態と容易かつ適切に組み合わせられ得ることが理解されよう。細胞療法製品に使用される心筋細胞は、細胞療法製品を製造する間の編集プロセスの任意の段階でドナー能力についてプロファイリングされ得る。

【1105】

本明細書に記載される心筋細胞は、対象の疾患を処置または予防するために使用され得る。

【1106】

本明細書において開示される細胞は、心筋細胞であり得、例えば、心筋細胞の集団が使用され得る。下記での「細胞」、例えば、「心筋細胞」への任意の言及は、本出願に記載される「細胞集団」、例えば、「心筋細胞の集団」にも適用されることが理解されよう。

【1107】

心筋細胞は、通常、NKX2.5、cTNT、ACTN2、TNNT1、TNNT3、MYH6、MYH7、MYL2、及びMYL7タンパク質を発現する。従って、これらのタンパク質は、心筋細胞のマーカーとして使用されることができる。

【1108】

幾つかの実施形態では、1つ以上の心筋細胞マーカーは、NKX2.5、cTNT、ACTN2、TNNT1、TNNT3、MYH6、MYH7、MYL2、及びMYL7からなる群から選択される1つ以上のマーカーを含む。幾つかの実施形態では、1つ以上の心筋細胞マーカーは、MYH6及びMYL7を含む。幾つかの実施形態では、1つ以上の心筋細胞マーカーは、NKX2.5、cTNT、MYH6、及びMYL7を含む。幾つかの実施形態では、1つ以上の心筋細胞マーカーは、NKX2.5及びcTNTを含む。

10

【1109】

心筋細胞は、当該技術分野において公知の任意の方法により作製され得る。

【1110】

幾つかの実施形態では、心筋細胞は、多能性幹細胞から分化していてもよく、ここで、集団は、8～22日目のいずれかまたはその前後に、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%である1つ以上の心筋細胞マーカーの存在頻度を有し、当該分化は0日目に開始される。

20

【1111】

幾つかの実施形態では、分化は、多能性幹細胞が、グリコゲン合成酵素キナーゼ3 (GSK3) / Wntの活性化因子 / β -カテニンシグナル伝達の阻害剤を含む培地で培養される1日目に開始される。

【1112】

幾つかの実施形態では、1つ以上の心筋細胞マーカーは、NKX2.5、cTNT、ACTN2、TNNT1、TNNT3、MYH6、MYH7、MYL2、及びMYL7からなる群から選択される1つ以上のマーカーを含む。幾つかの実施形態では、1つ以上の心筋細胞マーカーは、MYH6及びMYL7を含む。幾つかの実施形態では、1つ以上の心筋細胞マーカーは、NKX2.5、cTNT、MYH6、及びMYL7を含む。幾つかの実施形態では、1つ以上の心筋細胞マーカーは、NKX2.5及びcTNTを含む。

30

【1113】

幾つかの実施形態では、集団は、8、9、10、11、もしくは12日目またはその前後に、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるNKX2.5+ / cTNT+細胞の頻度を有する。幾つかの実施形態では、集団は、8、9、10、11、もしくは12日目またはその前後に、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるNKX2.5+ / cTNT+細胞の頻度を有する。幾つかの実施形態では、集団は、8、9、10、11、もしくは12日目またはその前後に、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%

40

50

、 95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるMYH6+／MYL7+細胞の頻度を有する。幾つかの実施形態では、集団は、8、9、10、11、もしくは12日目またはその前後に、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるNKX2.5+／cTNT+／MYH6+／MYL7+細胞の頻度を有する。

10

【1114】

幾つかの実施形態では、集団は、20、21、もしくは22日目またはその前後に、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるNKX2.5+／cTNT+細胞の頻度を有する。幾つかの実施形態では、集団は、20、21、もしくは22日目またはその前後に、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるMYH6+／MYL7+細胞の頻度を有する。幾つかの実施形態では、集団は、20、21、もしくは22日目またはその前後に、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるNKX2.5+／cTNT+／MYH6+／MYL7+細胞の頻度を有する。

20

30

40

【1115】

幾つかの実施形態では、集団は、9、10、もしくは11日目またはその前後に、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるNKX2.5+／cTNT+細胞、またはMYH6+／MYL7+細胞、またはNKX2.5+／cTNT+／MYH6+／MYL7+細胞の頻度を有

50

する。幾つかの実施形態では、集団は、10日目またはその前後に、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるNKX2.5+ / cTNT+細胞、またはMYH6+ / MYL7+細胞、またはNKX2.5+ / cTNT+ / MYH6+ / MYL7+細胞の頻度を有する。

【1116】

幾つかの実施形態では、集団は、8、9、10、11、もしくは12日目またはその前後に、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるNKX2.5+ / cTNT+細胞、またはMYH6+ / MYL7+細胞、またはNKX2.5+ / cTNT+ / MYH6+ / MYL7+細胞の頻度を有する。幾つかの実施形態では、集団は、9、10、もしくは11日目またはその前後に、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるNKX2.5+ / cTNT+細胞、またはMYH6+ / MYL7+細胞、またはNKX2.5+ / cTNT+ / MYH6+ / MYL7+細胞の頻度を有する。幾つかの実施形態では、集団は、10日目またはその前後に、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるNKX2.5+ / cTNT+細胞、またはMYH6+ / MYL7+細胞、またはNKX2.5+ / cTNT+ / MYH6+ / MYL7+細胞の頻度を有する。幾つかの実施形態では、集団は、8、9、10、11、もしくは12日目またはその前後に、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるNKX2.5+ / cTNT+細胞、またはMYH6+ / MYL7+細胞、またはNKX2.5+ / cTNT+ / MYH6+ / MYL7+細胞の頻度を有する。幾つかの実施形態では、集団は、9、10、もしくは11日目またはその前後に、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるNKX2.5+ / cTNT+細胞、またはMYH6+ / MYL7+細胞、またはNKX2.5+ / cTNT+ / MYH6+ / MYL7+細胞の頻度を有する。幾つかの実施形態では、集団は、10日目またはその前後に、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるNKX2.5+ / cTNT+細胞、またはMYH6+ / MYL7+細胞、またはNKX2.5+ / cTNT+ / MYH6+ / MYL7+細胞の頻度を有する。

【1117】

幾つかの実施形態では、多能性幹細胞は、人工多能性幹細胞、胚性幹細胞、骨髄間葉系幹細胞、心臓組織幹細胞、及び脂肪組織幹細胞からなる群から選択される。幾つかの実施形態では、多能性幹細胞は、人工多能性幹細胞である。

【1118】

幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、本明細書に記載されるような方法、インキュベーション、例えば、第1のインキュベーション、第2のインキュベーション、及び／または第3のインキュベーション、ならびに接触、例えば、解離剤との接触による解離のうちの任意の1つ以上を使用して作製された。

【1119】

幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、2、3、4、5、もしくは6日目またはその前後に、解離剤と接触させられた。幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、2、3、もしくは4日目またはその前後に、解離剤と接触させられた。幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、4日目またはその前後に、解離剤と接触させられた。

10

【1120】

幾つかの実施形態では、解離剤は、切断酵素であるか、またはそれを含む。幾つかの実施形態では、切断酵素は、プロテアーゼである。幾つかの実施形態では、プロテアーゼは、リジンまたはアルギニン残基のC末端側のペプチド結合を切断する組換え酵素である。幾つかの実施形態では、プロテアーゼは、エンドペプチダーゼである。幾つかの実施形態では、エンドペプチダーゼは、トリプシンである。幾つかの実施形態では、プロテアーゼは、トリプシン、コラゲナーゼ、キモトリプシン、エラスターゼ、ヒアルロニダーゼ、パイン、及びディスパーゼからなる群から選択される。幾つかの実施形態では、コラゲナーゼは、I型コラゲナーゼ、II型コラゲナーゼ、またはIII型コラゲナーゼである。幾つかの実施形態では、コラゲナーゼは、I型コラゲナーゼ、II型コラゲナーゼ、またはIII型コラゲナーゼである。幾つかの実施形態では、プロテアーゼは、コラゲナーゼである。幾つかの実施形態では、プロテアーゼは、ヒアルロニダーゼである。

20

【1121】

幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、8～22日目のいずれかまたはその前後に存在する。幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、もしくは22日目またはその前後に存在する。幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15日目またはその前後に存在する。幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、8、9、10、11、もしくは12日目またはその前後に存在する。幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、9、10、もしくは11日目またはその前後に存在する。幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、10日目またはその前後に存在する。

30

【1122】

幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、8～22日目のいずれかまたはその前後に採取された。幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、もしくは22日目またはその前後に採取された。幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15日目またはその前後に採取された。幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、8、9、10、11、もしくは12日目またはその前後に採取された。幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、9、10、もしくは11日目またはその前後に採取された。幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、10日目またはその前後に採取された。

40

【1123】

幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるNKX2.5+／cTNT+細胞、またはMYH6+／MYL7+細胞、またはNKX2.5+／cTNT+／MYH6+／MYL7+細胞の頻度を有する。幾つかの実施形態では、分化中

50

の心筋細胞の集団は、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるNKX2.5+ / cTNT+細胞、またはMYH6+ / MYL7+細胞、またはNKX2.5+ / cTNT+ / MYH6+ / MYL7+細胞の頻度を有する。幾つかの実施形態では、分化中の心筋細胞の集団は、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるNKX2.5+ / cTNT+細胞、またはMYH6+ / MYL7+細胞、またはNKX2.5+ / cTNT+ / MYH6+ / MYL7+細胞の頻度を有する。幾つかの実施形態では、分化中の心筋細胞の集団は、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるNKX2.5+ / cTNT+細胞、またはMYH6+ / MYL7+細胞、またはNKX2.5+ / cTNT+ / MYH6+ / MYL7+細胞の頻度を有する。

10

【1124】

幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるNKX2.5+ / cTNT+細胞、またはMYH6+ / MYL7+細胞、またはNKX2.5+ / cTNT+ / MYH6+ / MYL7+細胞の頻度を有する。幾つかの実施形態では、分化中の心筋細胞の集団は、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるNKX2.5+ / cTNT+細胞、またはMYH6+ / MYL7+細胞、またはNKX2.5+ / cTNT+ / MYH6+ / MYL7+細胞の頻度を有する。幾つかの実施形態では、分化中の心筋細胞の集団は、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるNKX2.5+ / cTNT+細胞、またはMYH6+ / MYL7+細胞、またはNKX2.5+ / cTNT+ / MYH6+ / MYL7+細胞の頻度を有する。幾つかの実施形態では、分化中の心筋細胞の集団は、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも95%、96%、97%、もしくは98%であるNKX2.5+ / cTNT+細胞、またはMYH6+ / MYL7+細胞、またはNKX2.5+ / cTNT+ / MYH6+ / MYL7+細胞の頻度を有する。

20

30

【1125】

幾つかの実施形態では、細胞集団は、第1の凝集塊のいずれかの細胞の集団、解離細胞の集団、例えば、第1の凝集塊から解離した細胞の集団、第2の凝集塊のいずれかの細胞の集団、及び／または心筋細胞の集団の中から選択される1つ以上の細胞の集団を含む細胞の混合集団であり得る。例えば、幾つかの実施形態では、特定の時点での細胞の採取は、細胞の混合集団、例えば、心筋細胞を含む第2の凝集塊及び第2の凝集塊を形成しなかった解離細胞の集団を採取することを含み得る。

40

【1126】

幾つかの実施形態では、細胞集団は、(a) 第1の凝集塊、例えば、本明細書に記載される第1の凝集塊のいずれか；(b) 解離細胞の集団、例えば、本明細書に記載される解離細胞の集団のいずれか；(c) 第2の凝集塊、例えば、本明細書に記載される第2の凝集塊のいずれか；及び／または(d) 心筋細胞の集団、例えば、当該第2の凝集塊の心筋細胞の集団、及び／または当該第2の凝集塊から分化し、及び／または解離した心筋細胞の集団のうちの1つ以上を含む細胞の混合集団であり得る。幾つかの実施形態では、解離

50

細胞の集団は、第2のインキュベーション及び／または第3のインキュベーションに従って培養されたが、第2の凝集塊を形成しなかった。

【1127】

幾つかの実施形態では、細胞集団は、本明細書に記載される第1の凝集塊及び／または第2の凝集塊のいずれかなどの、第1の凝集塊及び第2の凝集塊を含む細胞の混合集団である。

【1128】

幾つかの実施形態では、細胞集団は、本明細書に記載される第1の凝集塊及び／または解離細胞の集団及び／または第2の凝集塊のいずれかなどの、第1の凝集塊、解離細胞の集団、及び第2の凝集塊を含む細胞の混合集団である。

10

【1129】

幾つかの実施形態では、細胞集団は、本明細書に記載される第1の凝集塊及び／または解離細胞の集団のいずれかなどの、第1の凝集塊及び解離細胞の集団を含む細胞の混合集団である。

【1130】

幾つかの実施形態では、細胞集団は、本明細書に記載される解離細胞の集団及び／または第2の凝集塊のいずれかなどの、解離細胞の集団及び第2の凝集塊を含む細胞の混合集団である。

【1131】

幾つかの実施形態では、細胞集団は、第1の凝集塊、例えば、本明細書に記載される第1の凝集塊のいずれかから分化した細胞集団である。幾つかの実施形態では、第1の凝集塊から分化した細胞集団は、本明細書に記載される試薬、条件、及び／またはインキュベーションのいずれかにより分化している。

20

【1132】

幾つかの実施形態では、細胞集団は、第2の凝集塊、例えば、本明細書に記載される第2の凝集塊のいずれかから分化した細胞集団である。幾つかの実施形態では、第2の凝集塊から分化した細胞集団は、本明細書に記載される試薬、条件、及び／または本明細書に記載される第2及び／または第3のインキュベーションのいずれかが含まれる、インキュベーションのいずれかにより分化している。

【1133】

幾つかの実施形態では、細胞集団は、第1の凝集塊、例えば、本明細書に記載される第1の凝集塊のいずれかから解離された細胞集団である。幾つかの実施形態では、第1の凝集塊からの細胞集団の解離は、任意の手段及び／または試薬及び／または条件により行われ得るか、またはもたらされ得る。

30

【1134】

幾つかの実施形態では、解離細胞の集団は、第2のインキュベーション及び／または第3のインキュベーションに従って培養されたが、第2の凝集塊を形成しなかった。

【1135】

幾つかの実施形態では、第1の凝集塊は、解離剤との接触、及び／または第2のインキュベーション、及び／または第3のインキュベーションに従って培養されたが、解離細胞の集団をもたらさなかった。

40

【1136】

幾つかの実施形態では、細胞集団は、(a) 第1の凝集塊、例えば、本明細書に記載される第1の凝集塊のいずれか、(b) 解離細胞の集団、例えば、本明細書に記載される解離細胞の集団のいずれか、(c) 第2の凝集塊、例えば、本明細書に記載される第2の凝集塊のいずれか、(d) 心筋細胞の集団、例えば、本明細書に記載される心筋細胞の集団のいずれか、(e) 第1の凝集塊から解離された細胞集団、例えば、本明細書に記載される第1の凝集塊のいずれかから解離された細胞集団、(f) 第2の凝集塊から解離された細胞集団、例えば、本明細書に記載される第2の凝集塊のいずれかから解離された細胞集団、(g) 解離細胞の集団に解離されることなく、第2のインキュベーション及び／また

50

は第3のインキュベーションの条件に従って培養された第1の凝集塊、例えば、本明細書に記載される第1の凝集塊のいずれか、ならびに(h)第2の凝集塊を形成することなく、第2のインキュベーション及び／または第3のインキュベーションの条件に従って培養された解離細胞の集団、例えば、本明細書に記載される解離細胞の集団のいずれかからなる群から選択される1つ以上の細胞集団を含む細胞の混合集団である。幾つかの実施形態では、第1の凝集塊、解離細胞の集団、第2の凝集塊、心筋細胞の集団、第1の凝集塊から解離された細胞集団、第2の凝集塊から解離された細胞集団、解離細胞の集団に解離されることなく、第2のインキュベーション及び／または第3のインキュベーションの条件に従って培養された第1の凝集塊、ならびに第2の凝集塊を形成することなく、第2のインキュベーション及び／または第3のインキュベーションの条件に従って培養された解離細胞の集団のうちの1つ以上が、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、または24日目のいずれかまたはその前後に採取された。

10

【1137】

幾つかの実施形態では、かかる細胞集団のいずれか、例えば、多能性幹細胞の集団、解離細胞の集団、心筋細胞の集団、及び／または凝集塊、例えば、第1の凝集塊及び／または第2の凝集塊（それらの組み合わせが含まれる）は、採取され得、凍結保存され得、及び／または例えば、疾患もしくは状態の処置のために、対象に投与され得る。

【1138】

本明細書において開示される心筋細胞は、多能性幹細胞から分化され得る。多能性幹細胞から心筋細胞に分化させるための方法は、多能性幹細胞の集団を培養することにより形成された凝集塊を解離剤と接触させて、解離細胞の集団を形成させることを含み得、当該解離細胞の集団は、次いで、当該解離細胞を凝集させ、それらを心筋細胞の集団に分化させるための条件下で培養される。

20

【1139】

懸濁液中で多能性幹細胞を心筋細胞に分化させるための現行の方法は、分化の第1週目の間に（例えば、500 μm 超まで）急速にサイズが増加し、分化プロセスの終了時に採取及び凍結保存のために細胞の凝集塊が単一細胞に解離されるまで、分化期間全体を通してそのサイズをほぼ維持する、（例えば、約250 μm の平均直径を有する）細胞の凝集塊（場合により、クラスターとも称される）から開始される。

30

【1140】

多能性幹細胞の成熟心筋細胞への分化を達成するのに必要なシグナル伝達を可能にするために、分化の第1週目の間に到達するサイズ（例えば、500 μm 超）またはそれとほぼ同じサイズに凝集塊を維持することが必要であると考えられていた。従って、分化の間に、例えば、分化の第1週目の間に、これらの大きな凝集塊を解離させ、それらをかかる解離前の凝集塊のサイズより小さな凝集塊に再度凝集させることは、非慣習的であったであろう。

【1141】

多能性幹細胞からの心筋細胞分化は、通常、グリコーゲン合成酵素キナーゼ3（GSK3）／Wntの活性化因子／ β -カテニンシグナル伝達の阻害剤、例えば、CHIR99021を使用した誘導、及び中胚葉形成、それに続く、心臓へのコミットメントから開始される。しかしながら、多能性幹細胞を心筋細胞に分化させる場合に、過小誘導（低中胚葉（low mesoderm））と過剰誘導（高中胚葉（high mesoderm））、それに続く、心臓への低コミットメント（low cardiac commitment））との間の狭いタイミング範囲に部分的に起因して、再現性の課題が生じ得る。更に、大きな凝集塊の中心のCD56+／PDGFR α +細胞は、分化期間全体を通して細胞が大きな凝集塊内に存在する場合に起こる栄養素制限及び／または空間的制限に起因して、分化の間、心筋細胞への分化が妨げられ得るか、または遅延され得る。これにより、得られる分化した心筋細胞集団の均一性の減少及び／または純度の減少がもたらされ得る。

40

50

【1142】

幾つかの実施形態では、分化能の改善、心筋細胞分化の均一性の改善、心筋細胞及びその前駆細胞の採取及び凍結保存の改善、ならびに解離された凝集塊を凍結保存し、細胞療法、例えば、心臓細胞療法のために使用する能力をもたらし得る以下に記載される他の方法が使用され得る。

【1143】

幾つかの実施形態では、心筋細胞は、以下を含む方法により多能性幹細胞から分化された心筋細胞であり得る：a) 第1のインキュベーションを実行することであって、第1の凝集塊を形成させるための条件下で多能性幹細胞の集団を培養することを含み、当該第1のインキュベーションが0日目開始される、当該実行すること；b) 当該第1の凝集塊を解離剤と接触させて、解離細胞の集団を形成させること；c) 第2のインキュベーションを実行することであって、解離細胞の集団を、当該解離細胞を第2の凝集塊に凝集させるための条件下で培養することを含む、当該実行すること；及び(d) 第3のインキュベーションを実行することであって、当該第2の凝集塊の細胞集団を心筋細胞の集団に分化させるための条件下で当該第2の凝集塊を培養することを含む、当該実行すること。幾つかの実施形態では、本方法は、懸濁液中で実行される。幾つかの実施形態では、第1のインキュベーション、接触させること、第2のインキュベーション、及び第3のインキュベーションは、それぞれ懸濁液中で実行される。幾つかの実施形態では、第1のインキュベーション、接触させること、第2のインキュベーション、及び第3のインキュベーションのうちの1つ以上が、それぞれ懸濁液中で実行される。

【1144】

多能性幹細胞

【1145】

幾つかの実施形態では、多能性幹細胞(PSC)の集団は、任意の多能性幹細胞、例えば、心筋細胞に分化することができる任意の多能性幹細胞の集団である。幾つかの実施形態では、心筋細胞は、多能性幹細胞に由来する。

【1146】

幾つかの実施形態では、多能性幹細胞は、人工多能性幹細胞、胚性幹細胞、骨髄間葉系幹細胞、心臓組織幹細胞、及び脂肪組織幹細胞からなる群から選択される。幾つかの実施形態では、多能性幹細胞は、ヒト多能性幹細胞であるか、またはヒトに由来する多能性幹細胞である。幾つかの実施形態では、多能性幹細胞は、人工多能性幹細胞(iPSC)である。幾つかの実施形態では、iPSCは、ドナー、例えば、ヒトドナーに由来する。

【1147】

iPSCの集団は、任意の利用可能な方法を使用して作製され得る。多能性幹細胞(iPSC；マウス細胞ではmiPSCまたはヒト細胞ではhiPSCと一般に称される)を作製する種々の異なる方法が公知である。元々の誘導は、Oct3/4、Sox2、c-Myc、及びKlf4の4つの転写因子のウイルス導入を使用してマウス胎児線維芽細胞または成体線維芽細胞から行われた。Takahashi and Yamanaka Cell 126:663-676(2006)(その全体が、特にその中で概説される技術について参照により本明細書に組み込まれる)を参照のこと。それ以来、多数の方法が開発されてきた。概説についてSeki et al, World J. Stem Cells 7(1):116-125(2015)、及びLakshmipathy and Vermuri, editors, Methods in Molecular Biology: Pluripotent Stem Cells, Methods and Protocols, Springer 2013(これらの両方は参照によりその全体が、特にhiPSCを作製するための方法について明示的に本明細書に組み込まれる)を参照のこと(例えば、後者の参考文献の第3章を参照のこと)。

【1148】

一般に、iPSCは、通常はエピソームベクターを使用して導入される、1つ以上の初期化因子の宿主細胞での一過性発現により作製される。これらの条件下では、少量の細胞

が誘導されて、iPSCとなる（通常、選択マーカーが使用されないため、このステップの効率は低い）。細胞が「初期化」され、多能性になると、それらはエピソームベクター（複数可）を喪失し、内在性遺伝子を使用して初期化因子を産生する。このエピソームベクター（複数可）の喪失により、「ゼロフットプリント」細胞と称される細胞がもたらされる。このことは、（特に宿主細胞のゲノムに）遺伝子改変が少ないほど良いため、望ましい。従って、得られるhiPSCは、永続的な遺伝子改変を有さないことが好ましい。

【1149】

使用され得るか、または使用される初期化因子の数は異なり得る。一般に、より少数の初期化因子が使用される場合、多能性状態への細胞の形質転換の効率だけでなく「多能性」も下がり、例えば、より少数の初期化因子は、完全に多能性でないが、より少数の細胞種に分化することのみ可能であり得る細胞をもたらし得る。

10

【1150】

幾つかの実施形態では、OCTの4単一の初期化因子が使用される。他の実施形態では、OCT4及びKLF4の2つの初期化因子が使用される。他の実施形態では、OCT4、KLF4、及びSOX2の3つの初期化因子が使用される。他の実施形態では、OCT4、KLF4、SOX2、及びc-Mycの4つの初期化因子が使用される。他の実施形態では、SOKMNL T、SOX2、OCT4（POU5F1）、KLF4、MYC、NANOG、LIN28、及びSV40LT抗原から選択される5、6、または7つの初期化因子が使用され得る。

【1151】

20

通常、これらの初期化因子遺伝子は、当該技術分野において公知であり、市販されているようなエピソームベクターで提供される。例えば、ThermoFisher/Invitrogenは、hiPSCのゼロフットプリント作製のセンダイウイルススリプログラミングキットを販売している。カタログ番号：A34546を参照のこと。またThermoFisherは、EBNAベースのシステムも販売している。カタログ番号：A14703を参照のこと。

【1152】

加えて、多数の市販の利用可能なhiPSC株が存在する。例えば、ウイルス組込みのないゼロフットプリントヒトiPSC細胞株であるGibco（登録商標）Episomal hiPSC Line、K18945を参照のこと。（Burrige et al., 2011（前出）も参照のこと）。

30

【1153】

通常、iPSCは、本明細書に記載される初期化因子を一過性に発現させることにより、非多能性細胞、例えば、CD34+臍帯血細胞、線維芽細胞などから作製される。例えば、Oct3/4、Sox2、及びKlf4のみを使用し、一方でc-Mycを省いても、iPSCは成功裏に作製されたが、初期化効率は減少した。

【1154】

通常、iPSCは、KLF4、Nanog、OCT4、SOX2、ESRRB、TBX3、c-Myc、及びTCL1が含まれる特定の因子の発現を特徴とする。これらの因子の新たな発現または増強された発現は、内在性遺伝子座の誘導もしくは調節、または導入遺伝子からの発現によるものであり得る。

40

【1155】

例えば、マウスiPSCは、Diecke et al., Sci Rep. 2015, Jan. 28; 5:8081 (doi:10.1038/srep08081)（参照によりその全体が、特にmiPSCの作製のための方法及び試薬に関して本明細書に組み込まれる）の方法を使用して作製され得る。例えば、Burrige et al., PLoS One, 2011 6(4):18293（参照によりその全体が、特にその中で概説される方法に関して本明細書に組み込まれる）も参照のこと。

【1156】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載され、及び／または当技術分野において公知の

50

方法のいずれかにより作製されたPSC（例えば、iPSC）は、例えば、心筋細胞が高度に濃縮された組成物を作製するために、心筋細胞に分化される。

【1157】

PSC（例えば、iPSC）は、限定されるものではないが、Murry and Keller, Cell (2008) 132(4):661-80、Burridge et al., Cell Stem Cell (2012) 10:16-28、Lian et al., Nature Protocols (2013) 8:162-65、Batalov and Feiberg, Biomark. Insight (2015) 10(Suppl. 1):71-6、Denning et al., Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res. (2016) 1863:1728-48、Breckwoldt et al., Nature Protocols (2017) 12:1177-97、Guo et al., Stem Cell Res. And Ther. (2018) 9:44、及びLeitolis et al., Front. Cell Dev. Biol. (2019) 8:164に記載されるものが含まれる、任意の公知の方法により心筋細胞に分化され得る。

10

【1158】

幾つかの実施形態では、心筋細胞は、心筋細胞の移植を受ける対象と同種異系である。従って、幾つかの実施形態では、心筋細胞が由来するPSC（例えばiPSC）は、任意の公知の方法により低免疫原性となるように遺伝子操作されている。

【1159】

例えば、低免疫原性PSCを作製するために、PSC（例えば、iPSC）内の核酸配列が改変され得る。細胞内の核酸配列を改変するための技術としては、相同組換え、ノックイン、ノックアウト、ZFN（ジンクフィンガーヌクレアーゼ）、TALEN（転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ）、CRISPR（クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート）／Cas9、及び他の部位特異的ヌクレアーゼ技術が挙げられる。これらの技術は、目的の遺伝子座位置での二本鎖DNA切断を可能にする。これらの制御された二本鎖切断は、特定の遺伝子座位置での相同組換えを促進する。このプロセスは、染色体などの核酸分子における特定の配列を認識し、それに結合し、二本鎖切断を誘発するエンドヌクレアーゼにより当該核酸分子の当該配列を標的とすることに焦点を置いている。二本鎖切断は、エラーを起こしやすい非相同末端結合（NHEJ）、または相同組換え（HR）のいずれかにより修復される。

20

30

【1160】

WO2020/018615（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるものが含まれる、多数の異なる技術が、低免疫原性となるようにPSC（例えば、iPSC）を遺伝子操作するために使用され得る。幾つかの実施形態では、低免疫原性となるようにPSC（iPSC）を遺伝子操作することにより、低免疫原性PSC（例えば、iPSC）から分化した心筋細胞が含まれる、細胞に対するレシピエントの免疫応答が低減される。

【1161】

幾つかの実施形態では、多能性幹細胞の集団の培養は、2、3、4、5、もしくは6日目またはその前後までに、凝集塊、例えば、約300～約700µmの直径の凝集塊を形成させるのに適した任意の濃度で多能性幹細胞を播種することにより実行され得る。

40

【1162】

幾つかの実施形態では、多能性幹細胞の集団は、約 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^7$ 個細胞/mL、 $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^7$ 個細胞/mL、 $3 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 個細胞/mL、 $4 \times 10^5 \sim 9 \times 10^6$ 個細胞/mL、 $5 \times 10^5 \sim 8 \times 10^6$ 個細胞/mL、 $6 \times 10^5 \sim 7 \times 10^6$ 個細胞/mL、 $7 \times 10^5 \sim 6 \times 10^6$ 個細胞/mL、 $8 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 個細胞/mL、 $9 \times 10^5 \sim 4 \times 10^6$ 個細胞/mL、 $9 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ 個細胞/mL、 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 個細胞/mL、 $1.1 \times 10^6 \sim 1.9 \times 10^6$ 個細胞/mL、 $1.2 \times 10^6 \sim 1.8 \times 10^6$ 個細胞/mL、 $1.25 \times 10^6 \sim 1.75 \times$

50

10⁶個細胞/mLの生存細胞濃度を有する。幾つかの実施形態では、多能性幹細胞の集団は、0日目に播種する時もしくはその前後、または0日目に第1のインキュベーションが開始される時もしくはその前後に約1×10⁵～3×10⁷個細胞/mL、2×10⁵～2×10⁷個細胞/mL、3×10⁵～1×10⁷個細胞/mL、4×10⁵～9×10⁶個細胞/mL、5×10⁵～8×10⁶個細胞/mL、6×10⁵～7×10⁶個細胞/mL、7×10⁵～6×10⁶個細胞/mL、8×10⁵～5×10⁶個細胞/mL、9×10⁵～4×10⁶個細胞/mL、9×10⁵～3×10⁶個細胞/mL、1×10⁶～2×10⁶個細胞/mL、1.1×10⁶～1.9×10⁶個細胞/mL、1.2×10⁶～1.8×10⁶個細胞/mL、1.25×10⁶～1.75×10⁶個細胞/mLの生存細胞濃度を有する。

10

【1163】

幾つかの実施形態では、多能性幹細胞の集団は、1.0×10⁶個細胞/mL、1.05×10⁶個細胞/mL、1.1×10⁶個細胞/mL、1.15×10⁶個細胞/mL、1.2×10⁶個細胞/mL、1.25×10⁶個細胞/mL、1.3×10⁶個細胞/mL、1.35×10⁶個細胞/mL、1.4×10⁶個細胞/mL、1.45×10⁶個細胞/mL、1.5×10⁶個細胞/mL、1.55×10⁶個細胞/mL、1.6×10⁶個細胞/mL、1.65×10⁶個細胞/mL、1.7×10⁶個細胞/mL、1.75×10⁶個細胞/mL、1.8×10⁶個細胞/mL、1.85×10⁶個細胞/mL、1.9×10⁶個細胞/mL、1.95×10⁶個細胞/mL、2.0×10⁷個細胞/mL、2.05×10⁷個細胞/mL、2.1×10⁷個細胞/mL、2.15×10⁷個細胞/mL、もしくは2.2×10⁷個細胞/mLまたは約1.0×10⁶個細胞/mL、1.05×10⁶個細胞/mL、1.1×10⁶個細胞/mL、1.15×10⁶個細胞/mL、1.2×10⁶個細胞/mL、1.25×10⁶個細胞/mL、1.3×10⁶個細胞/mL、1.35×10⁶個細胞/mL、1.4×10⁶個細胞/mL、1.45×10⁶個細胞/mL、1.5×10⁶個細胞/mL、1.55×10⁶個細胞/mL、1.6×10⁶個細胞/mL、1.65×10⁶個細胞/mL、1.7×10⁶個細胞/mL、1.75×10⁶個細胞/mL、1.8×10⁶個細胞/mL、1.85×10⁶個細胞/mL、1.9×10⁶個細胞/mL、1.95×10⁶個細胞/mL、2.0×10⁷個細胞/mL、2.05×10⁷個細胞/mL、2.1×10⁷個細胞/mL、2.15×10⁷個細胞/mL、もしくは2.2×10⁷個細胞/mLの生存細胞濃度を有する。幾つかの実施形態では、多能性幹細胞の集団は、0日目に播種する時もしくはその前後、または0日目に第1のインキュベーションが開始される時もしくはその前後に1.0×10⁶個細胞/mL、1.05×10⁶個細胞/mL、1.1×10⁶個細胞/mL、1.15×10⁶個細胞/mL、1.2×10⁶個細胞/mL、1.25×10⁶個細胞/mL、1.3×10⁶個細胞/mL、1.35×10⁶個細胞/mL、1.4×10⁶個細胞/mL、1.45×10⁶個細胞/mL、1.5×10⁶個細胞/mL、1.55×10⁶個細胞/mL、1.6×10⁶個細胞/mL、1.65×10⁶個細胞/mL、1.7×10⁶個細胞/mL、1.75×10⁶個細胞/mL、1.8×10⁶個細胞/mL、1.85×10⁶個細胞/mL、1.9×10⁶個細胞/mL、1.95×10⁶個細胞/mL、2.0×10⁷個細胞/mL、2.05×10⁷個細胞/mL、2.1×10⁷個細胞/mL、2.15×10⁷個細胞/mL、もしくは2.2×10⁷個細胞/mLまたは約1.0×10⁶個細胞/mL、1.05×10⁶個細胞/mL、1.1×10⁶個細胞/mL、1.15×10⁶個細胞/mL、1.2×10⁶個細胞/mL、1.25×10⁶個細胞/mL、1.3×10⁶個細胞/mL、1.35×10⁶個細胞/mL、1.4×10⁶個細胞/mL、1.45×10⁶個細胞/mL、1.5×10⁶個細胞/mL、1.55×10⁶個細胞/mL、1.6×10⁶個細胞/mL、1.65×10⁶個細胞/mL、1.7×10⁶個細胞/mL、1.75×10⁶個細胞/mL、1.8×10⁶個細胞/mL、1.85×10⁶個細胞/mL、1.9×10⁶個細胞/mL、1.95×10⁶個細胞/mL、2.0×10⁷個細胞/mL、2.05×10⁷個細胞/mL、2.1×10⁷個細胞/mL、2.15×10⁷個細胞/mL

20

30

40

50

、もしくは 2.2×10^7 個細胞/mL の生存細胞濃度を有する。

【1164】

幾つかの実施形態では、多能性幹細胞の集団は、 1.4×10^6 個細胞/mL、 1.45×10^6 個細胞/mL、 1.5×10^6 個細胞/mL、 1.55×10^6 個細胞/mL、 1.6×10^6 個細胞/mL、 1.65×10^6 個細胞/mL、 1.7×10^6 個細胞/mL、 1.75×10^6 個細胞/mL、もしくは 1.8×10^6 個細胞/mL、または約 1.4×10^6 個細胞/mL、 1.45×10^6 個細胞/mL、 1.5×10^6 個細胞/mL、 1.55×10^6 個細胞/mL、 1.6×10^6 個細胞/mL、 1.65×10^6 個細胞/mL、 1.7×10^6 個細胞/mL、 1.75×10^6 個細胞/mL、もしくは 1.8×10^6 個細胞/mL の生存細胞濃度を有する。幾つかの実施形態では、多能性幹細胞の集団は、0 日目に播種する時もしくはその前後、または 0 日目に第 1 のインキュベーションが開始される時もしくはその前後に 1.4×10^6 個細胞/mL、 1.45×10^6 個細胞/mL、 1.5×10^6 個細胞/mL、 1.55×10^6 個細胞/mL、 1.6×10^6 個細胞/mL、 1.65×10^6 個細胞/mL、 1.7×10^6 個細胞/mL、 1.75×10^6 個細胞/mL、もしくは 1.8×10^6 個細胞/mL、または約 1.4×10^6 個細胞/mL、 1.45×10^6 個細胞/mL、 1.5×10^6 個細胞/mL、 1.55×10^6 個細胞/mL、 1.6×10^6 個細胞/mL、 1.65×10^6 個細胞/mL、 1.7×10^6 個細胞/mL、 1.75×10^6 個細胞/mL、もしくは 1.8×10^6 個細胞/mL の生存細胞濃度を有する。

10

【1165】

培養及び分離のための試薬及び条件

幾つかの実施形態では、多能性幹細胞からの心筋細胞分化、例えば、第 1 のインキュベーション、第 2 のインキュベーション、及び／または第 3 のインキュベーションのための試薬及び条件のうちの 1 つ以上は、公知の方法を含み得るか、または公知の方法から改変され得る。

20

【1166】

胚心臓発生に重要な可溶性因子としては、アクチビン A、BMP 4、Nodal、Wnt アゴニスト及びアンタゴニスト、bFGF、ならびに他の分子が挙げられる (Conlon et al, Development 120 (7): 1919 (1994)、Lough et al, Dev. Biol. (1996) 178 (1): 198、Mima et al, PNAS (1995) 92 (2): 467、Zaffran and Frasch, Circ. Res. (2002) 91 (6), 457)。心筋細胞分化を誘発する任意の好適な方法、例えば、Fujiwara et al., PLoS One. (2001) 6 (2): e16734、Dambrot et al., Biochem J. (2011) 434 (1): 25-35、Foldes et al., J Mol Cell Cardiol. (2011) 50 (2): 367-76、Wang et al., Sci China Life Sci. (2010) 53 (5): 581-9、Chen et al., J Cell Biochem. (2010) (1): 29-39、Yang et al., Nature (2008) 453: 524-28、Kattman et al., Cell Stem Cell (2011) 8: 228-40、Laflamme et al., Nat. Biotechnol. (2007) 25: 1015-24、Paige et al., PLoS One (2010) 5 (6): e11134、Xu et al., Regen Med (2011) 6 (1): 53-66、Mignone et al., Circ J (2010) 74 (12): 2517-26、及び Takei et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol. (2009) 296 (6): H1793-803 (各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) に記載されるもののいずれかが使用され得る。PSC (例えば、iPSC または ESC) は、WO2013013206 及び WO2013056072 (各々はその全体が参照により組み込まれる) に記載される方法のいずれかによっても心筋細胞に分化され得る。

30

40

50

【1167】

幾つかの実施形態では、多能性幹細胞からの心筋細胞分化の方法は、以下を含む：a) 第1のインキュベーションを実行することであって、第1の凝集塊を形成させるための条件下で多能性幹細胞の集団を培養することを含み、当該第1のインキュベーションが0日目開始される、当該実行すること；b) 当該第1の凝集塊を解離剤と接触させて、解離細胞の集団を形成させること；c) 第2のインキュベーションを実行することであって、解離細胞の集団を、当該解離細胞を第2の凝集塊に凝集させるための条件下で培養することを含み、当該実行すること；及び(d) 第3のインキュベーションを実行することであって、当該第2の凝集塊の細胞集団を心筋細胞の集団に分化させるための条件下で当該第2の凝集塊を培養することを含み、当該実行すること。第1のインキュベーション、第1の凝集塊を解離剤と接触させることによる解離、第2のインキュベーション、及び第3のインキュベーションのための例示的な試薬及び条件が以下に示され、これらは限定することを意図しない。

10

【1168】

第1のインキュベーション

第1のインキュベーションは、0日目開始され、第1の凝集塊を形成させるための条件下で多能性幹細胞の集団を培養することを含む。

【1169】

幾つかの実施形態では、第1のインキュベーションは、多能性幹細胞の集団を、当該多能性幹細胞が第1の凝集塊を形成するのを可能にするのに適した任意の条件下で、例えば、Fujiwara et al., PLoS One. (2001) 6(2): e16734、Dambrot et al., Biochem J. (2011) 434(1): 25-35、Foldes et al., J Mol Cell Cardiol. (2011) 50(2): 367-76、Wang et al., Sci China Life Sci. (2010) 53(5): 581-9、Chen et al., J Cell Biochem. (2010) (1): 29-39、Yang et al., Nature (2008) 453: 524-28、Kattman et al., Cell Stem Cell (2011) 8: 228-40、Laflamme et al., Nat. Biotechnol. (2007) 25: 1015-24、Paige et al., PLoS One (2010) 5(6): e11134、Xu et al., Regen Med (2011) 6(1): 53-66、Mignone et al., Circ J (2010) 74(12): 2517-26、Takei et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol. (2009) 296(6): H1793-803、WO2013013206、及びWO2013056072に記載されるような多能性幹細胞からの心筋細胞分化のための任意の公知の方法における0、1、2、3、4、5、及び6日目のうちの1つ以上で使用される任意の培地、試薬、及び／または条件下で培養することを含む。幾つかの実施形態では、第1のインキュベーションは、多能性幹細胞の集団を、当該多能性幹細胞が第1の凝集塊を形成するのを可能にするのに適した任意の1つ以上の培地、例えば、Fujiwara et al., PLoS One. (2001) 6(2): e16734、Dambrot et al., Biochem J. (2011) 434(1): 25-35、Foldes et al., J Mol Cell Cardiol. (2011) 50(2): 367-76、Wang et al., Sci China Life Sci. (2010) 53(5): 581-9、Chen et al., J Cell Biochem. (2010) (1): 29-39、Yang et al., Nature (2008) 453: 524-28、Kattman et al., Cell Stem Cell (2011) 8: 228-40、Laflamme et al., Nat. Biotechnol. (2007) 25: 1015-24、Paige et al., PLoS One (2010) 5(6): e11134、Xu et al., Regen Med (2011) 6(1): 5

20

30

40

50

3-66、Mignone et al., Circ J (2010) 74 (12) : 2517-26、Takei et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol. (2009) 296 (6) : H1793-803、WO 2013013206、及びWO 2013056072に記載されるような、例えば、0、1、2、3、4、5、及び6日目のうちの1つ以上で使用される任意の公知の培地で培養することを含む。

【1170】

幾つかの実施形態では、第1のインキュベーションは、グリコーゲン合成酵素キナーゼ3 (GSK3) /Wntの活性化因子/β-カテニンシグナル伝達の阻害剤を含む分化0日目 (DD0) 培地で多能性幹細胞の集団を培養することを含む。幾つかの実施形態では、第1のインキュベーションは、多能性幹細胞の集団を、GSK3 /Wntの活性化因子/β-カテニンシグナル伝達の阻害剤及びL-アラニン-L-グルタミン (L-グルタミンのジペプチド代替物) を含むDD0培地で培養することを含む。幾つかの実施形態では、DD0培地は、無血清かつインスリンを含まない増殖サプリメントを更に含む。幾つかの実施形態では、無血清かつインスリンを含まない増殖サプリメントは、B27 (商標) Supplement Minus Insulin (カタログ番号: A18956-01; Life Technologies) である。

10

【1171】

幾つかの実施形態では、DD0培地は、MCD B131培地 (カタログ番号: 10372-019; Life Technologies) である基礎培地を含む。

20

【1172】

幾つかの実施形態では、L-アラニン-L-グルタミンは、GlutaMax (商標)、例えば、CTS GlutaMax (商標) (カタログ番号: A12860-01; Life Technologies) またはGlutaMax (商標) (カタログ番号: 35050-061; Life Technologies) である。

【1173】

幾つかの実施形態では、GSK-3α及び/またはGSK-3βの阻害剤は、GSK-3α及びGSK-3βの阻害剤である。幾つかの実施形態では、GSK-3α及び/またはGSK-3βの阻害剤は、CHIR99021である。幾つかの実施形態では、CHIR99021の濃度は、約4 μM~約8 μMである。幾つかの実施形態では、CHIR99021の濃度は、約5 μM~約7 μMである。幾つかの実施形態では、CHIR99021の濃度は、約5、5.5、6、6.5、もしくは7 μM、または上述の値のいずれかの間の任意の値である。幾つかの実施形態では、CHIR99021の濃度は、約5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、または7 μMである。幾つかの実施形態では、CHIR99021の濃度は、約5 μM~約6 μMであるか、または約4.5 μM~約6.5 μMである。幾つかの実施形態では、CHIR99021の濃度は、約5 μMである。幾つかの実施形態では、CHIR99021の濃度は、約6 μMである。幾つかの実施形態では、CHIR99021の濃度は、約5 μMまたは約6 μMである。

30

40

【1174】

幾つかの実施形態では、第1のインキュベーションは、0日目に、GSK-3α及び/またはGSK-3βの阻害剤を含む培地、例えば、DD0培地で多能性幹細胞の集団を培養することを含む。幾つかの実施形態では、第1のインキュベーションは、0日目及び1日目に、GSK-3α及び/またはGSK-3βの阻害剤を含む培地、例えば、DD0培地で多能性幹細胞の集団を培養することを含む。幾つかの実施形態では、第1のインキュベーションは、0及び1日目ならびに第1のインキュベーションの1日以上の後続の日に、GSK-3α及び/またはGSK-3βの阻害剤を含む培地、例えば、DD0培地で多能性幹細胞の集団を培養することを含む。

【1175】

50

幾つかの実施形態では、第1のインキュベーションは、L-アラニン-L-グルタミン及び無血清かつインスリンを含まない増殖サプリメントを含む培地、例えば、分化1日目（DD1）培地で多能性幹細胞の集団を培養することを含む。幾つかの実施形態では、培地、例えば、DD1培地は、MCDB131培地である基礎培地を含む。幾つかの実施形態では、L-アラニン-L-グルタミンは、GlutaMax（商標）（カタログ番号：35050-061；Life Technologies）である。幾つかの実施形態では、無血清かつインスリンを含まない増殖サプリメントは、B27（商標）Supplement Minus Insulin（カタログ番号：A18956-01；Life Technologies）である。

【1176】

10

幾つかの実施形態では、第1のインキュベーションは、1日目またはその前後に、L-アラニン-L-グルタミン及び無血清かつインスリンを含まない増殖サプリメントを含む培地、例えば、DD1培地で多能性幹細胞の集団を培養することを含む。幾つかの実施形態では、第1のインキュベーションは、1日目及び2日目に、L-アラニン-L-グルタミン及び無血清かつインスリンを含まない増殖サプリメントを含む培地、例えば、DD1培地で多能性幹細胞の集団を培養することを含む。幾つかの実施形態では、第1のインキュベーションは、1日目及び2日目ならびに第1のインキュベーションの1日以上の後続の日に、L-アラニン-L-グルタミン及び無血清かつインスリンを含まない増殖サプリメントを含む培地、例えば、DD1培地で多能性幹細胞の集団を培養することを含む。

【1177】

20

幾つかの実施形態では、第1のインキュベーションは、0日目後に、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達の阻害剤を含む培地、例えば、分化2日目（DD2）培地で多能性幹細胞の集団を培養することを含む。幾つかの実施形態では、培地、例えば、DD2培地は、L-アラニン-L-グルタミン及び無血清の分化サプリメントを含む。幾つかの実施形態では、培地、例えば、DD2培地は、MCDB131培地である基礎培地を含む。幾つかの実施形態では、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達の阻害剤は、WIKI4、NSC668036、iCRT3、iCRT5、iCRT14、IWP-2、XAV-939、ICG-001、LGK-974、OMP-18R5、FJ9、IWR-1-endo、KY02111、PFK115-584、Wnt-059、DKK1、FH-535、Box5、及びPen-N3ペプチドからなる群から選択される。幾つかの実施形態では、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達の阻害剤は、WIKI4である。幾つかの実施形態では、L-アラニン-L-グルタミンは、GlutaMax（商標）（カタログ番号：35050-061；Life Technologies）である。幾つかの実施形態では、無血清の分化サプリメントは、B27（商標）サプリメント（カタログ番号：A1486701；Life Technologies）である。

30

【1178】

幾つかの実施形態では、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達の阻害剤を含む培地、例えば、DD2培地での多能性幹細胞の集団の培養は、第1のインキュベーションが0日目に開始された約36～48時間後に開始される。幾つかの実施形態では、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達の阻害剤を含む培地、例えば、DD2培地での多能性幹細胞の集団の培養は、第1のインキュベーションが0日目に開始された約40時間後に開始される。

40

【1179】

幾つかの実施形態では、第1のインキュベーションは、2日目またはその前後に、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達の阻害剤を含む培地、例えば、DD2培地で多能性幹細胞の集団を培養することを含む。幾つかの実施形態では、第1のインキュベーションは、1日目、2日目、及び3日目のうちの1日以上または約1日以上で、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達の阻害剤を含む培地、例えば、DD2培地で多能性幹細胞の集団を培養することを含む。幾つかの実施形態では、第1のインキュベーションは、2日目及び3日目またはそれらの前後に、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達の阻害剤を含む培地、例えば、DD2培地で多能性幹細胞の集団を培養することを含む。幾つかの実施形態では、第1の

50

インキュベーションは、2日目及び3日目ならびに第1のインキュベーションの1日以上
の後続の日またはそれらの前後に、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達の阻害剤を含む培
地、例えば、DD2培地で多能性幹細胞の集団を培養することを含む。

【1180】

幾つかの実施形態では、第1のインキュベーションは、L-アラニン-L-グルタミン
及び無血清の分化サプリメントを含む培地、例えば、分化3日目（DD3）培地で多能性
幹細胞の集団を培養することを含む。幾つかの実施形態では、培地、例えば、DD3培地
は、MCDB131培地である基礎培地を含む。幾つかの実施形態では、L-アラニン-
L-グルタミンは、GlutaMax（商標）（カタログ番号：35050-061；L
i f e T e c h n o l o g i e s）である。幾つかの実施形態では、無血清の分化サ
プリメントは、B27（商標）サプリメント（カタログ番号：A1486701；L i f e
T e c h n o l o g i e s）である。

10

【1181】

幾つかの実施形態では、第1のインキュベーションは、3日目またはその前後に、L-
アラニン-L-グルタミン及び無血清の分化サプリメントを含む培地、例えば、分化3日
目（DD3）培地で多能性幹細胞の集団を培養することを含む。幾つかの実施形態では、
第1のインキュベーションは、3日目、4日目、5日目、及び6日目のうちの1日以上ま
たは約1日以上で、L-アラニン-L-グルタミン及び無血清の分化サプリメントを含む
培地、例えば、分化3日目（DD3）培地で多能性幹細胞の集団を培養することを含む。
幾つかの実施形態では、第1のインキュベーションは、3日目及び4日目またはそれらの
前後に、L-アラニン-L-グルタミン及び無血清の分化サプリメントを含む培地、例え
ば、分化3日目（DD3）培地で多能性幹細胞の集団を培養することを含む。幾つかの実
施形態では、第1のインキュベーションは、3日目及び4日目ならびに第1のインキュ
ベーションの1日以上の後続の日またはそれらの前後に、L-アラニン-L-グルタミン及
び無血清の分化サプリメントを含む培地、例えば、分化3日目（DD3）培地で多能性幹
細胞の集団を培養することを含む。

20

【1182】

幾つかの実施形態では、第1のインキュベーションの間に形成される第1の凝集塊は、
約300～約1,000 μm の直径である。幾つかの実施形態では、第1のインキュベ
ーションの間に形成される第1の凝集塊は、約300から約500、600、700、80
0、900、または1,000 μm までの間の直径である。幾つかの実施形態では、第1
のインキュベーションの間に形成される第1の凝集塊は、2日目、3日目、4日目、5日
目、もしくは6日目またはその前後で、約300～約1,000 μm の直径である。幾つ
かの実施形態では、第1のインキュベーションの間に形成される第1の凝集塊は、2日目
、3日目、4日目、5日目、もしくは6日目またはその前後で、約300から約500、
600、700、800、900、または1,000 μm までの間の直径である。幾つか
の実施形態では、第1のインキュベーションの間に形成される第1の凝集塊は、約300
～約700 μm の直径である。幾つかの実施形態では、第1のインキュベーションの間に
形成される第1の凝集塊は、2日目、3日目、4日目、5日目、もしくは6日目またはそ
の前後で、約300～約700 μm の直径である。幾つかの実施形態では、第1のイン
キュベーションの間に形成される第1の凝集塊は、2日目、3日目、4日目、5日目、もし
くは6日目またはその前後で、約350～650 μm 、400～650 μm 、450～6
50 μm 、450～600 μm 、500～650 μm 、550～650 μm 、または55
0～600 μm の直径である。幾つかの実施形態では、第1のインキュベーションの間に
形成される第1の凝集塊は、約500～約650 μm の直径である。幾つかの実施形態で
は、第1のインキュベーションの間に形成される第1の凝集塊は、約550～約600 μ
mの直径である。幾つかの実施形態では、第1のインキュベーションの間に形成される第
1の凝集塊は、3日目もしくは4日目またはその前後で、約300～約700 μm の直径
である。幾つかの実施形態では、第1のインキュベーションの間に形成される第1の凝
集塊は、3日目もしくは4日目またはその前後で、約350～650 μm 、400～650

30

40

50

μm 、 $450\sim650\mu\text{m}$ 、 $450\sim600\mu\text{m}$ 、 $500\sim650\mu\text{m}$ 、 $550\sim650\mu\text{m}$ 、または $550\sim600\mu\text{m}$ の直径である。幾つかの実施形態では、第1のインキュベーションの間に形成される第1の凝集塊は、3日目もしくは4日目またはその前後で、約 $500\sim$ 約 $650\mu\text{m}$ の直径である。幾つかの実施形態では、第1のインキュベーションの間に形成される第1の凝集塊は、3日目もしくは4日目またはその前後で、約 $550\sim$ 約 $600\mu\text{m}$ の直径である。

【1183】

幾つかの実施形態では、第1のインキュベーションは、多能性幹細胞の集団がDD0培地により最初に接触される時に開始される。

【1184】

幾つかの実施形態では、第1のインキュベーションは、懸濁液中で行われる。幾つかの実施形態では、第1のインキュベーションは、懸濁液中で多能性幹細胞の集団を培養することを含む。幾つかの実施形態では、第1のインキュベーションは、第1のインキュベーションのうちの1日以上、2日以上、3日以上、または4日以上、または5日以上の間、懸濁液中で多能性幹細胞の集団を培養することを含む。幾つかの実施形態では、第1のインキュベーションは、第1のインキュベーションの全期間にわたって懸濁液中で多能性幹細胞の集団を培養することを含む。

【1185】

解離剤を使用した解離

第1のインキュベーションの間に形成される第1の凝集塊は、解離細胞の集団を形成させるために、解離剤を使用して解離される。例えば、幾つかの実施形態では、本方法は、第1の凝集塊を解離剤と接触させて、解離細胞の集団を形成させることを含む。

【1186】

幾つかの実施形態では、接触は、第1の凝集塊が約 $300\sim1,000\mu\text{m}$ の直径である時に行われる。幾つかの実施形態では、接触は、第1の凝集塊が約 300 から 500 、 600 、 700 、 800 、 900 、または $1,000\mu\text{m}$ までの間の直径である時に行われる。

【1187】

幾つかの実施形態では、第1の凝集塊の解離剤との接触は、第1の凝集塊が約 $300\sim$ 約 $1,000\mu\text{m}$ の直径、例えば、約 300 から 500 、 600 、 700 、 800 、 900 、もしくは $1,000\mu\text{m}$ までの間の直径、または約 $350\sim650\mu\text{m}$ 、 $400\sim650\mu\text{m}$ 、 $450\sim650\mu\text{m}$ 、 $450\sim600\mu\text{m}$ 、 $500\sim650\mu\text{m}$ 、 $550\sim650\mu\text{m}$ 、もしくは $550\sim600\mu\text{m}$ の直径である時に行われる。幾つかの実施形態では、第1の凝集塊は、約 $500\sim$ 約 $650\mu\text{m}$ の直径である。幾つかの実施形態では、第1の凝集塊は、約 $550\sim$ 約 $600\mu\text{m}$ の直径である。幾つかの実施形態では、第1の凝集塊の解離剤との接触は、第1の凝集塊が約 $400\sim1,000$ 、 $400\sim950$ 、 $400\sim900$ 、 $400\sim850$ 、 $400\sim800$ 、 $400\sim750$ 、 $400\sim700$ 、 $450\sim1,000$ 、 $450\sim950$ 、 $450\sim900$ 、 $450\sim850$ 、 $450\sim800$ 、 $450\sim750$ 、または $450\sim700\mu\text{m}$ の直径である時に行われる。

【1188】

幾つかの実施形態では、第1の凝集塊の解離剤との接触は、第1の凝集塊が約 $300\sim$ 約 $1,000\mu\text{m}$ の直径である時に行われる。幾つかの実施形態では、第1の凝集塊の解離剤との接触は、第1の凝集塊が約 300 から約 500 、 600 、 700 、 800 、 900 、または $1,000\mu\text{m}$ までの間の直径である時に行われる。幾つかの実施形態では、第1の凝集塊の解離剤との接触は、第1の凝集塊が約 $350\sim650\mu\text{m}$ 、 $400\sim650\mu\text{m}$ 、 $450\sim650\mu\text{m}$ 、 $450\sim600\mu\text{m}$ 、 $500\sim650\mu\text{m}$ 、 $550\sim650\mu\text{m}$ 、または $550\sim600\mu\text{m}$ の直径である時に行われる。幾つかの実施形態では、第1の凝集塊の解離剤との接触は、第1の凝集塊が約 $400\sim1,000$ 、 $400\sim950$ 、 $400\sim900$ 、 $400\sim850$ 、 $400\sim800$ 、 $400\sim750$ 、 $400\sim700$ 、 $450\sim1,000$ 、 $450\sim950$ 、 $450\sim900$ 、 $450\sim850$ 、 $450\sim$

800、450～750、または450～700 μm の直径である時に行われる。幾つかの実施形態では、第1の凝集塊の解離剤との接触は、第1の凝集塊が約500～約650 μm の直径である時に行われる。幾つかの実施形態では、第1の凝集塊の解離剤との接触は、第1の凝集塊が約550～約600 μm の直径である時に行われる。幾つかの実施形態では、時機、例えば、第1の凝集塊が解離剤と接触させられる時機は、2日目、3日目、4日目、5日目、もしくは6日目またはその前後である。幾つかの実施形態では、時機、例えば、第1の凝集塊が解離剤と接触させられる時機は、2日目もしくは3日目またはその前後である。幾つかの実施形態では、時機、例えば、第1の凝集塊が解離剤と接触させられる時機は、3日目もしくは4日目またはその前後である。幾つかの実施形態では、時機、例えば、第1の凝集塊が解離剤と接触させられる時機は、4日目もしくは5日目またはその前後である。幾つかの実施形態では、時機、例えば、第1の凝集塊が解離剤と接触させられる時機は、4日目またはその前後である。

10

【1189】

幾つかの実施形態では、接触は、2、3、4、5、及び6日目のいずれかまたはその前後に行われる。幾つかの実施形態では、接触は、2日目もしくは3日目またはその前後に行われる。幾つかの実施形態では、接触は、3日目もしくは4日目またはその前後に行われる。幾つかの実施形態では、接触は、4日目もしくは5日目またはその前後に行われる。幾つかの実施形態では、接触は、5日目もしくは6日目またはその前後に行われる。幾つかの実施形態では、接触は、4日目またはその前後に行われる。幾つかの実施形態では、接触は、2～6日目のいずれかもしくはその前後、または3～6日目のいずれかもしくはその前後、または4～6日目のいずれかに行われる。

20

【1190】

幾つかの実施形態では、接触は、第1のインキュベーション後の第1のインキュベーションの最終日に行われる。幾つかの実施形態では、接触は、第1のインキュベーションの最終日後の日に行われる。

【1191】

幾つかの実施形態では、接触時に、第1の凝集塊は、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、もしくは95%であるか、または少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、もしくは95%である頻度のCD56+ / PDGFR α +細胞を含む。幾つかの実施形態では、接触時に、第1の凝集塊は、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、もしくは95%であるか、または少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、もしくは95%である頻度のCD56+ / PDGFR α +細胞を含む。幾つかの実施形態では、接触時に、第1の凝集塊は、80%、81%、92%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%であるか、または約80%、81%、92%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%である頻度のCD56+ / PDGFR α +細胞を含む。

30

40

【1192】

幾つかの実施形態では、解離剤は、解離した細胞がその後に好適な培養条件下で増殖及び／または増大及び／または分化する能力に影響を及ぼすことなく、細胞の凝集塊が互いに解離することを可能にする任意の薬剤であり得るか、またはそれを含み得る。幾つかの実施形態では、解離剤は、切断酵素であるか、またはそれを含む。幾つかの実施形態では、切断酵素は、プロテアーゼである。幾つかの実施形態では、プロテアーゼは、リジンま

50

たはアルギニン残基のC末端側のペプチド結合を切断する組換え酵素である。幾つかの実施形態では、プロテアーゼは、TrypLE（商標）Select（カタログ番号：A1217702；Life Technologies）である。幾つかの実施形態では、プロテアーゼは、リジンまたはアルギニン残基のC末端側のペプチド結合を切断する組換え酵素、例えば、TrypLE（商標）Selectである。幾つかの実施形態では、プロテアーゼは、エンドペプチダーゼである。幾つかの実施形態では、エンドペプチダーゼは、トリプシンである。幾つかの実施形態では、プロテアーゼは、トリプシン、コラゲナーゼ、キモトリプシン、エラスターゼ、ヒアルロニダーゼ、パパイン、及びディスパーゼからなる群から選択される。幾つかの実施形態では、コラゲナーゼは、I型コラゲナーゼ、II型コラゲナーゼ、またはIII型コラゲナーゼである。幾つかの実施形態では、コラゲナーゼは、I型コラゲナーゼ、II型コラゲナーゼ、またはIII型コラゲナーゼである。幾つかの実施形態では、プロテアーゼは、コラゲナーゼである。幾つかの実施形態では、プロテアーゼは、ヒアルロニダーゼである。

10

【1193】

幾つかの実施形態では、接触は、解離細胞の集団をもたらすのに十分な時間行われる。幾つかの実施形態では、接触は、約15分間～約2時間行われる。幾つかの実施形態では、接触は、約30分間～約90分間、約30分間～約75分間、約40分間～約60分間、約40分間～約55分間、約40分間～約50分間、約45分間～55分間、または約45分間～約50分間行われる。幾つかの実施形態では、接触は、約40～約55分間行われる。幾つかの実施形態では、接触は、約45～約50分間行われる。

20

【1194】

幾つかの実施形態では、本方法は、接触の間、第1の凝集塊を攪拌することを含む。幾つかの実施形態では、攪拌は、シェーカー、例えば、プラットフォームシェーカーを使用して実行される。幾つかの実施形態では、攪拌は、約20～100RPMの毎分回転数（RPM）で実行される。幾つかの実施形態では、攪拌は、約20～100RPM、20～90、20～80、20～70、20～60、20～50、30～100、30～90、30～80、30～70、30～60、30～50、40～100、40～90、40～80、40～70、40～60、40～50RPM、50～100、50～90、50～80、50～70、50～60、60～100、60～90、60～80、または60～70RPMで実行される。幾つかの実施形態では、攪拌は、約45～55RPMのRPM、例えば、50RPMまたは約50RPMで実行される。幾つかの実施形態では、攪拌は、50RPMまたは約50RPMで実行される。幾つかの実施形態では、攪拌は、上述のRPM及び／またはRPMの範囲のうちの任意の1つ以上で、例えば、1つ、2つ、3つ、または4つ以上の異なるRPMで、各々が継続時間の間、実行される。

30

【1195】

幾つかの実施形態では、本方法は、接触の間及び／またはその後、解離細胞の集団をトリチュレートすることを更に含む。幾つかの実施形態では、トリチュレートは、解離細胞の集団にピペットを1回以上通過させることにより実行される。幾つかの実施形態では、トリチュレートは、解離細胞の集団にピペットを5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、もしくは25回、または少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、もしくは25回通過させることにより実行される。幾つかの実施形態では、トリチュレートは、解離細胞の集団にピペットを約15～約25回、例えば、約20回通過させることにより実行される。幾つかの実施形態では、トリチュレートは、本方法が解離細胞の集団をトリチュレートすることを含まない場合と比べてより高い頻度の単一細胞を有する解離細胞の集団をもたらす。

40

【1196】

幾つかの実施形態では、解離細胞の集団は、約 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^7$ 個細胞/mL、 $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^7$ 個細胞/mL、 $3 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 個細胞/mL、 $4 \times 10^5 \sim 9 \times 10^6$ 個細胞/mL、 $5 \times 10^5 \sim 8 \times 10^6$ 個細胞/mL、 $6 \times 10^5 \sim 7 \times$

50

10⁶個細胞/mL、7×10⁵～6×10⁶個細胞/mL、8×10⁵～5×10⁶個細胞/mL、9×10⁵～4×10⁶個細胞/mL、9×10⁵～3×10⁶個細胞/mL、1×10⁶～2×10⁶個細胞/mL、1.1×10⁶～1.9×10⁶個細胞/mL、1.2×10⁶～1.8×10⁶個細胞/mL、1.25×10⁶～1.75×10⁶個細胞/mLの生存細胞密度を有する。

【1197】

幾つかの実施形態では、接触及び／またはトリチュレート後に、解離細胞の集団は、約1×10⁵～3×10⁷個細胞/mL、2×10⁵～2×10⁷個細胞/mL、3×10⁵～1×10⁷個細胞/mL、4×10⁵～9×10⁶個細胞/mL、5×10⁵～8×10⁶個細胞/mL、6×10⁵～7×10⁶個細胞/mL、7×10⁵～6×10⁶個細胞/mL、8×10⁵～5×10⁶個細胞/mL、9×10⁵～4×10⁶個細胞/mL、9×10⁵～3×10⁶個細胞/mL、1×10⁶～2×10⁶個細胞/mL、1.1×10⁶～1.9×10⁶個細胞/mL、1.2×10⁶～1.8×10⁶個細胞/mL、1.25×10⁶～1.75×10⁶個細胞/mLの生存細胞密度を有する。

【1198】

幾つかの実施形態では、接触が開始された1もしくは2時間後または約1もしくは2時間後、解離細胞の集団は、約1×10⁵～3×10⁷個細胞/mL、2×10⁵～2×10⁷個細胞/mL、3×10⁵～1×10⁷個細胞/mL、4×10⁵～9×10⁶個細胞/mL、5×10⁵～8×10⁶個細胞/mL、6×10⁵～7×10⁶個細胞/mL、7×10⁵～6×10⁶個細胞/mL、8×10⁵～5×10⁶個細胞/mL、9×10⁵～4×10⁶個細胞/mL、9×10⁵～3×10⁶個細胞/mL、1×10⁶～2×10⁶個細胞/mL、1.1×10⁶～1.9×10⁶個細胞/mL、1.2×10⁶～1.8×10⁶個細胞/mL、1.25×10⁶～1.75×10⁶個細胞/mLの生存細胞密度を有する。

【1199】

幾つかの実施形態では、接触は、懸濁液中で行われる。幾つかの実施形態では、接触は、懸濁液中で第1の凝集塊を解離剤と接触させることを含む。幾つかの実施形態では、トリチュレート及び／または攪拌は、懸濁液中で実行される。

【1200】

第2のインキュベーション

第2のインキュベーションは、接触後に実行され、解離細胞を第2の凝集塊に凝集させるための条件下で解離細胞の集団を培養することを含む。

【1201】

幾つかの実施形態では、第2のインキュベーションは、解離細胞の集団を第2の凝集塊に凝集させるのに十分な継続時間の間、行われる。幾つかの実施形態では、解離細胞の集団を第2の凝集塊に凝集させるのに十分な継続時間は、1～3日間であるか、または約1～3日間である。幾つかの実施形態では、解離細胞の集団を第2の凝集塊に凝集させるのに十分な継続時間は、1日間もしくは2日間であるか、または約1日間もしくは2日間である。幾つかの実施形態では、解離細胞の集団を第2の凝集塊に凝集させるのに十分な継続時間は、1日間であるか、または約1日間である。

【1202】

幾つかの実施形態では、第2のインキュベーションは、L-アラニン-L-グルタミン及び無血清の分化サプリメントを含む培地、例えば、分化4日目(DD4)培地で解離細胞の集団を培養することを含む。幾つかの実施形態では、培地、例えば、DD3培地は、MCDB131培地である基礎培地を含む。幾つかの実施形態では、L-アラニン-L-グルタミンは、GlutaMax(商標)、例えば、CTS GlutaMax(商標)(カタログ番号:A12860-01;Life Technologies)である。幾つかの実施形態では、無血清の分化サプリメントは、B27(商標)サプリメント(カタログ番号:A1486701;Life Technologies)である。

【1203】

10

20

30

40

50

幾つかの実施形態では、第2のインキュベーションは、2～7日目の間の1日間または連続する2日間に、例えば、DD4培地で、解離細胞の集団を培養することを含む。幾つかの実施形態では、第2のインキュベーションは、2、3、4、5、6、もしくは7日目またはその前後に、例えば、DD4培地で、解離細胞の集団を培養することを含み、及び／または第2のインキュベーションは、2日目及び3日目もしくはそれらの前後、3日目及び4日目もしくはそれらの前後、4日目及び5日目もしくはそれらの前後、5日目及び6日目もしくはそれらの前後、または6日目及び7日目もしくはそれらの前後に、例えば、DD4培地で、解離細胞の集団を培養することを含む。幾つかの実施形態では、第2のインキュベーションは、2及び3日目、3及び4日目、4及び5日目、5及び6日目、または6及び7日目の中から選択される連続する2日間に、例えば、DD4培地で、解離細胞の集団を培養することを含む。幾つかの実施形態では、第2のインキュベーションは、4日目及び5日目またはそれらの前後に、例えば、DD4培地で、解離細胞の集団を培養することを含む。

10

【1204】

幾つかの実施形態では、第2の凝集塊は、第1の凝集塊より小さい直径である。幾つかの実施形態では、第2の凝集塊は、第1の凝集塊の直径と比べて少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%小さい直径を有する。幾つかの実施形態では、接触の1日もしくは2日後または約1日もしくは2日後の第2の凝集塊は、接触直前の第1の凝集塊より小さい直径である。幾つかの実施形態では、接触の1日もしくは2日後または約1日もしくは2日後の第2の凝集塊は、接触直前の第1の凝集塊の直径と比べて少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%小さい直径を有する。

20

【1205】

幾つかの実施形態では、凝集塊、例えば、第1の凝集塊及び／または第2の凝集塊の直径は、同じ条件下で培養された複数のかかる凝集塊、例えば、複数の第1の凝集塊または複数の第2の凝集塊の平均直径に基づく。

【1206】

幾つかの実施形態では、形成される第2の凝集塊は、第2のインキュベーションの2日目で、及び／または接触の24時間もしくは約24時間後、例えば、接触が開始された24時間もしくは約24時間後で、約25～200 μm の直径である。幾つかの実施形態では、形成される第2の凝集塊は、第2のインキュベーションの2日目で、及び／または接触の24時間もしくは約24時間後、例えば、接触が開始された24時間もしくは約24時間後で、約25～200、25～175、25～150、25～125、30～200、30～175、30～150、30～125、35～200、35～175、35～150、35～125、40～200、40～175、40～150、40～125、45～200、45～175、45～150、45～125、50～200、50～175、50～150、50～125、55～200、55～175、55～150、55～125、60～200、60～175、60～150、60～125、65～200、65～175、65～150、65～125、70～200、70～175、70～150、70～125、75～200、75～175、75～150、または75～125 μm の直径である。

30

40

【1207】

幾つかの実施形態では、形成される第2の凝集塊は、第2のインキュベーションの2日目で、及び／または接触の24時間もしくは約24時間後、例えば、接触が開始された24時間もしくは約24時間後で、(a) 解離剤と接触させられる直前の第1の凝集塊の直径の50%未満の直径を有し、及び／または(b) 解離剤と接触させられる直前の第1の凝集塊の直径の約5～50%の直径を有し、及び／または(c) 解離剤と接触させられる直前の第1の凝集塊の直径の5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、もしくは50%であるか、もしくは約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、もしくは50%である直径を有し、及び／ま

50

たは（d）解離剤と接触させられる直前の第1の凝集塊の直径の約5～25%の直径を有する。

【1208】

幾つかの実施形態では、第2の凝集塊は、第2のインキュベーションの2日目で、及び／または接触の24時間もしくは約24時間後、例えば、接触が開始された24時間もしくは約24時間後で、解離剤と接触させられる直前の第1の凝集塊の直径の約5～25%の直径を有する。

【1209】

幾つかの実施形態では、第2の凝集塊は、第2のインキュベーションの2日目で、及び／または解離剤と接触させる日より後の日で、約25～200、25～175、25～150、25～125、30～200、30～175、30～150、30～125、35～200、35～175、35～150、35～125、40～200、40～175、40～150、40～125、45～200、45～175、45～150、45～125、50～200、50～175、50～150、50～125、55～200、55～175、55～150、55～125、60～200、60～175、60～150、60～125、65～200、65～175、65～150、65～125、70～200、70～175、70～150、70～125、75～200、75～175、75～150、または75～125 μm の直径を有する。幾つかの実施形態では、解離剤と接触させる日より後の日は、3、4、5、6、または7日目である。幾つかの実施形態では、解離剤と接触させる日より後の日は、5日目である。

【1210】

幾つかの実施形態では、第2の凝集塊は、第2のインキュベーションの2日目で、約25～200、25～175、25～150、25～125、30～200、30～175、30～150、30～125、35～200、35～175、35～150、35～125、40～200、40～175、40～150、40～125、45～200、45～175、45～150、45～125、50～200、50～175、50～150、50～125、55～200、55～175、55～150、55～125、60～200、60～175、60～150、60～125、65～200、65～175、65～150、65～125、70～200、70～175、70～150、70～125、75～200、75～175、75～150、または75～125 μm の直径を有する。幾つかの実施形態では、第2のインキュベーションの2日目は、3、4、5、6、または7日目である。幾つかの実施形態では、第2のインキュベーションの2日目は、5日目である。

【1211】

幾つかの実施形態では、解離剤と接触させる日より後の2日目及び／または第2のインキュベーションの開始後の2日目及び／または第3のインキュベーションの1日目で、第2の凝集塊が、約25～300、25～275、25～250、40～300、40～275、40～250、50～300、50～275、50～250、60～300、60～275、60～250、70～300、70～275、70～250、80～300、80～275、または80～250 μm の直径を有する。幾つかの実施形態では、解離剤と接触させる日より後の2日目及び／または第2のインキュベーションの開始後の2日目及び／または第3のインキュベーションの1日目は、4、5、6、7、もしくは8日目またはその前後である。幾つかの実施形態では、解離剤と接触させる日より後の2日目及び／または第2のインキュベーションの開始後の2日目及び／または第3のインキュベーションの1日目は、6日目またはその前後である。

【1212】

幾つかの実施形態では、第2の凝集塊は、第2のインキュベーションの2日目及び／または第3のインキュベーションの1日目に、約25～200、25～175、25～150、25～125、30～200、30～175、30～150、30～125、35～200、35～175、35～150、35～125、40～200、40～175、4

0～150、40～125、45～200、45～175、45～150、45～125、50～200、50～175、50～150、50～125、55～200、55～175、55～150、55～125、60～200、60～175、60～150、60～125、65～200、65～175、65～150、65～125、70～200、70～175、70～150、70～125、75～200、75～175、75～150、または75～125 μm の直径を有する。幾つかの実施形態では、第2の凝集塊は、5日目またはその前後に、約25～200、25～175、25～150、25～125、30～200、30～175、30～150、30～125、35～200、35～175、35～150、35～125、40～200、40～175、40～150、40～125、45～200、45～175、45～150、45～125、50～200、50～175、50～150、50～125、55～200、55～175、55～150、55～125、60～200、60～175、60～150、60～125、65～200、65～175、65～150、65～125、70～200、70～175、70～150、70～125、75～200、75～175、75～150、または75～125 μm の直径を有する。

10

【1213】

幾つかの実施形態では、第2のインキュベーションの開始後の2日目及び／または第3のインキュベーションの1日目に、第2の凝集塊が、約25～300、25～275、25～250、40～300、40～275、40～250、50～300、50～275、50～250、60～300、60～275、60～250、70～300、70～275、70～250、80～300、80～275、または80～250 μm の直径を有する。第2の凝集塊は、6日目に、約25～300、25～275、25～250、40～300、40～275、40～250、50～300、50～275、50～250、60～300、60～275、60～250、70～300、70～275、70～250、80～300、80～275、または80～250 μm の直径を有する。

20

【1214】

幾つかの実施形態では、第2の凝集塊は、第2のインキュベーションの開始後の3日目及び／または第3のインキュベーションの2日目に、約25～400、25～350、25～300、25～275、25～250、40～400、40～350、40～300、40～275、40～250、50～400、60～350、50～300、50～275、50～250、60～400、60～350、60～300、60～275、60～250、70～400、70～350、70～300、70～275、70～250、80～400、80～350、80～300、80～275、または80～250 μm の直径を有する。幾つかの実施形態では、第2の凝集塊は、7日目に、約25～400、25～350、25～300、25～275、25～250、40～400、40～350、40～300、40～275、40～250、50～400、60～350、50～300、50～275、50～250、60～400、60～350、60～300、60～275、60～250、70～400、70～350、70～300、70～275、70～250、80～400、80～350、80～300、80～275、または80～250 μm の直径を有する。

30

40

【1215】

幾つかの実施形態では、第2の凝集塊は、第2のインキュベーションの開始後の4日目及び／または第3のインキュベーションの3日目に、約25～400、25～350、25～300、25～275、25～250、40～400、40～350、40～300、40～275、40～250、50～400、60～350、50～300、50～275、50～250、60～400、60～350、60～300、60～275、60～250、70～400、70～350、70～300、70～275、70～250、80～400、80～350、80～300、80～275、または80～250 μm の直径を有する。幾つかの実施形態では、第2の凝集塊は、8日目に、約25～400、25～350、25～300、25～275、25～250、40～400、40～350

50

、40～300、40～275、40～250、50～400、60～350、50～300、50～275、50～250、60～400、60～350、60～300、60～275、60～250、70～400、70～350、70～300、70～275、70～250、80～400、80～350、80～300、80～275、または80～250 μm の直径を有する。

【1216】

幾つかの実施形態では、第2のインキュベーションは、懸濁液中で行われる。幾つかの実施形態では、第2のインキュベーションは、懸濁液中で解離細胞の集団を培養することを含む。幾つかの実施形態では、第2のインキュベーションは、1日間以上、例えば、第2のインキュベーションのうちの1日間、2日間、または3日間、懸濁液中で解離細胞の集団を培養することを含む。幾つかの実施形態では、第2のインキュベーションは、第2のインキュベーションの全期間にわたって懸濁液中で解離細胞の集団を培養することを含む。幾つかの実施形態では、第2のインキュベーションは、12～72時間、12～60時間、12～48時間、12～36時間、12～24時間、18～72時間、18～60時間、18～48時間、18～36時間、18～24時間、24～72時間、24～60時間、24～48時間、もしくは24～36時間、または約12～72時間、12～60時間、12～48時間、12～36時間、12～24時間、18～72時間、18～60時間、18～48時間、18～36時間、18～24時間、24～72時間、24～60時間、24～48時間、もしくは24～36時間、懸濁液中で解離細胞の集団を培養することを含む。

【1217】

第3のインキュベーション

第3のインキュベーションは、第2の凝集塊の形成後、例えば、第2のインキュベーション後に実行され、第2の凝集塊の細胞集団を心筋細胞の集団に分化させるための条件下で第2の凝集塊を培養することを含む。

【1218】

幾つかの実施形態では、第3のインキュベーションの培養は、第2の凝集塊の細胞集団を心筋細胞の集団に分化させるのに適した任意の条件下で第2の凝集塊を培養することを含む。例えば、幾つかの実施形態では、第3のインキュベーションの培養は、例えば、Fujiwara et al., PLoS One. (2001) 6(2): e16734、Dambrot et al., Biochem J. (2011) 434(1): 25–35、Foldes et al., J Mol Cell Cardiol. (2011) 50(2): 367–76、Wang et al., Sci China Life Sci. (2010) 53(5): 581–9、Chen et al., J Cell Biochem. (2010) (1): 29–39、Yang et al., Nature (2008) 453: 524–28、Kattman et al., Cell Stem Cell (2011) 8: 228–40、Laflamme et al., Nat. Biotechnol. (2007) 25: 1015–24、Paige et al., PLoS One (2010) 5(6): e11134、Xu et al., Regen Med (2011) 6(1): 53–66、Mignone et al., Circ J (2010) 74(12): 2517–26、Takei et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol. (2009) 296(6): H1793–803、WO2013013206、及びWO2013056072に記載されるような培地、試薬、及び／または条件、例えば、0日目の分化方法の開始後の3日目から例えば、22日目の心筋細胞の採取までのうちの任意の1日以上で使用されるものを含み得る。

【1219】

幾つかの実施形態では、第3のインキュベーションは、グルコースを含む培地、例えば、分化6日目(DD6)培地、及び乳酸ナトリウムを含む培地、例えば、分化10日目(DD10)培地で第2の凝集塊を培養することを含む。幾つかの実施形態では、細胞は、

グルコースを含む培地で、及び乳酸ナトリウムを含む培地で非同時に培養される。

【1220】

幾つかの実施形態では、第3のインキュベーションは、グルコースを含み、無血清の分化サプリメントを更に含む培地、例えば、分化6日目（DD6）培地で第2の凝集塊を培養することを含む。幾つかの実施形態では、培地、例えば、DD6培地は、RPMI1640培地（カタログ番号：11875-093；Life Technologies）である基礎培地を含む。幾つかの実施形態では、無血清の分化サプリメントは、B27（商標）サプリメント（カタログ番号：A1486701；Life Technologies）である。

【1221】

幾つかの実施形態では、第3のインキュベーションは、4～22日目から選択される1日以上の間、または心筋細胞の集団が採取されるまで、グルコース及び無血清の分化サプリメントを含む培地、例えば、DD6培地で第2の凝集塊を培養することを含む。幾つかの実施形態では、第3のインキュベーションは、4日目、5日目、6日目、もしくは7日目またはその前後に開始して連続3日間以上、4日間以上、5日間以上、または6日間以上、グルコース及び無血清の分化サプリメントを含む培地、例えば、DD6培地で第2の凝集塊を培養することを含む。幾つかの実施形態では、第3のインキュベーションは、5、6、もしくは7日目またはその前後に開始して連続3、4、または5日間、グルコース及び無血清の分化サプリメントを含む培地、例えば、DD6培地で第2の凝集塊を培養することを含む。幾つかの実施形態では、第3のインキュベーションは、6日目またはその前後に開始して連続5日間、グルコース及び無血清の分化サプリメントを含む培地、例えば、DD6培地で第2の凝集塊を培養することを含む。

【1222】

幾つかの実施形態では、乳酸ナトリウムを含む培地は、グルコースを含まない。幾つかの実施形態では、乳酸ナトリウムは、S-乳酸ナトリウム（カタログ番号：106522；Millipore-Sigma）である。

【1223】

幾つかの実施形態では、第3のインキュベーションは、グルコースを含む培地、例えば、DD6培地、乳酸ナトリウムを含む培地、例えば、DD10培地と交換される7、8、9、10、11、12、もしくは13日目またはその前後に開始される連続する1、2、3、または4日間の期間を除いて、第3のインキュベーションの開始時から開始し、例えば、22日目または前後の採取まで継続して、グルコースを含む当該培地、例えば、DD6培地で第2の凝集塊を培養することを含む。幾つかの実施形態では、第3のインキュベーションは、グルコース及び無血清の分化サプリメントを含む培地、例えば、DD6培地、乳酸ナトリウムを含む培地、例えば、DD10培地と交換される7、8、9、10、11、12、もしくは13日目またはその前後に開始される連続する1、2、3、または4日間の期間を除いて、第3のインキュベーションの開始時から開始し、例えば、22日目または前後の採取まで継続して、グルコース及び無血清の分化サプリメントを含む当該培地、例えば、DD6培地で第2の凝集塊を培養することを含む。

【1224】

幾つかの実施形態では、第3のインキュベーションは、グルコースを含む培地、例えば、DD6培地、乳酸ナトリウムを含む培地、例えば、DD10培地と交換される10日目またはその前後に開始される連続する3日間の期間、例えば、10、11、及び12日目を除いて、第3のインキュベーションの開始時から開始し、例えば、22日目または前後の採取まで継続して、グルコースを含む当該培地、例えば、DD6培地で第2の凝集塊を培養することを含む。幾つかの実施形態では、第3のインキュベーションは、グルコース及び無血清の分化サプリメントを含む培地、例えば、DD6培地、乳酸ナトリウムを含む培地、例えば、DD10培地と交換される10日目またはその前後に開始される連続する3日間の期間、例えば、10、11、及び12日目を除いて、第3のインキュベーションの開始時から開始し、例えば、22日目または前後の採取まで継続して、グルコース

及び無血清の分化サプリメントを含む当該培地、例えば、D D 6 培地で第 2 の凝集塊を培養することを含む。

【1 2 2 5】

幾つかの実施形態では、第 3 のインキュベーションは、7 ～ 1 5 日目から選択される 1 日以上の日、グルコース及び無血清の分化サプリメントを含む培地、例えば、D D 1 0 培地で第 2 の凝集塊を培養することを含む。幾つかの実施形態では、第 3 のインキュベーションは、7 ～ 1 5 日目から選択される 1 日、連続する 2 日以上、連続する 3 日以上、または連続する 4 日以上の日、グルコース及び無血清の分化サプリメントを含む培地、例えば、D D 1 0 培地で第 2 の凝集塊を培養することを含む。幾つかの実施形態では、第 3 のインキュベーションは、7、8、9、1 0、1 1、1 2、もしくは 1 3 日目またはその前後に開始して 1、2、3、または 4 日間連続で、グルコース及び無血清の分化サプリメントを含む培地、例えば、D D 1 0 培地で第 2 の凝集塊を培養することを含む。幾つかの実施形態では、第 3 のインキュベーションは、9、1 0、もしくは 1 1 日目またはその前後に開始して 3 日間連続で、グルコース及び無血清の分化サプリメントを含む培地、例えば、D D 1 0 培地で第 2 の凝集塊を培養することを含む。幾つかの実施形態では、第 3 のインキュベーションは、1 0、1 1、及び 1 2 日目に、グルコース及び無血清の分化サプリメントを含む培地、例えば、D D 1 0 培地で第 2 の凝集塊を培養することを含む。

10

【1 2 2 6】

幾つかの実施形態では、(a) グルコースを含む培地での第 2 の凝集塊の培養が、6 ～ 1 0 及び 1 2 ～ 2 2 日目もしくはそれらの前後に、グルコースを含む培地で第 2 の凝集塊を培養することを含み、乳酸ナトリウムを含む培地での第 2 の凝集塊の培養が、1 0 ～ 1 2 日目もしくはその前後に、乳酸ナトリウムを含む培地で第 2 の凝集塊を培養することを含むか、または (b) グルコースを含む培地での第 2 の凝集塊の培養が、4 ～ 8 及び 1 2 ～ 2 2 日目もしくはそれらの前後に、グルコースを含む培地で第 2 の凝集塊を培養することを含み、乳酸ナトリウムを含む培地での第 2 の凝集塊の培養が、8 ～ 1 2 日目もしくはその前後に、乳酸ナトリウムを含む培地で第 2 の凝集塊を培養することを含むか、または (c) グルコースを含む培地での第 2 の凝集塊の培養が、5 ～ 9 及び 1 3 ～ 2 2 日目もしくはそれらの前後に、グルコースを含む培地で第 2 の凝集塊を培養することを含み、乳酸ナトリウムを含む培地での第 2 の凝集塊の培養が、9 ～ 1 3 日目もしくはその前後に、乳酸ナトリウムを含む培地で第 2 の凝集塊を培養することを含むか、または (d) グルコースを含む培地での第 2 の凝集塊の培養が、7 ～ 1 1 及び 1 3 ～ 2 2 日目もしくはそれらの前後に、グルコースを含む培地で第 2 の凝集塊を培養することを含み、乳酸ナトリウムを含む培地での第 2 の凝集塊の培養が、1 1 ～ 1 3 日目もしくはその前後に、乳酸ナトリウムを含む培地で第 2 の凝集塊を培養することを含むか、または (e) グルコースを含む培地での第 2 の凝集塊の培養が、8 ～ 1 2 及び 1 4 ～ 2 2 日目もしくはそれらの前後に、グルコースを含む培地で第 2 の凝集塊を培養することを含み、乳酸ナトリウムを含む培地での第 2 の凝集塊の培養が、1 2 ～ 1 4 日目もしくはその前後に、乳酸ナトリウムを含む培地で第 2 の凝集塊を培養することを含む。

20

30

【1 2 2 7】

幾つかの実施形態では、グルコースを含む培地での第 2 の凝集塊の培養は、6 ～ 1 0 及び 1 2 ～ 2 2 日目もしくはそれらの前後に、グルコースを含む培地で第 2 の凝集塊を培養することを含み、乳酸ナトリウムを含む培地での第 2 の凝集塊の培養は、1 0 ～ 1 2 日目もしくはその前後に、乳酸ナトリウムを含む培地で第 2 の凝集塊を培養することを含む。幾つかの実施形態では、グルコースを含む培地での第 2 の凝集塊の培養は、4 ～ 8 及び 1 2 ～ 2 2 日目もしくはそれらの前後に、グルコースを含む培地で第 2 の凝集塊を培養することを含み、乳酸ナトリウムを含む培地での第 2 の凝集塊の培養は、8 ～ 1 2 日目もしくはその前後に、乳酸ナトリウムを含む培地で第 2 の凝集塊を培養することを含む。幾つかの実施形態では、グルコースを含む培地での第 2 の凝集塊の培養は、5 ～ 9 及び 1 3 ～ 2 2 日目もしくはそれらの前後に、グルコースを含む培地で第 2 の凝集塊を培養することを含み、乳酸ナトリウムを含む培地での第 2 の凝集塊の培養は、9 ～ 1 3 日目もしくはその

40

50

前後に、乳酸ナトリウムを含む培地で第2の凝集塊を培養することを含む。幾つかの実施形態では、グルコースを含む培地で第2の凝集塊の培養は、7～11及び13～22日目もしくはそれらの前後に、グルコースを含む培地で第2の凝集塊を培養することを含み、乳酸ナトリウムを含む培地で第2の凝集塊の培養は、11～13日目もしくはその前後に、乳酸ナトリウムを含む培地で第2の凝集塊を培養することを含む。幾つかの実施形態では、グルコースを含む培地で第2の凝集塊の培養は、8～12及び14～22日目もしくはそれらの前後に、グルコースを含む培地で第2の凝集塊を培養することを含み、乳酸ナトリウムを含む培地で第2の凝集塊の培養は、12～14日目もしくはその前後に、乳酸ナトリウムを含む培地で第2の凝集塊を培養することを含む。

【1228】

10

幾つかの実施形態では、乳酸ナトリウムを含む培地で第2の凝集塊の培養は、約9～13日目のいずれかの1日以上で、乳酸ナトリウムを含む培地で第2の凝集塊を培養することを含む。幾つかの実施形態では、乳酸ナトリウムを含む培地で第2の凝集塊の培養は、10～12日目のうちの1日以上に、乳酸ナトリウムを含む培地で第2の凝集塊を培養することを含む。幾つかの実施形態では、乳酸ナトリウムを含む培地で第2の凝集塊の培養は、10～12日目またはその前後に、乳酸ナトリウムを含む培地で第2の凝集塊を培養することを含む。

【1229】

幾つかの実施形態では、第3のインキュベーションは、心筋細胞の集団が採取されるまで継続される。幾つかの実施形態では、第3のインキュベーションは、4～8日目のいずれかまたはその前後、例えば、4、5、6、7、または8日目に開始され、心筋細胞の集団が採取されるまで継続される。幾つかの実施形態では、第3のインキュベーションは、4日目もしくは5日目またはその前後に開始される。幾つかの実施形態では、第3のインキュベーションは、6～8日目のいずれかまたはその前後、例えば、6、7、または7日目に開始され、心筋細胞の集団が採取されるまで継続される。幾つかの実施形態では、第3のインキュベーションは、6日目もしくは7日目またはその前後に開始される。幾つかの実施形態では、第3のインキュベーションは、6日目またはその前後に開始される。

20

【1230】

幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、8、9、10、11、及び12日目のうちのいずれかの1日以上で、及び／または解離剤と接触させる日より後の6日目に、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%である1つ以上の心筋細胞マーカーの頻度を含む。心筋細胞マーカーの例としては、例えば、NKX2.5、cTNT、ACTN2、TNNT1、TNNT3、MYH6、MYH7、MYL2、及びMYL7タンパク質が挙げられる。NKX2.5は、NK2ホメオボックス5（NKX2-5としても公知）であり、NKX2-5遺伝子（NM_001166175；NCBI遺伝子番号：1482）によりコードされる。cTNTは、心臓型トロポニンT2（TNNT2としても公知）であり、TNNT2遺伝子（NG_007556；NCBI遺伝子番号：7139）によりコードされる。ACTN2は、アクチニンα2であり、ACTN2遺伝子（NCBIアクセッション番号：NG_009081；NCBI遺伝子番号：88）によりコードされる。TNNT1は、遅骨格筋型トロポニンI1（SSTNI1としても公知）であり、TNNT1遺伝子（NG_016649；NCBI遺伝子番号：7135）によりコードされる。TNNT3は、心臓型トロポニンI3であり、TNNT3遺伝子（NM_000363；NCBI遺伝子番号：7137）によりコードされる。MYH6は、ミオシン重鎖6であり、MYH6遺伝子（NM_002471；NCBI遺伝子番号：4624）によりコードされる。MYH7は、ミオシン重鎖7であり、MYH7遺伝子（NM_000257；NCBI遺伝子番号：

30

40

50

4625)によりコードされる。MYL2は、ミオシン軽鎖2であり、MYL2遺伝子(NM_000432;NCBI遺伝子番号:4633)によりコードされる。MYL7は、ミオシン軽鎖7であり、MYL2遺伝子(NM_021223;NCBI遺伝子番号:58498)によりコードされる。

【1231】

幾つかの実施形態では、1つ以上の心筋細胞マーカーは、NKX2.5、cTNT、ACTN2、TNNI1、TNNI3、MYH6、MYH7、MYL2、及びMYL7からなる群から選択される。幾つかの実施形態では、1つ以上の心筋細胞マーカーは、NKX2.5及びcTNTを含む。幾つかの実施形態では、1つ以上の心筋細胞マーカーは、MYH6及びMYL7を含む。幾つかの実施形態では、1つ以上の心筋細胞マーカーは、NKX2.5、cTNT、MYH6、及びMYL7を含む。

10

【1232】

幾つかの実施形態では、第3のインキュベーションの間、心筋細胞の集団は、8~12日目のいずれかの1日以上、すなわち、8、9、10、11、及び12日目のうちの任意の1日以上で、及び／または解離剤と接触させる日より後の6日目で、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%である頻度のNKX2.5+／cTNT+細胞を含む。幾つかの実施形態では、NKX2.5+／cTNT+細胞の頻度は、8~12日目のいずれかの1日以上、すなわち、8、9、10、11、及び12日目のうちの任意の1日以上で、及び／または解離剤と接触させる日より後の6日目で、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%である。幾つかの実施形態では、第3のインキュベーションの間、心筋細胞の集団は、9~11日目のいずれかの1日以上、すなわち、9、10、及び11日目のうちの任意の1日以上で、及び／または解離剤と接触させる日より後の6日目で、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%である頻度のNKX2.5+／cTNT+細胞を含む。幾つかの実施形態では、NKX2.5+／cTNT+細胞の頻度は、9~11日目のいずれかの1日以上、すなわち、9、10、及び11日目のうちの任意の1日以上で、及び／または解離剤と接触させる日より後の6日目で、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%である。幾つかの実施形態では、第3のインキュベーションの間、心筋細胞の集団は、10日目もしくはその前後で、及び／または解離剤と接触させる日より後の6日目で、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%である頻度のNKX2.5+／cTNT+細胞を含む。幾つかの実施形態では、NKX2.5+／cTNT+細胞の頻度は、10日目もしくはその

20

30

40

50

前後で、及び／または解離剤と接触させる日より後の6日目で、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%である。幾つかの実施形態では、NKX2.5+／cTNT+細胞の頻度は、10日目またはその前後で、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%である。

【1233】

幾つかの実施形態では、NKX2.5+／cTNT+細胞の頻度は、8～12日目のいずれかの1日以上、すなわち、8、9、10、11、及び12日目のうちの任意の1日以上で、及び／または解離剤と接触させる日より後の6日目で、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%である。幾つかの実施形態では、NKX2.5+／cTNT+細胞の頻度は、9～11日目のいずれかの1日以上、すなわち、9、10、及び11日目のいずれかの1日以上で、及び／または解離剤と接触させる日より後の6日目で、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%である。幾つかの実施形態では、NKX2.5+／cTNT+細胞の頻度は、10日目もしくはその前後で、及び／または解離剤と接触させる日より後の6日目で、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%である。

【1234】

幾つかの実施形態では、第3のインキュベーションは、懸濁液中で行われる。幾つかの実施形態では、第3のインキュベーションは、懸濁液中で第2の凝集塊を培養することを含む。幾つかの実施形態では、第3のインキュベーションは、4、5、6、7、8、9、もしくは10日目またはその前後に開始して、懸濁液中で第2の凝集塊を培養することを含む。幾つかの実施形態では、第3のインキュベーションは、6日目またはその前後に開始して、懸濁液中で第2の凝集塊を培養することを含む。幾つかの実施形態では、第3のインキュベーションは、解離剤との接触の1日後、2日後、3日後、もしくは4日後またはその前後に開始して、懸濁液中で第2の凝集塊を培養することを含む。幾つかの実施形態では、第3のインキュベーションは、解離剤との接触の2日後またはその前後に開始して、懸濁液中で第2の凝集塊を培養することを含む。

心筋細胞の集団

【1235】

幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%である1つ以上の心筋細胞マーカーの頻度を含む。幾つかの実施形態では、1つ以上の心筋細胞マーカーは、NKX2.5、cTNT、ACTN2、TNNT1、TNNT3、MYH6、MYH7、MYL2、及びMYL7からなる群から選択される。幾つかの実施形態では、1つ以上の心筋細胞マーカーは、NKX2.5及びcTNTを含む。幾つかの実施形態では、1つ以上の心筋細胞マーカーは、MYH6及びMYL7を含む。幾つかの実施形態では、1つ以上の心筋細胞マーカーは、NKX2.5、cTNT、MYH6、及びMYL7を含む。

【1236】

幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%である、NKX2.5、cTNT、ACTN2、TNNI1、TNNI3、MYH6、MYH7、MYL2、及びMYL7からなる群から選択される1つ以上の心筋細胞マーカーの頻度を含む。

幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるNKX2.5

+ / cTNT+の頻度を含む。幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるMYH6+ / MYL7+の頻度を含む。幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるNKX2.5+ / cTNT+ / MYH6+ / MYL7+の頻度を含む。

幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるNKX2.5+ / cTNT+ / MYH6+ / MYL7+の頻度を含む。

幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるNKX2.5+ / cTNT+の頻度を含む。幾つかの実施形態では、

心筋細胞の集団は、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるMYH6+ / MYL7+の頻度を含む。幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるか、または少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、もしくは98%であるNKX2.5+ / cTNT+ / MYH6+ / MYL7+の頻度を含む。

【1237】

幾つかの実施形態では、第2の凝集塊の心筋細胞の集団は、予め解離されなかった細胞を含む凝集塊における心筋細胞の参照集団と比較してより高い頻度の成熟心筋細胞を含む。幾つかの実施形態では、第2の凝集塊の心筋細胞の集団は、20、21、22、23、もしくは24日目またはその前後に、予め解離されなかった細胞を含む凝集塊における心筋細胞の参照集団と比較してより高い頻度の成熟心筋細胞を含む。幾つかの実施形態では、第2の凝集塊の心筋細胞の集団は、22日目またはその前後に、予め解離されなかった細胞を含む凝集塊における心筋細胞の参照集団と比較してより高い頻度の成熟心筋細胞を

10

20

30

40

50

含む。

【1238】

幾つかの実施形態では、心筋細胞の参照集団は、b) 及び c) を除いて、第2の凝集塊の心筋細胞の集団と同じ条件下または実質的に同じ条件下で分化される。幾つかの実施形態では、心筋細胞の参照集団は、凝集塊を解離剤と接触させて、解離細胞の集団を形成させることを含まない条件下で分化される。幾つかの実施形態では、心筋細胞の参照集団は、凝集塊を解離剤と接触させることを含まないことを除いて、第2の凝集塊の心筋細胞の集団と同じ条件下または実質的に同じ条件下で分化される。幾つかの実施形態では、心筋細胞の参照集団は、解離剤を使用して予め解離されなかった。

10

【1239】

幾つかの実施形態では、成熟心筋細胞の頻度は、第2の凝集塊の心筋細胞の集団における1つ以上の成熟心筋細胞マーカーの存在の頻度に基づく。心筋細胞マーカーは、心筋細胞を同定するために使用される任意のマーカー、例えば、任意の細胞表面マーカーであり得る。幾つかの実施形態では、1つ以上の心筋細胞マーカーは、NKX2.5、cTNT、ACTN2、TNNI1、TNNI3、MYH6、MYH7、MYL2、及びMYL7からなる群から選択される1つ以上のマーカーを含む。幾つかの実施形態では、1つ以上の心筋細胞マーカーは、MYH6及びMYL7を含む。幾つかの実施形態では、1つ以上の心筋細胞マーカーは、NKX2.5、cTNT、MYH6、及びMYL7を含む。幾つかの実施形態では、1つ以上の心筋細胞マーカーは、NKX2.5及びcTNTを含む。

20

【1240】

移植後不整脈(AE)を低減するための改変

幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、対象に移植される場合に移植後不整脈(EA)を低減または予防する1種以上の改変を含む。幾つかの実施形態では、解離細胞の集団は、対象に移植される場合にEAを低減または予防する1種以上の改変を含む。幾つかの実施形態では、第2の凝集塊の細胞集団は、対象に移植される場合にEAを低減または予防する1種以上の改変を含む。

30

【1241】

幾つかの実施形態では、1種以上の改変は、1種以上の改変を含まない心筋細胞の集団と比較して、(i) 1種以上の免疫寛容誘導因子の発現を増強し、及び／または(ii) 1種以上の主要組織適合複合体(MHC)クラスI分子及び／またはMHCクラスII分子の発現を低減する、1種以上の改変を含む。

【1242】

幾つかの実施形態では、1種以上の改変は、(a) CACNA1G、HCN4、及びSLC8A1のうちの1つ以上の発現を低減し、及び／または(b) KCNJ2、TRDN、SRL、HRC、及びCASQ2のうちの1つ以上の発現を増強する1種以上の改変を含む。

40

【1243】

幾つかの実施形態では、1種以上の改変は、(a) CACNA1H、HCN4、及びSLC8A1のうちの1つ以上の発現を低減し、及び／または(b) KCNJ2、TRDN、SRL、HRC、及びCASQ2のうちの1つ以上の発現を増強する1種以上の改変を含む。

【1244】

幾つかの実施形態では、1種以上の改変は、(a) CACNA1H、HCN4、及びSLC8A1の発現を低減し、(b) KCNJ2の発現を増強する1種以上の改変を含む。

【1245】

細胞に改変を導入して、発現を変化させるための例示的な方法は、公知であり、また本明細書に記載されている。例えば、タンパク質をコードする外来性ポリヌクレオチド(す

50

なわち導入遺伝子)の導入もしくは送達、またはDNA標的化ドメイン及び遺伝子を標的とする転写活性化因子の融合タンパク質の送達の導入などによる、遺伝子またはタンパク質を過剰発現させるか、またはその発現を増強するための種々の方法のいずれかが使用され得る。同様に、抑制性核酸(例えば、RNAi)の導入もしくは送達などによる遺伝子編集でない方法、または標的化ヌクレアーゼシステム(例えばCRISPR/Cas)の導入もしくは送達を含む遺伝子編集方法が含まれる、遺伝子またはタンパク質の発現を低減または除去するための種々の方法のいずれかが使用され得る。幾つかの実施形態では、発現を低減または除去するための方法は、ヌクレアーゼベースの遺伝子編集技術によるものである。

【1246】

幾つかの実施形態では、レアカットエンドヌクレアーゼ(例えば、CRISPR/Cas、TALEN、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、及びホーミングエンドヌクレアーゼシステム)を利用するゲノム編集技術が、(例えば、重要な免疫遺伝子のゲノムDNAを欠失させることにより)ヒト細胞における免疫遺伝子が含まれる、遺伝子の発現を低減または除去するために使用される。幾つかの実施形態では、ゲノム編集技術は、ニッカーゼ、塩基編集、プライム編集、及びGene Writingの使用を含む。

【1247】

ある特定の実施形態では、ゲノム編集技術または他の遺伝子調節技術は、KCNJ2、TRDN、SRL、HRC、及びCASQ2遺伝子のうちの1つ以上を挿入するために、CACNA1G、CACNA1H、HCN4、及びSLC8A1遺伝子のうちの1つ以上の発現を低減もしくは除去するために、またはそれらの任意の組み合わせのために使用され、これにより、遺伝子操作された細胞、例えば、対象への移植後にEAの低減または除去をもたらし得る遺伝子操作された心筋細胞の集団が作製される。

【1248】

従って、本明細書において提供される細胞、例えば、心筋細胞の集団、または解離細胞の集団、または第2の凝集塊の細胞の集団は、幾つかの実施形態では、CACNA1G、CACNA1H、HCN4、及びSLC8A1のうちの1つ以上の調節された発現(例えば、低減または除去された発現)、及び/またはKCNJ2、TRDN、SRL、HRC、及びCASQ2のうちの1つ以上の調節された発現(例えば、増強された発現または過剰発現)を示し得る。幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞、例えば、心筋細胞の集団、または解離細胞の集団、または第2の凝集塊の細胞の集団は、CACNA1G、HCN4、及びSLC8A1の調節された発現(例えば、低減または除去された発現)、ならびにKCNJ2の調節された発現(例えば、増強された発現または過剰発現)を示す。

【1249】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞、例えば、心筋細胞の集団、または解離細胞の集団、または第2の凝集塊の細胞の集団は、対象への移植後に移植後不整脈を引き起こさない。

【1250】

関心対象の標的遺伝子の発現を低減するための方法は公知である。標的ポリヌクレオチドの発現を低減するための任意の方法が使用され得る。幾つかの実施形態では、改変(例えば、遺伝子改変)は、標的ポリヌクレオチドの発現の永続的な除去または低減をもたらす。例えば、幾つかの実施形態では、標的ポリヌクレオチドまたは遺伝子は、例えば、標的化エンドヌクレアーゼを使用することによって、標的ポリヌクレオチドのDNA切断を導入することにより破壊される。他の実施形態では、改変(例えば、遺伝子改変)は、標的ポリヌクレオチドの発現の一過性の低減をもたらす。例えば、幾つかの実施形態では、遺伝子抑制は、遺伝子の発現を選択的に阻害または抑制するための、標的ポリヌクレオチドに相補的な抑制性核酸を使用して、例えば、アンチセンス技術を使用して、例えば、RNA干渉(RNAi)、低分子干渉RNA(sirna)、短鎖ヘアピン(shRNA)

10

20

30

40

50

、及び／またはリボザイムにより達成される。

【1251】

幾つかの実施形態では、標的ポリヌクレオチド配列は、ゲノム配列である。幾つかの実施形態では、標的ポリヌクレオチド配列は、ヒトゲノム配列である。幾つかの実施形態では、標的ポリヌクレオチド配列は、哺乳動物ゲノム配列である。幾つかの実施形態では、標的ポリヌクレオチド配列は、脊椎動物ゲノム配列である。幾つかの実施形態では、遺伝子破壊は、通常は標的化した様式での遺伝子における1つ以上の二本鎖切断及び／または1つ以上の一本鎖切断の導入により実行される。幾つかの実施形態では、二本鎖または一本鎖切断は、ヌクレアーゼ、例えば、エンドヌクレアーゼ、例えば、遺伝子標的化ヌクレアーゼにより作られる。幾つかの実施形態では、標的化ヌクレアーゼは、遺伝子またはその一部の配列に標的化されるように専用に設計された、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、及びRNA誘導型ヌクレアーゼ、例えば、CRISPR関連ヌクレアーゼ（Cas）から選択される。幾つかの実施形態では、標的化ヌクレアーゼは、二本鎖または一本鎖切断を生成し、次いで、これはエラーを起こしやすい非相同末端結合（NHEJ）、または場合によっては、テンプレートが使用される正確な相同組換え修復（HDR）による修復を受ける。幾つかの実施形態では、標的化ヌクレアーゼは、DNA二本鎖切断（DSB）を生成する。幾つかの実施形態では、切断を生じさせ、それを修復するプロセスは、通常、エラーを起こしやすく、NHEJ修復によるDNA塩基の挿入及び欠失（インデル）をもたらす。幾つかの実施形態では、遺伝子改変は、標的遺伝子のヌクレオチド配列の欠失、挿入、または変異を誘発し得る。幾つかの例では、遺伝子改変は、フレームシフト変異をもたらし得、これは未成熟終止コドンをもたらし得る。ヌクレアーゼにより媒介される遺伝子編集の例では、標的編集は、遺伝子の両方のアレルで発生し、これにより、遺伝子の両アレル破壊または編集をもたらす。幾つかの実施形態では、遺伝子の全てのアレルが遺伝子編集による標的とされる。幾つかの実施形態では、例えば、CRISPR/Casシステムを使用する、標的化ヌクレアーゼによる遺伝子改変は、遺伝子の完全なノックアウトをもたらす。

10

20

【1252】

採取及び凍結保存

幾つかの実施形態では、本発明の方法は、心筋細胞の集団を採取することを更に含む。幾つかの実施形態では、本発明の方法は、解離細胞の集団を採取することを更に含む。幾つかの実施形態では、発明の方法は、第2の凝集塊を採取することを更に含む。

30

【1253】

幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、任意の好適な時機に、例えば、第3のインキュベーションの間またはそれ以降における任意の好適な時機に採取される。幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、1つ以上の心筋細胞マーカーの頻度に基づいて採取される。幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、閾値を越えている1つ以上の心筋細胞マーカーの頻度を含む基準に基づいて採取される。幾つかの実施形態では、閾値は、85%以上、96%以上、97%以上、88%以上、89%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、または99%以上である。

40

【1254】

幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、もしくは24日目またはその前後に採取される。幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、20、21、22、23、もしくは24日目またはその前後に採取される。幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、21、22、もしくは23日目またはその前後に採取される。幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団は、22日目またはその前後に採取される。

【1255】

幾つかの実施形態では、解離細胞の集団は、2、3、4、5、もしくは6日目またはその前後に採取される。幾つかの実施形態では、解離細胞の集団は、3、4、もしくは5日

50

目またはその前後に採取される。幾つかの実施形態では、解離細胞の集団は、4日目もしくは5日目またはその前後に採取される。幾つかの実施形態では、解離細胞の集団は、4日目またはその前後に採取される。

【1256】

幾つかの実施形態では、第2の凝集塊は、3～22日目のいずれかまたはその前後に採取される。幾つかの実施形態では、第2の凝集塊は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15日目のいずれかまたはその前後に採取される。幾つかの実施形態では、第2の凝集塊は、4、5、6、7、8、9、10、11、もしくは12日目のいずれかまたはその前後に採取される。幾つかの実施形態では、第2の凝集塊は、4、5、6、7、8、9、もしくは10日目またはその前後に採取される。幾つかの実施形態では、第2の凝集塊は、5、6、もしくは7日目またはその前後に採取される。

10

【1257】

採取、例えば、心筋細胞の集団、解離細胞の集団、及び／または第2の凝集塊の採取は、任意の公知の方法、例えば、Fujiwara et al., PLoS One. (2001) 6(2): e16734、Dambrot et al., Biochem J. (2011) 434(1): 25-35、Foldes et al., J Mol Cell Cardiol. (2011) 50(2): 367-76、Wang et al., Sci China Life Sci. (2010) 53(5): 581-9、Chen et al., J Cell Biochem. (2010) (1): 29-39、Yang et al., Nature (2008) 453: 524-28、Kattman et al., Cell Stem Cell (2011) 8: 228-40、Laflamme et al., Nat. Biotechnol. (2007) 25: 1015-24、Paige et al., PLoS One (2010) 5(6): e11134、Xu et al., Regen Med (2011) 6(1): 53-66、Mignone et al., Circ J (2010) 74(12): 2517-26、Takei et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol. (2009) 296(6): H1793-803、WO2013013206、及びWO2013056072において記載または使用されているような任意の方法が含まれる、任意の好適な方法を使用して実行され得る。

20

30

【1258】

幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団の採取は、心筋細胞の集団を遠心分離してペレットにすることを含む。幾つかの実施形態では、心筋細胞の集団の採取は、1つ以上の洗浄ステップを更に含む。幾つかの実施形態では、本発明の方法は、心筋細胞の採取された集団を凍結保存することを更に含む。

【1259】

幾つかの実施形態では、解離細胞の集団の採取は、解離細胞の集団を遠心分離してペレットにすることを含む。幾つかの実施形態では、解離細胞の集団の採取は、1つ以上の洗浄ステップを更に含む。幾つかの実施形態では、本発明の方法は、解離細胞の採取された集団を凍結保存することを更に含む。

40

【1260】

幾つかの実施形態では、第2の凝集塊の採取は、第2の凝集塊を遠心分離してペレットにすることを含む。幾つかの実施形態では、第2の凝集塊の採取は、1つ以上の洗浄ステップを更に含む。幾つかの実施形態では、本発明の方法は、採取された第2の凝集塊を凍結保存することを更に含む。

【1261】

凍結保存は、任意の公知の方法が含まれる、任意の好適な方法を使用して実行され得る。

【1262】

心筋細胞を使用することにより、様々な心臓疾患または病態に対抗するための大規模な

50

効果的細胞療法が提供され得る。

【1263】

ゲノム編集された心筋細胞は、（例えば、WO2022187379A1（その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるような）対象の疾患を処置または予防するために使用され得る。方法は、本明細書に記載されるゲノム編集された心筋細胞、または本明細書に記載される方法により作製されたゲノム編集された心筋細胞を含む組成物を対象に投与することを含み得る。疾患としては、例えば、心臓疾患または心臓病態が挙げられ得る。

【1264】

ゲノム編集された心筋細胞は、単独でまたは1種以上の他の治療法と組み合わせて対象に投与され得る。例えば、ゲノム編集された心筋細胞は、活性薬剤及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物と組み合わせて、及び／または細胞療法と組み合わせて、対象に投与され得る。心筋細胞は、所望の効果をもたらすのに有効な量で患者、好ましくは、哺乳動物、より好ましくは、ヒトに投与され得る。心筋細胞は、例えば、静脈内経路、腫瘍内経路、動脈内経路、経皮経路、カテーテルまたはステントによる局所的送達による経路、腫瘍内注射のための針または他のデバイスによる経路、皮下経路などが含まれる、種々の経路で投与され得る。心筋細胞は、1回または複数回投与され得る。当該技術分野における通常の技量を有する医師は、適応心筋細胞及び任意により、必要とされる医薬組成物の有効量及び投与を決定及び処方することができる。

【1265】

心臓疾患または心臓病態としては、例えば、小児心筋症、加齢性心筋症、拡張型心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症、慢性虚血性心筋症、周産期心筋症、炎症性心筋症、他の心筋症、心筋炎、心筋梗塞、心筋虚血再灌流傷害、心室機能障害、心不全、うっ血性心不全、冠状動脈疾患、末期心疾患、アテローム硬化症、虚血、高血圧、再狭窄、狭心症、リウマチ心疾患、動脈炎、または心血管疾患が挙げられ得る。幾つかの実施形態では、心臓疾患または病態は、心筋梗塞（MI）である。

提供される実施形態のいずれかでは、心筋細胞療法を投与される対象は、病態または疾患、例えば、心臓病態または疾患を有する。幾つかの実施形態では、心臓病態または疾患は、小児心筋症、加齢性心筋症、拡張型心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症、慢性虚血性心筋症、周産期心筋症、炎症性心筋症、他の心筋症、心筋炎、心筋梗塞（MI）、心筋虚血再灌流傷害、心室機能障害、心不全、うっ血性心不全、冠状動脈疾患、末期心疾患、アテローム硬化症、虚血、高血圧、再狭窄、狭心症、リウマチ心疾患、動脈炎、または心血管疾患からなる群から選択される。幾つかの実施形態では、心臓病態または疾患は、心筋梗塞（MI）である。従って、幾つかの実施形態では、心筋細胞療法は、MIを処置するために（例えば、心筋細胞を含む組成物として）対象に投与される。

【1266】

h. 神経細胞

細胞療法製品に使用される神経細胞は、細胞療法製品の製造プロセスの任意の段階でドナー能力についてプロファイリングされ得る。

【1267】

細胞療法製品に使用される神経細胞は、初代神経細胞であり得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、（例えば、ゲノム編集された）初代神経細胞で実行され得る。

【1268】

本明細書の他箇所で記載されるように、細胞療法製品に使用される神経細胞は、多能性幹細胞（iPSC）に由来する神経細胞であり得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、分化して、神経細胞を形成することができる幹細胞でも実行され得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、幹細胞に由来する（例えば、ゲノム編集された）神経細胞でも実行され得る。

【1269】

細胞療法に使用される場合の神経細胞の望ましい特徴に関するある特定の情報が含まれる、本開示の文脈において参照される神経細胞に関する関連情報は、当該技術分野において公知である。本明細書に記載される神経細胞に関する実施形態は、HIPC細胞（例えば、MHCクラスI及び／またはMHCクラスII分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現ならび少なくとも1種の免疫寛容誘導因子の増強された発現を示す）を記載している実施形態、ならびに安全スイッチ、及び本明細書に記載されるような他の改変／遺伝子編集された細胞を記載している実施形態と容易かつ適切に組み合わせられ得ることが理解されよう。細胞療法製品に使用される神経細胞は、細胞療法製品を製造する間の編集プロセスの任意の段階でドナー能力についてプロファイリングされ得る。

10

【1270】

本明細書に記載される神経細胞は、対象の疾患を処置または予防するために使用され得る。

【1271】

本明細書において、レシピエント対象へのその後の移植（transplantation）または移植（engraftment）に有用な、記載される遺伝子操作された多能性細胞（例えば、iPSC）から分化した異なる神経細胞種が提供される。当業者によって理解されるように、分化の方法は、目的の細胞種に依存し、公知の技術を使用する。例示的な神経細胞種としては、限定されるものではないが、脳血管内皮細胞、神経細胞（例えば、ドーパミン作動性ニューロン）、グリア細胞などが挙げられる。

20

【1272】

幾つかの実施形態では、人工多能性幹細胞の分化は、それらの分化を特定の目的の系列及び／または関心対象の細胞種に向けるように、細胞を特定の細胞系列（複数可）をもたらすことが公知の特定の因子に曝露させるか、またはそれと接触させることにより実行される。幾つかの実施形態では、終末分化した細胞は、特殊な表現型特徴または特性を示す。ある特定の実施形態では、本明細書に記載される幹細胞は、神経外胚葉性細胞集団、神経細胞集団、神経内分泌細胞集団、ドーパミン作動性細胞集団、コリン作動性細胞集団、セロトニン作動性細胞集団（5-HT）、グルタミン酸作動性細胞集団、GABA作動性細胞集団、アドレナリン作動性細胞集団、ノルアドレナリン作動性細胞集団、交感神経細胞集団、副交感神経細胞集団、交感神経末梢神経細胞集団、またはグリア細胞集団に分化させられる。幾つかの例では、グリア細胞集団としては、ミクログリア細胞（例えば、アメーバ状細胞、分枝型細胞、活性化貪食細胞、及び活性化非貪食細胞）集団、もしくは大グリア細胞（中枢神経系細胞：アストロサイト、オリゴデンドロサイト、上衣細胞、及び放射状グリア；ならびに末梢神経系細胞：シュワン細胞及び衛星細胞）集団、または前述の細胞のいずれかの前駆体及び前駆細胞が挙げられる。

30

【1273】

異なる種類の神経細胞を作製するためのプロトコールは、PCT出願第WO2010144696号、米国特許第9,057,053号、同第9,376,664号、及び同第10,233,422号に記載されている。低免疫原性多能性細胞を分化させるための方法の追加の説明は、例えば、Deuse et al., Nature Biotechnology, 2019, 37, 252-258、及びHan et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(21), 10441-10446に見出され得る。神経学的障害または状態の動物モデルにおける神経細胞移植の効果を決定するための方法は、以下の参考文献に記載されている：脊髄損傷については、Curtis et al., Cell Stem Cell, 2018, 22, 941-950；パーキンソン病については、Kikuchi et al., Nature, 2017, 548:592-596；ALSについては、Israel et al., Stem Cell Research, 2018, 9(1):152、及びIsrael et al., IntechOpen, DOI:10.5772/intechopen.72862；てんかんについては、Upadhyaya et al., PNAS, 201

40

50

9, 116 (1) : 287-296。

【1274】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された神経細胞、例えば、1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）に由来するiPSCから分化した神経細胞の集団は、培養下で維持され、幾つかの例では、投与前に増殖される。ある特定の実施形態では、神経細胞の集団は、投与前に凍結保存される。

【1275】

幾つかの実施形態では、本技術は、免疫寛容誘導因子（例えば、CD47）を過剰発現し、1種以上のMHCクラスI分子及び／または1種以上のMHCクラスII分子（例えば、1種以上のMHCクラスIヒト白血球抗原分子及び／または1種以上のMHCクラスIIヒト白血球抗原分子）の低減された発現または発現の欠如を有する遺伝子操作された神経細胞、例えば、1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）に由来するiPSCから分化した神経細胞を対象とする。

10

【1276】

幾つかの実施形態では、提供される遺伝子操作された神経細胞は、免疫認識を回避する。幾つかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子操作された神経細胞、例えば、1人以上の個別のドナー（例えば、健常なドナー）に由来するiPSCから分化した神経細胞は、患者（例えば、投与された際のレシピエント）において免疫応答を活性化しない。障害を処置する必要がある対象（例えば、レシピエント）または患者に本明細書に記載される遺伝子操作された神経細胞の集団を投与することにより障害を処置する方法が提供される。

20

【1277】

幾つかの実施形態では、神経細胞は、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症、他の神経変性疾患または神経変性状態、注意欠陥多動性障害（ADHD）、トゥレット症候群（TS）、統合失調症、精神病、うつ病、他の神経精神性障害を処置するために対象に投与される。幾つかの実施形態では、本明細書に記載される神経細胞は、脳卒中を処置または改善するために対象に投与される。幾つかの実施形態では、神経細胞及びグリア細胞は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）を有する対象に投与される。

1) 脳血管内皮細胞

【1278】

細胞療法製品に使用される脳血管内皮細胞は、細胞療法製品の製造プロセスの任意の段階でドナー能力についてプロファイリングされ得る。

30

【1279】

細胞療法製品に使用される脳血管内皮細胞は、初代脳血管内皮細胞であり得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、（例えば、ゲノム編集された）初代脳血管内皮細胞で実行され得る。

【1280】

本明細書の他箇所で記載されるように、細胞療法製品に使用される脳血管内皮細胞は、多能性幹細胞（iPSC）に由来する脳血管内皮細胞であり得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、分化して、脳血管内皮細胞を形成することができる幹細胞でも実行され得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、幹細胞に由来する（例えば、ゲノム編集された）脳血管内皮細胞でも実行され得る。

40

【1281】

細胞療法に使用される場合の脳血管内皮細胞の望ましい特徴に関するある特定の情報が含まれる、本開示の文脈において参照される脳血管内皮細胞に関する関連情報は、当該技術分野において公知である。本明細書に記載される脳血管内皮細胞に関する実施形態は、HIP細胞（例えば、MHCクラスI及び／またはMHCクラスII分子のうちの1つ以

50

上の分子の低減された発現ならび少なくとも1種の免疫寛容誘導因子の増強された発現を示す)を記載している実施形態、ならびに安全スイッチ、及び本明細書に記載されるような他の改変／遺伝子編集された細胞を記載している実施形態と容易かつ適切に組み合わせられ得ることが理解されよう。細胞療法製品に使用される脳血管内皮細胞は、細胞療法製品を製造する間の編集プロセスの任意の段階でドナー能力についてプロファイリングされ得る。

【1282】

幾つかの実施形態では、脳血管内皮細胞(EC)、その前駆体、及び前駆細胞は、脳ECまたは神経細胞の生成を促進する1種以上の因子を含む培地で細胞を培養することにより、表面上で多能性幹細胞(例えば、人工多能性幹細胞)から分化される。幾つかの例では、培地は、以下のうちの1つ以上を含む:CHIR-99021、VEGF、塩基性FGF(bFGF)、及びY-27632。幾つかの実施形態では、培地は、神経細胞の生存及び機能を促進するように設計されたサプリメントを含む。

10

【1283】

幾つかの実施形態では、脳血管内皮細胞(EC)、その前駆体、及び前駆細胞は、非馴化培地または馴化培地で細胞を培養することにより、表面上で多能性幹細胞から分化される。幾つかの例では、培地は、分化を助長または促進する因子または低分子を含む。幾つかの実施形態では、培地は、VEGR、FGF、SDF-1、CHIR-99021、Y-27632、SB431542、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される1つ以上の因子または低分子を含む。幾つかの実施形態では、分化用の表面は、1種以上の細胞外マトリックスタンパク質を含む。表面は、1種以上の細胞外マトリックスタンパク質でコーティングされ得る。細胞は、懸濁液中で分化され得、次いで、細胞生存を促進するために、マトリゲル、ゼラチン、またはフィブリン／トロニン形態などのゲルマトリックス形態に入れられ得る。幾つかの例では、分化は、通常、細胞特異的マーカーの存在を評価することにより、当該技術分野において公知のように分析される。

20

【1284】

幾つかの実施形態では、脳血管内皮細胞は、CD31、VEカドヘリン、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される因子を発現または分泌する。ある特定の実施形態では、脳血管内皮細胞は、CD31、CD34、CD45、CD117(c-kit)、CD146、CXCR4、VEGF、SDF-1、PDGF、GLUT-1、PECAM-1、eNOS、クロードニン-5、オクルディン、ZO-1、p-糖タンパク質、フォン・ビルブランド因子、VE-カドヘリン、低密度リポタンパク質受容体(LDLR)、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質1(LRP1)、インスリン受容体(INSR)、レプチン受容体(LEPR)、基底細胞接着分子(BCAM)、トランスフェリン受容体(TFRC)、終末糖化産物特異的受容体(AGER)、レチノール取り込み受容体STRA6、大型中性アミノ酸輸送体小サブユニット1(SLC7A5)、興奮性アミノ酸輸送体3(SLC1A1)、ナトリウム共役中性アミノ酸輸送体5(SLC38A5)、溶質輸送体ファミリー16メンバー1(SLC16A1)、ATP依存性トランスロカーゼABCB1、ATP-ABCC2結合カセット輸送体ABCG2、多剤耐性関連タンパク質1(ABCC1)、胆管側多選択性有機アニオン輸送体1(ABCC2)、多剤耐性関連タンパク質4(ABCC4)、及び多剤耐性関連タンパク質5(ABCC5)からなる群から選択される因子のうちの1つ以上を発現または分泌する。

30

40

【1285】

幾つかの実施形態では、脳ECは、密着結合の高発現、高い電気抵抗、少ない開窓数、小さな血管周囲腔、インスリン及びトランスフェリン受容体の高い分布率、ならびに多数のミトコンドリアからなる群から選択される特徴のうちの1つ以上を特徴とする。

【1286】

幾つかの実施形態では、脳ECは、ポジティブセレクション法を使用して選別または精製される。幾つかの例では、脳ECは、内皮細胞マーカー、例えば、限定されるものではないが、CD31に照らし合わせて選別される。換言すれば、CD31陽性脳ECが単離

50

される。幾つかの実施形態では、脳ECは、ネガティブセクション法を使用して選別または精製される。幾つかの実施形態では、限定されるものではないが、TRA-1-60及びSSEA-1が含まれる、多能性マーカーを発現する細胞を選別することにより、未分化または多能性幹細胞が除去される。

【1287】

幾つかの実施形態では、脳血管内皮細胞は、脳出血の症状または影響を軽減するために投与される。幾つかの実施形態では、ドーパミン作動性ニューロンが、パーキンソン病を有する患者に投与される。幾つかの実施形態では、ノルアドレナリン作動性ニューロン、GABA作動性介在ニューロンが、てんかん発作を経験した患者に投与される。幾つかの実施形態では、運動ニューロン、介在ニューロン、シュワン細胞、オリゴデンドロサイト、及びミクログリアが、脊髄損傷を経験した患者に投与される。

10

2) ドーパミン作動性ニューロン

【1288】

細胞療法製品に使用されるドーパミン作動性ニューロンは、細胞療法製品の製造プロセスの任意の段階でドナー能力についてプロファイリングされ得る。

【1289】

細胞療法製品に使用されるドーパミン作動性ニューロンは、初代ドーパミン作動性ニューロンであり得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、（例えば、ゲノム編集された）初代ドーパミン作動性ニューロンで実行され得る。

20

【1290】

本明細書の他箇所で記載されるように、細胞療法製品に使用されるドーパミン作動性ニューロンは、多能性幹細胞（iPSC）に由来するドーパミン作動性ニューロンであり得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、分化して、ドーパミン作動性ニューロンを形成することができる幹細胞でも実行され得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、幹細胞に由来する（例えば、ゲノム編集された）ドーパミン作動性ニューロンでも実行され得る。

【1291】

細胞療法に使用される場合のドーパミン作動性ニューロンの望ましい特徴に関するある特定の情報が含まれる、本開示の文脈において参照されるドーパミン作動性ニューロンに関する関連情報は、当該技術分野において公知である。本明細書に記載されるドーパミン作動性ニューロンに関する実施形態は、HIP細胞（例えば、MHCクラスI及び／またはMHCクラスII分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現ならび少なくとも1種の免疫寛容誘導因子の増強された発現を示す）を記載している実施形態、ならびに安全スイッチ、及び本明細書に記載されるような他の改変／遺伝子編集された細胞を記載している実施形態と容易かつ適切に組み合わせられ得ることが理解されよう。細胞療法製品に使用されるドーパミン作動性ニューロンは、細胞療法製品を製造する間の編集プロセスの任意の段階でドナー能力についてプロファイリングされ得る。

30

【1292】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるHIP細胞は、神経細胞幹細胞、神経細胞前駆細胞、未成熟ドーパミン作動性ニューロン、及び成熟ドーパミン作動性ニューロンが含まれる、ドーパミン作動性ニューロンに分化される。

40

【1293】

幾つかの例では、用語「ドーパミン作動性ニューロン」は、ドーパミン合成のための律速酵素であるチロシンヒドロキシラーゼ（TH）を発現する神経細胞を包含する。幾つかの実施形態では、ドーパミン作動性ニューロンは、神経伝達物質ドーパミンを分泌し、ドーパミンヒドロキシラーゼをほとんどまたはまったく発現しない。ドーパミン作動性（DA）ニューロンは、以下のマーカーのうちの1つ以上を発現し得る：ニューロン特異的エノラーゼ（NSE）、1-芳香族アミノ酸デカルボキシラーゼ、小胞モノアミン輸送体2

50

、ドーパミン輸送体、Nurr-1、及びドーパミン-2受容体（D2受容体）。ある特定の例では、用語「神経幹細胞」は、神経細胞経路に沿って部分的に分化しており、例えば、ネスチンが含まれる、1つ以上の神経マーカーを発現する多能性細胞の集団を包含する。神経幹細胞は、神経細胞またはグリア細胞（例えば、アストロサイト及びオリゴデンドロサイト）に分化され得る。用語「神経前駆細胞」は、FOX A2及び低レベルのb-チューブリンを発現するが、チロシンヒドロキシラーゼは発現しない培養細胞を包含する。かかる神経前駆細胞は、本明細書に記載されるものなどの適切な因子の培養時に、種々の神経細胞サブタイプ、例えば、種々のドーパミン作動性ニューロンサブタイプに分化する能力を有する。

【1294】

幾つかの実施形態では、HIP細胞に由来するDAニューロンは、神経変性疾患または状態を処置するために患者、例えば、ヒト患者に投与される。幾つかの例では、神経変性疾患または状態は、パーキンソン病、ハンチントン病、及び多発性硬化症からなる群から選択される。他の実施形態では、DAニューロンは、神経精神障害、例えば、注意欠陥多動性障害（ADHD）、トゥレット症候群（TS）、統合失調症、精神病、及びうつ病の1つ以上の症状を処置または改善するために使用される。更なる他の実施形態では、DAニューロンは、DAニューロンの障害を有する患者を処置するために使用される。

【1295】

幾つかの実施形態では、DAニューロン、その前駆体、及び前駆細胞は、1つ以上の因子または添加剤を含む培地中で幹細胞を培養することにより多能性幹細胞から分化される。DAニューロンの分化、成長、増殖、維持、及び／または成熟を促進する有用な因子及び添加剤としては、限定されるものではないが、Wnt1、FGF2、FGF8、FGF8a、ソニックヘッジホッグ（SHH）、脳由来神経栄養因子（BDNF）、トランスフォーミング増殖因子（TGF- α ）、TGF- β 、インターロイキン1 β 、グリア細胞株由来神経栄養因子（GDNF）、GSK-3阻害剤（例えば、CHIR-99021）、TGF- β 阻害剤（例えば、SB-431542）、B-27サプリメント、ドルソモルフィン、パルモルファミン、ノギン、レチノイン酸、cAMP、アスコルビン酸、ニューラルツリン、ノックアウト血清代替物、N-アセチルシステイン、c-kitリガンド、それらの改変形態、それらの模倣体、それらの類似体、及びそれらのバリエーションが挙げられる。幾つかの実施形態では、DAニューロンは、WNT経路、NOTCH経路、SHH経路、BMP経路、FGF経路などを活性化または阻害する1種以上の因子の存在下で分化される。分化プロトコール及びその詳細な説明は、例えば、US9,968,637、US7,674,620、Kim et al, Nature, 2002, 418, 50-56、Bjorklund et al, PNAS, 2002, 99(4), 2344-2349、Grow et al., Stem Cells Transl Med. 2016, 5(9):1133-44、及びCho et al, PNAS, 2008, 105:3392-3397において提供され、それらの開示は、実施例、方法、図、及び結果の詳細な説明を含め、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【1296】

幾つかの実施形態では、低免疫原性ドーパミン作動性ニューロンの集団は、非神経細胞から単離される。幾つかの実施形態では、低免疫原性ドーパミン作動性ニューロンの単離された集団は、投与前に増殖される。ある特定の実施形態では、低免疫原性ドーパミン作動性ニューロンの単離された集団は、投与前に増殖及び凍結保存される。

【1297】

DAの分化を特徴付け及びモニタリングするため、ならびにDAの表現型を評価するために、任意の数の分子マーカー及び遺伝子マーカーの発現が評価され得る。例えば、遺伝子マーカーの存在は、当業者に公知の種々の方法により決定され得る。分子マーカーの発現は、定量方法、例えば、限定されるものではないが、qPCRベースのアッセイ、免疫アッセイ、免疫細胞染色アッセイ、免疫プロットアッセイなどにより測定され得る。DAニューロンの例示的なマーカーとしては、限定されるものではないが、TH、b-チュー

10

20

30

40

50

プリン、ペアードボックスタンパク質 (Pax6)、インスリン遺伝子エンハンサータンパク質 (Isl1)、ネスチン、ジアミノベンジン (DAB)、Gタンパク質活性化内向き整流カリウムチャネル2 (GIRK2)、微小管関連タンパク質2 (MAP-2)、NURR1、ドーパミン輸送体 (DAT)、フォークヘッドボックスタンパク質A2 (FOX A2)、FOX3、ダブルコルチン、及び LIMホメオボックス転写因子1β (LMX1B)などが挙げられる。幾つかの実施形態では、DAニューロンは、コリン、FOX A2、TuJ1、NURR1、及びそれらの任意の組み合わせから選択されるマーカーのうちの1つ以上を発現する。

【1298】

幾つかの実施形態では、DAニューロンは、細胞の電気生理学的活性にとり評価される。細胞の電気生理学は、当業者に公知のアッセイを使用することにより評価され得る。例えば、全細胞及び穿孔パッチクランプ法、細胞の電気生理学的活性を検出するためのアッセイ、細胞の活動電位の大きさ及び持続時間を測定するためのアッセイ、ならびにDA細胞のドーパミン産生を検出するための機能アッセイ。

【1299】

幾つかの実施形態では、DAニューロン分化は、自発性の周期的活動電位、及び脱分極電流の注入時にスパイク頻度順応を示す高頻度活動電位を特徴とする。他の実施形態では、DA分化は、ドーパミンの産生を特徴とする。産生されるドーパミンのレベルは、それが最大振幅の半分に達した時点での活動電位の幅 (スパイク半値幅) を測定することにより算出される。

【1300】

幾つかの実施形態では、分化したDAニューロンは、静注または患者の特定の位置での注射のいずれかにより移植される。幾つかの実施形態では、分化したDA細胞は、パーキンソン病をもたらした変性を有するDAニューロンと置換するために、脳の黒質 (特に緻密部内にまたはその付近)、腹側被蓋野 (VTA)、尾状核、被殻、側坐核、視床下核、またはそれらの任意の組み合わせに移植される。分化したDA細胞は、細胞懸濁液として標的領域に注入され得る。代替的に、分化したDA細胞は、支持マトリックスまたは足場に埋め込まれ得る (このような送達デバイス内に収容される場合)。幾つかの実施形態では、足場は、生分解性である。他の実施形態では、足場は、生分解性ではない。足場は、天然または合成 (人工) 材料を含み得る。

【1301】

DAニューロンの送達は、好適なビヒクル、例えば、限定されるものではないが、リポソーム、微小粒子、またはマイクロカプセルを使用することにより達成され得る。他の実施形態では、分化したDAニューロンは、等張性賦形剤を含む医薬組成物として投与される。医薬組成物は、ヒトへの投与のために十分に滅菌された条件下で調製される。幾つかの実施形態では、HIP細胞から分化したDAニューロンは、医薬組成物の形態で供給される。細胞組成物の治療用製剤の一般原則は、Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy, G. Morstyn & W. Sheridan eds, Cambridge University Press, 1996、及び Hematopoietic Stem Cell Therapy, E. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000に見出され、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【1302】

幹細胞に由来する神経細胞及びその作製方法の有用な説明は、例えば、Kirkeby et al., Cell Rep, 2012, 1: 703-714、Kriks et al., Nature, 2011, 480: 547-551、Wang et al., Stem Cell Reports, 2018, 11 (1): 171-182、Lorenz Studer, "Chapter 8 - Strategies for Bringing Stem Cell-Derived Dopamine Neuron

10

20

30

40

50

s to the clinic—The NYSTEM Trial”, Progress in Brain Research, 2017, volume 230, pg. 191–212、Liu et al., Nat Protoc, 2013, 8:1670–1679、Upadhyay et al., Curr Protoc Stem Cell Biol, 38, 2D. 7. 1–2D. 7. 47、米国特許出願公開第20160115448号、ならびにUS8, 252, 586、US8, 273, 570、US9, 487, 752、及びUS10, 093, 897に見出され得、それらの内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【1303】

DAニューロンに加えて、他の神経細胞、その前駆体、及び前駆細胞は、1種以上の因子または添加剤を含む培地で細胞を培養することにより、本明細書に概説されるHIP細胞から分化され得る。因子及び添加剤の非限定的な例としては、GDNF、BDNF、GM-CSF、B27、塩基性FGF、塩基性EGF、NGF、CNTF、SMAD阻害剤、Wntアンタゴニスト、SHHシグナル伝達活性化剤、及びそれらの任意の組み合わせが挙げられる。幾つかの実施形態では、SMAD阻害剤は、SB431542、LDN-193189、ノギン、PD169316、SB203580、LY364947、A77-01、A-83-01、BMP4、GW788388、GW6604、SB-505124、レルデリムマブ、メテリムマブ、GC-I008、AP-12009、AP-110I4、LY550410、LY580276、LY364947、LY2109761、SB-505124、E-616452 (RepSox ALK阻害剤)、SD-208、SMI6、NPC-30345、K26894、SB-203580、SD-093、アクチビン-M108A、P144、可溶性TBR2-Fc、DMH-1、ドルソモルフィン二塩酸塩、及びそれらの誘導体からなる群から選択される。幾つかの実施形態では、Wntアンタゴニストは、XAV939、DKK1、DKK-2、DKK-3、DKK-4、SFRP-1、SFRP-2、SFRP-3、SFRP-4、SFRP-5、WIF-1、Soggy、IWP-2、IWR1、ICG-001、KY0211、Wnt-059、LGK974、IWP-L6、及びその誘導体からなる群から選択される。幾つかの実施形態では、SHHシグナル伝達活性化因子は、スムーズドアゴニスト (SAG)、SAG類似体、SHH、C25-SHH、C24-SHH、パルモルファミン、Hga、及び／またはそれらの誘導体からなる群から選択される。

【1304】

幾つかの実施形態では、神経細胞は、イオンチャネル型グルタミン酸受容体NMDA型サブユニット1 (GRIN1)、グルタミン酸デカルボキシラーゼ1 (GAD1)、γ-アミノ酪酸 (GABA)、チロシンヒドロキシラーゼ (TH)、LIMホメオボックス転写因子1-α (LMX1A)、フォークヘッドボックスタンパク質O1 (FOXO1)、フォークヘッドボックスタンパク質A2 (FOX A2)、フォークヘッドボックスタンパク質O4 (FOXO4)、FOXG1、2', 3'-環状ヌクレオチド3'-ホスホジエステラーゼ (CNP)、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP)、チューブリンβ鎖3 (TUB3)、チューブリンβ鎖3 (NEUN)、溶質輸送体ファミリー1メンバー6 (SLC1A6)、SST、PV、カルビンジン、RAX、LHX6、LHX8、DLX1、DLX2、DLX5、DLX6、SOX6、MAFB、NPAS1、ASCL1、SIX6、OLIG2、NKX2.1、NKX2.2、NKX6.2、VGLUT1、MAP2、CTIP2、SATB2、TBR1、DLX2、ASCL1、CHAT、NGFI-B、c-fos、CRF、RAX、POMC、ヒポクレチン、NADPH、NGF、ACh、VACHT、PAX6、EMX2p75、CORIN、TUJ1、NURR1、及び／またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択されるマーカーのうちの1つ以上を発現する。

【1305】

3) グリア細胞

細胞療法製品に使用されるグリア細胞は、細胞療法製品の製造プロセスの任意の段階で

ドナー能力についてプロファイリングされ得る。

【1306】

細胞療法製品に使用されるグリア細胞は、初代グリア細胞であり得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、（例えば、ゲノム編集された）初代グリア細胞で実行され得る。

【1307】

本明細書の他箇所で記載されるように、細胞療法製品に使用されるグリア細胞は、多能性幹細胞（iPSC）に由来するグリア細胞であり得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、分化して、グリア細胞を形成することができる幹細胞でも実行され得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、幹細胞に由来する（例えば、ゲノム編集された）グリア細胞でも実行され得る。

【1308】

細胞療法に使用される場合のグリア細胞の望ましい特徴に関するある特定の情報が含まれる、本開示の文脈において参照されるグリア細胞に関する関連情報は、当該技術分野において公知である。本明細書に記載されるグリア細胞に関する実施形態は、HIP細胞（例えば、MHCクラスI及び／またはMHCクラスII分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現ならび少なくとも1種の免疫寛容誘導因子の増強された発現を示す）を記載している実施形態、ならびに安全スイッチ、及び本明細書に記載されるような他の改変／遺伝子編集された細胞を記載している実施形態と容易かつ適切に組み合わせられ得ることが理解されよう。細胞療法製品に使用されるグリア細胞は、細胞療法製品を製造する間の編集プロセスの任意の段階でドナー能力についてプロファイリングされ得る。

【1309】

幾つかの実施形態では、記載される神経細胞としては、グリア細胞、例えば、限定されるものではないが、ミクログリア、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、上衣細胞、及びシュワン細胞、それらのグリア前駆体、及びグリア前駆細胞が挙げられ、多能性幹細胞を治療上有効なグリア細胞などに分化させることにより作製される。低免疫原性多能性幹細胞の分化は、低免疫原性グリア細胞などの低免疫原性神経細胞をもたらす。

【1310】

幾つかの実施形態では、グリア細胞、その前駆体、及び前駆細胞は、レチノイン酸、IL-34、M-CSF、FLT3リガンド、GM-CSF、CCL2、TGFβ阻害剤、BMPシグナル伝達阻害剤、SHHシグナル伝達活性化剤、FGF、血小板由来成長因子（PDGF）、PDGFR-α、HGF、IGF1、ノギン、SHH、ドルソモルフィン、ノギン、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される1つ以上の薬剤を含む培地で多能性幹細胞を培養することにより作製される。ある特定の例では、BMPシグナル伝達阻害剤は、LDN193189、SB431542、またはそれらの組み合わせである。幾つかの実施形態では、グリア細胞は、NKX2.2、PAX6、SOX10、脳由来神経栄養因子（BDNF）、ニューロトロフィン-3（NT-3）、NT-4、EGF、毛様体神経栄養因子（CNTF）、神経成長因子（NGF）、FGF8、EGFR、OLIG1、OLIG2、ミエリン塩基性タンパク質（MBP）、GAP-43、LNGFR、ネスチン、GFAP、CD11b、CD11c、CX3CR1、P2RY12、IBA-1、TMEM119、CD45、及びそれらの任意の組み合わせを発現する。例示的な分化培地は、当業者により理解されるように、グリア細胞種の生成を促進し得るか、または可能にし得る任意の特定の因子及び／または低分子を含み得る。

【1311】

インビトロ分化プロトコールに従って作製された細胞がグリア細胞の特性及び特徴を示すかどうかを決定するために、細胞は動物モデルに移植され得る。幾つかの実施形態では、グリア細胞は、免疫不全マウス、例えば、免疫不全シバラーマウスに注入される。グリア細胞は、マウスの脳に投与され、予め選択された一定時間後に、移植された細胞が評価

10

20

30

40

50

される。幾つかの例では、脳に移植された細胞は、免疫染色及びイメージング法を使用することにより可視化される。幾つかの実施形態では、グリア細胞が公知のグリア細胞バイオマーカーを発現することが決定される。

【1312】

幹細胞からグリア細胞、その前駆体、及び前駆細胞を作製するための有用な方法は、例えば、US 7, 579, 188、US 7, 595, 194、US 8, 263, 402、US 8, 206, 699、US 8, 252, 586、US 9, 193, 951、US 9, 862, 925、US 8, 227, 247、US 9, 709, 553、US 2018/0187148、US 2017/0198255、US 2017/0183627、US 2017/0182097、US 2017/253856、US 2018/0236004、WO 2017/172976、及びWO 2018/093681に見出される。多能性幹細胞を分化させるための方法は、例えば、Kikuchi et al., Nature, 2017, 548, 592-596、Kriks et al., Nature, 2011, 547-551、Doi et al., Stem Cell Reports, 2014, 2, 337-50、Perrier et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101, 12543-12548、Chambers et al., Nat Biotechnol, 2009, 27, 275-280、及びKirkeby et al., Cell Reports, 2012, 1, 703-714に記載されている。

10

【1313】

脊髄損傷に対する神経細胞移植の有効性は、例えば、McDonald, et al., Nat. Med., 1999, 5:1410)、及びKim, et al., Nature, 2002, 418:50により記載されるような急性脊髄損傷のラットモデルにおいて評価され得る。例えば、移植の成功は、2～5週間後の病変における移植由来の細胞の存在、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、及び／または神経細胞への分化、ならびに損傷端から脊髄に沿った移動、ならびに歩行、協調運動、及び体重負荷の改善を示し得る。具体的な動物モデルは、神経細胞種及び処置される神経系疾患または神経学的状態に基づいて選択される。

20

【1314】

神経細胞は、それらが意図される組織部位に生着し、機能的に欠損した領域を再構成または再生するのを可能にする様式で投与され得る。例えば、神経細胞は、処置される疾患に応じて、中枢神経系の実質部位または髄腔内部位に直接移植され得る。幾つかの実施形態では、脳血管内皮細胞、神経細胞、ドーパミン作動性ニューロン、上衣細胞、アストロサイト、ミクログリア細胞、オリゴデンドロサイト、及びシュワン細胞が含まれる、本明細書に記載される神経細胞のいずれかは、静脈内、脊髄内、脳室内、クモ膜下腔内、動脈内、筋肉内、腹腔内、皮下、筋肉内、腹部内、眼内、眼球後、及びそれらの組み合わせを介して患者に注射される。幾つかの実施形態では、細胞は、ボラス注射または持続注入の形態で注射または配置される。ある特定の実施形態では、神経細胞は、脳内への注射、脳への適切 (apposite) な注射、及びそれらの組み合わせにより投与される。注射は、例えば、対象の頭蓋に作られた穿頭孔を通してなされ得る。脳への神経細胞の投与に適した部位としては、限定されるものではないが、脳の脳室、側脳室、大槽、被殻、基底核、海馬皮質、線条体、尾状核領域、及びそれらの組み合わせが挙げられる。

30

40

【1315】

本技術に使用されるドーパミン作動性ニューロンが含まれる神経細胞の追加の説明は、WO 2020/018615 (その開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる) に見出される。

【1316】

本明細書において開示される細胞は、グリア細胞、例えば、グリア細胞の集団であり得る。下記での「細胞」、例えば、「グリア細胞」への任意の言及は、本出願に記載される「細胞集団」、例えば、「グリア細胞の集団」にも適用されることが理解されよう。本開

50

示の文脈におけるグリア細胞に関する関連情報は、WO2021195426（その内容は参照により本明細書に組み込まれる）に見出され得る。本明細書に記載されるグリア細胞に関する実施形態は、安全スイッチを記載している実施形態、ならびにHIP細胞、CAR細胞、及び本明細書に記載されるような他の改変／遺伝子編集された細胞を記載している実施形態と容易かつ適切に組み合わせられ得ることが理解されよう。

神経細胞を作製するための分化方法

【1317】

人工多能性幹細胞が含まれる、多能性幹細胞から異なる神経細胞種が分化され得る。神経細胞種は、必要に応じた対象へのその後の移植（transplantation）または移植（engraftment）に有用である。当業者によって理解されるように、分化の方法は、目的の細胞種に依存し、公知の技術を使用する。かかる方法の例は、WO2021195426（その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【1318】

幾つかの実施形態では、多能性幹細胞、例えば、人工多能性幹細胞の分化は、それらの分化を特定の目的の系列及び／または関心対象の細胞種に向けるように、細胞を特定の細胞系列（複数可）をもたらすことが公知の特定の因子に曝露させるか、またはそれと接触させることにより実行される。幾つかの実施形態では、終末分化した神経細胞は、特殊な表現型特徴または特性を示す。幾つかの実施形態では、多能性幹細胞は、神経外胚葉細胞、神経細胞、神経内分泌細胞、ドーパミン作動性ニューロン、コリン作動性ニューロン、セロトニン作動性ニューロン、グルタミン酸作動性ニューロン、GABA作動性ニューロン、アドレナリン作動性、ノルアドレナリン作動性ニューロン、交感神経細胞、副交感神経細胞、交感神経性末梢神経細胞、グリア細胞、それらの前駆細胞、またはそれらの前駆体に分化される。幾つかの実施形態では、グリア細胞としては、ミクログリア細胞（例えば、アミーバ状細胞、分枝型細胞、活性化貪食細胞、及び活性化非貪食細胞）または大グリア細胞（中枢神経系細胞：アストロサイト、オリゴデンドロサイト、上衣細胞、及び放射状グリア；ならびに末梢神経系細胞：シュワン細胞及び衛星細胞）、それらの前駆細胞、及び上記の細胞のいずれかの前駆体が挙げられる。

【1319】

幾つかの実施形態では、記載される神経細胞としては、グリア細胞、例えば、限定されるものではないが、ミクログリア、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、上衣細胞、及びシュワン細胞、グリア前駆細胞、ならびにそれらのグリア前駆体が挙げられ、多能性幹細胞を治療上有効なグリア細胞などに分化させることにより作製される。

【1320】

神経細胞は、幹細胞から誘導され得、次いで、神経障害及び神経学的状態を処置するために使用され得る。神経細胞種は、限定されるものではないが、多能性幹細胞、人工多能性幹細胞（iPSC）などが含まれる、他の非神経細胞種から作製され得る。かかる細胞を取得する方法は、例えば、WO2021195426（その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【1321】

細胞療法に使用される場合のグリア細胞の幾つかの望ましい特徴が本明細書に記載される。

【1322】

幾つかの実施形態では、グリア細胞は、NKX2.2、PAX6、SOX10、脳由来神経栄養因子（BDNF）、ニューロトロフィン-3（NT-3）、NT-4、上皮成長因子（EGF）、毛様体神経栄養因子（CNTF）、神経成長因子（NGF）、FGF8、EGFR、OLIG1、OLIG2、ミエリン塩基性タンパク質（MBP）、GAP-43、LNGFR、ネスチン、GFAP、CD11b、CD11c、CD105、CX3CR1、P2RY12、IBA-1、TMEM119、CD45、及びそれらの任意の組み合わせを発現する。これらの例示的なマーカーのいずれかが、本明細書に記載されるグ

リア細胞を特徴付けるために使用され得る。グリア細胞分化をモニタリングするため、及びグリア細胞の表現型を評価するために、グリア細胞及びその前駆細胞に特異的な任意の数の分子マーカー及び遺伝子マーカーの発現が評価され得る。例えば、遺伝子マーカーの存在は、当業者に公知の様々な方法により測定され得る。分子マーカーの発現は、定量方法、例えば、限定されるものではないが、qPCRベースのアッセイ、RNA-seqアッセイ、プロテオミクスアッセイ、免疫アッセイ、免疫細胞染色アッセイ、免疫プロットアッセイなどにより測定され得る。

【1323】

幾つかの実施形態では、オリゴデンドロサイト、アストロサイト、及びそれらの前駆細胞が含まれる、グリア細胞は、A2B5、CD9、CD133、CD140a、FOXG1、GalC、GD3、GFAP、ネスチン、NG2、MBP、Musashi、O4、Olig1、Olig2、PDGFR、S100P、グルタミンシンセターゼ、コネキシン43、ビメンチン、BLBP、GLASTなどから選択されるマーカーのうちの1つ以上を発現する。幾つかの実施形態では、オリゴデンドロサイト、アストロサイト、及びそれらの前駆細胞が含まれる、グリア細胞は、PSA-NCAM、CD9、CD11、CD32、CD36、CD105、CD140a、ネスチン、PDGFRなどから選択されるマーカーのうちの1つ以上を発現しない。幾つかの実施形態では、グリア細胞は、ポジティブセクション法、ネガティブセクション法、またはその両方を使用して選別または精製される。

【1324】

幾つかの実施形態では、グリア細胞は、免疫細胞染色及び免疫組織染色により決定される形態によって特徴付けられる。幾つかの実施形態では、グリア細胞は、例えば、限定されるものではないが、神経細胞共培養アッセイ、リポ多糖(LPS)による刺激アッセイ、インビトロ髄鞘形成アッセイ、カルシウム波振動によるATP流入アッセイなどの機能的特徴付けアッセイにより評価される。

【1325】

幾つかの実施形態では、グリア細胞が細胞特異的な特徴及び特性を示すことを判定するために、細胞が動物モデルに移植され得る。幾つかの実施形態では、グリア細胞は、免疫不全マウス、例えば、免疫不全シバラーマウスに注入される。グリア細胞は、マウスの脳に投与され、事前に選択した期間後に移植された細胞が評価される。幾つかの実施形態では、脳に移植された細胞は、免疫染色及びイメージング法を使用して可視化される。幾つかの実施形態では、移植された細胞における公知のグリア細胞バイオマーカーの発現が測定され得る。

【1326】

異なる種類の神経細胞を作製するためのプロトコールは、PCT出願第WO2010144696号、米国特許第9,057,053号、同第9,376,664号、及び同第10,233,422号に記載されている。低免疫原性多能性細胞を分化させるための方法の追加の説明は、例えば、Deuse et al., Nature Biotechnology, 2019, 37, 252-258、及びHan et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(21), 10441-10446に見出され得る。

【1327】

幾つかの実施形態では、グリア細胞、その前駆細胞及び前駆体は、レチノイン酸、IL-34、M-CSF、FLT3リガンド、GM-CSF、CCL2、TGFβ阻害剤、BMPシグナル伝達阻害剤、SHHシグナル伝達活性化剤、FGF、血小板由来成長因子(PDGF)、PDGFR-α、HGF、IGF-1、ノギン、ソニックヘッジホッグ(SHH)、ドルソモルフィン、ノギン、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される1つ以上の薬剤を含む培地で多能性幹細胞を培養することにより作製される。ある特定の例では、BMPシグナル伝達阻害剤は、LDN193189、SB431542、またはそれらの組み合わせである。例示的な分化培地は、当業者により理解されるように

、グリア細胞種の生成を促進し得るか、または可能にし得る任意の特定の因子及び／または低分子を含み得る。

【1328】

幾つかの実施形態では、多能性幹細胞の分化は、細胞をグリア細胞、例えば、ミクログリア細胞（例えば、アメーバ状細胞、分枝型細胞、活性化貪食細胞、及び活性化非貪食細胞）、大グリア細胞（例えば、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、上衣細胞、放射状グリア、シュワン細胞、及び衛星細胞）、それらの前駆細胞、及びそれらの前駆細胞をもたらすことが公知の特定の因子に曝露させるか、またはそれと接触させることにより実行される。幹細胞からグリア細胞、その前駆細胞及び前駆体を作製するの有用な方法は、例えば、米国特許第7,579,188号；同第7,595,194号；同第8,263,402号；同第8,206,699号；同第8,227,247号；同第8,252,586号；同第9,193,951号；同第9,709,553号；及び同第9,862,925号；ならびに米国特許出願公開第2018/0187148号；同第2017/0198255号；同第2017/0183627号；同第2017/0182097号；同第2017/253856号；同第2018/0236004号；ならびにPCT出願公開第WO2017/172976号及び同第WO2018/093681号に見出される。

10

【1329】

本明細書に記載されるグリア細胞は、対象の疾患を処置または予防するために使用され得る。

20

【1330】

本明細書に記載されるグリア細胞は、様々な神経障害及び神経学的状態を処置するために使用され得る。

【1331】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるグリア細胞は、脳卒中を改善または処置するために対象に投与される。幾つかの実施形態では、グリア細胞は、脳卒中を経験した対象に投与される。

【1332】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるグリア細胞は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）の症状または影響を軽減するために対象に投与される。幾つかの実施形態では、グリア細胞は、ALSを有する対象に投与される。

30

【1333】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるグリア細胞は、脳出血の症状または影響を軽減するために対象に投与される。幾つかの実施形態では、グリア細胞は、脳出血を経験した対象に投与される。

【1334】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるグリア細胞は、パーキンソン病の症状または影響を軽減するために対象に投与される。幾つかの実施形態では、グリア細胞は、パーキンソン病を有する患者に投与される。

【1335】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるグリア細胞は、てんかん発作の症状または影響を軽減するために対象に投与される。幾つかの実施形態では、グリア細胞は、てんかん発作を経験した患者に投与される。

40

【1336】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるグリア細胞は、脊髄損傷の症状または影響を軽減するために対象に投与される。幾つかの実施形態では、グリア細胞は、脊髄損傷を経験した患者に投与される。

【1337】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるグリア細胞は、ペリツェウス・メルツバッハー病の症状または影響を軽減するために対象に投与される。幾つかの実施形態では、

50

グリア細胞は、ペリツェウス・メルツバッハー病を有する対象に投与される。

【1338】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるグリア細胞は、進行性多発性硬化症の症状または影響を軽減するために対象に投与される。幾つかの実施形態では、グリア細胞は、進行性多発性硬化症を有する対象に投与される。

【1339】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるグリア細胞は、ハンチントン病の症状または影響を軽減するために対象に投与される。幾つかの実施形態では、グリア細胞は、ハンチントン病を有する対象に投与される。

i. マクロファージ

【1340】

細胞療法製品に使用されるマクロファージは、細胞療法製品の製造プロセスの任意の段階でドナー能力についてプロファイリングされ得る。

【1341】

細胞療法製品に使用されるマクロファージは、初代マクロファージであり得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、（例えば、ゲノム編集された）初代マクロファージで実行され得る。

【1342】

細胞療法製品に使用されるマクロファージは、多能性幹細胞（iPSC）に由来するマクロファージであり得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、分化して、マクロファージを形成することができる幹細胞でも実行され得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、幹細胞に由来する（例えば、ゲノム編集された）マクロファージでも実行され得る。

【1343】

細胞療法に使用される場合のマクロファージの望ましい特徴に関する情報が含まれる、本開示の文脈において参照されるマクロファージに関する関連情報は、当該技術分野において公知であり、例えば、WO2017019848（その内容は参照により本明細書に組み込まれる）に見出され得る。本明細書に記載されるマクロファージに関する実施形態は、HIP細胞（例えば、MHCクラスI及び／またはMHCクラスII分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現ならび少なくとも1種の免疫寛容誘導因子の増強された発現を示す）を記載している実施形態、ならびに安全スイッチ、及び本明細書に記載されるような他の改変／遺伝子編集された（例えば、CAR導入遺伝子で編集された）細胞を記載している実施形態と容易かつ適切に組み合わせられ得ることが理解されよう。細胞療法製品に使用されるマクロファージは、細胞療法製品を製造する間の編集プロセスの任意の段階でドナー能力についてプロファイリングされ得る。

【1344】

本明細書に記載されるマクロファージは、対象の疾患を処置または予防するために使用され得る。

【1345】

実施形態で使用される細胞は、マクロファージまたは他の貪食細胞、例えば、マクロファージの集団であり得る。下記での「細胞」、例えば、「マクロファージ」への任意の言及は、本出願に記載される「細胞集団」、例えば、「マクロファージの集団」にも適用されることが理解されよう。

【1346】

貪食細胞、例えば、単球、マクロファージ、及び／または樹状細胞は、（例えば、WO2017019848A1（その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるように）対象から採取され得る。対象の非限定的な例としては、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、及びそれらのトランスジェニック種が挙げられる。好ましくは

10

20

30

40

50

、対象は、ヒトである。T細胞は、末梢血単核細胞、骨髄、リンパ節組織、脾臓組織、臍帯、及び腫瘍が含まれる、多数の供給源から取得され得る。幾つかの実施形態では、当該技術分野において利用可能な多数の単球株、マクロファージ株、樹状細胞株、または前駆細胞株が使用され得る。幾つかの実施形態では、細胞は、当業者に公知の多数の技術、例えば、F I C O L L分離を使用して、対象から採取された血液単位から取得され得る。幾つかの実施形態では、個体の循環血液由来の細胞がアフエーシスまたは白血球アフエーシスにより取得される。アフエーシス生成物は、通常、T細胞、単球、顆粒球、B細胞が含まれるリンパ球、他の有核白血球、赤血球、及び血小板を含有する。アフエーシスにより採取された細胞は、その後の処理ステップのため、血漿分画を除去するために、及び細胞を適切な緩衝液または培地、例えば、リン酸緩衝食塩水（P B S）、またはカルシウムを欠き、マグネシウムを欠き得るか、もしくは全てではないにしろ多数の二価カチオンを欠き得る洗浄溶液中に入れるために洗浄され得る。洗浄後、細胞は、例えば、Ca²⁺非含有、Mg²⁺非含有のP B Sなどの種々の生体適合性の緩衝剤中に再懸濁され得る。あるいは、アフエーシス試料の望ましくない成分が除去され得、細胞が培養培地中に直接再懸濁され得る。

10

【1347】

幾つかの実施形態では、細胞は、赤血球を溶解し、リンパ球及び赤血球を枯渇させることによって、例えば、P E R C O L L（商標）勾配遠心分離によって、末梢血から単離される。あるいは、細胞は、臍帯から単離され得る。いずれの場合も、単球、マクロファージ、及び／または樹状細胞の特定の亜集団は、ポジティブまたはネガティブセレクション技術により更に単離され得る。

20

【1348】

幾つかの実施形態では、細胞集団は、単球、マクロファージ、または樹状細胞を含む。細胞集団の例としては、限定されるものではないが、末梢血単核細胞、臍帯血細胞、単球、マクロファージ、または樹状細胞の精製された集団、及び細胞株が挙げられる。幾つかの実施形態では、末梢血単核細胞は、単球、マクロファージ、または樹状細胞の集団を含む。幾つかの実施形態では、精製された細胞は、単球、マクロファージ、または樹状細胞の集団を含む。

【1349】

細胞療法に使用される場合のマクロファージの幾つかの望ましい特徴が本明細書に記載される。

30

【1350】

幾つかの実施形態では、細胞は、上方調節されたM1マーカー及び下方調節されたM2マーカーを有する。例えば、少なくとも1つのM1マーカー、例えば、H L A D R、C D 8 6、C D 8 0、及びP D L 1が貪食細胞において上方調節されている。別の例では、（例えば、W O 2 0 1 7 0 1 9 8 4 8 A 1（その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるように）少なくとも1つのM2マーカー、例えば、C D 2 0 6、C D 1 6 3が貪食細胞において下方調節されている。幾つかの実施形態では、細胞は、少なくとも1つの上方調節されたM1マーカー及び少なくとも1つの下方調節されたM2マーカーを有する。

40

【1351】

幾つかの実施形態では、貪食細胞の標的化エフェクター活性が、C D 4 7またはS I R P a活性の阻害により増強される。C D 4 7及び／またはS I R P a活性は、貪食細胞を抗C D 4 7または抗S I R P a抗体で処理することにより阻害され得る。あるいは、C D 4 7またはS I R P a活性は、当業者に公知の任意の方法により阻害され得る。

【1352】

マクロファージは、W O 2 0 1 7 0 1 9 8 4 8 A 1（その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるように、以下の例示的な方法により取得され得る。

【1353】

50

WO2017019848A1記載されるような細胞培養：THP1、K562、SKOV3、SKBR3、HDL M2、MD468、及び全ての細胞株が、10%のウシ胎児血清及びペニシリン／ストレプトマイシンを補足したRPMI1640で37度、5%CO₂にて培養され得る。THP1 mRFP+細胞亜株(Wt)が、レンチウイルス形質導入及びmRFP+細胞株のFACS精製により作製され得る。THP1 mRFP+細胞亜株は、THP1 mRFP+ CAR19z+ (CAR19z; CARMA19z)、THP1 mRFP+ CAR19Az+ (CAR19Az; CARMA19Az)、THP1 mRFP+ MesoZ+、及びTHP1 mRFP+ CARHer2z+ (CARHer2z; CARMAHer2z)細胞亜株を作製するために使用され得る。単球分化は、培養培地中1ng/mLのホルボール12-ミリスレート13-アセテートを用いて細胞を48時間培養することにより誘導され得る。

10

【1354】

WO2017019848A1記載されるような初代ヒトマクロファージ：初代ヒト単球は、Miltenyi CD14 MicroBeads (Miltenyi、130-050-201)を使用して正常ドナーのアフェレーシス産物から精製され得る。単球は、5%ヒトAB血清を補足したX-Vivo培地または10%ウシ胎児血清を補足したRPMI1640で、ペニシリン／ストレプトマイシン、グルタマックス、及び10ng/mLの組換えヒトGM-CSF (PeproTech、300-03)と共に、MACS GMP Cell Differentiation Bags (Miltenyi、170-076-400)内で7日間培養され得る。マクロファージは、7日目に採取され得、その後の使用までFBS+10%DMSO中で凍結保存され得る。

20

【1355】

WO2017019848A1に記載されるような貪食アッセイ：WtまたはCARMA mRFP+ THP1細胞亜株が、1ng/mLホルボール12-ミリスレート13-アセテートにより48時間かけて分化され得る。GFP+抗原担持腫瘍細胞亜株、すなわちK562 CD19+ GFP+細胞が、分化したTHP1マクロファージに、PMA洗い流し後に1:1の比率で添加され得る。マクロファージが標的腫瘍細胞と4時間共培養され得、食作用がEVOS FL Auto Cell Imaging Systemを使用して蛍光顕微鏡により定量された。3つの視野の平均がnとみなされ得、全ての条件について三重反復で定量され得る。FACSに基づく食作用は、BD LSR-Fortessaで分析され得る。FlowJo (TreeStar, Inc.)を用いてフローサイトメトリーデータが解析され得る。生細胞、シングレットでゲートされたmRFP/GFP二重陽性イベントが食作用とみなされ得る。CD47/SIRPα軸の遮断は、共培養の開始時にモノクローナル遮断抗体(マウス抗ヒトCD47クローンB6H12、eBioscience #14-0479-82; 陰性対照としてのマウス抗ヒトCD47クローン2D3、eBioscience #14-0478-82; マウス抗ヒトSIRPαクローンSE5A5、BioLegend #323802)を示される濃度で添加することにより実行され得る。TLR共刺激は、TLR1~9アゴニスト(ヒトTLR1~9アゴニストキット; Invivogen #tlrl-kitt1hw)を共培養の際に添加することにより実行され得る。

30

40

【1356】

WO2017019848A1に記載されるようなインビトロ殺傷アッセイ：WtマクロファージまたはCAR担持マクロファージが、抗原を担持するか、または対照のコメツキムシ緑色ルシフェラーゼ(CBG)/緑色蛍光性タンパク質(GFP)陽性標的腫瘍細胞と、様々なエフェクター対標的比率(30:1から開始し、3倍希釈で減少させる)で共培養され得る。腫瘍量を決定するために、IVIS Spectrum Imaging System (Perkin Elmer)を使用した生物発光イメージングが利用され得る。特異的溶解パーセントは以下の通りに算出された：特異的溶解% = ((処置したウェル-腫瘍のみのウェル) / (最大減少量-腫瘍のみのウェル) * 100)

【1357】

50

WO2017019848A1に記載されるようなタイムラプス顕微鏡検査：CAR媒介性食作用の蛍光性タイムラプスビデオ顕微鏡検査は、EVOS FL Auto Cell Imaging Systemを使用して実行され得る。画像は18時間にわたって40秒毎に取得され得る。画像解析はFII画像処理ソフトウェアを使用して実行された。

【1358】

WO2017019848A1に記載されるようなレンチウイルス作製及び形質移入：キメラ抗原受容体構築物が、GeneArt (Life Technologies)により新規合成され、以前に記載されたようにレンチウイルスベクターにクローニングされ得る。濃縮レンチウイルスは、以前に記載されたようにHEK293T細胞を使用して作製され得る。

10

【1359】

WO2017019848A1に記載されるようなアデノウイルス作製及び形質移入：CMVプロモーター下でGFP、CARをコードするか、または導入遺伝子をコードしないAd5f35キメラアデノウイルスベクターが作製され得、標準的な分子生物学的方法に従って力価測定され得る。初代ヒトマクロファージに対して異なる感染多重度で形質導入され得、EVOS FL Auto Cell Imaging Systemを使用してGFP発現及び生存率に関して継続的に撮像され得る。CAR発現は、Hisタグ標識抗原及び抗His-APC二次抗体 (R&D Biosystems、クローンAD1.1.10)を使用して表面CAR発現のFACS分析により評価され得る。

20

【1360】

WO2017019848A1に記載されるようなフローサイトメトリー：FACSは、BD LSR Fortessaで実行され得る。表面CAR発現は、ビオチン化タンパク質L (GenScript M00097)及びストレプトアビジンAPC (BioLegend、#405207)、またはHisタグ標識抗原及び抗His-APC二次抗体 (R&D Biosystems、クローンAD1.1.10)を用いて評価され得る。Fc受容体は、染色前にHuman TruStain FcX (BioLegend、#422301)によりブロックされ得る。CD47発現は、マウス抗ヒトCD47 APC (eBioscience #17-0479-41)を、バックグラウンド測定のためのマウスIgG1κAPCアイソタイプ対照と共に使用して測定され得る。カルレチキュリン発現は、マウス抗カルレチキュリン-PE クローンFMC75 (Abcam #ab83220)を用いて測定され得る。全てのフローサイトメトリーの結果について、単一生細胞でゲーティングされ得る (Live/Dead Aqua Fixable Dead Cell Stain、Life Technologies L34957)。

30

【1361】

WO2017019848A1に記載されるようなイメージストリームフローサイトメトリー：単一細胞蛍光イメージングによるFACSは、ImageStream Mark IIイメージングフローサイトメーター (EMD Millipore)で実行され得る。要約すると、mRFP+マクロファージまたはDiIで染色されたマクロファージ (CARまたは対照)が、GFP+腫瘍細胞と4時間共培養され得、その後に固定及びImageStreamによるデータ収集が行われる。データはImageStreamソフトウェア (EMD Millipore)を使用して解析され得る。

40

【1362】

WO2017019848A1に記載されるようなRNAエレクトロポレーション：標準的な分子生物学技術を使用して、CAR構築物が、インビトロ転写プラスミドのT7プロモーターの制御下にクローニングされ得る。CAR mRNAが、mMessage mMachine T7 Ultraインビトロ転写キット (Thermo Fisher)を使用してインビトロで転写され得、RNeasy RNA精製キット (Qiagen)を使用して精製され得、BTX ECM850エレクトロポレーター (BTX Ha

50

r v a r d A p p a r a t u s) を使用して電気穿孔によりヒトマクロファージに導入され得る。CAR発現は、エレクトロポレーション後の様々な時点でFACS分析を使用して分析され得る。

【1363】

WO2017019848A1に記載されるようなTLR／デクチン-1を介したプライミング：インビトロ食作用アッセイまたは殺傷アッセイの前に、WtマクロファージまたはCARマクロファージのTLRまたはデクチン-1を介したプライミングが、共培養前に細胞を、それぞれ推奨用量のTLR 1～9アゴニスト (Human TLR1-9 Agonist Kit、Invivogen) またはβ-グルカン (MP Biomedicals、LLC) と共に30分間ブレインキュベートすることにより実行され得る。WtマクロファージまたはCARマクロファージのインビトロでの機能が、初回刺激を受けていない条件と初回刺激を受けた条件との間で比較され得る。

10

【1364】

WO2017019848A1に記載されるようなマクロファージ／単球表現型：M1／M2の識別のために、以下の表面マーカーが、マクロファージ／単球免疫表現型FACSパネルの一部として評価され得る：CD80、CD86、CD163、CD206、CD11B、HLA-DR、HLA-A／B／C、PD-L1、及びPD-L2 (BioLegend)。免疫染色前のFc受容体遮断のために、TruStain FcXが使用され得る。表現型評価の前に、マクロファージ／単球は、活性化条件（すなわち、48時間のAd5f35形質導入）に曝露されてもよく、またはされなくてもよい。

20

【1365】

WO2017019848A1に記載されるようなSeahorseアッセイ：マクロファージの代謝表現型及び酸素消費は、Seahorseアッセイ (Seahorse XF、Agilent) を使用して決定され得る。分析前に、対照マクロファージまたはCARマクロファージは、対照培地または免疫抑制サイトカインに24時間曝露され得る。Seahorseアッセイの全体を通して、細胞は、オリゴマイシン、FCCP、及びロテノンで逐次的に処理され得る。アッセイは各条件毎に6回反復して実行された。

【1366】

WO2017019848A1に記載されるようなインビボアッセイ：NOD-scid IL2R γ -null IL3／GM／SF、NSG-SGM3 (NSGS) マウスがヒト異種移植モデルに使用され得る。CBG-ルシフェラーゼ陽性ヒトSKOV3卵巣癌細胞を生着させたマウスは、無処置のままにされたか、または非形質導入ヒトマクロファージ、空のAd5f35が形質導入されたヒトマクロファージ、もしくはAd5f35 CAR-HER2が形質導入されたヒトマクロファージを種々の用量で投与された。腫瘍量をモニタリングするために、継続的な生物発光イメージングが実行され得る (IVIS Spectrum、Perkin Elmer)。FACS分析のために器官及び腫瘍が殺後に採取され得る。全生存率がモニタリングされ得、カプラン・マイヤー分析を使用して比較され得る。

30

【1367】

本明細書に記載されるマクロファージは、対象の疾患を処置または予防するために使用され得る。

40

【1368】

幾つかの実施形態では、疾患は、自己免疫疾患である。本明細書で使用する場合、用語「自己免疫疾患」は、自己免疫応答に起因する障害と定義される。自己免疫疾患は、自己抗原に対する不適当かつ過剰な応答の結果である。自己免疫疾患の例としては、限定されるものではないが、とりわけ、アジソン病、円形脱毛症、強直性脊椎炎、自己免疫性肝炎、自己免疫性耳下腺炎、クローン病、糖尿病 (I型)、栄養障害型表皮水疱症、精巣上体炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、橋本病、溶血性貧血、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、乾癬、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、脊椎関節症、甲状腺炎、血

50

管炎、白斑、粘液水腫、悪性貧血、潰瘍性大腸炎が挙げられる。

【1369】

自己免疫疾患の例としては、限定されるものではないが、後天性免疫不全症候群（AIDS（これは自己免疫要素によるウイルス疾患である））、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質抗体症候群、自己免疫性アジソン病、自己免疫溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性内耳疾患（AIED）、自己免疫性リンパ球増殖性症候群（ALPS）、自己免疫性血小板減少性紫斑病（ATP）、ベーチェット病、心筋症、セリアックスブルー・疱疹状皮膚炎、慢性疲労免疫機能不全症候群（CFIDS）、慢性炎症性脱髄性多発神経炎（CIPD）、瘢痕性類天疱瘡、寒冷凝集素症、クレスト症候群、クローン病、デゴス病、若年性皮膚筋炎、円板状ループス、本態性混合型クリオグロブリン血症、線維筋痛・線維筋炎、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、IgA腎症、インスリン依存型糖尿病、若年性慢性関節炎（スティル病）、若年性関節リウマチ、メニエール病、混合性結合組織病、多発性硬化症、重症筋無力症、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎及び皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症（進行性全身性硬化症（PSS）、全身性硬化症（SS）としても公知）、シェーグレン症候群、スティフマン症候群、全身性エリテマトーデス、高安動脈炎、側頭動脈炎／巨細胞性動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、白斑ならびにウェゲナー肉芽腫症が挙げられる。

10

20

【1370】

本明細書に記載されるマクロファージは、炎症性疾患を処置するためにも使用され得る。炎症性疾患の例としては、限定されるものではないが、慢性及び急性炎症性疾患が挙げられる。炎症性疾患の例としては、アルツハイマー病、喘息、アトピー性アレルギー、アレルギー、アテローム硬化症、気管支喘息、湿疹、糸球体腎炎、移植片対宿主病、溶血性貧血、変形性関節炎、敗血症、脳卒中、組織及び器官の移植、血管炎、糖尿病性網膜症、ならびに人工呼吸器関連肺損傷が挙げられる。

【1371】

幾つかの実施形態では、疾患は、がんである。本明細書に記載されるマクロファージは、がんを処置するためにも使用され得る。がんとしては、血管新生していないか、または実質的にまだ血管新生していない腫瘍、及び血管新生した腫瘍が挙げられる。がんは、非固形腫瘍（例えば、血液系腫瘍、例えば、白血病及びリンパ腫）を含み得るか、または固形腫瘍を含み得る。本明細書において開示される細胞により処置されるがんの種類としては、限定されるものではないが、がん腫、芽細胞腫、及び肉腫、ならびにある特定の白血病またはリンパ系腫瘍、良性及び悪性腫瘍、ならびに悪性疾患、例えば、肉腫、がん腫、及び黒色腫が挙げられる。成人腫瘍／がん及び小児腫瘍／がんも含まれる。

30

【1372】

固形腫瘍は、嚢胞または液体領域を通常有さない異常な組織塊である。固形腫瘍は良性または悪性であり得る。種々の種類の固形腫瘍が、固形腫瘍を形成する細胞種にちなんで名付けられる（例えば、肉腫、がん腫、及びリンパ腫）。

40

【1373】

固形腫瘍、例えば、肉腫及びがん腫の例としては、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、及び他の肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、リンパ系腫瘍、膵臓癌、乳癌、肺癌、卵巣癌、前立腺癌、肝細胞癌、扁平上皮細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭癌、褐色細胞腫、脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、髄様癌、気管支原性肺癌、腎細胞癌、肝臓癌、胆管癌、絨毛癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、精上皮腫、膀胱癌、黒色腫、及びCNS腫瘍（例えば、神経膠腫（例えば、脳幹神経膠腫及び混合性神経膠腫）、神経膠芽腫（多形神経膠芽腫としても公知）、星細胞腫、CNSリンパ腫、胚細胞腫、髄芽腫、シュワン細胞腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、神

50

経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、及び脳転移）が挙げられる。

【1374】

血液癌は、血液または骨髄のがんである。血液癌（または造血性癌）の例としては、急性白血病（例えば、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病、急性顆粒球性白血病、及び骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単核球性、ならびに赤白血病）、慢性白血病（例えば、慢性骨髄性（顆粒球性）白血病、慢性ミエロイド性白血病、及び慢性リンパ球性白血病）、真正多血症、リンパ腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫（低悪性度型及び高悪性度型）、多発性骨髄腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、重鎖病、骨髄異形成症候群、毛様細胞性白血病、及び脊髄形成異常症が含まれる、白血病が挙げられる。

10

【1375】

種々のがんの更なる例としては、限定されるものではないが、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、皮膚癌、膵臓癌、結腸直腸癌、腎臓癌、肝臓癌、脳癌、リンパ腫、白血病、肺癌などが挙げられる。幾つかの実施形態では、がんは、甲状腺髄様癌である。

j. B細胞

【1376】

細胞療法製品に使用されるB細胞は、細胞療法製品の製造プロセスの任意の段階でドナー能力についてプロファイリングされ得る。

【1377】

細胞療法製品に使用されるB細胞は、初代B細胞であり得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、（例えば、ゲノム編集された）初代B細胞で実行され得る。

20

【1378】

本明細書その他箇所で記載されるように、細胞療法製品に使用されるB細胞は、多能性幹細胞（iPSC）に由来するB細胞であり得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、分化して、B細胞を形成することができる幹細胞でも実行され得る。本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、幹細胞に由来する（例えば、ゲノム編集された）B細胞でも実行され得る。

【1379】

細胞療法に使用される場合のB細胞の望ましい特徴に関するある特定の情報が含まれる、本開示の文脈において参照されるB細胞に関する関連情報は、当該技術分野において公知であり、例えば、US2019321403A1（その内容は参照により本明細書に組み込まれる）に見出され得る。本明細書に記載されるB細胞に関する実施形態は、HIP細胞（例えば、MHCクラスI及び／またはMHCクラスII分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現ならびに少なくとも1種の免疫寛容誘導因子の増強された発現を示す）を記載している実施形態、ならびに安全スイッチ、及び本明細書に記載されるような他の改変／遺伝子編集された（例えば、CAR導入遺伝子で編集された）細胞を記載している実施形態と容易かつ適切に組み合わせられ得ることが理解されよう。細胞療法製品に使用されるB細胞は、細胞療法製品を製造する間の編集プロセスの任意の段階でドナー能力についてプロファイリングされ得る。

30

【1380】

本明細書に記載されるB細胞は、対象の疾患を処置または予防するために使用され得る。

40

【1381】

本明細書において開示される細胞は、B細胞、例えば、B細胞の集団であり得る。下記での「細胞」、例えば、「B細胞」への任意の言及は、本出願に記載される「細胞集団」、例えば、「B細胞の集団」にも適用されることが理解されよう。

【1382】

B細胞のサブタイプ及び亜集団には、前駆B細胞または未成熟B細胞、ナイーブ成熟B

50

細胞、メモリーB細胞、形質芽細胞、及び形質細胞がある。前駆B細胞または未成熟B細胞としては、HSC、多能性前駆（MPP）細胞、リンパ球系共通前駆細胞（CLP）、初期プロB細胞、後期プロB細胞、大型プレB細胞、小型プレB細胞、未成熟B細胞、T1 B細胞、及びT2 B細胞（例えば、US2019321403A1（その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている）が挙げられる。

【1383】

B細胞またはB細胞の集団を取得する方法は、当技術分野において公知である（例えば、US2019321403A1（その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている）。HSCの分泌性Bリンパ球及び形質細胞へのインビトロ成熟のための様々な技術が公知である（例えば、Luo, X. M., et al. (2009). Blood, 113(7), 1422-1431を参照のこと）。

【1384】

例えば、US2019321403A1に記載されるように、使用される出発細胞集団は、多数の供給源に由来し得る。出発細胞集団は、PBMCもしくは他の血液試料、扁桃腺、骨髓またはB細胞が存在する他の同様の調製物に由来し得る。幾つかの実施形態では、出発細胞集団としては、バルク（選別されていない）B細胞または特定のB細胞サブセット、例えば、成熟B細胞、未成熟B細胞、メモリーB細胞、ナイーブB細胞、もしくは他のB細胞サブセットが挙げられ得る。幾つかの実施形態では、出発細胞集団は、B細胞に分化することができる前駆細胞、例えば、造血幹細胞（HSC）を含み得る。処置される対象によって、出発細胞は、同種異系及び／または自家であり得る。方法の中には、市販品による方法が含まれる。幾つかの態様では、例えば、市販品による技術では、出発細胞は、多能性及び／または、多分化能性、例えば、人工多能性幹細胞（iPSC）などの幹細胞である。幾つかの実施形態では、本発明の方法は、対象から細胞を単離すること、本明細書に記載されるようにそれらを調製、処理、培養、及び／または遺伝子操作すること、ならびに凍結保存の前または後にそれらを同じ患者に再度導入することを含む。

【1385】

細胞療法に使用される場合のB細胞の幾つかの望ましい特徴が本明細書に記載される。

【1386】

幾つかの実施形態では、B細胞集団のうちの1つ以上は、1つ以上の特定のマーカー、例えば、表面マーカーについて陽性である（マーカー+）か、もしくはそれを高レベルで発現する（マーカーhigh）か、または1つ以上のマーカーについて陰性である（マーカー-）か、もしくはそれを比較的低レベルで発現する（マーカーlow）細胞が濃縮または枯渇される。幾つかの例では、かかるマーカーは、B細胞のある特定の集団（例えば、ナイーブ細胞）では存在しないか、または比較的低レベルで発現されるが、B細胞のある特定の他の集団（例えば、非ナイーブ細胞）では存在するか、または比較的高レベルで発現されるものである。

【1387】

幾つかの実施形態では、細胞は、(1) PAX5、BACH2、BCL-2、OBF1、OCT2、PU.1、SPIB、ETS1、及びIRF8のうちの1つ以上（例えば、それらの全て）について陽性であるか、もしくはそれを高レベルで発現する細胞が濃縮（すなわち、ポジティブセレクション）されており、及び／またはIRF4、BLIMP1、及びXBP1のうちの1つ以上（例えば、それらの全て）について陽性であるか、もしくはそれを高レベルで発現する細胞が枯渇（例えば、ネガティブセレクション）されており、及び／または(2) CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、及びCD24のうちの1つ以上（例えば、それらの全て）について陽性であるか、もしくはそれを高い表面レベルで発現する細胞が濃縮（すなわち、ポジティブセレクション）されており、及び／またはCD10、CD27、及びCD38のうちの1つ以上（例えば、それらの全て）について陽性であるか、もしくはそれを高い表面レベルで発現する細胞が枯渇（例えば、ネガティブセレクション）されている。幾つかの実施形態では、細胞は、ナイーブ成熟B細胞が濃縮されている。

10

20

30

40

50

【1388】

幾つかの実施形態では、細胞は、(1) I R F 4、B L I M P 1、及びX B P 1のうちの1つ以上（例えば、それらの全て）について陽性であるか、もしくはそれを高レベルで発現する細胞が濃縮（すなわち、ポジティブセレクション）されており、及び／またはP A X 5、B A C H 2、B C L - 2、O B F 1、O C T 2、P U . 1、S P I B、E T S 1、及びI R F 8のうちの1つ以上（例えば、それらの全て）について陽性であるか、もしくはそれを高レベルで発現する細胞が枯渇（例えば、ネガティブセレクション）されており、及び／または(2) C D 1 9、C D 3 8、C D 2 7、C D 2 6 9、及びM H C I Iのうちの1つ以上（例えば、それらの全て）について陽性であるか、もしくはそれを高い表面レベルで発現する細胞が濃縮（すなわち、ポジティブセレクション）されており、及び／またはC D 2 0及び／またはC D 1 3 8について陽性であるか、もしくはそれを高い表面レベルで発現する細胞が枯渇（例えば、ネガティブセレクション）されている。幾つかの実施形態では、細胞は、形質芽細胞が濃縮されている。

10

【1389】

幾つかの実施形態では、細胞は、(1) I R F 4、B L I M P 1、及びX B P 1のうちの1つ以上（例えば、それらの全て）について陽性であるか、もしくはそれを高レベルで発現する細胞が濃縮（すなわち、ポジティブセレクション）されており、及び／またはP A X 5、B A C H 2、B C L - 2、O B F 1、O C T 2、P U . 1、S P I B、E T S 1、及びI R F 8のうちの1つ以上（例えば、それらの全て）について陽性であるか、もしくはそれを高レベルで発現する細胞が枯渇（例えば、ネガティブセレクション）されており、及び／または(2) C X C R 4、C D 2 7、C D 3 8、C D 1 3 8、及びC D 2 6 9のうちの1つ以上（例えば、それらの全て）について陽性であるか、もしくはそれを高い表面レベルで発現する細胞が濃縮（すなわち、ポジティブセレクション）されており、及び／またはC D 1 9、C D 2 0、及びM H C I Iのうちの1つ以上（例えば、それらの全て）について陽性であるか、もしくはそれを高い表面レベルで発現する細胞が枯渇（例えば、ネガティブセレクション）されている。幾つかの実施形態では、細胞は、形質細胞が濃縮されている。

20

【1390】

幾つかの実施形態では、細胞は、(1) P A X 5、B A C H 2、B C L - 2、O B F 1、O C T 2、P U . 1、S P I B、E T S 1、及びI R F 8のうちの1つ以上（例えば、それらの全て）について陽性であるか、またはそれを高レベルで発現する細胞が濃縮（すなわち、ポジティブセレクション）されており、及び／またはI R F 4、B L I M P 1、及びX B P 1のうちの1つ以上（例えば、それらの全て）について陽性であるか、またはそれを高レベルで発現する細胞が枯渇（例えば、ネガティブセレクション）されており、及び／または(2) C D 1 9、C D 2 0、C D 4 0、C X C R 4、C X C R 5、及びC X C R 7のうちの1つ以上（例えば、それらの全て）について陽性であるか、またはそれを高い表面レベルで発現する細胞が濃縮（すなわち、ポジティブセレクション）されており、及び／またはC D 2 3及び／またはC D 3 8について陽性であるか、またはそれを高い表面レベルで発現する細胞が枯渇（例えば、ネガティブセレクション）されている。幾つかの実施形態では、細胞は、メモリーB細胞が濃縮されている。

30

40

【1391】

細胞が対象（例えば、ヒト）に投与されたら、遺伝子操作されたB細胞集団の幾つかの側面での生物活性が多数の公知の方法のいずれかにより測定される。幾つかの実施形態では、細胞の生物活性は、外来性タンパク質、例えば、治療用タンパク質の発現及び／または分泌について分析することにより測定され得る。幾つかの実施形態では、細胞の生物活性は、ある特定のサイトカイン、例えば、I F N γ 、I L - 2、I L - 4、I L - 6、I L - 1 2、及びT N F α の発現及び／または分泌を分析することによっても測定され得る。幾つかの実施形態では、生物活性は、臨床転帰、例えば、腫瘍量または腫瘍負荷の低減を評価することにより測定される。幾つかの実施形態では、細胞の毒作用、持続性、及び／または増殖、及び／または宿主免疫応答の有無が評価される。

50

【1392】

幾つかの実施形態では、本発明の方法は、遺伝子操作されたB細胞が外来性タンパク質の産生及び／または分泌を増加するのを誘発することを含む。幾つかの実施形態では、誘発は、遺伝子操作されたB細胞に発現される内在性B細胞受容体のリガンド結合ドメインに結合する薬剤を対象に投与することを含む。幾つかの実施形態では、薬剤は、内在性B細胞受容体により認識されるワクチン、例えば、記載される任意のものである。幾つかの実施形態では、誘発は、遺伝子操作されたB細胞に発現される駆動受容体（driving receptor）、例えば、組換え受容体またはキメラ受容体のリガンド結合ドメインに結合する薬剤を対象に投与することを含む。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたB細胞の駆動受容体（driving receptor）へのリガンドの結合は、
10 遺伝子操作されたB細胞を形質芽細胞または形質細胞に分化させる。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたB細胞は、形質芽細胞または形質細胞である。幾つかの実施形態では、外来性タンパク質は、内在性免疫グロブリンプロモーターまたは構成的に活性なプロモーターの制御下である。幾つかの実施形態では、外来性タンパク質は、誘導性プロモーターの制御下であり、本発明の方法は、誘導性プロモーターを活性化する薬剤を対象に投与することを更に含む。

【1393】

幾つかの実施形態では、本発明の方法は、対象における少なくとも約1ヵ月、少なくとも2ヵ月、少なくとも6ヵ月、少なくとも1年、少なくとも2年、またはそれ以上の作用持続時間（特定の方法が有効である期間）をもたらす。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたB細胞または組成物の対象への単回投与は、外来性タンパク質の対象への直接的な単回投与によりもたらされる許容可能な最大の作用持続時間（治療薬の最大耐容量での作用持続時間）と比較した、対象における作用持続時間の増加をもたらす。幾つかの実施形態では、増加は、少なくとも1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、または5倍である。
20

【1394】

本明細書に記載されるB細胞は、対象の疾患を処置または予防するために使用され得る。
。

【1395】

本明細書に記載されるB細胞を使用して処置され得る疾患、状態、及び障害には、腫瘍、例えば、固形腫瘍、血液悪性腫瘍、及び黒色腫、ならびに感染性疾患、例えば、ウイルスまたは他の病原体、例えば、HIV、HCV、HBV、CMVによる感染症、ならびに寄生虫疾患がある。幾つかの実施形態では、疾患または状態は、腫瘍、がん、悪性腫瘍、新生物、または他の増殖性疾患である。かかる疾患としては、限定されるものではないが、血液癌（または造血性癌）、例えば、白血病、例えば、急性白血病（例えば、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病、急性顆粒球性白血病、及び骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単核球性、ならびに赤白血病）、慢性白血病（例えば、慢性骨髄性（顆粒球性）白血病、慢性ミエロイド性白血病、及び慢性リンパ球性白血病）、真正多血症、リンパ腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫（低悪性度型及び高悪性度型）、多発性骨髄腫、形質細胞腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、重鎖病、骨髄異形成症候群、毛様細胞性白血病、及び脊髄形成異常症、ならびに固形腫瘍、例えば、肉腫及びがん腫、例えば、副腎皮質癌、胆管細胞癌、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、及び他の肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、胃癌、リンパ系腫瘍、脾臓癌、乳癌、肺癌、卵巣癌、前立腺癌、肝細胞癌、扁平上皮細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺癌（例えば、甲状腺髄様癌及び甲状腺乳頭癌）、褐色細胞腫、脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、髄様癌、気管支原性肺癌、腎細胞癌、肝臓癌、胆管癌、絨毛癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌（例えば、子宮頸部癌及び前浸潤性子宮頸部異形成）、結腸直腸癌、肛門、肛門管、または肛門直腸のがん、膣癌、外陰部のがん（例えば、扁平上皮細胞癌、上皮内癌、腺癌、及び線維肉腫）、陰茎癌、中咽頭癌、食道癌、頭部癌（例えば、扁平上皮細胞癌）、頸部癌（例えば、扁平上皮細胞癌）、精巣癌（
30
40
50

例えば、精上皮腫、奇形腫、胎児性癌、奇形癌、絨毛癌、肉腫、ライディッヒ細胞腫、線維腫、線維腺腫、類腺腫瘍、及び脂肪腫）、膀胱癌、腎臓癌、黒色腫、子宮のがん（例えば、子宮内膜癌）、尿路上皮癌（例えば、扁平上皮細胞癌、移行上皮癌、腺癌、尿管癌、及び膀胱癌）、及びCNS腫瘍（例えば、神経膠腫（例えば、脳幹神経膠腫及び混合性神経膠腫）、神経膠芽腫（多形神経膠芽腫としても公知）、星細胞腫、CNSリンパ腫、胚細胞腫、髄芽腫、シュワン細胞腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、及び脳転移）が挙げられる。

【1396】

幾つかの実施形態では、疾患または状態は、感染性疾患または感染状態、例えば、限定されるものではないが、ウイルス、レトロウイルス、細菌、及び原虫感染症である。かかる疾患としては、限定されるものではないが、*Acinetobacter baumannii*、*Anaplasma*属、*Anaplasma phagocytophilum*、*Ancylostoma braziliense*、*Ancylostoma duodenale*、*Arcanobacterium haemolyticum*、*Ascaris lumbricoides*、*Aspergillus*属、アストロウイルス科、*Babesia*属、*Bacillus anthracis*、*Bacillus cereus*、*Bartonella henselae*、BKウイルス、*Blastocystis hominis*、*Blastomyces dermatitidis*、*Bordetella pertussis*、*Borrelia burgdorferi*、*Borrelia*属、*Borrelia*属菌種、*Brucella*属、*Brugia malayi*、ブニヤウイルス科、*Burkholderia capacia*及び他の*Burkholderia*属菌種、*Burkholderia mallei*、*Burkholderia pseudomallei*、カリチウイルス科、*Campylobacter*属、*Candida albicans*、*Candida*属菌種、*Chlamydia trachomatis*、*Chlamydophila pneumoniae*、*Chlamydophila psittaci*、CJDプリオン、*Clonorchis sinensis*、*Clostridium botulinum*、*Clostridium difficile*、*Clostridium perfringens*、*Clostridium*属菌種、*Clostridium tetani*、*Coccidioides*属菌種、コロナウイルス、*Corynebacterium diphtheriae*、*Coxiella burnetii*、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス、*Cryptococcus neoformans*、*Cryptosporidium*属、サイトメガロウイルス、デングウイルス（DEN-1、DEN-2、DEN-3、及びDEN-4）、*Dientamoeba fragilis*、エボラウイルス（EBOV）、*Echinococcus*属、*Ehrlichia chaffeensis*、*Ehrlichia ewingii*、*Ehrlichia*属、*Entamoeba histolytica*、*Enterococcus*属、エンテロウイルス属、エンテロウイルス、主にコクサッキーAウイルス及びエンテロウイルス71（EV71）、*Epidermophyton*属菌種、エプスタイン・バーウイルス（EBV）、*Escherichia coli* O157:H7、O111、及びO104:H4、*Fasciola hepatica*及び*Fasciola gigantica*、FFIプリオン、*Filarioidea*上科、フラビウイルス、*Francisella tularensis*、*Fusobacterium*属、*Geotrichum candidum*、*Giardia intestinalis*、*Gnathostoma*属種、GSSプリオン、グアナリトウイルス、*Haemophilus ducreyi*、*Haemophilus influenzae*、*Helicobacter pylori*、ヘニバウイルス（ヘンドラウイルス、ニバウイルス）、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス（HCV）、D型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、単純ヘルペスウイルス1及び2（HSV-1及びHSV-2）、*Histoplasma capsulatum*、HIV（ヒト免疫不全ウイルス）、*Hortaea werneckii*、ヒトボカウイルス

10

20

30

40

50

(HBoV)、ヒトヘルペスウイルス6 (HHV-6) 及びヒトヘルペスウイルス7 (HHV-7)、ヒトメタニューモウイルス (hMPV)、ヒトパピローマウイルス (HPV)、ヒトパラインフルエンザウイルス (HPIV)、ヒトT細胞白血病ウイルス1 (HTLV-1)、日本脳炎ウイルス、JCウイルス、フニンウイルス、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV)、*Kingella kingae*、*Klebsiella granulomatis*、クーループリオン、ラッサウイルス、*Legionella pneumophila*、*Leishmania* 属、*Leptospira* 属、*Listeria monocytogenes*、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV)、マチュポウイルス、*Malassezia* 属菌種、マールブルグウイルス、麻疹ウイルス、*Metagonimus yokagawai*、*Microsporidia* 門、伝染性軟属腫ウイルス (MCV)、ムンプスウイルス、*Mycobacterium leprae* 及び *Mycobacterium lepromatosis*、*Mycobacterium tuberculosis*、*Mycobacterium ulcerans*、*Mycoplasma pneumoniae*、*Naegleria fowleri*、*Necator americanus*、*Neisseria gonorrhoeae*、*Neisseria meningitidis*、*Nocardia asteroides*、*Nocardia* 属菌種、*Onchocerca volvulus*、*Orientia tsutsugamushi*、オルトミクソウイルス科 (インフルエンザ)、*Paracoccidioides brasiliensis*、*Paragonimus* 属種、*Paragonimus westermani*、パルボウイルスB19、*Pasteurella* 属、*Plasmodium* 属、*Pneumocystis jirovecii*、ポリオウイルス、狂犬病ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス (RSV)、鼻炎ウイルス、ライノウイルス、*Rickettsia akari*、*Rickettsia* 属、*Rickettsia prowazekii*、*Rickettsia rickettsii*、*Rickettsia typhi*、リフトバレー熱ウイルス、ロタウイルス、風疹ウイルス、サビアウイルス、*Salmonella* 属、*Sarcoptes scabiei*、SARSコロナウイルス、*Schistosoma* 属、*Shigella* 属、シンノンブルウイルス、ハンタウイルス、*Sporothrix schenckii*、*Staphylococcus* 属、*Staphylococcus* 属、*Streptococcus agalactiae*、*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus pyogenes*、*Strongyloides stercoralis*、*Taenia* 属、*Taenia solium*、ダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV)、*Toxocara canis* または *Toxocara cati*、*Toxoplasma gondii*、*Treponema pallidum*、*Trichinella spiralis*、*Trichomonas vaginalis*、*Trichophyton* 属菌種、*Trichuris trichiura*、*Trypanosoma brucei*、*Trypanosoma cruzi*、*Ureaplasma urealyticum*、帯状疱疹ウイルス (VZV)、帯状疱疹ウイルス (VZV)、大痘瘡ウイルスまたは小痘瘡ウイルス、vCJDプリオン、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、*Vibrio cholerae*、西ナイルウイルス、西部ウマ脳炎ウイルス、*Wuchereria bancrofti*、黄熱病ウイルス、*Yersinia enterocolitica*、*Yersinia pestis*、ならびに *Yersinia pseudotuberculosis* の中から選択される病原体による感染症が挙げられる。

【1397】

幾つかの実施形態では、疾患または状態は、HIV感染症である。幾つかの実施形態では、HIV感染症は、本明細書に記載されるHIVグループ、サブタイプ、またはバリエーションのいずれかによる感染症が含まれる、HIV-1またはHIV-2感染症である。例示的なHIV-1グループとしては、HIV-1グループM、HIV-1グループN、HIV-1グループO、及びHIV-1グループPが挙げられる。それらのサブタイプ及び

10

20

30

40

50

組換え型は公知であり、例示的なサブタイプとしては、サブタイプ A（A 1 及び A 2 が含まれる）、サブタイプ B、サブタイプ C、及び C R F _ A E が含まれる組換え型が挙げられる。例示的な H I V - 2 グループとしては、H I V - 2 グループ A、H I V - 2 グループ B、H I V - 2 グループ C、H I V - 2 グループ D、H I V - 2 グループ E、H I V - 2 グループ F、H I V - 2 グループ G、及び H I V - 2 グループ H が挙げられる。

【1398】

k. 造血幹細胞（H S C）

本明細書における任意の箇所に記載されるような、細胞集団をドナー能力についてプロファイリングするための方法は、（例えば、ゲノム編集された）造血幹細胞でも実行され得る。

【1399】

細胞療法に使用される場合の造血幹細胞の望ましい特徴に関する情報が含まれる、本開示の文脈において参照される造血幹細胞に関する関連情報は、当該技術分野において公知である。本明細書に記載される H S C に関する実施形態は、H I P 細胞（例えば、M H C クラス I 及び／または M H C クラス I I 分子のうちの 1 つ以上の分子の低減された発現ならび少なくとも 1 種の免疫寛容誘導因子の増強された発現を示す）に記載している実施形態、ならびに安全スイッチ、及び本明細書に記載されるような他の改変／遺伝子編集された細胞に記載している実施形態と容易かつ適切に組み合わせられ得ることが理解されよう。細胞療法製品に使用される H S C は、細胞療法製品の製造プロセスの任意の段階でドナー能力についてプロファイリングされ得る。

【1400】

本明細書に記載される H S C は、対象の疾患を処置または予防するために使用され得る。

【1401】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、造血幹細胞である。幾つかの例では、造血幹細胞は、白血球、赤血球、及び血小板が含まれる、全ての種類の血液細胞に発達することができる未成熟細胞である。造血幹細胞（H S C）は、末梢血及び骨髓に見出される。幾つかの例では、造血幹細胞は、末梢血または骨髓から単離される。

【1402】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された H S C または遺伝子操作された H S C を含む集団は、血液疾患または障害を処置するために投与される。幾つかの実施形態では、血液疾患または障害は、脊髓形成異常症、再生不良性貧血、ファンコニ貧血、発作性夜間ヘモグロビン尿症、鎌状赤血球症、ダイヤモンド・ブラックファン貧血、シャックマン・ダイヤモンド障害、コストマン症候群、慢性肉芽腫症、副腎白質ジストロフィー、白血球接着不全症、血友病、サラセミア、βサラセミア、白血病、例えば、急性リンパ球性白血病（A L L）、急性骨髄性（骨髄）白血病（A M L）、成人リンパ芽球性白血病、慢性リンパ球性白血病（C L L）、B 細胞慢性リンパ球性白血病（B - C L L）、慢性骨髄性白血病（C M L）、若年性慢性骨髄性白血病（C M L）、及び若年性骨髄単球性白血病（J M M L）、重症複合免疫不全症（S C I D）、X 連鎖性重症複合免疫不全症、ウィスコット・アルドリッチ症候群（W A S）、アデノシンデアミナーゼ（A D A）欠損症、慢性肉芽腫症、チェディアック・東症候群、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫（N H L）、または A I D S である。

【1403】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された H S C または遺伝子操作された H S C を含む集団は、白血病もしくは骨髄腫に関連する細胞欠損症を処置するために、または白血病もしくは骨髄腫を処置するために投与される。

【1404】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された H S C または遺伝子操作された H S C を含む集団は、自己免疫疾患もしくは状態に関連する細胞欠損症を処置するために、または自己免疫疾患もしくは状態を処置するために投与される。幾つかの実施形態では、自己免疫疾

10

20

30

40

50

患または状態は、急性散在性脳脊髄炎、急性出血性白質脳炎、アジソン病、無ガンマグロブリン血症、円形脱毛症、筋萎縮性側索硬化症、強直性脊椎炎、抗リン脂質抗体症候群、抗合成酵素症候群、アトピー性アレルギー、自己免疫性再生不良性貧血、自己免疫性心筋症、自己免疫性腸疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性内耳疾患、自己免疫性リンパ球増殖症候群、自己免疫性末梢神経障害、自己免疫性膵炎、多腺性自己免疫症候群、自己免疫性プロゲステロン皮膚炎、自己免疫性血小板減少性紫斑病、自己免疫性蕁麻疹、自己免疫性ブドウ膜炎、バロー病、バロー同心円性硬化症、ベーチェット病、ベルガー病、ピッカーstaff脳炎、ブラウ症候群、水疱性類天疱瘡、がん、カストルマン病、セリアック病、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、慢性再発性多発性骨髄炎、チャグ・ストラウス症候群、癬痕性類天疱瘡、コーガン症候群、寒冷凝集素症、補体第2成分欠損症、頭蓋動脈炎、クレスト症候群、クローン病、クッシング症候群、皮膚白血球破碎性血管炎、デゴス病、ダーカム病、疱疹状皮膚炎、皮膚筋炎、1型糖尿病、びまん性皮膚硬化型全身性強皮症、ドレスラー症候群、円板状エリテマトーデス、湿疹、付着部炎、関節炎、好酸球性筋膜炎、好酸球性胃腸炎、後天性表皮水疱症、結節性紅斑、本態性混合型寒冷グロブリン血症、エバンス症候群、進行性骨化性線維異形成症、線維化性肺炎、胃炎、消化器性類天疱瘡、巨細胞性動脈炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、グレーブス病、ギラン・バレー症候群（GBS）、橋本脳炎、橋本甲状腺炎、溶血性貧血、ヘノッホ・シェンライン紫斑病、妊娠性疱疹、低ガンマグロブリン血症、特発性炎症性脱髄性疾患、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病、IgA腎症、封入体筋炎、炎症性脱髄性多発性神経障害、間質性膀胱炎、若年性特発性関節炎、若年性関節リウマチ、川崎病、ランバート・イートン筋無力症候群、白血球破碎性血管炎、扁平苔癬、硬化性苔癬、線状IgA病（LAD）、ルー・ゲーリック病、ルポイド肝炎、全身性エリテマトーデス、マジード症候群、メニエール病、顕微鏡的多発血管炎、ミラーフィッシャー症候群、混合性結合組織病、限局性強皮症、ムッハ・ハーベルマン病、多発性硬化症、重症筋無力症、筋炎、視神経脊髄炎、ニューロミオトニア、眼部癬痕性類天疱瘡、オプソクローヌス・ミオクローヌス症候群、オールド甲状腺炎、回帰性リウマチ、傍腫瘍性小脳変性症、発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）、パリー・ロンバーグ症候群、パーソネージ・ターナー症候群、扁平部炎、天疱瘡、尋常性天疱瘡、悪性貧血、静脈周囲性脳脊髄炎、POEMS症候群、結節性多発動脈炎、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、進行性炎症性神経障害、乾癬、乾癬性関節炎、壊疽性膿皮症、赤芽球癆、ラスムッセン脳炎、レイノー現象、再発性多発性軟骨炎、ライター症候群、レストレスレッグズ症候群、後腹膜線維症、関節リウマチ、リウマチ熱、サルコイドーシス、シュミット症候群、シュニッツラー症候群、強膜炎、強皮症、シェーグレン症候群、脊椎関節炎、スティル病、スティッフパーソン症候群、亜急性細菌性心内膜炎、スザック症候群、スイート症候群、シデナム舞踏病、交感性眼炎、高安動脈炎、側頭動脈炎、トロサ・ハント症候群、横断性脊髄炎、潰瘍性大腸炎、未分化結合組織病、分類不能型脊椎関節炎、血管炎、白斑、及びウェゲナー肉芽腫症である。

4. ABO型及びRh抗原の発現

【1405】

血液製剤は、人間の身体の全ての赤血球における表面抗原の存在または不存在に従って異なるグループに分類され得る（ABO式血液型）。A、B、AB、及びA1抗原は、赤血球の糖タンパク質上のオリゴ糖配列により決定される。血液型抗原群の遺伝子は、抗原タンパク質を作る指示を出す。血液型抗原タンパク質は、赤血球の細胞膜内で様々な機能を果たす。これらのタンパク質機能としては、細胞内外への他のタンパク質及び分子の輸送、細胞構造の維持、他の細胞及び分子への付着、ならびに化学反応への参加が挙げられる。

【1406】

リーサス因子（Rh）血液型は、ABO式血液型に次いで2番目に重要な血液型系である。Rh式血液型系は、49種の既定の血液型抗原からなり、その中でもD、C、c、E、及びeの5種の抗原が最も重要である。個体のRh（D）状態は、通常、ABO型の後

に陽性または陰性の接尾辞で記載される。用語「R h 因子」、「R h 陽性」、及び「R h 陰性」は、R h (D) 抗原のみに言及する。R h 抗原に対する抗体は、溶血性輸血反応に関与し得、R h (D) 及び R h (c) 抗原に対する抗体は、胎児新生児溶血性疾患の重大なリスクをもたらす。A B O 抗体は、全てのヒトにおいて幼児期に発生する。しかしながら、R h - のヒトにおけるリーサス抗体は、通常、その人が感作された場合にのみ発生する。これは、例えば、R h + 乳児を出産することにより、または R h + 血液の輸血を受けることにより起こり得る。

【1407】

A、B、H、及び R h 抗原は、血液、組織、及び細胞移植でのドナーとレシピエントとの間の組織適合性の主要な決定因子である。A B O 遺伝子によりコードされるグリコシルトランスフェラーゼの活性は、細胞表面に提示される A、B、A B、O 組織血液型抗原の産生に関与する。A 型の個体は、 α (1, 3) N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ活性をもたらす特性を有する A B O 遺伝子産物をコードし、B 型の個体は、 α (1, 3) ガラクトシルトランスフェラーゼ活性をもたらす特性を有する A B O 遺伝子産物をコードする。O 型の個体は、機能的ガラクトシルトランスフェラーゼを全く産生せず、従って、いずれの修飾も引き起こさない。A B 型の個体は、各々の 1 コピーを保有し、両方の種類の修飾を引き起こす。A B O 遺伝子の酵素産物は基質として H 抗原に作用し、従って、A B O 活性を欠く O 型個体は非修飾 H 抗原を提示し、このためしばしば O (H) 型と称される。

【1408】

H 抗原自体は、F U T 1 遺伝子によりコードされる α (1, 2) フコシルトランスフェラーゼ酵素の産物である。非常に稀な個体では、F U T 1 遺伝子の破壊の結果として H 抗原が完全に失われ、A B O が A または B 組織血液型を形成するための基質が存在しない。これらの個体はボンベイ組織血液型と言われる。R h 抗原は、R H D 遺伝子によりコードされ、R h 陰性である個体は、R H D 遺伝子の欠失または破壊を保有する。

【1409】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞または細胞集団は、A B O 式 O 型 R h 因子陰性である。幾つかの実施形態では、本明細書に記載される A B O 式 O 型 R h 因子陰性細胞は、A B O 式 O 型 R h 因子陰性ドナーに由来する。幾つかの実施形態では、本明細書に記載される A B O 式血液型 O 型 R h 因子陰性細胞は、A B O 式 A 型抗原、A B O 式 B 型抗原、または R h 因子抗原の提示を欠くように遺伝子操作される。幾つかの実施形態では、A B O 式 O 型及び／または R h 陰性細胞は、(例えば、A B O 遺伝子の有害変異による、または A B O 遺伝子のエキソン 6 258 del G 変異の挿入による) A B O 遺伝子の部分的もしくは完全な不活性化を含み、及び／または R H D 遺伝子の発現が R H D 遺伝子の有害変異により部分的もしくは完全に不活性化されている。幾つかの実施形態では、A B O 式 O 型 R h 陰性細胞は、F U T 1 遺伝子の部分的もしくは完全な不活性化を含み、及び／または R H D 遺伝子の発現が R H D 遺伝子の有害変異により部分的もしくは完全に不活性化されている。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された A B O 式 O 型及び／または R h 因子陰性細胞は、例えば、A 型細胞を O 型細胞に、B 型細胞を O 型細胞に、A B 型細胞を O 型細胞に、A + 型細胞を O - 型細胞に、A - 型細胞を O - 型細胞に、A B + 型細胞を O - 型細胞に、A B - 型細胞を O - 型細胞に、B + 型細胞を O - 型細胞に、及び B - 型細胞を O - 型細胞に改変するための遺伝子編集を使用して作製される。例示的な遺伝子操作された A B O 式 O 型 R h 因子陰性細胞及びそれを作製する方法は、W O 2 0 2 1 / 1 4 6 2 2 2 (その内容はその全体が参照により本明細書に組み込まれる) に記載されている。

【1410】

幾つかの実施形態では、C D 4 6 及び C D 5 9 の増強された発現を含む本明細書において提供される細胞または細胞集団は、A B O 式 A 型、A B O 式 B 型、または A B O 式 A B 型であり、及び／または C D 4 6 及び C D 5 9 の増強された発現を含む本明細書において提供される細胞または細胞集団は、R h 因子陽性である。幾つかの実施形態では、C D 4

10

20

30

40

50

6 及び C D 5 9 の増強された発現を含む細胞は、C D C 応答を引き起こすことなく A B O 及び／または R h 因子不適合のレシピエント患者に投与され得る。

【1 4 1 1】

5. 性染色体

ある特定の態様では、性染色体を有する細胞は、ある特定の抗原（例えば、Y 抗原）を発現し得、レシピエントは、かかる抗原に対する既存の感受性を有し得る。例えば、幾つかの実施形態では、男性胎児を妊娠していた女性は、男性ドナー由来の細胞を拒絶し得る。従って、幾つかの実施形態では、ドナーは男性であり、レシピエントは女性である。幾つかの実施形態では、ドナーは女性であり、レシピエントは女性である。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、抗原、例えば、プロトカドヘリン Y 及び／またはニューロリジン Y の発現を低減する改変を含む。幾つかの実施形態では、プロトカドヘリン Y をコードする遺伝子（P C D H 1 1 Y ; E n s e m b l I D : E N S G 0 0 0 0 0 0 9 9 7 1 5）が、遺伝子操作された細胞において低減または除去、例えば、ノックアウトされている。幾つかの実施形態では、ニューロリジン Y をコードする遺伝子（N L G N 4 Y ; E n s e m b l I D : E N S G 0 0 0 0 0 1 6 5 2 4 6）が、遺伝子操作された細胞において低減または除去、例えば、ノックアウトされている。遺伝子の発現を低減または除去するための任意の方法、例えば、本明細書に記載される任意のものが使用され得る。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞において、P C D H 1 1 Y 及び／または N L G N 4 Y が、例えば、C R I S P R / C a s システムを使用した、ヌクレアーゼにより媒介される遺伝子編集法により低減または除去されている。

D. 導入遺伝子の挿入のための遺伝子編集システム

【1 4 1 2】

幾つかの態様では、免疫寛容誘導因子をコードする第 1 の導入遺伝子及び／または C A R をコードする第 2 の導入遺伝子は、本明細書に記載されるある特定の方法及び組成物を使用して宿主細胞（例えば、T 細胞）のゲノムに組み込まれ得る。

【1 4 1 3】

1. ランダム挿入

幾つかの実施形態では、免疫寛容誘導因子をコードする第 1 の導入遺伝子及び／または C A R をコードする第 2 の導入遺伝子は、宿主細胞のランダムなゲノム遺伝子座に挿入され得る。

当業者に公知のように、例えば、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、及びアデノ随伴ウイルスベクターが含まれる、ウイルスベクターは、遺伝物質を宿主細胞に送達するために一般的に使用され、異種遺伝子または外来性遺伝子を宿主細胞ゲノムにランダムに挿入して、遺伝子の安定した発現及び複製を促進する。

【1 4 1 4】

2. 部位特異的挿入（ノックイン）

幾つかの実施形態では、免疫寛容誘導因子をコードする第 1 の導入遺伝子及び／または C A R をコードする第 2 の導入遺伝子は、宿主細胞の特定のゲノム遺伝子座に挿入され得る。導入遺伝子を選択された特定のゲノム遺伝子座に挿入するために、多数の遺伝子編集方法が使用され得る。遺伝子編集は、生物のゲノムにおいてヌクレオチド配列が挿入、除去、改変、または置換され得る 1 種の遺伝子操作である。幾つかの実施形態では、遺伝子編集技術としては、ヌクレアーゼ、インテグラーゼ、トランスポザーゼ、及び／またはリコンビナーゼを含むシステムが挙げられ得る。幾つかの実施形態では、遺伝子編集技術は、一本鎖切断（S S B）をもたらす。幾つかの実施形態では、遺伝子編集技術は、非相同末端結合（N H E J）または相同組換え修復（H D R）を伴うものが含まれる、二本鎖切断（D S B）をもたらす。幾つかの実施形態では、遺伝子編集技術は、D N A ベースの編集またはプライム編集を含み得る。幾つかの実施形態では、遺伝子編集技術は、部位特異的標的化エレメントによるプログラム化可能な付加（P A S T E）を含み得る。幾つかの実施形態では、遺伝子編集技術は、T n p B ポリペプチドを含み得る。一般に、多数の遺

伝子編集技術が、細胞がDNAの二本鎖切断（DSB）を修復する生来のメカニズムを利用する。

【1415】

真核細胞は、以下の2つの主要な修復経路によりDSBを修復する：非相同末端結合（NHEJ）及び相同組換え修復（HDR）。HDRは、通常、姉妹染色分体が修復テンプレートとして機能することができるS期後期またはG2期の間に発生する。NHEJは、より一般的であり、細胞周期のどの期においても発生し得るが、よりエラーを起こしやすい。遺伝子編集において、NHEJは、通常、挿入／欠失変異（インデル）を生じさせるために使用され、当該変異は、オープンリーディングフレーム（ORF）をシフトさせること、及びコード領域または関連する調節領域における変化を生じさせることにより、標的遺伝子の標的化された機能喪失をもたらし得る。一方で、HDRは、相同配列を有する修復テンプレートの存在下で標的化されたノックイン、ノックアウト、または特定の変異の挿入を生じさせるための好ましい経路である。例えば、化学的調節（例えば、NHEJ経路における重要な酵素の阻害剤での細胞の処理）；細胞周期のS期及びG2期にタイミングを合わせた遺伝子編集システムの送達；S期及びG2期での細胞周期停止；ならびに相同配列を有する修復テンプレートの導入が含まれる、HDR効率を改善するための幾つかの方法が当業者に公知である。本明細書において提供される方法は、HDRにより媒介される修復、NHEJにより媒介される修復、またはそれらの組み合わせを利用し得る。

10

【1416】

幾つかの実施形態では、HDRにより媒介される挿入のための本明細書において提供される方法は、例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、メガヌクレアーゼ、トランスポザーゼ、及びクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（CRISPR）／Casシステムが含まれる、部位特異的ヌクレアーゼを利用する。

20

【1417】

a. ZFN

ZFNは、細菌のFokI制限酵素のエンドヌクレアーゼドメインに結合された、ジンクフィンガー含有転写因子から応用された一連の部位特異的DNA結合ドメインを含む融合タンパク質である。ZFNは、1個以上（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上）のDNA結合ドメインまたはジンクフィンガードメインを有し得る。例えば、Carroll et al., Genetics Society of America (2011) 188:773-782、Kim et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93:1156-1160を参照のこと。各ジンクフィンガードメインは、1個以上の亜鉛イオンにより安定化された小さなタンパク質構造モチーフであり、通常、3～4bpのDNA配列を認識する。従って、タンデムドメインは、細胞のゲノム内で固有である拡張されたヌクレオチド配列に結合できる可能性がある。

30

【1418】

特異性が既知の種々のジンクフィンガーを組み合わせ、約6、9、12、15、または18bpの配列を認識するマルチフィンガーポリペプチドを作製することができる。ファジーディスプレイ、酵母ワンハイブリッドシステム、細菌ワンハイブリッド及びツーハイブリッドシステム、ならびに哺乳動物細胞が含まれる、特定の配列を認識するジンクフィンガー（及びその組み合わせ）を作製するための種々の選択及びモジュール式組立て技術が利用可能である。ジンクフィンガーは、所定の核酸配列に結合するように遺伝子操作され得る。所定の核酸配列に結合するようにジンクフィンガーを遺伝子操作するための条件は、当該技術分野において公知である。例えば、Sera et al., Biochemistry (2002) 41:7074-7081、Liu et al., Bioinformatics (2008) 24:1850-1857を参照のこと。

40

【1419】

FokIヌクレアーゼドメインまたは他の二量体ヌクレアーゼドメインを含有するZF

50

Nは、二量体として機能する。従って、非回文構造のDNA部位を標的とするために一对のZFNが必要とされる。2つの個々のZFNは、それらのヌクレアーゼが適切に離れた状態でDNAの対向する鎖に結合しなければならない。Bitinaite et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 95:10570-10575を参照のこと。ゲノム内の特定の部位を切断するために、一对のZFNは、当該部位に隣接する2つの配列を認識するように設計され、一方が順鎖に存在し、他方が逆鎖上に存在する。ZFNが当該部位の両側に結合すると、ヌクレアーゼドメインは二量体化し、当該部位にてDNAを切断し、5'オーバーハングを伴うDSBを生じさせる。次いで、相同性アームに挟まれた所望の変異を含む修復テンプレートをを用いて特定の変異を導入するために、HDRが利用され得る。

10

修復テンプレートは、通常、細胞に導入される外来性二本鎖DNAベクターである。Miller et al., Nat. Biotechnol. (2011) 29:143-148、Hockemeyer et al., Nat. Biotechnol. (2011) 29:731-734を参照のこと。

【1420】

b. TALEN

TALENは、標的遺伝子を編集するために使用され得る人工ヌクレアーゼの別の例である。TALENは、通常、10~30リピートを有するタンデムアレイを含むTALEリピートと称されるDNA結合ドメインに由来し、当該タンデムアレイは、拡張されたDNA配列に結合し、それを認識する。各リピートは、33~35アミノ酸の長さであり、4つのDNA塩基対のうちの1つに対する特異性を付与する2個の隣接するアミノ酸（反復可変二残基またはRVDと称される）を有する。従って、リピートと標的DNA配列の塩基対との間には1対1の対応が存在する。

20

【1421】

TALENは、1個以上のTALE DNA結合ドメイン（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上）をヌクレアーゼドメイン、例えば、FokIエンドヌクレアーゼドメインと融合させることによって人工的に作製される。Zhang, Nature Biotech. (2011) 29:149-153を参照のこと。TALENにおける使用に向けてFokIに対する幾つかの変異が作製されており、これらは、例えば、切断特異性または活性を改善する。Cermak et al., Nucleic Acids Res. (2011) 39:e82、Miller et al., Nature Biotech. (2011) 29:143-148、Hockemeyer et al., Nature Biotech. (2011) 29:731-734、Wood et al., Science (2011) 333:307、Doyon et al., Nature Methods (2010) 8:74-79、Szczepiek et al., Nature Biotech (2007) 25:786-793、Guo et al., J. Mol. Biol. (2010) 200:96を参照のこと。FokIドメインは、二量体として機能し、適切な配置及び間隔を有する標的ゲノム部位に対する固有のDNA結合ドメインを有する2つの構築物を必要とする。TALE DNA結合ドメインとFokIヌクレアーゼドメインとの間のアミノ酸残基の数、及び2つの個々のTALEN結合部位間の塩基の数の両方が、高レベルの活性を達成するのに重要なパラメータであるようである。Miller et al., Nature Biotech. (2011) 29:143-148。

30

40

【1422】

遺伝子操作されたTALEリピートをヌクレアーゼドメインと組み合わせることにより、任意の所望のDNA配列に特異的な部位特異的ヌクレアーゼを作製され得る。ZFNと同様に、TALENは、ゲノム内の所望の標的部位でDSBを生じさせるために細胞に導入され得るため、同様のHDRにより媒介される経路で遺伝子をノックアウトまたは変異をノックインするために使用され得る。Boch, Nature Biotech. (2011) 29:135-136、Boch et al., Science (200

50

9) 326:1509-1512、Moscou et al., Science (2009) 326:3501を参照のこと。

【1423】

c. メガヌクレアーゼ

メガヌクレアーゼは、大きなDNA配列(14~40塩基対)を認識し、それを切断する能力を特徴とするエンドヌクレアーゼファミリーの酵素である。メガヌクレアーゼは、ヌクレアーゼ活性及び／またはDNA認識に影響を及ぼすそれらの構造モチーフに基づいてファミリーに分類される。最も広範囲かつ最もよく知られているメガヌクレアーゼは、LAGLIDADGファミリーのタンパク質であり、それらの名称は保存されたアミノ酸配列に由来する。Chevalier et al., Nucleic Acids Res. (2001) 29(18):3757-3774を参照のこと。一方で、GIY-YIGファミリーメンバーは、70~100残基の長さであるGIY-YIGモジュールを有し、4つの不変残基を有する4または5つの保存された配列モチーフを含み、そのうちの2つが活性に必要とされる。Van Roey et al., Nature Struct. Biol. (2002) 9:806-811を参照のこと。His-Cysファミリーメガヌクレアーゼは、数百のアミノ酸残基を包含する領域にわたる高度に保存されたヒスチジン及びシステインの配列を特徴とする。Chevalier et al., Nucleic Acids Res. (2001) 29(18):3757-3774を参照のこと。NHNファミリーのメンバーは、アスパラギン残基によって囲まれた2対の保存されたヒスチジンを含有するモチーフによって定義される。Chevalier et al., Nucleic Acids Res. (2001) 29(18):3757-3774を参照のこと。

【1424】

高い特異性が要求されることに起因して、特定の標的DNA配列のための天然メガヌクレアーゼを同定する可能性は低いため、変異誘発及びハイスループットスクリーニング法を含む様々な方法が、ユニーク配列を認識するメガヌクレアーゼバリエーションを作製するために使用されてきた。例えば、所定の核酸配列に結合するようにDNA結合特異性が変化したメガヌクレアーゼを開発するための戦略は、当技術分野において公知である。例えば、Chevalier et al., Mol. Cell. (2002) 10:895-905、Epinat et al., Nucleic Acids Res (2003) 31:2952-2962、Silva et al., J Mol. Biol. (2006) 361:744-754、Seligman et al., Nucleic Acids Res (2002) 30:3870-3879、Sussman et al., J Mol Biol (2004) 342:31-41、Doyon et al., J Am Chem Soc (2006) 128:2477-2484、Chen et al., Protein Eng Des Sel (2009) 22:249-256、Arnould et al., J Mol Biol. (2006) 355:443-458、Smith et al., Nucleic Acid Res. (2006) 363(2):283-294を参照のこと。

【1425】

ZFN及びTALENと同様に、メガヌクレアーゼは、ゲノムDNAにDSBを生じさせることができ、これは、例えば、NHEJにより不適当に修復される場合にフレームシフト変異を生じさせ得、これにより、細胞における標的遺伝子の発現の減少をもたらす。代替的に、外来DNAがメガヌクレアーゼと共に細胞に導入され得る。外来DNAの配列及び染色体配列に応じて、このプロセスは、標的遺伝子を改変するために使用され得る。Silva et al., Current Gene Therapy (2011) 11:11-27を参照のこと。

【1426】

d. トランスポザーゼ

トランスポザーゼは、トランスポゾンの末端に結合し、カット&ペーストメカニズムま

10

20

30

40

50

たは複製的転移メカニズムによりゲノムの別の部分へのその移動を触媒する酵素である。トランスポザーゼを他のシステム、例えば、CRISPR/Casシステムに連結させることにより、ゲノムDNAの部位特異的挿入または操作を可能にするための新たな遺伝子編集ツールが開発され得る。トランスポゾンを使用する2つの公知のDNA組み込み方法が存在し、これらは触媒活性のないCasエフェクタータンパク質及びTn7様トランスポゾンを使用する。トランスポザーゼ依存的DNA組み込みは、ゲノムにDSBを誘発せず、このことは、より安全かつより特異的なDNA組み込みを保証し得る。

【1427】

e. CRISPR/Cas

CRISPRシステムは、侵入したファージ及びプラスミドに対する防御に関与する、獲得免疫の一形態を提供するシステムとして原核生物（例えば、細菌及び古細菌）において最初に発見された。現在では、研究及び臨床用途において一般的な遺伝子編集ツールとして応用及び使用されている。

【1428】

CRISPR/Casシステムは、通常、以下の少なくとも2つの構成要素を含む：1種以上のガイドRNA (gRNA) 及びCasタンパク質。Casタンパク質は、標的部位にDSBを導入するヌクレアーゼである。CRISPR-Casシステムは、2つの主要なクラスに分類され、クラス1システムは、核酸を分解するために複数のCasタンパク質の複合体を使用し、クラス2システムは、同じ目的のために単一の大きなCasタンパク質を使用する。クラス1は、I型、III型、及びIV型に分類され、クラス2は、II型、V型、及びVI型に分類される。遺伝子編集用途に適した種々のCasタンパク質としては、限定されるものではないが、Cas3、Cas4、Cas5、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a (Cpf1)、Cas12b (C2c1)、Cas12c (C2c3)、Cas12d (CasY)、Cas12e (CasX)、Cas12f (C2c10)、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k (C2c5)、Cas13、Cas13a (C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr5、Cse1、Cse2、Csf1、Csm2、Csn2、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3、及びMad7が挙げられる。例えば、Jinek et al., Science (2012) 337 (6096): 816-821、Dang et al., Genome Biology (2015) 16: 280、Rane et al., Nature (2015) 520: 186-191、Zetsche et al., Cell (2015) 163: 759-771、Strecker et al., Nature Comm. (2019) 10: 212、Yan et al., Science (2019) 363: 88-91を参照のこと。最も広く使用されているCas9は、II型Casタンパク質であり、例示として本明細書に記載されている。これらのCasタンパク質は、異なる供給源種に由来し得る。例えば、Cas9は、S. pyogenesまたはS. aureusに由来し得る。

【1429】

元の微生物ゲノムにおいて、II型CRISPRシステムは、宿主ゲノム内でアレイとしてコードされるCRISPRリピート配列の間に侵入したDNA由来の配列を組み込んでいる。CRISPRリピートアレイからの転写物は、侵入したDNAから転写された「プロトスペーサー」配列として公知の可変配列、及びCRISPRリピートの一部を各々が保有するCRISPR RNA (crRNA) へとプロセッシングされる。各crRNAは、第2のトランス活性化CRISPR RNA (tracrRNA) とハイブリダイズし、これらの2つのRNAは、Cas9ヌクレアーゼと複合体を形成する。crRNAのプロトスペーサーによりコードされる部分は、相補的な標的DNA配列を切断するようにCas9複合体を誘導するが、ただし、相補的な標的DNA配列は、「プロトスペーサー隣接モチーフ」(PAM) として公知の短い配列に隣接している。

【1430】

前述の説明はCas9ヌクレアーゼに焦点を置いたが、これまでに記載されたものと幾つかの点で異なるgRNAを利用する他のRNA誘導型ヌクレアーゼが存在することが理解されよう。例えば、Cpf1 (Prevotella属及びFrancisella属由来のCRISPR1; Cas12aとしても公知) は、機能するためにcrRNAのみを必要とし、tracrRNAを必要としないRNA誘導型ヌクレアーゼである。

【1431】

その発見以来、CRISPRシステムは、細菌からヒト細胞を含め真核細胞にわたる広範囲の細胞及び生物において配列特異的DSB及び標的ゲノム編集を誘発するために応用されてきた。遺伝子編集用途でのその使用においては、人工的に設計された合成gRNAが、本来のcrRNA: tracrRNA複合体と置き換わっており、例えば、ある特定の実施形態では、シングルgRNAにより行われる。例えば、gRNAは、crRNA、テトラループ、及びtracrRNAから構成されるシングルガイドRNA (sgRNA) であり得る。crRNAは、通常、関心対象の標的DNAを認識するように使用者が設計した相補的領域 (スパーサーとも称され、通常は約20ヌクレオチドの長さである) を含む。tracrRNA配列は、Casヌクレアーゼ結合のための足場領域を含む。crRNA配列及びtracrRNA配列は、テトラループにより連結されており、各々が互いにハイブリダイゼーションするための短いリピート配列を有し、これにより、キメラsgRNAが生成される。gRNAに存在するスパーサーまたは相補的領域配列を単純に変更することによりCasヌクレアーゼのゲノム標的を変更することができる。相補的領域は、標準的なRNA-DNA相補的塩基対形成則によりCasヌクレアーゼを標的DNA部位に誘導する。

【1432】

Casヌクレアーゼが機能するためには、ゲノムDNAの標的配列のすぐ下流にPAMが存在しなければならない。Casタンパク質によるPAMの認識は、隣接するゲノム配列を不安定化し、これにより、gRNAによる配列の調査を可能にし、一致する配列が存在する場合にgRNA-DNA対合をもたらすと考えられている。PAMの具体的な配列は、Cas遺伝子の種に応じて異なる。例えば、S. pyogenesに由来する最も一般的に使用されるCas9ヌクレアーゼは、5'-NGG-3'のPAM配列、またはより効率の低い速度で5'-NAG-3'のPAM配列を認識し、ここで、「N」は任意のヌクレオチドであり得る。代替的PAMを有する他のCasヌクレアーゼバリエーションも特徴付けられ、ゲノム編集に成功裏に使用されており、それらを表1aに要約する。

【1433】

幾つかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、それらの活性、特異性、認識、及び／または他の特徴を変化させるための1つ以上の変異を含み得る。例えば、Casヌクレアーゼは、オフターゲット効果を軽減するためにその忠実度を変化させる1つ以上の変異を有し得る (例えば、SpCas9のeSpCas9、SpCas9-HF1、HypaSpCas9、HeFSpCas9、及びevoSpCas9高忠実度バリエーション)。別の例では、Casヌクレアーゼは、そのPAM特異性を変化させる1つ以上の変異を有し得る。

【1434】

幾つかの実施形態では、本開示のCRISPRシステムは、TnpBポリペプチドを含む。幾つかの実施形態では、TnpBポリペプチドは、RuvC様ドメインを含み得る。RuvCドメインは、RuvC-I、RuvC-II、及びRuvC-IIISubドメインを含む分割されたRuvCドメインであり得る。幾つかの実施形態では、TnpBは、HTHドメイン、ブリッジヘリックスドメイン、及びジンクフィンガードメインのうちの1つ以上更に含み得る。TnpBポリペプチドは、HNHドメインを含まない。幾つかの実施形態では、TnpBタンパク質は、N末端から開始して、HTHドメイン、RuvC-I Subドメイン、ブリッジヘリックスドメイン、RuvC-II Subドメイン、ジンクフィンガードメイン、及びRuvC-IIISubドメインを含む。幾つかの実施形態では、RuvC-IIISubドメインは、TnpBポリペプチドのC末端を形成する。幾つか

の実施形態では、TnpBポリペプチドは、*Epsilonproteobacteria* 綱の細菌、*Actinoplanes lobatus* DSM 43150 株、*Actinomadura cellulosilytica* DSM 45823 株、*Actinomadura namibiensis* DSM 44197 株、*Alicyclobacillus macrosprangiidus* DSM 17980 株、*Lipingzhangelia halophila* DSM 102030 株、または *Ktedonobacter racemifer* に由来する。幾つかの実施形態では、TnpBポリペプチドは、*Ktedonobacter racemifer* に由来するか、または *K. racemifer* の TnpB 遺伝子座の 5' ITR との類似性を有する保存された RNA 領域を含む。幾つかの実施形態では、TnpB は、真核生物ゲノムに見出される TnpB ホモログである Fanzor タンパク質を含み得る。幾つかの実施形態では、TnpB ポリペプチドを含む CRISPR システムは、標的ポリヌクレオチドの 5' 側の標的隣接モチーフ (TAM) 配列に結合する。幾つかの実施形態では、TAM は、トランスポゾン関連モチーフである。幾つかの実施形態では、TAM 配列は、TCA を含む。幾つかの実施形態では、TAM 配列は、TTCAN を含む。幾つかの実施形態では、TAM 配列は、TTGAT を含む。幾つかの実施形態では、TAM 配列は、ATAA を含む。

10

【1435】

ある特定の実施形態では、第1及び／または第2の導入遺伝子は、記載される遺伝子編集システム（例えば、CRISPR/Cas システム）に関連した HDR により標的部位に組み込まれる DNA 修復テンプレートとして機能し得る。通常、挿入される導入遺伝子は、関心対象のタンパク質（例えば、免疫寛容誘導因子または CAR）をコードする発現カセットを少なくとも含み、1つ以上の調節エレメント（例えば、プロモーター、インスレーター、エンハンサー）も任意に含む。これらの実施形態の幾つかでは、挿入される導入遺伝子は、HDR のためのテンプレートとして機能するように標的ゲノム遺伝子座のために特別に設計された、標的のすぐ上流及びすぐ下流の相同配列、すなわち、左相同性アーム (LHA) 及び右相同性アーム (RHA) に挟まれている。各相同性アームの長さは、通常、導入される挿入断片のサイズに依存し、より大きな挿入物はより長い相同性アームを必要とする。

20

【1436】

幾つかの実施形態では、標的プライムド逆転写 (TPRT) またはプライム編集が、外来性遺伝子、例えば、免疫寛容誘導因子（例えば、CD47）をコードする外来性導入遺伝子を特定の遺伝子座に遺伝子操作するために使用され得る。幾つかの実施形態では、プライム編集は、DSB またはドナー DNA テンプレートを必要とすることなく、ヒト細胞における標的挿入、欠失、全12通りの可能な塩基-塩基変換、及びそれらの組み合わせを媒介する。

30

【1437】

プライム編集は、ポリメラーゼと共同して機能する（すなわち、融合タンパク質の形態の、またはそうでなければ napDNAbp と共にトランスで提供される）、核酸によりプログラム化可能な DNA 結合タンパク質（「napDNAbp」）を使用して指定された DNA 部位に新たな遺伝子情報を直接書き込むゲノム編集方法であり、ここで、プライム編集システムは、標的部位を指定し、ガイド RNA 上に（例えば、5' もしくは 3' 末端、またはガイド RNA の内部に）設計された延長部（DNA または RNA のいずれか）による置換 DNA 鎖の形態での目的とする編集の合成の鋳型にもなるプライム編集 (PE) ガイド RNA（「PEgRNA」）によりプログラム化される。目的の編集（例えば、単一核酸塩基置換）を含有する置換鎖は、（それが目的の編集を含むことを除いて）編集されるべき標的部位の内在性鎖と同じ配列を共有する。DNA 修復及び／または複製機構により、標的部位の内在性鎖は、目的の編集を含有する新たに合成された置換鎖と置き換えられる。場合によっては、プライム編集は、プライムエディターが編集されるべき目的の標的部位を検索及び検出し、同時に、該当する標的部位の内在性 DNA 鎖の代わりに導入

40

50

される目的の編集を含有する置換鎖をコードするため、「検索及び置換」によるゲノム編集技術とみなされ得る。例えば、プライム編集は、正確なCRISPR/Casベースのゲノム編集を実施するために、二本鎖切断を回避する目的で採用され得る。幾つかの実施形態では、相同タンパク質は、ガイドRNAにより特定のDNA配列を標的とし、標的部位で一本鎖ニックを生じさせ、ニックの入ったDNAをガイドRNAにより組込まれる遺伝子操作された逆転写酵素テンプレートの逆転写のためのプライマーとして使用するためのCasタンパク質-逆転写酵素融合物または関連するシステムであるか、またはそれをコードする。幾つかの実施形態では、プライムエディタータンパク質は、ゲノムDNAの対向する鎖での相補的DNAフラップの合成の鑄型となる2つのプライム編集ガイドRNA (pegRNAs) と組み合わせられ、これにより、PEにより誘発されたニック部位とpegRNAによりコードされる配列との間での内在性DNA配列の置換をもたらす。

10

【1438】

幾つかの実施形態では、遺伝子編集技術は、逆転写酵素または当該技術分野において公知の任意のDNAポリメラーゼであるプライムエディターを伴う。従って、一態様では、プライムエディターは、標的DNAの相補的なプロトスペーサーにアニーリングするスペーサー配列を含有する特殊なガイドRNA (すなわち、PEgRNA) と会合させることによりDNA配列を標的とするようにプログラムされるCas9 (または同等のnapDNAbp) を含み得る。かかる方法としては、Anzalone et al., (doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4)、またはPCT公開第WO2020191248号、同WO2021226558号、または同WO2022067130号 (これらはその全体が本明細書に組み込まれる) に開示されるいずれかが挙げられる。

20

【1439】

幾つかの実施形態では、塩基編集技術は、生細胞のDNAまたはRNAに単一ヌクレオチドバリエーション (SNV) を導入するために使用され得る。塩基編集は、DSBを生じさせることなくRNAまたはDNAへの点変異の導入を可能にするCRISPR-Cas9ベースのゲノム編集技術である。塩基エディター (BE) は、通常、Cas (「CRISPR関連」) ドメイン及び核酸塩基修飾ドメイン (例えば、天然または進化させたデアミナーゼ、例えば、APOBEC1 (「アポリポタンパク質B mRNA編集酵素、触媒ポリペプチド1」)、CDA (「シチジンデアミナーゼ」)、及びAID (「活性化誘導シチジンデアミナーゼ」) が挙げられるシチジンデアミナーゼ) の融合物である。幾つかの実施形態では、塩基エディターは、細胞内DNA修復過程を変化させて、得られる単一ヌクレオチド変化の効率及び/または安定性を増加させるタンパク質またはドメインも含み得る。以下の2つの主要なクラスの塩基エディターが開発されている: C:GからT:Aへの変換を可能にするシチジン塩基エディター (CBE) (例えば、BE4) 及びA:TからG:Cへの変換を可能にするアデニン塩基エディター (ABE) (例えば、ABE7.10)。塩基エディターは、デアミナーゼに融合された、触媒活性を失ったCas9 (dCas9) またはニックアーゼCas9 (nCas9) により構成され、sgRNAにより関心対象の遺伝子座に誘導される。d/nCas9は特定のPAM配列を認識し、sgRNAとPAMの上流に通常位置するDNA配列 (プロトスペーサーとも称される) との間

30

40

50

：A塩基対を生じさせ、次いで、これがDNA複製時にT：Aに変換されるロングパッチ塩基除去修復（BER）を誘導すると予想される。

【1440】

幾つかの実施形態では、塩基エディターは、触媒活性のない第1のDNA結合タンパク質ドメイン、塩基編集活性を有するドメイン、及びニッカーゼ活性を有する第2のDNA結合タンパク質ドメインを含有する核酸塩基エディターであり、ここで、DNA結合タンパク質ドメインは、単一の融合タンパク質で発現されるか、または（例えば、別個の発現ベクターで）別々に発現される。幾つかの実施形態では、塩基エディターは、塩基編集活性を有するドメイン（例えば、シチジンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼ）及び2つの核酸によりプログラム化可能なDNA結合タンパク質（napDNAbp）ドメインを含む融合タンパク質であり、第1のドメインがニッカーゼ活性を含み、第2のドメインが触媒活性のないnapDNAbpを含み、ここで、少なくとも当該2つのnapDNAbpは、リンカーにより連結されている。幾つかの実施形態では、塩基エディターは、ニッカーゼ活性を有するCRISPR-Cas（例えば、Cas9）のDNAドメイン（nCAs；nCAs9）、核酸によりプログラム化可能なDNA結合活性を有するCRISPR-Casタンパク質（例えば、Cas9）の触媒活性のないドメイン（dCas；例えば、dCas9）、及びデアミナーゼドメインを含む融合タンパク質であり、ここで、当該dCasは、リンカーにより当該nCAsに連結されており、当該dCasは、当該デアミナーゼドメインに直接隣接する。幾つかの実施形態では、塩基エディターは、アデニン→チミンまたは「ATBE」（またはチミン→アデニンもしくは「TABE」）トランスポジション塩基エディターである。例示的な塩基エディター及び塩基エディターシステムとしては、特許出願公開第US20220127622、同US20210079366号、同US20200248169号、同US20210093667号、同US20210071163号、同WO2020181202、同WO2021158921号、同WO2019126709号、WO2020181178号、同WO2020181195号、同WO2020214842号、同WO2020181193号（これらはその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるようないずれかが挙げられる。

10

20

【1441】

幾つかの実施形態では、遺伝子編集技術は、部位特異的標的化エレメントによるプログラム化可能な付加（PASTE）である。幾つかの態様では、PASTEは、逆転写酵素及びセリンインテグラーゼの両方に融合されたCRISPR-Cas9ニッカーゼによりゲノム挿入が誘導されるプラットフォームである。Ioannidis et al. (doi.org/10.1101/2021.11.01.466786)に記載されているように、PASTEは、二本鎖切断を生じさせないが、約36kbもの大きさの配列の組込みを可能にする。幾つかの実施形態では、セリンインテグラーゼは、当該技術分野において公知の任意のものであり得る。幾つかの実施形態では、セリンインテグラーゼは、少なくとも2つのゲノム位置で少なくとも2つの異なる遺伝子を同時に組込む多重化された遺伝子組込みにPASTEを使用することができるよう、十分な直交性を有する。幾つかの実施形態では、PASTEは、相同組換え修復または非相同末端結合に基づく組込みの方法と同等か、またはそれより高い編集効率を有し、非分裂細胞において活性であり、検出可能なオフターゲット事象がより少ない。

30

40

【1442】

3. 第1の導入遺伝子の挿入のためのゲノム遺伝子座

幾つかの実施形態では、免疫寛容誘導因子をコードする第1の導入遺伝子の部位特異的挿入のためのゲノム遺伝子座は、内在性TCR遺伝子座である。幾つかの実施形態では、内在性TCR遺伝子座は、TRAC遺伝子座、TRBC1遺伝子座、及びTRBC2遺伝子座からなる群から選択される。遺伝子座内の挿入のための特定の部位は、限定されるものではないが、遺伝子コード領域（コード配列または「CDS」としても公知）、エキソン、イントロン、エキソンの一部及び隣接するイントロンの一部にまたがる配列、または調節領域（例えば、プロモーター、エンハンサー）が含まれる、遺伝子の任意の好適な領

50

域内に存在し得る。幾つかの実施形態では、挿入は、特定のゲノム遺伝子座の一方のアレルで起こる。幾つかの実施形態では、挿入は、特定のゲノム遺伝子座の両方のアレルで起こる。これらの実施形態のいずれかでは、標的ゲノム遺伝子座に挿入される導入遺伝子の方向は、その遺伝子座における内在性遺伝子の方向と同じであり得るか、または反対であり得る。

【1443】

a. T R A C

T C Rは、低分子ペプチドとしてプロセッシングされ、抗原提示細胞（A P C）表面のM H C分子に結合した外来抗原を認識する。各T C Rは、1本の α 鎖及び1本の β 鎖（最もよく見られる）、または1本の δ 及び1本の γ 鎖からなる二量体である。T C R α 鎖をコードする遺伝子は、14番染色体にクラスターを形成している。T C R α 鎖は、N末端抗原認識ドメインをコードする少なくとも70個の可変部（V）遺伝子のうちの1つが、61個の連結部（J）遺伝子セグメントのうちの1つと再構成して、機能的可変領域を生成し、それが転写され、分子のC末端部分をコードする定常領域遺伝子セグメントにつなぎ合わされると形成される。一方で、 β 鎖は、V、D（多様部）、及びJセグメント遺伝子の組換えにより生成される。

【1444】

T R A C 遺伝子は、T C R α 鎖定常領域をコードする。ヒトT R A C 遺伝子は、14番染色体の22, 547, 506~22, 552, 156（フォワード鎖）に存在する。T R A C ゲノム配列は、Ensembl ID: ENSG00000277734に記載されている。

【1445】

b. T R B C 1 及び T R B C 2

T R B C 遺伝子は、T C R β 鎖定常領域をコードする。T R B C 1 及び T R B C 2 は、同じ遺伝子のアナログであり、T細胞は、T R B C 1 及び T R B C 2 のいずれかを相互に排他的に発現する。ヒトT R B C 1 遺伝子は、7番染色体の142, 791, 694~142, 793, 368（フォワード鎖）に存在し、そのゲノム配列は、Ensembl ID: ENSG00000211751に記載されている。ヒトT R B C 2 遺伝子は、7番染色体の142, 801, 041~142, 802, 748（フォワード鎖）に存在し、そのゲノム配列は、Ensembl ID: ENSG00000211772に記載されている。

【1446】

4. 第2の導入遺伝子の挿入のためのゲノム遺伝子座

幾つかの実施形態では、C A Rをコードする第2の導入遺伝子の挿入のためのゲノム遺伝子座は、（ランダムな挿入による）ランダムな遺伝子座または（部位特異的挿入による）特定の遺伝子座であり得る。特定の遺伝子座が望ましい場合、それは、第1の導入遺伝子の遺伝子座と同じであり得るか、または異なる遺伝子座であり得る。幾つかの実施形態では、C A Rをコードする第2の導入遺伝子の挿入のためのゲノム遺伝子座は、T R A C 遺伝子座、T R B C 1 遺伝子座、T R B C 2 遺伝子座、B 2 M 遺伝子座、C I I T A 遺伝子座、及びセーフハーバー遺伝子座からなる群から選択される特定の遺伝子座である。セーフハーバー遺伝子座の非限定的な例としては、限定されるものではないが、A A V S 1（PPP1R12Cとしても公知）、A B O、C C R 5、C L Y B L、C X C R 4、F 3（C D 1 4 2としても公知）、F U T 1、H M G B 1、K D M 5 D、L R P 1（C D 9 1としても公知）、M I C A、M I C B、R H D、R O S A 2 6、及びS H S 2 3 1 遺伝子座が挙げられる。幾つかの実施形態では、C A Rをコードする第2の導入遺伝子の挿入のためのゲノム遺伝子座は、T R A C 遺伝子座、T R B C 1 遺伝子座、T R B C 2 遺伝子座、B 2 M 遺伝子座、C I I T A 遺伝子座、A A V S 1（PPP1R12Cとしても公知）遺伝子座、A B O 遺伝子座、C C R 5 遺伝子座、C L Y B L 遺伝子座、a C X C R 4 遺伝子座、F 3（C D 1 4 2としても公知）遺伝子座、F U T 1 遺伝子座、H M G B 1 遺伝子座、K D M 5 D 遺伝子座、L R P 1（C D 9 1としても公知）遺伝子座、M I C A 遺伝子

座、MICB遺伝子座、RHD遺伝子座、ROSA26遺伝子座、またはSHS231遺伝子座を含む特定の遺伝子座である。第2の導入遺伝子は、限定されるものではないが、遺伝子コード領域（コード配列または「CDS」としても公知）、エキソン、イントロン、エキソンの一部及び隣接するイントロンの一部にまたがる配列、または調節領域（例えば、プロモーター、エンハンサー）が含まれる、記載される遺伝子座のいずれかの任意の好適な領域内に挿入され得る。幾つかの実施形態では、挿入は、ゲノム遺伝子座の一方のアレルで起こる。幾つかの実施形態では、挿入は、ゲノム遺伝子座の両方のアレルで起こる。これらの実施形態のいずれかでは、ゲノム遺伝子座に挿入される導入遺伝子の方向は、その遺伝子座における本来の遺伝子の方向と同じであり得るか、または反対であり得る。幾つかの実施形態では、第2の導入遺伝子は、第1の導入遺伝子と共に挿入され、例えば、第1の導入遺伝子及び第2の導入遺伝子は、多シストロン性ベクターにより保有される。

10

【1447】

5. 部位特異的挿入のためのガイドRNA (gRNA)

幾つかの実施形態では、特にCRISPR/Casシステムに関連する、本明細書において提供される種々の実施形態に従って導入遺伝子の部位特異的挿入に使用されるgRNAが提供される。gRNAは、crRNA配列を含み、そしてまたcrRNA配列は、関心対象の相補的な標的DNAを認識し、それに結合する相補的領域（スパーサーとも称される）を含む。スパーサーまたは相補的領域の長さは、一般的に15～30ヌクレオチド、通常約20ヌクレオチドの長さであるが、特定のCRISPR/Casシステムの必要条件に基づいて異なるであろう。ある特定の実施形態では、スパーサーまたは相補的領域は、標的DNA配列に完全に相補的である。他の実施形態では、スパーサーは、標的DNA配列に部分的に相補的であり、例えば、少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%相補的である。

20

【1448】

ある特定の実施形態では、本明細書において提供されるgRNAは、ヌクレアーゼへの結合のための足場領域を含むtracrRNA配列を更に含む。tracrRNAの長さ及び／または配列は、編集に使用される特定のヌクレアーゼに応じて異なり得る。ある特定の実施形態では、gRNAによるヌクレアーゼ結合は、tracrRNA配列を必要としない。gRNAがtracrRNAを含む実施形態では、crRNA配列は、tracrRNAの相補配列とのハイブリダイゼーションのための反復領域を更に含み得る。

30

【1449】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供されるgRNAは、2つ以上のgRNA分子、例えば、2つの別個の分子としてのcrRNA及びtracrRNAを含む。他の実施形態では、gRNAは、単一のRNA分子にcrRNA及びtracrRNAを含むsgRNAが含まれる、シングルガイドRNA (sgRNA) である。これらの実施形態の幾つかでは、crRNA及びtracrRNAは、介在するテトラループにより連結されている。

【1450】

幾つかの実施形態では、1種のgRNAが、関心対象の遺伝子座の標的編集のために部位特異的ヌクレアーゼと共に使用され得る。他の実施形態では、関心対象の同じ遺伝子座を標的とする2種以上のgRNAが、部位特異的ヌクレアーゼと共に使用され得る。

40

【1451】

幾つかの実施形態では、Cas9及びCas12b (C2c1) が含まれる、crRNA及びtracrRNAの両方を必要とする種々の一般的なCasヌクレアーゼと共に使用される例示的なgRNA（例えば、sgRNA）を表27に示す。例えば、Jinek et al., Science (2012) 337 (6096): 816-821、Dang et al., Genome Biology (2015) 16: 280、Ran et al., Nature (2015) 520: 186-191、Streck et al., Nature Comm. (2019) 10: 212を参照の

50

こと。例示的な各 *gRNA* について、相補的領域またはスパーサー、*crRNA* 反復領域、テトラループ、及び *tracrRNA* が含まれる、*gRNA* の異なる部分の配列を示す。幾つかの実施形態では、*gRNA* は、配列番号 324、325、326、327 に記載されるヌクレオチド配列の全体または一部を含む。幾つかの実施形態では、*gRNA* は、配列番号 328、329、330、331 に記載されるヌクレオチド配列の全体または一部を含む。幾つかの実施形態では、*gRNA* は、配列番号 332、333、334、335 に記載されるヌクレオチド配列の全体または一部を含む。幾つかの実施形態では、*gRNA* は、配列番号 336、337、338、339 に記載されるヌクレオチド配列の全体または一部を含む。

【 1 4 5 2 】

幾つかの実施形態では、gRNAは、配列番号325、配列番号329、配列番号333、または配列番号122Aに記載されるヌクレオチド配列を含むか、それからなるか、またはそれから本質的になるcrRNA反復領域を含む。幾つかの実施形態では、gRNAは、配列番号326または配列番号337に記載されるヌクレオチド配列を含むか、それからなるか、またはそれから本質的になるテトラループを含む。幾つかの実施形態では、gRNAは、配列番号327、配列番号331、配列番号335、または配列番号336に記載されるヌクレオチド配列を含むか、それからなるか、またはそれから本質的になるtracrRNAを含む。

【表 2 7 - 1】

表 27. CRISPR/Cas のための例示的な gRNA の構造及び配列

配列番号	配列 (5' → 3')	説明
324	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	s p C a s 9 1での例示的な相補的領域 (スパーサー)
325	guuuuagagcua	s p C a s 9 1での例示的な c r R N A 反復領域
326	gaaa	s p C a s 9 1での例示的なテトラループ
327	uagcaaguuaaaaauaaggcu aguccguuaucacucugaaaa gug gcaaccgagucggugcu uuuu	s p C a s 9 1での例示的な t r a c r R N A
328	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	s p C a s 9 2での例示的な相補的領域 (スパーサー)
329	guuusagagcuaugcug	s p C a s 9 2での例示的な c r R N A 反復領域
330	gaaa	s p C a s 9 2での例示的なテトラループ
331	cagcauagcaaguusaaauaa ggcuaguccguuaucacucug aaaa aguggcacccgagucgg ugcuuuuuuu	s p C a s 9 2での例示的な t r a c r R N A
332	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	s a C a s 9での例示的な相補的領域 (スパーサー)
333	guuuuaguaucucug	s a C a s 9での例示的な c r R N A 反復領域
334	gaaa	s a C a s 9での例示的なテトラループ
335	cagaauucauaaaaaacaaggc aaaaaugccguguuuuauucug ucaac uuguuggccggauiuu uu	s a C a s 9での例示的な t r a c r R N A

【表 2 7 - 2】

336	g u c g u c u a u a g g a c g g c g a g g a c a a c g g g a a g u g c c a a u g u g c u c u u u c c a a g a g c a a a c a c c c g u u g g c u u c a a g a u g a c c g c u c g	AkCas12bでの例示的な tracrRNA
337	a a a a	AkCas12bでの例示的な テトラループ
338	c g a g c g g u c u g a g a a g u g g c a c u	AkCas12bでの例示的な crRNA反復領域
339	n n n n n n n n n n n n n n n n n n n n	AkCas12bでの例示的な 相補的領域（スパーサー）

$s = c$ または g ; $n =$ 任意の塩基

【1453】

幾つかの実施形態では、gRNAは、関心対象の標的遺伝子座、例えば、TRAC遺伝子座、TRBC1遺伝子座、TRBC2遺伝子座、B2M遺伝子座、CIITA遺伝子座、またはAAVS1、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3、FUT1、HMB1、KDM5D、LRP1、MICA、MICB、RHD、ROSA26、及びSHS231遺伝子座からなる群から選択されるセーフハーバー遺伝子座に特異的な相補的領域を含む。相補的領域は、例えば、CDS、エキソン、イントロン、エキソンの一部及び隣接するイントロンの一部にまたがる配列、または調節領域（例えば、プロモーター、エンハンサー）が含まれる、標的遺伝子座の任意の領域の配列を結合し得る。標的配列がCDS、エキソン、イントロン、またはエキソン及びイントロンの一部にまたがる配列である場合、当該CDS、エキソン、イントロン、またはエキソン／イントロン境界は、標的遺伝子の任意のスプライスバリエーションに従って定義され得る。幾つかの実施形態では、gRNAにより標的とされるゲノム遺伝子座は、記載される遺伝子座またはその領域のいずれかの4000bpの範囲内、3500bpの範囲内、3000bpの範囲内、2500bpの範囲内、2000bpの範囲内、1500bpの範囲内、1000bpの範囲内、または500bpの範囲内に存在する。更に、本明細書において提供される1種以上のgRNA、及びCasタンパク質またはCasタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む組成物が本明細書において提供される。これらの実施形態の幾つかでは、1種以上のgRNA及びCasタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、ベクター、例えば、ウイルスベクターに含まれる。

10

20

【1454】

幾つかの実施形態では、記載されるような部位特異的ゲノム挿入手法に使用するための新規の遺伝子座及び／またはgRNA配列を同定する方法が提供される。例えば、CRISPR／Casシステムでは、（例えば、内在性TCR遺伝子座内の）特定の位置に対する既存のgRNAが公知である場合、ゲノム全体で約100塩基対（bp）毎に通常出現するPAM配列の遺伝子座の両側の隣接領域を調査することにより、導入遺伝子の標的化挿入のための追加の位置を同定する「インチワーマーキング」手法が使用され得る。異なるヌクレアーゼが異なる対応するPAM配列を通常有するため、PAM配列は、使用される特定のCasヌクレアーゼに依存する。遺伝子座の両側の隣接領域は、約500～4000bpの長さ、例えば、約500bp、約1000bp、約1500bp、約2000bp、約2500bp、約3000bp、約3500bp、または約4000bpの長さであり得る。PAM配列が調査範囲内で同定される場合、導入遺伝子の部位特異的挿入に使用される新規のガイドがその遺伝子座の配列に従って設計され得る。CRISPR／Casシステムが例示として記載されているが、ZFN、TALEN、メガヌクレアーゼ、及びトランスポザナーゼを使用するものが含まれる、記載されている任意の遺伝子編集手法が新規の遺伝子座を同定する方法に使用され得る。

30

【1455】

幾つかの実施形態では、gRNAの活性、安定性、及び／または他の特徴は、化学的修飾及び／または配列の改変を組み込むことにより改変され得る。一例として、一過性に発現されるか、または送達される核酸は、例えば、細胞のヌクレアーゼによる分解を受けやすい場合がある。従って、本明細書に記載されるgRNAは、ヌクレアーゼに対する安定性を導入する1個以上の修飾ヌクレオチドまたはヌクレオチドを含有し得る。特定の理論に拘束されるものではないが、本明細書に記載されるある特定の修飾gRNAは、細胞、特に本技術の細胞の集団に導入される場合に、低減された自然免疫応答を示し得ると考えられる。本明細書で使用する場合、用語「自然免疫応答」は、サイトカイン、例えば、インターフェロンの発現及び放出、ならびに細胞死の誘導を伴う、外来性核酸、例えば、通常はウイルスまたは細菌起源である一本鎖核酸に対する細胞応答を包含する。安定性を改善するため、ヌクレアーゼ耐性を増強するため、及び／または免疫応答を低減するためのgRNAの他の一般的な化学修飾としては、2'-O-メチル修飾、2'-フルオロ修飾、2'-O-メチルホスホロチオエート結合修飾、及び2'-O-メチル-3'-チオPAC

40

50

E 修飾が挙げられる。

【1456】

1つの一般的な3'末端修飾は、1個以上（かつ通常5～200個）のアデニン（A）残基を含むポリ（A）鎖の付加である。ポリ（A）鎖は、gRNAをコードする核酸配列に含まれ得るか、または化学合成時、もしくはインビトロでの転写後に、ポリアデノシンポリメラーゼ（例えば、E. coliポリ（A）ポリメラーゼ）を使用してgRNAに付加され得る。インビボでは、ポリ（A）鎖は、ポリアデニル化シグナルを使用することによりDNAベクターから転写された配列に付加され得る。かかるシグナルの例は、Maderにおいて提供される。他の好適なgRNA修飾としては、限定されるものではないが、米国特許出願第US2017/0073674A1号及び国際公開第WO 2017/165862A1号（これらの各々の全内容は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものが挙げられる。

10

【1457】

幾つかの実施形態では、本明細書において開示されるようなgRNAを設計するためのツールには、Benchling、Broad Institute GPP、CasOFFinder、CHOPCHOP、CRISPick、CRISPOR、Deskgen、E-CRISP、Geneious、Guides、Horizon Discovery、IDT、Off-Spotter、Synthego、またはTrueDesign（ThermoFisher）が含まれる。当業者は、（例えば、オフターゲット改変を抑えるために）活性及び特異性を予測するツールが、本明細書において開示されるある特定の例におけるgRNAを設計するのに有用であることを理解するであろう。

20

【1458】

F. 宿主細胞への遺伝子編集システムの送達

幾つかの実施形態では、1種以上のgRNA、部位特異的ヌクレアーゼ（例えば、Casヌクレアーゼ）または部位特異的ヌクレアーゼタンパク質をコードするヌクレオチド配列、及び標的化挿入のための導入遺伝子が含まれる、本明細書に記載される遺伝子編集システムの1つ以上の構成要素を含む組成物が提供される。幾つかの実施形態では、組成物は、細胞への送達用に製剤化される。

【1459】

幾つかの実施形態では、1種以上のgRNA、部位特異的ヌクレアーゼ（例えば、Casヌクレアーゼ）または部位特異的ヌクレアーゼタンパク質をコードするヌクレオチド配列、及び標的化挿入のための導入遺伝子（例えば、免疫寛容誘導因子をコードする第1の導入遺伝子及び／またはCARをコードする第2の導入遺伝子）が含まれる、本明細書において提供される遺伝子編集システムの構成要素は、送達ベクターの形態で細胞に送達され得る。送達ベクターは、例えば、プラスミド、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ファージ、及びHDRに基づくドナーベクターが含まれる、細胞へのヌクレオチド配列の導入に適した任意の種類のベクターであり得る。異なる構成要素は、一緒にまたは別々に細胞に導入され得、単一のベクターまたは複数のベクターで送達され得る。

30

【1460】

幾つかの実施形態では、送達ベクターは、例えば、ウイルス形質転換、リン酸カルシウム形質移入、脂質により媒介される形質移入、DEAE-デキストラン、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、ヌクレオポレーション、リポソーム、ナノ粒子、または他の方法が含まれる、当分野において公知の任意の方法により細胞に導入され得る。

40

【1461】

幾つかの実施形態では、本技術は、本明細書において開示される種々の実施形態による送達ベクターを含む組成物を提供する。幾つかの実施形態では、組成物は、1種以上の薬学的に許容される担体、賦形剤、防腐剤、またはそれらの組み合わせを更に含み得る。「薬学的に許容される担体または賦形剤」は、関心対象の化合物を身体のある組織、器官、

50

または一部から身体の別の組織、器官、または一部に移動させるか、または輸送することに関与する、薬学的に許容される物質、組成物、またはビヒクルを指す。例えば、担体または賦形剤は、液体もしくは固体の充填剤、希釈剤、賦形剤、溶媒、または封入材料、またはそれらの幾つかの組み合わせであり得る。担体または賦形剤の各成分は、製剤の他の成分と適合可能でなければならないという点で「薬学的に許容可能」でなければならない。担体または賦形剤の各成分は、これが遭遇し得る身体の任意の組織、器官、または一部との接触にも適していなければならず、これは、各成分が毒性、刺激、アレルギー応答、免疫原性、または治療効果を過度に上回る任意の他の合併症のリスクを伴ってはならないことを意味する。好適な賦形剤としては、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロールなど、及びそれらの組み合わせが挙げられる。幾つかの実施形態では、本明細書において開示される細胞を含む組成物は、好適な注入媒体を更に含む。

10

【1462】

幾つかの実施形態では、1種以上のgRNA、部位特異的ヌクレアーゼ（例えば、Casヌクレアーゼ）または部位特異的ヌクレアーゼタンパク質をコードするヌクレオチド配列、及び標的化挿入のための導入遺伝子が含まれる、本明細書に記載される遺伝子編集システムの1つ以上の構成要素を含む細胞またはその組成物が提供される。

【1463】

E. 遺伝子操作された細胞の例示的な実施形態

上述したように、本明細書において開示されるドナーの能力について細胞集団をプロファイリングするための方法は、有利には、細胞療法製品を製造するための方法全体の一部を構成し得る。細胞療法を作製する過程で、例えば、細胞が免疫認識を回避するのを補助するために、細胞療法製品に望ましいと考えられるある特定の改変が細胞に導入され得ることが理解されよう。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞及びその集団は、MHCクラスI及び／またはMHCクラスII分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現を示す。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞及びその集団は、少なくとも1種の免疫寛容誘導因子の増強された発現を示す。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞及びその集団は、MHCクラスI及び／またはMHCクラスII分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現、ならびに少なくとも1種の免疫寛容誘導因子の増強された発現を示す。

20

【1464】

幾つかの実施形態では、細胞（例えば、遺伝子操作されたβ脾島細胞、肝実質細胞、または移植時に血液と接触する他の細胞種）及びその集団は、CD47の増強された発現を示し、少なくとも1種の免疫寛容誘導因子の増強された発現、及びMHCクラスI複合体の1種以上の分子の低減された発現を有する。幾つかの実施形態では、細胞及びその集団は、CD47の増強された発現、少なくとも1種の免疫寛容誘導因子の増強された発現、ならびにMHCクラスI及び／またはMHCクラスII複合体のうちの1つ以上の分子の低減された発現を示す。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、CD46、CD59、DAF／CD55、及びそれらの任意の組み合わせから選択される1種以上の外来性補体阻害ポリペプチドを発現する。幾つかの実施形態では、少なくとも1種の免疫寛容誘導因子は、本明細書に記載される免疫寛容誘導因子のうちの少なくとも1種である。

30

40

【1465】

F. 低免疫原性多能性幹細胞から分化した治療細胞

本明細書において、免疫認識を回避する多能性幹細胞に由来する細胞が含まれる、低免疫原性細胞が提供される。幾つかの実施形態では、細胞は、患者または対象（例えば、投与された際のレシピエント）において自然免疫及び／または適応免疫応答を活性化しない。障害を処置する方法であって、障害を処置する必要があるレシピエント対象に低免疫原性細胞の集団を反復投与することを含む、当該方法が提供される。

【1466】

幾つかの実施形態では、多能性幹細胞及びこのような多能性幹細胞から分化した任意の細胞は、MHCクラスIヒト白血球抗原の低減された発現を示すように改変される。他の

50

実施形態では、多能性幹細胞及びこのような多能性幹細胞から分化した任意の細胞は、MHCクラスIIヒト白血球抗原の低減された発現を示すように改変される。ある特定の実施形態では、多能性幹細胞及びこのような多能性幹細胞から分化した任意の細胞は、TCR複合体の低減された発現を示すように改変される。幾つかの実施形態では、多能性幹細胞及びこのような多能性幹細胞から分化した任意の細胞は、MHCクラスI及びIIヒト白血球抗原の低減された発現を示すように改変される。幾つかの実施形態では、多能性幹細胞及びこのような多能性幹細胞から分化した任意の細胞は、MHCクラスI及びIIヒト白血球抗原ならびにTCR複合体の低減された発現を示すように改変される。

【1467】

幾つかの実施形態では、多能性幹細胞及びこのような多能性幹細胞から分化した任意の細胞は、MHCクラスI及び／またはIIヒト白血球抗原の低減された発現を示し、増強されたCD47発現を示すように改変される。幾つかの例では、細胞は、1種以上のCD47導入遺伝子を保有することによりCD47を過剰発現する。幾つかの実施形態では、多能性幹細胞及びこのような多能性幹細胞から分化した任意の細胞は、MHCクラスI及びIIヒト白血球抗原の低減された発現を示し、増強されたCD47発現を示すように改変される。幾つかの実施形態では、多能性幹細胞及びこのような多能性幹細胞から分化した任意の細胞は、MHCクラスI及びIIヒト白血球抗原ならびにTCR複合体の低減された発現を示し、増強されたCD47発現を示すように改変される。

【1468】

幾つかの実施形態では、多能性幹細胞及びこのような多能性幹細胞から分化した任意の細胞は、MHCクラスI及び／またはIIヒト白血球抗原の低減された発現を示し、増強されたCD47発現を示し、キメラ抗原受容体を外来性に発現するように改変される。幾つかの例では、細胞は、1種以上のCD47導入遺伝子を保有することによりCD47ポリペプチドを過剰発現する。幾つかの例では、細胞は、1種以上のCAR導入遺伝子を保有することによりCARポリペプチドを過剰発現する。幾つかの実施形態では、多能性幹細胞及びこのような多能性幹細胞から分化した任意の細胞は、MHCクラスI及びIIヒト白血球抗原の低減された発現を示し、増強されたCD47発現を示し、キメラ抗原受容体を外来性に発現するように改変される。幾つかの実施形態では、多能性幹細胞及びこのような多能性幹細胞から分化した任意の細胞は、MHCクラスI及びIIヒト白血球抗原ならびにTCR複合体の低減された発現を示し、増強されたCD47発現を示し、キメラ抗原受容体を外来性に発現するように改変される。

【1469】

かかる多能性幹細胞は低免疫原性幹細胞である。かかる分化した細胞は低免疫原性細胞である。

【1470】

本明細書に記載される多能性幹細胞のいずれかは、生物及び組織の任意の細胞に分化され得る。幾つかの実施形態では、細胞は、MHCクラスI及び／またはIIヒト白血球抗原の低減された発現、ならびにTCR複合体の低減された発現を示す。幾つかの例では、MHCクラスI及び／またはIIヒト白血球抗原の発現は、同じ細胞種の未改変細胞または野生型細胞と比較して低減される。幾つかの例では、TCR複合体の発現は、同じ細胞種の未改変細胞または野生型細胞と比較して低減される。幾つかの実施形態では、細胞は、増強されたCD47発現を示す。幾つかの例では、CD47の発現は、本開示により包含される細胞において、同じ細胞種の未改変細胞または野生型細胞と比較して増強される。幾つかの実施形態では、細胞は、外来性CAR発現を示す。MHCクラスI及び／またはIIヒト白血球抗原ならびにTCR複合体のレベルを低減し、CD47及びCARの発現を増強するための方法が本明細書に記載される。

【1471】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される方法に使用される細胞は、患者（例えば、レシピエント対象）に投与される場合に、免疫認識及び応答を回避する。細胞は、インビトロ及びインビボで免疫細胞による殺傷を回避することができる。幾つかの実施形態で

10

20

30

40

50

は、細胞は、マクロファージ及びNK細胞による殺傷を回避する。幾つかの実施形態では、細胞は、免疫細胞または対象の免疫系により無視される。換言すれば、本明細書に記載される方法により投与される細胞は、免疫系の免疫細胞によって検出可能ではない。幾つかの実施形態では、細胞は、隠蔽され、これにより、免疫拒絶反応を回避する。

【1472】

多能性幹細胞及びこのような多能性幹細胞から分化した任意の細胞が免疫認識を回避するかどうかを決定する方法としては、限定されるものではないが、IFN- γ ELISpotアッセイ、ミクログリア殺傷アッセイ、細胞移植動物モデル、サイトカイン放出アッセイ、ELISA、生物発光イメージング使用した殺傷アッセイ、またはクロム放出アッセイ、または細胞分析のためのリアルタイム定量マイクロエレクトロニクスバイオセンサーシステム (xCELLigence (登録商標) RTCAシステム、Agilent)、混合リンパ球反応、免疫蛍光分析などが挙げられる。

10

【1473】

本明細書において概説される治療細胞は、障害、例えば、限定されるものではないが、がん、遺伝的障害、慢性感染性疾患、自己免疫障害、神経障害などを処置するのに有用である。

【1474】

1. 低免疫原性多能性細胞から分化したTリンパ球

本明細書において提供されるTリンパ球 (初代T細胞が含まれるT細胞) は、本明細書に記載されるHIP細胞 (例えば、低免疫原性iPSC) に由来する。CAR-T細胞が含まれるT細胞を多能性幹細胞 (例えば、iPSC) から作製するための方法は、例えば、Iriguchi et al., Nature Communications 12, 430 (2021)、Themeli et al., Cell Stem Cell, 16 (4): 357-366 (2015)、Themeli et al., Nature Biotechnology 31: 928-933 (2013) に記載されている。

20

【1475】

Tリンパ球に由来する低免疫原性細胞としては、限定されるものではないが、免疫認識を回避する初代T細胞が挙げられる。幾つかの実施形態では、低免疫原性細胞は、初代T細胞などのT細胞から作製される (例えば、T細胞から生成されるか、それから培養されるか、それに由来する)。幾つかの例では、初代T細胞は、対象または個体から取得される (例えば、収集されるか、抽出されるか、取り出されるか、または採取される)。幾つかの実施形態では、初代T細胞は、T細胞が1人以上の対象 (例えば、1人以上の健常なヒトが含まれる、1人以上のヒト) に由来するように、T細胞のプールから作製される。幾つかの実施形態では、初代T細胞のプールは、1~100人、1~50人、1~20人、1~10人、1人以上、2人以上、3人以上、4人以上、5人以上、10人以上、20人以上、30人以上、40人以上、50人以上、または100人以上の対象に由来する。幾つかの実施形態では、ドナー対象は、患者 (例えば、治療細胞を投与されるレシピエント) と異なる。幾つかの実施形態では、T細胞のプールは、患者由来の細胞を含まない。幾つかの実施形態では、T細胞のプールが採取されるドナー対象のうちの1人以上は、患者と異なる。

30

40

【1476】

幾つかの実施形態では、低免疫原性細胞は、患者 (例えば、投与された際のレシピエント) において免疫応答を活性化しない。障害を処置する必要がある対象 (例えば、レシピエント) または患者に低免疫原性細胞の集団を投与することにより障害を処置する方法が提供される。幾つかの実施形態では、本明細書に記載される低免疫原性細胞は、限定されるものではないが、本明細書に記載されるキメラ抗原受容体が含まれる、キメラ抗原受容体を発現するように遺伝子操作された (例えば、改変されている) T細胞を含む。幾つかの例では、T細胞は、1人以上の個体由来の初代T細胞の集団または亜集団である。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるT細胞、例えば、遺伝子操作または改変された

50

T細胞は、内在性T細胞受容体の低減された発現を含む。

【1477】

幾つかの実施形態では、HIPに由来するT細胞は、キメラ抗原受容体(CAR)を含む。本明細書に記載されるCARが含まれる、任意の好適なCARがhyHIPに由来するT細胞に含まれ得る。幾つかの実施形態では、低免疫原性人工多能性幹細胞に由来するT細胞は、CARをコードするポリヌクレオチドを含み、ここで、当該ポリヌクレオチドは、ゲノム遺伝子座に挿入されている。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、セーフハーバー遺伝子座または標的遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、B2M、CIITA、TRAC、TRB、PD-1、またはCTLA-4遺伝子に挿入される。本明細書に記載される遺伝子編集法(例えば、CRISPR/Casシステム)が含まれる、低免疫原性細胞のゲノム遺伝子座にCARを挿入するための任意の好適な方法が使用され得る。

10

【1478】

本明細書において提供されるHIPに由来するT細胞は、限定されるものではないが、B細胞急性リンパ芽球性白血病(B-ALL)、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、肝臓癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、結腸直腸癌、肺癌、非小細胞肺癌、急性骨髄性リンパ性白血病、多発性骨髄腫、胃癌、胃腺癌、膵臓腺癌、神経膠芽腫、神経芽細胞腫、肺扁平上皮細胞癌、肝細胞癌、及び膀胱癌が含まれる、好適な癌の処置に有用である。

【1479】

2. 低免疫原性多能性細胞に由来するNK細胞

20

本明細書において提供されるナチュラルキラー(NK)細胞は、本明細書に記載されるHIP細胞(例えば、低免疫原性iPSC)に由来する。

【1480】

NK細胞(「大型顆粒リンパ球」とも定義される)は、リンパ球系共通前駆細胞(これはBリンパ球及びTリンパ球も生じさせる)から分化した細胞系譜である。T細胞と異なり、NK細胞は、形質膜にCD3を天然に含まない。重要なことに、NK細胞は、TCRを発現せず、通常、他の抗原特異的細胞表面受容体(ならびにTCR及びCD3)も欠く(それらは免疫グロブリンB細胞受容体も発現せず、その代わりにCD16及びCD56を典型的に発現する)。NK細胞の細胞傷害活性は、感作を必要としないが、IL-2が含まれる、種々のサイトカインによる活性化により増強される。NK細胞は、通常、抗原受容体により媒介されるシグナル伝達に必要なまたは完全なシグナル伝達経路を欠いていると考えられており、従って、抗原受容体に依存的なシグナル伝達、活性化、及び増殖ができないと考えられている。NK細胞は細胞傷害性であり、活性化受容体及び抑制性受容体シグナル伝達のバランスを保って、それらの細胞傷害活性を調節する。例えば、CD16を発現するNK細胞は、感染細胞に結合した抗体のFcドメインに結合し得、これにより、NK細胞活性化をもたらす。対照的に、高レベルのMHCクラスIタンパク質を発現する細胞に対しては、活性が低減される。標的細胞との接触時、NK細胞は、パーフォリンなどのタンパク質、及びプロテアーゼ(グランザイム)などの酵素を放出する。パーフォリンは、標的細胞の細胞膜に細孔を形成することができ、これにより、アポトーシスまたは細胞溶解を誘発する。

30

40

【1481】

CAR-NK細胞が含まれる、NK細胞を多能性幹細胞(例えば、iPSC)から作製するために使用され得る多数の技術が存在する。例えば、Zhu et al., Methods Mol Biol. 2019; 2048: 107-119、Knorr et al., Stem Cells Transl Med. 2013 2(4): 274-83. doi: 10.5966/sctm.2012-0084、Zeng et al., Stem Cell Reports. 2017 Dec 12; 9(6): 1796-1812、Ni et al., Methods Mol Biol. 2013; 1029: 33-41、Bernareggi et al., Exp Hematol. 2019 71: 13-23、Shankar et al., Stem Cell R

50

es Ther. 2020; 11 (1) : 234 (これらの全ては、それらの全体が、かつ特に分化のための方法及び試薬について参照により本明細書に組み込まれる) を参照のこと。当該技術分野において公知のように、分化は、通常、限定されるものではないが、CD56、KIR、CD16、NKp44、NKp46、NKG2D、TRAIL、CD122、CD27、CD244、NK1.1、NKG2A/C、NCR1、Ly49、CD49b、CD11b、KLRG1、CD43、CD62L、及び／またはCD226が含まれる、NK細胞関連マーカー及び／または特異的マーカーの存在を評価することにより分析され得る。

【1482】

幾つかの実施形態では、低免疫原性多能性細胞は、肝細胞機能の喪失または肝硬変に対処するために、肝実質細胞に分化される。HIP細胞を肝実質細胞に分化させるために使用され得る多数の技術が存在する。例えば、Pettinato et al., doi : 10.1038/spre32888, Snykers et al., Methods Mol Biol., 2011 698:305-314、Si-Tayeb et al., Hepatology, 2010, 51:297-305、及びAsgari et al., Stem Cell Rev., 2013, 9(4):493-504 (これらの全ては、それらの全体が、かつ特に分化のための方法及び試薬について参照により本明細書に組み込まれる) を参照のこと。当該技術分野において公知のように、分化は、通常、限定されるものではないが、アルブミン、 α フェトプロテイン、及びフィブリノゲンが含まれる、肝細胞関連マーカー及び／または特異的マーカーの存在を評価することにより分析され得る。分化は、アンモニアの代謝、LDL貯蔵及び取り込み、ICG取り込み及び放出、ならびにグリコーゲン蓄積など、機能的に測定することもできる。

【1483】

幾つかの実施形態では、NK細胞は、患者（例えば、投与された際のレシピエント）において自然免疫及び／または適応免疫応答を活性化しない。障害を処置する必要がある対象（例えば、レシピエント）または患者にNK細胞の集団を投与することにより障害を処置する方法が提供される。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるNK細胞は、限定されるものではないが、本明細書に記載されるキメラ抗原受容体が含まれる、キメラ抗原受容体を発現するように遺伝子操作された（例えば、改変されている）NK細胞を含む。本明細書に記載されるCARが含まれる、任意の好適なCARがNK細胞に含まれ得る。幾つかの実施形態では、NK細胞は、CARをコードするポリヌクレオチドを含み、ここで、当該ポリヌクレオチドは、ゲノム遺伝子座に挿入されている。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、セーフハーバー遺伝子座または標的遺伝子座に挿入される。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、B2M、CIITA、PD1、またはCTLA4遺伝子に挿入される。本明細書に記載される遺伝子編集法（例えば、CRISPR/Casシステム）が含まれる、NK細胞のゲノム遺伝子座にCARを挿入するための任意の好適な方法が使用され得る。

【1484】

G. 低免疫原性表現型及び多能性保持についてのアッセイ

低免疫原性細胞が作製されたら、それらは、WO2016183041及びWO2018132783に記載されるように、低免疫原性及び／または多能性の保持について分析され得る。

【1485】

幾つかの実施形態では、低免疫原性は、WO2018132783の図13及び図15に例示されるような多数の技術を使用して分析される。これらの技術は、同種異系宿主への移植及び宿主免疫系を回避する低免疫原性多能性細胞の増殖（例えば、奇形腫）のモニタリングを含む。幾つかの例では、低免疫原性多能性細胞派生物は、ルシフェラーゼを発現するように形質導入され、次いで、生物発光イメージングを使用して追跡され得る。同様に、細胞が宿主動物において免疫応答を引き起こさないことを確認するために、かかる細胞に対する宿主動物のT細胞及び／またはB細胞の反応が試験される。T細胞応答は、

E l i s p o t、E L I S A、F A C S、P C R、またはマスサイトメトリー (C Y T O F) により評価され得る。B細胞応答または抗体応答は、F A C SまたはL u m i n e xを使用して評価される。追加的または代替的に、細胞は、自然免疫応答、例えば、N K細胞による殺傷を回避するそれらの能力について、W O 2 0 1 8 1 3 2 7 8 3の図14及び15に一般的に示されるように分析され得る。

【1486】

幾つかの実施形態では、細胞の免疫原性は、当業者により理解されるT細胞免疫アッセイ、例えば、T細胞増殖アッセイ、T細胞活性化アッセイ、及びT細胞殺傷アッセイを使用して評価される。幾つかの例では、T細胞増殖アッセイは、細胞をインターフェロニンで前処理すること、及び細胞を標識されたT細胞と共培養すること、及び事前に設定した期間後にT細胞集団（または増殖性T細胞集団）の存在を分析することを含む。幾つかの例では、T細胞活性化アッセイは、T細胞を本明細書において概説される細胞と共培養すること、及びT細胞におけるT細胞活性化マーカーの発現レベルを測定することを含む。

10

【1487】

本明細書において概説される細胞の免疫原性を評価するために、インビボアッセイが実行され得る。幾つかの実施形態では、低免疫原性細胞の生存及び免疫原性は、同種異系ヒト化免疫不全マウスモデルを使用して測定される。幾つかの例では、低免疫原性多能性幹細胞が同種異系ヒト化N S G－S G M 3マウスに移植され、細胞拒絶反応、細胞生存、及び奇形腫形成について分析される。幾つかの例では、移植された低免疫原性多能性幹細胞またはその分化した細胞は、マウスモデルにおいて長期生存を示す。

20

【1488】

細胞の低免疫原性が含まれる、免疫原性を測定するための更なる技術は、例えば、D e u s e t a l. , N a t u r e B i o t e c h n o l o g y , 2 0 1 9 , 3 7 , 2 5 2－2 5 8及びH a n e t a l. , P r o c N a t l A c a d S c i U S A , 2 0 1 9 , 1 1 6 (2 1) , 1 0 4 4 1－1 0 4 4 6に記載されており、それらの開示は、図、図の凡例、及び方法の説明を含め、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【1489】

同様に、多能性の保持は多数の方法で試験される。幾つかの実施形態では、多能性は、本明細書において一般的に記載され、W O 2 0 1 8 1 3 2 7 8 3の図29に示されるような、ある特定の多能性特異的因子の発現により分析される。追加的または代替的に、多能性細胞は、多能性の指標として1つ以上の細胞種に分化される。

30

【1490】

当業者によって理解されるように、多能性細胞におけるM H C I機能（細胞がヒト細胞に由来する場合はH L A I）の低減の成功は、当該技術分野において公知の、かつ下記で述べる様な技術、例えば、H L A複合体に結合する標識抗体を使用した、例えば、ヒトの主要組織適合H L AクラスI抗原のα鎖に結合する市販のH L A－A、H L A－B、及びH L A－C抗体を使用したF A C S技術を使用して測定され得る。

【1491】

加えて、細胞は、H L A－I複合体が細胞表面に発現しないことを確認するために試験され得る。これは、上記のように1種以上のH L A細胞表面成分に対する抗体を使用したF A C S分析により分析され得る。

40

【1492】

多能性細胞またはそれらの派生物におけるM H C I I機能（細胞がヒト細胞に由来する場合はH L A I I）の低減の成功は、当該技術分野において公知の技術、例えば、タンパク質に対する抗体を使用したウェスタンブロット法、F A C S技術、R T－P C R技術などを使用して測定され得る。

【1493】

加えて、細胞は、H L A－I I複合体が細胞表面に発現しないことを確認するために試験され得る。また、このアッセイは、当該技術分野において公知のように実行され（例え

50

ば、WO2018132783の図21を参照のこと）、通常、ヒトHLAクラスII HLA-DR、DP、及びほとんどのDQ抗原に結合する市販の抗体に基づくウェスタンブロットまたはFACS分析のいずれかを使用して行われ得る。

【1494】

HLA I及びII（またはMHC I及びII）の低減に加えて、本技術の低免疫原性細胞は、マクロファージによる貪食及びNK細胞による殺傷に対する低減された感受性を有する。得られる低免疫原性細胞は、TCR複合体の低減または欠如及び1種以上のCD47導入遺伝子の発現に起因して、免疫マクロファージ及び自然免疫経路を「回避」する。

【1495】

幾つかの態様では、本技術は、本明細書において開示される種々の実施形態による方法により得られるか、または作製されるT細胞、例えば、免疫回避性同種異系T細胞を提供する。幾つかの実施形態では、作製されたT細胞は、それらが（例えば、免疫寛容誘導因子を内在性TCR遺伝子座に挿入することにより、及び／または記載されるようにMHC I及び／またはMHC II遺伝子を改変することにより）免疫回避性となり、1種以上のCARを発現するように作製されたため、養子細胞療法に使用するのに適している。

【1496】

幾つかの実施形態では、T細胞は、ナイーブT細胞、ヘルパーT細胞（CD4+）、細胞傷害性T細胞（CD8+）、制御性T細胞（Treg）、セントラルメモリーT細胞（TCM）、エフェクターメモリーT細胞（TEM）、幹細胞メモリーT細胞（TSCM）、またはそれらの任意の組み合わせである。より具体的には、T細胞は、ナイーブ（抗原に曝露されていない；TCMと比較して、CD62L、CCR7、CD28、CD3、CD127、及びCD45RAの発現が増加しており、CD45ROの発現が減少している）、メモリーT細胞（抗原を経験しており、長寿命である）、及びエフェクター細胞（抗原を経験しており、細胞傷害性である）であり得る。メモリーT細胞は、TCM（ナイーブT細胞と比較して、CD62L、CCR7、CD28、CD127、CD45RO、及びCD95の発現が増加しており、CD54RAの発現が減少している）及びTEM（ナイーブT細胞またはTCMと比較して、CD62L、CCR7、CD28、CD45RAの発現が減少しており、CD127の発現が増加している）のサブセットに更に分類され得る。エフェクターT細胞は、TCMと比較して、CD62L、CCR7、CD28の発現が減少しており、グランザイン及びパーフォリンについて陽性である、抗原を経験したCD8+細胞傷害性T細胞を指す。ヘルパーT細胞は、サイトカインを放出することにより他の免疫細胞の活性に影響を及ぼすCD4+細胞である。CD4+T細胞は、適応免疫応答を活性化及び抑制することができ、それら2つの機能のどちらが誘導されるかは、他の細胞及びシグナルの存在に依存する。T細胞は、公知の技術を使用して採取され得、様々な亜集団またはそれらの組み合わせは、公知の技術により、例えば、抗体に対する結合親和性、フローサイトメトリー、または免疫磁気選択により濃縮または枯渇され得る。

【1497】

幾つかの実施形態では、T細胞は、自家細胞であり、すなわち、改変後にT細胞を投与される対象から採取される。幾つかの実施形態では、T細胞は、同種異系T細胞であり、すなわち、改変後にT細胞を投与される対象以外の人から採取される。これらの実施形態のいずれかでは、T細胞は、末梢血単核細胞、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位由来の組織、腹水、胸水、脾臓組織、及び腫瘍が含まれる、多数の供給源から取得された初代T細胞であり得る。他の実施形態では、特に同種異系T細胞の場合、T細胞は、胚性幹細胞（ESC）または人工多能性細胞（iPSC）に由来し得るか、またはそれから分化され得る。

【1498】

幾つかの態様では、本技術は、本明細書において開示される種々の実施形態によるT細胞を含む医薬組成物を提供する。

【1499】

幾つかの実施形態では、組成物は、好適な投与経路に応じて、注射製剤、凍結乾燥製剤、液体製剤、経口製剤などの様々な製剤形態を有し得る。

【1500】

幾つかの実施形態では、組成物は、同じ用量単位に共製剤化され得るか、または別個の用量単位に個別に製剤化され得る。本明細書において、用語「用量単位 (dose unit)」及び「用量単位 (dosage unit)」は、治療効果をもたらすための単回の投与に適した量の治療薬を含有する医薬組成物の一部を指す。かかる用量単位は、1日当たり1回～複数回（すなわち、1～10回、1～8回、1～6回、1～4回、または1～2回）投与され得るか、または治療反応を誘発するのに必要とされる回数投与され得る。

10

【1501】

幾つかの実施形態では、単一の用量単位は、少なくとも約 1×10^2 、 5×10^2 、 1×10^3 、 5×10^3 、 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、または 5×10^{10} 個の細胞を含む。

【1502】

幾つかの実施形態では、提供される遺伝子操作された細胞は、患者（例えば、レシピエント対象）に投与される場合に、それらが免疫認識及び応答を回避することができるように改変される。細胞は、インビトロ及びインビボで免疫細胞による殺傷を回避することができる。幾つかの実施形態では、細胞は、マクロファージ及びNK細胞による殺傷を回避する。幾つかの実施形態では、細胞は、免疫細胞または対象の免疫系により無視される。換言すれば、本明細書に記載される方法により投与される細胞は、免疫系の免疫細胞によって検出可能ではない。幾つかの実施形態では、細胞は、隠蔽され、これにより、免疫拒絶反応を回避する。

20

【1503】

本明細書において提供される遺伝子操作された細胞が免疫認識を回避するかどうかを決定する方法としては、限定されるものではないが、IFN- γ ELISpotアッセイ、ミクログリア殺傷アッセイ、細胞移植動物モデル、サイトカイン放出アッセイ、ELISA、生物発光イメージング使用した殺傷アッセイ、またはクロム放出アッセイ、またはxCeLLigence解析、混合リンパ球反応、免疫蛍光分析などが挙げられる。

30

【1504】

幾つかの実施形態では、細胞の免疫原性は、補体依存性細胞傷害 (CDC) アッセイで評価される。CDCは、補体を含有する血清の存在下で、細胞表面に発現されるHLA非依存的な抗原を標的とするIgGまたはIgM抗体と共に細胞をインキュベートし、細胞殺傷を分析することによりインビトロで分析され得る。幾つかの実施形態では、CDCは、ABO式血液型不適合血清と共に細胞をインキュベートすることにより分析され得、ここで、細胞はA抗原またはB抗原を含み、血清は、細胞のA抗原及び／またはB抗原に対する抗体を含む。

【1505】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞が本明細書に記載されるように改変または作製されたら、それらは低免疫原性について分析され得る。種々のアッセイのいずれかが、細胞が低免疫原性かどうか、または免疫系を回避することができるかどうかを評価するために使用され得る。例示的なアッセイとしては、WO2016183041及びWO2018132783に記載されるような任意のものが挙げられる。幾つかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子操作された細胞は、宿主免疫応答を刺激することなく、宿主において1週間以上（例えば、1週間、2週間、1ヵ月、2ヵ月、3ヵ月、6ヵ月、1年、2年、3年、4年、5年、またはそれ以上、例えば、細胞及び／またはその子孫の生存期間の間）生存する。細胞は、それらが宿主内で生存する間、導入遺伝子の発現を維持し、及び／または標的遺伝子の発現が欠失しているか、もしくは低減される。幾つかの態様では、導入遺伝子がもはや発現されない場合、及び／または標的遺伝子が発現される

40

50

場合、遺伝子操作された細胞は、宿主の免疫系により除去され得る。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞の持続性または生存は、細胞がインビボで検出されることを可能にするタンパク質（例えば、GFPなどの蛍光タンパク質、短縮された受容体もしくは他の代替マーカー、または他の検出可能なマーカー）をコードする導入遺伝子を更に発現させることにより、レシピエントへのそれらの投与後にモニタリングされ得る。

【1506】

低免疫原性細胞は、それらが意図される組織部位に生着し、機能的に欠損した領域を再構成または再生するのを可能にする様式で投与される。幾つかの実施形態では、低免疫原性細胞は、生着（例えば、生着の成功）について分析される。幾つかの実施形態では、低免疫原性細胞の生着は、事前に選択した期間の後に評価される。幾つかの実施形態では、生着した細胞は、細胞生存についてモニタリングされる。例えば、細胞生存は、生物発光イメージング（BLI）によりモニタリングされ得、ここで、細胞は、細胞生存をモニタリングするためにルシフェラーゼ発現構築物で形質導入される。幾つかの実施形態では、生着した細胞は、当該技術分野において公知の免疫染色及びイメージング法により可視化される。幾つかの実施形態では、生着した細胞は、生着の成功を確認するために検出され得る既知のバイオマーカーを発現する。例えば、フローサイトメトリーが特定のバイオマーカーの表面発現を確認するために使用され得る。幾つかの実施形態では、低免疫原性細胞は、期待通りに意図される組織部位に生着される（例えば、低免疫原性細胞の生着の成功）。幾つかの実施形態では、低免疫原性細胞は、必要に応じて意図される組織部位、例えば、細胞の欠損部位に生着される。幾つかの実施形態では、低免疫原性細胞は、改変を含まない同じ種類の細胞と同じ様式で意図される組織部位に生着される。

【1507】

幾つかの実施形態では、低免疫原性細胞は、機能について分析される。幾つかの実施形態では、低免疫原性細胞は、意図される組織部位へのそれらの生着前に機能について分析される。幾つかの実施形態では、低免疫原性細胞は、意図される組織部位への生着後に機能について分析される。幾つかの実施形態では、低免疫原性細胞の機能は、事前に選択した量の後に評価される。幾つかの実施形態では、生着した細胞の機能は、検出可能な表現型をもたらす細胞の能力により評価される。例えば、生着したβ膵島細胞の機能は、糖尿病により失われたグルコース制御の回復に基づいて評価され得る。幾つかの実施形態では、低免疫原性細胞の機能は、期待通りである（例えば、低免疫原性細胞が良好に機能すると同時に、抗体媒介性拒絶反応を回避する）。幾つかの実施形態では、低免疫原性細胞の機能は、必要に応じたものであり、例えば、細胞の欠損部位で十分に機能と同時に、抗体媒介性拒絶反応を回避する。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、同じ種類の遺伝子操作されていない細胞と同様に機能する。

【1508】

HIP細胞に関する実施形態は、本明細書に記載されるような任意の細胞種に容易に適用され得るだけでなく、安全スイッチ、CAR改変、及び本明細書に記載されるような他の改変／遺伝子編集と容易に組み合わせられ得ることが理解されよう。

H. 安全スイッチ

【1509】

上記に開示されるように、幾つかの実施形態では、安全スイッチは、例えば、細胞が望ましくない様式で増殖及び分裂するか、または宿主に過度の毒性をもたらす場合に、当該安全スイッチを含有する遺伝子操作された細胞の死滅またはアポトーシスを誘発する能力を提供するために、本明細書において提供される遺伝子操作された細胞に組み込まれ得、例えば、導入され得る。従って、安全スイッチの使用は、インビボで異常な細胞を条件的に除去することを可能にし、臨床での細胞療法の適用に重要なステップであり得る。本開示の文脈における安全スイッチに関する関連情報は、WO2021/146627（その内容は参照により本明細書に組み込まれる）に見出され得る。安全スイッチに関する実施形態は、本明細書に記載されるような任意の細胞種に容易に適用され得るだけでなく、HIP細胞、CAR改変、及び本明細書に記載されるような他の改変／遺伝子編集に関する

実施形態と容易に組み合わせられ得ることが理解されよう。以下の定義が本開示に適用される。

【1510】

本明細書において使用される用語「安全スイッチ」は、下方調節または上方調節された場合に、例えば、宿主の免疫系による認識による、細胞の除去または死滅を引き起こす、関心対象の遺伝子またはタンパク質の発現を制御するためのシステムを指す。安全スイッチは、有害臨床事象が発生した場合に外来性分子により活性化されるように設計され得る。安全スイッチは、DNA、RNA、及びタンパク質レベルでの発現を調節することにより操作され得る。安全スイッチは、有害事象に応答して細胞活性を制御することを可能にするタンパク質または分子を含む。幾つかの実施形態では、安全スイッチは、不活性化状態

10

【1511】

「HLA」または「ヒト白血球抗原」複合体は、ヒトにおける主要組織適合複合体（MHC）タンパク質をコードする遺伝子複合体である。HLA複合体を構成するこれらの細胞表面タンパク質は、抗原に対する免疫応答の調節を担う。ヒトにおいては、クラスI及びクラスII、「HLA-I」及び「HLA-II」の2つのMHCが存在する。HLA-Iは、HLA-A、HLA-B、及びHLA-Cの3つのタンパク質を含み、これらは細胞内部からのペプチドを提示し、HLA-I複合体により提示された抗原は、キラーT細胞（CD8+T細胞または細胞傷害性T細胞としても公知）を引き寄せる。HLA-Iタンパク質は、β-2ミクログロブリン（B2M）と会合している。HLA-IIは、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOB、HLA-DQ、及びHLA-DRの5つのタンパク質を含み、これらは細胞外部からの抗原をTリンパ球に提示する。これは、CD

20

30

【1512】

1. 免疫シグナル伝達遺伝子の遺伝子座

本明細書において、記載される構築物を含む単離細胞またはその集団が提供される。幾つかの実施形態では、構築物は、標的遺伝子座に導入されている。幾つかの実施形態では、遺伝子座は、AAVS1遺伝子座、CLBYL遺伝子座、CXCR4遺伝子座、Rosa26遺伝子座、及びCCR5遺伝子座からなる群から選択されるセーフハーバー遺伝子座、またはB2M、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-D、HLA-E、RFXANK、CIITA、CTLA-4、PD-1、RAET1E/ULBP4、RAET1G/ULBP5、RAET1H/ULBP2、RAET1/ULBP1、RAET1L/ULBP6、RAET1N/ULBP3、及びNKG2Dの他のリガンドからなる群から選択される免疫シグナル伝達遺伝子の遺伝子座のいずれかである。幾つかの実施形態では、単離細胞は、未改変ヒト細胞と比較して、MHCクラスIヒト白血球抗原の欠失もしくは低減された発現、及び／またはMHCクラスIIヒト白血球抗原の欠失もしくは低減された発現を更に含む遺伝子操作された単離ヒト細胞である。幾つかの実施形態では、単離細胞は、CIITA、B2M、及び／またはNLRC5の欠失または低減された発現を更に含む。幾つかの実施形態では、単離細胞は低免疫原性であり、幹細胞である。

40

50

【1513】

幾つかの実施形態では、免疫シグナル伝達遺伝子の遺伝子座は、B2M、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-D、HLA-E、RFXANK、CIITA、CTLA-4、PD-1、RAET1E/ULBP4、RAET1G/ULBP5、RAET1H/ULBP2、RAET1/ULBP1、RAE11L/ULBP6、RAET1N/ULBP3、及びNKG2Dの他のリガンドからなる群から選択される。

【1514】

幾つかの実施形態では、免疫シグナル伝達遺伝子の遺伝子座は、B2M、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-D、及びHLA-Eからなる群から選択される。

【1515】

幾つかの態様では、CIITAの発現の低減または除去は、以下のMHCクラスII分子のうちの1つ以上の発現を低減または除去する：HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、及びHLA-DR。

【1516】

2. コンディショナルHIP細胞及び免疫抑制因子のコンディショナル下方調節の方法

安全スイッチの導入は、低免疫原性細胞（HIP細胞）を使用して開発される細胞療法の安全性を改善する。本明細書に記載されるHIP細胞の特徴は、1種以上の免疫調節因子（免疫抑制因子）の誘導性発現である。幾つかの実施形態では、免疫抑制因子（「低免疫因子（*hyp immunity factor*）」または「免疫寛容誘導因子」とも称される）としては、限定されるものではないが、CD47、CD24、CD200、HLA-G、HLA-E、HLA-C、HLA-E重鎖、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1インヒビター、IL-10、IL-35、FASL、Serpina9、CCL21、及びMfge8が挙げられる。ある特定の実施形態では、免疫抑制因子は、CD47である。免疫抑制因子の調節可能な発現または誘導性発現は、移植された低免疫原性細胞に対するレシピエント対象による免疫応答を制御するように機能する。

【1517】

本明細書において、免疫調節タンパク質の発現を制御された様式で「止める」ためのメカニズムを必要とする、免疫抑制因子の発現のための方法が記載される。1種以上の免疫抑制因子の制御可能な発現を有するHIP細胞も記載される。幾つかの例では、細胞は、1種以上の免疫抑制因子を過剰発現し、当該1種以上の免疫抑制因子の発現を下方調節するように誘導され得る。従って、細胞はもはや低免疫原性ではなく、細胞死のためにレシピエントの免疫細胞により認識される。幾つかの実施形態では、レシピエント対象に導入される細胞の低免疫性は、HLA-I及びHLA-II遺伝子座の抑制または遺伝子破壊を伴う、低免疫因子（*hyp immunity factor*）及び補体阻害因子が含まれる免疫抑制分子の過剰発現により達成される。これらの改変は、感染細胞、悪性細胞、または非自己細胞の除去を担うレシピエント免疫系のエフェクター細胞、例えば、T細胞、B細胞、NK細胞、及びマクロファージから細胞を隠蔽する。免疫系からの細胞の隠蔽は、同種異系細胞が身体内で存在及び持続することを可能にする。遺伝子操作された細胞の身体からの制御された除去は、患者の安全にとって重要であり、細胞を免疫系に暴露することにより達成され得る。暴露は安全スイッチとして機能し、免疫抑制分子の下方調節または免疫シグナル伝達分子の上方調節により達成され得る。記載される免疫抑制性分子のいずれかの発現レベルは、細胞におけるタンパク質レベル、mRNAレベル、またはDNAレベルで制御され得る。同様に、記載される免疫シグナル伝達分子のいずれかの発現レベルは、細胞におけるタンパク質レベル、mRNAレベル、またはDNAレベルで制御され得る。

【1518】

幾つかの実施形態では、記載されている安全スイッチ法（例えば、タンパク質レベル、RNAレベル、及びDNAレベルでの安全スイッチ）のいずれかは、低レベルの免疫抑制因子が閾値レベル未満となるように、細胞における免疫抑制因子のレベルを減少させるために使用される。幾つかの実施形態では、細胞における免疫抑制因子のレベルは、発現の

10

20

30

40

50

閾値レベルの約10分の1未満、9分の1未満、8分の1未満、7分の1未満、6分の1未満、5分の1未満、4分の1未満、3分の1未満、2分の1未満、1倍未満、または0.5倍未満に減少する。幾つかの実施形態では、細胞における免疫抑制因子のレベルは、発現の閾値レベルの約10分の1～5分の1未満、10分の1～3分の1未満、9分の1～1倍未満、8分の1～1倍未満、7分の1～0.5倍未満、6分の1～1倍未満、5分の1～0.5倍未満、4分の1～0.5倍未満、3分の1～0.5倍未満、2分の1～0.5倍未満、または1倍～0.5倍未満に減少する。幾つかの実施形態では、免疫抑制因子の発現の閾値レベルは、人工多能性幹細胞におけるかかる因子の発現に基づいて確立される。幾つかの実施形態では、免疫抑制因子の発現の閾値レベルは、対応する低免疫細胞、例えば、MHC I 及び MHC II ノックアウト細胞または MHC I / MHC II / TCR ノックアウト細胞における免疫抑制因子の発現レベルに基づいて確立される。

10

【1519】

3. タンパク質レベルの制御

幾つかの実施形態では、免疫抑制タンパク質の調節された分解は、タンパク質の内在性代謝回転機構への動員を可能にするデグロンを免疫抑制因子のアミノ酸配列に組み込むことにより確立される。標的タンパク質分解のためのメカニズムとしては、限定されるものではないが、ユビキチン化のための E3 リガーゼへの動員及びその後のプロテアソーム分解、プロテアソームへの直接的動員、ならびにリソソームへの動員が挙げられる。

【1520】

誘導性デグロンモチーフの免疫抑制分子との融合は、デグロンを安定化または不安定化し、これにより、免疫抑制分子を安定化または不安定化する低分子の添加または除去による分子の安定性の外因的制御を可能にする。

20

【1521】

幾つかの実施形態では、デグロンによる誘導性タンパク質分解の方法としては、限定されるものではないが、SMASH タグを使用したリガンド誘導性分解 (LID)、Shield-1 を使用したリガンド誘導性分解、オーキシンを使用したリガンド誘導性分解、ラバマイシンを使用したリガンド誘導性分解、ペプチド性デグロン (例えば、IKZF3 ベースのデグロン)、及びタンパク質分解誘導キメラ分子 (PROTAC) が挙げられる。リガンド誘導性分解法の幾つかの実施形態では、デグロンタグは、不活性な立体構造に維持されるが、特定の分子、例えば、限定されるものではないが、Shield-1 分子に結合すると、プロテアソームにより認識されることができるとる立体構造をとるように誘導される。例えば、Roth et al., Cellular Molecular Life Sciences, 2019, 76 (14), 2761-2777 (これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) を参照のこと。SMASH デグロン技術の詳細な説明は、Hannah and Zhou, Nat Chem Biol, 2015, 11: 637-638 及び Chung et al., Nat Chem Biol, 2015, 11: 713-720 (これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) に見出され得る。LID デグロン技術の詳細な説明は、Bonger et al., Nat Chem Biol, 2011, 7 (8): 531-7 (これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) に見出され得る。

30

40

【1522】

幾つかの態様では、単離細胞を採取し、免疫抑制因子をコードする遺伝子に作動可能に連結されている誘導性デグロンエレメントに作動可能に連結された構成的プロモーターを含む構築物を導入することによる、哺乳動物細胞 (例えば、ヒト細胞) の免疫原性を制御するための方法が提供される。幾つかの実施形態では、構築物は、免疫抑制因子をコードする遺伝子に作動可能に連結されている可動性リンカーをコードする核酸配列に作動可能に連結されている誘導性デグロンエレメントに作動可能に連結された構成的プロモーターを含む。幾つかの実施形態では、構築物は、誘導性デグロンエレメントに作動可能に連結されている免疫抑制因子をコードする遺伝子に作動可能に連結された構成的プロモーターを含む。幾つかの実施形態では、構築物は、誘導性デグロンエレメントに作動可能に

50

連結されている可動性リンカーをコードする配列に連結されている免疫抑制因子をコードする遺伝子に作動可能に連結された構成的プロモーターを含む。従って、細胞をデグロンリガンドまたは分子と接触させると、デグロンは、免疫抑制因子を分解の標的とする。

【1523】

幾つかの実施形態では、誘導性デグロンエレメントは、リガンド誘導性デグロンエレメント、例えば、低分子支援切断 (small molecule-assisted shut off、SMASH) デグロンエレメント、Shield-1 応答性デグロンエレメント、オーキシン応答性デグロンエレメント、及びラパマイシン応答性デグロンエレメント；ペプチド性デグロンエレメント；ならびにペプチド性タンパク質分解誘導キメラ分子 (PROTAC) エレメントからなる群から選択される。有用な実施形態では、リガンド誘導性デグロンエレメントは、低分子支援切断 (small molecule-assisted shut off、SMASH) デグロンエレメントであり、免疫原性を制御するための外来性因子は、アスナプレビルである。幾つかの実施形態では、免疫抑制因子遺伝子は、CD47、CD24、CD200、HLA-G、HLA-E、HLA-C、HLA-E 重鎖、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1 インヒビター、IL-10、IL-35、FASL、Serpina b9、CCl21、及び Mfge8 からなる群から選択される。多数の実施形態では、免疫抑制因子遺伝子は、CD47 である。幾つかの例では、構築物の構成的プロモーターは、EF1A プロモーター、EFS プロモーター、CMV プロモーター、CAGGS プロモーター、SV40 プロモーター、COPIA プロモーター、ACT5C プロモーター、TRE プロモーター、CBh プロモーター、PGK プロモーター、及び UBC プロモーターからなる群から選択される。幾つかの例では、任意の可動性リンカーは、(GSG)_n (配列番号3)、(GGGS)_n (配列番号1)、及び (GGSGGGGS)_n (配列番号2) からなる群から選択され、ここで、n は 1~10 である。幾つかの実施形態では、構築物は、セーフハーバー遺伝子座、例えば、限定されるものではないが、AAVS1 遺伝子座、CLBYL 遺伝子座、CXCR4 遺伝子座、Rosa26 遺伝子座、及び CCR5 遺伝子座に組み込まれるように細胞に導入される。幾つかの実施形態では、構築物は、ホモロジー媒介組換えの方法により細胞の AAVS 遺伝子座に導入される。従って、構築物は、標的とされるセーフハーバー遺伝子座に特異的な 5' 及び 3' 相同性アームを含む。幾つかの実施形態では、構築物は、5' 末端から 3' 末端までに、AAVS1 遺伝子座に対する 5' 相同性アーム、外来性構成的プロモーター、誘導性デグロンエレメント、免疫抑制因子をコードする遺伝子、及び AAVS1 遺伝子座に対する 3' 相同性アームを含む。他の実施形態では、構築物は、5' 末端から 3' 末端までに、AAVS1 遺伝子座に対する 5' 相同性アーム、外来性構成的プロモーター、誘導性デグロンエレメント、可動性リンカーをコードする配列、免疫抑制因子をコードする遺伝子、及び AAVS1 遺伝子座に対する 3' 相同性アームを含む。有用な実施形態では、遺伝子操作された細胞は、免疫抑制因子をコードする遺伝子に作動可能に連結されている可動性リンカーをコードする任意の配列に作動可能に連結されている誘導性デグロンエレメントに作動可能に連結された構成的プロモーターを含む外来性核酸配列を含む。遺伝子操作された細胞は、免疫抑制因子に融合または連結された誘導性デグロンエレメントを発現する。幾つかの実施形態では、細胞は、因子または薬剤、例えば、限定されるものではないが、デグロンエレメントを活性化して、免疫抑制因子を分解させるリガンド、分子、ペプチド、または低分子と接触させられる。

【1524】

ペプチド性デグロンの幾つかの実施形態では、低分子により媒介される E3 リガーゼへの動員をもたらすペプチドタグが使用される。幾つかの実施形態では、ペプチドタグは、Koduri et al., Proc Natl Acad Sci, 2019, 116 (7), 2539-2544 (これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) に記載されるような、免疫調節薬剤 (IMI D) 依存的様式で E3 リガーゼ受容体 (CRBN) に動員される、リンパ球限定転写因子である IKZF3 を含む。ある特定の実施形態では、デグロンは、免疫抑制因子を分解 (例えば、ユビキチン化経路による分解)、タ

10

20

30

40

50

ンパク質分解の誘発、またはタンパク質分解の標的とすることができる。

【1525】

幾つかの態様では、単離細胞を採取し、構成的プロモーター、ペプチド性誘導性デグロンエレメント、及び免疫抑制因子をコードする遺伝子を含む構築物を導入することによる、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）の免疫原性を制御するための方法が提供される。幾つかの実施形態では、構築物は、構成的プロモーター、ペプチド性誘導性デグロンエレメント、可動性リンカーをコードする核酸配列、及び免疫抑制因子をコードする遺伝子を含む。本明細書に記載される構成的プロモーター、免疫抑制因子、可動性リンカー、及び細胞のいずれかがこの方法に適用可能である。

【1526】

PROTACの幾つかの実施形態では、免疫抑制因子を細胞のタンパク質分解機構に動員するために、二機能性分子が使用される。幾つかの実施形態では、二機能性分子は、免疫抑制タンパク質の天然配列もしくは野生型配列に結合するか、または二機能性分子に高親和性で結合するドメインを発現している免疫抑制タンパク質の遺伝子操作されたバージョンに結合する。幾つかの実施形態では、二機能性分子は、低分子または生物学的薬剤（例えば、抗体またはその断片）を含む。例えば、Burslem et al., Cell Chemical Biology, 2018, 25, 67-77、及びRoth et al., Cellular Molecular Life Sciences, 2019, 76(14), 2761-2777（これらは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと。

【1527】

二価抗体の幾つかの実施形態では、抗体は、免疫抑制因子ならびに内部移行及び分解をもたらす第2の内在性受容体を標的とする。1種以上の免疫抑制因子の制御可能な発現は、二価抗体（例えば、化学的に再プログラム化された二価抗体）、デグロンによる誘導性タンパク質分解、誘導性RNA調節、誘導性DNA調節、及び誘導性発現の方法により提供され得る。例えば、Natsume and Kanemaki, Annu Rev Genet, 2017, 51, 82-102、Burslem and Crews, Chem Rev, 2017, 117, 11269-11301、Banik et al., ChemRxiv, 2019（これらは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと。幾つかの実施形態では、免疫抑制因子を発現する細胞は、分解のために当該細胞に結合する抗体と接触させられる。

【1528】

幾つかの例では、低免疫細胞は、細胞の細胞外表面上のエピトープに結合する抗体の添加によって免疫系により利用され、除去される。エピトープは、過剰発現された免疫抑制因子に固有であり得るか、または免疫抑制因子内に存在するか、もしくは細胞外表面に明白に存在する別のエピトープであり得る。抗体の表面への結合は細胞を暴露し、抗体依存性細胞傷害（ADCC）または補体依存性細胞傷害（CDC）をもたらす。

【1529】

幾つかの実施形態では、ADCC/CDCによる安全スイッチのためのエピトープは、EGFR、CD20、CD19、CCR4、HER2、MUC1、GD2、PSMA、CD30、CD16、及びそれらの断片、誘導体、及びバリエーションからなる群から選択される。幾つかの例では、本明細書に記載される細胞のいずれかは、EGFRエピトープ、CD20エピトープ、CD19エピトープ、CCR4エピトープ、HER2エピトープ、MUC1エピトープ、GD2エピトープ、PSMAエピトープ、CD30エピトープ、またはCD16エピトープから選択されるエピトープを発現する。幾つかの実施形態では、細胞は、EGFR、CD20、CD19、CCR4、HER2、MUC1、GD2、PSMA、CD30、またはCD16に特異的な、ADCC/CDCをもたらす抗体に結合する。

【1530】

本明細書に記載されるようなタンパク質レベルの安全スイッチを対象とする方法は、本

10

20

30

40

50

明細書に記載される遺伝子操作された細胞（例えば、低免疫細胞）における免疫抑制因子（例えば、CD47）のレベルを調節可能な様式で減少させるための方法を提供する。本明細書に記載される安全スイッチの方法のいずれかを使用して、細胞におけるCD47などの免疫抑制因子のレベルを閾値レベル未満に減少させることにより、レシピエント対象の免疫系は、かかる細胞に対する免疫応答を惹起することができる。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞におけるCD47のレベルは、安全スイッチにより、発現の閾値レベルの約10分の1未満、9分の1未満、8分の1未満、7分の1未満、6分の1未満、5分の1未満、4分の1未満、3分の1未満、2分の1未満、1倍未満、または0.5倍未満に減少する。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞におけるCD47のレベルは、発現の閾値レベルの約10分の1～5分の1未満、10分の1～3分の1未満、9分の1～1倍未満、8分の1～1倍未満、7分の1～0.5倍未満、6分の1～1倍未満、5分の1～0.5倍未満、4分の1～0.5倍未満、3分の1～0.5倍未満、2分の1～0.5倍未満、または1倍～0.5倍未満に減少する。幾つかの例では、CD47発現の閾値レベルは、人工多能性幹細胞におけるCD47の外來性発現に基づいて確立される。他の例では、CD47発現の閾値レベルは、対応する低免疫細胞、例えば、MHC I及びMHC IIノックアウト細胞またはMHC I/MHC II/TCRノックアウト細胞におけるCD47の発現レベルに基づいて確立される。幾つかの例では、CD47のレベルは、デグロンベースの安全スイッチ、例えば、限定されるものではないが、SMA SHデグロンまたはLIDデグロンを使用して低減される。幾つかの実施形態では、外來性CD47導入遺伝子に連結されたSMA SHデグロンを発現する細胞は、低分子のアスナプレビル（デグロン誘導因子）に曝露され、これにより、細胞による外來性CD47の発現の低減が誘発される。

10

20

【1531】

4. RNAレベルの制御

免疫抑制因子は、siRNAまたはmiRNAにより標的とされ得、これにより、当該因子をコードする転写物の分解がもたらされる。siRNAは、外來性に提供され得るか、または抑制性RNAの転写の制御を提供するために遺伝子にコードされ得る。siRNAまたはmiRNAは、免疫抑制因子の転写物にアニーリングすることができ、これにより、RISC複合体による分解をもたらす。

【1532】

30

幾つかの実施形態では、免疫抑制因子の発現を下方調節するための誘導性RNA調節の方法としては、限定されるものではないが、低分子または生物学的薬剤により誘発されるshRNA、誘導性siRNA、誘導性miRNA、誘導性CRISPR干渉（CRISPRi）、及び誘導性RNA標的化ヌクレアーゼが挙げられる。

【1533】

幾つかの実施形態では、本方法は、免疫抑制因子のRNAを標的とするshRNAまたはsiRNAを含む。幾つかの例では、shRNAまたはsiRNAの発現は、低分子または生物学的薬剤により誘発される。

【1534】

幾つかの態様では、単離細胞を採取し、誘導性RNAポリメラーゼプロモーターを制御することができるトランス活性化因子エレメントに作動可能に連結されている構成的プロモーターに作動可能に連結されている免疫抑制因子を標的とするshRNA配列に作動可能に連結された当該誘導性RNAポリメラーゼプロモーターを含有する構築物を導入することによる、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）の免疫原性を制御するための方法が提供される。幾つかの実施形態では、構築物は、U6 Tetプロモーター、免疫抑制因子を標的とするshRNA、構成的プロモーター、及びテトラサイクリンまたはその誘導体（例えば、ドキシサイクリン）に応答するTetリプレッサーエレメントを含む。他の例では、shRNAは、免疫抑制因子の発現を除去する。他の例では、shRNAは、免疫抑制因子の発現を約99%以下、例えば、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、90%、85%、またはそれ以下減少させる。幾つかの実施形態では

40

50

、誘導性プロモーターは、テトラサイクリン応答性プロモーターである。本明細書に記載される構成的プロモーター、免疫抑制因子、及び細胞のいずれかがこの方法に適用可能である。

【1535】

多数の実施形態では、遺伝子操作された細胞は、免疫抑制因子を標的とする誘導性 shRNA を発現する。幾つかの実施形態では、細胞は、細胞の低免疫原性をもたらす外来性免疫抑制因子も発現する。幾つかの実施形態では、細胞は、因子、例えば、限定されるものではないが、shRNA の発現を活性化して、免疫抑制因子を分解させるリガンド、分子、ペプチド、または低分子と接触させられる。

【1536】

幾つかの実施形態では、本方法は、免疫抑制因子のプロモーターを標的として、その転写を下方調節するための CRISPR 干渉システム (CRISPRi) を含む。幾つかの例では、免疫抑制因子を標的とする CRISPRi 及び／または gRNA の発現は、低分子または生物学的薬剤により誘発される。CRISPRi 法の詳細な説明は、例えば、Engreitz et al., Cold Spring Harb Perspect Biol, 2019, 11: a035386 (これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) に見出される。幾つかの実施形態では、CRISPRi システムは、構成的プロモーターにより制御される dCas9-リプレッサー融合タンパク質、及び誘導性プロモーター制御下の免疫抑制因子に特異的な gRNA を利用する。

【1537】

幾つかの態様では、単離細胞を採取し、当該細胞に (i) 免疫抑制因子をコードする遺伝子に作動可能に連結された構成的プロモーターを含有する第1の構築物；(ii) Cas9ヌクレアーゼまたはそのバリエーション、例えば、dCas9-リプレッサー融合タンパク質をコードする遺伝子に作動可能に連結された構成的プロモーターを含有する第2の構築物；及び (iii) 免疫抑制因子をコードする配列を標的とする gRNA 配列に作動可能に連結された誘導性 RNA ポリメラーゼプロモーターを、当該 gRNA 配列が、当該誘導性 RNA ポリメラーゼプロモーターに対応するトランス活性化因子エレメントに作動可能に連結されるように含む第3の構築物を導入することによる、哺乳動物細胞 (例えば、ヒト細胞) の免疫原性を制御するための方法が提供される。幾つかの例では、第1の構築物、第2の構築物、及び第3の構築物は、単一のベクターに見出される。幾つかの例では、第1の構築物、第2の構築物、及び第3の構築物は、2つのベクターに見出される。

【1538】

幾つかの実施形態では、CRISPR ベースの方法は、免疫抑制因子に対応する mRNA 配列を標的とするためのヌクレアーゼ、例えば、限定されるものではないが、Cas13、Cas7、または Casx1 を含む。幾つかの例では、ヌクレアーゼ及び／または免疫抑制因子を標的とする gRNA の発現は、低分子または生物学的薬剤により誘発される。

【1539】

幾つかの態様では、単離細胞を採取し、当該細胞に (i) 免疫抑制因子をコードする遺伝子に作動可能に連結された構成的プロモーターを含む第1の構築物；(ii) Cas13aヌクレアーゼ、そのバリエーション、またはその融合タンパク質をコードする遺伝子に作動可能に連結された構成的プロモーターを含む第2の構築物；及び (iii) 免疫抑制因子をコードする配列を標的とする gRNA 配列に作動可能に連結された誘導性 RNA ポリメラーゼプロモーターを、当該 gRNA 配列が、当該誘導性 RNA ポリメラーゼプロモーターに対応するトランス活性化因子エレメントに作動可能に連結されるように含む第3の構築物を導入することによる、哺乳動物細胞 (例えば、ヒト細胞) の免疫原性を制御するための方法が提供される。

【1540】

幾つかの実施形態では、免疫抑制因子の RNA レベルの制御に有用である誘導性発現システムとしては、限定されるものではないが、リガンド誘導性転写因子システム、受容体媒介発現制御システム、及びリガンド調節型リボスイッチが挙げられる。幾つかの実施形

10

20

30

40

50

態では、誘導性発現システムとしては、テトラサイクリン制御性オペレーターシステム、合成Notchベース (SynNotch) のシステム (例えば、Morsut et al., Cell, 2016, 164: 780-791、及びYang et al., Commun Biol, 2020, 3: 116を参照のこと)、及び生成したプレmRNAのリガンド (例えば、アプタマー、ペプチド、または低分子) により媒介される選択的スプライシングによって免疫抑制因子遺伝子の発現を調節するリボスイッチが挙げられる。有用なリボスイッチは、リガンドの存在を感知し、標的の免疫抑制因子遺伝子のスプライシングを変化させるセンサー領域及びエフェクター領域を含む。リボスイッチgRNAの詳細な説明及び例は、例えば、US9, 228, 207、US9, 993, 491、及びUS10, 421, 989、ならびにSeeliger et al., PLoS One, 2012, 7 (1): e29266に見出され、それらの内容はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【1541】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞における免疫抑制因子、例えば、CD47のレベルは、RNAレベルの安全スイッチにより発現の閾値レベルの約10分の1未満、9分の1未満、8分の1未満、7分の1未満、6分の1未満、5分の1未満、4分の1未満、3分の1未満、2分の1未満、1倍未満、または0.5倍未満に減少する。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞におけるCD47のレベルは、発現の閾値レベルの約10分の1～5分の1未満、10分の1～3分の1未満、9分の1～1倍未満、8分の1～1倍未満、7分の1～0.5倍未満、6分の1～1倍未満、5分の1～0.5倍未満、4分の1～0.5倍未満、3分の1～0.5倍未満、2分の1～0.5倍未満、または1倍～0.5倍未満に減少する。幾つかの例では、CD47発現の閾値レベルは、人工多能性幹細胞におけるCD47の外來性発現に基づいて確立される。他の例では、CD47発現の閾値レベルは、対応する低免疫細胞、例えば、MHC I及びMHC IIノックアウト細胞またはMHC I/MHC II/TCRノックアウト細胞におけるCD47の発現レベルに基づいて確立される。

20

【1542】

5. DNAレベルの制御

誘導性プロモーターを用いることによる免疫抑制因子の転写調節は、低分子、例えば、限定されるものではないが、ドキシサイクリンの添加または除去により、スイッチの発現を任意にオンまたはオフにする能力を提供する。同様に、標的化ヌクレアーゼ活性による遺伝子破壊も免疫抑制因子の発現を除去して、細胞を暴露することができる。

30

【1543】

幾つかの実施形態では、誘導性DNA調節のための方法としては、限定されるものではないが、組織特異的プロモーター、誘導性プロモーター、制御可能なリボスイッチ、及び誘導性ヌクレアーゼ (例えば、誘導性CRISPR、誘導性TALEN、誘導性ジンクフィンガーヌクレアーゼ、誘導性ホーミングエンドヌクレアーゼ、誘導性メガヌクレアーゼなど) を使用したノックアウトを使用して、1種以上の免疫抑制因子のDNA配列を標的とすることが挙げられる。幾つかの実施形態では、誘導性ヌクレアーゼは、その発現が低分子の存在によって制御されるようなヌクレアーゼを含む。幾つかの実施形態では、誘導性ヌクレアーゼは、ヌクレアーゼRNAまたはタンパク質の細胞への送達が高分子の存在によって制御されるようなヌクレアーゼを含む。幾つかの実施形態では、ヌクレアーゼの発現は、低分子または生物学的薬剤により誘導される。幾つかの実施形態では、Casヌクレアーゼ及び/またはガイドRNA (gRNA) の発現は、低分子または生物学的薬剤により誘導される。

40

【1544】

幾つかの実施形態では、誘導性発現のための方法としては、限定されるものではないが、リガンド誘導性転写因子システム (例えば、テトラサイクリン制御性オペレーターシステム)、発現システムの受容体媒介性制御 (例えば、SynNotchシステム)、及びmRNAまたはgRNA活性の制御のためのリガンド制御型リボスイッチシステムが挙げ

50

られる。誘導性発現の方法の詳細な説明は、例えば、Kallunki et al., Cells, 2019, 796 (doi:10.3390/cells8080796) (これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に見出される。

【1545】

幾つかの実施形態では、免疫抑制因子は、誘導性発現ベクターを使用して細胞において発現される。発現ベクターは、ウイルスベクター、例えば、限定されるものではないが、レンチウイルスベクターであり得る。幾つかの実施形態では、本明細書に記載される誘導性免疫抑制因子は、レンチウイルス形質導入により細胞に導入される。

【1546】

幾つかの実施形態では、免疫抑制因子をコードする構築物のサイレンシングは、レシピアント対象の免疫系による遺伝子操作された細胞の除去をもたらす。更に、免疫抑制因子及び誘導性発現システムを含有する構築物は、この遺伝子のサイレンシングにより遺伝子操作された細胞が除去されるため、カセットの発現を保護するために内在性遺伝子座内に組み込まれ得る。幾つかの実施形態では、組込みに有用な内在性遺伝子座は、コア必須遺伝子座または免疫シグナル伝達因子遺伝子座である。かかる組込みのためのコア必須遺伝子座の非限定的な例としては、RpS2、RpS9、RpS11、RpS13、RpS18、RpL8、RpL11、RpL32、RpL36、Rpn11、Psmc14、及びPSMA3が挙げられる。かかる組込みのための免疫シグナル伝達因子遺伝子座の非限定的な例としては、B2M、MIC-A/B、HLA-A、HLA-B、HLA-C、RFXANK、CTLA4、PD1、及びNKG2Dのリガンド（例えば、MICA、MICB、RAET1E/ULBP4、RAET1G/ULBP5、RAET1H/ULBP2、RAET1/ULBP1、RAET1L/ULBP6、及びRAET1N/ULBP3）が挙げられる。

【1547】

幾つかの実施形態では、免疫抑制因子のコンディショナル発現は、免疫調節因子CD47の発現調節に基づく。CD47は、マクロファージによる貪食を阻害するために自然免疫系の一部として「私を食べないで (do not eat me)」シグナルとして機能する、自然免疫系の構成要素である。発現制御のために遺伝子操作され得る有用な免疫抑制因子としては、限定されるものではないが、CD47、CD27、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鎖、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1阻害因子、IL-10、IL-35、FASL、Serpinb9、CCL21、及びMfge8が挙げられる。

【1548】

幾つかの実施形態では、本開示は、CD47、CD27、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鎖、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1阻害因子、IL-10、IL-35、FASL、Serpinb9、CCL21、及びMfge8からなる群から選択される免疫抑制因子のいずれかをコンディショナルに発現するように改変された、幹細胞（例えば、低免疫原性多能性幹細胞または低免疫原性人工多能性幹細胞）またはその分化した細胞を作製する方法を提供する。他の実施形態では、免疫抑制因子は、HLA-A、HLA-B、HLA-C、RFXANK、CIITA、NFY-A、NLRC5、B2M、RFX5、RFX-AP、HLA-G、HLA-E、NFY-B、PD-L1、NFY-C、IRF1、TAP1、GITR、4-1BB、CD28、B7-1、CD47、B7-2、OX40、CD27、HVEM、SLAM、CD226、ICOS、LAG3、TIGIT、TIM3、CD160、BTLA、CD244、LFA-1、ST2、HLA-F、CD30、B7-H3、VISTA、TLT、PD-L2、CD58、CD2、及びHELIOSからなる群から選択される。

【1549】

幾つかの実施形態では、細胞は、外来性制御シグナルの不在下で細胞が低免疫原性となるか、または低減された低免疫原性を有するように、免疫抑制因子のうちの1つ以上をコンディショナルに発現する。外来性制御シグナルの存在下では、細胞は、免疫細胞により

認識され、細胞死または除去の標的となる。幾つかの例では、H I P細胞は、免疫抑制因子を発現し、その免疫抑制因子の機能が、H I P細胞がレシピエント対象の免疫応答を回避することを可能にする。H I P細胞が外来性制御シグナルに曝露されると、免疫抑制因子の発現（例えば、DNAレベルの発現、RNAレベルの発現、またはタンパク質レベルの発現）が下方調節され、これにより、H I P細胞がレシピエント対象の自然免疫系により認識される。このようにして、H I P細胞は、レシピエントにおいて細胞死及び／または細胞除去を経る。

【1550】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞における免疫抑制因子、例えば、CD 47のレベルは、DNAレベルの安全スイッチにより発現の閾値レベルの約10分の1未満、9分の1未満、8分の1未満、7分の1未満、6分の1未満、5分の1未満、4分の1未満、3分の1未満、2分の1未満、1倍未満、または0.5倍未満に減少する。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞におけるCD 47のレベルは、発現の閾値レベルの約10分の1～5分の1未満、10分の1～3分の1未満、9分の1～1倍未満、8分の1～1倍未満、7分の1～0.5倍未満、6分の1～1倍未満、5分の1～0.5倍未満、4分の1～0.5倍未満、3分の1～0.5倍未満、2分の1～0.5倍未満、または1倍～0.5倍未満に減少する。幾つかの例では、CD 47発現の閾値レベルは、人工多能性幹細胞におけるCD 47の外来性発現に基づいて確立される。他の例では、CD 47発現の閾値レベルは、対応する低免疫細胞、例えば、MHC I及びMHC IIノックアウト細胞またはMHC I/MHC II/TCRノックアウト細胞におけるCD 47の発現レベルに基づいて確立される。

【1551】

6. コンディショナルH I P細胞及び免疫シグナル伝達因子のコンディショナル下方調節の方法

免疫シグナル伝達因子の発現を増加させて、細胞の低免疫原性を変化させるために、この因子を制御可能な様式で発現させるための方法が本明細書において記載される。1種以上の免疫シグナル伝達因子の制御可能な発現を有するH I P細胞も記載される。幾つかの態様では、免疫シグナル伝達因子は、B2M、MIC-A/B、HLA-A、HLA-B、HLA-C、RFXANK、CTLA-4、PD-1、及びNKG2Dのリガンド（例えば、MICA、MICB、RAET1E/ULBP4、RAET1G/ULBP5、RAET1H/ULBP2、RAET1/ULBP1、RAET1L/ULBP6、及びRAET1N/ULBP3）からなる群から選択される。

【1552】

1種以上の免疫シグナル伝達因子の制御可能な発現は、デグロンを使用した誘導性リガンド安定化システム、誘導性RNA上方調節システム（例えば、誘導性CRISPR活性化）、及び誘導性DNA上方調節システムにより提供され得る。幾つかの実施形態では、誘導性DNA上方調節システムには、誘導性CRISPR活性化（CRISPRa）、組織特異的プロモーター、誘導性プロモーター、及びリボスイッチが含まれる。

【1553】

CRISPRa法の詳細な説明は、例えば、Engreitz et al., Cold Spring Harb Perspect Biol, 2019, 11:a035386（これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に見出される。誘導性リボスイッチの詳細な説明及び例は、例えば、US9,228,207、US9,993,491、及びUS10,421,989；ならびにSeeliger et al., PLoS One, 2012, 7(1):e29266（それらの内容はその全体が参照により本明細書に組み込まれる）に見出される。

【1554】

遺伝子調節、転写後調節、及び翻訳後調節による低免疫細胞の暴露の一例では、低免疫性は、HLA-I及びHLA-II遺伝子座の抑制または遺伝子破壊を伴う、CD 47などの低免疫分子（hyp Immunity molecule）、補体阻害因子の過剰

発現により達成される。これらの改変は、感染細胞、悪性細胞、または非自己細胞の除去を担う免疫系のエフェクター細胞、例えば、T細胞、B細胞、NK細胞、及びマクロファージから細胞を隠蔽する。免疫系からの細胞の隠蔽は、同種異系細胞が身体内で存在及び持続することを可能にする。遺伝子操作された細胞の身体からの除去は、患者の安全にとって重要であり、細胞を免疫系に暴露することにより達成され得る。暴露は安全スイッチとして機能し、低免疫分子(hypoimmunity molecule)の下方調節(例えば、CD47、CD27、CD200、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鎖、HLA-G、PD-L1、IDO1、CTLA4-Ig、C1阻害因子、IL-10、IL-35、FASL、Serpinb9、CCL21、またはMfge8)または免疫シグナル伝達分子の上方調節(例えば、B2M、MIC-A/B、HLA-A、HLA-B、HLA-C、RFXANK、CTLA-4、PD-1、及びNKG2Dのリガンド(例えば、MICA、MICB、RAET1E/ULBP4、RAET1G/ULBP5、RAET1H/ULBP2、RAET1/ULBP1、RAET1L/ULBP6、またはRAET1N/ULBP3))により達成され得る。これらの活性のいずれかは、細胞を天然のエフェクター細胞に利用し、これにより、同種異系細胞の除去をもたらすこと。

10

X. 遺伝子操作された細胞の集団及び医薬組成物

【1555】

本明細書その他箇所で記載されるように、細胞療法を製造する過程で、ある特定の改変が細胞に導入され得る。本明細書において、複数の提供される遺伝子操作された細胞を含有する細胞集団が提供される。本明細書において、複数の遺伝子操作された細胞を含有する細胞集団も提供される。

20

【1556】

「最終」細胞集団、すなわち、細胞療法製品(医薬組成物)に使用される細胞集団において、未編集細胞または部分的に編集された細胞は、細胞療法製品の機能に悪影響を及ぼす可能性がある夾雑物とみなされ得る。幾つかの場合では、集団における編集された細胞対未編集細胞または部分的に編集された細胞の比率を基準にした、編集された細胞の百分率は、純度の尺度とみなされ得る。これは特に、免疫回避を可能にする低免疫遺伝子改変に関連し、免疫回避において、低免疫遺伝子改変を有さない細胞の存在は、細胞療法製品のインビボでの有効性に悪影響を及ぼすと予想され得る。驚くべきことに、本発明の発明者らにより実証されたように、細胞集団内の遺伝子操作された細胞は、細胞集団が未編集細胞または部分的に編集された細胞を含有する場合であっても機能的であり得る。従って、細胞集団を含む新規の細胞療法製品であって、当該細胞集団が一部の未編集細胞または部分的に編集された細胞を含有する、当該細胞療法製品が本明細書において提供される。

30

【1557】

幾つかの実施形態では、集団における最大20%、最大30%、最大40%、最大50%、最大60%、または最大65%の細胞がHIP改変細胞ではない(例えば、MHCクラスI及び/またはMHCクラスII分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現を示さず、任意により、少なくとも1種の免疫寛容誘導因子の増強された発現も示さない)。

【1558】

幾つかの実施形態では、細胞療法製品における最大20%、最大30%、最大40%、最大50%、最大60%、または最大65%の細胞が、MHCクラスI及び/またはMHCクラスII分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現を示さない。幾つかの実施形態では、細胞療法製品における最大20%、最大30%、最大40%、最大50%、最大60%、または最大65%の細胞が、(i) MHCクラスI及び/またはMHCクラスII分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現を示さず、(ii) 少なくとも1種の免疫寛容誘導因子の増強された発現を示さない。これらの実施形態のいずれかでは、細胞療法製品におけるCARを発現する細胞の比率は、70~100%、80~100%、90~100%の範囲であり得る。幾つかの実施形態では、細胞療法製品における少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、または70%の細胞が、MHCクラ

40

50

スⅠ及び／またはMHCクラスⅠⅠ分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現を示さない。幾つかの実施形態では、細胞療法製品における少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、または70%の細胞が、(i) MHCクラスⅠ及び／またはMHCクラスⅠⅠ分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現を示さず、(ii) 少なくとも1種の免疫寛容誘導因子の増強された発現を示さない。これらの実施形態のいずれかでは、細胞療法製品におけるCARを発現する細胞の比率は、70～100%、80～100%、90～100%の範囲であり得る。

【1559】

幾つかの実施形態では、集団における少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、または99.99%の細胞が本明細書に記載される一連の改変を含む。幾つかの実施形態では、一連の改変は、MHCクラスⅠ及び／またはMHCクラスⅠⅠ分子のうちの1つ以上の分子の発現を低減し、少なくとも1種の免疫寛容誘導因子、例えば、本明細書に記載される免疫寛容誘導因子の発現を増強する。幾つかの実施形態では、一連の改変は、MHCクラスⅠ及び／またはMHCクラスⅠⅠ分子のうちの1つ以上の分子の発現を低減し、少なくとも1種の免疫寛容誘導因子、例えば、本明細書に記載される免疫寛容誘導因子の発現を増強し、CAR導入遺伝子を組み込む。幾つかの実施形態では、一連の改変は、MHCクラスⅠ及び／またはMHCクラスⅠⅠ分子のうちの1つ以上の分子の発現を低減し、CAR導入遺伝子を組み込む。

10

【1560】

幾つかの実施形態では、集団における少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、または99.99%の細胞が、1種以上のMHCクラスⅠ分子及び／または1種以上のMHCクラスⅠⅠ分子の発現を低減し、1種以上の免疫寛容誘導因子の発現を増強する一連の改変を含む。幾つかの実施形態では、1種以上の免疫寛容誘導因子は、A20/TNFAIP3、B2M-HLA-E、CD16、CD16Fc受容体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、CD52、CD55、CD59、CD64、CD200、CCL21、CCL22、CTLA4-Ig、C1阻害因子、CR1、DUX4、FASL、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鎖、HLA-F、HLA-G、H2-M3、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、IL-39、MANF、Mfge8、PD-L1、Serpina9、またはそれらの任意の組み合わせのうちの1つ以上である。幾つかの実施形態では、1種以上の免疫寛容誘導因子は、CD47である。幾つかの実施形態では、集団における少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、または99.99%の細胞がCD47をコードする外来性ポリヌクレオチドを含む。

20

30

【1561】

幾つかの実施形態では、集団における少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、または99.99%の細胞がB2M遺伝子の両方のアレルを不活性化する1種以上の改変を含む。幾つかの実施形態では、集団における少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、または99.99%の細胞がCIITA遺伝子の両方のアレルを不活性化する1種以上の改変を含む。

40

【1562】

幾つかの実施形態では、細胞療法製品における最大40%の細胞が、MHCクラスⅠ及び／またはMHCクラスⅠⅠ分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現を示さず、細胞療法製品におけるCARを発現する細胞の比率は、70～100%、80～100%、90～100%の範囲である。幾つかの実施形態では、細胞療法製品における最大50%の細胞が、MHCクラスⅠ及び／またはMHCクラスⅠⅠ分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現を示さず、細胞療法製品におけるCARを発現する細胞の比率は、70～

50

100%、80～100%、90～100%の範囲である。幾つかの実施形態では、細胞療法製品における最大60パーセントの細胞が、MHCクラスI及び／またはMHCクラスII分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現を示さず、細胞療法製品におけるCARを発現する細胞の比率は、70～100%、80～100%、90～100%の範囲である。

【1563】

幾つかの実施形態では、細胞療法製品における少なくとも40%の細胞が、(i) MHCクラスI及び／またはMHCクラスII分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現を示さず、(ii) 少なくとも1種の免疫寛容誘導因子の増強された発現を示さず、細胞療法製品におけるCARを発現する細胞の比率は、70～100%、80～100%、90～100%の範囲である。

10

【1564】

幾つかの実施形態では、細胞療法製品における少なくとも50%の細胞が、(i) MHCクラスI及び／またはMHCクラスII分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現を示さず、(ii) 少なくとも1種の免疫寛容誘導因子の増強された発現を示さず、細胞療法製品におけるCARを発現する細胞の比率は、70～100%、80～100%、90～100%の範囲である。幾つかの実施形態では、細胞療法製品における少なくとも60パーセントの細胞が、(i) MHCクラスI及び／またはMHCクラスII分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現を示さず、(ii) 少なくとも1種の免疫寛容誘導因子の増強された発現を示さず、細胞療法製品におけるCARを発現する細胞の比率は、70～100%、80～100%、90～100%の範囲である。

20

【1565】

幾つかの実施形態では、集団における本明細書に記載される一連の改変を含む細胞の比率は、30～90%、30～80%、30～70%、30～60%、30～50%、または40～50%である。幾つかの実施形態では、集団における本明細書に記載される一連の改変を含む細胞の比率は、40～90%、40～80%、40～70%、40～60%、または40～50%である。幾つかの実施形態では、集団における本明細書に記載される一連の改変を含む細胞の比率は、50～90%、50～80%、50～70%、または50～60%である。

【1566】

幾つかの実施形態では、細胞療法製品における30～90%、30～80%、30～70%、30～60%、30～50%、または40～50%の細胞がHIP改変細胞である（例えば、MHCクラスI及び／またはMHCクラスII分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現、ならびに任意により、少なくとも1種の免疫寛容誘導因子の増強された発現を示す）。幾つかの実施形態では、細胞療法製品における40～90%、40～80%、40～70%、40～60%、または40～50%の細胞がHIP改変細胞である（例えば、MHCクラスI及び／またはMHCクラスII分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現、ならびに任意により、少なくとも1種の免疫寛容誘導因子の増強された発現を示す）。幾つかの実施形態では、細胞療法製品における50～90%、50～80%、50～70%、または50～60%の細胞がHIP改変細胞である（例えば、MHCクラスI及び／またはMHCクラスII分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現、ならびに任意により、少なくとも1種の免疫寛容誘導因子の増強された発現を示す）。これらの実施形態のいずれかでは、細胞療法製品におけるCARを発現する細胞の比率は、70～100%、80～100%、90～100%の範囲であり得る。

30

40

【1567】

幾つかの実施形態では、細胞療法製品における30～80%の細胞が、MHCクラスI及び／またはMHCクラスII分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現を示すHIP改変細胞であり、80～100%の細胞がCARを発現する。幾つかの実施形態では、細胞療法製品における30～70%の細胞が、MHCクラスI及び／またはMHCクラスII分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現を示すHIP改変細胞であり、80～

50

【 1 5 6 8 】

【 1 5 6 9 】

【 1 5 7 0 】

幾つかの実施形態では、細胞療法製品における30～80%の細胞が、MHCクラスI及び／またはMHCクラスII分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現、ならびに少なくとも1種の免疫寛容誘導因子の増強された発現を示すHIP改変細胞であり、90～100%の細胞がCARを発現する。幾つかの実施形態では、細胞療法製品における30～70%の細胞が、MHCクラスI及び／またはMHCクラスII分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現、ならびに少なくとも1種の免疫寛容誘導因子の増強された発現を示すHIP改変細胞であり、90～100%の細胞がCARを発現する。幾つかの実施形態では、細胞療法製品における30～60%の細胞が、MHCクラスI及び／またはMHCクラスII分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現、ならびに少なくとも1種の免疫寛容誘導因子の増強された発現を示すHIP改変細胞であり、90～100%の細胞がCARを発現する。幾つかの実施形態では、細胞療法製品における30～50パーセントの細胞が、MHCクラスI及び／またはMHCクラスII分子のうちの1つ以上の分子の低減された発現、ならびに少なくとも1種の免疫寛容誘導因子の増強された発現を

示すH I P 改変細胞であり、90～100%の細胞がC A Rを発現する。

【1571】

また本明細書において、遺伝子操作された細胞または遺伝子操作された細胞の集団を含む組成物も提供される。幾つかの実施形態では、組成物は、医薬組成物である。

【1572】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される医薬組成物は、薬学的に許容される賦形剤または担体を更に含む。許容可能な担体、賦形剤、または安定剤は、用いられる投与量及び濃度でレシピエントに対して無毒性であり、これらとしては、緩衝剤、例えば、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸；アスコルビン酸及びメチオニンが含まれる抗酸化剤；防腐剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル、またはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えば、メチルまたはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満の）ポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリジン；グルコース、マンノース、もしくはデキストリンが含まれる単糖、二糖、及び他の炭水化物；キレート剤、例えば、EDTA；糖、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロース、もしくはソルビトール；塩形成性対イオン、例えば、ナトリウム；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；及び／または非イオン性活性剤、例えば、ポリソルベート（TWEEN（商標））、ポロキサマー（PLURONICS（商標））、もしくはポリエチレングリコール（PEG）が挙げられる。幾つかの実施形態では、医薬組成物は、薬学的に許容される緩衝液（例えば、中性緩衝食塩水またはリン酸緩衝食塩水）を含む。幾つかの実施形態では、医薬組成物は、例えば、組成物のpH、モル浸透圧濃度、粘性、透明度、色、等張性、匂い、無菌性、安定性、溶解速度もしくは放出速度、吸着性、または浸透性を改変、維持、保持するための1種以上の賦形剤を含有し得る。幾つかの態様では、当業者は、細胞を含有する医薬組成物がタンパク質を含有する医薬組成物とは異なり得ることを理解する。

【1573】

用語「医薬製剤」は、それに含有される活性成分の生物活性が有効となるのを可能にする形態であり、製剤が投与される対象に対して許容できないほど有毒である追加の成分を含有しない調製物を指す。

【1574】

「薬学的に許容される担体」は、対象に対して無毒性である、医薬製剤中の活性成分以外の成分を指す。薬学的に許容される担体としては、限定されるものではないが、緩衝液、賦形剤、安定剤、または防腐剤が挙げられる。

【1575】

幾つかの実施形態での医薬組成物は、疾患または状態を処置または予防するのに有効な量、例えば、治療上有効量または予防上有効量で本明細書に記載されるような遺伝子操作された細胞を含有する。幾つかの実施形態では、医薬組成物は、疾患または状態を処置または予防するのに有効な量、例えば、治療上有効量または予防上有効量で本明細書に記載されるような遺伝子操作された細胞を含有する。幾つかの実施形態では、処置された対象の定期評価により治療有効性または予防有効性がモニタリングされる。状態に応じた数日間またはそれ以上にわたる反復投与の場合、処置は、疾患の症状の所望される抑制が生じるまで繰り返される。しかしながら、他の投与計画が有用であってもよく、決定され得る。所望の投与量は、組成物の単回ボラス投与により、組成物の複数回ボラス投与により、または組成物の持続注入投与により送達され得る。

【1576】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような遺伝子操作された細胞は、標準的な投与技術、製剤、及び／またはデバイスを使用して投与される。幾つかの実施形態では

、本明細書に記載されるような遺伝子操作された細胞は、標準的な投与技術、製剤、及び／またはデバイスを使用して投与される。組成物の保存及び投与のための製剤及びデバイス、例えば、シリンジ及びバイアルが提供される。遺伝子操作された細胞は、カテーテル投与が含まれる局所注射、全身注射、局所注射、静脈内注射、または非経口投与により投与され得る。治療用組成物（例えば、遺伝子操作された細胞を含有する医薬組成物）を投与する場合、それは通常、単位可能な単位剤形（溶液、懸濁液、エマルション）に製剤化される。

【1577】

製剤としては、静脈内、腹腔内、または皮下投与用のものが挙げられる。幾つかの実施形態では、細胞集団は非経口投与される。本明細書で使用する場合、用語「非経口」は、静脈内、筋肉内、皮下、直腸、腔内、及び腹腔内投与を包含する。幾つかの実施形態では、細胞集団は、静脈内、腹腔内、または皮下注射による末梢からの全身性送達を使用して対象に投与される。

【1578】

幾つかの実施形態では、組成物は、無菌液体調製物、例えば、等張水溶液、懸濁液、エマルション、または分散体として提供され、それらは、幾つかの態様では、選択されたpHに緩衝され得る。液体組成物は、特に注射により投与するのに幾分より便利である。液体組成物は、例えば、水、生理食塩水、リン酸緩衝食塩水、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール）、及びそれらの好適な混合物を含有する溶媒または分散媒であり得る担体を含み得る。無菌注射剤は、細胞を、例えば、好適な担体、希釈液、または賦形剤、例えば、滅菌水、生理的食塩水、グルコース、デキストロースなどと混合された溶媒に組み込むことにより調製され得る。

【1579】

幾つかの実施形態では、薬学的に許容される担体としては、薬剤投与に適合可能なあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤、ならびに吸収遅延剤などが挙げられる（Gennaro, 2000, Remington: The science and practice of pharmacy, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA）。かかる担体または希釈剤の例としては、限定されるものではないが、水、生理食塩水、リンガー液、デキストロース溶液、及び5%のヒト血清アルブミンが挙げられる。リポソーム及び非水性ビヒクル、例えば、不揮発性油も使用され得る。補助的活性化合物も組成物に組み込まれ得る。薬学的担体は、遺伝子操作された細胞に適したもの、例えば、生理食塩液、デキストロース溶液、またはヒト血清アルブミンを含む溶液でなければならない。幾つかの実施形態では、かかる組成物のための薬学的に許容される担体またはビヒクルは、遺伝子操作された細胞が、生細胞の投与を可能にするのに十分な時間、維持され得るか、または生存可能な状態を維持し得る任意の非毒性の水溶液である。例えば、薬学的に許容される担体またはビヒクルは、生理食塩液または緩衝生理食塩溶液であり得る。

【1580】

幾つかの実施形態では、医薬組成物が含まれる、組成物は、無菌である。幾つかの実施形態では、細胞の単離、濃縮、または培養は、誤り、使用者による取り扱い、及び／または汚染を最小限にするために、密閉された環境または無菌環境で、例えば、無菌培養バッグで実行される。幾つかの実施形態では、無菌性は、例えば、無菌濾過膜を通して濾過することにより、容易に達成され得る。幾つかの実施形態では、培養は、気体透過性培養容器を使用して実行される。幾つかの実施形態では、培養は、バイオリアクターを使用して実行される。

【1581】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞及び組成物は、保存され得る。幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞及び組成物は、1～72時間保存され得る。幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞及び組成物は、1～7日間保存され得る。幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞及び

組成物は、1～5週間保存され得る。幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞及び組成物は、1～12ヵ月間保存され得る。幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞及び組成物は、1～30年間保存され得る。

【1582】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞及び組成物は、それらがドナーまたはドナーのプールから採取された後に保存され得る。幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞及び組成物は、製造前に保存され得る。幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞及び組成物は、製造開始後に保存され得る。幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞及び組成物は、製造プロセスの1、2、3、4、5、6、7、8、9、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20プロセスを完了した後に保存され得る。幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞及び組成物は、製造プロセスの1つ以上のプロセスを完了した後に保存され得る。幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞及び組成物は、製造プロセスを完了した後に保存され得る。幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞及び組成物は、改変前に保存され得る。幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞及び組成物は、改変開始後に保存され得る。幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞及び組成物は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20種の改変を完了した後に保存され得る。幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞及び組成物は、1種以上の改変を完了した後に保存され得る。幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞及び組成物は、改変を完了した後に保存され得る。幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞及び組成物は、遺伝子編集前に保存され得る。幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞及び組成物は、遺伝子編集開始後に保存され得る。幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞及び組成物は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20種の遺伝子編集を完了した後に保存され得る。幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞及び組成物は、1種以上の遺伝子編集を完了した後に保存され得る。幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞及び組成物は、遺伝子編集を完了した後に保存され得る。幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞及び組成物は、ウイルス形質導入前に保存され得る。幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞及び組成物は、ウイルス形質導入開始後に保存され得る。幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞及び組成物は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20種のウイルス形質導入を完了した後に保存され得る。幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞及び組成物は、1種以上のウイルス形質導入を完了した後に保存され得る。幾つかの実施形態では、本明細書において提供される細胞及び組成物は、ウイルス形質導入を完了した後に保存され得る。

【1583】

幾つかの実施形態では、細胞及び組成物は、液体窒素中で保存され得る。幾つかの実施形態では、細胞及び組成物は、冷凍庫内で-80℃にて保存され得る。幾つかの実施形態では、細胞及び組成物は、冷凍庫内で-20℃にて保存され得る。幾つかの実施形態では、細胞及び組成物は、氷上で保存され得る。幾つかの実施形態では、細胞及び組成物は、ドライアイス上で保存され得る。幾つかの実施形態では、細胞及び組成物は、冷蔵庫内で4℃にて保存され得る。

【1584】

また本明細書において、提供される遺伝子操作された細胞を凍結保存するのに適した組成物も提供される。幾つかの実施形態では、提供される遺伝子操作された細胞は、凍結保存媒体中で凍結保存される。幾つかの実施形態では、凍結保存媒体は、血清を含まない凍結保存媒体である。幾つかの実施形態では、組成物は、凍結保護物質を含む。幾つかの実施形態では、凍結保護物質は、DMSO及び／またはsグリセロールであるか、またはそ

れを含む。幾つかの実施形態では、凍結保存媒体は、5%または約5%~10%または約10%のDMSO(v/v)である。幾つかの実施形態では、凍結保存媒体は、5%または約5%のDMSO(v/v)である。幾つかの実施形態では、凍結保存媒体は、6%または約6%のDMSO(v/v)である。幾つかの実施形態では、凍結保存媒体は、7%または約7%のDMSO(v/v)である。幾つかの実施形態では、凍結保存媒体は、7.5%または約7.5%のDMSO(v/v)である。幾つかの実施形態では、凍結保存媒体は、8%または約8%のDMSO(v/v)である。幾つかの実施形態では、凍結保存媒体は、9%または約9%のDMSO(v/v)である。幾つかの実施形態では、凍結保存媒体は、10%または約10%のDMSO(v/v)である。幾つかの実施形態では、凍結保存媒体は、市販の凍結保存溶液(Cryosstor(商標)CS10)を含有する。Cryosstor(商標)CS10は、10%のジメチルスルホキシド(DMSO)を含有する凍結保存媒体である。幾つかの実施形態では、凍結保存用に製剤化された組成物は、低温、例えば、超低温で保存され得、例えば、-40℃~-150℃の温度範囲、または例えば、約80℃±6.0℃で保存され得る。

10

【1585】

凍結保存後に集団内の一部の細胞、例えば、最大10%、最大5%、最大1%、最大0.5%、または最大0.1%の細胞が死に得ることが理解されよう。あるいは、凍結保存後の細胞回収率は、最大20%または最大10%であり得る。幾つかの実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載される遺伝子操作された細胞、ならびに31.25%(v/v)のPlasma-Lyte A、31.25%(v/v)の5%デキストロース/0.45%塩化ナトリウム、10%のデキストラン40(LMD)/5%のデキストロース、20%(v/v)の25%ヒト血清アルブミン(HSA)、及び7.5%(v/v)のジメチルスルホキシド(DMSO)を含む薬学的に許容される担体を含む。

20

【1586】

幾つかの実施形態では、凍結保存された遺伝子操作された細胞は、解凍により投与用に調製される。幾つかの例では、遺伝子操作された細胞は、解凍直後に対象に投与され得る。幾つかのかかる実施形態では、組成物は、なんらの更なる処理なしにすぐ使用可能である。他の場合では、遺伝子操作された細胞は、解凍後に例えば、薬学的に許容される担体での再懸濁、活性化剤もしくは刺激剤とのインキュベーションにより更に処理されるか、または対象への投与前に活性化され、洗浄され、薬学的に許容される緩衝液中に再懸濁される。

30

【1587】

XI. キット、成分、及び製造物品

幾つかの態様では、本方法のキット、構成要素(例えば、消耗品)、及び組成物、本明細書に記載されるデバイス及びシステムが本明細書において提供される。幾つかの実施形態では、キットは、本明細書の開示に従った使用説明書を含む。

【1588】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子操作された細胞の集団を含むキットが本明細書において提供される。幾つかの実施形態では、(a)複数の遺伝子操作された細胞を含む細胞集団、及び(ii)1種以上のMHCクラスI分子及び/または1種以上のMHCクラスII分子(例えば、1種以上のMHCクラスIヒト白血球抗原及び/または1種以上のMHCクラスIIヒト白血球抗原)の発現を低減する、を含むキットが本明細書において提供され、ここで、(i)の増強された発現及び(ii)の低減された発現は、改変を含まない同じ細胞種の細胞と比較したものである。幾つかの実施形態では、(iii)CD47の発現を増強し、(iiii)1種以上のMHCクラスI分子及び/または1種以上のMHCクラスII分子(例えば、1種以上のMHCクラスIヒト白血球抗原及び/または1種以上のMHCクラスIIヒト白血球抗原)の発現を低減する、複数の遺伝子操作された細胞を含む細胞集団を含むキットまたは組み合わせが本明細書において提供され、ここで、(i)及び(ii)の増強された発現ならびに(iii)の低減された発現は、改変を含まない同じ細胞種の細胞と比較したものである。

40

50

【1589】

幾つかの実施形態では、細胞療法が含まれる、臨床移植治療に有用な物質を含有する製造物品が提供される。幾つかの実施形態では、製造物品は、細胞欠損症、例えば、限定されるものではないが、糖尿病（例えば、I型糖尿病）、血管病態または血管疾患、自己免疫性甲状腺炎、肝疾患（例えば、肝硬変）、角膜疾患（例えば、フックスジストロフィーまたは先天遺伝性角膜内皮ジストロフィー）、腎臓疾患、及びがん（例えば、B細胞急性リンパ芽球性白血病（B-A L L）、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、肝臓癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、結腸直腸癌、肺癌、非小細胞肺癌、急性骨髄性リンパ性白血病、多発性骨髄腫、胃癌、胃腺癌、膵臓腺癌、神経膠芽腫、神経芽細胞腫、肺扁平上皮細胞癌、肝細胞癌、及び膀胱癌）の処置に有用な物質を含有する。製造物品は、容器及び当該容器上のまたは当該容器に付随するラベルまたは添付文書を含み得る。好適な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ（例えば、ガラスまたはプラスチック容器）などが挙げられる。通常、容器は、同種異系細胞療法に有効な組成物を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る（例えば、容器は、皮下注射針により貫通可能な栓を有する静脈注射用溶液バッグまたはバイアルであり得る）。

10

【1590】

幾つかの態様では、本明細書において提供されるキットまたは製造物品は、遺伝子操作された細胞、例えば、本明細書において提供される遺伝子操作された細胞のいずれかの集団を含む。幾つかの実施形態では、キットまたは製造物品は、遺伝子操作された細胞の集団を含む組成物を含み、ここで、当該遺伝子操作された細胞は、（i）C D 4 7をコードする外来性ポリヌクレオチドを含む導入遺伝子、（i i）、及び（i i i）B 2 M遺伝子の両方のアレルの不活性化または破壊を含む。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたβ細胞は、C I E T A遺伝子の両方のアレルの不活性化または破壊を更に含む。

20

【1591】

ラベルまたは添付文書は、組成物が特定の状態を処置するために使用されることを示す。ラベルまたは添付文書は、医薬組成物を患者に投与するための使用説明書を更に含む。幾つかの実施形態では、製造物品は、併用療法を含む。

【1592】

製造物品及び／またはキットは、添付文書を更に含み得る。添付文書は、治療用製品の市販パッケージに慣習的に含まれる、適応症、用法、投与量、投与、禁忌に関する情報、及び／またはかかる治療用製品の使用に関する警告を含む使用説明書を指す。X I

30

【1593】

I. 処置方法

本明細書において、対象の疾患または状態を処置するのに使用される、本明細書に記載される遺伝子操作された細胞の集団を含む、提供される細胞組成物に関連する組成物及び方法が提供される。本明細書に記載される遺伝子操作された細胞の集団を投与することにより患者を処置する方法が本明細書において提供される。幾つかの実施形態では、細胞集団は、医薬組成物、例えば、本明細書で記載される任意のもので投与用に製剤化される。かかる方法及び使用としては、例えば、遺伝子操作された細胞の集団またはそれを含有する組成物の疾患、状態、または障害を有する対象への投与を伴う治療方法及び治療使用が挙げられる。特定の疾患適応症に適した本明細書において提供される遺伝子操作された細胞を選択することは、当業者のレベルの範囲内である。幾つかの実施形態では、細胞またはその医薬組成物は、疾患または障害の処置に達成するのに有効な量で投与される。使用としては、かかる方法及び処置における、ならびにかかる治療方法を実行するための薬剤の調製における遺伝子操作された細胞またはその医薬組成物の使用が挙げられる。幾つかの実施形態では、これにより、本方法は、対象の疾患または状態または障害を処置する。

40

【1594】

本明細書において提供される遺伝子操作された細胞は、例えば、疾患または障害の処置のための細胞療法の候補が含まれる、任意の好適な患者に投与され得る。細胞療法の候補

50

としては、本明細書において提供される主題の遺伝子操作された細胞の治療効果から潜在的に恩恵を受け得る疾患または状態を有する任意の患者が挙げられる。幾つかの実施形態では、患者は、投与される細胞の同種異系レシピエントである。幾つかの実施形態では、提供される遺伝子操作された細胞は、同種異系細胞療法に使用するのに有効である。本明細書において提供される主題の遺伝子操作された細胞の治療効果から恩恵を受ける候補は、疾患または状態の消失、低減、または改善を示す。

【1595】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される方法のいずれかにより作製されるものが含まれる、本明細書において提供される遺伝子操作された細胞は、細胞療法に使用され得る。本明細書において概説される治療細胞は、障害、例えば、限定されるものではないが、がん、遺伝的障害、慢性感染症、自己免疫障害、神経障害などを処置するのに有用である。

【1596】

幾つかの実施形態では、患者は、細胞欠損症を有する。本明細書で使用する場合、「細胞の欠損症」は、患者における細胞集団の機能障害または欠失を引き起こす任意の疾患または状態を指し、ここで、当該患者は、細胞集団を自然に交換または再生することができない。例示的な細胞欠損症としては、限定されるものではないが、自己免疫疾患（例えば、多発性硬化症、重症筋無力症、関節リウマチ、糖尿病、全身性ループス、及びエリテマトーデス）、神経変性疾患（例えば、ハンチントン病及びパーキンソン病）、心血管病態及び疾患、血管病態及び疾患、角膜病態及び疾患、肝臓病態及び疾患、甲状腺病態及び疾患、ならびに腎臓病態及び疾患が挙げられる。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞を投与される患者は、がんを有する。本明細書において提供される遺伝子操作された細胞により処置され得る例示的ながんとしては、限定されるものではないが、B細胞急性リンパ芽球性白血病（B-ALL）、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、肝臓癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、結腸直腸癌、肺癌、非小細胞肺癌、急性骨髄性リンパ性白血病、多発性骨髄腫、胃癌、胃腺癌、膵臓腺癌、神経膠芽腫、神経芽細胞腫、肺扁平上皮細胞癌、肝細胞癌、及び膀胱癌が挙げられる。ある特定の実施形態では、がん患者は、本明細書において提供される遺伝子操作されたCAR T細胞の投与により処置される。

【1597】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞の集団を投与する必要がある患者に遺伝子操作された細胞の集団を投与する方法であって、当該遺伝子操作された細胞が投与時または投与後に血液と接触し、当該遺伝子操作された細胞が血液と接触する場合にIBMIRを予防または減弱する改変を当該遺伝子操作された細胞が含む、当該方法が本明細書において提供される。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、静脈内注射または筋肉内注射により投与される。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、免疫寛容誘導因子（例えば、CD47）を過剰発現し、1種以上のMHCクラスI分子の低減された発現または発現の欠如を有する。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、β膵島細胞または肝実質細胞である。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、1種以上の補体阻害因子の過剰発現を更に含む。

【1598】

幾つかの実施形態では、細胞欠損症は糖尿病に関連するか、または細胞療法は糖尿病の処置のためのものであり、ここで、任意により、当該糖尿病はI型糖尿病である。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞の集団は、β膵島細胞が含まれる、膵島細胞の集団である。幾つかの実施形態では、膵島細胞は、膵島前駆細胞、未成熟膵島細胞、及び成熟膵島細胞からなる群から選択される。幾つかの実施形態では、本方法は、遺伝子操作されたβ膵島細胞の集団を含む組成物を患者に投与することを含み、ここで、当該遺伝子操作された細胞は、(i) CD47をコードする外来性ポリヌクレオチドを含む多シストロン性ベクター、及び(ii) B2M遺伝子の両方のアレルの不活性化または破壊を含む。幾つかの実施形態では、本方法は、遺伝子操作されたβ膵島細胞の集団を含む組成物を患者に投与することを含み、ここで、当該遺伝子操作されたβ膵島細胞は、(i) CD47

をコードする外来性ポリヌクレオチドを含む導入遺伝子を含む。幾つかの実施形態では、遺伝子操作されたβ細胞は、C I E T A 遺伝子の両方のアレルの不活性化または破壊を含む。幾つかの実施形態では、C D 4 7 をコードするポリヌクレオチドを含む導入遺伝子は、多シストロン性ベクターである導入遺伝子である。

【1599】

幾つかの実施形態では、細胞欠損症は肝疾患に関連するか、または細胞療法は肝疾患の処置のためのものである。幾つかの実施形態では、肝疾患は、肝硬変を含む。幾つかの実施形態では、細胞集団は、肝実質細胞または肝前駆細胞の集団である。幾つかの実施形態では、本方法は、遺伝子操作された肝細胞の集団を含む組成物を患者に投与することを含み、ここで、当該遺伝子操作された肝細胞は、(i) C D 4 7 をコードする外来性ポリヌクレオチドを含む導入遺伝子、及び (i i i) B 2 M 遺伝子の両方のアレルの不活性化または破壊を含む。幾つかの実施形態では、本方法は、遺伝子操作された肝細胞の集団を含む組成物を患者に投与することを含み、ここで、当該遺伝子操作された肝細胞は、(i) C D 4 7 をコードする外来性ポリヌクレオチドを含む導入遺伝子、及び (i i) B 2 M 遺伝子の両方のアレルの不活性化または破壊を含む。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された肝細胞は、C I E T A 遺伝子の両方のアレルの不活性化または破壊を含む。幾つかの実施形態では、C D 4 7 をコードするポリヌクレオチドを含む導入遺伝子は、多シストロン性ベクターである導入遺伝子である。

【1600】

幾つかの実施形態では、本明細書において提供される遺伝子操作された細胞またはそれを含有する組成物は、例えば、細胞移植、輸血、組織移植、または臓器移植などの以前の移植において存在した1種以上の抗原により感作された患者の処置に有用である。ある特定の実施形態では、以前の移植は、同種異系移植であり、患者は、当該同種異系移植により1種以上の同種異系抗原に対して感作されている。同種異系移植としては、限定されるものではないが、同種異系細胞移植、同種異系輸血、同種異系組織移植、または同種異系臓器移植が挙げられる。幾つかの実施形態では、患者は、妊娠しているか、または妊娠していた（例えば、妊娠中に同種免疫されているか、または同種免疫された）感作患者である。ある特定の実施形態では、患者は、以前の移植片に含まれる1種以上の抗原により感作されており、ここで、当該以前の移植片は、改変されたヒト細胞、組織、または器官である。幾つかの実施形態では、改変されたヒト細胞、組織、または器官は、改変された自家ヒト細胞、組織、または器官である。幾つかの実施形態では、以前の移植片は、非ヒト細胞、組織、または器官である。代表的実施形態では、以前の移植片は、改変された非ヒト細胞、組織、または器官である。ある特定の実施形態では、以前の移植片は、ヒト成分を含むキメラである。ある特定の実施形態では、以前の移植片は、C A R T 細胞である。ある特定の実施形態では、以前の移植は、自家移植であり、患者は、自家移植により1種以上の自己抗原に対して感作されている。ある特定の実施形態では、以前の移植片は、自家細胞、組織、または器官である。ある特定の実施形態では、感作患者は、アレルギーを有し、1種以上のアレルゲンに感作されている。代表的実施形態では、患者は、枯草熱、食物アレルギー、昆虫アレルギー、薬剤アレルギー、またはアトピー性皮膚炎を有する。

【1601】

幾つかの実施形態では、提供される遺伝子操作された細胞またはそれを含有する組成物を使用した処置を受ける患者は、前治療を受けたことがある。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞またはそれを含有する組成物は、前治療と同じ状態を処置するために使用される。特定の実施形態では、遺伝子操作された細胞またはそれを含有する組成物は、前治療と異なる状態を処置するために使用される。幾つかの実施形態では、患者に投与される遺伝子操作された細胞またはそれを含有する組成物は、前治療により処置された同じ状態または疾患の処置について増強された治療効果を示す。特定の実施形態では、投与される遺伝子操作された細胞またはそれを含有する組成物は、患者の状態または疾患の処置について前治療と比較してより長期の治療効果を示す。代表的実施形態では、投与され

る細胞は、前治療と比較して、がん細胞に対する増強された効力、有効性、及び／または特異性を示す。実施形態では、遺伝子操作された細胞は、がんの処置のためのCAR T細胞である。

【1602】

本明細書において提供される方法は、第1選択治療の失敗後の特定の状態または疾患に対する第2選択治療として使用され得る。幾つかの実施形態では、前治療は、治療として無効な処置である。本明細書で使用する場合、「治療として無効な」処置は、患者における要求に満たない臨床転帰をもたらす処置を指す。例えば、細胞欠損症の処置に関して、治療として無効な処置は、患者の欠損細胞と置き換わるのに望ましいレベルの機能的細胞及び／または細胞活性を達成せず、及び／または治療持続性を欠く処置を指し得る。がん処置に関しては、治療として無効な処置は、所望の効力、有効性、及び／または特異性のレベルを達成しない処置を指す。治療有効性は、当該技術分野において公知の任意の好適な技術を使用して測定され得る。幾つかの実施形態では、患者は、前治療に対する免疫応答を生じる。幾つかの実施形態では、前治療は、患者により拒絶される細胞、組織、または臓器移植である。幾つかの実施形態では、前治療は、機械により支援される処置を含んでいた。幾つかの実施形態では、機械により支援される処置は、血液透析または補助人工心臓を含んでいた。幾つかの実施形態では、患者は、機械により支援される処置に対する免疫応答を生じた。幾つかの実施形態では、前治療は、それら細胞が望ましくない様式で増殖及び分裂した場合に、治療細胞の死滅を引き起こすことができる安全スイッチを含む治療細胞の集団を含んでいた。ある特定の実施形態では、患者は、治療細胞の安全スイッチにより誘発される死滅の結果として免疫応答を生じる。ある特定の実施形態では、患者は、前治療により感作されている。代表的実施形態では、患者は、本明細書において提供される投与される遺伝子操作された細胞により感作されない。

【1603】

幾つかの実施形態では、提供される遺伝子操作された細胞またはそれを含有する組成物は、組織、臓器、または部分的臓器移植をそれ必要とする患者に提供する前に投与される。実施形態では、患者は、遺伝子操作された細胞に対する免疫応答を示さない。ある特定の実施形態では、遺伝子操作された細胞は、特定の組織または器官における細胞欠損症の処置のために患者に投与され、その後患者は、同じ特定の組織または器官の組織または臓器移植を受ける。かかる実施形態では、遺伝子操作された細胞による処置は、最終的な組織または臓器置換への橋渡し治療として機能する。例えば、幾つかの実施形態では、患者は、肝臓障害を有し、肝移植を受ける前に、本明細書において提供される遺伝子操作された肝細胞による処置を受ける。ある特定の実施形態では、遺伝子操作された細胞は、特定の組織または器官における細胞欠損症の処置のために患者に投与され、その後患者は、異なる組織または器官の組織または臓器移植を受ける。例えば、幾つかの実施形態では、患者は、腎臓移植を受ける前に本明細書において提供される遺伝子操作された膵臓β細胞で処置される糖尿病患者である。幾つかの実施形態では、本方法は、細胞欠損症の処置のためのものである。代表的実施形態では、組織または臓器移植は、心臓移植、肺移植、腎臓移植、肝移植、膵臓移植、腸管移植、胃移植、角膜移植、骨髄移植、血管移植、心臓弁移植、または骨移植である。

【1604】

患者を処置する方法は、通常、本明細書において提供される遺伝子操作された細胞またはそれを含有している組成物の投与によるものである。理解されるように、細胞及び／または治療のタイミングに関する本明細書に記載される全ての複数の実施形態について、細胞の投与は、導入された細胞の目的の部位での少なくとも部分的な局在化をもたらす方法または経路により達成される。細胞は、目的の部位に直接移植され得るか、または代替的に、移植された細胞の少なくとも一部もしくは細胞の成分が存続可能な状態を維持する対象内の目的の位置への送達をもたらす任意の適切な経路により投与される。幾つかの実施形態では、細胞は、疾患または障害、例えば、細胞療法により軽減され得る任意の疾患、障害、状態、またはそれらの症状を処置するために投与される。

【1605】

幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞の集団またはそれを含有する組成物は、患者が感作された少なくとも1日後、少なくとも2日後、少なくとも3日後、少なくとも4日後、少なくとも5日後、少なくとも6日後、少なくとも1週間後、もしくは少なくとも1ヵ月後、またはそれ以上後に投与される。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞の集団またはそれを含有する組成物は、患者が感作されたか、または感作の特性もしくは特徴を示した少なくとも1週間後（例えば、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間、12週間、13週間、14週間、15週間、16週間、17週間、18週間、19週間、20週間、またはそれ以上後）またはそれ以上後に投与される。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞の集団またはそれを含有する組成物は、患者が移植（例えば、同種異系移植）を受けたか、妊娠したか（例えば、妊娠中に同種免疫されるか、または同種免疫された）、または患者が感作されたか、もしくは感作の特性もしくは特徴を示した少なくとも1ヵ月後（例えば、1ヵ月、2ヵ月、3ヵ月、4ヵ月、5ヵ月、6ヵ月、7ヵ月、8ヵ月、9ヵ月、10ヵ月、11ヵ月、12ヵ月、13ヵ月、14ヵ月、15ヵ月、16ヵ月、17ヵ月、18ヵ月、19ヵ月、20ヵ月、またはそれ以上後）またはそれ以上後に投与される。

10

【1606】

幾つかの実施形態では、移植を受けた患者、妊娠していた（例えば、妊娠中に同種免疫されているか、または同種免疫された）患者、及び／または抗原（例えば、同種異系抗原）に対して感作されている患者は、本明細書に記載される遺伝子操作された細胞の集団の初回用量の投与、初回用量後の回復期間、及び記載される遺伝子操作された細胞の集団の2回目用量の投与を含む投与レジメンを実施される。幾つかの実施形態では、第1の細胞集団及び第2の細胞集団に存在する細胞種の混成物は異なる。ある特定の実施形態では、遺伝子操作された細胞の第1の集団及び遺伝子操作された細胞の第2の集団に存在する細胞種の混成物は、同じであるか、または実質的に同等である。多数の実施形態では、遺伝子操作された細胞の第1の集団及び遺伝子操作された細胞の第2の集団は、同じの細胞種を含む。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞の第1の集団及び遺伝子操作された細胞の第2の集団は、異なる細胞種を含む。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞の第1の集団及び遺伝子操作された細胞の第2の集団は、同じ百分率の細胞種を含む。他の実施形態では、遺伝子操作された細胞の第1の集団及び第2の細胞集団は、異なる百分率の細胞種を含む。

20

30

【1607】

幾つかの実施形態では、回復期間は、遺伝子操作された細胞の集団またはそれを含有する組成物の最初の投与後に開始し、かかる細胞が患者においてもはや存在しないか、または検出可能でない場合に終了する。幾つかの実施形態では、回復期間の期間は、細胞の最初の投与後から少なくとも1週間（例えば、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間、12週間、13週間、14週間、15週間、16週間、17週間、18週間、19週間、20週間、またはそれ以上）またはそれ以上である。幾つかの実施形態では、回復期間の期間は、細胞の最初の投与後から少なくとも1ヵ月（例えば、1ヵ月、2ヵ月、3ヵ月、4ヵ月、5ヵ月、6ヵ月、7ヵ月、8ヵ月、9ヵ月、10ヵ月、11ヵ月、12ヵ月、13ヵ月、14ヵ月、15ヵ月、16ヵ月、17ヵ月、18ヵ月、19ヵ月、20ヵ月、またはそれ以上）またはそれ以上である。

40

【1608】

幾つかの実施形態では、投与される遺伝子操作された細胞の集団またはそれを含有する組成物は、対象に投与される場合に低免疫原性である。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、低免疫性である。幾つかの実施形態では、遺伝子操作された細胞に対する免疫応答は、免疫原性細胞（例えば、同じか、または同様の細胞種または表現型であるが、遺伝子操作された細胞の改変、例えば、遺伝子改変を含まない細胞集団）の投与によりもたらされる免疫応答のレベルと比較して少なくとも5%、10%、15%、20%、

50

25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%低減または減弱される。幾つかの実施形態では、投与される遺伝子操作された細胞の集団またはそれを含有する組成物は、患者において遺伝子操作された細胞に対する免疫応答を誘発することができない。

【1609】

幾つかの実施形態では、投与される遺伝子操作された細胞の集団またはそれを含有する組成物は、患者における減少したレベルまたはより低レベルの全身性TH1活性化を誘発する。幾つかの例では、細胞により誘発される全身性TH1活性化のレベルは、免疫原性細胞（例えば、同じか、または同様の細胞種または表現型であるが、遺伝子操作された細胞の改変、例えば、遺伝子改変を含まない細胞集団）の投与によりもたらされる全身性TH1活性化のレベルと比較して少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%低い。幾つかの実施形態では、投与される遺伝子操作された細胞の集団またはそれを含有する組成物は、患者において全身性TH1活性化を誘発することができない。

10

【1610】

幾つかの実施形態では、投与される遺伝子操作された細胞の集団またはそれを含有する組成物は、患者における末梢血単核細胞（PBMC）の減少したレベルまたはより低レベルの免疫活性化を誘発する。幾つかの例では、細胞により誘発されるPBMCの免疫活性化のレベルは、免疫原性細胞（例えば、同じか、または同様の細胞種または表現型であるが、遺伝子操作された細胞の改変、例えば、遺伝子改変を含まない細胞集団）の投与によりもたらされるPBMCの免疫活性化のレベルと比較して少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%低い。幾つかの実施形態では、投与される遺伝子操作された細胞の集団またはそれを含有する組成物は、患者においてPBMCの免疫活性化を誘発することができない。

20

【1611】

幾つかの実施形態では、投与される遺伝子操作された細胞の集団またはそれを含有する組成物は、患者において減少したレベルまたはより低レベルのドナー特異的IgG抗体を誘発する。幾つかの例では、細胞により誘発されるドナー特異的IgG抗体のレベルは、免疫原性細胞（例えば、同じか、または同様の細胞種または表現型であるが、遺伝子操作された細胞の改変、例えば、遺伝子改変を含まない細胞集団）の投与によりもたらされるドナー特異的IgG抗体のレベルと比較して少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%低い。幾つかの実施形態では、投与される遺伝子操作された細胞の集団は、患者においてドナー特異的IgG抗体を誘発することができない。

30

40

【1612】

幾つかの実施形態では、投与される遺伝子操作された細胞の集団またはそれを含有する組成物は、患者において減少したレベルまたはより低レベルのIgM及びIgG抗体産生を誘発する。幾つかの例では、細胞により誘発されるIgM及びIgG抗体産生のレベルは、免疫原性細胞（例えば、同じか、または同様の細胞種または表現型であるが、遺伝子操作された細胞の改変、例えば、遺伝子改変を含まない細胞集団）の投与によりもたらされるIgM及びIgG抗体産生のレベルと比較して少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%低い。幾つかの実施形態では、投与される遺伝子操

50

作された細胞の集団またはそれを含有する組成物は、患者において I g M 及び I g G 抗体産生を誘発することができない。

【1613】

幾つかの実施形態では、投与される遺伝子操作された細胞の集団またはそれを含有する組成物は、患者において減少したレベルまたはより低レベルの細胞傷害性 T 細胞による殺傷を誘発する。幾つかの例では、細胞により誘発される細胞傷害性 T 細胞による殺傷のレベルは、免疫原性細胞（例えば、同じか、または同様の細胞種または表現型であるが、遺伝子操作された細胞の改変、例えば、遺伝子改変を含まない細胞集団）の投与によりもたらされる細胞傷害性 T 細胞による殺傷のレベルと比較して少なくとも 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % 低い。幾つかの実施形態では、投与される遺伝子操作された細胞の集団またはそれを含有する組成物は、患者において細胞傷害性 T 細胞による殺傷を誘発することができない。

【1614】

上記のように、ある特定の実施形態では、同種異系抗原、例えば、ヒト白血球抗原に対して感作された患者に投与され得る細胞が本明細書において提供される。幾つかの実施形態では、患者は、妊娠しているか、または妊娠していた（例えば、妊娠中に同種免疫された（例えば、胎児新生児溶血性疾患（HDFN）、新生児同種免疫性好中球減少症（NAN）、または胎児新生児同種免疫性血小板減少症（FNAIT）を有する）。換言すれば、患者は、妊娠中の同種免疫化に関連する障害または状態、例えば、限定されるものではないが、胎児新生児溶血性疾患（HDFN）、新生児同種免疫性好中球減少症（NAN）、及び胎児新生児同種免疫性血小板減少症（FNAIT）を有するか、または有していた。幾つかの実施形態では、患者は、同種異系移植、例えば、限定されるものではないが、同種異系細胞移植、同種異系輸血、同種異系組織移植、または同種異系臓器移植を受けている。幾つかの実施形態では、患者は、同種異系抗原に対するメモリー B 細胞を示す。幾つかの実施形態では、患者は、同種異系抗原に対するメモリー T 細胞を示す。かかる患者は、同種異系抗原に対するメモリー B 及びメモリー T 細胞を示し得る。

【1615】

記載される細胞が投与されると、患者は、全身性免疫応答を示さないか、または低免疫原性でない細胞に対する応答と比較して低減されたレベルの全身性免疫応答を示す。幾つかの実施形態では、患者は、適応免疫応答を示さないか、または低免疫原性でない細胞に対する応答と比較して低減されたレベルの適応免疫応答を示す。幾つかの実施形態では、患者は、自然免疫応答を示さないか、または低免疫原性でない細胞に対する応答と比較して低減されたレベルの自然免疫応答を示す。幾つかの実施形態では、患者は、T 細胞応答を示さないか、または低免疫原性でない細胞に対する応答と比較して低減されたレベルの T 細胞応答を示す。幾つかの実施形態では、患者は、B 細胞応答を示さないか、または低免疫原性でない細胞に対する応答と比較して低減されたレベルの B 細胞応答を示す。

【1616】

A. 用量及び投与計画

処置される適応症に応じて、任意の治療上有効量の本明細書に記載される細胞が医薬組成物に含まれ得る。細胞の非限定的な例としては、初代細胞（例えば、初代 β 脾島細胞）及び記載されるような遺伝子操作された人工多能性幹細胞から分化した細胞（例えば、iPSC から分化した β 脾島細胞または肝実質細胞）が挙げられる。幾つかの実施形態では、医薬組成物は、少なくとも約 1×10^2 、 5×10^2 、 1×10^3 、 5×10^3 、 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、または 5×10^{10} 個の細胞を含む。幾つかの実施形態では、医薬組成物は、最大約 1×10^2 、 5×10^2 、 1×10^3 、 5×10^3 、 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、1

$\times 10^9$ 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、または 5×10^{10} 個の細胞を含む。幾つかの実施形態では、医薬組成物は、最大約 6.0×10^8 個の細胞を含む。幾つかの実施形態では、医薬組成物は、最大約 8.0×10^8 個の細胞を含む。幾つかの実施形態では、医薬組成物は、少なくとも約 $1 \times 10^2 \sim 5 \times 10^2$ 、 $5 \times 10^2 \sim 1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3$ 、 $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 、または $1 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{10}$ 個の細胞を含む。代表的実施形態では、医薬組成物は、約 $1.0 \times 10^6 \sim$ 約 2.5×10^8 個の細胞を含む。

10

【1617】

幾つかの実施形態では、医薬組成物は、少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、または500mlの容量を有する。代表的実施形態では、医薬組成物は、最大約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、または500mlの容量を有する。代表的実施形態では、医薬組成物は、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、または500mlの容量を有する。幾つかの実施形態では、医薬組成物は、約1～50ml、50～100ml、100～150ml、150～200ml、200～250ml、250～300ml、300～350ml、350～400ml、400～450ml、または450～500mlの容量を有する。幾つかの実施形態では、医薬組成物は、約1～50ml、50～100ml、100～150ml、150～200ml、200～250ml、250～300ml、300～350ml、350～400ml、400～450ml、または450～500mlの容量を有する。幾つかの実施形態では、医薬組成物は、約1～10ml、10～20ml、20～30ml、30～40ml、40～50ml、50～60ml、60～70ml、70～80ml、70～80ml、80～90ml、または90～100mlの容量を有する。幾つかの実施形態では、医薬組成物は、約5ml～約80mlの範囲の容量を有する。代表的実施形態では、医薬組成物は、約10ml～約70mlの範囲の容量を有する。多数の実施形態では、医薬組成物は、約10ml～約50mlの範囲の容量を有する。

20

30

【1618】

特定の量／投与レジメンは、個体の体重、性別、年齢、及び健康状態；細胞の製剤、生化学性質、生理活性、生物学的利用能、及び副作用、ならびに完全な治療レジメンにおける細胞の数及び同一性に依りて異なる。

【1619】

幾つかの実施形態では、医薬組成物の用量は、約10mL～50mLの容量で約 $1.0 \times 10^5 \sim$ 約 2.5×10^8 個の細胞を含み、医薬組成物は単回用量として投与される。

40

【1620】

多数の実施形態では、細胞はT細胞であり、医薬組成物は、約 $2.0 \times 10^6 \sim$ 約 2.0×10^8 個の細胞、例えば、限定されるものではないが、初代T細胞、遺伝子操作された人工多能性幹細胞から分化したT細胞を含む。幾つかの例では、用量は、約10ml～50mlの容量で約 $1.0 \times 10^5 \sim$ 約 2.5×10^8 個の本明細書に記載される初代T細胞を含む。幾つかの例では、用量は、約10ml～50mlの容量で約 $1.0 \times 10^5 \sim$ 約 2.5×10^8 個の上記された初代T細胞を含む。種々の例では、用量は、約10ml～50mlの容量で約 $1.0 \times 10^5 \sim$ 約 2.5×10^8 個の本明細書に記載される遺

50

伝子操作された人工多能性幹細胞から分化したT細胞を含む。他の例では、用量は、約 $1.0 \times 10^5 \sim$ 約 2.5×10^8 個のT細胞（初代T細胞または遺伝子操作された人工多能性幹細胞から分化したT細胞が含まれる）より低い範囲である。更なる他の例では、用量は、約 $1.0 \times 10^5 \sim$ 約 2.5×10^8 個のT細胞（初代T細胞及び遺伝子操作された人工多能性幹細胞から分化したT細胞が含まれる）より高い範囲である。

【1621】

幾つかの実施形態では、医薬組成物は、50 kg 以下の対象について kg 体重当たり約 $1.0 \times 10^5 \sim$ 約 1.0×10^7 個の遺伝子操作された細胞（例えば、初代細胞または遺伝子操作された人工多能性幹細胞から分化した細胞）の単回用量として投与される。幾つかの実施形態では、医薬組成物は、50 kg 以下の対象について kg 体重当たり約 $0.5 \times 10^5 \sim$ 約 1.0×10^7 、約 $1.0 \times 10^5 \sim$ 約 1.0×10^7 、約 $1.0 \times 10^5 \sim$ 約 1.0×10^7 、約 $5.0 \times 10^5 \sim$ 約 1×10^7 、約 $1.0 \times 10^6 \sim$ 約 1×10^7 、約 $5.0 \times 10^6 \sim$ 約 1.0×10^7 、約 $1.0 \times 10^5 \sim$ 約 5.0×10^6 、約 $1.0 \times 10^5 \sim$ 約 1.0×10^6 、約 $1.0 \times 10^5 \sim$ 約 5.0×10^5 、約 $1.0 \times 10^5 \sim$ 約 5.0×10^6 、約 $2.0 \times 10^5 \sim$ 約 5.0×10^6 、約 $3.0 \times 10^5 \sim$ 約 5.0×10^6 、約 $4.0 \times 10^5 \sim$ 約 5.0×10^6 、約 $5.0 \times 10^5 \sim$ 約 5.0×10^6 、約 $6.0 \times 10^5 \sim$ 約 5.0×10^6 、約 $7.0 \times 10^5 \sim$ 約 5.0×10^6 、約 $8.0 \times 10^5 \sim$ 約 5.0×10^6 、または約 $9.0 \times 10^5 \sim$ 約 5.0×10^6 個の細胞の単回用量として投与される。幾つかの実施形態では、用量は、50 kg 以下の対象について kg 体重当たり約 $0.2 \times 10^6 \sim$ 約 5.0×10^6 個の細胞である。多数の実施形態では、用量は、50 kg 以下の対象について kg 体重当たり約 $0.2 \times 10^6 \sim$ 約 5.0×10^6 個の細胞より低い範囲である。多数の実施形態では、用量は、50 kg 以下の対象について kg 体重当たり約 $0.2 \times 10^6 \sim$ 約 5.0×10^6 個の細胞より高い範囲である。代表的実施形態では、単回用量は、約 10 ml $\sim$ 50 ml の容量である。幾つかの実施形態では、用量は、静脈内投与される。

【1622】

代表的実施形態では、細胞は、50 kg を超える対象について約 $1.0 \times 10^6 \sim$ 約 5.0×10^8 個の細胞（例えば、初代細胞及び遺伝子操作された人工多能性幹細胞から分化した細胞）の単回用量で投与される。幾つかの実施形態では、医薬組成物は、50 kg 以下の対象について kg 体重当たり約 $0.5 \times 10^6 \sim$ 約 1.0×10^9 、約 $1.0 \times 10^6 \sim$ 約 1.0×10^9 、約 $1.0 \times 10^6 \sim$ 約 1.0×10^9 、約 $5.0 \times 10^6 \sim$ 約 1.0×10^9 、約 $1.0 \times 10^7 \sim$ 約 1.0×10^9 、約 $5.0 \times 10^7 \sim$ 約 1.0×10^9 、約 $1.0 \times 10^6 \sim$ 約 5.0×10^7 、約 $1.0 \times 10^6 \sim$ 約 1.0×10^7 、約 $1.0 \times 10^6 \sim$ 約 5.0×10^7 、約 $1.0 \times 10^7 \sim$ 約 5.0×10^8 、約 $2.0 \times 10^7 \sim$ 約 5.0×10^8 、約 $3.0 \times 10^7 \sim$ 約 5.0×10^8 、約 $4.0 \times 10^7 \sim$ 約 5.0×10^8 、約 $5.0 \times 10^7 \sim$ 約 5.0×10^8 、約 $6.0 \times 10^7 \sim$ 約 5.0×10^8 、約 $7.0 \times 10^7 \sim$ 約 5.0×10^8 、約 $8.0 \times 10^7 \sim$ 約 5.0×10^8 、または約 $9.0 \times 10^7 \sim$ 約 5.0×10^8 個の細胞の単回用量として投与される。多数の実施形態では、細胞は、50 kg を超える対象について約 $1.0 \times 10^7 \sim$ 約 2.5×10^8 個の細胞の単回用量で投与される。幾つかの実施形態では、細胞は、50 kg を超える対象について約 $1.0 \times 10^7 \sim$ 約 2.5×10^8 個の細胞より低い範囲の単回用量で投与される。幾つかの実施形態では、細胞は、50 kg を超える対象について約 $1.0 \times 10^7 \sim$ 約 2.5×10^8 個の細胞より高い範囲の単回用量で投与される。幾つかの実施形態では、用量は、静脈内投与される。代表的実施形態では、単回用量は、約 10 ml $\sim$ 50 ml の容量である。幾つかの実施形態では、用量は、静脈内投与される。

【1623】

代表的実施形態では、用量は、1分当たり約 1 $\sim$ 50 ml、1分当たり 1 $\sim$ 40 ml、1分当たり 1 $\sim$ 30 ml、1分当たり 1 $\sim$ 20 ml、1分当たり 10 $\sim$ 20 ml、1分当たり 10 $\sim$ 30 ml、1分当たり 10 $\sim$ 40 ml、1分当たり 10 $\sim$ 50 ml、1分当たり 20 $\sim$ 50 ml、1分当たり 30 $\sim$ 50 ml、1分当たり 40 $\sim$ 50 ml の速度で静脈

内投与される。多数の実施形態では、医薬組成物は、静脈内投与用の1つ以上の注入バッグで保存される。幾つかの実施形態では、用量は、10分、15分、20分、25分、30分、35分、40分、45分、50分、55分、60分、70分、80分、90分、120分、150分、180分、240分、または300分以下で完全に投与される。

【1624】

幾つかの実施形態では、医薬組成物の単回用量は、単一の注入バッグに存在する。他の実施形態では、医薬組成物の単回用量は、2、3、4、または5つの別個の注入バッグに分割される。

【1625】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される細胞は、複数回の投与、例えば、2、3、4、5、6回、またはそれ以上の投与で投与される。幾つかの実施形態では、複数回の投与の各投与は、1～24時間の範囲の間隔で行われる。幾つかの例では、後続の投与は、最初または直前の投与から約1時間～約24時間（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23時間、または約24時間）後に行われる。幾つかの実施形態では、複数回の投与の各投与は、約1日～28日の範囲の間隔で行われる。幾つかの例では、後続の投与は、最初または直前の投与から約1日～約28日（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27日、または約28日）後に行われる。多数の実施形態では、複数回の投与の各投与は、1週間～約6週間の範囲の間隔で行われる。ある特定の例では、後続の投与は、最初または直前の投与から約1週間～約6週間（例えば、約1、2、3、4、5、または6週間）後に行われる。幾つかの実施形態では、複数回の投与の各投与は、約1ヵ月～約12ヵ月の範囲の間隔で行われる。幾つかの例では、後続の投与は、最初または直前の投与から約1ヵ月～約12ヵ月（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12ヵ月）後に行われる。

【1626】

幾つかの実施形態では、対象は、第1の時点で第1の投与レジメンを実施され、次いで、その後第2の時点で第2の投与レジメンを実施される。幾つかの実施形態では、第1の投与レジメンは、第2の投与レジメンと同じである。他の実施形態では、第1の投与レジメンは、第2の投与レジメンと異なる。幾つかの例では、第1の投与レジメン及び第2の投与レジメンにおける細胞数は同じである。幾つかの例では、第1の投与レジメン及び第2の投与レジメンにおける細胞数は異なる。幾つかの例では、第1の投与レジメン及び第2の投与レジメンの投与回数は同じである。幾つかの例では、第1の投与レジメン及び第2の投与レジメンの投与回数は異なる。

【1627】

幾つかの実施形態では、細胞は、遺伝子操作されたT細胞（例えば、初代T細胞または遺伝子操作された人工多能性幹細胞から分化したT細胞）であり、第1のCAR及び当該第2のCARが異なるように、第1の投与レジメンが当該第1のCARを発現する遺伝子操作されたT細胞を含み、第2の投与レジメンが当該第2のCARを発現する遺伝子操作されたT細胞を含む。例えば、第1のCAR及び第2のCARは、異なる標的抗原に結合する。幾つかの例では、第1のCARは、抗原に結合するscFvを含み、第2のCARは、異なる抗原に結合するscFvを含む。幾つかの実施形態では、第1のCAR及び第2のCARが同一となるように、第1の投与レジメンが当該第1のCARを発現する遺伝子操作されたT細胞を含み、第2の投与レジメンが当該第2のCARを発現する遺伝子操作されたT細胞または初代T細胞を含む。第1の投与レジメンは、第2の投与レジメンから少なくとも1ヵ月、2ヵ月、3ヵ月、4ヵ月、5ヵ月、6ヵ月、7ヵ月、8ヵ月、9ヵ月、10ヵ月、11ヵ月、12ヵ月、1～3ヵ月、1～6ヵ月、4～6ヵ月、3～9ヵ月、3～12ヵ月、またはそれ以上の月数隔てて対象に実施され得る。幾つかの実施形態では、対象は、疾患（例えば、がん）の経過中に複数の投与レジメンを実施され、投与レジメンのうちの少なくとも2つは、本明細書に記載される同じ種類の遺伝子操作されたT細胞

胞を含む。他の実施形態では、複数の投与レジメンのうちの少なくとも2つは、本明細書に記載される異なる種類の遺伝子操作されたT細胞を含む。

【1628】

B. 免疫抑制剤

幾つかの実施形態では、免疫抑制剤及び／または免疫調節剤は、遺伝子操作された細胞の集団の、またはそれを含有する組成物での最初の投与前に患者に投与されない。

【1629】

幾つかの実施形態では、免疫抑制剤及び／または免疫調節剤は、遺伝子操作された細胞の投与を受けた患者に投与され得る。幾つかの実施形態では、免疫抑制剤及び／または免疫調節剤は、遺伝子操作された細胞の投与前に投与される。幾つかの実施形態では、免疫抑制剤及び／または免疫調節剤は、遺伝子操作された細胞の1回目及び／または2回目投与の投与前に投与される。

10

【1630】

免疫抑制剤及び／または免疫調節剤の非限定的な例としては、サイクロスポリン、アザチオプリン、ミコフェノール酸、ミコフェノール酸モフェチル、コルチコステロイド、例えば、プレドニゾン、メトトレキサート、金塩、スルファサラジン、抗マラリア薬、ブレキナル、レフルノミド、ミゾリビン、15-デオキシスベルグアリン、6-メルカプトプリン、シクロホスファミド、ラパマイシン、タクロリムス（FK-506）、OKT3、抗胸腺細胞グロブリン、チモペンチン、チモシンα、及び同様の薬剤が挙げられる。幾つかの実施形態では、免疫抑制剤及び／または免疫調節剤は、IL-2受容体のp75に結合する抗体、例えば、MHC、CD2、CD3、CD4、CD7、CD28、B7、CD40、CD45、IFN-γ、TNF-α、IL-4、IL-5、IL-6R、IL-6、IGF、IGFR1、IL-7、IL-8、IL-10、CD11a、またはCD58に結合する抗体、及びそれらのリガンドのいずれかに結合する抗体からなる免疫抑制性抗体の群から選択される。免疫抑制剤及び／または免疫調節剤が細胞の1回目投与の前または後に患者に投与される幾つかの実施形態では、投与は、MHCクラスIIの発現を有し、CD47の外來性発現を有さない細胞で必要とされるよりも低い投与量で行われる。

20

【1631】

幾つかの実施形態では、このような免疫抑制剤及び／または免疫調節剤は、可溶性IL-15R、IL-10、B7分子（例えば、B7-1、B7-2、それらのバリエーション及びそれらの断片）、ICOS、及びOX40、T細胞の負の調節因子の阻害剤（例えば、CTLA-4に対する抗体）、ならびに同様の薬剤から選択され得る。

30

【1632】

幾つかの実施形態では、免疫抑制剤及び／または免疫調節剤は、遺伝子操作された細胞の集団の1回目の投与前に患者に投与され得る。幾つかの実施形態では、免疫抑制剤及び／または免疫調節剤は、細胞の1回目投与の少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14日、またはそれ以上前に投与される。幾つかの実施形態では、免疫抑制剤及び／または免疫調節剤は、細胞の1回目投与の少なくとも1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、またはそれ以上前に投与される。

40

【1633】

実施形態では、免疫抑制剤及び／または免疫調節剤は、細胞の1回目投与後に患者に投与されないか、または細胞の1回目投与の少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14日、もしくはそれ以上後に投与される。幾つかの実施形態では、免疫抑制剤及び／または免疫調節剤は、細胞の1回目投与の少なくとも1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、またはそれ以上後に投与される。

【1634】

幾つかの実施形態では、免疫抑制剤及び／または免疫調節剤は、遺伝子操作された細胞

50

の集団の投与前に患者に投与されない。多数の実施形態では、免疫抑制剤及び／または免疫調節剤は、遺伝子操作された細胞の集団の1回目及び／または2回目の投与前に患者に投与される。幾つかの実施形態では、免疫抑制剤及び／または免疫調節剤は、細胞の投与の少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14日、またはそれ以上前に投与される。幾つかの実施形態では、免疫抑制剤及び／または免疫調節剤は、細胞の1回目及び／または2回目投与の少なくとも1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、またはそれ以上前に投与される。実施形態では、免疫抑制剤及び／または免疫調節剤は、細胞の投与の少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14日、またはそれ以上後に投与される。幾つかの実施形態では、免疫抑制剤及び／または免疫調節剤は、細胞の1回目及び／または2回目投与の少なくとも1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、またはそれ以上後に投与される。

10

【1635】

免疫抑制剤及び／または免疫調節剤が細胞の投与前または投与後に患者に投与される幾つかの実施形態では、投与は、免疫原性細胞（例えば、同じか、または類似の細胞種または表現型であるが、遺伝子操作された細胞の改変、例えば、遺伝子改変を含まない、例えば、内在性レベルのMHCクラスI及び／またはMHCクラスII発現を有し、CD47の増強された（例えば、外来性）発現を有さない細胞の集団）で必要とされるよりも低い投与量で行われる。

【1636】

20

XII. 結論

本技術の実施形態の上記の詳細な説明は、網羅的であること、または本技術を上記で開示される厳密な形態に限定することを意図しない。本技術の特定の実施形態及び本開示の例が、例示目的のために本明細書に開示されるが、関連する技術分野の当業者が理解するように、様々な等価の改変が本技術の範囲内で可能である。例えば、ステップが所与の順序で提示されるが、代替的实施形態において異なる順序でステップが実行され得る。本明細書において開示される種々の実施形態は、更なる実施形態を提供するために組み合わせられてもよい。

【1637】

上記により、本技術の特定の実施形態が例示目的で明細書に開示されたが、周知の構成要素及び機能が、本技術の実施形態の説明を不必要に不明確にするのを避けるために示されていないか、または詳細に開示されていないことが理解されよう。文脈が許す場合、単数形または複数形の用語は、それぞれ複数形または単数形の用語も包含し得る。更に、本技術の幾つかの実施形態に関連する利点がそれらの実施形態の文脈において開示されているが、他の実施形態もかかる利点を示し得、必ずしも全ての実施形態が、本技術の範囲内に収まるためにかかる利点を示す必要はない。従って、本開示及び関連する技術は、明示的に示されていないか、または本明細書に開示されていない他の実施形態を包含し得る。

30

【実施例】

【1638】

本開示は、当業者に公知の標準的な技術及びこれらの実施例に記載されるものと類似した技術が必要に応じて使用され得る以下の非限定的な実施例により更に表現され説明され得る。本明細書において提供される本開示と一致する追加の実施形態が当業者により想定されると理解されよう。

40

【1639】

実施例1. RNA-seqによるCD47アイソフォーム発現の測定

Gibco WT及びRUES2 WTの2つのヒト幹細胞試料における各CD47アイソフォームの発現を、RNA-seqにより測定した。具体的には、Qiagen AllPrep DNA/RNA単離キットを使用して1試料当たり 1×10^6 個の細胞からRNAを抽出した。抽出プロセスにおいてQiashrredderを使用して、可溶化液をホモジナイズした。バイオアナライザーを使用して、RNAを定量化し、RNAの

50

質を評価した。RUES2 WT試料由来の500 ngのRNA、及びGibco WT試料由来の100 ngのRNA（500 ng未満のRNAがGibco WT試料から抽出されたため）をライブラリー作製に使用した。ライブラリーは、Illumina TruSeq Stranded mRNAキットを使用して作製した。製造者のプロトコールを使用した。IDT for Illumina TruSeq Indices（96サンプル、96インデックス）プレートをアダプターに使用した。ライブラリーをバイオアナライザーで分析して、品質を確認し、qPCRを使用して定量化した（Kappa Quantification Kit）。

【1640】

RNA-seqの結果を表28にまとめた。RNA-seqの結果によれば、CD47-202及びCD47-201は、Gibco及びRues2ヒト幹細胞株において相対的に等しいレベルで発現していた。CD47-206、205、204もこれらの幹細胞株において高度に発現するようであった。CD47-203発現の証拠は、これらの幹細胞株において検出されなかった。

【表28】

表28. RNA-seqの結果

転写物名称	転写物ID (bpでの長さ)	Gibco WTでのTPM* (SSAM000360361)	RUES2 WTでのTPM (SSAM000361)
CD47-202	ENST00000361309 (5292)	0.21	1.07
CD47-201	ENST00000355354 (5228)	1.90	0.84
CD47-206	ENST00000644850 (766)	3.38	5.96
CD47-205	ENST00000517766 (538)	4.68	2.81
CD47-204	ENST00000471694 (6796)	0.90	2.46
*TPMは100万配列当たりの転写産物量を指す。 **CD47-203はリードによりサポートされなかった			

【1641】

実施例2. CD47 KO細胞における短縮されたCD47バリエントの発現

これらの実験の全体的な目的は、標的細胞に送達され得、SIRPαとの機能的相互作用を達成し得るCD47の短縮バリエントを設計することであった。表29は、この研究の一部として設計された短縮型CD47バリエントを以下に示す。

10

20

30

40

50

【表 29-1】

表 29. 短縮型 CD47 バリエント

設計された短縮型 CD47 バリエント	核酸配列番号	アミノ酸配列番号
野生型 hCD47	19	該当なし
CD47-202	14	2
CD47-201	13	1
N末端を有さない CD47-206	133	80
復元された N末端を有する CD47-206	134	81
TMD3 欠失型	135	82
EC+TMD3 欠失型	136	83
TMD2+EC+TMD3 欠失型	137	84
最後の IC 欠失型	138	85
TMD5+最後の IC 欠失型	139	86
EC+TMD5+最後の IC 欠失型	140	87
TMD4 欠失型	141	88
DAF/CD55 GPI アンカーを有する CD47 ECD	142	89
長鎖 TRAILR3 GPI アンカーを有する CD47 ECD	143	90
短鎖 TRAILR3 GPI アンカーを有する CD47 ECD	144	91
CD8a TMD及び短鎖 IC (9aa) を有する CD47 ECD	145	92
CD28 TMD及び短鎖 IC (9aa) を有する CD47 ECD	146	93
PDGFR TMD及び短鎖 IC (9aa) を有する CD47 ECD	147	94
PDGFR ヒンジ、TMD、及び短鎖 IC (9aa) を有する CD47 IgV、ヒンジ領域由来の 3 アミノ酸	148	95
CD47 IgV、ヒンジ領域由来の 3 アミノ酸、IgG4 ヒンジ-CD28 TM	149	96
CD47 IgV、ヒンジ領域由来の 3 アミノ酸、IgG4 ヒンジ-CD8a TM	150	97
CD47 IgV、ヒンジ領域由来の 3 アミノ酸、CD28 ヒンジ-CD28 TM	151	98
CD47 IgV、ヒンジ領域由来の 3 アミノ酸、CD28 ヒンジ-CD8a TM	152	99

【表 29-2】

CD47 IgV、ヒンジ領域由来の 3 アミノ酸、CD8a ヒンジ-CD28 TM	153	100
CD47 IgV、ヒンジ領域由来の 3 アミノ酸、CD8a ヒンジ-CD8a TM	154	101
バイストロン性 CDA に由来するコドン最適化した CD47	200	199
hCD47 N361 変異型	171	118
hCD47 N362 変異型	172	119
hCD47 N363 変異型	173	120
hCD47 N364 変異型	174	121
hCD47 N366 変異型	175	122
hCD47 N368 変異型	176	123
hCD47 N369 変異型	177	124
hCD47 N3610 変異型	178	125
hCD47 N3612 変異型	179	126
hCD47 N3614 変異型	180	127
hCD47 N3617 変異型	181	128
hCD47 N3618 変異型	182	129
hCD47 N3621 変異型	183	130
hCD47 N3623 変異型	184	131
hCD47 N3624 変異型	185	132

【1642】

各々の短縮型 CD47 バリエント（上記の表 5 に記載される）について L V V を作製し、抗 CD47 抗体染色及び S I R P α - F c 染色により測定される CD47 細胞外ドメイン（ECD）の発現に差があるかどうか決定するために以下の実験を実施した。

【1643】

方法 レンチウイルスベクター（L V V）作製

本実施例において、レンチウイルスベクター（L V V）を、第 3 世代レンチウイルス作製方法を使用して作製した。当業者は、L V V を作製するための当該技術分野において公知の他の方法が本明細書に記載される方法と共に使用され得ることを理解するであろう。例示的な方法は、ワールド・ワイド・ウェブを通して addgene.org/guides/lentivirus で利用可能である。要約すると、1 日目に、293T を組織

10

20

30

40

50

培養プレートにプレーティングした。その翌日、表5（上記を参照のこと）に記載されるCD47バリエーションのうちの1つをコードするレンチウイルス導入ベクター、レンチウイルスエンベローププラスミド、及びレンチウイルスパッケージングプラスミドを細胞に形質移入した。2日後、LVVを含有する細胞培地を採取し、その後の使用のために凍結させた。

【1644】

p24 ELISAによるLVV力価

本実施例では、LVV力価をELISA自動免疫測定システムでのp24 ELISAにより評価した。当業者は、LVV力価を評価するための当該技術分野において公知の他の方法が本明細書に記載される方法と共に使用され得ることを理解するであろう。

要約すると、LVV試料を解凍し、各々のアリコートに96ウェルプレートのウェルに添加した。次に、等容量の溶解緩衝液（RIPA緩衝液で希釈されたプロテアーゼ阻害剤）を各ウェルに添加し、混合物をシェーカー上で4℃にて30分間インキュベートした。インキュベーション後、混合物を希釈し、p24 ELISAカートリッジに添加し、ELISA自動免疫測定システムで分析した。

【1645】

CD47KO HEK293Tの短縮型CD47 LVV感染

CD47をもはや発現しないように改変されたHEK293T細胞（CD47KO HEK293T）を組織培養プレートにプレーティングし、37℃及び5%CO₂でインキュベートした。次に、LVV試料を解凍し、穏やかにピペティングすることにより混合し、CD47KO HEK293T細胞を含有するウェルに加え、プレートを1000xgで室温にて30分間遠心しながら感染させた。次に、全ての宿主細胞プレートを37℃及び5%CO₂の細胞培養インキュベーターに入れて、3日間増殖させた。

【1646】

抗CD47でのCD47KO HEK293Tの染色

短縮型CD47 LVVで処理されたCD47KO HEK293T細胞を採取し、細胞染色緩衝液（BioLegendカタログ番号：420201）中に再懸濁した。次いで、細胞を遠心分離し、細胞生死判定用色素（eBiosciencesカタログ番号：65-0865-14）を含有する細胞染色緩衝液中に再懸濁し、氷上で30分間インキュベートし、洗浄し、細胞染色緩衝液中に再懸濁した。次に、細胞を遠心分離し、PE-抗ヒトCD47抗体クローンCC2C6（BioLegendカタログ番号：323108）またはFITC-抗ヒトCD47抗体クローンCC2C6（BioLegendカタログ番号：323106）のいずれかを含有する細胞染色緩衝液中に再懸濁し、氷上で30分間インキュベートし、洗浄し、細胞染色緩衝液中に再懸濁した。最後に、CD47発現をフローサイトメトリーにより評価した。

【1647】

SIRPα-FCでのCD47KO HEK293Tの染色

短縮型CD47 LVVで処理されたCD47KO HEK293T細胞を採取し、細胞染色緩衝液（BioLegendカタログ番号：420201）中に再懸濁した。次いで、細胞を遠心分離し、細胞生死判定用色素（eBiosciencesカタログ番号：65-0865-14）を含有する細胞染色緩衝液中に再懸濁し、氷上で30分間インキュベートし、洗浄し、細胞染色緩衝液中に再懸濁した。次に、細胞を遠心分離し、PE-SIRPα-FC-PE（AcroBiosystemsカタログ番号：SIA-HP252）を含有する細胞染色緩衝液中に再懸濁し、氷上で30分間インキュベートし、洗浄し、細胞染色緩衝液中に再懸濁した。最後に、CD47発現をフローサイトメトリーにより評価した。

【1648】

結果

図6は、ELISA自動免疫測定システムにより評価される、例示的な短縮型CD47バリエーションを含むLVVのウイルス価を示す。

10

20

30

40

50

【1649】

図7～14及び図18Aは、短縮型CD47 L V Vによる処理後のCD47を発現するCD47 KO HEK293T細胞の百分率(%)を示す(抗CD47フローサイトメトリーにより評価される)。データは、多数の短縮型CD47バリエーション(例えば、CAG-CD47 ECD-CD59 GPI及びCAG-CD47 ECD-DAF/CD55 GPI)が、過剰発現されたWT CD47と同程度のレベルで発現することを実証する。

【1650】

図15～17及び図18Bは、短縮型CD47 L V Vによる処理後のCD47を発現するCD47 KO HEK293T細胞の百分率(%)を示す(SIRPα-Fcフローサイトメトリーにより評価される)。データは、多数の短縮型CD47バリエーション(例えば、CAG-CD47 ECD-CD59 GPI及びCAG-CD47 ECD-DAF/CD55 GPI)が、過剰発現されたWT CD47と同程度のレベルで発現することを実証する。

10

【1651】

実施例3. 短縮型CD47バリエーションの発現レベルの測定

各々の短縮型CD47バリエーション(上記の表5に記載される)についてL V Vを作製し、抗CD47抗体染色及びSIRPα-Fc染色により測定される、異なる細胞種における外来性野生型CD47の発現と比較した外来性CD47バリエーションの相対発現レベルを測定するために、以下の実験が実施される。

20

【1652】

これらの実験は、(限定されるものではないが)島細胞、β膵島細胞、膵島細胞、免疫細胞、B細胞、T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、ナチュラルキラーT(NKT)細胞、マクロファージ細胞、内皮細胞、筋細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、骨格筋細胞、ドーパミン作動性ニューロン、網膜色素上皮細胞、視細胞、肝実質細胞、甲状腺細胞、皮膚細胞、グリア前駆細胞、神経細胞、心臓細胞、幹細胞、造血幹細胞、人工多能性幹細胞(iPSC)、間葉系幹細胞(MSC)、胚性幹細胞(ESC)、多能性幹細胞(PSC)、及び/または血液細胞が含まれる、本明細書において開示される任意の細胞種を含み得る。

【1653】

例示的な方法としては、実施例2に記載されるもの、例えば、表5(上記を参照のこと)に記載されるCD47バリエーションのうちの1つをコードするレンチウイルス導入ベクター、レンチウイルスエンベローププラスミド、及びレンチウイルスパッケージングプラスミドの細胞への形質移入が挙げられる。

30

【1654】

例示的な結果としては、0.25x、0.5x、0.75x、1x、1.25x、1.5x、1.75x、5x、4x、2x、3x、7x、6x、9x、8x、または10x用量(例えば、レンチウイルス力価)の短縮型CD47バリエーションを細胞に送達した後(例えば、形質移入した後)の細胞における野生型CD47で達成される外来性発現レベル以上の外来性発現レベルの達成が挙げられる。

40

【1655】

実施例4. 低免疫性を達成するための短縮型CD47バリエーションの発現レベルの決定

低免疫性を達成するために必要とされる短縮型CD47バリエーション(上記の表5に記載される)の発現レベルを決定するために、以下の実験が実施される。

【1656】

これらの実験は、(限定されるものではないが)島細胞、β膵島細胞、膵島細胞、免疫細胞、B細胞、T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、ナチュラルキラーT(NKT)細胞、マクロファージ細胞、内皮細胞、筋細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、骨格筋細胞、ドーパミン作動性ニューロン、網膜色素上皮細胞、視細胞、肝実質細胞、甲状腺細胞、皮膚細胞、グリア前駆細胞、神経細胞、心臓細胞、幹細胞、造血幹細胞、人工多能性幹細胞(

50

iPSC)、間葉系幹細胞(MSC)、胚性幹細胞(ESC)、多能性幹細胞(PSC)、及び／または血液細胞が含まれる、本明細書において開示される任意の細胞種を含み得る。

【1657】

NK細胞媒介殺傷アッセイ及びマクロファージ媒介殺傷アッセイが、XCELLIGENCE SPプラットフォーム及びMPプラットフォーム(ACEA Biosciences、San Diego、CA)で実行される。96ウェルプレート(ACEA Biosciences)をコラーゲン(Sigma-Aldrich)でコーティングし、外来性野生型CD47または短縮型CD47を発現する 4×10^5 個のMHC-Iノックアウト細胞、MHC-IIノックアウト細胞、またはMHC-I及びMHC-IIノックアウト細胞を100 μ Lの細胞特異的培地にプレーティングする。細胞指数の値が0.7に達した後、ヒトNK細胞またはヒトマクロファージを0.5:1、0.8:1、または1:1のエフェクター細胞対標的細胞(E:T)比で、1 ng/mLのヒトIL-2またはヒトIL-15(両方ともPeprrotech)と共にまたはそれなしで添加する。陰性対照として、細胞を2%のTriton(商標) X-100で処理する。RTCAソフトウェア(ACEA)でデータを標準化し、解析する。NK細胞及びマクロファージの両方を使用すると、CD47の外来性発現を有さないMHC-Iノックアウト細胞、MHC-IIノックアウト細胞、またはMHC-I及びMHC-IIノックアウト細胞は、急速に殺傷される。成功した場合、短縮型CD47の外来性発現は、殺傷効果を逆転させる。例示的な結果としては、野生型の外来性発現で達成されるレベルの0.5倍、0.75倍、1倍、1.25倍、1.5倍、1.75倍、2倍、3x、4倍、5倍、6倍、7倍、9倍、8倍、または10倍の低免疫性レベルの達成が挙げられる。

10

20

【1658】

NK細胞及びマクロファージによる細胞のインビボでの殺傷は、養子移入により測定される。 5×10^6 個の野生型細胞を 5×10^6 個の短縮型CD47を発現する細胞と混合し、混合物を5 μ MのCFSE(ThermoFisher)で染色する。ヒトIL-2(1 ng/mL、Peprrotech)を含有する生理食塩水中の細胞及び 2.5×10^6 個のヒト初代NK細胞(StemCell Technologies)または 2.5×10^6 個のヒトマクロファージ(PBMCから分化させた)を免疫不全NSG-SGM3マウス(013062、Jackson Laboratory)に腹腔内注射する。ヒト初代NK細胞は、注射の12時間前にインビトロでヒトIL-2を用いて前処理する。48時間後、細胞を腹部から採取し、APCコンジュゲート抗HLA-A、B、C抗体(クローンG46-2.6、BD Biosciences)で4°Cにて45分間染色する。CFSE陽性かつHLA-A、B、C陰性の集団をフローサイトメトリー(FACS Calibur、BD Bioscience)により分析し、野生型細胞と外来性短縮型CD47を発現する細胞との間で比較する。成功した場合、短縮型CD47細胞のCSFE+/HLA-集団の減少が観察されない。

30

【1659】

マクロファージによる貪食もBLIにより測定される。外来性短縮型CD47細胞を発現するルシフェラーゼ発現細胞または野生型細胞を計数し、24ウェル当たり 1×10^5 個細胞の濃度でプレーティングする。16時間後、1:1のE:T比率でヒトマクロファージを添加する。120分後、D-ルシフェリン(Promega、Madison、WI)を添加することによりルシフェラーゼ発現を確認する。対照として、標的細胞を処理しないか、または2%のTRITON X100で処理する。シグナルをAmi HT(Spectral Instruments Imaging、Tucson、AZ)を用いて、最大光子/秒/平方センチメートル/ステラジアン(p/s/cm²/sr)で定量化する。成功した場合、貪食レベルは、野生型細胞及び外来性短縮型CD47細胞を発現する細胞で同程度である。

40

【1660】

NK細胞特異的Elispotアッセイでは、ヒト初代NK細胞を野生型細胞及び外来

50

性短縮型CD47細胞を発現する細胞と共培養し、それらのIFN- γ 放出を測定する。K562細胞（Sigma-Aldrich）を陽性対照として使用する。マイトマイシン処理した（50 μ g/mLで30分間）刺激細胞をNK細胞（1 ng/mLのヒトIL-2によって刺激した）と共に1：1のE：T比率で24時間インキュベートし、Elispotプレートリーダーを使用してIFN- γ スポット頻度を数える。成功した場合、NK細胞活性化レベルは、野生型細胞及び外来性短縮型CD47細胞を発現する細胞で同程度である。

【1661】

被検細胞と同種異系である、ヒト化CD34+造血幹細胞が移植されたNSG-SGM3マウス（Wunderlich et al., 2010, Leukemia 24: 1785-88）での移植実験が実行される。このヒト化マウスモデルでは同系対照が利用可能でないため、バックグラウンド測定値をナイーブマウスで収集する。成功した場合、5日後に、野生型細胞のレシピエントは、高い脾細胞IFN- γ スポット頻度及び上昇したIgMレベルを示す一方で、外来性短縮型CD47を発現する細胞のレシピエントは、細胞の検出可能なIFN- γ 応答もしくは抗体応答を開始しないか、または細胞の顕著に少ないIFN- γ 応答もしくは抗体応答を開始する。

例示的な配列

【表30-1】

表30. CD47タンパク質の例示的なアミノ酸配列

説明	配列番号	アミノ酸配列
CD47-201	1	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVE FTFCNDTVVIPCFCV TNMEAQNTTEVYVK WKFKGRDIYTFDGLNKS TVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTC EVTETLTREGETIIEL KYRVVSWFSPNEN ILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGG MDE KTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVP GEYSLKNATGLGLIVTSTGIL ILLHYV FSTAIGLTSFVIAILVIQVIAIYILAVVGL SLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLG LVYMKFVASNQKTIQPPRNN
CD47-202	2	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVE FTFCNDTVVIPCFCV TNMEAQNTTEVYVK WKFKGRDIYTFDGLNKS TVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTC EVTETLTREGETIIEL KYRVVSWFSPNEN ILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGG MDE KTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVP GEYSLKNATGLGLIVTSTGIL ILLHYV FSTAIGLTSFVIAILVIQVIAIYILAVVGL SLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLG GLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVEEPLNA FKESKGMNDE

10

20

30

40

50

【表 3 0 - 2】

シグナルペプチドを有さないCD47-202	配列番号3	QLEFNKTKSV EFTFCNDTVV IPCFVTN MEA QNTTEVYVVKW KFKGRDIYTF DGA LNKSTVP TDFSSAKIEV SLLKGDASL KMDKSDAVSH TGNYTCEVTE LTREGET IIE LKYRVVSWFS PNENLIVIF PIF AILLFWG QFGIKTLKYR SGGMDEKTIA LLVAGLVITV IVIVGAILFV PGEYSLK NAT GLGLIVTSTG ILILLHYVVF STA IGLTSFV IAILVIQVIA YILAVVGLSL CIAACIPMHG PLLISGLSIL ALAQLLG LVY MKFVASNQKT IQPPRKAVEE PLN AFKESKG MMNDE
CD47-203	配列番号4	XWTESLYCGV YTNAPSSDF RFEYLSS STI TWTSLYEICG VQRDTYSQLK GKK RQASNQK TIQPPRKAVE EPLNAFKESK GMMNDE
CD47-205	配列番号5	XKNATGLGLI VTSTGILILL HYYVFST AIG LTSFVIAILY IQVIAVILAV VGL SLCIAAC IPMHGPLLIS GLSILALAQL LGLVYMKFVA SNQKTIQPPR KAVEEPL NE
CD47-206	配列番号6	MEAQNTTEVY VKWKFKGRDI YTFDGA NKS TVPTDFSSAK IEVSQLLKGD ASL KMDKSDA VSHTGNYTCE VTELTREGET IIE LKYRVVS WFSPNENILI VIFPIFA ILL FWGQFGIKTL KYRSGGMDEK TIA LLVAGLV ITVIVIVGAI LFVPGEYSLK NATGLGLIVT STGILILLHY YVF
CD47-207	配列番号7	MWPLVAALLL GSACCGSAQL LFNKTKS VEF TFCNDTVVIP CFVTNMEAQN TTE VYVKWKF KGRDIYTFDG ALNKSTVPTD FSSAKIEVSQ LLKGDASLKM DKSDAVS HTG NYTCEVTELT REGETIIE LK YRV VSWFSPN ENILIVIFPI FAILLFWGQF GIKTL

10

20

【表 3 0 - 3】

CD47-202	配列番号8	MWPLVAALLL GSACCGSAQL LFNKTKS VEF TFCNDTVVIP CFVTNMEAQN TTE VYVKWKF KGRDIYTFDG ALNKSTVPTD FSSAKIEVSQ LLKGDASLKM DKSDAVS HTG NYTCEVTELTREGETIIE LK YRVV SWFSPN ENILIVIFPI FAILLFWGQF GIKTLKYRSG GMDEKTIALL VAGLVIT VIV IVGAILFVPG
CD47-203	配列番号9	MWPLVAALLL GSACCGSAQL LFNKTKS VEF TFCNDTVVIP CFVTNMEAQN TTE VYVKWKF KGRDIYTFDG ALNKSTVPTD FSSAKIEVSQ LLKGDASLKM DKSDAVS HTG NYTCEVTELT REGETIIE LK YRV VSWFSPN ENILIVIFPI FAILLFWGQF GIKTLKYRSG GMDEKTIALL VAGLVIT VIV IVGAILFVPG EYSLKNATGL GLI VTSTGIL ILLHYVVFST A
CD47-204	配列番号10	MWPLVAALLL GSACCGSAQL LFNKTKS VEF TFCNDTVVIP CFVTNMEAQN TTE VYVKWKF KGRDIYTFDG ALNKSTVPTD FSSAKIEVSQ LLKGDASLKM DKSDAVS HTG NYTCEVTELT REGETIIE LK YRV VSWFSPN ENILIVIFPI FAILLFWGQF GIKTLKYRSG GMDEKTIALL VAGLVIT VIV IVGAILFVPG EYSLKNATGL GLI VTSTGIL ILLHYVVFST AIGLTSFVIA ILVIQVIAI LAVVGLSLC

30

40

50

【表 30-4】

CD47欠型	配列番号 11	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVE VEF TFCNDTVVIP CFVTNMEAQN TTE VYVKWKF KGRDIYTFDG ALNKSTVPTD FSSAKIEVSQ LLKGDASLKM DKSDAVS HTG NYTCEVTELT REGETIIELEK YRV VSWFSPN ENILIVIFPI FAILLFWGQF GIKTLKYRSG GMDEKTIALL VAGLVIT VIV IVGAILFVPG EYSLKNATGL GLI VTSTGIL ILLHYVVFST AIGLTSFVIA ILVIQVIAYI LAVVGLSLCI AACIPMH GPL LISGLSILAL AQLLGLVYMK FV
CD47欠型	配列番号 12	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVE VEF TFCNDTVVIP CFVTNMEAQN TTE VYVKWKF KGRDIYTFDG ALNKSTVPTD FSSAKIEVSQ LLKGDASLKM DKSDAVS HTG NYTCEVTELT REGETIIELEK YRV VSWFSPN ENILIVIFPI FAILLFWGQF GIKTLKYRSG GMDEKTIALL VAGLVIT VIV IVGAILFVPG EYSLKNATGL GLI VTSTGIL ILLHYVVF
N末端を有さないCD47-206	配列番号 80	MEAQNTTEVYVKWKFGRDIYTFDGALNK STVPTDFSSAKIE VSQLLKGDASLKMMDK SDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELEK YRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQF FGIKTLKYRSGGMDEK TIALLVAGLVIT VIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTS TGILI LLHYVVF
復元されたN末端を有するCD47-206	配列番号 81	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVE FTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVK WKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMMDKSDAVSHTGNYTC EVTREGETIIELEK YRVVSWFSPNEN ILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGG MDE KTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVP GEYSLKNATGLGLIVTSTGIL ILLHYVVF

10

20

【表 30-5】

TMD3欠失型	配列番号 82	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVE FTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVK WKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMMDKSDAVSHTGNYTC EVTREGETIIELEK YRVVSWFSPNEN ILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGG MDE KTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVP GEYSLKNA
EC+TMD3欠失型	配列番号 83	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVE FTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVK WKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMMDKSDAVSHTGNYTC EVTREGETIIELEK YRVVSWFSPNEN ILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGG MDE KTIALLVAGLVITVIVIVGAILF
TMD2+EC+TMD3欠失型	配列番号 84	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVE FTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVK WKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMMDKSDAVSHTGNYTC EVTREGETIIELEK YRVVSWFSPNEN ILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGG MDE KT
最後のIC欠失型	配列番号 85	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVE FTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVK WKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMMDKSDAVSHTGNYTC EVTREGETIIELEK YRVVSWFSPNEN ILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGG MDE KTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVP GEYSLKNATGLGLIVTSTGIL ILLHYVVF FSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGL SLCIAACIPM HGPLLISGLSILALALAQLL GLVYM

30

40

50

【表 30-6】

TMD5+最 後のIC欠失 型	配列番号 86	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVE FTFCNDTVVIPCFCV TNMEAQNTTEVYVK WKFKGRDIYTFDGLNKSSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTC EVTELTREGETIIEEL KYRVVSWFSPNEN ILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGG MDE KTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVFP GEYSLKNATGLGLIVTSTGIL ILLHYYV FSTAIGLTSFVIAILVIQVIAIYILAVVGL SLCIAACIPM HG
EC+TMD 5+最後のIC 欠失型	配列番号 87	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVE FTFCNDTVVIPCFCV TNMEAQNTTEVYVK WKFKGRDIYTFDGLNKSSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTC EVTELTREGETIIEEL KYRVVSWFSPNEN ILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGG MDE KTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVFP GEYSLKNATGLGLIVTSTGIL ILLHYYV FSTAIGLTSFVIAILVIQVIAIYILAVVGL
TMD4欠失 型	配列番号 88	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVE FTFCNDTVVIPCFCV TNMEAQNTTEVYVK WKFKGRDIYTFDGLNKSSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTC EVTELTREGETIIEEL KYRVVSWFSPNEN ILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGG MDE KTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVFP GEYSLKNATGLGLIVTSTGIL ILLHYYV FSTAIGLT
DAF/CD 55 GPI アンカーを有 するCD47 ECD	配列番号 89	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVE FTFCNDTVVIPCFCV TNMEAQNTTEVYVK WKFKGRDIYTFDGLNKSSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTC EVTELTREGETIIEEL KYRVVSWFSPNEP NKGSGTTSCTRLLSGHTCFTLTGLLGLT V TMGLLT

10

20

【表 30-7】

長鎖TRAI LR3 GP 1アンカーを 有するCD4 7 ECD	配列番号 90	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVE FTFCNDTVVIPCFCV TNMEAQNTTEVYVK WKFKGRDIYTFDGLNKSSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTC EVTELTREGETIIEEL KYRVVSWFSPNEA TVETPAAEETMNTSPGTPAPAAEETMNTS PGTPAPAAEETMTTSPGTPAPAAEETMTT SPGTPAPAAEETMTS PGTPASSHYLSCT IVGIIIVLIVLLIVFV
短鎖TRAI LR3 GP 1アンカーを 有するCD4 7 ECD	配列番号 91	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVE FTFCNDTVVIPCFCV TNMEAQNTTEVYVK WKFKGRDIYTFDGLNKSSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTC EVTELTREGETIIEEL KYRVVSWFSPNEM ITSPGTPASSHYLSCTIVGIIIVLIVLLIV FV
CD8a T MD及び短鎖 ICD(9a a)を有する CD47 E CD	配列番号 92	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVE FTFCNDTVVIPCFCV TNMEAQNTTEVYVK WKFKGRDIYTFDGLNKSSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTC EVTELTREGETIIEEL KYRVVSWFSPNEI YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR
CD28 T MD及び短鎖 ICD(9a a)を有する CD47 E CD	配列番号 93	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVE FTFCNDTVVIPCFCV TNMEAQNTTEVYVK WKFKGRDIYTFDGLNKSSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTC EVTELTREGETIIEEL KYRVVSWFSPNEF WVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSK RSRLH
PDGFR TMD及び短 鎖ICD(9 a a)を有す るCD47 ECD	配列番号 94	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVE FTFCNDTVVIPCFCV TNMEAQNTTEVYVK WKFKGRDIYTFDGLNKSSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTC EVTELTREGETIIEEL KYRVVSWFSPNEV VISAILALVVLTIISLIILIMLWQKPRY

30

40

50

【表 30-8】

PDGFRヒンジ、TMD、及び恒鎖ICD(9aa)を有するCD47 IgV、ヒンジ領域由来の3アミノ酸	配列番号95	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVE FTFCNDTVVIPCFFV TNMEAQNTTEVYVK WKFKGRDIYTFDGLNKSSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTC EVTRELTREGETIIEL KAVGQDTQEVIVV PHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLIIL MLW QKKPRY
CD47 IgV、ヒンジ領域由来の3アミノ酸、IgG4ヒンジ-CD28TM	配列番号96	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVE FTFCNDTVVIPCFFV TNMEAQNTTEVYVK WKFKGRDIYTFDGLNKSSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTC EVTRELTREGETIIEL KESKYGPPCPPCP FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRS KRSRLH
CD47 IgV、ヒンジ領域由来の3アミノ酸、IgG4ヒンジ-CD8aTM	配列番号97	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVE FTFCNDTVVIPCFFV TNMEAQNTTEVYVK WKFKGRDIYTFDGLNKSSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTC EVTRELTREGETIIEL KESKYGPPCPPCP IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR R
CD47 IgV、ヒンジ領域由来の3アミノ酸、CD28ヒンジ-CD28TM	配列番号98	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVE FTFCNDTVVIPCFFV TNMEAQNTTEVYVK WKFKGRDIYTFDGLNKSSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTC EVTRELTREGETIIEL KIEVMYPPPYLDNE KSNGTIIHVKGKHLCPSPFPFGPSKPFV L VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKR SRLH

10

20

【表 30-9】

CD47 IgV、ヒンジ領域由来の3アミノ酸、CD28ヒンジ-CD8aTM	配列番号99	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVE FTFCNDTVVIPCFFV TNMEAQNTTEVYVK WKFKGRDIYTFDGLNKSSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTC EVTRELTREGETIIEL KIEVMYPPPYLDN EKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPFGPSKPIY IWA PLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR
CD47 IgV、ヒンジ領域由来の3アミノ酸、CD8aヒンジ-CD28TM	配列番号100	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVE FTFCNDTVVIPCFFV TNMEAQNTTEVYVK WKFKGRDIYTFDGLNKSSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTC EVTRELTREGETIIEL KTTTPAPRPPTPA PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FA CDFWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIF WVRSKRSLH
CD47 IgV、ヒンジ領域由来の3アミノ酸、CD8aヒンジ-CD8aTM	配列番号101	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVE FTFCNDTVVIPCFFV TNMEAQNTTEVYVK WKFKGRDIYTFDGLNKSSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTC EVTRELTREGETIIEL KTTTPAPRPPTPA PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FA CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC NHRNR
WT、C15G	配列番号102	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVE FTFGNDTVVIPCFFV TNMEAQNTTEVYVK WKFKGRDIYTFDGLNKSSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTC EVTRELTREGETIIEL KYRVVSWFSPNEN ILIVIFPIFALLFWGQFGIKTLKYRSGG MDE KTIALLVAGLVITVIVIGAILFVP GEYSLKNATGLGLIVTSTGIL ILLHYV FSTAIGLTSFVIAILVIQVIAIILAVVGL SLCIAACIPM HGPLLISGLSILALAQLL GLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVEEPL NA FKESKGMNDE

30

40

50

【表 30-10】

N361、C 15G	配列番号 103	MWPLVAALLGSAACGSAWQRPLRFNKT SVEFTFGNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEV YVKWKFKGRDIYTFDGWANKSTVPTD FS SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELTREG ETIELKYRVVSWFSP NENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYR S GGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAIL FVPGEYSLKNATGLGLI VTSTGILILLH YYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAIYLAV VGLSLCIA ACIPMHGPELLISGLSILALA QLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRK AVEEP LNAFKESKGMNDE
N362、C 15G	配列番号 104	MWPLVAALLGSAACGSAWAPPLRFNKT SVEFTFGNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEV YVKWKFKGRDIYTFDGYTNKSTVPTDF S SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELTREGE TIELKYRVVSWFSP NENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYR SGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILF VFPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLHY YYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAIYLAVV GLSLCIAACIPMHGPELLISGLSILALAAQL LGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEPLN AFKESKGMNDE
N363、C 15G	配列番号 105	MWPLVAALLGSAACGSAWQLPLLNFNKT SVEFTFGNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEV YVKWKFKGRDIYTFDGDKNKSTVPTDF S SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELTREGE TIELKYRVVSWFSP NENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYR SG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAIL FVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLH YYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAIYLAV VGLSLCIA ACIPMHGPELLISGLSILALA QLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEP LNAFKESKGMNDE

10

20

【表 30-11】

N364、C 15G	配列番号 106	MWPLVAALLGSAACGSAWQPLLA FNKT SVEFTFGNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEV YVKWKFKGRDIYTFDGA MNKSTVPTDF S SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELTREGE TIELKYRVVSWFSP NENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYR SG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAIL FVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLH YYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAIYLAV VGLSLCIA ACIPMHGPELLISGLSILALA QLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEP LNAFKESKGMNDE
N365、C 15G	配列番号 107	MWPLVAALLGSAACGSAWQTPLKFNKT SVEFTFGNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEV YVKWKFKGRDIYTFDGA LNKSTVPTDF S SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELTREGE TIELKYRVVSWFSP NENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYR SG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAIL FVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLH YYVFSTAIGLTSFVIAILEVIQVIAIYLAV VGLSLCIA ACIPMHGPELLISGLSILALA QLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEP LNAFKESKGMNDE
N366、C 15G	配列番号 108	MWPLVAALLGSAACGSAWQFLRFNKT SVEFTFGNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEV YVKWKFKGRDIYTFDGA ENKSTVPTDF S SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELTREGE TIELKYRVVSWFSP NENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYR SG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAIL FVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLH YYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAIYLAV VGLSLCIA ACIPMHGPELLISGLSILALA QLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEP LNAFKESKGMNDE

30

40

50

【表 30-12】

N369、C15G	配列番号 109	MWPLVAALLGSAACGSAWQIPLNFNKTK SVEFTFGNDTVVIP CFVTNMEAQNTTEV YVKWKFKGRDIYTFDGAWNKSTVPTDF S SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELTREGE TIELKYRVVSWFSP NENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYR SG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAIL FVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLH YYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAIYLAV VGLSLCIA ACIPMHGPLLISGLSILALA QLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVEEPL NAFKESKGMNDE
N3610、C15G	配列番号 110	MWPLVAALLGSAACGSAWQPLLLFNKTK SVEFTFGNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEV YVKWKFKGRDIYTFDGASNKSTVPTDF S SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELTREGETIIEKYRVVSWFSPN ENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRS GGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFV PGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLHY VFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAIYLAVVG LSLCIA ACIPMHGPLLISGLSILALAAQL LGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEPLN AFKESKGMNDE
N3612、C15G	配列番号 111	MWPLVAALLGSAACGSAWQPLLLFNKTK SVEFTFGNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEV YVKWKFKGRDIYTFDGAQNKSTVPTDF S SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELTREGE TIELKYRVVSWFSP NENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYR SG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAIL FVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLH YYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAIYLAV VGLSLCIA ACIPMHGPLLISGLSILALA QLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVEEPL NAFKESKGMNDE

10

20

【表 30-13】

N3614、C15G	配列番号 112	MWPLVAALLGSAACGSAWQPLLKFNKTK SVEFTFGNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEV YVKWKFKGRDIYTFDGAANKSTVPTDF S SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELTREGE TIELKYRVVSWFSP NENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYR SG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAIL FVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLH YYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAIYLAV VGLSLCIA ACIPMHGPLLISGLSILALA QLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEP LNAFKESKGMNDE
N3617、C15G	配列番号 113	MWPLVAALLGSAACGSAWQRLRFNFKTK SVEFTFGNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEV YVKWKFKGRDIYTFDGAANKSTVPTDF S SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELTREGE TIELKYRVVSWFSP NENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYR SG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAIL FVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLH YYVFSTAIGLTSFVIAIEVIQVIAIYLAV VGLSLCIA ACIPMHGPLLISGLSILALA QLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEP LNAFKESKGMNDE
N3618、C15G	配列番号 114	MWPLVAALLGSAACGSAWQLPLLFNKTK SVEFTFGNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEV YVKWKFKGRDIYTFDGAINKSTVPTDF S SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELTREGETIIEKYRVVSWFSP NENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYR SGG MDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAIL FVPGEYSLKNATGLGLIVTS TGIILLH YYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAIYLAV VGLSLCIAAC IPMHGPLLISGLSILALA QLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVE EP LNAFKESKGMNDE

30

40

50

【表 30-14】

N3621、 C15G	配列番号 115	MWPLVAALLGSAACCGSAWQIPLEFNKTK SVEFTFGNDTVVIP CFVTNMEAQNTTEV YVKWKFKGRDIYTFDGLNKSSTVPTDFS SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELTREGET IIELKYRVVSWFSP NENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYR SGG MDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAIL FVPGEYSLKNATGLGLIVTS TGILILLH YYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAIYLAV VGLSLCIAAC IPMHGPELLISGLSILALA QLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVE EP LNAFKESKGMNDE
N3623、 C15G	配列番号 116	MWPLVAALLGSAACCGSAWQMPLVFNKTK SVEFTFGNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEV YVKWKFKGRDIYTFDGVNKSSTVPTDFSS AKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNY TCEVTELTREGE TIELKYRVVSWFSPN ENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRS G GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILF VFPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLHY YYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAIYLAVV GLSLCIA ACIPMHGPELLISGLSILALAAQ LLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEPL NAFKESKGMNDE
N3624、 C15G	配列番号 117	MWPLVAALLGSAACCGSAWQIPLRFNKTK SVEFTFGNDTVVIP CFVTNMEAQNTTEV YVKWKFKGRDIYTFDGVNKSSTVPTDFS SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELTREGET IIELKYRVVSWFSP NENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYR SGG MDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAIL FVPGEYSLKNATGLGLIVTS TGILILLH YYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAIYLAV VGLSLCIAAC IPMHGPELLISGLSILALA QLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVEEPL NAFKESKGMNDE

10

20

【表 30-15】

h C D 4 7 N361変異 型	配列番号 118	MWPLVAALLGSAACCGSAWQRPLRFNKT SVEFTFCNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEV YVKWKFKGRDIYTFDGWANKSTVPTD FS SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELTREG ETIELKYRVVSWFSP NENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYR S GGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAIL FVPGEYSLKNATGLGLI VTSTGILILLH YYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAIYLAV VGLSLCI AACIPMHGPELLISGLSILALA QLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRK AVEEP LNAFKESKGMNDE
h C D 4 7 N362変異 型	配列番号 119	MWPLVAALLGSAACCGSAWAPPLRFNKT SVEFTFCNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEV YVKWKFKGRDIYTFDGYNKSSTVPTDF S SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELTREGE TIELKYRVVSWFSP NENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYR SG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAIL FVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLH YYVFSTAIGLTSFVIAILEVIQVIAIYLAV VGLSLCIA ACIPMHGPELLISGLSILALA QLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEP LNAFKESKGMNDE
h C D 4 7 N363変異 型	配列番号 120	MWPLVAALLGSAACCGSAWQLPLLFNKT SVEFTFCNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEV YVKWKFKGRDIYTFDGDKNKSSTVPTDF S SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELTREGE TIELKYRVVSWFSP NENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYR SG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAIL FVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLH YYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAIYLAV VGLSLCIA ACIPMHGPELLISGLSILALA QLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEP LNAFKESKGMNDE

30

40

50

【表 30-16】

h C D 4 7 N 3 6 4 変異 型	配列番号 121	MWPLVAALLGSAACCGSAWQPLAFNKKTK SVEFTFCNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEV YVKWKFKGRDIYTFDGAMNKSTVPTDF S SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELTREGE TIELKYRVVSWFSP NENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYR SG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAIL FVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLH YYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAIYLAV VGLSLCIA ACIPMHGPLLISGLSILALA QLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEP LNAFKESKGMNDE
h C D 4 7 N 3 6 6 変異 型	配列番号 122	MWPLVAALLGSAACCGSAWQTPKFNKKTK SVEFTFCNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEV YVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDF S SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELTREGE TIELKYRVVSWFSP NENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYR SG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAIL FVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLH YYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAIYLAV VGLSLCIA ACIPMHGPLLISGLSILALA QLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEP LNAFKESKGMNDE
h C D 4 7 N 3 6 8 変異 型	配列番号 123	MWPLVAALLGSAACCGSAWQFPLRFNKKTK SVEFTFCNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEV YVKWKFKGRDIYTFDGAENKSTVPTDF S SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELTREGE TIELKYRVVSWFSP NENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYR SG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAIL FVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLH YYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAIYLAV VGLSLCIA ACIPMHGPLLISGLSILALA QLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEP LNAFKESKGMNDE

10

20

【表 30-17】

h C D 4 7 N 3 6 9 変異 型	配列番号 124	MWPLVAALLGSAACCGSAWQIPLNFNKKTK SVEFTFCNDTVVIP CFVTNMEAQNTTEV YVKWKFKGRDIYTFDGAWNKSSTVPTDF S SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELTREGE TIELKYRVVSWFSP NENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYR SG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAIL FVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLH YYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAIYLAV VGLSLCIA ACIPMHGPLLISGLSILALA QLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEP LNAFKESKGMNDE
h C D 4 7 N 3 6 10 変異 型	配列番号 125	MWPLVAALLGSAACCGSAWQPLLLFNKKTK SVEFTFCNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEV YVKWKFKGRDIYTFDGASNKSTVPTDF S SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELTREGE TIELKYRVVSWFSP NENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYR SG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAIL FVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLH YYVFSTAIGLTSFVIAILEVIQVIAIYLAV VGLSLCIA ACIPMHGPLLISGLSILALA QLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEP LNAFKESKGMNDE
h C D 4 7 N 3 6 12 変異 型	配列番号 126	MWPLVAALLGSAACCGSAWQPPLLFNKKTK SVEFTFCNDTVVIP CFVTNMEAQNTTEV YVKWKFKGRDIYTFDGQANKSTVPTDF S SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELTREGET IIELKYRVVSWFSP NENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYR SGG MDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAIL FVPGEYSLKNATGLGLIVTS TGILILLH YYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAIYLAV VGLSLCIAAC IPMHGPLLISGLSILALA QLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VE EP LNAFKESKGMNDE

30

40

50

【表 30-18】

h C D 4 7 N 3 6 1 4 変 異型	配列番号 127	MWPLVAALLGSAACCGSAWQPLLFNKT SVEFTFCNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEV YVKWKFKGRDIYTFDGAANKSTVPTDF S SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELTREGE TIELKYRVVSWFSP NENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYR SG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAIL FVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLH YYVFSTAIGLTSFVIAILVIVQVIAYILAV VGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALA LLGLLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEPL NAFKESKGMNDE
h C D 4 7 N 3 6 1 7 変 異型	配列番号 128	MWPLVAALLGSAACCGSAWQRLRFNKT SVEFTFCNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEV YVKWKFKGRDIYTFDGAANKSTVPTDF S SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELTREGE TIELKYRVVSWFSP NENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYR SG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAIL FVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLH YYVFSTAIGLTSFVIAILVIVQVIAYILAV VGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALA QLLGLLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEP LNAFKESKGMNDE
h C D 4 7 N 3 6 1 8 変 異型	配列番号 129	MWPLVAALLGSAACCGSAWQIPLEFNKT SVEFTFCNDTVVIP CFVTNMEAQNTTEV YVKWKFKGRDIYTFDGAANKSTVPTDFS SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELTREGET IIELKYRVVSWFSP NENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYR SGG MDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAIL FVPGEYSLKNATGLGLIVTS TGILILLH YYVFSTAIGLTSFVIAILVIVQVIAYILAV VGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALA QLLGLLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VE LNAFKESKGMNDE

10

20

【表 30-19】

h C D 4 7 N 3 6 2 1 変 異型	配列番号 130	MWPLVAALLGSAACCGSAWQIPLEFNKT SVEFTFCNDTVVIP CFVTNMEAQNTTEV YVKWKFKGRDIYTFDGAANKSTVPTDFS SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELTREGET IIELKYRVVSWFSP NENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYR SGG MDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAIL FVPGEYSLKNATGLGLIVTS TGILILLH YYVFSTAIGLTSFVIAILVIVQVIAYILAV VGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALA QLLGLLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VE LNAFKESKGMNDE
h C D 4 7 N 3 6 2 3 変 異型	配列番号 131	MWPLVAALLGSAACCGSAWQMPLVFNKT SVEFTFCNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEV YVKWKFKGRDIYTFDGVNKSSTVPTDF S SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELTREGE TIELKYRVVSWFSP NENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYR SG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAIL FVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLH YYVFSTAIGLTSFVIAILVIVQVIAYILAV VGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALA QLLGLLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEP LNAFKESKGMNDE
h C D 4 7 N 3 6 2 4 変 異型	配列番号 132	MWPLVAALLGSAACCGSAWQIPRFNKT SVEFTFCNDTVVIP CFVTNMEAQNTTEV YVKWKFKGRDIYTFDGVNKSSTVPTDFS SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELTREGET IIELKYRVVSWFSP NENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYR SGG MDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAIL FVPGEYSLKNATGLGLIVTS TGILILLH YYVFSTAIGLTSFVIAILVIVQVIAYILAV VGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALA QLLGLLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VE EPLNAFKESKGMNDE

30

40

50

【表 3 0 - 2 0】

CAG-CD 47 (202) (コドン最適 化)	配列番号 199	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVE FTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVK WKFKGRDIYTFD GALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTC EVTELTREGETI IELKYRVVSWFSPNENI LIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGM DEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGE YSLKNATGLGLIVTSTGIL ILLHYVFS TAIGLTSFVIAILVIQVIAVILAVVGLSL CIAACIPM HGPLLI SGLSILALAQLLGL VYMKFVASNQKTIQPPRKAVEEPL NAFK ESKGMNDE
CD47 E CD-CD5 9 GPI	配列番号 340	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVE FTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVK WKFKGRDIYTFD GALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTC EVTELTREGETI IEL KYRVVSWFSPNEQ LENGGTSLSSEKTVLLLVTPFLAAAWSLHP *

10

【表 3 1 - 1】

表 3 1. CD47 タンパク質の例示的なスクレオチド配列

説明	配列番号	スクレオチド配列
CD47-2 01 CDS	配列番号 13	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAG CTACTATTTAATAAAAACAAAATCTG TAG AATTCACGTTTGTAAATGACACTGTCGTC ATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGG CACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAA GTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACA CCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCAC TGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAA ATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGA TGCC TCCTTGAAGATGGATAAGAGTGAT GCTGTCTCACACACAGG AAACCTACACTT GTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGT TGTTTCATGGTTT TCTCCAAATGAAAAT ATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTGT CTATACTCCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGT ATTAAAACACTTA AATATAGATCCGGTG GTATGGATGAGAAAACAATTGCTTTA CT TGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTG TCATTGFTTGA GCCATTCTTTTCGTCCC AGGTGAATATTCATTAAAGAAATGCT ACT GGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATA TFACTTCACTACTATGTG TTTAGTACAGCGATTGGATTAACC TCCT TCGTCAATTGCCATATTGGTTATTCAGGTG ATAGCCTAT ATCCTCGCTGTGGTTGGAC TGAGTCTCTGTATTGCGGCGTGT ATACC AATGCATGGCCCTCTTCTGATTTTCAGGTT TGAGTATC TTAGCTCTAGCACAATTACT TGGACTAGTTTATATGAAATTTGTGGCTT CCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGG AATAA CTGA

20

30

40

50

【表 3 1 - 2】

CD4 7-2	配列番号	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT
02 CDS	14	GGGCTCGGCGTG ETGCGGATCAGCTCAG
		CTACTATTTAATAAAAACAAAATCTG TAG
		AATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCTGTC
		ATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGG
		CACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAA
		GTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACA
		CCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCAC
		TGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAA
		ATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGA
		TGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGAT
		GCTGTCTCACACACAGG AAACCTACACTT
		GTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT
		GAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGT
		TGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATA
		TTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTG C
		TATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTA
		TTAAAACACTTA AATATAGATCCGGTGG
		TATGGATGAGAAAACAATTGCTTTA CTT
		GTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGT
		CATTGTTGGA GCCATTCTTTTGGTCCCA
		GGTGAATATTCATTAAGAATGCT ACTG
		GCCTTGGTTTAAATTGTGACTTCTACAGGG
		ATATTAATA TTACTTCACTACTATGTGT
		TTAGTACAGCGATTGGATTAAAC TCCTT
		CGTCATTGCCATATTGGTTATTTCAGGTGA
		TAGCCTAT ATCCTCGCTGTGGTTGGACT
		GAGTCTCTGTATTGCGGCGGT ATACCA
		ATGCATGGCCCTCTTCTGATTTTCAGGTTT
		GAGTATC TTAGCTCTAGCACAAATTAATT
		GGACTAGTTTATATGAAATTT GTGGCTT
		CCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGG
		AAAGC TGTAGAGGAACCCCTTAATGCAT
		TCAAAGAATCAAAAGGAA TGATGAATGA
		TGAATAA

10

20

【表 3 1 - 3】

CD4 7-2	配列番号	TGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTGTA
03 CDS	15	TACCAATGCATG GCCCTCTTCTGATTTC
		AGGTTTGAGTATCTTAGCTCTAGCAC AA
		TTACTTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGT
		GGGGTTTCAGA GGGACACCTACAGTCAGT
		TGAAAGGCAAGAAGAGACAAGC TTCCAA
		TCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAG
		CTGTAG AGGAACCCCTTAATGCATTCAA
		AGAATCAAAAGGAATGATG AATGATGAA
		TAA
CD4 7-2	配列番号	AGATATTTTCTTGTTCATTTAAGGAGAG
04 CDS	16	GTAAATTTGGTAT CAATAGAAAAAATGT
		TTCTGAAAAATTTAAACCCCTGGAAAT GT
		ATTTATGGCATGGAGTCAGATGTTTCAGG
		GAGAGAAGAA CAAATCAAGAAGCATTGC
		AAGTATGCTCATATGGAATGCTT AAGGC
		TTGTGGTTAAAAAATATATATATATGGCT
		GTCAATG TCTTAGGCTCATGGTAGCAGC
		AGAAATCGTAATAATTCTTTT GTCACAT
		GGGTTATATCCATATTGGAGAGAATTAAC
		TCAGG TGAATTAACCTTGTACACTGTTT
		GGTTTTATATATTTAGAG GGATCACAA
		CTGACTGATGTCCCTTTGAAGTACCATT
		TTCA TAAATCTTTTTTTTTTTCAGAATGGG
		CCAGCCAACCTGTGACATC CTTGGATCG
		GAGATTTAGAACTAGAAAGTATTCTTTCT
		AC ATTATTAGGGAAGAAAAGGAGTTACT
		TGGCGGTTAGCAATA TTCTATTTTGT
		TGTTTTGTTTTTAGAGACAGGGTCTCATT
		A TGTTGACCAGGCTGGCCTCGAGCTCCT
		GGGCTCAAGCAATG CTCCCACCTCAGCC
		TCCCAAGTAGCTGGGACTACAGGCATG T
		GCCACTACACCTGGCAGTGTTTATTCTGA
		TAAATACATTTA TGAGCTCAAAAATGTA
		ACTCTAAAACCTTATCTCTGAACCTC CA
		TATTACCATCAGAAATTTAGATAGTTGTT
		TAGTTCTCTTT

30

40

50

【表 3 1 - 4】

	TTCTTTGTAGAACATAGATATAAGGCATG GTTTCATTGAAGT CAGTTGTATATACAT GTAACATATCCTGATGTTCCCAAATAAA G CTCTGTATTTCTGCTTAGTTTATTGGGGA GGCTGCTAAATG TAGTGCATCCCAACCC ATTTTACCCCTGTTCTACTTTAAAAAG AG GTTGGCTTCTTGTGTTGGATACAAGGACCA AGTCACTCCCCCAGGTTCCCTCCACAGTAA GGGAGGCCATTTTAAAGCCGCC CATGGC ACTAACAGAAACTGGACTCCTATGAGCTC AGATACATAACTGGGECTCACAGGGGTGG GACAGTATGTAGTCTAGG AATTGGAAGG ATCCATTCCATATCAAAGAACTGAAGCAT CG TGTGCGCTCTCAGCAGCAAGAGTAA GGTGATGCCCCCTGTC AGTTATAGTTCCCT GAGTTCCTCTGTCTTTGATTCTTTGCCTA T TAGCCAGCTAGCTCACCCTCTTGTTTA TGCCACTGTTTTTTA TCCTATTCAATGCC TTCTCACAGACAACTTTTCTTACCTACAG CTTTGGACTCATCCTTGCTCCTTTCTGT TTCTTTTTTCACTTT CCCTTCCCATCACC AACTTTCTGGGTTTTTTTCTGTTTCTTCT TAGAGTCCAGTGGCAGGGAGAACTTGTC AGTCCAGTCTGT TGCCATTTTCTCTGTT TGAGAAAGACTCACCAGCTTTTGGCT GG CTCACAGATTGGCTTTCTTGGGTACAGGA CCCACCCTTTT CCCTGCCAGCTTTGGAA GCTTGACAGAAATTCGAGTGTGCAG TGGT GGTAAATAAATAGTAAGGAACACAGAGCA GTCCTGG AGGCGTGCCCTCCATCTGCTGA TGAGAAAATCCAGTGTCTGTC ATCCAGCC CAGGTCCCAGCGGAATGGGCTCTCTGTT CAGT AGGATCCCCCTCCTGCTGAGTGGT TCATGGCATGTTTCTGTT CAACGCTTTT CCATCTGTAGGATTCTTATTCTGTATTTA TTTG TTTTTTTGGGTTTTTTTATTTTTT GAGATGGAGTCTCGCTCTG

10

20

【表 3 1 - 5】

	TCGCCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCAGCAGC CCCAGCTCGCTG CAGCCTCTGCGCTCCCA GGACGAGGGAGATCCTCCACCTCA GCC TTCCACGTAGCTGGGACTACAGGCATGCA CCACAGGCA TGCACCAACCAGCCAGCTA ATTTTTGTATTTTTGGTAGAGAC AGGGT TGCATCATGTTGCCCAGGCTGGTCTTGAA TGCTTGA GCTCAAGCAATCTATTGCTT TGGCCTCCCCAAAGTGCTGGG ATTACAGG CATGAGCCACCAAGGCCAGCCTTCTCATT TGTTT TTTTTATAAGGAAGCTATCTCTT CTTCCCTCCCCAACTAGGG TATTCTTTT TCCCTTTCTGCTACTTTGCTCATGTACTGT ATTCC TTCAACTTCATTAATGAATCCAT TTGGAAGCAGTGAAAAAG GCAACTCAGA AAGCTAAGAAGAAATAGATAGAGGAATAC T CAGAGCTATCTGAGTATTTTCTTTAGT TTGTTAGCTCTTTGG AGCTTTGAAACTG GAAAGACCCAGGGAGTGATGTGGAGAA A GAGACTGAGCTTGTAAGACACAGGAGCAG TGAGCTAAGG GAGATGGAGTAGTGGGGA CAAATTCTGGCACATTCTGTCTA CACTC TGGGTAGATAGAGGAGGGAGGATGGAGCA CCCATG GTGGGGGTATGTTGGTGACAGC ATTTTCCCACCCAGCCAGTG TAACAAGTG GCTGATTTGGGGGAAAGATGGCATAAACA AA TGAGAGAATGTGTTTACTATTTGATG TAGATGGGTATTTTG TTCATTTTTCAA ATCAGTGTATATAATCAAGAATATTCAGC A TGTTTGAATAGACTGTGAGAGCTGGAA CTCTTTTCATTAAACAT CTCTGGCACCTTT AGTTTTAGCCCTGAACATTTTATCTTAAA ATTAAACATTACCAAATGCCTTAGTTTAT TTGATTTTATTTAAA TTTATATTCTTATTT GTTATTTATATCAGCTTCCAATCAGAA G ACTATACAACCTCCTAGGAATAACTGAAG TGAAGTGATGG

30

40

50

【表 3 1 - 6】

	ACTCCGATTGGAGAGTAGTAAGACGTGA AAGGAATACACT TGTGTTTAAGCACCAT GGCCTTGATGATTCACTGTTGGGGAGAAG AAACAAGAAAAGTAACTGGTTGTACCTA TGAGACCCTTACGTGATTGTTAGTTAAGT TTTTATTCAAAGCAGCTGTA ATTTAGTT AATAAAATAATTATGATCTATGTTGTTTG CCCAA TTGAGATCCAGTTTTTGTGTT ATTTTAAATCAATTAGGGG CAATAGTAG AATGGACAATTTECAAGAATGATGCCCTTT CAG GTCCTAGGGCCTCTGGCCTCTAGGT AACCAGTTTAAATTGGT TCAGGGTGATA ACTACTTAGCACTGCCCTGGTGATTACCC A GAGATATCTATGAAAACCAGTGGCTTC CATCAAACCTTTGC CAACTCAGGTTCAE AGCAGCTTTGGGCAGTTATGGCAGTAT G GCATTAGCTGAGAGGTGTCTGCCACTTCT GGGTCAATGGA ATAATAAATTAAGTACA GGCAGGAATTTGGTTGGGAGCATC TTGT ATGATCTCCGTATGATGTGATATTGATGG AGATAGTG GTCCTCATTCTTGGGGGTTG CCATTCCCACATTCCCCCTTCA ACAAAC AGTGTAACAGGTCTCTCCAGATTTAGGG TACTTT TATTGATGGATATGTTTTCTTT TTATTACATAACCCCTTGA AACCTGT CTTGTCTCTCTGTTACTTGTCTCTGTCT ACAAG ATGTAGCACCTTTTCTCTCTTT GAACATGGTCTAGTGACAC GGTAGCACCC AGTTGCAGGAAGGAGCCAGACTTGTCTC AGA GCACTGTGTTCACTTTTTCAGCAA AAATAGCTATGGTTGTA ACATATGTATT CCCTTCTCTGATTGTAAGGCAAAAATCT AC AGTGTTTCTTCACTTCTTTTCTGATC TGGGGCATGAAAAAG CAAGATTGAAAT TTGAACATAGAGTCTCCTGCATGGCAACA

10

20

【表 3 1 - 7】

	AAATGTGTGTCACCATCAGGCCAACAGGC CAGCCCTTGAAT GGGGATTTATTACTGT TGTATCTATGTTGCATGATAAACATT CA TCACCTTCTCTCTGTAGTCTGCTCTCGTA CTCCTCTTCC CTAATGATTGAAAAGTAA AAAAAACCCACATTTCTCTATCCTG GTTA GAAGAAAAATTAATGTTCTGACAGTTGTGA TCGCCTGG AGTACTTTTAGACTTTTAGC ATTCTTTTTTTACCTGTTTGTGG ATGTG TGTTTGTATGTGCATACGTATGAGATAGG CACATGC ATCTTCTGTATGGACAAAGGT GGGGTACCTACAGGAGAGCA AAGGTTAA TTTTGTGCTTTTAGTAAAAACATTTAAAT ACAA AGTTCTTTATTGGGTGGAATTATA TTTGATGCAAAATATTTGA TCACTTAAAA CTTTTAAACCTTCTAGGTAATTTGCCACG CTT TTTGACTGCTCACCAATACCCTGTA AAAATACGTAATTCCTC CTGTTTGTGTA ATAAGATATTCATATTTGTAGTTGCATTA AT AATAGTTATTTCTTAGTCCATCAGAT GTTCCCGTGTGCTCT TTTATGCCAAAT TGATTGTCTATTTTCATGTTGGGACCAAG T AGTTTGGCCATGGCAAACTAAATTTA TGACCTGCTGAGGC CTCTCAGAAAACTG AGCATACTAGCAAGACAGCTCTTCTTG A AAAAAAAAAATGTATACACAAATATATA CGTATATCTAT ATATACGTATGTATATA CACACATGTATATTCTTCTTGTATT GTG TAGCTGTCCAAAAATAATAACATATATAGA GGGAGCTGT ATTCCTTTATACAAATCTG ATGGCTCTGCAGCACTTTTTC TTCTG AAAATATTTACATTTTGTAACTAGTTT GTTACTTT AAAAATCAGTTTGTATGAAA GGAGGGAAAAGCAGATGGAC TTGAAAAA GATCCAAGCTCCTATTAGAAAAGGTATGA AAATCTTTATAGTAAATTTTTTATAAAC TAAAGTTGTACCTTTTA

30

40

50

【表 3 1 - 8】

	ATATGTAGTAAACTCTCATTATTGTTGGG TTCGCTCTTGGAT CTCATCCATCCATTG TGTTCTCTTTAATGCTGCCCTGCTTTTG AGGCATTCACTGCCCTAGACAATGCCACC AGAGATAGTGGG GGAAATGCCAGATGAA ACCAACTCTTGETCTCAGTAGTTGT CAG CTTCTCTGGATAAGTGACCACAGAAGCAG GAGTCCCTCC TGCTTGGGCATCATTGGGC CAGTTCCCTCTCTTTAAATCAGA TTTGT AATGGCTCCCAAATTCATCACATCACAT TTAAATTG CAGACAGTGTTTTGACATC ATGTATCTGTTTTGTCCCATAA TATGCT TTTTACTCCCTGATCCAGTTTCTGCTGT TGA CTCTT CCATTCAGTTTATTTATTG TGTGTTCTCACAGTGACACCAT TTGTCC TTTTCTGCAACAACETTTCCAGCTACTTT TGCCAAA TTCTATTTGTCTTCTCCTTCA AAACATTCTCCTTTGCAGTTCC TCTTCA TCTGTGTAGCTGCTCTTTTGTCTCTTAAC TTACCATT CCTATAGTACTTTATGCATC TCTGCTTAGTTCTATTAGTTTTT TGGCC TTGCTCTTCTCCTTGATTTAAAAATTCCT TCTATAGCT AGAGCTTTTCTTTCTTTCA TTCTCTCTTCTGTCAGTGTTTTGC ATAC ATCAGAAGCTAGGTACATAAGTTAAATGA TTGAGAGT TGGCTGTATTTAGATTTATC ACTTTTTAATAGGGTGAGCTTG AGAGTT TTCTTTCTTTCTGTTTTTTTTTTTGT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTT TGA CTAATTCACATGCTCTAAAAA CCT TCAAAGGTGATTATTTTTCTCCTGGAAAC TCCAGGTCCA TTCTGTTTAAATCCCTAA GAATGTCAGAAATTAATAACAG GGCTA TCCCCTAATTGGAAATATTTCTTTTTTCA GGATGCTA

10

20

【表 3 1 - 9】

	TAGTCAATTTAGTAAGTGACCACCAAATT GTTATTTGCACTA ACAAGCTCAAAACA CGATAAGTTTACTCCTCCATCTCAGT AA TAAAAATTAAGCTGTAATCAACCTTCTAG GTTTCTCTTGT CTTAAATGGGTATTCA AAAATGGGGATCTGTGGTGATGT ATGG AAACACATACTCCTTAATTTACCTGTTGT TGGAAACTG GAGAAATGATTGTGGGCA ACCGTTTATTTTTTTATTGTATTT TATTT GGTGAGGGATTTTTTTATAAACAGTTTT ACTTGTT CATATTTTAAAAATTAATAAC TGCCATCACCCTGCTGGGGTCCCT TTGTTA GGTCAATTTTCAGTGACTAATAGGGATAAT CCAGGT AACTTTGAAGAGATGAGCAGTG AGTGACCAGGCAGTTTTTC TGCTTTAG CTTTGACAGTTCTTAATTAAGATCATTGA AGAC CAGCTTCTCATAAATTTCTCTTT TTGAAAAAAGAAAGCAT TTGTACTAAG CTCCTCTGTAAGACAACATCTTAAATCTT AAA AGTGTGTTATCATGACTGGTGAGA GAAGAAAAACATTTTGT TTTATTAATG GAGCATTATTTACAAAAAGCCATTGTTGA G AATTAGATCCACATCGTATAAATATC TATTAACCATCTAA ATAAAGAGAACTC CAGTGTTGCTATGTGCAAGATCCTCTCT TGGAGCTTTTTTGCATAGCAATTAAAGGT GTGCTATTTGTCA GTAGCCATTTTTTTG CAGTGATTTGAAGACCAAGTTGTTTT A CAGCTGTGTTACCGTTAAAGGTTTTTTTT TTTATATGTATT AAATCAATTTATCACT GTTTAAAGCTTTGAATATCTGCAATCTTT GCCAAGGTACTTTTTTATTTAAAAA CATAACTTTGTAAATATTACCTGTAATA TTATATATACTTAATAAAACATT TTAAG CTAT

30

40

50

【表 3 1 - 1 0】

CD4 7-2 05 CDS	配列番号 17	AAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGT GACTTCTACAGG GATATTAATATTACTT CACTACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TG GATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTG GTTATTCAGGT GATAGCCTATATCCTCG CTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTAT TGC GGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTC TGATTTTCAGG TTTGAGTATCTTAGCTCT AGCACAAATTACTTGGACTAGTTTA TATG AAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTAT ACAACCTC CTAGGAAAGCTGTAGAGGAA CCCCTTAATGAATAA
CD4 7-2 06 CDS	配列番号 18	ATGGAGGCGACAAAACACTACTGAAGTATA GGTAAAGTGGA AATTTAAAGGAAGAGAT ATTTACACCTTTTGATGGAGCTCTA AACAA AGTCCACTGTCECCACTGACTTTAGTAGT GCAAAAAAT TGAAGTCTCACAACTACTAA AAGGAGATGCCTCTTTGAAGA TGGATAA GAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACT ACACT TGTGAAGTAACAGAAATTAACCAG AGAAGGTGAAACGATCA TCGAGCTAAAA TATCGTGTGTTTCATGGTTTTCTCCAAA TG AAAATATTCTTATTGTTATTTTCCCA ATTTTGTCTATACTCCT GTTCTGGGGAC AGTTTGGTATTAACACACTTAAATATAGA T CCGGTGGTATGGATGAGAAAACAATTG CTTTACTTGTGCTT GGACTAGTGATCAC TGTCATTGTCTTGTGGAGCCATTCTT TTCGTCCCAGGTGAATATTCAATTAAGAA TGCTACTGGCCTT GGTTTAATTGTGACT TCTACAGGGATATTAAATATTACTTCAC T ACTATGTGTTT

10

20

【表 3 1 - 1 1】

ヒトCD47 遺伝子	配列番号 19	CTCATTCTATTTATTCTTTTAAACAACGAT TTGTTGAGTACAT ACTATGTGTGAGGCA AAGGGCTAGCAGTAAAGAAGACTC ATA TGGTCCCTCCCTCATTGAGCTTACAGTA TAGGAAACA GTTATTACTGAACACGAAG ACAGCTATATAAACATAATTT AATAAA AGATGGTAACTGATATGCACCAAAGTAAG ACTAA AACACAGAGAAGTGCACTTAACT TATACTGGCATTATCATG GGCCTTGATT TACTGTGGGATCCTTTGCTGTTATGTTCC CTT ACGTTGAAAGATGCATCTGGCCCTA CACAAAGCACAGACTA TGAGTAGGTAGG CACATACAGTTCTAAGCCAAACCCCTTGGG GCACCAGGAGACAGCACTGTCTCATGTCC TTGCATGACACA CCACCATGGGGCAAAA CATTTGCTGAATGAAGTTACAATAA GGA TACAATTGTATCTACATAAACATTTAAAG ATACTATCA TATCAATACCTACTATGTG GCAGGATCTTGATGTTGTGTGGG GAGGA AGATAAAAGTAGATGTATCGTTGAGACAG AAATGA GGGCAAGGGAAATTTTTATGC ATTGAGAGAGGAAGTTTGT GAATTTTTT CGCTGGCCATGGAGTCAGGGAGACTTCAG TCC AACCAACCGTCCCTCCCTGAGCTTGT GACCAAGCCTCACTTTT CTTATCTATAA AGGTGACAAGAGTGATTTT TTAAGTTTA TT TATCTGTAAAGGGGAACTGTAGCAA CTTTGCTATTATAGG GTAAAAAGAAAAA AGGATGAAAACCAAGAACAGGGAGAG AG ACAAGAGAGAGAGCAGTGTCACTTATAAC TGTGGGCAA AGTGCTCACCATTCTCTT TCCCTTTGTTTCTCATCTCAAAA AGGG AGATCATACATTTATCCTTTCTGAGGTT GTTATGAA GATTAACTTAGGTGATATAG CTAATGTGTACTTCCTGTGTTG

30

40

50

【表 3 1 - 1 2】

	AAAACATTCTAATATGTATTATCCCTCC CTCTCTACCCAAG AAACCTCCTTACATAC AGATAAGATGAGCTCAACATCCAAAT TA AAATGCTTTGAAAAAGTTAAAAGGCAAACC TTTAAAAATGA TTAAATACTGAAAAAGAGC TTAAGGTTATCTCAGAGAGAGGA TAATC AAACCTAGGCAGGCTGCTTTGGACTGTCT CTCCTGG GATATGCCTGCTTTTGCCCA CCACCAAAACATACCCAGC TAGATTCC CAAGAGCAGCAGTGGTCACCCAGGTGGCC TCTC ATTCCATTTTCTGCACAAAAAGAC GTTAAGCATATAGCTCA GTAGCTCCAG TGTAACACAGAACATCACCCGATCTCCAC C TCTGAAGGTTGGGGACAGTCCTTTCTA GTCACCTCTTCAGCTT TAGGGGGGTTGGT TGGTATCAGGGACAGCTGACAGCCTTAT TTAGCCAACCAGCTGCTCTGTGATACACA ATGTCCCTAATG CTCAAAGTCTGGTGG TGATTCTTTTGTATCCACATAAGCAG CA GTTGGAGGAGAATCGATGAGTCCCTTTGG TTGCCTCGGG GTGTCAAGGCTGCCATTTC AAATCATTACACCATTAATTATTA ACCA TTGTTTTAGTGAGATGTCTGCCAGGCAAT TGTCTTTAT TTTTCAATCATTAATAAAG CAATCAAAATTCAGTAGAGCAA TGCCTG CCTCACGCCGATCAACACATTTATTAAA CCCCTTC TGTTCGCGAGCTCAATGGAA AGTCTTGGAGGAGGGAATAC TAAAAATG CTCTCGGATTTAAAAAGAATTGATAATGCT GTGG GGAAGAGGTTTACACAAAAAAGCA ATTACAGGAAGAAGCTCGATAGTATACAA TACACTGGTACAGAGTGTCATAGACAGT

10

20

【表 3 1 - 1 3】

	GCCACTTTCATACGCTGGATTATTTCT GTGGCAATGGGAT GCTTGGGAGGAGCCG CACTGTGTAGAGGATTTGGAGAAGTG GG GTATTGTGGTGGGAAATTGCTTTCTTTCC CAGGAGGTAG GAGGAAAACAATCAAGGA GGTGGACAGGATGTGCACTCCA TTAGAG CAGCCACCAGAGCCTGACTTTTGGATAAG AGAGTA CATCAGTTAGGATAACGGTTAA AAGTATCTTTAAAAAGACTT TTGCTTCAG GATGAATGATGTGGCCTGTGTGATTACAGC GAT AAATTCAAAAGCCTTGTCCTATTG TGGCTTGGCGCCACATT TCGAACCCATT TTTCAAGCATGTAAACCCAAAGCGCAGCG C AGAGGGCTGCACATGGGGCAGTCACAA ACCAAGCTCAATA ACCTTGCTGGTGGGG ATGTGTTGGATACGCTGCTAATGCCT GT TTGCGACAATGCTCGCTAGTCCCGGTGGT GGCGGTGTTC ACAGGTAACAATGTTTAC CACCGTGAAATGGAACCTGTTTGA TTAAC ECTGATCAGAGGATGAAAACACTAAAGAA CCAAGT GAGAAAGAGGGAAGAGAACCGC ATAGGGAAGAGCAGAGC GAGTAGACGAG CCGAACGCAAGAGCCCGCGAGGGCGAGTG GAAGCTCCCTGCGGGCAGGTACCCGACCA CCGCCCTGCCCT GGGCGTGGCGGCTCG GGCTCAGGGACCGCTTCGGCGCTAG ACG GCCGCGTCCGGAGGAAACGGCGCTGGTG AAAGCCTA GGTGTCTGTGTCACGCGCG CAGCGGACGTGGGTCCAGG GAGAGAC GCGGGCTGGGGCGGGACGGGACCCGGCCC CTGA AGCGCGAGGGTGGGAGTGAAAGCA AAGAGGAGAAAAGTA GAGAGAGAGGACA GTGGGGCCCAAGCGCCGCGGAAAGGCA G GAACCGACCCGCGGACAGGAACGGGTGCA ATGAGGTCCC CCGCGAGCGTGGGAACAC AGGGTTACGCCTCCTGCGGCGG

30

40

50

【表 3 1 - 1 4】

	GCGAGCACGCGGACCCAGGGGCGGGCGG GTGCGACAGGA CGTGACCTGGAAGCGCG GCGCGTGCCACCGCCCTGGAGCAG GCAT CCGGCCTCCGTGGAGCGGGCAGGCGGGCC CCGGGTCT GGAGCCTGCGACTGGGGAGG GCGCCGCGTCAACAGCAGCG GTTGCGGG GCGGGGCGGAGTGCGCGTGCGCGGCTCTC GCGG GCGGGGAGCAGGCGGGGAGCGGG CGGGAAGCAGTGGGA GCGGCGGTGCGGG CGGCCGTGCAGCCTGGGCAGTGGGTCTT GCCTGTGACGCGGCGGGCGGTGGGTCTT GCCTGTAAACGGC GCGGCGGCTGCTGCT CCGGACACCTGCGGCGGGCGGGCG ACC CGGCGGCGGGCGGGAGATGTGGCCCTG GTAGCGGC GCTGTTGCTGGGCTCGGCGT GCTGCGGTGAGTGGGTCTCTCG CTCCAG CCCTGCGGCTGCTGTGCTTCGCCCCCGC GGGCGT GTGGGCTGCGCCCCAGCCAGCC CGGCGGCGCCCTGAAGAG GGTGGCGGG GCGCAGAAACACTCGGGCCCTGAGCGCCCG A AGTGACAGCGTGGGAGGGCCCCACGGG GAATCGGGCGCCC CCCTTCTTCTCTCCCT TCTTTTCCCTGGTCTGTTCTTCTTCCCT GGGTGAGAGCGGGGCTCATCTCTCTCCACC CGGTTCTCCATC TCCAAATGCACACACA CAGGAAGACTCCAAACCGCGACCT CGC GCAAAAAATTAAGTAGCAAGAAAGGGCGCG ATCAGAGG CAAGGGGCTGCAGCTGCTAG GGATCCCTTCTTTGCGACCCCTCTCCCT TCTCAGTGCTTAGACGCATTGCGGGTTGA GGGAG

10

20

【表 3 1 - 1 5】

	GGAGAGTGGGAGGGCCCGGGCTCTTGCG ATGGAAGTGC CATTTTGGCGAAGTCGG TGAGAAGGGGTTTCTGCGGTTTGC CTCC CACATGAACATAGGAGCGAAGAGGACGTA AAGGACA CAATTAAGTTTCATTTCAAC TCAGCATTCGAATCAGAAGAAT CTTCCGG CCGTGTAAATTTTGCTGTCTTTTAAATC CTAAAA ATAAGCTTGCTGGAACCTCTTC CTTTCTCGTGACCCCTCACCG CCCATCAG CCACTTGCATACATTCTAAATTGTACGTT GAAGT TTTTCCCACTTTATTGGGGGAA CCGTTTTAAAAAGTAATCTG GTTTTCGCG TGAAATAGGAAGACAGTAACCTCCAGTCA AAA CATGTGCAGCAGAATGGGATTTGGT GTTTTTTCGACGCCAAA GAACCTCCACCC CCCCACCCCCACCCCGAGCTTTTGGGAATC CATTTGCGTTTTGTAAACGTGTGCTTCG TCTGTAAAAACTG AGCAAGGAATAGAAA CATTCGTAGCTCTACAGTGAGTGCCCT GT CACACTTCACATCCATAGAGCCTTTTGTG AACTTTTATAA GATTACAGAAATTCAGCTT GAGCACCAGTGACAGCAATTGTGA CATT TATTCTAGAATGCTAAATTAATTGATT TAAACTGAT TATTAGCCTCGGTGTGCGG TTCCTAAAGGCTTGTGACTTTAG GTATT TCCAAGATGCCCTTAAGTCTCTGCTTACC ACTTTCTCT CCCTCCCGAGCATCCTGGA TGTTGGGACTGTGAATCCAGG TCTCCGT TATCTAAATGGTTGATGTTAGTGTTTCTT GTCATC ACGTTTAGTATGCTTGTTCCT TTACTATCATTATAGCTAAA ATAATACT GCTTTCAGAGATGTGTTGTATAATCGCAT AATA ATTTCAGAACGCCCTTCATATTGAA CCAGATATGAAGTGATA CAGTATCATT ATTCAAACCTGCCCTAAAAAGTAAAAAGTAT A.

30

40

50

【表 3 1 - 1 6】

	AACCATATACTATTTTTTAAACAGGTAGG TTAGATTTAAAT CACGTAGTTTAGAACT GTTGGAATGGTACTTTGAGTGATAG GAT TTATGTTAGGCCTTCTTTAGTAATAGTTA ATATCATGTA ATTAGCACTCGTTTACAC ACAATTTTAAATGTGTTTGAATCCC TAGA GTCATCGAATTCAGAATTTATAGTATTTT ATTTTACTT AGTTAATATTAACCTAAAA AAAAAGCAAAATACAGGCATTA TGCAGT TGAGTTGTGTTAAGTGTGGACTGTAAAAAC AGGATA GTATTTGTTATAAAATATGTTT TTGTATGTGTTTAAATATATA GCTTCAAA AGGACATGTATGAAGAAAGATGTCTCAGC ACAT AGGTAGTTATAAACCAAGGGTTTG AGAGACTGACTTTAGAA TCTAGAATGAG TAAGAAAGTGATGGATCTGTACATTCAAT T GTATTGAAGTTTGATTTTGCTTTCAGT TTCGTTAATTAAGCC CCGGGAATCAGGG ACCTTTTCTGGCACCTCTACAGTGTTA GTGGCCTTTGTGGTAAAAGAGTTATCTC AGATACTCATTTT ATGCAATTACAGGCA AACTGGAAGGCACCTTAATGGTATGC AA GATGTGAAATGAATTACTATGTTGCATT CACTCTGCCCC CACTCATGTACAATTAT ACTTTGTTTAAAGTGCATAGTTT AGT GGTATTTATTAGCTAGCAAAATAAACTTT AAATAAATA ATGATGGTGTGTGAACTG TCTTTTCAGTGGTTGAATGATTC CTCTT TGTTCAAAATGAGTTGTTTTTTTTTTAA ATCAGGGT ACATATGATTAAATAAAATT TTTTTCCATCGTCTAAGTCTAGTAGTAAT TTGGCTTGTTAAATAAAAAATGTTTTCTC TTAAAG

10

20

【表 3 1 - 1 7】

	AATATATTATTTTTAATTACAAGTTGCCA TTTTAAGGAAGTA AATGCCATTTAAAAA GTACGTATTTATGGGGCCGCCCCAGC AG TCTAGAGGCAGTGTTTTTTAAAGCATTAC ACTAAATGCC TACCATTAGGACACTTGC TCATGCTGTCTATCTGTGTTTTGGC AGAT GTTTTATCTTTGTCACTGAGTTGTTTCATG GAGATTTGA AAGGCCAAGTTCTAAAGAT GAGAGATAGATGACTTTCCCCC CAAATT GATACATATTCTAAATCCAAATAATCAC GCATAT TCGCAAAACTAGATTTGCATTT CATAGTATGAATTCAGCTAT AGCTAGTA TATAGGCATTGCTTTTAAATATAGTAATGT TCTTT TTGTGGCATAATTTCAATCACT TTCCCTGTCTTAGGTTTCTG CCTACCTT TTTATACAAGATAAACATTTCTATTTTCA TATCTT ATCTCTCAGTCTGATTTTAATA ATATCGTCTTGGGTTATCAT AAAGTTAC TTTCACTTTGTATACTAGTGTAGATATTT CTTCT GTGATAAAAAGAACAAGAATAAT AGTGTAGGATCAGTTTTG TAAACTCAT TGTAAGTACTAAAGTAGAAAAACAGAGCA CC CAGGAAATTTGATTCTGATATACCTA GACTAAGACAATAGA ATCTGGGTTTTTC CTCTTTACGATTATACAGTGTGAAACAG AAATCAAGCTACACCCACCTCTGAATATT TCATTCCAAATCC ATGGAGCAGTTGCAT AAGACTCAGAATCTGGTCAATCTCAT GG TTTGAGATTCAAGTTAGGAGAATTAATGT GCATATTTGA ATATATATCACACTTGT GGTTAAAGGTAAAGCAAGGGGT TTGGC TAGTTCAAGGCCTGTCAAAACCACTTTTT TCCATTTT CAGCAAGTATGAGCCTATAC TAGACACCAAGCAGTTTGCAA AGCCCTC TTTGGCATATAGACAAATTTTACAGACAGTA TGTCA

30

40

50

【表 3 1 - 1 8】

	GTATGTCTCTTAATGACTTAAGATGTAGT ATATAGACAGTA GGGATATCTTGTTTTT ATTCCCTCATGGTACTTAGGTGCTTG TT AAGGCCATAATTCTGGATGTTATTGACTT TAAACTGCCCT GCCCTTTTAAATTCTAA GTTGGCCTCTTCCATTCTTATAAGG CCA CTTTTAAATTCAATTAGGGGGATTGCGTTG GGTCAGAAC TAAGTACAACCTTGTGGACA CCCCCTCTACCCAGACCTTT ATTTTA GTGTCCATTGAGGAGAGATCTGACTTCAAT CCTTTTT GTACGTAACCCAGTGTAGCTA GAGACTCCAGTCTTTCAAGC CAGACACT AGTTCTAAGGGGCAAAAGTAGGTAGGATT GCTT TCTGGCATGTGTCTTTACTGATGA TCTTTGCTTCTTTACCTAA GAGGCTGCT GAGACTTCTTACTCCATTCCGTAACATCC ATT C CAGCAGATAATTAACTTCTTACT CTACTGCAAAAAATAGT GGTGTGTGGTT TGGACTCCCTCTGCTTCCCTCCCACTT AC TAAACTGATCTATAACATCTTAGATA ACCCTCGTCTCATTTCT CTTCGGTCAATCC AGCTTCAGAAAGAAAACCTACTCACTTTTTC C AACGAAAGGACAACCTGTCTACCACCT TTTCACTTCTACCAT CTTGGAGACCTGCT TCAGTCAGCATAATTCTTCACTGCTTGCAT CTTAGATCTTTCCCTCTCCATTGACTCCT TCCCCGTAGCTTGC ACACATGATCAAAAT TTTACCCCATATTAATAAAATATAACAA A AAACCTCAAGAACCAAAATGCTCTGGCC TTGTTCTGCTT GCACATTGTCACTTGT TGCCTTCTCTGCTTTCTTACACTGCCAAA TTTATTGTAAAAGAATCACTGCCACTTAA TATATTTTAA

10

20

【表 3 1 - 1 9】

	GTGCTTGATAAAGCCATCTTGTTTCTCTC TCATTTCTCAAAC ATAGTGTGCATCAGA TCTCACTAGTCCATTGACAGATGGAA AG ATATTCTCCCCAAATATTTAAGCCTCTTT TCTCTATAATT AGCCTACCATCTAACTA GCTACACATACTATTTTGGTTTACA ATT TTAATTTTCCCTCTTTATCTCCCTGCT TCCACAACTA ACTTCTGTTGATTACTG TAAGTTTTAGGTCTTCTCTCCAGTT GTT CTTTACCTGGACTATTGCAGTAGTCTGTT AAGGATCTC CCTTCTCTTTTCCCTTG CTGCCCTCAGTCTTCTTTTACACT GCT GTCAATGTTTTTTTTTAAATGAAATTA TCTGAGTGGT TTACAGTTGTTTATGTTA TCAAGTCTAAACTCAGCATGACAT TCAA GGAAGCCCTTAGAATTTTCTTATTCAT CTTTTCCAA CCTCATTTCCTAGAGCTCA CCTAAATAATTCTCTGCTTTTCACT TTCTT CACTTTCTTTATCTGGCTGTACACGTTAC TCTGCCCTAG AAAGCCCTTCTTTCCCAT AACATTCTTACTCATCTTTAAG ACCCA GTTTAAACATCACCTCTAGGAAGATCAT TCATAGA CACATTCTTGTGATTTTAAAG GAACTTTTCTATCCAACCATA CAAAGTGA CTTGAGATTTTCCATGAAAATATGCAGCT TCATG ATTTTATAATCAAGTCTATACAA GTGAGAAGCAGTGGCAGG TTCTCTTGAA ATACAGAAGAAAAATCTATCTTCTCCAC ATG ATTTTATAGATTTTCTTCTATGGAA TTTATACTTTAAACTTTT TACATTACAA AGGAAGGTATTGAATCCTACTTTCTGGAC CCT GTGTTAGATTCTTAGGATACCAAAAT GAAGACAGTGTCTTAC TTTCTGAGCCTG GAGAGATCAGTTAAGTAAATAGTAATTA

30

40

50

【表 3 1 - 2 0】

	CACAGTAGTAGGTACAGTGACAACATTTG AACACAAGGCA ATGGGAGCAATAAGGAG GGGAAGAATACAATTGAGTAATG GTAGG GAAGGGGAACAAGATTGAACAACCTCAACT GTGCTTT AGTAGGAAGAGCAAAAAGTTAG CAAACCTGTAGCTGCCATTTA TTGAGTAC TTGCTGTATATGTGAAAGGTGATACAAAA ACAT GTTATCTTTATTAAATCTTAACAAT ATCTCTATGAGGTATATA GCATCACTAT GCACATTTTATAGATGAGGAACTGAGGA GC AGAGGTAAGTAACTTGCCTAAGGTTA TACAGCTAAGAAGTA CATGAGGTGAATC TTAAACTAGGGTCGACCCCTTAATGTGT GCACTTAACTATTATACACCCCTATGTA CAGTGGGGTAAT AGTGTATAACAGTTAA GAGGCTATTTAGGTTTGAGGAACAG TAT GTGCTAAGGCATGGGGATGAGAGTGCATT TGCATAGTC ATGGAATTGCAATAACGTC ATTATGATTGGAGCTTAGGTG GAAATG AGGGAGTACAGGAGGTGGGGCTGGAAAGG ATCTT GAAGGACCTCGTTTGTATTCCAT GCTAATGTACTTAGAATTT AGCCTGAAA AGGGTTGAGGGTGTGTTAAAGTATCTTA GGC AAAGGAGTGCACATTTGCATTTAGA ACAGTTATTTGGGAA CTGTAGAAAATA CATCAGGGCCAGGATGGAGAAACCTTGA GGATGGAGGCAGGGAGCTGGTTAGAAGGG TATGGCAGTAG TTCCAGGGGGGAGGATG AGTGTCTAATTCATTCAACA GACA TTGGATTTAGGAACTATTAATTAGGTTGA ACCTACTA AGAATTCTCCATGGCTAAGG AGAGGGAGTAATCTAATGTGATTCTTAGG TCCAGGTCTGGTTCAGTGGTAGATGATAG AAAA

10

20

【表 3 1 - 2 1】

	TACTTTAGCAAAGTGATTTAGGCTGAGGG TAAGAAGTGGGG GTACGTAAAGTTTTTGG ACATACTGACTTTGAAGTAACTGTAT TA CATCCAAGTGGAAGTGCACAGCAGACAGT TGGCTGTCCA ACATCTGCAGTTTAGAAG AAAGGCAGTGCATGATTCAGTTT TTTAT TTAAAAGTTGCAGGTGAAGAAAACCATG GGAGTCA GGGAAAATACTAGGGGGCAGA GGGTACTGAATCTGAAGCC CTTAGGGAC ACTAACATTTAGTGTGAGTCAAGGAATAG ATT TCAACAAGAAAGCAAACTAGGATG GGGTGGACAAAGCAG GAGGAAATTCGTA ATCAGGAGATACCATGGAGGCCAAGAG A GAAGAGCAAGAAAGAGACTGCCCACTGGC TCAAGAACTG TGGAAAAGTCAAGACAGA AAGTGAACCATGCATATTTGATT TTTCA CAAGGGATTGGTGGTGACTTTGGCAAGAG CTGTAGT AATGAAGAAGTAGGGGTGAAT GGGTGGAGGCCACGTAACA GATTTAAGG AGTGAATTGGAAGTGAGGAAATGCTTATA GAT TGTTAATTTGGGATGCTAGGGAGAG AGAAAGTATGAGGGAT TTTTTTAAAGTT GGCAAATATTCAAGCAATTTTAAAGACA C ACACAAAAACAACACCTTGTAATGGA ATGGGGGATGTGG GAGGCTGATAATCAA CTAAGGAAAGTCGTTGAGGAGACTG ATG GGTATGGAGGCAGAAATGGAACTAGCTT TCAGGTGAT GGGATTCATTTCAGAAAAG GAAGCAAAAAAAAAAAAAAGG TGTGGAT AGTTGGGGTTACAGGTAGGTTTATAGGGA AGGAG TATTGGGAAGCTTCAGGATTCTCC TCTGAAGGTTTCAGTTGT ATTAAGAAA TAGGGAGAGAGGACTGTTGGAGAGTATGG GA

30

40

50

【表 3 1 - 2 2】

	TAAAGGGCAGAAGGGAGTAATTTAAGAGT TGTTAAAAAGA AGCGAACATTTACATGA AATATGTAAATGGTAAAGATTGA AGGC CCGGAGGAGCAGGGACTATGACATTCTTC TGTTTTTG CCTATTAGCAACATGAATTT TCTTAGAAATCTGTAAGACCA ATTACTC TTCTGCCCCATCCATAAGGACGTTGTCCAT GCAGAA AAGATAACACTTGTAACTTGT ATTATATACTTATCATCGCC CATTGAG AATTGTAAGCTCCTAAAAGATAATAACTA TATT TTTTCATCACTATATCCCCACATC CTATCACAATATTTGATC ACAGGTAATT CTTGACAAATGTTGATTGCATTTTTAAAA TTT CTAACCTGAACCTTGTGTGCTGTGAC CACCATGGATTGAGTCT TCTCTGCCACT ACAAAGCTCTTTTCTAGACTATGATATGA GA TGGTTTGGGCTGATAGTCTATATTCA CCAATACTTGTACAGT TCCAATGAAGGT TTCAAGTCTAATACTTTTGGCATTTGATA T AAAATCATTTTCCCATTTTATTGCTA ATTTATCTATAACTCT GGCATTACTCTT GGTTACATTGTCTGCTGCTATCTGATTT A GACTGCTATAAGCATATCTTGTTTATT CAGAGTTTTCTTATT CATGTTAATTATC TGTGTTTCTTATTTGCTCTCTACATTTT A AATAGTTTCTTCACTTTGCTGTTTTAT GAGAAGGGAGTAGGC AAAAGGAAAAAAC CCCAAATCAGACAGTTTTACTACTTAAT AGTTTTTTAATGCATCTTTATAGAGATTG AAGTTGTAGTFAA CAGCTAGAGTGATAT TTTTGGCCTGCCCTTATTTATTAATTA C TAGTGCAAAGGTTATTCAAATGTGGTTT ATCCAGGTCAATTTTACTGTTATTTTTAC TAATAGCATTTATTCTACTTAAATTG

10

20

【表 3 1 - 2 3】

	CTTCAGCTATAAAATGTTTTATTGTAAC AAATAATGCAGTA TAATTATTGCTTTCT GTATTCCTTTGAAAAATTCATTCTCTAAA CATATGTTATGAAATGGTGGATTGTTTAC CAACTACTTCTTA CTTACTTAATTAAG CCTTTGCAAAAAGTTTCATAGGATGA CT GAGTTCTTCATTCGTACCTCTTTTTTTTA AGAATAATCTCT TGAAAGTCAAACCATG ATTCATACAAATATAAAATGAACAT GTG TCAAAGATTTATTTCACTAATTAATTAA CAAGCAAAC AGCAAGAAGGCAAAACCC TTTTAAAAGAAAATTGGAAAAA CAGACA CATTTATAGGCAATCAAGAAATGCCATAAT GAATTT GCTAATAAATGCAAAATTGGTC AATATCCTCAGGGCAGTAA AATGTAGTC TTTTGGAATCCTCTCTTCCACCAGGTGGA AATC AATTGCAGAACAGATTTATTTTT ATCTGTATGGACAGCAA TCCATTTGAAT TACTCTCAGTTTTCTACAACCTTATGAAAC TG TAAAACAGGCCAGTCAAAGTCAGTGA AAGGCACAGGCTTCT ATAGAGTCAGATA ATTCCAAAGCGTCTGTAGACATTGCCCT AGCACTTGACTGAAAGGATACCCAGTAGT CTTTGTATCCCTT TCAAAATCTTCACCA TATTTTCTGATACCTTCCCTTCTTTATA ATTTGAACATCTTCACCCCTTTATTCTTC TCTGGTATACTATG TCCTCTCTCCCTCA GTGTTTCTCTCTCAGGGGAAATAATTCA CAATTCCAAAGTTTTAAAGAAATGCAACGG AAGTCCAGGTCT TGCCTTGGGCTTCCTA GTATTTGGGTGGCTAGAAATGTAGA AAA CTGGGAAGAGGTGAGCTGTGGATGCCAC AATATAGG TTCAGACTGCAATTTCCAG AAATATAACAATTTGGACTAG TCAAAGA GGGCCATATCATTACATTTAAATGCCAG ATTAT

30

40

50

【表 3 1 - 2 4】

	CTAGTTTTTATAGTATCACCCCTACATTTT TACAGCATAGTAT TGTTTAGAGAGCACT TGCCGCTATGTTTTCCATGTTAATGCT C AACACAGTTCTGTGAAGTAGCCCGGTGTT TGTTTTTGATCC TCCTACTTAAGAGATC CTCCTATTTTAGAGAGTAAACCAAG GCA TAGAAAAGTGAGTTGCTTAAGGCAGCATA TTAAAAAG GGGCAGAAATAGTATTTTTTA CTCAGGTGTTTTGAACATTGTC CAGTAC CTATATTCCAGTATGCATCCTTGCAATTCA ATTCATG GGGTATTTATTGAGTAAACAT AGTGTTCTTACAATAGAAAC ATTCTATG CCTCTGATTTTATTCCAGTTTATGTAGA AGTAA ATCTTAAGTGTGAACTATTAAACA AAGTTGATATTTTATTTAT ATTTGTTAG TAATTTGTGTTTTGTTTTGTTTATGTTT TGAGG GGAAGGCCAAGTAGCTACTTAGG TAAAAGAGTTGCTGAGTG GCTGAAGAAT ATGGAAGACAACACTACAATTCCTACACATT CT TGTACATTTTAGTTGAACAATGAGTG ATTACATTTATTTACC CAGTGCCCTCTTC TATAAGGCAACAACCTGGTAGTTTATCCTA T TGAGAAGCGTAGATAGGATGCTTATTA GCAGTAACTGCTCT TGGTTTCAACTTGC ATCTTACTTAGCTTTTTCACCGTTTTGTG GTTTCTTGGAGGAAGAATACCCATAATAT ACATTTGGAGAC TGTGTCTCTGAGTGT CAATGAAATGTGGGGGTGGGAAAAAT GTC ATTCAAGACTCCCATACAAAATGTCTATT GCTGCCCTATA TTTTGCTATGGGAAAGTA GCCACAGATAATGTTTTTTTTTTCCTCAT TAGTATTTTAAAGATTTTCCATCCTAGTGG AAAGATAT

10

20

【表 3 1 - 2 5】

	GATTTGATTCATCCTATTTACTTTGTATA TTAAAGTACAGTA GAACCTGCCACTTTT TTTGAAATGCAGCATAAGGATAAAG AT AAATTTTCATATCAGTTTCAGCAAGTTCTAT TTAGCAGTGTG TTGAAGTTGAGACTGAA TAAAAATATTTGGTTTTGGTTTTCTGT TCA AAATTTTACCTTGATAAGGACAATATTTT TCTACATATA TCAGTAGGCAGTAATGAT TACTTCAAAGCTTCCAAAGCCAG ATACT ACACCTGCATGTTCCAAACATAGTTGCTGA ATTTATTTC CCAAGATGCATGTAATGTAT ACTTTGTATTATGAGAATGA ATAAAGA AAAGTCATAATGATGCCCTTCAGCTGTGC AAGTT AATATTTAAATATAATTTGTTTG CATATTTTCCCTAATAGGT CTTCTTCAT TGCTATACTGTTTACTTAAAGTGAACAATG GAAA TGTGCTGTTTATCTTAAGGATTT GTAACATGCCCTAAGATCT TACAGTACAG ACTTCTATAATTAATGAAACATTTTTCTT TTT CCTTTCAGGATCAGCTCAGCTACT ATTTAATAAAACAAAA TCTGTAGAATTC ACGTTTTGTAAATGACACTGTCGTCAATCC A TGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAA AACACTACTGAAGT ATACGTAAAGTGGA AATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCT T TGATGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCC CCACTGACTTTA GTAGTGCAAAAAATTGA AGTCTCACAAATTAATAAAGGAGAT GCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGT CTCACACAC AGGAAACTACAGTTGTGAA GTAACAGAAATTAACCAGAGAA GGTGAAA CGATCATCGAGCTAAATATCGTGTTGGT AAGAC TTCTATGAAAGCTTCTTTTTTTA TTTGTCTGGTGCAACCTG

30

40

50

【表 3 1 - 2 6】

	ATCCTCTTTTCGAGAGGAGGCCAAATGGGG ATAGGTA CTCT FTGAATCAAAAAGCAG GCTGTTATTAATAAATGTTGATGTA ATG TTTAGCAAGTTTAAGATTGTGATTTCTAT CCTATTTGTT AATCTACTCTTCATGGTA AAACACATTTACTATTTAATTTGT ATTA CTTGTTAATTTGTATATTGTGTGGTTCTC AAACTTTTG GTCTAAGGACCATTTTATT TGGCTGATTGGTCCTGGGGTAAT GTACT CTTCATTTCTGTTTGCTGCCATCCAAGTG CTTTCTTTCT GTGTGACTAATTTTCAAGT CTCTTTCCAAATTAATTCAGCCTTCT GTTT TTTGTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTAACCTTA CACTTTGACCAAGGGA TGACAAGTCCCAGCCATGCTCCCTC TGG AGAGAATAGAGGAGAGTCAGGAGATTAAA TCACGTTA TCATGGATGATTTCTTCAGA TTTTCTGTGCTTAGCCTTACTTT GGTCT TCTTTTTGTTGGCCAAAATATGAGAGAAC TAGAGAT TCAAATTCATTTATTCAAATT CAGACTTGATGATAGCACCAT GATTCTG CCCTTTTTATCACAACTTGGGTTGCTGA GGTGTA GAAGGTAGTAAATTAGCTGAA GTAAATACTCTCCTCTCCT TGGTGTTTC CTGCTGTGCTAGCTGAGTTCTTCAACCCC ATAT GAGTATGTTCTTTCTGTTTTGAAA TCTCTATTTAGAATTACC TGTCATATTA CCGATCATGGCTTAACCACATTTTGAGAA CCT TAACTCTAGATAGGTTCAAGTTCTGT TCAGTTGGATCAACTAT TTGCCTAGCTT TTATAAAATAATCTACTACCAGATTAGGA AT GGGGTGTTTGGTTTGATGAAATGTTT GCACATTACTTAGGAT TGAGAATCAGGAGGCTGAGTTACAGCCC CTGTTTCAGCAAC

10

20

【表 3 1 - 2 7】

	TTACTATTCACCTGTGTGATCTTGAGAAG GTGCTTAACCGAG TCCAAGTTACCTCAT GTCCGAAATGGAGATGACAATAGATA CT TGCTTTTATGTATTCTACAGTCTAATGAG CATAAACCAAA GTGTGTTGTAAATGTTA GTTGTTTTCTCGGGATGTTTATTTT ATG AAGTAAGGTATCAAGTTGTTGAAGTTAGC CTAGAGCAT TGTGAGAGGGATTTGTGTG CAGTGAGGAATGGGCAAGGGA TGGCTCC GAGTAGGCAAGGAGAATTTGAAAGGTCTT TCTGC TCAGAAATCTCTCTTACATTGTA GCTTTTACTATTGATATTA ATTTGGGCA AAGGAGCTTTTTTTGTTGTGTTAAGTAT ACCT TTAATGAAGGGTGTAATCAGTCAG TCATATCCACTGCAACT AACTGGTATTA GATCATCTAATACCTAGTTGAAATTTTTCT TG AGGTAATGTACAATTTTGTGGAATG AAAGAATAAGATATG GGGGAACAGTAAC TTTTGGGGGGTAATGCAGGTCACTGAGA GGTAAACTGGAAAACCAAAATATGAGAT TTGAAAGGCCA GAAGATGAAATGAAGAT GGAAGAGAAAGGAATGCCAGGAT CTGAG ATAAAAACAGTTTATTATTTTGGGTGTGA TTGAAAG ACTGTTTTATCTTTGTTTGCA AAATACCTATAAAAATAAAA ACTAGAC TTATTTTGGGAGCCATTAAGGAGAAAG TATTG TTTTATTATAGAGAAATGTAGAAA ATTCTACCAGAGGTTTGA GACATTTGGC TTTGCAATCCATTTTAATTTTGAATATA TTA TTGATTTACAGGACGATTCAAAGAT AGAGAGCTTCCATGTG CCCTTCACCCAG TCCCCCAATGGTTTCCTCTTATGTGACA C AATATGAAAATCAGGAAGTTCACAATG GTGCAGTGTGTGTT AATGCTTCGCTCTC ATTTTATCAGGTGTTTATTTGCGTAACT

30

40

50

【表 3 1 - 2 8】

	ACCTACACAATCAGGACATAGACCTATCC ATCATAACAAAC ATCTCCCTCATGCTTA TTCTTACTAGTCATACCGCCACCTCC CA CTGTCCCTAACCTGGCAAGCACCAATTTG TCCTCCATATC TATAATTTTGTCAATTC AACAATGCTATATAAATGGAATGAT ACA AGATGTGACCTTTTGAGAAGGGCTTTTTTC ACTAAGCAC AATGCCCTTGAGATCTATC CAAGTTTTTGCATCTATCAATAG TTCTT TTTTCCCTTACTTTTTTTTTTTGCTGAGTAG TAGTCCATA GTATGAATATATCACAGTT TGTTTAAACCACTTACCTATAGTA GGACA TTTTGGTTGTTTCCAAGTTTGGGCTGTTA CAAATGAA ACTGCTCTGAACAATTGTGT ACAGGTTCTTGTGTAGACACA GTTTTCA TTTCTCTGGGATAAATGCTCAGAAGTATG GTTACT GGGCTGTATGGTAAGTATATGC TTAGTTTTTAAAGAACTG CCAGACTTT TCCAGAGTGGCTATTTTCATTTTACATTTT CATC AACAATGTAAGAGTGATCTGGTTT CTCCACATCCTCACCAG TATCTGGTGCC ACTATGTTGTAACCATTTTTAACTGAAAA AA ACAACAAAACAAAACAAAACCAAGTTAA AAAAGTTATCTGCAC AAAAAGGTTAAATG GGGCAGGACTCTTACTATGGAGTATAA G TTCTTTTCTAATAAGAATACTTACTTGTG ACGGACTTTGAG GATTTAAGCATTAGAA ACCATTTTTACTATGTCTGATTTTT GC AAATACAGGCATAAATGAGAAACAGAATT TGCTCAATA GAGAAGTGAATTCTACTTA ATAGAATGCAGATAATAGTGACCATTCTT TGTGCCTTTTTAAATTTTTTGGAGGACTA GGACTG

10

20

【表 3 1 - 2 9】

	AATACATGGAAACACTATAAGATATAGTT TTATATACCTCT GTGCCTATGTATGATA TAGTCCATTAGAAGGAGCACTGGAC TTG AAATTAGAAAGCTGTTTTCTAGACTTCAC TGTTTAAATAG CTTAAGAAAAAGTTGGATA AAAAACTCAACCTATCTGTCCCT CAAAT TCTTCTTAGTACAGTAAAGATGGCATCAC CATCATG GAAATGTTTGAGATATAAATA ATACCTCTCTTACTTAAACA AATTTTAC TAAGTGCCTACCATGTGCCAGTCACCGTA CTAG GCATCACAGATTCTGTGATGAATA AGACATTATTGCTGATTT CAAGGAAGTG GTTGCAGTACAAATATGAAGAGTGAAGTG A CTAACATTTTATTTGACATGTGCCAC ATACTTTATGTAAGT CGTGTCTGTATT CCTCTCAAGAACTCTAGGAGATAGATGG AGTTCTTACCATTTAACAAATAGGGAAGC AAAAGAGATTCA AGGTATTGTTCAAGGT CAGAGTAATAGCCAAGAATTAACCC TAG ATCTCTTTGGCATCAAAACCCAGTATTTT TACCACCGTA ATATGTGGTTCATGTGAA AACACCTTGTAATAAATAAATA CTGAA TGCAAATACTAGTAATCATAAAATTTATC ATTAATA TTTCTGTTCTATTAGCAATAC AAAAACTTGAAAACCTAAAGT TTATTTT TCTCTAAGCTATTAGAGTTTTGTTTAGAA AGGTCA GTTCAAGTTCCGCAGTGTTGCC AATTCATTATTATCAACAG GACATATG GCTGTTTTATAATGAAGACATGAAGGCAT TGCA AGATCTTTGTATTAGTTTTCTAGT GCTGCATAACAACCTACAA ATATAGCAGC TTAAAACACTACCCATTTTTTAGCTCAA GTT TTGTAGGTGGCAAGCCTGGTCATGG CATGACTGGGTTCTCT GATCAAAGTCTT AAAAGACTAAAATCAAGGTGTTGCCCAGG

30

40

50

【表 3 1 - 3 0】

	GCATACCTTTATTTGGAGTTTGGGGTCTTG TTCTAGGCTCACA TAATTGTGACAGAAT TCAATTCCTTGTGATTGTAAGACTGG GG TCCCTGTTTCTTTGCTAAGTATCTGCCAA GGAATTGTAGC AGCTCCTAGAGATTGCC CTCATTTCTTGGCCCATGGCCCCCTT GCA TATTTAAAGCCAGCAAAGGAGAATCTTCC TCTTGTTGA ATCCCTCTCACATATTGAG TTTATTTTGGCAGGAAGAAGCCA GACCC TTTTAAGAGACCACCTTGGTTAGGTCAGCT CTCTCTCC CTCAAAAATAATCTCTCTTT CTTAAAGTCAGCTGATTTGGGA TCTTAA TTACATCAGCAAACCTCCCTTTTGCTGGGT GATATAA TCATGAAAAATGAAATCCAATA CATTACACAGTCCTAGTCTCC CACACACA AGGGGAGGGAATTATAAAAGATGCATGGC TAG GGCAGGGGTTTTGGGACCACCTTAG AATTCTGGGTTTGATT AAATAAATAATG GGACTGTAGCCTAGCAAGTCGACACATCA GAAAAGCCATCACAATCCTGAAACATCAA GTAAAAAATTGG TTTGCATTTTAGGATT GTAAATGTTACTGTGGTGTATGCCGTG TG TGTGTGTGTGTAACCTGGTGTTCCTATG TTTGTGGGAGT TTGAAGGAGACACTTTG TTGATAGGAATGGTGTCTTCACTTT TTT AGGTTGTCTCATTTTGTACAGTGATAAG ACAAATGAGG TCCTGGGTTTTAATAACA CTTCAGCTTGAAGCAAAAATTA AACAC TTATTCAATTGACTACACCCTGTAAATATC ACTTCTTT GCCTTTCCACTAGCAAGAAG TTCATTTTCTGTGGAAGCCATTCTGCCTGT CCAGGAATTGGAGGAGAGTGATAGACACA GTTGT

10

20

【表 3 1 - 3 1】

	CAGCCATAGCTTGGGTAGAATAAGGATGT GAATGTCTTGG CTTATCTTTATTAATC TTGTGATGGAAAAATATCTGACATTG TT CTTAGTCCATTTTAAGCTTAATTTATGTT CTTAGTGGCAT AGAAATTCAGAGCTGAA AGAAGTATCATGTCTCACTCTCCC CTTG AGGAACAAGAGTTAACGTCACTGACAGT ACTACCAT AACAAATCAATAGCTTAATA GGCATATAAGTGGCTTTATAT AAAATGT TGGTTTTTTTCCCCCAGCATCTCAGTTGG TTCTTA AATATCTAATTCATGATCCTC AAACTTTTCCCACTGTAACA AATTAGAG AGAGGAGGAACATGTTTCATCAGTGACTGT AGTT CAAATACAGCAGAAATGTGCAGCA GTGATTTCAAACCTGAGA GAATCCTGGAT GCCCCTTCTCCATTGTGTGCCCCCCCCC CA CCGCCCCACATATCAGGGAACAATT TAAAAATCCTGGCACA ATAATGAGAAGGG AGAGTGACAACTGATAAGTTCCAGTT A AGAATCACTTAGACAGGCCAGGTGTGGCA GCCCACGCCCTG TAATACCAGCACTTTGG GAGGCTGAGGCAGGTGGATCACCT GAGG TCAGGAATTGAGACCAGCCTGGCCAACA TGATAAA ACCCTGTCTCTACCAAAATTA CAAAATTTAGCTGGGCATGG TGGCGCCT GCCTATAATCCAGCTACTTGGGAGGCTG AGAC AGGAGAATTGCTTGAACCCGGGAG GTGGAGGTTGCAGTGA GCTGAGACCACA CCACTGCACCTCAGCTGGGCAACAGAGT GAGACTCCATCTCAAAAAATAAAAAAAA GAATCACTTAG ACAGTATTTTGTCTCT GTAATCTTCTCTCTGTCAATTGAAAT GT CTCATATTTCTTGTTCACATAGAATCTG GGAGTCATCAA GTAGTCATCTAGTCTAT CTCATCATCTAATTTACGAATTATT

30

40

50

【表 3 1 - 3 2】

	TCTATCACACCCCAAGTAGCTGGCGATTG AGATTTTTTACTG AAAGCTTGACATGAT GAGACATTATTACTTCCCAGAGGATC TT GGTCTGTTATCAGGCAATTCAGTTCTTC CTTAAATCAAAG CTAAAACTTGCTACTAT TCTCACTCACTGGGAGGGCTGTAGT ATT TCTCTCAAGTTTATACCTCTCTGTGATGA AAATCTCTGT TCTTTTAGCCATTGCTCA TGGTTTCGGGATCCCCATTCTAGT CATC TTCCTTTGGAGCAATTCCCTGTAGATCT TCAAATGTG ATGAGTAAAACTGAGCTCA GGACTGCGTTTGTGGTCACAC CTTCT CCCTTCCAAATGACTGCTGCTGTAACTTT CTGACAG GTCCTGCTTCCCTGTAATCCA TTCTCCATGTGGCTGCCAAAG AAGATTT GAAATAAGTCAGGTTATTTTCTTCCCTA TTTAAA GCCTTCCAGCCGCTTGTCATTG CTCTTAGAATAAAATCCAAA CTCTCCCA ACAAGTTTTAAGACTCTACATGGTCTTG CCCCA GCAAACTCTTCCCATTTGATCTC ATCACTGAATTCAGTCAC AATGGCCAT CCTTTGGTTCTCAAAGTTGCCGTTCCCT TGGC ATCTCTTCTCCCTGTCTTCACAA TGTAGGCTCCTTCCCATC CTAGGCTTAG TTTCGTTCTCTCCCTAGAGGCCTTTCCT TAC TGECTCAGCTTCTCCACTCTGCAC ACTCAGGGTCCTCTGCA TTGTTCACTGC TGGCCTTCAAGAGCCTAGAGGAGTTCCCT CC CATGGTGGGCTTTCAATAAGTGTTTG TGGAATAAGTGAAAA ATGAGTGGTCACA CCAGGATCGAATGCACCTCTTACTTTTGT TAATATATTCAAATTAATATTAATATATT AATATTCTATTAA

10

20

【表 3 1 - 3 3】

	TATATCCTAAAATTTTGTGTATAGGG GCAGGGACCAAT GAAAGAACATTTCAAT GTCAGCTCATCTTGACTATGAGATC AGA TATTGGCTATATTTTGAAGGTAGAGTCAG CAGGATTTG CTGTTTAACTAGAGTGGGA TGTGGGAGAAATCAGGGAGTCA GGTATA ACTCCAAGGTTTTTCAGCCTCAAGCAACTG AAGAAA TGGGGTCACCACGACTGAAATG AGGAAAATGAGAGGGGGA GTTTAGTGGG GGATGGGGTGATGAAAATATCAGGATTCA TT GTGGAACATGAACAGTTAAGATTAAAC TGAAGAGCCTGAATT CACTGTTCTCTCAG TTTCTACAACATATAAGGAGGGGTTAATA ATTTCTCACATCATAATTGTGAGGATTTG AGGAGTTGAGGT ACACAATTAAAAACAA AAGCACAGGGGAAGTAAGGAAAAA TACA TCAATTAAGCATGGCTATTAGACCATACA GCCTTACC AAATCCATTGGGGATTAGAT ACAAAAATCCAAGCATGATCT CCAAAAT TTTTCTCTGGTAGGGTTTTAGGCTATACT GAAGTG ACTTTTCTTTGGGCATAAGAAGA TATTCAGTTATACAGTTGGA AATAAAGG TATTGATTTGGAGTATCCAAAAACATCTC TCAG TAGAGATCCACAACCAAGAAGCA TAAAAAAAAGTCTTCC ATCACTCGCAA AACTGTCTTATGACCATTGCAACCCCTCAA C AGCAAAACATATGGAGTCTCTACTACAT ATAGAGGAAAAATGC TAGATTCTGAAAAAG CTAATATCTATAAAACAGAGTTTATGA T GTTGTTATATTCTGGGGATTGATGTAAGC ATTTTACCAGGA CTATTATAGCATTAT AAGCTTAACACAAGAAATATGTGGC TAT CATTATGGAGTGAAAGGCTGGAAAAATTC TCACCTGTG ACCTGAGAGATAGTGCGTG GTAGAATTTGAAAGAAGTGTTG

30

40

50

【表 3 1 - 3 4】

	ATTCAGAGGAATGCTAGTGCTTGCTTAG GGCAGTATTGAG AAGAAGCTCTTCCAATC ACACAGCCCCCTGTACAGGCAAACT CCG GAATACTTTGAGTACATTTACTTTGGCTTT ATTGTTAGAG CAGAAACTTCACAGCTAA AATTATGGTCTTAGGGGTTTATA AGATG CAATTAACCTTAATTTTTAAAGTTCTCA CAAATCTT ATTTGAAGTCTTAATATCTT AATTTCCITTTATATAGGATATG TGGATA TATTTTTATGATAAAAGTAACATGTGACC AACTTA ATAACAGCTTCGTTAATATCCT AAAGCCACTCATCTTACTTT ACATATAA ACAGTCCTTCTGAAGCCTAATTATGCATG GATA ATTGCAGAGTGAGTTTGGGAAAAG ACCAACCAGGACATCT CTCTCCATTTT AACCACAATGAGAAGAGAGTACCTAGTGG T GCATCTTCTCGCTTAGGTTCCCTGAG TCTGTCTTTACAGGA AGACTTCATTGTT ACTTGAAGGTACATTCTTGGAACTTTACA CACCAGCCACTCAACACATGAATACATA CTTATTTTAGTTA ACTGAGTACTTAGTG AGTGCTAAGCTTTGTTTTAAGCCCTTT G CATGTAGTTTATTAAGTTTGTAAATAGTT ACAACAGTCTCT CAAGATACATGTACTG TGTATACTAGTGTAACAGTTGAGG ACA CCAAAGAACAAGAGGTGTTGACACGTGG TCACGGTTC CATAGAGTGTTAAGTTAGA GTTGGGTTCAAACCTGGCAGT GTGGCC ACAGAGCCTTGTCTCAGCCACTGCACTG CACTAC CTCTCCCGTGAAACATAAGAA AAATGTGAGAAATGCTTAAGTAAGTGTA TTTTATTTCATAAATAAAATTTACATAAG TAC

10

20

【表 3 1 - 3 5】

	ATTATGTGTAATTTGTTTTATGTATATGT GTGTATGTATAAA TAAATACATGTAAAA ATAAGGCCACAGTTTTAATTTTTTTCC A TCTCTATAATAAAGCATGTATTATAGACC ATTAGCAGAAAT TTAAAGTGTATAGTAA ATATTAATTGTGACTTTTGTCTTCT TCT TCCCCAGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGA AAATATTCTT ATTGTTATTTCCCAATT TTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGAC AGT TTGGTATTAAGTAAGTATTATTTCTAC TTTTCATTTA TGTTTCAGTGATGATATA GTTATTTCTACGAGACATTGTCAG CGAA ATATTTAAAGTTGTACTAGGAAAAGTGCT ATTATGAT AAATATGAGTATGTAATTTG AATACTACTAGTCTCCTTGAA GTATATG TTGTCGCCCCACATTTTGCTGCAGTTCACT TTTAAT TCCTAAGAAGGTTGTTTTCACT TGGTGTTTTTTAATCTCTTA AGAATGA ATAGTAGGAATATTAGTACCAACACCTTA AACTC ATGTCACATTTTAATATTACAG AACATCTACACACACATTA TGTTATTAG GTAAACAGGTGGTGACAGCCTGCATTAGT TTT AAGGTAGGACGTTATACCTTTGGAGC ATTTAGATTCCCTCTT TTTATTTTCCC AGTTTGATTTTCTCTGTGTACACGTGTTT ACC CTTGGAAAAGTCCAGTCGGAACAT GTTTTGTCACTCCTCTGC GTGCAGTTCTG CAGCCTCTAAAGAAGCAGCCACCAGAGAG T TAGGTTCTTTGATCTTGCTTTCTATA ATAGTAACGTAACCA GACTTCTGAAGGC AGATCTTGATGCTGCATTAGATTTAGCTT CAACAACACAGAATTGTCATTACTAGGCA AATAGGTAATAT GCATTACGGTTAATGT TTAATCAACCATATTTTCATATTTTG

30

40

50

【表 3 1 - 3 6】

	GTAAAGAAAATTTACAAAATTAATGAAGT TCTGAGGTGACA GTCTAAACTTTTAAGC TTTTTAAATACAAGATTTATTCCTTC TT TCCTTGTAGCATCCTGAAGACCAGTAAAC ATTTATATAAG CAAGGAATAAATACTGC TTATTTAAATTTATTCTGCAACCTTT AAA CACACAAAAGCTAGTAAACTATTGCAGTG GATTGCCCT GTTGATATTTTATGAATT TTACTTTTACTCAGCAGTTTAAG CTGTC TATATCTATGCTGGTGTATAAACATGGAA GGGAGAT GACTGATTGATTATATGTTTT AAGCGCTTTTCTCAGTGTATG GCATTCT GGAAATGCTTAGTGATTTTCAGAAATGTTT TCAACT TTTGTCTGAAAGGAAAAAAGGG GGAAGAAAGGGGTGGCAG TGGCAACTGT CAAGACATTTTATAACTTTTACTTTCAAG ATA GTGTCTAGACTTCTTTTGAAATTT TCTTATAATCTCTTAGTT TTTTATGTCA AGAAAAGGACTGGTGTAGCATTAAGACCT AT TCTGGCATCAATGATATTAGGGAAAG CTTTTAACCATATTG GCAGAGCCAGACT TTAAGGGCTAAGTCAATGACTTGGGCA GGGAACAGCCTTTTTCAAAGATCATGAAA TTATTTTACATA GTGCGATTTTTTGAGT TTGGCTTGATGGATGTTTGCTGATCC AG ACGTTATCATTGGTGACATTATTTTATG GAAATGAACC AGGAGTGAGTTTGTTTAC TGTTGGCTGTATTTTACAAAATG AGCT TTACAATATTTTTCTGACTTAAAAAAGT CATACATAT CACTTTAGAACACCTCGTA CAAAGTAGGGAGTTATTTAAAA AAAAAA AAAAAAAACATCTGTAGTCCCAAACC TAGAAATAAACTATTGGTATATTCTGGTG AATTTCTCTGTTTCCCTTT

10

20

【表 3 1 - 3 7】

	CTGTCTTTTCTATTCAATTTTGTTATCT TTTTTTTAAAAAAA GGTAACCATAAATG GACTCGTACAGCTTATATGCTTGTACG T TCTGATGTTCCCCCATGTCTTCAGAAATC TTGTTATAGCTG CCTGTGTTCTACTTTT GTGGATGCACTATAATTTACTTAACT CT CATCTTGATGGATTTTAAAGGATGTTTCCA ATTTTTTTGAT ACTATGAAAATAACTCT GCTAAAGATATGAAGCCTGGAATT GGCA GAGATATTTAAGACTCTAGATACATACT GGCAAAAT GTTTTCCAGAAACGTTTGTA TCAACTACTATTGCAGATGAG AATACCT GTCTTTTACCTCAGTTATAATTCTGATAT TATAAC GCTAAAAATCTCTGCAAATTTGA TGGGTGAAAAAGCATCTTA TTGTAATTG TAATTTTTTGTTAGTAAGGTGGAATGTT CTTT TTTATATTTTTTTGTAAGTGCATA TTTTAAGGAACGTGCTTA TAAACCTAAA GAAATATTTTGGTGGGAATTTTTGTTTT GGC TCATCTTGAAACAGGTAGATGTGTG TGTATGTGCATGGAAG AGGTATGTCTAT ACATGATTCACCCAGCCTGCGCTCACATT T AAAGGTGTTGATGATAATAGTAGCTAA CCATTTGTGGAGCT CTGCTCTGCTTGA CAGGTTCTGTGCAAAGTACTCTATATCT GAAATGACATTTATTTCTCCAGAAACTC TATGGGCATAGA CACTGTTGTTATTCCC GTTTTGTAGATAAGAAACAGGCACA GAT AGATTAGGCAATTTGCCGCAATCACCCA GCCGTTTCC TGATAGTACTGGGATTTGA ACTAGTACTGTTTACCCTGCAC TGTAC TGCTCTCCCGTTTTGCATTTATTTGAGG ATTTTATTT CCATGAAGGGTGAACCTAT ATCTAAGCACATAAATACTGAGT AGCTAA AACTTATTAGGAGAGCAGAAATGTTGACCT GATTTG

30

40

50

【表 3 1 - 3 8】

	TTTACTTATTCTGCAAAATACCTAGTGACA GGGTGCCTACTGA TTGCTGGACACCAAG CTACATGCCCTGAAATGTGGGTGTGAT GT GCATATTGCCCTGGTTTTGTAGCACCCAC ATTTAAGCCAG GGAGACACGAATGTATG TGCATCCCATGCCCTTGTACATCT TTGA GATAGTCATGGATCCAAATCTAACTTTTC TGTTAGTGC CTCTGTTGATGGCCTGAGC ATTCCACCAAAATAGAAATAGAA AGCACC TCTATTCTCCACCTGCTTAGATGTATATT TTTTAGA ATCCAGTATGGTAAATCTTCT AAAGCATTCATAATAACTCA GACCCATG ACTTTTATTTTATAGATTTCTAGTTCTGC TTAAC TTTTCCCTGATTACCATTTATGGT CTGTACTTGGCTACAGGGG ATTTCTCTC AGTGGTTTTTCCAGCTCTGCATGTGAGTC TTTGT GGTCCAAGACAAACCTGGACCTT TACCAGGCTAAACTTTCA GTAAAGACAG CAGGTTATGCCCTCATTTGCTCACTCTGA GG AGAAAGAGTTTCTTTATACCAGAGCT GTATCTTGAAAGATG TCTCAGGATGCCA TTGGTCCTACTGAGGAAGAAGCCTGAGA AGACTCTTAAACTCCAGAGCCAGCCAG CACTTGGTGAGC CCTGGACCACGTTTCA AAGATAAAGGCCTCTTACAGGGAAA TGT TCCTAAATACTTGCCTTTAGCTTAGCT TTAACTTAGG AACTTTTAAGCAGAATCT CTATGCTTAGCAACAGCTCAGA GATTG CTAGAATCAAAACACCAAGGCTTAACTGAT AGTATTG AATTTTCAGACGCTTTGTTTGT GTTCTGAAAACACACCAACT CACAGTTTGGCACTCTACTGACAATTAAG TTCTTGGCTGATT

10

20

【表 3 1 - 3 9】

	TTCAGGATTCTTCTTTCTCACTCTGATAT CATTTTAAGTGCTG TCCACCTAGTCCTC CAGTTCCCTGCAGGATTAAGGTCCAAC TG TATGTAAAGAACTGGCTAACATTTTGAAA TTCTTTGAGATA GGCCTATCTGTTCTTT CTTTGGCTTTGTAACTTTGTTTTATAC A GGCAATACTGGCTTCGCACAAAACCGCAA GACCATAAAC ATGACCATGTAAGCTGAA ATTCTGCAAAACAATCTTCATGA TGAAT GGGAAAAAC TATTATTATATTGTTCCATG ACCTTTAA AATTTTTTTTTGTGTTAAAA CCTTAAAAAC TCTGTTATTTATC AATAAC AACGGCATTGGGAAATGAAAAATAGTAAA GCTAG TATTTAGTATGTGGTAAATTAAA TCATTAGAAACATCGAGA ATGAAAGTGT GTTATCAAGAGTAGTTTGAACAACACTTG TG TGTTCTTCTTGATAACTTTGGATAC AGAGCAAGCATCTTCT CTATGGCTTGGT GAATTGTACATCCCTTTCTAAGTTTGGGA T CGGTTTCTACCGTTTTATCCTTTGCAC TCTCAATGTCATGAA AGAATTCCTTTAA TGTTTTTTTGAATGTTTAAAGTTTATTTT A TTGCCAGTCACTTCCTCTGGGACATCT TTATTCTTTTTGTTAC ATCCTCCTCACT TTCCTCATTTATATCAGTAAGTCCACCTT C GCTGAGTTCTTCTGGCTTCATCTCTAG AGTTTCTTGCAATTGC AGTAATGTCGACA TTCGCACAAACAGCTATTTCTCTCTTAC TCCATTTATGGTCTATTCAAATTTCACTC CTAGCATTTGTCA GTTTTTATTTCTTTA CTCTTTCTATCTTCTTGCCTAGTTTCCTC TTTTGATTTATCCATTATAAAATGTCACA TGGGTTTATCACT GGGAAACAAGGAGGT AACAAAAC TCCATACTTTGCTGTCTG

30

40

50

【表 3 1 - 4 0】

	TGCATGACCTAAATATCAGATGTACAGTG ACTAGTCACCAA CAGTCTTCAAAAAGAAG TGACATGGTTGATCACTGATCATGA TGG GACATCTGCTATTTACATAGTTATTTTTG AACTGAAGAA ATAGCAGTGAAGTTGTAC TTTATGCAGTTACTCAGTTAATAT ATTG TGGTAATTGAAATTTGGACTGTTTATGAG GGATTTTATT TGATTAAACCATGGTAACT GGAATTCATATCAGAATAGTGC AAAGTG AGGACTGCTGTACTTTGATTCCAAATTTAA AACTGT ATTCTAGGCATCTTAAATTTTT TTTTTTCAACTTTCCTCCCTCCC TGCTCAA AATTACTCCACAGAGATTTTGGTTACGGC TCAGA TGTCTTTGAGTAGATGTTCTGT AGAAATCATTGTTAGAAAA TTCAAGGAA AAAAGTTCTCATTACACTACCTTGAGATC CTA CCAAGTCCTTGAGTTTGGACTTGAG GACAGCTTAAATAATGA AAGTAATTCAGC CATGAAAGCATATTTAAAAAAGTAATGG AACAGGAAATTTCTTCATAGATTAGAAAA ATTATTTCTGAAA AAGTGAAGACATAGCC TATCTTGGACTAGGAAATTTCCATC CAA GAAAGTAAAAATATACAATAAATATTATCA CAAAGAATC ATTCTGTGACCTGGTTGAT GGCCCTGGTAATAAGACTTTGT TATTA AGTTTACTGTGAATTCTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTTGAGACGGA GTCTCGCTCTGTTGCCCAGGCTGG AGTG CAGTGGCGTGATCTCGGCTCACTGCAACC TCCGCCTC CCAGGTTCAAGGGATTCTTC TGTCTCAGCCTCCCGAGTAGCT ACAGGC TACTGGCGTGCACCAACCATGCCTGGGTAA TTTTTGTATTTTTAGTAGTGATGGGGTTT CACCATATTGGCCAGGCTG

10

20

【表 3 1 - 4 1】

	GTCTCGAAGCTCCTGACCTCGTGATCCGTC TGTCTCGGCTCC CAAAGTGCTGAGATT ACAGGCATTAGCCACCATGCATGGCC CC TTACAGTGAAATCTGTTCAATAATCTTGA ACTCCAGTGC TTTCCCTTGGTCTGTCT CATATAATGATCACATTCTGTTATT AAA TAATGTGCTTATGTGCTGATTTATTGTA GGAGGAATTG AACAAATCTATAGCTCAG CATTTTACTCTTTTGTAGAAATCC CTTG ACCTTTTCCAAATCCAGACATCACAAGCT TCTCCATAT ACTCAAAAATTGTGAAATC CACAAGGCAGGGAAGTTGAT AATGAAA AAAAGGAAGTTTGGTCTGTTGGACATCCT CTTCT TTCATCTTTTATGTTCAAAGTAC TTGATGCACAAAGCCTGGA CTCTTTTAT CTCTGTCTATAGACTGATGCTCTAGTCAG TATT CATTGTGACAAAATTGTTTCATTA GAGCAAGTTGGATAGTG TATGGAGATTA TTATAAAATGATTTAACTTGTCTTCTGTCT AA GTAATTTTATAATTGGTATTAATGTT CATTTTTTCCAGTACC AGTTTCAGAAG CTTTCATTTGTGTATGCATGTGTGTGTTA AA TAAGTGATTTAGATACTTGAAAAATA GTAATTTAAATTTAA ACAATTTAAAAAA TGAAATTGTAATTTTATGTGTAAGGTG TCTGATGTGCTTTATTCTGCACTGAAAAC AATATTCATTTAC AGCTCAACAGACACC AAATATATTCTAAAATTACTTTCCTA GA GTTATCAGAAAACAGCACTGTAATAATGA AATCAAACCC ATCTTTCTTTATGATTTA TTCTTAGCTGATACGCATCAGCCT GGT AAGCCTTCTGTCTCTCTGCTTACTTACC AATCACTCCA AATGTCATGTCTTTGGGC AGGCATTTAAATCTTGGGTTTGG GTTT TGTTGGATGGACTGCAGTCTGTGTGAGCC TATATGGGT

30

40

50

【表 3 1 - 4 2】

	GTGTCAAATCCAGTCTTTGGGGTGTGTCATG GAAACTTAGCAT GATAGACTTGATTTTA TCCCCAAGTTGACTTGGTAAATTTTCAAT TA GATTTTCATCAGTCACAACCTGCAATTTTAT CTTGTAATGTGCTGTCTATTGGTCACAAA ATCAGAAAACCTTCTTGTCCATTCA TAA CATTAGCTGTTTTTTCAGGTGGCTAGAGG GACATGTGCTAT TGCTTCATCTGCATGAAT TTGAAAGATTAAATGCATAAAGG AATTT TCTTAGAGTAGAGTAGGCCCTTCACCATCT CTTTAACT GGGAAAGAAGTTTTGGGAGT AACATACTCATCACTCACACC CCCCTCC CCTCAAACACACACACTCACCCATTAGAA TGTAAGGGCCTTGAGGCAGGCCCTTGCTGT TTGCTTTTCTGTTCACTG TCAGCATTT AGAATAGTGATAGTCATATAGATGGATAG TGC TCAATCAATTATTGTCAAATAAAGT AATCTACTTGTTCCTTG ATTTAGACTAG CAAAAGGGGCTGGTACATTGTAGGTACAC A GTAAATATTTGTAGAACAGATGAATGA ACCAACCCACACAGA TTTCTTAGAAGTAG CCTGCTTTTGGTTACTAATTATTTTATA GAACATATAAAAAGAAAATTTAGAATACC TAATTTGTTTCAAC AAAAATGTTATATTGT CTCCCTGATACTTGGTATTCTCTGTG TC AGGCTGAGCACTAAGGTTATACATTTTTT GTTAAGCATGT AATTACTGTTATTTCTC ATGTACTTTATTTTGTGTATTGATTT CA GTAGTTGTAGCTGAGGGTAATCCTTAAGA GCATGCAGAT TTTAAAAATTACATAGAT TGCCTTGCCCAAGCCGTCTGAAAGTCATAC TAGAAAATTTGATAAGAGCCTGCTGTTAA CAACAC

10

20

【表 3 1 - 4 3】

	ATTGAGTTATTTTTATCTTAATGCTAAGT GGAGAATTACTTG AATTTATTTTTTTTGG CTGCATTTAATGTTTTGATACATTCAAT AAATAAGGATAAAATCCACTTACTGAAGGA CAAGAAAAGAT CAATAAGAGATCCTTGA GGTTATTGGGTTCTATGGCATCTAT TAT ATCAAATTCCTTGCCCTTTCACTATACTG AGAAATTTGA CGACTGGGCTAGCAACAA GATACCTACCCACATTAGCTGT GGTAC CTGCTGAAATGTGAACCATGTGAGCAAAGA AAATGA GCCAAAAGAACTCTTTCTGAA GATTCACTGAAGAAAACCT GGAGATACT CTTTCAATTAGTAGACCCACAGAGACAGG TGG AGTGTCGGTTATCCAGAATGCCTGG GACCAGAAGTGTTTTG GATTTCAGATTT TTTCACACTTGGGATCCTCAACATGTGTA T TTGTTGGAATGGCTACTTAATTTAAG GAAAAGTTTAAGGT GGCCTGGAAAATAA GTAGTAGTTGAACCAATCAACAGGAA CC AAAACCTACTTTCAATATATAGTGTACTTA TACTCAAAGA GAGACGGACCATTTTATG GTGGAACCCGTGCTATGGTAGTA TTTTG TGATGTTTTATTTTGTGGCTATTGTTTG CACTGTTTT CTCCTATAACAGGCTCTTCT AAGCCTTAAGAGGATAAATTTTA TATGA GATTCAAACTCTTATTTTGTGAAGAAGG ATGTAAGT CACCAGGCATGGTGGCTCAC ACCTGTAATCCCAGCACTTTG GGAGGCC GTGGCAGGTGGATCATGAGGTAAGGAGCT CGAG ATCAGCCTGGCCAACAATGTGAAA CCCCGTCTCTACTAAAA AAAAAAAAAA AGAATTCAAAAATTAGCCAGGCCTGGTGG CGCATGCCCTGTAGTCCCAGCTACTCGGGA GGCTGAGGCAGG AGAATCATTGAACCTG GGAGGCAGAGTTTGCACTGAGCCGA

30

40

50

【表 3 1 - 4 4】

	GATTGTGCCACTGCACTCCAGCCTGGGTA ACGGAGTGAGAG ACTCTGTCTCCAAAAA AAAAAAAAAAGAAAAAGAAAAAGAA AAT ATAGAAGAAGAACATAAGTCAACCTTTTT CCATGAAA TTATACTGTACTCTAAGGCA AATTCTTGTGCTTGATCTTAG TAGCTT TTTTATGCATTGACTTAAACCTGGAAGAG TTTCTTA TGAATGTTTGATTGACTGTGA GGTGCAATTTGAAACAGCTTCT ACTTTAT AACCTTTTGCAGAACTTTCAAGCTCTATT TAGATA ACAATATATATGGGATTAAAAAT GGAAAAATGTGACATATGTC TAGAGAAAG TTCCTTTTTCTGTGTATGTGCCTTTTGTG ACTT ATACACTCAGTTTCATTCTAGCCA GCATTTGAGCCTAGAAA ATAGGGAAGTT ATGAAAACTCTGTGCTTATAAGAAGGCA A GGCTATGACTGAGTATTAGACACATAA CTCCAGGGCTGGGC GGAAGTAATGAATC AAATAAAAACTTGGGGAACTTGCCATA G GATGTTTTCTGATTAATATGGGTTTCTCT TCTCTGATTAAT GTGGATTTCACTTACT CAACTGTGTAAGTGAATCCACATT A AAATTGGTTATTTATTGCTTAGGACTTAT CTCCCCATAAA GAGACTAAAATTGAGGT TATAAATTATGGGTAGATAGAAAT TCCA GAAATATTTAGGTACCTGTCATATACCTT AAACATAG ATTTTTATCACAATCATTTA GGGGCTTATTTATTGCTTTTACT TTATT TAATGTTTGTCACTGTAGAAGAAAAAAA CTAAATG CTAATATAACATTTAAAAATA TTTTCCCTTCATGACAGCCA CCAATTGATTACTGTCTGAGACTATCT CTATGTGGATGAC

10

20

【表 3 1 - 4 5】

	ACACAGCAGCATTTCATCAGCGCTGTT TCTTTCCGCTACT CAGTTTGCTTTTAGG TTGCCTTAAACAACCTTCCTTGGTGAAA A AATCAACTTCAATATTAACCAAAATTTAA AAGATTCTAT ATAGTAAAGAACTAAT ATTCGAGATTGACCCATTCCATT CTTT CAGAGAAGGTATGAGATACTTGACAGTGG AGCTAGCA GCAGAAACAATAACATGTAT GATGAATCCCATTTGAGTCTTT GCAGTTT ATTTTTATTAAAAATTTTTAATTGAACAA TTTAAG CTTTTTTCTTCATCAGGATTT CACAAGGGTGAATCTGCC AGTTTTAT TCTGTCTTTTTTTTCAAAACAAA
N末端を有さないCD47-206	ATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATA CGTAAAGTGGA AATTTAAAGGAAGAGAT ATTTACACCTTTGATGGAGCTCTA AACAA AGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGT GCAAAAAAT TGAAGTCTCACAATTACTAA AAGGAGATGCCCTCTTTGAAGA TGGATAA GAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAACT ACACT TGTGAAGTAACAGAATTAACCAG AGAAGGTGAAACGATCA TCGAGCTAAAA TATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAA TG AAAATATTCTTATTGTTATTTTCCCA ATTTTTGCTATACTCCT GTTCTGGGGAC AGTTTGGTATTTAAACACTTAAATATAGA T CCGGTGGTATGGATGAGAAAACAATTG CTTTACTTGTGCT GGACTAGTGATCAC TGTCATTGTCAATTGTTGGAGCCATTCTT TTCGTCCCAGGTGAATATTCATTAAGAA TGCTACTGGCCTT GGTTTAATTGTGACT TCTACAGGGATATTAATATTACTTCAC T ACTATGTGTTT

30

40

50

【表 3 1 - 4 6】

復元されたN 末端を有する CD47-2 06	配列番号 134	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAG CTACTATTTAATAAAAACAAAATCTG TAG AATTCACGTTTTGTAAATGACACTGTCGTC ATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGG CACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAA GTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACA CCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCAC TGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAA ATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGA TGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGAT GCTGTCTCACACACAGG AAACACTACTT GTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGT TGTTTCATGGTTT TCTCCAAATGAAAAT ATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTG CTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGT ATTAAAACACTTA AATATAGATCCGGTG GTATGGATGAGAAAACAATTGCTTTA CT TGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTG TCATTGTTGGA GCCATTCTTTTCGTCCC AGGTGAATATTCATTAAAGAATGCT ACT GGCCTTGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATA TTAATTCACTACTATGTG TTT

10

【表 3 1 - 4 7】

TMD3欠失 型	配列番号 135	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAG CTACTATTTAATAAAAACAAAATCTG TAG AATTCACGTTTTGTAAATGACACTGTCGTC ATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGG CACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAA GTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACA CCTTTGATGGAGCTCTAAACAAGTCCACT GTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAAA TTGAAGTCTCACAAATTACTAAAAGGAGAT GCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATG CTGTCTCACACACAGG AAACACTACTTG TGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGT TGTTTCATGGTTT TCTCCAAATGAAAAT ATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTG CTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGT ATTAAAACACTTA AATATAGATCCGGTG GTATGGATGAGAAAACAATTGCTTTA CT TGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTG TCATTGTTGGA GCCATTCTTTTCGTCCC AGGTGAATATTCATTAAAGAATGCT

20

30

【表 3 1 - 4 8】

EC+TMD 3欠失型	配列番号 136	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAG CTACTATTTAATAAAAACAAAATCTG TAG AATTCACGTTTTGTAAATGACACTGTCGTC ATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGG CACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAA GTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACA CCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCAC TGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAA ATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGA TGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGAT GCTGTCTCACACACAGG AAACACTACTT GTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGT TGTTTCATGGTTT TCTCCAAATGAAAAT ATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTG CTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGT ATTAAAACACTTA AATATAGATCCGGTG GTATGGATGAGAAAACAATTGCTTTA CT TGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTG TCATTGTTGGA GCCATTCTTTTC

40

50

【表 3 1 - 4 9】

TMD 2 + E C + TMD 3 欠失型	配列番号 137	ATGTGGCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAG CTACTATTTAATAAAAACAAAATCTG TAG AATTCACGTTTTGTAAATGACACTGTCGTC ATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGG CACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAA GTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACA CCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCAC TGTCCCCACTGACTTTTAGTA GTGCAAAA ATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGA TGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGAT GCTGTCTCACACACAGG AAACACACTT GTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGT TGTTTCATGGTTT TCTCCAAATGAAAAT ATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTG CTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGT ATTAACACTTA AATATAGATCCGGTG GTATGGATGAGAAAACA

10

【表 3 1 - 5 0】

最後のIC欠 失型	配列番号 138	ATGTGGCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAG CTACTATTTAATAAAAACAAAATCTG TAG AATTCACGTTTTGTAAATGACACTGTCGTC ATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGG CACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAA GTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACA CCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCAC TGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAA TTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGAT GCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATG CTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGT GAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT G AAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGT GTTTCATGGTTT TCTCCAAATGAAAATA TTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTG C TATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTA TTAAACACTTA AATATAGATCCGGTGG TATGGATGAGAAAACAATTGCTTTA CTT GTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGT CATTGTTGGA GCCATTCTTTTCGTCCCA GGTGAATATTCATTAAAGAAATGCT ACTG GCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGGG ATATTAATA TTACTTCACTACTATGTGT TTAGTACAGCGATTGGATTAAACC TCCTT CGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGA TAGCCTAT ATCCTCGCTGTGGTTGGACT GAGTCTCTGATTGCGGCGTGT ATACCA ATGCATGGCCCTCTTCTGATTTTCAGGTTT GAGTATC TTAGCTCTAGCACAAATTA GGACTAGTTTATATGTAA

20

30

40

50

【表 3 1 - 5 1】

TMD 5 + 最後の I C 欠失型	配列番号 139	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAG CTACTATTTAATAAAAACAAAATCTG TAG AATTCACGTTTTGTAAATGACACTGTGCGTC ATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGG CACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAA GTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACA CCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCAC TGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAA ATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGA TGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGAT GCTGTCTCACACACAGG AAACACTACTT GTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAAATATCGTGT TGTTTTCATGGTTT TCTCCAAATGAAAAT ATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTTG CTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGT ATTAACAACTTA AATATAGATCCGGTG GTATGGATGAGAAAACAATTGCTTTA CT TGTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTG TCATTGTTGGA GCCATTCTTTTCGTCCC AGGTGAATATTCATTAAAGAATGCT ACT GGCCTTGGTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATA TTACTTCACTACTATGTG TTTAGTACAGCGATTGGATTAACC TCCT TCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTG ATAGCCTAT ATCCTCGCTGTGGTTGGAC TGAGTCTCTGATTGCGGCGTGT ATACC AATGCATGGCTAA

10

【表 3 1 - 5 2】

EC + TMD 5 + 最後の I C 欠失型	配列番号 140	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAG CTACTATTTAATAAAAACAAAATCTG TAG AATTCACGTTTTGTAAATGACACTGTGCGTC ATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGG CACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAA GTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACA CCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCAC TGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAA ATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGA TGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGAT GCTGTCTCACACACAGG AAACACTACTT GTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAAATATCGTGT TGTTTTCATGGTTT TCTCCAAATGAAAAT ATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTTG CTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGT ATTAACAACTTA AATATAGATCCGGTG GTATGGATGAGAAAACAATTGCTTTACTT GTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGT CATTGTTGGA GCCATTCTTTTCGTCCCA GGTGAATATTCATTAAAGAATGCT ACTG GGCCTTGGTTAATTGTGACTTCTACAGG ATATTAATA TTACTTCACTACTATGTGT TTAGTACAGCGATTGGATTAACC TCCTT CGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGA TAGCCTAT ATCCTCGCTGTGGTTGGACT GTAA

20

30

40

50

【表 3 1 - 5 3】

TMD 4 欠失型	配列番号 1 4 1	ATGTGGCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAG CTACTATTTAATAAAAACAAAATCTG TAG AATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTC ATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGG CACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAA GTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACA CCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCAC TGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAA ATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGA TGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGAT GCTGTCTCACACACAGG AAACACTACTT GTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGT TGTTTCATGGTTT TCTCCAAATGAAAAT ATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTG CTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGT ATTAACACTTA AATATAGATCCGGTG GTATGGATGAGAAAACAATTGCTTTA CT TGTTGCTGGAAGTATGATCACTGTCATTG TCATTGTTGGA GCCATTCTTTTCGTCCC AGGTGAATATTCATTAAAGAAATGCT ACT GGCCTTGTTTAAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATA TTAACACTACTATGTG TTTAGTACAGCGATTGGATTAAAC

10

【表 3 1 - 5 4】

DAF/CD 5 5 GPI アンカーを有 するCD 4 7 ECD	配列番号 1 4 2	ATGTGGCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAG CTACTATTTAATAAAAACAAAATCTG TAG AATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTC ATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGG CACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAA GTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACA CCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCAC TGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAA ATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGA TGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGAT GCTGTCTCACACACAGG AAACACTACTT GTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGT TGTTTCATGGTTT TCTCCAAATGAACCA AATAAAGGAAGTGGAACCACTTCAGG TA CTACCCGCTTCTATCTGGGCACACGTGT TTCACGTTGAC AGGTTTGCTTGGGACGC TAGTAACCATGGGCTTGCTGACTTAA

20

30

【表 3 1 - 5 5】

長鎖TRAI LR 3 GP Iアンカーを 有するCD 4 7 ECD	配列番号 1 4 3	ATGTGGCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAG CTACTATTTAATAAAAACAAAATCTG TAG AATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTC ATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGG CACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAA GTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACA CCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCAC TGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAA TTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGAT GCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATG CTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTGT GAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT G AAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGT GTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAGCCAC TGTTGAAACccccagctgctgaagagacaa tgaacaccagccccggggactcctgcccc agctgctgaagagacaaatgaacaccagcc cggggactcctgccccagctgctgaaga gacaaatgaccaccagccccggggactcctg ccccagctgctgaagagacaaatgaccac cagccccggggactcctgccccagctgctg aagagacaaatgateaccagccccggg gac tcctgcccTCTTCTCATTACCTCTCATGCA CCATCGTAGGGATC ATAGTTCTAATTGT GCTTCTGATTGTGTTTGTAA

40

50

【表 3 1 - 5 6】

短鎖TRAI LR3 GP Iアンカーを 有するCD4 7 ECD	配列番号 144	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAG CTACTATTTAATAAAAACAAAATCTG TAG AATTCACGTTTTGTAAATGACACTGTCGTC ATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGG CACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAA GTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACA CCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCAC TGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAA ATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGA TGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGAT GCTGTCTCACACACAGG AAACACTACTT GTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGT TGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAa t g a t c a c c a g c c c g g g g a c t c c t g c c TCTTCT CATTACC TCTCATGCACCATCGTAGGGA TCATAGTTCTAATTGTGCTTC TGATTGT GTTTGTTTAA

10

【表 3 1 - 5 7】

CD8a T MD及び短鎖 ICD (9a a)を有する CD47 E CD	配列番号 145	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAG CTACTATTTAATAAAAACAAAATCTG TAG AATTCACGTTTTGTAAATGACACTGTCGTC ATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGG CACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAA GTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACA CCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCAC TGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAA ATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGA TGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGAT GCTGTCTCACACACAGG AAACACTACTT GTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGT TGTTTCATGGTTT TCTCCAAATGAAATC TACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTG TGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCA CCCTTTACTG CAACCACAGGAACCGAAG ATAA

20

【表 3 1 - 5 8】

CD28 T MD及び短鎖 ICD (9a a)を有する CD47 E CD	配列番号 146	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAG CTACTATTTAATAAAAACAAAATCTG TAG AATTCACGTTTTGTAAATGACACTGTCGTC ATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGG CACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAA GTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACA CCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCAC TGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAA ATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGA TGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGAT GCTGTCTCACACACAGG AAACACTACTT GTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGT TGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAATTTT GGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTG GCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGC CTTTATTAT TTTCTGGGTGAGGAGTAAG AGGAGCAGGCTCCTGCACTAA

30

40

50

【表 3 1 - 5 9】

P D G F R TMD及び短 鎖I C D (9 a a) を有す る C D 4 7 E C D	配列番号 1 4 7	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAG CTACTATTTAATAAAACAAAATCTG TAG AATTCACGTTTTGTAAATGACACTGTGCTC ATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGG CACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAA GTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACA CCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCAC TGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAA ATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGA TGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGAT GCTGTCTCACACACAGG AAACACTACTT GTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGT TGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAgtgg t gatctcagccatcctggccctgggtgggtg ctcaccatcatctcc ctTATCATCCTCA TCATGCTTTGGCAGAAGAAGCCACGTTAC TAA

10

【表 3 1 - 6 0】

P D G F R ヒンジ、TMD、 及び短鎖I C D (9 a a) を 有するCD4 7 I g V、 ヒンジ領域由 来の3アミノ 酸	配列番号 1 4 8	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAG CTACTATTTAATAAAACAAAATCTG TAG AATTCACGTTTTGTAAATGACACTGTGCTC ATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGG CACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAA GTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACA CCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCAC TGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAA ATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGA TGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGAT GCTGTCTCACACACAGG AAACACTACTT GTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAAGCTGTGGG CCAGGACACGC AGGAGGTCATCGTGGTG CCACACTCCTTGCCCTTTAAGGtgggt gggtgatctcagccatcctggccctgggtgg t ggtcaccatcatctccctTATCATCCTC ATC ATGCTTTGGCAGAAGAAGCCACGTT ACTAA

20

【表 3 1 - 6 1】

CD47 I g V、ヒンジ 領域由来の3 アミノ酸、I g G 4 ヒンジ ー C D 2 8 TM	配列番号 1 4 9	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAG CTACTATTTAATAAAACAAAATCTG TAG AATTCACGTTTTGTAAATGACACTGTGCTC ATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGG CACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAA GTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACA CCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCAC TGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAA ATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGA TGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGAT GCTGTCTCACACACAGG AAACACTACTT GTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAAGaattctaa gtacggaccgcccctgccccctt gccct TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGT CCTGGCTTGC TATAGCTTGCTAGTAACA GTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTG AGGA GTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACTAA

30

40

50

【表 3 1 - 6 2】

CD47 I g V、ヒンジ 領域由来の3 アミノ酸、I g G4 ヒンジ ー C D 8 a TM	配列番号 150	ATGTGGCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAG CTACTATTTAATAAAAACAAAATCTG TAG AATTCACGTTTTGTAAATGACACTGTGCTC ATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGG CACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAA GTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACA CCTTTGATGGAGCTCTAAACAAGTCCACT GTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAAA TTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGAT GCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATG CTGTCTCACACACAGG AAACCTACACTTG TGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTG AAACGATCATCGAGCTAAAAGa a t c t a a g t a c g g a c c g c c c t g c c c c c c t t g c c c t A TCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACT TGTGGGGT CCTTCTCCTGTCACTGGTTA TCACCCTTTACTGCAACCACAG GAACCG AAGATAA

10

【表 3 1 - 6 3】

CD47 I g V、ヒンジ 領域由来の3 アミノ酸、C D 28 ヒンジ ー C D 2 8 TM	配列番号 151	ATGTGGCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAG CTACTATTTAATAAAAACAAAATCTG TAG AATTCACGTTTTGTAAATGACACTGTGCTC ATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGG CACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAA GTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACA CCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCAC TGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAAA ATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGA TGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGAT GCTGTCTCACACACAGG AAACCTACACTT GTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAAATTGAAGT TATGTATCCTCC TCCTTACCTAGACAAT GAGAAGAGCAATGGAACCATTTATCC ATG TGAAAGGGAACACCTTTGTCCAAGTCCC CTATTTCCC GGACCTTCTAAGCCCTTTT GGGTGCTGGTGGTGGTGGTGG AGTCCT GGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGG CCTTTAT TATTTTCTGGGTGAGGAGTAA GAGGAGCAGGCTCCTGCACT AA

20

【表 3 1 - 6 4】

CD47 I g V、ヒンジ 領域由来の3 アミノ酸、C D 28 ヒンジ ー C D 8 a TM	配列番号 152	ATGTGGCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAG CTACTATTTAATAAAAACAAAATCTG TAG AATTCACGTTTTGTAAATGACACTGTGCTC ATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGG CACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAA GTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACA CCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCAC TGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAAA ATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGA TGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGAT GCTGTCTCACACACAGG AAACCTACACTT GTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAAATTGAAGT TATGTATCCTCC TCCTTACCTAGACAAT GAGAAGAGCAATGGAACCATTTATCC ATG TGAAAGGGAACACCTTTGTCCAAGTCCC CTATTTCCC GGACCTTCTAAGCCCATCT ACATCTGGGCGCCCTTGGCCGG GACTTG TGGGGTCTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCA CCCTTTA CTGCAACCACAGGAACCGAAGATAA

30

40

50

【表 3 1 - 6 5】

CD47 I g V、ヒンジ 領域由来の3 アミノ酸、C D8a ヒンジ - C D 2 8 TM	配列番号 153	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAG CTACTATTTAATAAAAACAAAATCTG TAG AATTCACGTTTGTAAATGACACTGTCGTC ATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGG CACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAA GTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACA CCTTTGATGGAGCTCTAAACAAGTCCACT GTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAAA TTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGAT GCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGC TGTCTCACACACAGG AAACCTACACTTGT GAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT G AAACGATCATCGAGCTAAAAACACGACG CCAGCGCCGC GACCACCAACACCGGCGC CCACCATCGCGTCGCAGCCCTG TCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCA g c g g c g g g g g g c g c a g TGC ACACGAGGGGG CTGGACTTCGCCTGTGATTTTGGGTGCT G GTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGC TATAGCTTGCTAGTA ACAGTGGCCTTTA TTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAG CAGGCTCCTGCACTAA

10

【表 3 1 - 6 6】

CD47 I g V、ヒンジ 領域由来の3 アミノ酸、C D8a ヒンジ - C D 8 a TM	配列番号 154	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAG CTACTATTTAATAAAAACAAAATCTG TAG AATTCACGTTTGTAAATGACACTGTCGTC ATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGG CACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAA GTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACA CCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCAC TGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAAA ATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGA TGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGAT GCTGTCTCACACACAGG AAACCTACACTT GTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAAACACGAC GCCAGCGCCGC GACCACCAACACCGGCG CCACCATCGCGTCGCAGCCCTGTCCCT GCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCA g c g g c g g g g g g c g c a g TGC ACACGAGGGGGCTGGA CTTCGCCTGTGATATCTACATCTGG GCG CCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCT CCTGTCACTG GTTATCACCCCTTACTGC AACCACAGGAACCGAAGATAA

20

30

40

50

【表 3 1 - 6 7】

WT、C15 G	配列番号 155	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAG CTACTATTTAATAAAAACAAAATCTG TAG AATTCACGTTTGGAAATGACACTGTCTGTC ATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGG CACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAA GTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACA CCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCAC TGTCCCCACTGACTTTTAGTA GTGCAAAA ATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGA TGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGAT GCTGTCTCACACACAGG AAACCTACACTT GTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGT TGTTTCATGGTTT TCTCCAAATGAAAAAT ATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTTG CTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGT ATTAAAACACTTA AATATAGATCCGGTG GTATGGATGAGAAAACAATTGCTTTA CT TGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTG TCATTGTTGGA GCCATTCTTTTCGTCCC AGGTGAATATTCAATTAAGAATGCT ACT GGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATA TTACTTCACTACTATGTG TTTAGTACAGCGATTGGATTAACC TCCT TCGTCAATGCCATATTGGTTATTCAGGTG ATAGCCTAT ATCCTCGCTGTGGTTGGAC TGAGTCTCTGTATTGCGGCGTGT ATACC AATGCATGGCCCTCTTCTGATTTTCAGGTT TGAGTATC TTAGCTCTAGCACAAATTAAT TGGACTAGTTTATATGAAATTTGTGGCTT CCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGG AAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATT CAAAGAATCAAAAGGAA TGATGAATGAT GAATAA

10

20

【表 3 1 - 6 8】

N361、C 15G	配列番号 156	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTGCTGCGGATCAGCTTGGC AGAGACCACTAAGATTTAATAAAAACAAAA TCTGTAGAATTCACGTTTGGAAATGACAC TGTCGTCAATCCATGCTTTGTTACTAATA TGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATAT TTACACCTTTGATGGATGGGCTAACAAAGT CCACTGTCCCACTGACTTTAGTAGTGCA AAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGG AGATGCCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTG ATGCTGTCTCACACACAGGAACTACACT TGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGG TGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTG TTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAAAT ATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTTG TATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTA TTAAAACACTTAATATAGATCCGGTGGT ATGGATGAGAAAACAATTGCTTTACTTTGT TGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCA TTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGT GAATATTCAATTAAGAATGCTACTGGCCT TGGTTTAATTGTGACTTCTACAGGGATAT TAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGT ACAGCGATTGGATTAAACCTCCTTCGTCA TGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGCCT ATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTC TGTATTGCGGCGTGTATACCAATGCATGG CCCTCTTCTGATTTTCAGGTTTGAGTATCT TAGCTCTAGCACAAATTAATTGGACTAGTT TATATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAA GACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAG AGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCA AAAGGAATGATGAATGATGAATAA

30

40

50

【表 3 1 - 6 9】

N 3 6 2 . C	配列番号	ATGTGGCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT
1 5 G	1 5 7	GGGCTCGGCGTGCTGCGGATCAGCTTGGG
		CTCCACCACTAAGATTTAATAAAACAAAA
		TCTGTAGAAATTCACGTTTGGAAATGACAC
		TGTCGTCAATCCATGCTTGTACTAATA
		TGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC
		GTAAGTGGAATTTAAAGGAAGAGATAT
		TTACACCTTTGATGGATACACAAACAAGT
		CCACTGTCCCACTGACTTTAGTAGTGCA
		AAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGG
		AGATGCCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTG
		ATGCTGTCTCACACACAGGAACTACACT
		TGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGG
		TGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTG
		TTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAAAT
		ATTCTTATTTGTTATTTTCCCAATTTTTC
		TATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTA
		TTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGT
		ATGGATGAGAAAACAATTGCTTTACTTGT
		TGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCA
		TTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGT
		GAATATTCATTAAGAATGCTACTGGCCT
		TGGTTTAAATGTGACTTCTACAGGGATAT
		TAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGT
		ACAGCGATTGGATTAACCTCCTTCGTCAAT
		TGCCATATTTGGTTATTCAGGTGATAGCCT
		ATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTC
		TGTATTGCGGCGTGTATACCAATGCATGG
		CCCTCTTCTGATTTTCAGGTTTGAGTATCT
		TAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTT
		T ATATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGA
		AGACTATACAACCT CCTAGGAAAGCTGT
		AGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGA A
		TCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA

10

20

【表 3 1 - 7 0】

N 3 6 3 . C	配列番号	ATGTGGCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT
1 5 G	1 5 8	GGGCTCGGCGTGCTGCGGATCAGCTTGGC
		AGCTACCACTACTATTTAATAAAACAAAA
		TCTGTAGAAATTCACGTTTGGAAATGACAC
		TGTCGTCAATCCATGCTTGTACTAATA
		TGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC
		GTAAGTGGAATTTAAAGGAAGAGATAT
		TTACACCTTTGATGGAGACAAAACAAGT
		CCACTGTCCCACTGACTTTAGTAGTGCA
		AAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGG
		AGATGCCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTG
		ATGCTGTCTCACACACAGGAACTACACT
		TGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGG
		TGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTG
		TTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAAAT
		ATTCTTATTTGTTATTTTCCCAATTTTTC
		TATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTA
		TTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGT
		ATGGATGAGAAAACAATTGCTTTACTTGT
		TGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCA
		TTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGT
		GAATATTCATTAAGAATGCTACTGGCCT
		TGGTTTAAATGTGACTTCTACAGGGATAT
		TAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGT
		ACAGCGATTGGATTAACCTCCTTCGTCAAT
		TGCCATATTTGGTTATTCAGGTGATAGCCT
		ATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTC
		TGTATTGCGGCGTGTATACCAATGCATGG
		CCCTCTTCTGATTTTCAGGTTTGAGTATCT
		TAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTT
		TATATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAA
		GACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAG
		AGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCA
		AAAGGAATGATGAATGATGAATAA

30

40

50

【表 3 1 - 7 1】

N 3 6 4 . C 1 5 G	配列番号 1 5 9	ATGTGGCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTGCTGCGGATCAGCTTGGC AGCCACTACTAGCTTTTAAATAAAACAAAA TCTGTAGAAATTCACGTTTGGAATGACAC TGTCGTCAATCCATGCTTGTACTAATA TGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATAT TTACACCTTTGATGGAGCTATGAACAAGT CCACTGTCCCACTGACTTTAGTAGTGCA AAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGG AGATGCCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTG ATGCTGTCTCACACACAGGAACTACACT TGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGG TGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTG TTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAAAT ATTCTTATTTGTTATTTTCCCAATTTTTC TATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTA TTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGT ATGGATGAGAAAACAATTGCTTTACTTGT TGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCA TTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGT GAATATTCATTAAGAATGCTACTGGCCT TGGTTTAAATGTGACTTCTACAGGGATAT TAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGT ACAGCGATTGGATTAACCTCCTTCGTCAAT TGCCATATTTGGTTATTCAGGTGATAGCCT ATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTC TGTA TTGCGGCGTGTATACCAATGCATG GCCCTCTTCTGATTTTCAG GTTGAGTAT CTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAG TTT ATATGAAATTTGTGGCTTCCAATCA GAAGACTATACAACCT CCTAGGAAAGCT GTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGA ATCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA

10

20

【表 3 1 - 7 2】

N 3 6 6 . C 1 5 G	配列番号 1 6 0	ATGTGGCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTGCTGCGGATCAGCTTGGC AGACACCACTAAAATTTAAATAAAACAAAA TCTGTAGAAATTCACGTTTGGAATGACAC TGTCGTCAATCCATGCTTGTACTAATA TGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATAT TTACACCTTTGATGGAGCTCTAACAAGT CCACTGTCCCACTGACTTTAGTAGTGCA AAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGG AGATGCCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTG ATGCTGTCTCACACACAGGAACTACACT TGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGG TGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTG TTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAAAT ATTCTTATTTGTTATTTTCCCAATTTTTC TATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTA TTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGT ATGGATGAGAAAACAATTGCTTTACTTGT TGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCA TTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGT GAATATTCATTAAGAATGCTACTGGCCT TGGTTTAAATGTGACTTCTACAGGGATAT TAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGT ACAGCGATTGGATTAACCTCCTTCGTCAAT TGCCATATTTGGTTATTCAGGTGATAGCCT ATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTC TGTAATGCGGCGTGTATACCAATGCATGG CCCTCTTCTGATTTTCAGGTTTGAGTATCT TAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTT TATATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAA GACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAG AGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCA AAAGGAATGATGAATGATGAATAA

30

40

50

【表 3 1 - 7 3】

N 3 6 8、C 1 5 G	配列番号 1 6 1	ATGTGGCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTGCTGCGGATCAGCTTGGC AGTTCCCACTAAGATTTAATAAAACAAAA TCTGTAGAATTACAGTTTGAAATGACAC TGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTAATA TGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATAT TTACACCTTTGATGGAGCTGAGAACAAGT CCACTGTCCCACTGACTTTAGTAGTGCA AAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGG AGATGCCCTTTTGAAGATGGATAAGAGTG ATGCTGTCTCACACACAGGAACTACACT TGTGAAGTAACAGAAATTAACCAGAGAAGG TGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTG TTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAAT ATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTCG TATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTA TTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGT ATGGATGAGAAAACAATTGCTTTACTTGT TGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCA TTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCAGGT GAATATTCAATTAAGAATGCTACTGGCCT TGGTTTTAATTGTGACTTCTACAGGGATAT TAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGT ACAGCGA TTGGATTAACTCCTTCGTCA TTGCCATATTGGTTATTCAGG TGATAGC CTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTC TCTGTA TTGCGGCGTGATACCAATGCA TGGCCCTCTCTGATTTCAG GTTTGAGT ATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACT AGTTT ATATGAAATTTGTGGCTTCCAAT CAGAAGACTATACAACCT CCTAGGAAAG CTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAA GA ATCAAAAGGAATGATGAATGATGAAT AA

10

20

【表 3 1 - 7 4】

N 3 6 9、C 1 5 G	配列番号 1 6 2	ATGTGGCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTGCTGCGGATCAGCTTGGC AGATTCCCACTAAACTTTAATAAAACAAAA TCTGTAGAATTACAGTTTGAAATGACAC TGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTAATA TGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATAT TTACACCTTTGATGGAGCTTGGACAAGT CCACTGTCCCACTGACTTTAGTAGTGCA AAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGG AGATGCCCTTTTGAAGATGGATAAGAGTG ATGCTGTCTCACACACAGGAACTACACT TGTGAAGTAACAGAAATTAACCAGAGAAGG TGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTG TTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAAT ATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTCG TATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTA TTAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGT ATGGATGAGAAAACAATTGCTTTACTTGT TGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCA TTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCAGGT GAATATTCAATTAAGAATGCTACTGGCCT TGGTTTTAATTGTGACTTCTACAGGGATAT TAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGT ACAGCGATTGGATTAACTCCTTCGTCA TGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGCCT ATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTC TGTAATTGCGGCGTGATACCAATGCATGG CCCTCTTCTGATTTTCAGGTTTGAGTATCT TAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTT TATATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAA GACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAG AGGAACCCCTTAATGCATTCAAAAGATCA AAAGGAATGATGAATGATGAATAA

30

40

50

【表 3 1 - 7 5】

N 3 6 1 0、 C 1 5 G	配列番号 1 6 3	ATGTGGCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTGCTGCGGATCAGCTTGGC AGCCACTACTACTATTTAATAAAACAAAA TCTGTAGAATTACAGTTTGGAAATGACAC TGTGCTCATTCATGCTTTGTTACTAATA TGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATAT TTACACCTTTGATGGAGCTTCTAACAAGT CCACTGTCCCACTGACTTTAGTAGTGCA AAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGG AGATGCCCTTTTGAAGATGGATAAGAGTG ATGCTGTCTCACACACAGGAACTACACT TGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGG TGAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTG TTGTTTCATGGTTTCTCCAAATGAAAAT ATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTCG TATACTCTGTTCTGCGGACAGTTTGGTA TTAACACACTTAAATATAGATCCGGTGGT ATGGATGAGAAAACAATTGCTTTACTTGT TGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCA TTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCAGGT GAATATTCTATTA AAGAATGCTACTGGCC TTGGTTTAAATTGTGACTTCTACAGG GAT ATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTA GTACAGCGAT TGGATTAACTCTCTTCGT CATTGCCATATTGGTTATTACGGT GATA GCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAG TCTCTGTAT TGCGGCGTGTATACCAATG CATGGCCCTCTTCTGATTTCAGG TTTGA GTATCTTAGCTCTAGCACAAATTACTTGG CTAGTTTA TATGAAATTTGTGGCTTCCA ATCAGAAGACTATACAACCTC CTAGGAA AGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCA AAGAA TCAAAAGGAATGATGAATGATGA ATAA

10

20

【表 3 1 - 7 6】

N 3 6 1 2、 C 1 5 G	配列番号 1 6 4	ATGTGGCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGG CAGCCACCCTACTATTTAATAAAA CAA AATCTGTAGAATTACAGTTTGGAAATGAC ACTGTGCTC ATTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCACAAAACACTAC TGAAGT ATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAG ATATTT ACACCTTTGATGGACAGGCTAA CAAGTCCACTGTCCCCACT GACTTTAGT AGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACT AAA AGGAGATGCCCTCTTTGAAGATGGAT AAGAGTGATGCTGTCT CACACACAGGAA ACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC AGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAA ATATCGTGTGT TTCATGGTTTCTCCA AATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTC C CAATTTTGTCTATACTCCTGTTCTGGGGA CAGTTTGGTATT AAAACACTTAAATATA GATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAC AAT TGCTTTACTTGTGCTGGACTAGTGATCA CTGTCAATTGT CATTGTTGGAGCCATTCT TTTCTGTCAGGTGAATATTCAAT AAAG AATGCTACTGGCCTTGGTTTAAATTGTGAC TTCTACAG GGATATTAATATTACTTCAC TACTATGTGTTTAGTACAGCGA TTGGAT TAACCTCGTTCGTCAATTGCCATATTGGTT ATTCAGG TGATAGCCTATATCCTCGCTG TGGTTGGACTGAGTCTCTGTA TTGCGGC GTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGA TTTTCAAG GTTTGAGTATCTTAGCTCTAGC ACAATTACTTGGACTAGTTT ATATGAAA TTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACA ACCT CCTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCC CTTAATGCATTCAAAGA ATCAAAAGGAA TGATGAATGATGAATAA

30

40

50

【表 3 1 - 7 7】

N3614、 C15G	配列番号 165	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGG CAGCCACTACTAAAAATTTAATAAAA CAA AATCTGTAGAAATTCACGTTTGGAAATGAC ACTGTEGTC ATTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCCACAAAACACTAC TGAAGT ATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAG ATATTT ACACCTTTGATGGAGCTGCTAA CAAGTCCACTGTCCCCACT GACTTTAGT AGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACT AAA AGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGAT AAGAGTGATGCTGTCT CACACACAGGAA ACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC AGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAA ATATCGTGTGTG TTCATGGTTTTCTCCA AATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTC C CAATTTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGA CAGTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAG ATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAAC AATT GCTTTACTTGTGCTGGACTAGTGATCAC TGTCATTGT CATTGTTGGAGCCATTCTT TTTCGTCGCCAGGTGAATATTCAAT AAAGA ATGCTACTGGCCTTGGTTTAAATTGTGACT TCTACAG GGATATTAATATTACTTCACT ACTATGTGTTTAGTACAGCGA TTGGATT AACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTA TTCAGG TGATAGCCTATATCCTCGCTGT GGTTGGACTGAGTCTCTGTA TTGCGGCG TGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGAT TTCAG GTTTGAGTATCTTAGCTCTAGCA CAATTACTTGGACTAGTTT ATATGAAAT TTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAA CCT CCTAGGAAAAGCTGTAGAGGAACCC TTAATGCATTCAAAGA ATCAAAGGGAAT GATGAATGATGAATAA

10

20

【表 3 1 - 7 8】

N3617、 C15G	配列番号 166	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGG CAGAGACCACTAAGATTTAATAAAA CAA AATCTGTAGAAATTCACGTTTGGAAATGAC ACTGTEGTC ATTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCCACAAAACACTAC TGAAGT ATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAG ATATTT ACACCTTTGATGGAGCTCTAAA CAAGTCCACTGTCCCCACT GACTTTAGT AGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACT AAA AGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGAT AAGAGTGATGCTGTCT CACACACAGGAA ACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC AGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAA ATATCGTGTGTG TTCATGGTTTTCTCCA AATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTC C CAATTTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGA CAGTTTGGTATT AAAACACTTAAATATA GATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAAC AAT TGCTTTACTTGTGCTGGACTAGTGATCA CTGTCATTGT CATTGTTGGAGCCATTCT TTTCGTCGCCAGGTGAATATTCAAT AAAG AATGCTACTGGCCTTGGTTTAAATTGTGAC TCTACAG GGATATTAATATTACTTCACT TACTATGTGTTTAGTACAGCGA TTGGAT TAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTT ATTCAGG TGATAGCCTATATCCTCGCTG TGGTTGGACTGAGTCTCTGTA TTGCGGCG GTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGA TTTCAG GTTTGAGTATCTTAGCTCTAGC ACAATTACTTGGACTAGTTT ATATGAAA TTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACA ACCT CCTAGGAAAAGCTGTAGAGGAACCC CTTAATGCATTCAAAGA ATCAAAGGGA TGATGAATGATGAATAA

30

40

50

【表 3 1 - 7 9】

N3618、 C15G	配列番号 167	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGG CAGCTACCACTACTATTTAATAAAA CAA AATCTGTAGAAATTCACGTTTGGAAATGAC ACTGTEGTC ATTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCCACAAAACACTAC TGAAGT ATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAG ATATTT ACACCTTTGATGGAGCTATTAA CAAGTCCACTGTCCCCACT GACTTTAGT AGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACT AAA AGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGAT AAGAGTGATGCTGTCT CACACACAGGAA ACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC AGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAA ATATCGTGTGTTTTCATGGTTTTCTGCAA ATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTC CC AATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGAC AGTTTGGTATT AAAACACTTAAATATAG ATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAC AATT GCTTTACTTGTGCTGGACTAGTGATCAC TGTCATTGT CATTGTTGGAGCCATTCTT TTTCGTCGCCAGGTGAATATTCAAT AAAGA ATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACT TCTACAG GGATATTAATATTACTTCACT ACTATGTGTTTAGTACAGCGA TTGGATT AACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTA TTCAGG TGATAGCCTATATCCTCGCTGT GGTTGGACTGAGTCTCTGTA TTGCGGCG TGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGAT TTCAG GTTTGAGTATCTTAGCTCTAGCA CAATTACTTGGACTAGTTT ATATGAAAT TTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAA CCT CCTAGGAAAAGCTGTAGAGGAACCC TTAATGCATTCAAAGA ATCAAAGGAAT GATGAATGATGAATAA

10

20

【表 3 1 - 8 0】

N3621、 C15G	配列番号 168	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGG CAGATTCCACTAGAGTTTAATAAAA CAA AATCTGTAGAAATTCACGTTTGGAAATGAC ACTGTEGTC ATTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCCACAAAACACTAC TGAAGT ATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAG ATATTT ACACCTTTGATGGAGCTCTAAA CAAGTCCACTGTCCCCACT GACTTTAGT AGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACT AAA AGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGAT AAGAGTGATGCTGTCT CACACACAGGAA ACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC AGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAA ATATCGTGTGTTTTCATGGTTTTCTCCA AATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTC C CAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGA CAGTTTGGTATT AAAACACTTAAATATA GATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAC AAT TGCTTTACTTGTGCTGGACTAGTGATCA CTGTCAATTGT CATTGTTGGAGCCATTCT TTTCGTCGCCAGGTGAATATTCAAT AAAG AATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGAC TCTACAG GGATATTAATATTACTTCACT TACTATGTGTTTAGTACAGCGA TTGGAT TAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTT ATTCAGG TGATAGCCTATATCCTCGCTG TGGTTGGACTGAGTCTCTGTA TTGCGGCG GTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGA TTTCAG GTTTGAGTATCTTAGCTCTAGC ACAATTACTTGGACTAGTTT ATATGAAA TTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACA ACCT CCTAGGAAAAGCTGTAGAGGAACCC CTTAATGCATTCAAAGA ATCAAAGGAAT TGATGAATGATGAATAA

30

40

50

【表 3 1 - 8 1】

N 3 6 2 3、 C15G	配列番号 169	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGG CAGATGCCACTAGTTTTTAATAAAA CAA AATCTGTAGAAATTCACGTTTGGAAATGAC ACTGTEGTC ATTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCCACAAAACACTAC TGAAGT ATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAG ATATTT ACACCTTTGATGGAGTTACAAA CAAGTCCACTGTCCCCACT GACTTTAGT AGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACT AAA AGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGAT AAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAA CTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC AGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAA ATATCGTGTGTG TTCATGGTTTTCTCCA AATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTC C CAATTTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGA CAGTTTGGTATT AAAACACTTAAATATA GATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAC AAT TGCTTTACTTGTGCTGGACTAGTGATCA CTGTCATTGT CATTGTTGGAGCCATTCT TTTCGTCCCGAGGTGAATATTCAATT AAAG AATGCTACTGGCCTTGTTTTAATTGTGAC TTCTACAG GGATATTAATATTACTTCAC TACTATGTGTTTAGTACAGCGA TTGGAT TAACCTCGTTGCTCATTGCCATATTGGTT ATTCAGG TGATAGCCTATATCCTCGCTG TGGTTGGACTGAGTCTCTGTA TTGCGGC GTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGA TTTCAG GTTTGAGTATCTTAGCTCTAGC ACAATTACTTGGACTAGTTT ATATGAAA TTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACA ACCT CCTAGGAAAAGCTGTAGAGGAACCC CTTAATGCATTCAAAGA ATCAAAGGAA TGATGAATGATGAATAA

10

20

【表 3 1 - 8 2】

N 3 6 2 4、 C15G	配列番号 170	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGG CAGATTCCACTAAGATTTAATAAAA CAA AATCTGTAGAAATTCACGTTTGGAAATGAC ACTGTEGTC ATTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCCACAAAACACTAC TGAAGT ATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAG ATATTT ACACCTTTGATGGACAGGTTAA CAAGTCCACTGTCCCCACT GACTTTAGT AGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACT AAA AGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGAT AAGAGTGATGCTGTCT CACACACAGGAA ACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC AGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAA ATATCGTGTGTG TTCATGGTTTTCTCCA AATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTC C CAATTTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGA CAGTTTGGTATT AAAACACTTAAATATA GATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAC AAT TGCTTTACTTGTGCTGGACTAGTGATCA CTGTCATTGT CATTGTTGGAGCCATTCT TTTCGTCCCGAGGTGAATATTCAATT AAAG AATGCTACTGGCCTTGTTTTAATTGTGAC TTCTACAG GGATATTAATATTACTTCAC TACTATGTGTTTAGTACAGCGA TTGGAT TAACCTCGTTGCTCATTGCCATATTGGTT ATTCAGG TGATAGCCTATATCCTCGCTG TGGTTGGACTGAGTCTCTGTA TTGCGGC GTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGA TTTCAG GTTTGAGTATCTTAGCTCTAGC ACAATTACTTGGACTAGTTT ATATGAAA TTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACA ACCT CCTAGGAAAAGCTGTAGAGGAACCC CTTAATGCATTCAAAGA ATCAAAGGAA TGATGAATGATGAATAA

30

40

50

【表 3 1 - 8 3】

h C D 4 7 N 3 6 1 変異型	配列番号 171	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGG CAGAGACCACTAAGATTTAATAAAA CAA AATCTGTAGAAATTCACGTTTTGTAATGAC ACTGTEGTCA TTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCCACAAAACACTACT GAAGT ATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAG ATATTTA CACCTTTGATGGATGGGCTAA CAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTA AAA GGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATA AGAGTGATGCTGTCTC ACACACAGGAAA CTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCA GAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAA TATCGTGTTGTT TCATGGTTTTCTCCAA ATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCC C AATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGAC AGTTTGGTATTA AAACACTTAAATATAG ATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAACA ATT GCTTTACTTTGTTGCTGGACTAGTGATCAC TGTCAATTGTC ATTGTTGGAGCCATTCTT TTCGTCCCAGGTGAATATTCATTA AAGA ATGCTACTGGCCTTGGTTTAAATTGTGACT TCTACAGG GATATTAATATTACTTCACT ACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TGGATT AACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTA TTCAGGT GATAGCCTATATCCTCGCTGT GGTGGGACTGAGTCTCTGTAT TGGGGCG TGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGAT TTCAGG TTTGAGTATCTTAGCTCTAGCA CAATTACTTGGACTAGTTTA TATGAAAT TTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAA CCTC CTAGGAAAAGCTGTAGAGGAACCC TTAATGCATTCAAAGAA TCAAAAGGAAT GATGAATGATGAATAA

10

20

【表 3 1 - 8 4】

h C D 4 7 N 3 6 2 変異型	配列番号 172	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGG GCTCCACCACTAAGATTTAATAAAA CAA AATCTGTAGAAATTCACGTTTTGTAATGAC ACTGTEGTCA TTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCCACAAAACACTACT GAAGT ATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAG ATATTTA CACCTTTGATGGATACACAAA CAAGTCCACTGTCCCCACTG ACTTTAGT AGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACT AAAA GGAGATGCCTCTTTGAAGATGGAT AAGAGTGATGCTGTCTC ACACACAGGAA ACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC A GAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAA AATATCGTGTTGTT TCATGGTTTTCTCC AAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCC CAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGA CAGTTTGGTATTA AAACACTTAAATATA GATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAACA AT TGCTTTACTTTGTTGCTGGACTAGTGATCA CTGTCATTGTC ATTGTTGGAGCCATTCT TTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTA AAG AATGCTACTGGCCTTGGTTTAAATTGTGAC TTCTACAGG GATATTAATATTACTTCACT TACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TGGAT TAACCTCGTTCTGTCATTGCCATATTGGTT ATTCAGGT GATAGCCTATATCCTCGCTG TGGTTGGACTGAGTCTCTGTAT TGGGGC GTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGA TTTCAGG TTTGAGTATCTTAGCTCTAGC ACAATTACTTGGACTAGTTTA TATGAAA TTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACA ACCTC CTAGGAAAAGCTGTAGAGGAACCC CTTAATGCATTCAAAGAA TCAAAAGGAA TGATGAATGATGAATAA

30

40

50

【表 3 1 - 8 5】

h C D 4 7 N 3 6 3 変異型	配列番号 1 7 3	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGG CAGCTACCACTACTATTTAATAAAA CAA AATCTGTAGAAATTCACGTTTTGTAATGAC ACTGTEGTCA TTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCCACAAAACACTACTGAAGTA TACGTAAAGTGGAATTTAAAGGAAGAGA TATTTA CACCTTTGATGGAGACAAAAC AAGTCCACTGTCCCCACTG ACTTTAGTA GTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTA AAA GGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATA AGAGTGATGCTGTCTC ACACACAGGAAA CTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCA GAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAA TATCGTGTTGTT TCATGGTTTTCTCCAA ATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCC C AATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGAC AGTTTGGTATTA AAACACTTAAATATAG ATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAACA ATT GCTTTACTTTGTTGCTGGACTAGTGATCAC TGTCAATTGTC ATTGTTGGAGCCATTCTT TTCGTCCCAGGTGAATATTCATTA AAGA ATGCTACTGGCCTTGTTTTAATTGTGACT TCTACAGG GATATTAATATTACTTCACT ACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TGGATT AACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTA TTCAGGT GATAGCCTATATCCTCGCTGT GGTGGGACTGAGTCTCTGTAT TGCGGCG TGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGAT TTCAGG TTTGAGTATCTTAGCTCTAGCA CAATTACTTGGACTAGTTTA TATGAAAT TTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAA CCTC CTAGGAAAAGCTGTAGAGGAACCC TTAATGCATTCAAAGAA TCAAAAGGAAT GATGAATGATGAATAA

10

20

【表 3 1 - 8 6】

h C D 4 7 N 3 6 4 変異型	配列番号 1 7 4	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGG CAGCCACTACTAGCTTTTAATAAAA CAA AATCTGTAGAAATTCACGTTTTGTAATGAC ACTGTEGTCA TTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCCACAAAACACTACT GAAGT ATACGTAAAGTGGAATTTAAAGGAAGAG ATATTTA CACCTTTGATGGAGCTATGAA CAAGTCCACTGTCCCCACTG ACTTTAGT AGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACT AAAA GGAGATGCCTCTTTGAAGATGGAT AAGAGTGATGCTGTCTC ACACACAGGAA ACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC A GAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAA AATATCGTGTTGTT TCATGGTTTTCTCC AAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCC CAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGA CAGTTTGGTATTA AAACACTTAAATATA GATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAACA AT TGCTTTACTTTGTTGCTGGACTAGTGATCA CTGTCATTGTC ATTGTTGGAGCCATTCT TTCGTCCCAGGTGAATATTCATTA AAG AATGCTACTGGCCTTGTTTTAATTGTGAC TTCTACAGG GATATTAATATTACTTCACT TACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TGGAT TAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTT ATTCAGGT GATAGCCTATATCCTCGCTG TGGTTGGACTGAGTCTCTGTAT TGCGGC GTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGA TTTCAGG TTTGAGTATCTTAGCTCTAGC ACAATTACTTGGACTAGTTTA TATGAAA TTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACA ACCTC CTAGGAAAAGCTGTAGAGGAACCC CTTAATGCATTCAAAGAA TCAAAAGGAA TGATGAATGATGAATAA

30

40

50

【表 3 1 - 8 7】

h C D 4 7 N 3 6 8 変異型	配列番号 1 7 5	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGG CAGACACCACTAAAAATTTAATAAAA CAA AATCTGTAGAAATTCACGTTTTGTAAATGAC ACTGTEGTCA TTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCCACAAAACACTACT GAAGT ATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAG ATATTTA CACCTTTGATGGAGCTCTAAA CAAGTCCACTGTCCCCACTG ACTTTAGT AGTGCAAAAAATTGAAGTCTCACAATTACT AAAA GGAGATGCCTCTTTGAAGATGGAT AAGAGTGTGCTGTCTC ACACACAGGAA ACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC A GAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAA AATATCGTGTGTGTT TCATGGTTTTCTCC AAATGAAAAATATTCCTTATTGTTATTTTCC CAATTTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGA CAGTTTGGTATTA AAACACTTAAATATA GATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACA AT TGCTTTACTTGTGCTGGACTAGTGATCA CTGTCAATTGTC ATTGTTGGAGCCATTCT TTTCGTCCCAAGGTGAATATTCATTA AAG AATGCTACTGGCCTTGTTTTAATTGTGAC TTCTACAGG GATATTAATATTACTTCAC TACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TGGAT TAACCTCCFTCGTCAATTGCCATATTGGTT ATTCAGGT GATAGCCTATATCCTCGCTG TGGTTGGACTGAGTCTCTGTAT TGCGGC GTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGA TTTCAGG TTTGAGTATCTTAGCTCTAGC ACAATTACTTGGACTAGTTTA TATGAAA TTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACA ACCTC CTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCC CTTAATGCATTCAAAGAA TCAAAAGGAA TGATGAATGATGAATAA

10

20

【表 3 1 - 8 8】

h C D 4 7 N 3 6 8 変異型	配列番号 1 7 6	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGG CAGTTCCCACTAAGATTTAATAAAA CAA AATCTGTAGAAATTCACGTTTTGTAAATGAC ACTGTEGTCA TTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCCACAAAACACTACT GAAGT ATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAG ATATTTA CACCTTTGATGGAGCTGAGAA CAAGTCCACTGTCCCCACTG ACTTTAGT AGTGCAAAAAATTGAAGTCTCACAATTACT AAAA GGAGATGCCTCTTTGAAGATGGAT AAGAGTGTGCTGTCTC ACACACAGGAA ACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC A GAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAA AATATCGTGTGTGTT TCATGGTTTTCTCC AAATGAAAAATATTCCTTATTGTTATTTTCC CAATTTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGA CAGTTTGGTATTA AAACACTTAAATATA GATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACA AT TGCTTTACTTGTGCTGGACTAGTGATCA CTGTCAATTGTC ATTGTTGGAGCCATTCT TTTCGTCCCAAGGTGAATATTCATTA AAG AATGCTACTGGCCTTGTTTTAATTGTGAC TTCTACAGG GATATTAATATTACTTCAC TACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TGGAT TAACCTCCFTCGTCAATTGCCATATTGGTT ATTCAGGT GATAGCCTATATCCTCGCTG TGGTTGGACTGAGTCTCTGTAT TGCGGC GTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGA TTTCAGG TTTGAGTATCTTAGCTCTAGC ACAATTACTTGGACTAGTTTA TATGAAA TTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACA ACCTCCTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCC TTAATGCATTCAAAGAA TCAAAAGGAAT GATGAATGATGAATAA

30

40

50

【表 3 1 - 8 9】

h C D 4.7 N 3 6 9 変異 型	配列番号 177	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGG CAGATTCCACTAAACTTTAATAAAA CAA AATCTGTAGAAATTCACGTTTTGTAATGAC ACTGTEGTCA TTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCCACAAAACACTACT GAAGT ATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAG ATATTTA CACCTTTGATGGAGCTTGGAA CAAGTCCACTGTCCCCACTG ACTTTAGT AGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACT AAAA GGAGATGCCTCTTTGAAGATGGAT AAGAGTGATGCTGTCTC ACACACAGGAA ACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC A GAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAA AATATCGTGTTGTT TCATGGTTTTCTCC AAATGAAAATATTCCTTATTGTTATTTTCC CAATTTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGA CAGTTTGGTATTA AAACACTTAAATATA GATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACA AT TGCTTTACTTGTGCTGGACTAGTGATCA CTGTCATTGTC ATTGTTGGAGCCATTCT TTTCGTCCCGAGGTGAATATTCATTA AAG AATGCTACTGGCCTTGTTTTAATTGTGAC TTCTACAGG GATATTAATATTACTTCAC TACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TGGAT TAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTT ATTCAGGT GATAGCCTATATCCTCGCTG TGGTTGGACTGAGTCTCTGTAT TCGGGC GTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGA TTTCAGG TTGAGTATCTTAGCTCTAGC ACAATTACTTGGACTAGTTTA TATGAAA TTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACA ACCTC CTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCC CTTAATGCATTCAAAGAATCAAAGGAAT GATGAATGATGAATAA

10

20

【表 3 1 - 9 0】

h C D 4.7 N 3 6 1 0 変異 型	配列番号 178	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGG CAGCCACTACTACTATTTAATAAAA CAA AATCTGTAGAAATTCACGTTTTGTAATGAC ACTGTEGTCA TTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCCACAAAACACTACT GAAGT ATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAG ATATTTA CACCTTTGATGGAGCTTCTAA CAAGTCCACTGTCCCCACTGA CTTTAGT AGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACT AAAAG GAGATGCCTCTTTGAAGATGGAT AAGAGTGATGCTGTCTCA CACACAGGAA ACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC AG AGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAA AATATCGTGTTGTTT CATGGTTTTCTCC AAATGAAAATATTCCTTATTGTTATTTTCC CAATTTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGA CAGTTTGGTATTA AAACACTTAAATATA GATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACA AT TGCTTTACTTGTGCTGGACTAGTGATCA CTGTCATTGTC ATTGTTGGAGCCATTCT TTTCGTCCCGAGGTGAATATTCATTA AAG AATGCTACTGGCCTTGTTTTAATTGTGAC TTCTACAGG GATATTAATATTACTTCAC TACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TGGAT TAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTT ATTCAGGT GATAGCCTATATCCTCGCTG TGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCG TGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGAT TTCAGGTTTGAGTATCTTAGCTCTAGCAC AATTACTTGGACTAGTTTA TATGAAATT TGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAAC CTC CTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCT TAATGCATTCAAAGAA TCAAAGGAATG ATGAATGATGAATAA

30

40

50

【表 3 1 - 9 1】

h C D 4 7 N 3 6 1 2 変異型	配列番号 179	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGG CAGCCACCACTACTATTTAATAAAA CAA AATCTGTAGAAATTCACGTTTTGTAATGAC ACTGTEGTCA TTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCCACAAAACACTACT GAAGT ATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAG ATATTTA CACCTTTGATGGACAGGCTAA CAAGTCCACTGTCCCCACTG ACTTTAGT AGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACT AAAA GGAGATGCCTCTTTGAAGATGGAT AAGAGTGATGCTGTCTC ACACACAGGAA ACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC A GAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAA AATATCGTGTTGTT TCATGGTTTTCTCC AAATGAAAATATTCCTTATTGTTATTTTCC CAATTTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGA CAGTTTGGTATTA AAACACTTAAATATA GATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACA AT TGCTTTACTTGTGCTGGACTAGTGATCA CTGTCATTGTC ATTGTTGGAGCCATTCT TTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTA AAG AATGCTACTGGCCTTGTTTTAATTGTGAC TTCTACAGG GATATTAATATTACTTCAC TACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TGGAT TAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTT ATTCAGGT GATAGCCTATATCCTCGCTG TGGTTGGACTGAGTCTCTGTAT TCGGGC GTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGA TTTCAGG TTGAGTATCTTAGCTCTAGC ACAATTACTTGGACTAGTTTA TATGAAA TTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACA ACCTC CTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCC CTTAATGCATTCAAAGAATCAAAGGAAT GATGAATGATGAATAA

10

20

【表 3 1 - 9 2】

h C D 4 7 N 3 6 1 4 変異型	配列番号 180	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGG CAGCCACTACTAAAAATTTAATAAAA CAA AATCTGTAGAAATTCACGTTTTGTAATGAC ACTGTEGTCA TTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCCACAAAACACTACT GAAGT ATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAG ATATTTA CACCTTTGATGGAGCTGCTAA CAAGTCCACTGTCCCCACTG ACTTTAGT AGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACT AAAA GGAGATGCCTCTTTGAAGATGGAT AAGAGTGATGCTGTCTC ACACACAGGAA ACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC A GAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAA AATATCGTGTTGTT TCATGGTTTTCTCC AAATGAAAATATTCCTTATTGTTATTTTCC CAATTTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGA CAGTTTGGTATTA AAACACTTAAATATA GATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACA AT TGCTTTACTTGTGCTGGACTAGTGATCA CTGTCATTGTC ATTGTTGGAGCCATTCT TTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTA AAG AATGCTACTGGCCTTGTTTTAATTGTGAC TTCTACAGG GATATTAATATTACTTCAC TACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TGGAT TAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTT ATTCAGGTGATAGCCTATATCCTCGCTGT GGTGGACTGAGTCTCTGTAT TCGGGCG TGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGAT TTCAGG TTGAGTATCTTAGCTCTAGCA CAATTACTTGGACTAGTTTA TATGAAAT TTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAA CCTC CTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCC TTAATGCATTCAAAGAA TCAAAGGAAT GATGAATGATGAATAA

30

40

50

【表 3 1 - 9 3】

h C D 4 7 N 3 6 1 7 変異型	配列番号 181	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGG CAGAGACCACTAAGATTTAATAAAA CAA AATCTGTAGAAATTCACGTTTTGTAATGAC ACTGTEGTCA TTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCCACAAAACACTACT GAAGT ATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAG ATATTTA CACCTTTGATGGAGCTCTAAA CAAGTCCACTGTCCCCACTG ACTTTAGT AGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACT AAAA GGAGATGCCTCTTTGAAGATGGAT AAGAGTGATGCTGTCTC ACACACAGGAA ACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC A GAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAA AATATCGTGTTGTT TCATGGTTTTCTCC AAATGAAAATATTCCTTATTGTTATTTTCC CAATTTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGA CAGTTTGGTATTA AAACACTTAAATATA GATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACA AT TGCTTTACTTGTGCTGGACTAGTGATCA CTGTCATTGTC ATTGTTGGAGCCATTCT TTTCGTCCCGAGGTGAATATTCATTA AAG AATGCTACTGGCCTTGTTTTAATTGTGAC TTCTACAGG GATATTAATATTACTTCAC TACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TGGAT TAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTT ATTCAGGT GATAGCCTATATCCTCGCTG TGGTTGGACTGAGTCTCTGTAT TCGGGC GTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGA TTTCAGG TTGAGTATCTTAGCTCTAGC ACAATTACTTGGACTAGTTTA TATGAAA TTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACA ACCTC CTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCC CTTAATGCATTCAAAGAATCAAAGGAAT GATGAATGATGAATAA

10

20

【表 3 1 - 9 4】

h C D 4 7 N 3 6 1 8 変異型	配列番号 182	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGG CAGATTCCACTAGAGTTTAATAAAA CAA AATCTGTAGAAATTCACGTTTTGTAATGAC ACTGTEGTCA TTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCCACAAAACACTACT GAAGT ATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAG ATATTTA CACCTTTGATGGAGCTCTAAA CAAGTCCACTGTCCCCACTG ACTTTAGT AGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACT AAAA GGAGATGCCTCTTTGAAGATGGAT AAGAGTGATGCTGTCTC ACACACAGGAA ACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC A GAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAA AATATCGTGTTGTT TCATGGTTTTCTCC AAATGAAAATATTCCTTATTGTTATTTTCC CAATTTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGA CAGTTTGGTATTA AAACACTTAAATATA GATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACA AT TGCTTTACTTGTGCTGGACTAGTGATCA CTGTCATTGTC ATTGTTGGAGCCATTCT TTTCGTCCCGAGGTGAATATTCATTA AAG AATGCTACTGGCCTTGTTTTAATTGTGAC TTCTACAGGGATATTAATATTACTTCAC ACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TGGATT AACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTA TTCAGGT GATAGCCTATATCCTCGCTGT GGTGGACTGAGTCTCTGTAT TCGGGCG TGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGAT TTCAGG TTGAGTATCTTAGCTCTAGCA CAATTACTTGGACTAGTTTA TATGAAAT TTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAA CCTC CTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCC TTAATGCATTCAAAGAA TCAAAGGAAT GATGAATGATGAATAA

30

40

50

【表 3 1 - 9 5】

h C D 4 7 N 3 6 2 1 変異型	配列番号 183	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGG CAGATTCCACTAGAGTTTAATAAAA CAA AATCTGTAGAAATTCACGTTTTGTAATGAC ACTGTEGTCA TTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCCACAAAACACTACT GAAGT ATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAG ATATTTA CACCTTTGATGGAGCTCTAAA CAAGTCCACTGTCCCCACTG ACTTTAGT AGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACT AAAA GGAGATGCCTCTTTGAAGATGGAT AAGAGTGTGCTGTCTC ACACACAGGAA ACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC A GAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAA AATATCGTGTGTGTT TCATGGTTTTCTCC AAATGAAAATATTCCTTATTGTTATTTTCC CAATTTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGA CAGTTTGGTATTA AAACACTTAAATATA GATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACA AT TGCTTTACTTGTGCTGGACTAGTGATCA CTGTCAATTGTC ATTGTTGGAGCCATTCT TTTCGTCCCGGTGAATATTCATTA AAG AATGCTACTGGCCTTGTTTTAATTGTGAC TTCTACAGG GATATTAATATTACTTCAC TACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TGGAT TAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTT ATTCAGGT GATAGCCTATATCCTCGCTG TGGTTGGACTGAGTCTCTGTAT TCGGGC GTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGA TTTCAGG TTGAGTATCTTAGCTCTAGC ACAATTACTTGGACTAGTTTA TATGAAA TTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACA ACCTC CTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCC CTTAATGCATTCAAAGAA TCAAAAGGAA TGATGAATGATGAATAA

10

20

【表 3 1 - 9 6】

h C D 4 7 N 3 6 2 3 変異型	配列番号 184	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGG CAGATGCCACTAGTTTTTAATAAAA CAA AATCTGTAGAAATTCACGTTTTGTAATGAC ACTGTEGTCA TTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCCACAAAACACTACT GAAGT ATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAG ATATTTA CACCTTTGATGGAGTTACAAA CAAGTCCACTGTCCCCACTG ACTTTAGT AGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACT AAAA GGAGATGCCTCTTTGAAGATGGAT AAGAGTGTGCTGTCTC ACACACAGGAA ACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC A GAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAA AATATCGTGTGTGTT TCATGGTTTTCTCC AAATGAAAATATTCCTTATTGTTATTTTCC CAATTTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGA CAGTTTGGTATTA AAACACTTAAATATA GATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACA AT TGCTTTACTTGTGCTGGACTAGTGATCA CTGTCAATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTT TTTCGTCCCGGTGAATATTCATTA AAGA ATGCTACTGGCCTTGTTTTAATTGTGACT TCTACAGG GATATTAATATTACTTCACT ACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TGGATT AACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTA TTCAGGT GATAGCCTATATCCTCGCTGT GGTTGGACTGAGTCTCTGTAT TCGGGCG TGATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGAT TTCAGG TTGAGTATCTTAGCTCTAGCA CAATTACTTGGACTAGTTTA TATGAAAT TTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAA CCTC CTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCC TTAATGCATTCAAAGAA TCAAAAGGAAT GATGAATGATGAATAA

30

40

50

【表 3 1 - 9 7】

h C D 4 7 N 3 6 2 4 変異型	配列番号 185	ATGTGGCCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGG CAGATTCCACTAAGATTTAATAAAA CAA AATCTGTAGAATTACGTTTTGTAATGAC ACTGTEGTCA TTCCATGCTTTGTTACTA ATATGGAGGCCACAAAACACTACT GAAGT ATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAG ATATTTA CACCTTTGATGGACAGGTTAA CAAGTCCACTGTCCCCACTG ACTTTAGT AGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACT AAAA GGAGATGCCTETTTGAAGATGGAT AAGAGTGTATGCTGTCTC ACACACAGGAA ACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC A GAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAA AATATCGTGTGTGT TCATGGTTTTCTCC AAATGAAAATATTCCTTATTGTTATTTTCC CAATTTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGA CAGTTTGGTATTA AAACACTTAAATATA GATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACA AT TGCTTTACTTGTGCTGGACTAGTGATCA CTGTCAATTGTC ATTGTTGGAGCCATTCT TTTCGTCCCGAGGTGAATATTCATTA AAG AATGCTACTGGCCTTGTTTTAATTGTGAC TTCTACAGG GATATTAATATTACTTCAC TACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TGGAT TAACCTCCTTGGTCAATTGCCATATTGGTT ATTCAGGT GATAGCCTATATCCTCGCTG TGGTTGGACTGAGTCTCTGTAT TCGGGC GTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGA TTTCAGG TTTGAGTATCTTAGCTCTAGC ACAATTACTTGGACTAGTTTA TATGAAA TTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACA ACCTC CTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCC CTTAATGCATTCAAAGAA TCAAAAGGAA TGATGAATGATGAATAA

10

20

【表 3 1 - 9 8】

CAG-CD 4 7 (202) (コドン最適化)	配列番号 200	ATGTGGCCCCCTGGTCGCCGCCCTGTTGCT GGGCTCGGCGTTGC TCGCGATCAGCTCAG CTACTGTTTAAATAAAACAAAATCTGT AG AATTACAGTTTTGTAACGACACTGTCTGT ATCCCATGCTT TGTTACTAATATGGAGG CACAAAACACCACTGAAGTGTACG TGAA GTGGAAATTCAAAGGCAGAGACATTTACA CCTTTGAC GCGGCCCTCAACAAGTCCAC CGTGCCCACTGACTTTAGTAG CGCAAAA ATTGAGGTCAGCCAATTAATAAAGGAGA TGCCCT CTTTGAAGATGGACAAGAGCGAT GCTGTACAGCCACACAGGG AACTACACTT GTGAAGTAACAGAGTTAACCCTCGGAAGGT GA AACGATCATCGAGCTGAAGTATCGAG TGGTGTCTCTGTTTT CTCCGAACGAGAA TATCCTTATCGTAATTTTCCCAATTTTCG CTATCCTCCTGTTCTGGGGCCAGTTTGGT ATCAAGACACTCAAATATCGGTCCGGTGG GATGGATGAGAAAGACAATTGCCCTG CTT GTTGCTGGACTCGTGATCACCGTCATCGT GATTGTTGGG GCCATCCTTTTGTCCCA GGGGAGTACAGCCTGAAGAATGC TACGG GCTGGGATTAAATTGTGACCTCTACAGGG ATACTCA TCCTGCTTCACTACTATGTGT TCAGTACCGCGATTGGACTGA CCTCCTT CGTCATTGCCATATTGGTGATTCAGGTGA TAGCCT ACATCCTCGCCGTGGTTGGCCT GAGTCTCTGTATCGCGGCGT GCATACCC ATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGGTT GAGTA TCCTCGCACTAGCACAGTTGCTG GGACTGGTTTTATGAAA TTTGTGGCCT CCAACCAGAAGACTATACAGCCTCTAGG AA GGCTGTAGAGGAGCCCTGAATGCAT TCAAGGAATCAAAA GGCATGATGAATGA TGAATAA

30

40

50

【表 3 1 - 9 9】

CD47 ECD CD-CD59 GPI	配列番号 341	ATGTGGCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAG CTACTATTTAATAAAAACAAAATCTG TAG AATTCACGTTTTGTAAATGACACTGTGCTC ATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGG CACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAA GTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACA CCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCAC TGTCCCCACTGACTTTTAGTA GTGCAAAA ATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGA TGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGAT GCTGTCTCACACACAGG AAACACTACTT GTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGT TGTTTCATGGTTT TCTCCAAATGAACAG CTTGAGAACGGGGGCACATCTCTCTC CG AAAAGACTGTCTGTACTGGTGACCCCT TTCTTGGCTGC CGCATGGAGCCTGCACC CCTAA

10

【表 3 1 - 1 0 0】

CAG-CD47 ECD - CD59 GPI	配列番号 342	ACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGG GTCATTAGTTCAT AGCCCATATATGGAG TTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAA TG GCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCC CGCCCATTTGA CGTCAATAATGACGTATG TTCCCATAGTAACGCCAATAGGG ACTTT CCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTAC GGTAAAC TGCCCACTTGGCAGTACATCA AGTGTATCATATGCCAAGTA CGCCCCCT ATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGC CTGG CATTATGCCCAGTACATGACCTTA TGGGACTTTCTACTTGG CAGTACATCT ACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTC GAG GTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTC TCCCCATCTCCCCCCCC TCCCCACCCCC AATTTTGTAATTTATTTATTTTAAATTAT TTT GTGCAGCGATGGGGCGGGGGGGGG GGGGGGGCGCGGCC AGGCGGGGCGGGG CGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAG GC GGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGC GGCGCGCTC CGAAAGTTTCCTTTTATGG CGAGGCGGCGGGCGGGCGGCC CTATAA AAAGCGAAGCGCGCGGCGGGGAGTCG CTGCG CGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCG CTCCGCGCGCGCTCGCGC CGCCCGCCC CGGCTCTGACTGACCGGTTACTCCACA GGT GAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCT CCGGGCTGTAATTAGC GCTTGGTTTAAAT GACGGCTTGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGT G AAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCC CTTTGTGCGGGGG

20

30

40

50

【表 3 1 - 1 0 1】

	AGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGT GTGCGTGGGGAG CGCCGCGTGCGGCTCC GCGCTGCCCCGGCGGCTGTGAGCGCT GCG GGCGCGGGCGGGGGCTTTGTGCGCTCCGC AGTGTGCGC GAGGGGAGCGCGGCCGGGG GCGGTGCCCCGGCGGTGCGGGG GGGGCTG CGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTG TGTG CGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGT GGCGCGCTCGGTGCGG CTGCAACCCCCC CTGCAACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCA CGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTA CGGGGCGTGGCG CGGGGCTCGCCGTGCC GGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGG GGTG CGGGCGGGGCGGGGGCGCCTCGGGCCGG GGAGGGC TCGGGGGAGGGGGCGGGCGGC CCCCGGAGCGCGGGCGGCT GTGAGGGCG CGGCGAGCGCGCAGCCATTGCCTTTTATGG TAA TCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTC CTTTGTCCCAAATCTG TGGGAGCGCGAA ATCTGGGAGGCGCGCGCGCACCCCTCTA GCGGGCGGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCC GGCAGGAAGGA AATGGCGGGGAGGGCC TTCGTGCGTGCGCGGGCGCGCGTC CCT TCTCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGC GGGGGGAC GGCTGCCTTCGGGGGGGACG GGGCAGGGCGGGGTTTCGGCTT CTGGCGT GTGACCGGGGCTCTAGAGCCTCTGCTAA CCATG TTCATGCCTTCTTCTTTTCTTA CAGCTCCTGGGCAACGTGC TGGTTATTG TGCTGTCTCATTTTTTGGCAAAGAATTC CGTT TATTAATTAAGTGAACCGTCAGAG CCACCATGTGGCCCTG GTAGCGGGCGT GTTGCTGGGCTCGGCGTGCTGCGGATCAG C TCAGCTACTATTTAATAAAACAAAAATC TGTAAGAATTCACGT TTTGTAATGACACT GTCGTCAATCCATGCTTTGTTACTAATA

10

20

【表 3 1 - 1 0 2】

	TGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAAGTGGA AATTAAGGAAGAGATA TTTACACCTTTGATGGAGCTCTAA ACAA GTCCTACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTG CAAAAATT GAAGTCTCACAATTACTAAA AGGAGATGCCTCTTTGAAGAT GGATAAG AGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTA CACTT GTGAAGTAACAGAATTAACCAGA GAAGGTGAAACGATCAT CGAGCTAAAAAT ATCGTGTGTTTCATGGTTTTCTCCAAAT GA ACAGCTTGAGAACGGGGGCACATCTC TCTCCGAAAAGACTG TCCTGTACTGGT GACCCCTTTCTTGGCTGCCGCATGGAGCC TGCACCCCTAA

30

40

50

【表 3 2 - 1】

表 3 2. CD47 タンパク質ドメイン及び追加のドメインの例示的なアミノ酸配列

説明	配列番号	アミノ酸配列
CD47 SPドメイン	0	MWPLVAALLLGSACCGSA
CD47 IgVドメイン	1	QLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFT NMEAQNTTEVYVKWKF KGRDIYTFD GALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGD ASLKMDKS DAVSHTGNYTCEVTELT REGETII
CD47 ECドメイン	2	QLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFT NMEAQNTTEVYVKWKF KGRDIYTFD GALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGD ASLKMDKS DAVSHTGNYTCEVTELT REGETIIELKYRVVSWFSPNE
CD47 TM1ドメイン	3	NILIVIFPIFAILLFWGQFGI
CD47 IC1ドメイン	4	KTLKYRSGGMDEKT
CD47 TM2ドメイン	5	IALLVAGLVITVIVIVGAILF
CD47 EC1ドメイン	6	VPGEYSLKNA
CD47 TM3ドメイン	7	TGLGLIVTSTGILILHYYVF
CD47 IC2ドメイン	8	STAIGLT
CD47 TM4ドメイン	9	SFVIAILVIQVIAYILAVVGL
CD47 EC2ドメイン	0	SLCIAACIPMHG
CD47 TM5ドメイン	1	PLLIISGLSILALAQLLGLVYM
CD47 (202) IC3ドメイン	2	KFVASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKE SKGMMNDE

10

20

【表 3 2 - 2】

CD47 (201) IC3ドメイン	配列番号3	KFVASNQKTIQPPRNN
DAF / CD5.5 GPI	配列番号4	PNKGS GTTSGTTRLESGHTCFTLTGL LGTLV TMGLLT
TRAILR3 GPI長鎖型 (TAP Eリボートを有する)	配列番号5	ATVETPAAEETMNTSPGTPAPAAEET MNTSPGTPAPAAEETMT TSPGTPAP AAEETMTTSPGTPAPAAEETMITSPG TPASSHYLSC TIVGIIIVLIVLLIVF V
TRAILR3 GPI短鎖型 (TAP Eリボートを有さない)	配列番号6	MITSPGTPASSHYLSCTIVGIIIVLIV LLIVFV
CD5.9 GPI	配列番号7	QLENGGTSLSSEKTVLLVTPFLAAAW SLHP
CD8a TMドメイン	配列番号8	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT
CD8a 9アミノ酸ICD	配列番号9	LYCNHRNRR
CD28 TMドメイン	配列番号10	FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFW V
CD28 9アミノ酸ICD	配列番号11	RSKRSRLH
PDGFR TMドメイン	配列番号12	VVISAILALVLTIIISLIILI
PDGFR 9アミノ酸ICD	配列番号13	MLWQKKPRY
CD47 3アミノ酸ヒンジドメイン	配列番号14	ELK
CD8a ヒンジドメイン	配列番号15	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDFAC D
CD28 ヒンジドメイン	配列番号16	IEVMYPPPYLDNEKSGTIIHVKGKH LCPSPLFPGPSKP
PDGFR ヒンジドメイン	配列番号17	AVGQDTQEVIIVPHSLPFFKV
IgG4 ヒンジドメイン	配列番号18	ESKYGPPCPPCP

30

40

50

【表 3 3 - 1】

表 3 3. CD 4 7 タンパク質ドメイン及び追加のドメインの例示的なヌクレオチド配列

説明	配列番号	ヌクレオチド配列
CAG プロモーター	49	ACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGG GTCATTAGTTCAT AGCCCATATATGGAG TTCCGCGTTACATAAATTACGGTAAA TG GCGCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCG CGCCCATTTGA CGTCAATAATGACGTATG TTCCCATAGTAACGCCAATAGGG ACTTT CCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTAC GGTAAGC TGCCCACTTGGCAGTACATCA AGTGATCATATGCCAAGTA CGCCCCCT ATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGC CTGG CATTATGCCCAGTACATGACCTTA TGGGACTTTCTACTTGG CAGTACATCT ACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTC GAG GTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTC TCCCCATCTCCCCCCCC TCCCCACCCCC AATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTAT TTT GTGCAGCGATGGGGCGGGGGGGGG GGGGGGGCGCGCGCC AGGCGGGCGGGG CGGGGCGAGGGCGGGCGGGCGGCGAG GC GGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGC GCGCGGCTC CGAAAGTTTCTTTTATGG CGAGGCGGGCGGGCGGGCGGCC CTATAA AAAGCGAAGCGCGGGCGGGCGGGAGTCG CTGCG CGCTGCCCTTCCGCCGTGCCCGG CTCGGCGGGCGGCTCGGGC CGGGCGGGC GGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCACA GGT GAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCT CCGGGCTGTAAATAGC GCTTGGTTTAAAT GACGGCTTGTCTTTCTTTCTGTGGCTGCGT G AAAGCCTTGAGGGGCTCGGGAGGGGC CTTTGTGCGGGGG

10

20

【表 3 3 - 2】

	AGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGT GTGCGTGGGGAG CGCCGCGTGCGGCTCC GCGCTGCGCGCGGCTGTGAGCGCT GCG GCGCGGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGC AGTGTCGC GAGGGGAGCGGGCGGGG GCGGTGCCCCGCGGTGCGGG GGGGCTG CGAGGGGAACAAGGCTGCGTGCGGGGTG TGTG CGTGGGGGGTGAGCAGGGGGTGT GGGCGCGTCGGTCGGG CTGCAACCCCC CTGCACCCCCCTCCCGAGTTGCTGAGCA CGGCCCCGCTTCCGGTGCGGGGCTCCGTA CGGGGCGTGGCG CGGGGCTCGCCGTGCC GGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGG GGTG CGGGGCGGGCGGGGCGCCTCGGGCCGG GGAGGGC TCGGGGAGGGGCGCGGCGGC CCGGAGCGCCGGCGGCT GTCGAGGCG CGGCGAGCCGAGCCATTGCCCTTTTATGG TAA TCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTC CTTTGTCCCAAATCTG TCGGAGCCGAA ATCTGGGAGGCGCGCGCACCCCCCTCTA GCGGGCGCGGGCGAAGCGGTGCGGCGCC GGCAGGAAGGA AATGGGCGGGAGGGCC TTCGTGCGTCGCGCGCGCGCGCT CCCT TCTCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGC GGGGGGAC GGCTGCCTTCGGGGGGGACG GGGCAGGGCGGGGTTGCGCTT CTGGCGT GTGACGGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAA CCATG TTCATGCCTTCTTCTTTTCTA CAGCTCCTGGGCAACGTGC TGGTTATTG TGCTGTCTCATCTTTTGGCAAAGAATTC

30

40

【表 3 3 - 3】

EF1 αプロモーター	配列番号 50	GCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGC ACATCGCCACA GTCCCCGAGAAGTTGG GGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCG GTGC CTAGAGAAAGTGGCGCGGGTAAACTGGG AAAGTGA TGTGCTGTACTGGCTCCGCT TTTTCCCGAGGGTGGGGGAG AACCGTAT ATAAGTGCACTAGTGGCGGTGAACGTTCT TTTTG GCAACGGGTTTGGCGCCAGAACA CAGGTAAGTGCCGTGTGT GGTTCGCGG GGCCTGGCTCTTTACGGGTTATGGCCCT TGC GTGCTTGAATTACTTCCACCTGGC TGCAGTACGTGATTTCTT GATCCCGAGCT TCGGGTTTGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGA G GCCTTGGCTTAAGGAGCCCTTCGCC TCGTGCTTGAGTTGA GGCTGGCTGGG CGCTGGGGCGCGCGCTGCGAATCTGGT GGCACCTTCGCGCTGTCTCGCTGCTTTC GATAAGTCTCTAG CCATTTAAATTTTT GATGACCTGCTGGGACGCTTTTTTCT G GCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAG ATCTGCACACT GGTATTTGGGTTTTTGG GGCGCGGGCGGGCGAGCGGGCCCG TCGG TCCAGCGCACATGTTCCGCGAGGCGGG CCTGCGAG CGCGGCCACCGAGAATCGGA CGGGGGTAGTCTCAAGCTGG CCGGCTG CTCTGGTGGCTGGCTCGCGCGCGCTGT ATCGC CCGCGCTGGCGGGCAAGGCTGG CCCGGTTCGGCACCAGTTG CGTGAGCGGA AAGATGGCGCTTCCCGGCTGTCTGCAG GG AGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTC GGGAGAGCGGGCGG GTGAGTCACCCACA CAAAGGAAAAGGGCTTTCCGTCCTCA G CGGTGCTTCTATGTGACTCCACTGAGTAC CGGGCGCGCTC CAGGCACCTCGATTAGT TCTCGAGCTTTTGGAGTACGTGCT TTT AGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGG AGTTTCCCC

10

20

【表 3 3 - 4】

		ACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGG CCAGCTTGGCAC TTGATGTAATTCTCCT TGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGA TC TTGGTTCACTCTCAAGCCTCAGACAGTGG TTCAAAGTTT TTTCTTCCATTTCAAGGT GTCGTGA
CD47 S Pドメイン	配列番号 51	ATGTGGCCCTGGTAGCGCGCTGTTGCT GGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCT
CD47 I GVドメイン	配列番号 52	CAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGT AGAATTCACGTT TTGTAATGACACTGTC GTCATTCCATGCTTTGTTACTAATAT GG AGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTA AAGTGGA AAA TTTAAAGGAAGAGATATTT ACACCTTTGATGGAGCTCTAAA CAAGTC CACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAA AAATTG AAGTCTCACAACTTACTAAAAGG AGATGCTCTTTGAAGATG GATAAGAGT GATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACAC TTG TGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAA GGTGAACGATCATC
CD47 E CDドメイン	配列番号 53	CAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGT AGAATTCACGTT TTGTAATGACACTGTC GTCATTCCATGCTTTGTTACTAATAT GG AGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTA AAGTGGA AAA TTTAAAGGAAGAGATATTT ACACCTTTGATGGAGCTCTAAA CAAGTC CACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAA AAATTG AAGTCTCACAACTTACTAAAAGG AGATGCTCTTTGAAGATG GATAAGAGT GATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACAC TTG TGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAA GGTGAACGATCATC GAGCTAAAATATC GTGTTGTTTCATGGTTTCTCCAAATGAA
CD47 T M1ドメイン	配列番号 54	AATATTCCTATTGTTATTTCCCAATTTT TGCTATACTCCTGTT TCTGGGGACAGTTT GGTATT

30

40

50

【表 3 3 - 5】

CD47 I C1ドメイン	配列番号 55	AAAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTAT GGATGAGAAAAC A
CD47 T M2ドメイン	配列番号 56	ATTGCTTTACTTGTGCTGGACTAGTGAT CACTGTCATTGTC ATTGTTGGAGCCATT CTTTTC
CD47 E C1ドメイン	配列番号 57	GTCCAGGTGAATATTCAATTAAGAATGC T
CD47 T M3ドメイン	配列番号 58	ACTGGCCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTAC AGGGATATTAATA TTACTTCACTACTAT GTGTTT
CD47 I C2ドメイン	配列番号 59	AGTACAGCGATTGGATTAACC
CD47 T M4ドメイン	配列番号 60	TCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCA GGTGATAGCCTAT ATCCTCGCTGTGGTT GGACTG
CD47 E C2ドメイン	配列番号 61	AGTCTCTGTATTGCGGCGTGTATACCAAT GCATGGC
CD47 T M5ドメイン	配列番号 62	CCTCTTCGTGATTTCAAGTTTGAGTATCTT AGCTCTAGCACAA TTACTTGGACTAGTT TATATG
CD47 (2 02) IC 3ドメイン	配列番号 63	AAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTAT ACAACCTCCTAG GAAAGCTGTAGAGGAA CCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAA AAG GAATGATGAATGATGAA
CD47 (2 01) IC 3ドメイン	配列番号 64	AAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTAT ACAACCTCCTAG GAATAAC
DAF/CD 55 GPI	配列番号 65	GCAAATAAAGGAAGTGAACCACTTCAGG TACTACCCGTCT TCTATCTGGGCACACG TGTTTCACGTTGACAGGTTTGCTTGG GA CGCTAGTAACCATGGGCTTGCTGACT

10

20

【表 3 3 - 6】

TRAILR 3 GPI長 鎖型 (TAP エリポートを 有する)	配列番号 66	GCCACTGTGGAAAccccagctgctgaaga gacaa tgaacacccagccgggggac tcc t gccccagctgctgaagagacaa tgaacac cagccgggggac tcc t gccccagctgctg aagagaa caa tgaacacccagccgggggac tcc t gccccagctgctgaagagacaa tga ccacacagccggggg ggaac tcc t gccccagc t gctgaagagacaa tga tcaacacagccgg ggaac tcc t gcttcttct CATTACCTCTC ATGCACCATCGTAGGGATCATAGTTCTAA TT GTGCTTCTGATTGTGTTTGT
TRAILR 3 GPI短 鎖型 (TAP エリポートを 有さない)	配列番号 67	atga tcaacacccagccgggggac tcc t gctc TTCTCAFTACCTCTCATGCACCA TCGTA GGGATCATAGTTCTAATTGTGCTTCTGAT TGTGTTTG TT
CD59 G PI	配列番号 68	CAGCTTGAGAACGGGGGCACATCTCTCTC CGAAAAGACTGT CCTGTTACTGGTGACC CCTTTCCTTGGCTGCEGCATGGAGCCT GC ACCC
CD8a T Mドメイン	配列番号 69	ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGAC TTGTGGGGTGCTT CTCCTGTCACTGGTT ATCACG
CD8a 9 アミノ酸IC D	配列番号 70	CTTTACTGCAACCACAGGAACCGAAGA
CD28 T Mドメイン	配列番号 71	TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGT CCTGGCTTGTCTAT AGCTTGCTAGTAACA GTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTG
CD28 9 アミノ酸IC D	配列番号 72	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCAC
PDGFR TMドメイン	配列番号 73	tlgg tga tctcagccatcc tggccctgg t gg tgg tca cca tca tctcc c t t a t c a t c c TCA TC

30

40

50

【表 3 3 - 7】

PDGFR 9アミノ酸 CD	配列番号 74	ATGCTTTGGCAGAAGAAGCCACGTTAC
CD47 アミノ酸 ヒンジドメイン	配列番号 75	GAGCTAAAA
CD8a ヒンジドメイン	配列番号 76	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACACCAAC ACCGGCGCCCA CCATCGCGTCGCAGCCC CTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCC AgcgggcgggggcgcgagTGCACACGAGGG GGCTGGACTTC GCCTGTGAT
CD28 ヒンジドメイン	配列番号 77	ATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCT AGACAATGAGAA GAGCAATGGAACCAT ATCCATGTGAAAGGAAACACCTTT GTC CAAGTCCCCATTATTTCCCGACCTTCTAAG CCC
PDGFR ヒンジドメイン	配列番号 78	GCTGTGGGCCAGGACACGCAGGAGGTCAT CGTGGTGCCACA CTCCTTGCCCTTTAAG Gtg
IgG4 ヒンジドメイン	配列番号 79	gaatctaagtaaggaccgcccctgcccccc ttgcccct

10

【表 3 4 - 1】

表 3 4. 例示的な抗 S I R P α 抗体アミノ酸配列

A.bドメイン	配列番号	アミノ酸配列
VHまたはHC	186	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNID YYIHWVQQRTE QGLEWIGRIDPEDGETKYA PKFQDKATITADTSSNTAYLHLSSL TSED AVYYCARWGAYWGQGTLLVTVSA
VLまたはLC	187	QIVLTQSPAIMASASPGEKVTTLTCSASSSVSS SYLYWYQKPGSS PKLWIYSTSNLASGVPA RFSGSGSGTSYSLTISMEAEADAASYF CHQ WSSYPRTFGAGTKLELK
VHまたはHC	188	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNID YYIHWVQQRTE QGLEWIGRIDPEDGETKYA PKFQDKATITADTSSNTAYLHLSSL TSED AVYYCARWGAYWGQGTLLVTVSS
s.c.Fv	189	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNID YYIHWVQQRTE QGLEWIGRIDPEDGETKYA PKFQDKATITADTSSNTAYLHLSSL TSED AVYYCARWGAYWGQGTLLVTVSGGGSGGGGS GGGG SQIVLTQSPAIMASASPGEKVTTLTCSA SSSVSSSYLYWYQKPGS SPKLWIYSTSNL ASGVPARFSGSGSGTSYSLTISMEAEADAAS Y FCHQWSSYPRTFGAGTKLELK
s.c.Fv	190	QIVLTQSPAIMASASPGEKVTTLTCSASSSVSS SYLYWYQKPGSS PKLWIYSTSNLASGVPA RFSGSGSGTSYSLTISMEAEADAASYF CHQ WSSYPRTFGAGTKLELKGTAAAGSGSGGSSS GAEVQLQQS GAELVKPGASVKLSCTASGFN IKDYIHWVQQRTEQGLEWIG RIDPEDGET KYAPKFQDKATITADTSSNTAYLHLSSLTSE DTAV YYCARWGAYWGQGTLLVTVS
VHまたはHC	191	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYTFTS YVWHVVRQMPG KGLEWIGNIDPSDSDTHYN QKFKDHVTLSDKSIISTAYLQLSSL KASDT AMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLLVTVSS

20

30

40

50

【表 3 4 - 2】

V L また はLC	配列番号 192	DVVM TQSPLSLPVT LGQPASISCRSSQSLVH SYGNTYLYWYQQ R PGQSPRLLIYRVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVY FCFQGTHVPYTFGGGTKEIK
V L また はLC	配列番号 193	DVVM TQSPLSLPVT LGQPASISCRSSQSLVH SYGNTYLYWYQQ R PGQSPRLLIYRVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVY YCFQGTHVPYTFGGGTKEIK
V H また はHC	配列番号 194	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTTS YWVHWVRQMPG KGLEWMGNIDPSDS DTHYN QKFKDHVTLSVDKSI STAYLQLSS LKASDT AMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGT LVTVSS
V H また はHC	配列番号 195	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTTS YWVHWVRQMPG KGLEWMGNIDPSDS DTHYS PSFQGHVTLSVDKSI STAYLQLSS LKASDT AMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGT LVTVSS
V H また はHC	配列番号 196	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTTS YWVHWVRQMPG KGLEWMGNIDPSDS DTHYS PSFQGHVTLSVDKSI STAYLQLSS LKASDT AMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGT LVTVSS
V H また はHC	配列番号 197	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTTS YWVHWVRQMPG KGLEWMGNIDPSDS DTHYS PSFQGHVTLSVDKSI STAYLQLSS LKASDT AMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGT LVTVSS
V H また はHC	配列番号 198	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTTS YWVHWVRQMPG KGLEWMGNIDPSDS DTHYS PSFQGHVTLSVDKSI STAYLQLSS LKASDT AMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGT LVTVSS

10

【1662】

20

特定の実施形態

実施形態 I-1. ヒト CD 47 細胞外ドメインまたはその一部と、
少なくとも 1 つのヒト CD 47 膜貫通ドメインまたはその一部と、
少なくとも 1 個のアミノ酸の欠失を含むヒト CD 47 細胞内ドメインの一部であって、前
記欠失が 18 アミノ酸の C 末端欠失ではない、前記一部と、を含む遺伝子操作された CD
47 タンパク質。

【1663】

実施形態 I-2. ヒト CD 47 細胞外ドメインの一部と、
少なくとも 1 つのヒト CD 47 膜貫通ドメインまたはその一部と、
18 アミノ酸の C 末端欠失を含むヒト CD 47 細胞内ドメインの一部と、を含む遺伝子操
作された CD 47 タンパク質。

30

【1664】

実施形態 I-3. ヒト CD 47 細胞外ドメインまたはその一部と、
少なくとも 1 個かつ 5 個以下のヒト CD 47 膜貫通ドメイン（複数可）またはその一部（
複数可）と、
18 アミノ酸の C 末端欠失を含むヒト CD 47 細胞内ドメインの一部と、を含む遺伝子操
作された CD 47 タンパク質。

【1665】

実施形態 I-4. ヒト CD 47 細胞外ドメインまたはその一部と、
少なくとも 1 個のヒト CD 47 膜貫通ドメインまたはその一部、及びシグナルペプチドと
、を含む遺伝子操作された CD 47 タンパク質であって、
前記遺伝子操作された CD 47 タンパク質が、細胞内ドメインを含まない、前記遺伝子操
作された CD 47 タンパク質。

40

【1666】

実施形態 I-5. ヒト CD 47 細胞外ドメインと、
少なくとも 1 個のヒト CD 47 膜貫通ドメインまたはその一部と、を含む遺伝子操作され
た CD 47 タンパク質であって、
前記遺伝子操作された CD 47 タンパク質が、細胞内ドメインを含まない、前記遺伝子操
作された CD 47 タンパク質。

【1667】

50

実施形態 I - 6 .

ヒト CD 4 7 細胞外ドメインまたはその一部と、
少なくとも 1 個かつ 5 個以下のヒト CD 4 7 膜貫通ドメイン（複数可）またはその一部（複数可）と、を含む遺伝子操作された CD 4 7 タンパク質であって、
前記遺伝子操作された CD 4 7 タンパク質が、細胞内ドメインを含まない、前記遺伝子操作された CD 4 7 タンパク質。

【1668】

実施形態 I - 7 .

ヒト CD 4 7 細胞外ドメインまたはその一部と、
少なくとも 1 個のヒト CD 4 7 膜貫通ドメインまたはその一部と、を含み、
細胞内ドメインを含まないか、または少なくとも 1 個のアミノ酸の欠失を含むヒト CD 4 7 細胞内ドメインを含む、を含む遺伝子操作された CD 4 7 タンパク質であって、
前記遺伝子操作された CD 4 7 タンパク質が、配列番号 1 及び配列番号 6 に対する最高で 99% の同一性を有するアミノ酸配列を有する、前記遺伝子操作された CD 4 7 タンパク質。

【1669】

実施形態 I - 8 . 野生型ヒト CD 4 7 タンパク質と比べてより少ないグリコシル化修飾部位を含む、実施形態 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された CD 4 7 タンパク質。

【1670】

実施形態 I - 9 . 野生型ヒト CD 4 7 タンパク質と比べてより少ないグリコシル化修飾を含む、実施形態 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された CD 4 7 タンパク質。

【1671】

実施形態 I - 10 . 2 個未満のヘパラン及び／またはコンドロイチン硫酸グリコサミノグリカン修飾部位を含む、実施形態 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された CD 4 7 タンパク質。

【1672】

実施形態 I - 11 . 2 個未満のヘパラン及び／またはコンドロイチン硫酸グリコサミノグリカン鎖を含む、実施形態 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された CD 4 7 タンパク質。

【1673】

実施形態 I - 12 . 5 個未満の N - グリコシル化修飾部位を含む、実施形態 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された CD 4 7 タンパク質。

【1674】

実施形態 I - 13 . 4 個未満の N - グリコシル化修飾鎖を含む、実施形態 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された CD 4 7 タンパク質。

【1675】

実施形態 I - 14 . 前記ヒト CD 4 7 細胞外ドメインまたはその一部が、野生型ヒト CD 4 7 タンパク質と比較して 1 個以上のトロンボスポンジン - 1 結合部位（複数可）を欠く、実施形態 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された CD 4 7 タンパク質。

【1676】

実施形態 I - 15 . 前記ヒト CD 4 7 細胞外ドメインまたはその一部が、野生型ヒト CD 4 7 タンパク質と比較して 1 個以上のインテグリン結合部位（複数可）を欠く、実施形態 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された CD 4 7 タンパク質。

【1677】

実施形態 I - 16 . インテグリンが、 $\alpha v \beta 3$ インテグリン、 $\alpha I I b \beta 3$ インテグリン、 $\alpha 2 \beta 1$ インテグリン、 $\alpha 4 \beta 1$ インテグリン、 $\alpha 6 \beta 1$ インテグリン、及び $\alpha 5$ インテグリンからなる群から選択される、実施形態 15 に記載の遺伝子操作された CD 4 7 タンパク質。

【1678】

10

20

30

40

50

実施形態 I-17. 前記細胞外ドメインまたはその一部が、少なくとも 1 個の S I R P α 相互作用モチーフを含む、実施形態 1～16 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された C D 4 7 タンパク質。

【1679】

実施形態 I-18. 前記ヒト C D 4 7 細胞外ドメイン内またはその一部内のシステインと、前記ヒト C D 4 7 膜貫通ドメイン（複数可）内またはその間のシステインとの間のジスルフィド結合を含む、実施形態 1～17 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された C D 4 7 タンパク質。

【1680】

実施形態 I-19. 前記遺伝子操作された C D 4 7 タンパク質が、免疫寛容誘導因子である、実施形態 1～18 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された C D 4 7 タンパク質。

【1681】

実施形態 I-20. 前記遺伝子操作された C D 4 7 タンパク質が、膜貫通タンパク質である、実施形態 1～19 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された C D 4 7 タンパク質。

【1682】

実施形態 I-21. 前記ヒト C D 4 7 細胞外ドメインが、配列番号 2 のアミノ酸 19～141 に対する少なくとも 80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 1～20 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された C D 4 7 タンパク質。

【1683】

実施形態 I-22. 前記少なくとも 1 つのヒト C D 4 7 膜貫通ドメイン（複数可）のいずれかが、

配列番号 2 のアミノ酸 142～162 に対する少なくとも 80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の同一性を有するアミノ酸配列、

配列番号 2 のアミノ酸 177～197 に対する少なくとも 80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の同一性を有するアミノ酸配列、

配列番号 2 のアミノ酸 208～228 に対する少なくとも 80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の同一性を有するアミノ酸配列、

配列番号 2 のアミノ酸 236～257 に対する少なくとも 80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の同一性を有するアミノ酸配列、及び

配列番号 2 のアミノ酸 269～289 に対する少なくとも 80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の同一性を有するアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態 1～21 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された C D 4 7 タンパク質。

【1684】

実施形態 I-23. 前記ヒト C D 4 7 細胞内ドメインが、配列番号 2 のアミノ酸 290～323 に対する少なくとも 80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 1～3、7～22 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された C D 4 7 タンパク質。

【1685】

実施形態 I-24. 配列番号 7 に記載されるアミノ酸配列に対する少なくとも 80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 1、7～23 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された C D 4 7 タンパク質。

【1686】

実施形態 I-25. 配列番号 8 に記載されるアミノ酸配列に対する少なくとも 80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 1、7～24 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された C D 4 7 タンパク質。

【1687】

10

20

30

40

50

実施形態 I-26. 配列番号 9 に記載されるアミノ酸配列に対する少なくとも 80 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 1、7 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された CD47 タンパク質。

【1688】

実施形態 I-27. 配列番号 12 に記載されるアミノ酸配列に対する少なくとも 80 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 1、7 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された CD47 タンパク質。

【1689】

実施形態 I-28. 配列番号 10 に記載されるアミノ酸配列に対する少なくとも 80 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 1、7 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された CD47 タンパク質。

【1690】

実施形態 I-29. 配列番号 11 に記載されるアミノ酸配列に対する少なくとも 80 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 1、7 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された CD47 タンパク質。

【1691】

実施形態 I-30. 前記遺伝子操作された CD47 タンパク質が、遺伝子操作されたヒト CD47 タンパク質、遺伝子操作されたヒト化 CD47 タンパク質、または遺伝子操作された部分的ヒト化 CD47 タンパク質である、実施形態 1 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された CD47 タンパク質。

【1692】

実施形態 I-31. 実施形態 1 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された CD47 タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【1693】

実施形態 I-32. 実施形態 31 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【1694】

実施形態 I-33. 前記ベクターが多シストロン性ベクターである、実施形態 32 に記載のベクター。

【1695】

実施形態 I-34. 前記多シストロン性ベクターが、バイシストロン性ベクターまたはトリシストロン性ベクターである、実施形態 33 に記載のベクター。

【1696】

実施形態 I-35. 前記ベクターがプラスミドまたはウイルスベクターである、実施形態 32 ~ 34 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【1697】

実施形態 I-36. 前記ウイルスベクターが、偽型化された自己不活性化レンチウイルスベクターである、実施形態 35 に記載のベクター。

【1698】

実施形態 I-37. 実施形態 31 に記載のポリヌクレオチド、及び／または実施形態 32 ~ 36 のいずれか 1 項に記載のベクターを含む細胞。

【1699】

実施形態 I-38. 実施形態 1 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された CD47 タンパク質を含む細胞。

【1700】

実施形態 I-39. 前記細胞が幹細胞である、実施形態 37 ~ 38 のいずれか 1 項に記載の細胞。

10

20

30

40

50

【1701】

実施形態 I-40. 前記幹細胞が多能性幹細胞である、実施形態 39 に記載の細胞。

【1702】

実施形態 I-41. 前記多能性幹細胞が、人工多能性幹細胞 (iPSC) または胚性幹細胞である、実施形態 40 に記載の細胞。

【1703】

実施形態 I-42. 前記細胞が膵島細胞である、実施形態 37～38 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【1704】

実施形態 I-43. 前記細胞が初代膵島細胞である、実施形態 42 に記載の細胞。

10

【1705】

実施形態 I-44. 前記膵島細胞が、多能性幹細胞から分化している、実施形態 42 に記載の細胞。

【1706】

実施形態 I-45. 前記多能性幹細胞が iPSC または ESC である、実施形態 44 に記載の細胞。

【1707】

実施形態 I-46. 前記細胞が T 細胞である、実施形態 37～38 のいずれか 1 項に記載の細胞

【1708】

実施形態 I-47. 前記 T 細胞が初代 T 細胞である、実施形態 46 に記載の細胞。

20

【1709】

実施形態 I-48. 前記初代 T 細胞が、キメラ抗原受容体 (CAR) を含む T 細胞である、実施形態 47 に記載の細胞。

【1710】

実施形態 I-49. 前記 T 細胞が CAR-T 細胞である、実施形態 48 に記載の細胞。

【1711】

実施形態 I-50. 前記 T 細胞が、多能性幹細胞から分化している、実施形態 46 に記載の細胞。

【1712】

実施形態 I-51. 前記多能性幹細胞が iPSC または ESC である、実施形態 50 に記載の細胞。

30

【1713】

実施形態 I-52. 前記細胞が、幹細胞、膵島細胞、T 細胞、CAR-T 細胞、心臓細胞、心臓前駆細胞、神経細胞、グリア前駆細胞、内皮細胞、B 細胞、網膜色素上皮細胞、肝実質細胞、甲状腺細胞、皮膚細胞、血液細胞、形質細胞、血小板、腎細胞、上皮細胞、ナチュラルキラー細胞 (NK 細胞)、及び CAR-NK 細胞からなる細胞の群から選択される、実施形態 37～38 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【1714】

実施形態 I-53. 前記細胞が初代細胞である、実施形態 52 に記載の細胞。

40

【1715】

実施形態 I-54. 前記細胞が分化した細胞である、実施形態 52 に記載の細胞。

【1716】

実施形態 I-55. 前記細胞が低免疫原性細胞である、実施形態 37～54 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【1717】

実施形態 I-56. 1 種以上の主要組織適合性 (MHC) クラス I タンパク質及び／または 1 種以上の MHC クラス II タンパク質の発現が、野生型または対照細胞と比較して低減される、実施形態 37～55 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【1718】

50

実施形態Ⅰ－５７．前記細胞が、１種以上のＭＨＣクラスⅠタンパク質及び／または１種以上のＭＨＣクラスⅡタンパク質を発現しない、実施形態３７～５５のいずれか１項に記載の細胞。

【１７１９】

実施形態Ⅰ－５８．前記ＭＨＣタンパク質がＨＬＡタンパク質である、実施形態５６～５７のいずれか１項に記載の細胞。

【１７２０】

実施形態Ⅰ－５９．ＭＨＣクラスⅠタンパク質の前記発現が、Ｂ２Ｍの発現をノックアウトまたは低減することにより低減される、実施形態５６～５８のいずれか１項に記載の細胞。

【１７２１】

実施形態Ⅰ－６０．ＭＨＣクラスⅡタンパク質の前記発現が、ＣⅡＴＡの発現をノックアウトまたは低減することにより低減される、実施形態５６～５８のいずれか１項に記載の細胞。

【１７２２】

実施形態Ⅰ－６１．ＴＲＡＣ及び／またはＴＲＢＣがノックアウトされているか、またはそれらの発現が低減されている、実施形態４１、４５～５５のいずれか１項に記載の細胞。

【１７２３】

実施形態Ⅰ－６２．前記細胞を作製するための出発物質が、野生型細胞及び／または対照細胞を含む、実施形態３７～６１のいずれか１項に記載の細胞。

【１７２４】

実施形態Ⅰ－６３．実施形態１～３０のいずれか１項に記載の遺伝子操作されたＣＤ４７タンパク質を含む組成物。

【１７２５】

実施形態Ⅰ－６４．実施形態３７～６２のいずれか１項に記載の細胞を含む組成物。

【１７２６】

実施形態Ⅱ－１．

(a) １個以上の細胞外ドメインと、

(b) １個以上の膜テザーと、を含む遺伝子操作されたタンパク質をコードする１つ以上の核酸配列を含む核酸構築物であって、前記１個以上の細胞外ドメインが、シグナル調節タンパク質α（ＳＩＲＰα）相互作用モチーフを含む、前記核酸構築物。

【１７２７】

実施形態Ⅱ－１ a．前記核酸構築物が、１個以上の全長ＣＤ４７細胞内ドメインをコードする核酸配列を含まない、実施形態１に記載の核酸構築物。

【１７２８】

実施形態Ⅱ－２．前記ＳＩＲＰα相互作用モチーフが、ＣＤ４７細胞外ドメインまたはその一部であるか、またはそれを含む、実施形態１に記載の核酸構築物。

【１７２９】

実施形態Ⅱ－３．前記ＣＤ４７細胞外ドメインが、ＣＤ４７免疫グロブリン可変部（Ｉｇ V）様ドメインであるか、またはそれを含む、実施形態２に記載の核酸構築物。

【１７３０】

実施形態Ⅱ－４．前記ＣＤ４７細胞外ドメインがヒトＣＤ４７細胞外ドメインである、実施形態１または２に記載の核酸構築物。

【１７３１】

実施形態Ⅱ－５．前記ＣＤ４７細胞外ドメインが、配列番号５２と少なくとも８０％同一な核酸配列によりコードされる、実施形態２～４のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１７３２】

10

20

30

40

50

実施形態ⅠⅠ－６．前記ＣＤ４７細胞外ドメインが、配列番号５３と少なくとも８０％同一な核酸配列によりコードされる、実施形態２～４のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１７３３】

実施形態ⅠⅠ－７．前記ＣＤ４７細胞外ドメインが、配列番号５７と少なくとも８０％同一な核酸配列によりコードされる、実施形態２～４のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１７３４】

実施形態ⅠⅠ－８．前記ＣＤ４７細胞外ドメインが、配列番号５９と少なくとも８０％同一な核酸配列によりコードされる、実施形態２～４のいずれか１項に記載の核酸構築物。

10

【１７３５】

実施形態ⅠⅠ－９．前記ＳＩＲＰα相互作用モチーフが、ＳＩＲＰα抗体またはその一部であるか、またはそれを含む、実施形態１に記載の核酸構築物。

【１７３６】

実施形態ⅠⅠ－１０．前記１個以上の膜テザーが、膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、実施形態１～９のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１７３７】

実施形態ⅠⅠ－１１．前記膜貫通ドメインが、ＣＤ３ζ、ＣＤ８α、ＣＤ１６α、ＣＤ２８、ＣＤ３２α、ＣＤ３２ｃ、ＣＤ４０、ＣＤ４７、ＣＤ６４、ＩＣＯＳ、デクチン１、ＤＮＧＲ１、ＥＧＦＲ、ＧＰＣＲ、ＭｙＤ８８、ＰＤＧＦＲ、ＳＬＡＭＦ７、ＴＲＬ１、ＴＬＲ２、ＴＬＲ３、ＴＲＬ４、ＴＬＲ５、ＴＬＲ６、ＴＬＲ７、ＴＬＲ８、ＴＬＲ９、またはＶＥＧＦＲの膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、実施形態１０に記載の核酸構築物。

20

【１７３８】

実施形態ⅠⅠ－１２．前記膜貫通ドメインが、ＣＤ４７膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、実施形態１０または１１に記載の核酸構築物。

【１７３９】

実施形態ⅠⅠ－１３．前記膜貫通ドメインが、配列番号５４と少なくとも８０％同一な核酸配列によりコードされる、実施形態１０～１２のいずれか１項に記載の核酸構築物。

30

【１７４０】

実施形態ⅠⅠ－１４．前記膜貫通ドメインが、配列番号５６と少なくとも８０％同一な核酸配列によりコードされる、実施形態１０～１２のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１７４１】

実施形態ⅠⅠ－１５．前記膜貫通ドメインが、配列番号５８と少なくとも８０％同一な核酸配列によりコードされる、実施形態１０～１２のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１７４２】

実施形態ⅠⅠ－１６．前記膜貫通ドメインが、配列番号６０と少なくとも８０％同一な核酸配列によりコードされる、実施形態１０～１２のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１７４３】

実施形態ⅠⅠ－１７．前記膜貫通ドメインが、配列番号６２と少なくとも８０％同一な核酸配列によりコードされる、実施形態１０～１２のいずれか１項に記載の核酸構築物。

40

【１７４４】

実施形態ⅠⅠ－１８．前記膜貫通ドメインが、ＣＤ８α膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、実施形態１０または１１に記載の核酸構築物。

【１７４５】

実施形態ⅠⅠ－１９．前記膜貫通ドメインが、配列番号６９と少なくとも８０％同一な核酸配列によりコードされる、実施形態１０、１１、または１８に記載の核酸構築物。

【１７４６】

実施形態ⅠⅠ－２０．前記膜貫通ドメインが、ＣＤ２８膜貫通ドメインであるか、また

50

はそれを含む、実施形態 10 または 11 に記載の核酸構築物。

【1747】

実施形態 II-21. 前記膜貫通ドメインが、配列番号 71 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列によりコードされる、実施形態 10、11、または 20 に記載の核酸構築物。

【1748】

実施形態 II-22. 前記膜貫通ドメインが、PDGFR 膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、実施形態 10 または 11 に記載の核酸構築物。

【1749】

実施形態 II-23. 前記膜貫通ドメインが、配列番号 73 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列によりコードされる、実施形態 10、11、または 22 に記載の核酸構築物。

10

【1750】

実施形態 II-24. 前記 1 個以上の膜テザーが、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーであるか、またはそれを含む、実施形態 1~9 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1751】

実施形態 II-25. 前記 GPI アンカーが、DAF / CD55 GPI アンカー、TRAILR3 GPI アンカー、または CD59 GPI アンカーであるか、またはそれを含む、実施形態 24 に記載の核酸構築物。

【1752】

実施形態 II-26. 前記 GPI アンカーが、DAF / CD55 GPI アンカーであるか、またはそれを含む、実施形態 24 または 25 に記載の核酸構築物。

20

【1753】

実施形態 II-27. 前記 DAF / CD55 GPI アンカーが、配列番号 65 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列によりコードされる、実施形態 24~26 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1754】

実施形態 II-28. 前記 GPI アンカーが、TRAILR3 GPI アンカーであるか、またはそれを含む、実施形態 24 または 25 に記載の核酸構築物。

【1755】

実施形態 II-29. 前記 TRAILR3 GPI アンカーが、配列番号 66 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列によりコードされる、実施形態 24、25、または 28 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

30

【1756】

実施形態 II-30. 前記 TRAILR3 GPI アンカーが、配列番号 67 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列によりコードされる、実施形態 24、25、または 28 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1757】

実施形態 II-31. 前記 GPI アンカーが、CD59 GPI アンカーであるか、またはそれを含む、実施形態 24 または 25 に記載の核酸構築物。

【1758】

実施形態 II-32. 前記 CD59 GPI アンカーが、配列番号 68 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列によりコードされる、実施形態 24、25、または 31 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

40

【1759】

実施形態 II-33. 1 つ以上の制御配列を更に含む、実施形態 1~24 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1760】

実施形態 II-34. 前記 1 つ以上の制御配列が、細胞外シグナルペプチドをコードする、実施形態 33 に記載の核酸構築物。

【1761】

50

実施形態ⅠⅠ－３５．前記細胞外シグナルペプチドが、配列番号５１と少なくとも８０％同一な核酸配列によりコードされる、実施形態３３または３４に記載の核酸構築物。

【１７６２】

実施形態ⅠⅠ－３６．前記１つ以上の制御配列がプロモーターを含む、実施形態３３に記載の核酸構築物。

【１７６３】

実施形態ⅠⅠ－３７．前記プロモーターが、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターである、実施形態３６に記載の核酸構築物。

【１７６４】

実施形態ⅠⅠ－３８．前記プロモーターが、天然に存在するプロモーター、ハイブリッドプロモーター、または合成プロモーターである、実施形態３６または３７に記載の核酸構築物。

【１７６５】

実施形態ⅠⅠ－３９．前記プロモーターが、ＥＦ１αプロモーター、ＥＦ１αショートプロモーター、ＣＡＧプロモーター、ユビキチン／Ｓ２７αプロモーター、ＳＶ４０初期プロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター、マウスメタロチオネイン－Ⅰプロモーター、ＲＳＶプロモーター、ＭＭＴＶプロモーター、モロニー Maus 白血病ウイルス、末端反復配列領域、ＣＭＶプロモーター、アクチンプロモーター、免疫グロブリンプロモーター、熱ショックプロモーター、ポリオマウイルスプロモーター、鶏痘ウイルスプロモーター、ウシ乳頭腫ウイルスプロモーター、トリ肉腫ウイルスプロモーター、レトロウイルスプロモーター、Ｂ型肝炎ウイルスプロモーター、ＰＧＫプロモーター、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス ７．５Ｋプロモーター、ＳＶ４０プロモーター、ＨＳＶのｔｋプロモーター、マウス乳癌ウイルス（ＭＭＴＶ）プロモーター、ＨＩＶのＬＴＲプロモーター、モロニーウイルスのプロモーター、エプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）プロモーター、Ｕ６プロモーター、またはＵＢＣプロモーターであるか、またはそれを含む、実施形態３６～３８のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１７６６】

実施形態ⅠⅠ－４０．前記プロモーターが、ＣＡＧプロモーターであるか、またはそれを含む、実施形態３６～３９のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１７６７】

実施形態ⅠⅠ－４１．前記プロモーターが、配列番号４９と少なくとも８０％同一な核酸配列を含む、実施形態３６～４０のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１７６８】

実施形態ⅠⅠ－４２．前記プロモーターが、ＥＦ１αプロモーターであるか、またはそれを含む、実施形態３６～３９のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１７６９】

実施形態ⅠⅠ－４３．前記プロモーターが、配列番号５０と少なくとも８０％同一な核酸配列を含む、実施形態３６～４０または４２のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１７７０】

実施形態ⅠⅠ－４４．前記１つ以上の制御配列が、リボソーム結合部位、エンハンサーエレメント、アクチベーターエレメント、翻訳開始配列、翻訳終結配列、転写開始配列、転写終結配列、ポリアデニル化シグナル配列、複製エレメント、ＲＮＡプロセシング及び輸送エレメント、トランスポゾン配列、トランスポザーゼ配列、インスレーター配列、内部リボソーム進入部位（IRES）、５' UTR、３' UTR、ｍＲＮＡ ３' 末端プロセシング配列、境界エレメント、遺伝子座制御領域（LCR）、マトリックス結合領域（MAR）、組換えもしくはカセット交換用配列、リンカー配列、分泌シグナル、耐性マーカー、アンカーペプチド、局在化シグナル、融合タグ、アフィニティタグ、シャペロニン、プロテアーゼ、またはそれらの組み合わせを含む、実施形態３３に記載の核酸構築物。

【１７７１】

実施形態ⅠⅠ－４５．前記１個以上の細胞外ドメインが、細胞外ヒンジドメインを更に含む、実施形態１～４４のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１７７２】

実施形態ⅠⅠ－４６．前記細胞外ヒンジドメインが、ＣＤ４７ヒンジ、ＣＤ８αヒンジ、ＣＤ２８ヒンジ、ＰＤＧＦＲヒンジ、またはＩｇＧ４ヒンジであるか、またはそれを含む、実施形態４５に記載の核酸構築物。

【１７７３】

実施形態ⅠⅠ－４７．前記細胞外ヒンジドメインが、ＣＤ４７ヒンジであるか、またはそれを含む、実施形態４５または４６に記載の核酸構築物。

【１７７４】

実施形態ⅠⅠ－４８．前記細胞外ヒンジドメインが、配列番号７５と少なくとも８０％同一な核酸配列によりコードされる、実施形態４５～４７のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１７７５】

実施形態ⅠⅠ－４９．前記細胞外ヒンジドメインが、ＣＤ８αヒンジであるか、またはそれを含む、実施形態４５または４６に記載の核酸構築物。

【１７７６】

実施形態ⅠⅠ－５０．前記細胞外ヒンジドメインが、配列番号７６と少なくとも８０％同一な核酸配列によりコードされる、実施形態４５、４６、または４９に記載の核酸構築物。

【１７７７】

実施形態ⅠⅠ－５１．前記細胞外ヒンジドメインが、ＣＤ２８ヒンジであるか、またはそれを含む、実施形態４５または４６に記載の核酸構築物。

【１７７８】

実施形態ⅠⅠ－５２．前記細胞外ヒンジドメインが、配列番号７７と少なくとも８０％同一な核酸配列によりコードされる、実施形態４５、４６、または７ｆ５１に記載の核酸構築物。

【１７７９】

実施形態ⅠⅠ－５３．前記細胞外ヒンジドメインが、ＰＤＧＦＲヒンジであるか、またはそれを含む、実施形態４５または４６に記載の核酸構築物。

【１７８０】

実施形態ⅠⅠ－５４．前記細胞外ヒンジドメインが、配列番号７８と少なくとも８０％同一な核酸配列によりコードされる、実施形態４５、４６、または５３に記載の核酸構築物。

【１７８１】

実施形態ⅠⅠ－５５．前記細胞外ヒンジドメインが、ＩｇＧ４ヒンジであるか、またはそれを含む、実施形態４５または４６に記載の核酸構築物。

【１７８２】

実施形態ⅠⅠ－５６．前記細胞外ヒンジドメインが、配列番号７９と少なくとも８０％同一な核酸配列によりコードされる、実施形態４５、４６、または５５に記載の核酸構築物。

【１７８３】

実施形態ⅠⅠ－５７．細胞内ドメインをコードする１つ以上の核酸配列を更に含む、先行実施形態のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１７８４】

実施形態ⅠⅠ－５８．前記細胞内ドメインが、ＣＤ４７細胞内ドメインまたはその一部であるか、またはそれを含む、実施形態５７に記載の核酸構築物。

【１７８５】

実施形態ⅠⅠ－５９．前記細胞内ドメインが、配列番号５５と少なくとも８０％同一な核酸配列によりコードされる、実施形態５７または５８に記載の核酸構築物。

10

20

30

40

50

【1786】

実施形態ⅠⅠ－60．前記細胞内ドメインが、配列番号59と少なくとも80%同一な核酸配列によりコードされる、実施形態57または58に記載の核酸構築物。

【1787】

実施形態ⅠⅠ－61．前記細胞内ドメインが、配列番号63と少なくとも80%同一な核酸配列によりコードされる、実施形態57または58に記載の核酸構築物。

【1788】

実施形態ⅠⅠ－62．前記細胞内ドメインが、配列番号64と少なくとも80%同一な核酸配列によりコードされる、実施形態57または58に記載の核酸構築物。

【1789】

実施形態ⅠⅠ－63．前記細胞内ドメインが、CD8α細胞内ドメインまたはその一部であるか、またはそれを含む、実施形態57に記載の核酸構築物。

【1790】

実施形態ⅠⅠ－64．前記細胞内ドメインが、配列番号70と少なくとも80%同一な核酸配列によりコードされる、実施形態57または63に記載の核酸構築物。

【1791】

実施形態ⅠⅠ－65．前記細胞内ドメインが、CD28細胞内ドメインまたはその一部であるか、またはそれを含む、実施形態57に記載の核酸構築物。

【1792】

実施形態ⅠⅠ－66．前記細胞内ドメインが、配列番号72と少なくとも80%同一な核酸配列によりコードされる、実施形態57または58に記載の核酸構築物。

【1793】

実施形態ⅠⅠ－67．前記細胞内ドメインが、PDGFR細胞内ドメインまたはその一部であるか、またはそれを含む、実施形態57に記載の核酸構築物。

【1794】

実施形態ⅠⅠ－68．前記細胞内ドメインが、配列番号74と少なくとも80%同一な核酸配列によりコードされる、実施形態57または67に記載の核酸構築物。

【1795】

実施形態ⅠⅠ－69．前記細胞内ドメインが、野生型CD47細胞内ドメインと比較して1種以上の改変を含む、実施形態57～68のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【1796】

実施形態ⅠⅠ－70．前記細胞内ドメインが、野生型CD47細胞内ドメインと比較して1種以上の欠失を含む、実施形態57～69のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【1797】

実施形態ⅠⅠ－71．前記細胞内ドメインが、野生型CD47細胞内ドメインと比較して1種以上の挿入を含む、実施形態57～69のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【1798】

実施形態ⅠⅠ－72．前記細胞内ドメインが、野生型CD47細胞内ドメインと比較して改変された機能を含む、実施形態57～71のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【1799】

実施形態ⅠⅠ－73．前記細胞内ドメインが、野生型CD47細胞内ドメインと比較して低減された機能を含む、実施形態57～72のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【1800】

実施形態ⅠⅠ－74．前記細胞内ドメインが、野生型CD47細胞内ドメインと比較して低減されたレベルのCD47細胞内シグナル伝達を含む、実施形態57～73のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【1801】

実施形態ⅠⅠ－75．前記細胞内ドメインが、非機能的細胞内ドメインを含む、実施形態57～74のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【1802】

実施形態Ⅱ－７６．表３１から選択される配列と少なくとも８０％同一な核酸配列を含む、先行実施形態のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８０３】

実施形態Ⅱ－７７．配列番号１３と少なくとも８０％同一な核酸配列を含む、実施形態１～７６のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８０４】

実施形態Ⅱ－７８．配列番号１４と少なくとも８０％同一な核酸配列を含む、実施形態１～７６のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８０５】

実施形態Ⅱ－７９．配列番号１８と少なくとも８０％同一な核酸配列を含む、実施形態１～７６のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８０６】

実施形態Ⅱ－８０．配列番号１３３と少なくとも８０％同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態１～７６のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８０７】

実施形態Ⅱ－８１．配列番号１３４と少なくとも８０％同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態１～７６のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８０８】

実施形態Ⅱ－８２．配列番号１３５と少なくとも８０％同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態１～７６のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８０９】

実施形態Ⅱ－８３．配列番号１３６と少なくとも８０％同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態１～７６のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８１０】

実施形態Ⅱ－８４．配列番号１３７と少なくとも８０％同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態１～７６のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８１１】

実施形態Ⅱ－８５．配列番号１３８と少なくとも８０％同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態１～７６のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８１２】

実施形態Ⅱ－８６．配列番号１３９と少なくとも８０％同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態１～７６のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８１３】

実施形態Ⅱ－８７．配列番号１４０と少なくとも８０％同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態１～７６のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８１４】

実施形態Ⅱ－８８．配列番号１４１と少なくとも８０％同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態１～７６のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８１５】

実施形態Ⅱ－８９．配列番号１４２と少なくとも８０％同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態１～７６のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８１６】

実施形態Ⅱ－９０．配列番号１４３と少なくとも８０％同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態１～７６のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８１７】

実施形態Ⅱ－９１．配列番号１４４と少なくとも８０％同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態１～７６のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８１８】

実施形態Ⅱ－９２．配列番号１４５と少なくとも８０％同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態１～７６のいずれか１項に記載の核酸構築物。

10

20

30

40

50

【1819】

実施形態Ⅱ－93．配列番号146と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態1～76のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【1820】

実施形態Ⅱ－94．配列番号147と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態1～76のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【1821】

実施形態Ⅱ－95．配列番号148と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態1～76のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【1822】

実施形態Ⅱ－96．配列番号149と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態1～76のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【1823】

実施形態Ⅱ－97．配列番号150と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態1～76のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【1824】

実施形態Ⅱ－98．配列番号151と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態1～76のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【1825】

実施形態Ⅱ－99．配列番号152と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態1～76のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【1826】

実施形態Ⅱ－100．配列番号153と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態1～76のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【1827】

実施形態Ⅱ－101．配列番号154と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態1～76のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【1828】

実施形態Ⅱ－102．配列番号155と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態1～76のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【1829】

実施形態Ⅱ－103．配列番号156と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態1～76のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【1830】

実施形態Ⅱ－104．配列番号157と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態1～76のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【1831】

実施形態Ⅱ－105．配列番号158と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態1～76のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【1832】

実施形態Ⅱ－106．配列番号159と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態1～76のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【1833】

実施形態Ⅱ－107．配列番号160と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態1～76のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【1834】

実施形態Ⅱ－108．配列番号161と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態1～76のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【1835】

実施形態Ⅱ－109．配列番号162と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を

10

20

30

40

50

含む、実施形態 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1836】

実施形態 II-110. 配列番号 163 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1837】

実施形態 II-111. 配列番号 164 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1838】

実施形態 II-112. 配列番号 165 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

10

【1839】

実施形態 II-113. 配列番号 166 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1840】

実施形態 II-114. 配列番号 167 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1841】

実施形態 II-115. 配列番号 168 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1842】

実施形態 II-116. 配列番号 169 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

20

【1843】

実施形態 II-117. 配列番号 170 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1844】

実施形態 II-118. 配列番号 171 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1845】

実施形態 II-119. 配列番号 172 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

30

【1846】

実施形態 II-120. 配列番号 173 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1847】

実施形態 II-121. 配列番号 174 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1848】

実施形態 II-122. 配列番号 175 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

40

【1849】

実施形態 II-123. 配列番号 176 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1850】

実施形態 II-124. 配列番号 177 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1851】

実施形態 II-125. 配列番号 178 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 1 ～ 76 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1852】

50

実施形態ⅠⅠ－１２６．配列番号１７９と少なくとも８０％同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態１～７６のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８５３】

実施形態ⅠⅠ－１２７．配列番号１８０と少なくとも８０％同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態１～７６のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８５４】

実施形態ⅠⅠ－１２８．配列番号１８１と少なくとも８０％同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態１～７６のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８５５】

実施形態ⅠⅠ－１２９．配列番号１８２と少なくとも８０％同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態１～７６のいずれか１項に記載の核酸構築物。

10

【１８５６】

実施形態ⅠⅠ－１３０．配列番号１８３と少なくとも８０％同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態１～７６のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８５７】

実施形態ⅠⅠ－１３１．配列番号１８４と少なくとも８０％同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態１～７６のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８５８】

実施形態ⅠⅠ－１３２．配列番号１８５と少なくとも８０％同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態１～７６のいずれか１項に記載の核酸構築物。

20

【１８５９】

実施形態ⅠⅠ－１３３．配列番号３４１と少なくとも８０％同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態１～７６のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８６０】

実施形態ⅠⅠ－１３４．配列番号３４２と少なくとも８０％同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態１～７６のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８６１】

実施形態ⅠⅠ－１３５．表３３から選択される１つ以上の配列と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態１～６８のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８６２】

実施形態ⅠⅠ－１３６．表３３及び／または表３１から選択される１つ以上の配列と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、先行実施形態のいずれか１項に記載の核酸構築物。

30

【１８６３】

実施形態ⅠⅠ－１３７．配列番号４９及び配列番号１４と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態１～６８のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８６４】

実施形態ⅠⅠ－１３８．配列番号１４と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態１～６８のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８６５】

実施形態ⅠⅠ－１３９．配列番号４９及び配列番号１３と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態１～６８のいずれか１項に記載の核酸構築物。

40

【１８６６】

実施形態ⅠⅠ－１４０．配列番号１３と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態１～６８のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８６７】

実施形態ⅠⅠ－１４１．配列番号４９及び配列番号１８と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態１～６８のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８６８】

実施形態ⅠⅠ－１４２．配列番号１８と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列

50

を含む、実施形態 1～68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1869】

実施形態 II-143. 配列番号 51、52、54、55、56、及び 57 と少なくとも 80% 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、実施形態 1～68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1870】

実施形態 II-144. 配列番号 51、52、54、55、及び 56 と少なくとも 80% 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、実施形態 1～68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1871】

実施形態 II-145. 配列番号 51、52、54、及び 55 と少なくとも 80% 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、実施形態 1～68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1872】

実施形態 II-146. 配列番号 51、52、54、55、56、57、58、59、60、61、及び 62 と少なくとも 80% 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、実施形態 1～68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1873】

実施形態 II-147. 配列番号 51、52、54、55、56、57、58、59、60、及び 61 と少なくとも 80% 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、実施形態 1～68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1874】

実施形態 II-148. 配列番号 51、52、54、55、56、57、58、59、及び 60 と少なくとも 80% 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、実施形態 1～68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1875】

実施形態 II-149. 配列番号 51、52、54、55、56、57、58、及び 59 と少なくとも 80% 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、実施形態 1～68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1876】

実施形態 II-150. 配列番号 49、53、及び 65 と少なくとも 80% 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、実施形態 1～68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1877】

実施形態 II-151. 配列番号 53 及び 65 と少なくとも 80% 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、実施形態 1～68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1878】

実施形態 II-152. 配列番号 49、53、及び 66 と少なくとも 80% 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、実施形態 1～68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1879】

実施形態 II-153. 配列番号 53 及び 66 と少なくとも 80% 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、実施形態 1～68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1880】

実施形態 II-154. 配列番号 49、53、及び 67 と少なくとも 80% 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、実施形態 1～68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1881】

実施形態 II-155. 配列番号 53 及び 67 と少なくとも 80% 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、実施形態 1～68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1882】

実施形態 II-156. 配列番号 49、53、69、及び 70 と少なくとも 80% 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、実施形態 1～68 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1883】

実施形態ⅠⅠ－１５７．配列番号５３、６９、及び７０と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態１～６８のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８８４】

実施形態ⅠⅠ－１５８．配列番号４９、５３、７１、及び７２と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態１～８ｋのいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８８５】

実施形態ⅠⅠ－１５９．配列番号５３、７１、及び７２と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態１～６８のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８８６】

実施形態ⅠⅠ－１６０．配列番号４９、５３、７３、及び７４と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態１～６８のいずれか１項に記載の核酸構築物。

10

【１８８７】

実施形態ⅠⅠ－１６１．配列番号５３、７３、及び７４と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態１～６８のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８８８】

実施形態ⅠⅠ－１６２．配列番号４９、５２、７８、７３、及び７４と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態１～６８のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８８９】

実施形態ⅠⅠ－１６３．配列番号５２、７８、７３、及び７４と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態１～６８のいずれか１項に記載の核酸構築物。

20

【１８９０】

実施形態ⅠⅠ－１６４．配列番号４９、５２、７９、７１、及び７２と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態１～６８のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８９１】

実施形態ⅠⅠ－１６５．配列番号５２、７９、７１、及び７２と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態１～６８のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８９２】

実施形態ⅠⅠ－１６６．配列番号４９、５２、７９、６９、及び７０と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態１～６８のいずれか１項に記載の核酸構築物。

30

【１８９３】

実施形態ⅠⅠ－１６７．配列番号５２、７９、６９、及び７０と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態１～６８のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８９４】

実施形態ⅠⅠ－１６８．配列番号４９、５２、７７、７１、及び７２と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態１～６８のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８９５】

実施形態ⅠⅠ－１６９．配列番号５２、７７、７１、及び７２と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態１～６８のいずれか１項に記載の核酸構築物。

40

【１８９６】

実施形態ⅠⅠ－１７０．配列番号４９、５２、７７、６９、及び７０と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態１～６８のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８９７】

実施形態ⅠⅠ－１７１．配列番号５２、７７、６９、及び７０と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態１～６８のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８９８】

50

実施形態Ⅱ－１７２．配列番号４９、５２、７６、７１、及び７２と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態１～６８のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１８９９】

実施形態Ⅱ－１７３．配列番号５２、７６、７１、及び７２と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態１～６８のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１９００】

実施形態Ⅱ－１７４．配列番号４９、５２、７６、６９、及び７０と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態１～６８のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１９０１】

実施形態Ⅱ－１７５．配列番号５２、７６、６９、及び７０と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態１～６８のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１９０２】

実施形態Ⅱ－１７６．配列番号４９及び２００と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態１～６８のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１９０３】

実施形態Ⅱ－１７７．配列番号５０及び２００と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態１～６８のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１９０４】

実施形態Ⅱ－１７８．配列番号２００と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態１～６８のいずれか１項に記載の核酸構築物。

【１９０５】

実施形態Ⅱ－１７９．実施形態１～１７８のいずれか１項に記載の核酸構築物を含むベクター。

【１９０６】

実施形態Ⅱ－１８０．前記ベクターが多シストロン性ベクターである、実施形態１７９に記載のベクター。

【１９０７】

実施形態Ⅱ－１８１．前記多シストロン性ベクターが、バイシストロン性ベクターまたはトリシストロン性ベクターである、実施形態１８０に記載のベクター。

【１９０８】

実施形態Ⅱ－１８２．前記ベクターがプラスミドまたはウイルスベクターである、実施形態１７９～１８１のいずれか１項に記載のベクター。

【１９０９】

実施形態Ⅱ－１８３．前記ウイルスベクターが、偽型化された自己不活性化レンチウイルスベクターである、実施形態１８２に記載のベクター。

【１９１０】

実施形態Ⅱ－１８４．実施形態１～１７８のいずれか１項に記載の核酸構築物によりコードされる遺伝子操作されたタンパク質。

【１９１１】

実施形態Ⅱ－１８５．

(a) １個以上の細胞外ドメインと、

(b) １個以上の膜テザーと、を含む遺伝子操作されたタンパク質であって、

前記１個以上の細胞外ドメインが、シグナル調節タンパク質 α (SIRP α) 相互作用モチーフを含む、である、前記遺伝子操作されたタンパク質。

【１９１２】

実施形態Ⅱ－１８５a．前記遺伝子操作されたタンパク質が、１個以上の全長CD47細胞内ドメインを含まない、実施形態１８５に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９１３】

10

20

30

40

50

実施形態ⅠⅠ－１８６．前記ＳＩＲＰ α 相互作用モチーフが、ＣＤ４７細胞外ドメインまたはその一部であるか、またはそれを含む、実施形態１８５に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９１４】

実施形態ⅠⅠ－１８７．前記ＣＤ４７細胞外ドメインが、ＣＤ４７免疫グロブリン可変部（IgV）様ドメインである、実施形態１８６に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９１５】

実施形態ⅠⅠ－１８８．前記ＣＤ４７細胞外ドメインがヒトＣＤ４７細胞外ドメインである、実施形態１８５または１８６に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９１６】

実施形態ⅠⅠ－１８９．前記ＣＤ４７細胞外ドメインが、配列番号２１と少なくとも８０％同一なアミノ酸配列を含む、実施形態１８６～１８８のいずれか１項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９１７】

実施形態ⅠⅠ－１９０．前記ＣＤ４７細胞外ドメインが、配列番号２２と少なくとも８０％同一なアミノ酸配列を含む、実施形態１８６～１８８のいずれか１項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９１８】

実施形態ⅠⅠ－１９１．前記ＣＤ４７細胞外ドメインが、配列番号２６と少なくとも８０％同一なアミノ酸配列を含む、実施形態１８６～１８８のいずれか１項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９１９】

実施形態ⅠⅠ－１９２．前記ＣＤ４７細胞外ドメインが、配列番号３０と少なくとも８０％同一なアミノ酸配列を含む、実施形態１８６～１８８のいずれか１項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９２０】

実施形態ⅠⅠ－１９３．前記ＳＩＲＰ α 相互作用モチーフが、ＳＩＲＰ α 抗体またはその一部であるか、またはそれを含む、実施形態１８５に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９２１】

実施形態ⅠⅠ－１９４．前記ＳＩＲＰ α 抗体またはその一部が、配列番号１８６と少なくとも８０％同一なアミノ酸配列を含む、実施形態１９３に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９２２】

実施形態ⅠⅠ－１９５．前記ＳＩＲＰ α 抗体またはその一部が、配列番号１８７と少なくとも８０％同一なアミノ酸配列を含む、実施形態１９３に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９２３】

実施形態ⅠⅠ－１９６．前記ＳＩＲＰ α 抗体またはその一部が、配列番号１８８と少なくとも８０％同一なアミノ酸配列を含む、実施形態１９３に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９２４】

実施形態ⅠⅠ－１９７．前記ＳＩＲＰ α 抗体またはその一部が、配列番号１８９と少なくとも８０％同一なアミノ酸配列を含む、実施形態１９３に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９２５】

実施形態ⅠⅠ－１９８．前記ＳＩＲＰ α 抗体またはその一部が、配列番号１９０と少なくとも８０％同一なアミノ酸配列を含む、実施形態１９３に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９２６】

10

20

30

40

50

実施形態Ⅱ-199. 前記SIRP α 抗体またはその一部が、配列番号191と少なくとも80%同一なアミノ酸配列を含む、実施形態193に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【1927】

実施形態Ⅱ-200. 前記SIRP α 抗体またはその一部が、配列番号192と少なくとも80%同一なアミノ酸配列を含む、実施形態193に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【1928】

実施形態Ⅱ-201. 前記SIRP α 抗体またはその一部が、配列番号193と少なくとも80%同一なアミノ酸配列を含む、実施形態193に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【1929】

実施形態Ⅱ-202. 前記SIRP α 抗体またはその一部が、配列番号194と少なくとも80%同一なアミノ酸配列を含む、実施形態193に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【1930】

実施形態Ⅱ-203. 前記SIRP α 抗体またはその一部が、配列番号195と少なくとも80%同一なアミノ酸配列を含む、実施形態193に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【1931】

実施形態Ⅱ-204. 前記SIRP α 抗体またはその一部が、配列番号196と少なくとも80%同一なアミノ酸配列を含む、実施形態193に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【1932】

実施形態Ⅱ-205. 前記SIRP α 抗体またはその一部が、配列番号197と少なくとも80%同一なアミノ酸配列を含む、実施形態193に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【1933】

実施形態Ⅱ-206. 前記SIRP α 抗体またはその一部が、配列番号198と少なくとも80%同一なアミノ酸配列を含む、実施形態193に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【1934】

実施形態Ⅱ-207. 前記1個以上の膜テザーが、膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、実施形態185～193のいずれか1項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【1935】

実施形態Ⅱ-208. 前記膜貫通ドメインが、CD3 ζ 、CD8a、CD16a、CD28、CD32a、CD32c、CD40、CD47、CD64、ICOS、デクチン1、DNGR1、EGFR、GPCR、MyD88、PDGFR、SLAMF7、TRL1、TLR2、TLR3、TRL4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、またはVEGFRの膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、実施形態207に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【1936】

実施形態Ⅱ-209. 前記膜貫通ドメインが、CD47膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、実施形態207または208に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【1937】

実施形態Ⅱ-210. 前記膜貫通ドメインが、配列番号23と少なくとも80%同一なアミノ酸配列を含む、実施形態207～209のいずれか1項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【1938】

10

20

30

40

50

実施形態ⅠⅠ－２１１．前記膜貫通ドメインが、配列番号２５と少なくとも８０％同一なアミノ酸配列を含む、実施形態２０７～２０９のいずれか１項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９３９】

実施形態ⅠⅠ－２１２．前記膜貫通ドメインが、配列番号２７と少なくとも８０％同一なアミノ酸配列を含む、実施形態２０７～２０９のいずれか１項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９４０】

実施形態ⅠⅠ－２１３．前記膜貫通ドメインが、配列番号２９と少なくとも８０％同一なアミノ酸配列を含む、実施形態２０７～２０９のいずれか１項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

10

【１９４１】

実施形態ⅠⅠ－２１４．前記膜貫通ドメインが、配列番号３１と少なくとも８０％同一なアミノ酸配列を含む、実施形態２０７～２０９のいずれか１項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９４２】

実施形態ⅠⅠ－２１５．前記膜貫通ドメインが、ＣＤ８α膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、実施形態２０７または２０８に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９４３】

実施形態ⅠⅠ－２１６．前記膜貫通ドメインが、配列番号３８と少なくとも８０％同一なアミノ酸配列を含む、実施形態２０７、２０８、または２１５に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

20

【１９４４】

実施形態ⅠⅠ－２１７．前記膜貫通ドメインが、ＣＤ２８膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、実施形態２０７または２０８に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９４５】

実施形態ⅠⅠ－２１８．前記膜貫通ドメインが、配列番号４０と少なくとも８０％同一なアミノ酸配列を含む、実施形態２０７、２０８、または２１７に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９４６】

実施形態ⅠⅠ－２１９．前記膜貫通ドメインが、ＰＤＧＦＲ膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、実施形態２０７または２０８に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

30

【１９４７】

実施形態ⅠⅠ－２２０．前記膜貫通ドメインが、配列番号４２と少なくとも８０％同一なアミノ酸配列を含む、実施形態２０７、２０８、または２１９に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９４８】

実施形態ⅠⅠ－２２１．前記１個以上の膜テザーが、グリコシルホスファチジルイノシトール（ＧＰＩ）アンカーであるか、またはそれを含む、実施形態８５～１９３のいずれか１項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

40

【１９４９】

実施形態ⅠⅠ－２２２．前記ＧＰＩアンカーが、ＤＡＦ／ＣＤ５５　ＧＰＩアンカー、ＴＲＡＩＬＲ３　ＧＰＩアンカー、またはＣＤ５９　ＧＰＩアンカーであるか、またはそれを含む、実施形態２２１に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９５０】

実施形態ⅠⅠ－２２３．前記ＧＰＩアンカーが、ＤＡＦ／ＣＤ５５　ＧＰＩアンカーであるか、またはそれを含む、実施形態２２１または２２２に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９５１】

実施形態ⅠⅠ－２２４．前記ＤＡＦ／ＣＤ５５　ＧＰＩアンカーが、配列番号３４と少

50

なくとも 80% 同一なアミノ酸配列を含む、実施形態 221～223 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【1952】

実施形態 II-225. 前記 GPI アンカーが、TRAILR3 GPI アンカーであるか、またはそれを含む、実施形態 221 または 222 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【1953】

実施形態 II-226. 前記 TRAILR3 GPI アンカーが、配列番号 35 と少なくとも 80% 同一なアミノ酸配列を含む、実施形態 221、222、または 225 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【1954】

実施形態 II-227. 前記 TRAILR3 GPI アンカーが、配列番号 36 と少なくとも 80% 同一なアミノ酸配列を含む、実施形態 221、222、または 225 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【1955】

実施形態 II-228. 前記 GPI アンカーが、CD59 GPI アンカーであるか、またはそれを含む、実施形態 221 または 222 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【1956】

実施形態 II-229. 前記 CD59 GPI アンカーが、配列番号 37 と少なくとも 80% 同一なアミノ酸配列を含む、実施形態 221、222、または 228 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【1957】

実施形態 II-230. 細胞外シグナルペプチドを更に含む、実施形態 185～221 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【1958】

実施形態 II-231. 前記細胞外シグナルペプチドが、配列番号 20 と少なくとも 80% 同一な核酸配列によりコードされる、実施形態 230 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【1959】

実施形態 II-232. 前記 1 個以上の細胞外ドメインが、細胞外ヒンジドメインを更に含む、実施形態 185～231 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【1960】

実施形態 II-233. 前記細胞外ヒンジドメインが、CD47 ヒンジ、CD8a ヒンジ、CD28 ヒンジ、PDGFR ヒンジ、または IgG4 ヒンジであるか、またはそれを含む、実施形態 232 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【1961】

実施形態 II-234. 前記細胞外ヒンジドメインが、CD47 ヒンジであるか、またはそれを含む、実施形態 232 または 17a に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【1962】

実施形態 II-235. 前記細胞外ヒンジドメインが、配列番号 44 と少なくとも 80% 同一なアミノ酸配列を含む、実施形態 232～234 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【1963】

実施形態 II-236. 前記細胞外ヒンジドメインが、CD8a ヒンジであるか、またはそれを含む、実施形態 232 または 233 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【1964】

実施形態 II-237. 前記細胞外ヒンジドメインが、配列番号 45 と少なくとも 80% 同一な核酸配列を含む、実施形態 232、233、または 236 に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【1965】

10

20

30

40

50

実施形態ⅠⅠ－２３８．前記細胞外ヒンジドメインが、ＣＤ２８ヒンジであるか、またはそれを含む、実施形態２３２または２３３に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９６６】

実施形態ⅠⅠ－２３９．前記細胞外ヒンジドメインが、配列番号４６と少なくとも８０％同一なアミノ酸配列を含む、実施形態２３２、２３３、または２３８に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９６７】

実施形態ⅠⅠ－２４０．前記細胞外ヒンジドメインが、ＰＤＧＦＲヒンジであるか、またはそれを含む、実施形態２３２または２３３に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９６８】

実施形態ⅠⅠ－２４１．前記細胞外ヒンジドメインが、配列番号４７と少なくとも８０％同一なアミノ酸配列を含む、実施形態２３２、２３３、または２４０に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９６９】

実施形態ⅠⅠ－２４２．前記細胞外ヒンジドメインが、ＩｇＧ４ヒンジであるか、またはそれを含む、実施形態２３２または２３３に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９７０】

実施形態ⅠⅠ－２４３．前記細胞外ヒンジドメインが、配列番号４８と少なくとも８０％同一なアミノ酸配列を含む、実施形態２３２、２３３、または２４２に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９７１】

実施形態ⅠⅠ－２４４．細胞内ドメインを更に含む、先行実施形態のいずれか１項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９７２】

実施形態ⅠⅠ－２４５．前記細胞内ドメインが、ＣＤ４７細胞内ドメインまたはその一部であるか、またはそれを含む、実施形態２４４に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９７３】

実施形態ⅠⅠ－２４６．前記細胞内ドメインが、配列番号２４と少なくとも８０％同一なアミノ酸配列を含む、実施形態２４４または２４５に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９７４】

実施形態ⅠⅠ－２４７．前記細胞内ドメインが、配列番号２８と少なくとも８０％同一なアミノ酸配列を含む、実施形態２４４または２４５に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９７５】

実施形態ⅠⅠ－２４８．前記細胞内ドメインが、配列番号３２と少なくとも８０％同一なアミノ酸配列を含む、実施形態２４４または２４５に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９７６】

実施形態ⅠⅠ－２４９．前記細胞内ドメインが、配列番号３３と少なくとも８０％同一なアミノ酸配列を含む、実施形態２４４または２４５に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９７７】

実施形態ⅠⅠ－２５０．前記細胞内ドメインが、ＣＤ８α細胞内ドメインまたはその一部であるか、またはそれを含む、実施形態２４４に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９７８】

実施形態ⅠⅠ－２５１．前記細胞内ドメインが、配列番号３９と少なくとも８０％同一なアミノ酸配列を含む、実施形態２４４または２５０に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９７９】

10

20

30

40

50

実施形態ⅠⅠ－２５２．前記細胞内ドメインが、ＣＤ２８細胞内ドメインまたはその一部であるか、またはそれを含む、実施形態２４４に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９８０】

実施形態ⅠⅠ－２５３．前記細胞内ドメインが、配列番号４１と少なくとも８０％同一なアミノ酸配列を含む、実施形態２４４または２４５に記載の遺伝子操作されたタンパク質構築物。

【１９８１】

実施形態ⅠⅠ－２５４．前記細胞内ドメインが、ＰＤＧＦＲ細胞内ドメインまたはその一部であるか、またはそれを含む、実施形態２４４に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９８２】

実施形態ⅠⅠ－２５５．前記細胞内ドメインが、配列番号４３と少なくとも８０％同一なアミノ酸配列を含む、実施形態２４４または２５４に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９８３】

実施形態ⅠⅠ－２５６．前記細胞内ドメインが、野生型ＣＤ４７細胞内ドメインと比較して１種以上の改変を含む、実施形態２４４～２５５のいずれか１項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９８４】

実施形態ⅠⅠ－２５７．前記細胞内ドメインが、野生型ＣＤ４７細胞内ドメインと比較して１種以上の欠失を含む、実施形態２４４～２５６のいずれか１項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９８５】

実施形態ⅠⅠ－２５８．前記細胞内ドメインが、野生型ＣＤ４７細胞内ドメインと比較して１種以上の挿入を含む、実施形態２４４～２５６のいずれか１項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９８６】

実施形態ⅠⅠ－２５９．前記細胞内ドメインが、野生型ＣＤ４７細胞内ドメインと比較して改変された機能を含む、実施形態２４４～２５８のいずれか１項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９８７】

実施形態ⅠⅠ－２６０．前記細胞内ドメインが、野生型ＣＤ４７細胞内ドメインと比較して低減された機能を含む、実施形態２４４～２５９のいずれか１項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９８８】

実施形態ⅠⅠ－２６１．前記細胞内ドメインが、野生型ＣＤ４７細胞内ドメインと比較して低減されたレベルのＣＤ４７細胞内シグナル伝達を含む、実施形態２４４～２６０のいずれか１項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９８９】

実施形態ⅠⅠ－２６２．前記細胞内ドメインが、非機能的細胞内ドメインを含む、実施形態２４４～２６１のいずれか１項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９９０】

実施形態ⅠⅠ－２６３．表３０から選択される配列と少なくとも８０％同一なアミノ酸配列を含む、実施形態１８５～２６２のいずれか１項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９９１】

実施形態ⅠⅠ－２６４．配列番号１と少なくとも８０％同一なアミノ酸配列を含む、実施形態１８５～２６３のいずれか１項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【１９９２】

実施形態ⅠⅠ－２６５．配列番号２と少なくとも８０％同一なアミノ酸配列を含む、

10

20

30

40

50

実施形態 185～263 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【1993】

実施形態 II-266. 配列番号 6 と少なくとも 80 % 同一なアミノ酸配列を含む、実施形態 185～263 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【1994】

実施形態 II-267. 配列番号 80 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 185～263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1995】

実施形態 II-268. 配列番号 81 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 185～263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1996】

実施形態 II-269. 配列番号 82 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 185～263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1997】

実施形態 II-270. 配列番号 83 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 185～263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1998】

実施形態 II-271. 配列番号 84 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 185～263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【1999】

実施形態 II-272. 配列番号 85 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 185～263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【2000】

実施形態 II-273. 配列番号 86 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 185～263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【2001】

実施形態 II-274. 配列番号 87 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 185～263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【2002】

実施形態 II-275. 配列番号 88 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 185～263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【2003】

実施形態 II-276. 配列番号 89 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 185～263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【2004】

実施形態 II-277. 配列番号 90 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 185～263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【2005】

実施形態 II-278. 配列番号 91 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 185～263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【2006】

実施形態 II-279. 配列番号 92 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 185～263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【2007】

実施形態 II-280. 配列番号 93 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 185～263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【2008】

実施形態 II-281. 配列番号 94 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 185～263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【2009】

10

20

30

40

50

実施形態Ⅱ-282. 配列番号95と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【2010】

実施形態Ⅱ-283. 配列番号96と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【2011】

実施形態Ⅱ-284. 配列番号97と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【2012】

実施形態Ⅱ-285. 配列番号98と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

10

【2013】

実施形態Ⅱ-286. 配列番号99と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【2014】

実施形態Ⅱ-287. 配列番号100と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【2015】

実施形態Ⅱ-288. 配列番号101と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

20

【2016】

実施形態Ⅱ-289. 配列番号102と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【2017】

実施形態Ⅱ-290. 配列番号103と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【2018】

実施形態Ⅱ-291. 配列番号104と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【2019】

実施形態Ⅱ-292. 配列番号105と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

30

【2020】

実施形態Ⅱ-293. 配列番号106と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【2021】

実施形態Ⅱ-294. 配列番号107と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【2022】

実施形態Ⅱ-295. 配列番号108と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

40

【2023】

実施形態Ⅱ-296. 配列番号109と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【2024】

実施形態Ⅱ-297. 配列番号110と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【2025】

実施形態Ⅱ-298. 配列番号111と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

50

【2026】

実施形態Ⅱ-299. 配列番号112と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【2027】

実施形態Ⅱ-300. 配列番号113と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【2028】

実施形態Ⅱ-301. 配列番号114と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【2029】

実施形態Ⅱ-302. 配列番号115と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【2030】

実施形態Ⅱ-303. 配列番号116と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【2031】

実施形態Ⅱ-304. 配列番号117と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【2032】

実施形態Ⅱ-305. 配列番号118と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【2033】

実施形態Ⅱ-306. 配列番号119と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【2034】

実施形態Ⅱ-307. 配列番号120と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【2035】

実施形態Ⅱ-308. 配列番号121と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【2036】

実施形態Ⅱ-309. 配列番号122と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【2037】

実施形態Ⅱ-310. 配列番号123と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【2038】

実施形態Ⅱ-311. 配列番号124と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【2039】

実施形態Ⅱ-312. 配列番号125と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【2040】

実施形態Ⅱ-313. 配列番号126と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【2041】

実施形態Ⅱ-314. 配列番号127と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態185～263のいずれか1項に記載の核酸構築物。

【2042】

実施形態Ⅱ-315. 配列番号128と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を

10

20

30

40

50

含む、実施形態 185～263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【2043】

実施形態 II-316．配列番号 129 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 185～263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【2044】

実施形態 II-317．配列番号 130 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 185～263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【2045】

実施形態 II-318．配列番号 131 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 185～263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

10

【2046】

実施形態 II-319．配列番号 132 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 185～263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【2047】

実施形態 II-320．配列番号 340 と少なくとも 80 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 185～263 のいずれか 1 項に記載の核酸構築物。

【2048】

実施形態 II-321．表 32 から選択される 1 つ以上の配列と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、実施形態 185～255 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

20

【2049】

実施形態 II-322．表 32 及び／または表 30 から選択される 1 つ以上の配列と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、先行実施形態のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【2050】

実施形態 II-323．配列番号 20、21、23、24、25、及び 26 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、実施形態 185～255 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【2051】

実施形態 II-324．配列番号 20、21、23、24、及び 25 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、実施形態 185～255 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

30

【2052】

実施形態 II-325．配列番号 20、21、23、及び 24 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、実施形態 185～255 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【2053】

実施形態 II-326．配列番号 20、21、23、24、25、26、27、28、29、30、及び 31 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、実施形態 185～255 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

40

【2054】

実施形態 II-327．配列番号 20、21、23、24、25、26、27、28、29、及び 30 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、実施形態 185～255 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【2055】

実施形態 II-328．配列番号 20、21、23、24、25、26、27、28、及び 29 と少なくとも 80 % 同一な 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、実施形態 185～255 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【2056】

実施形態 II-329．配列番号 20、21、23、24、25、26、27、及び 2

50

8と少なくとも80%同一な1つ以上のアミノ酸配列を含む、実施形態185～255のいずれか1項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【2057】

実施形態II-330. 配列番号22及び34と少なくとも80%同一な1つ以上のアミノ酸配列を含む、実施形態185～255のいずれか1項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【2058】

実施形態II-331. 配列番号22及び35と少なくとも80%同一な1つ以上のアミノ酸配列を含む、実施形態185～255のいずれか1項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

10

【2059】

実施形態II-332. 配列番号22及び36と少なくとも80%同一な1つ以上のアミノ酸配列を含む、実施形態185～255のいずれか1項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【2060】

実施形態II-333. 配列番号22、38、及び39と少なくとも80%同一な1つ以上のアミノ酸配列を含む、実施形態185～255のいずれか1項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【2061】

実施形態II-334. 配列番号22、40、及び41と少なくとも80%同一な1つ以上のアミノ酸配列を含む、実施形態185～255のいずれか1項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

20

【2062】

実施形態II-335. 配列番号22、42、及び43と少なくとも80%同一な1つ以上のアミノ酸配列を含む、実施形態185～255のいずれか1項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【2063】

実施形態II-336. 配列番号21、47、42、及び43と少なくとも80%同一な1つ以上のアミノ酸配列を含む、実施形態185～255のいずれか1項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

30

【2064】

実施形態II-337. 配列番号21、48、40、及び41と少なくとも80%同一な1つ以上のアミノ酸配列を含む、実施形態185～255のいずれか1項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【2065】

実施形態II-338. 配列番号21、48、38、及び39と少なくとも80%同一な1つ以上のアミノ酸配列を含む、実施形態185～255のいずれか1項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【2066】

実施形態II-339. 配列番号21、46、40、及び41と少なくとも80%同一な1つ以上のアミノ酸配列を含む、実施形態185～255のいずれか1項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

40

【2067】

実施形態II-340. 配列番号21、46、38、及び39と少なくとも80%同一な1つ以上のアミノ酸配列を含む、実施形態185～255のいずれか1項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【2068】

実施形態II-341. 配列番号21、45、40、及び41と少なくとも80%同一な1つ以上のアミノ酸配列を含む、実施形態185～255のいずれか1項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

50

【2069】

実施形態ⅠⅠ－342．配列番号21、45、38、及び39と少なくとも80%同一な1つ以上のアミノ酸配列を含む、実施形態185～255のいずれか1項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【2070】

実施形態ⅠⅠ－343．野生型ヒトCD47タンパク質と比べてより少ないグリコシル化修飾部位を含む、実施形態185～342のいずれか1項に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

【2071】

実施形態ⅠⅠ－344．前記遺伝子操作されたタンパク質が、N206グリコシル化部位を含まない、実施形態343に記載の遺伝子操作されたタンパク質。

10

【2072】

実施形態ⅠⅠ－345．実施形態185～344のいずれか1項に記載の遺伝子操作されたタンパク質を含む遺伝子操作された細胞。

【2073】

実施形態ⅠⅠ－346．遺伝子操作されたタンパク質をコードする第1の導入遺伝子を含む遺伝子操作された細胞であって、
前記遺伝子操作されたタンパク質が、

(a) 1個以上の細胞外ドメインと、

(b) 1個以上の膜テザーと、を含み、

20

前記1個以上の細胞外ドメインが、シグナル調節タンパク質 α (SIRP α) 相互作用モチーフを含む、前記遺伝子操作された細胞。

【2074】

実施形態ⅠⅠ－346a．前記遺伝子操作されたタンパク質が、1個以上の全長CD47細胞内ドメインを含まない、実施形態346に記載の遺伝子操作された細胞。

【2075】

実施形態ⅠⅠ－347．前記SIRP α 相互作用モチーフが、CD47細胞外ドメインまたはその一部であるか、またはそれを含む、実施形態346に記載の遺伝子操作された細胞。

【2076】

実施形態ⅠⅠ－348．前記CD47細胞外ドメインが、CD47免疫グロブリン可変部(IgV)様ドメインである、実施形態347に記載の遺伝子操作された細胞。

30

【2077】

実施形態ⅠⅠ－349．前記CD47細胞外ドメインがヒトCD47細胞外ドメインである、実施形態23または347に記載の遺伝子操作された細胞。

【2078】

実施形態ⅠⅠ－350．前記CD47細胞外ドメインが前記第1の導入遺伝子によりコードされ、前記第1の導入遺伝子が配列番号52と少なくとも80%同一な核酸配列を含む、実施形態347～349のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2079】

実施形態ⅠⅠ－351．前記CD47細胞外ドメインが前記第1の導入遺伝子によりコードされ、前記第1の導入遺伝子が配列番号53と少なくとも80%同一な核酸配列を含む、実施形態347～349のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

40

【2080】

実施形態ⅠⅠ－352．前記CD47細胞外ドメインが、配列番号57と少なくとも80%同一な核酸配列によりコードされる、実施形態347～349のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2081】

実施形態ⅠⅠ－353．前記CD47細胞外ドメインが、配列番号59と少なくとも80%同一な核酸配列によりコードされる、実施形態347～349のいずれか1項に記載

50

の遺伝子操作された細胞。

【2082】

実施形態ⅠⅠ-354. 前記SIRP α 相互作用モチーフが、SIRP α 抗体またはその一部であるか、またはそれを含む、実施形態346に記載の遺伝子操作された細胞。

【2083】

実施形態ⅠⅠ-355. 前記1個以上の膜テザーが、膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、実施形態346～354のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2084】

実施形態ⅠⅠ-356. 前記膜貫通ドメインが、CD3 ζ 、CD8a、CD16a、CD28、CD32a、CD32c、CD40、CD47、CD64、ICOS、デクチン1、DNDR1、EGFR、GPCR、MyD88、PDGFR、SLAMF7、TRL1、TLR2、TLR3、TRL4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、またはVEGFRの膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、実施形態355に記載の遺伝子操作された細胞。

【2085】

実施形態ⅠⅠ-357. 前記膜貫通ドメインが、CD47膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、実施形態355または356に記載の遺伝子操作された細胞。

【2086】

実施形態ⅠⅠ-358. 前記膜貫通ドメインが前記第1の導入遺伝子によりコードされ、前記第1の導入遺伝子が配列番号54と少なくとも80%同一な核酸配列を含む、実施形態355～357のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2087】

実施形態ⅠⅠ-359. 前記膜貫通ドメインが前記第1の導入遺伝子によりコードされ、前記第1の導入遺伝子が配列番号56と少なくとも80%同一な核酸配列を含む、実施形態355～357のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2088】

実施形態ⅠⅠ-360. 前記膜貫通ドメインが前記第1の導入遺伝子によりコードされ、前記第1の導入遺伝子が配列番号58と少なくとも80%同一な核酸配列を含む、実施形態355～357のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2089】

実施形態ⅠⅠ-361. 前記膜貫通ドメインが前記第1の導入遺伝子によりコードされ、前記第1の導入遺伝子が配列番号60と少なくとも80%同一な核酸配列を含む、実施形態355～357のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2090】

実施形態ⅠⅠ-362. 前記膜貫通ドメインが前記第1の導入遺伝子によりコードされ、前記第1の導入遺伝子が配列番号62と少なくとも80%同一な核酸配列を含む、実施形態355～357のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2091】

実施形態ⅠⅠ-363. 前記膜貫通ドメインが、CD8a膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、実施形態355または356に記載の遺伝子操作された細胞。

【2092】

実施形態ⅠⅠ-364. 前記膜貫通ドメインが前記第1の導入遺伝子によりコードされ、前記第1の導入遺伝子が配列番号69と少なくとも80%同一な核酸配列を含む、実施形態355、356、または363に記載の遺伝子操作された細胞。

【2093】

実施形態ⅠⅠ-365. 前記膜貫通ドメインが、CD28膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、実施形態355または356に記載の遺伝子操作された細胞。

【2094】

実施形態ⅠⅠ-366. 前記膜貫通ドメインが前記第1の導入遺伝子によりコードされ、前記第1の導入遺伝子が配列番号71と少なくとも80%同一な核酸配列を含む、実施

10

20

30

40

50

形態 355、356、または 365 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2095】

実施形態 II-367. 前記膜貫通ドメインが、PDGFR 膜貫通ドメインであるか、またはそれを含む、実施形態 355 または 356 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2096】

実施形態 II-368. 前記膜貫通ドメインが前記第 1 の導入遺伝子によりコードされ、前記第 1 の導入遺伝子が配列番号 73 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列を含む、実施形態 355、356、または 367 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2097】

実施形態 II-369. 前記 1 個以上の膜テザーが、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーであるか、またはそれを含む、実施形態 346 ~ 354 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2098】

実施形態 II-370. 前記 GPI アンカーが、DAF / CD55 GPI アンカー、TRAILR3 GPI アンカー、または CD59 GPI アンカーであるか、またはそれを含む、実施形態 369 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2099】

実施形態 II-371. 前記 GPI アンカーが、DAF / CD55 GPI アンカーであるか、またはそれを含む、実施形態 369 または 370 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2100】

実施形態 II-372. 前記 DAF / CD55 GPI アンカーが前記第 1 の導入遺伝子によりコードされ、前記第 1 の導入遺伝子が配列番号 65 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列を含む、実施形態 369 ~ 371 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2101】

実施形態 II-373. 前記 GPI アンカーが、TRAILR3 GPI アンカーであるか、またはそれを含む、実施形態 369 または 370 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2102】

実施形態 II-374. 前記 TRAILR3 GPI アンカーが前記第 1 の導入遺伝子によりコードされ、前記第 1 の導入遺伝子が配列番号 66 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列を含む、実施形態 369、370、または 373 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2103】

実施形態 II-375. 前記 TRAILR3 GPI アンカーが前記第 1 の導入遺伝子によりコードされ、前記第 1 の導入遺伝子が配列番号 67 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列を含む、実施形態 369、370、または 373 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2104】

実施形態 II-376. 前記 GPI アンカーが、CD59 GPI アンカーであるか、またはそれを含む、実施形態 369 または 370 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2105】

実施形態 II-377. 前記 CD59 GPI アンカーが前記第 1 の導入遺伝子によりコードされ、前記第 1 の導入遺伝子が配列番号 68 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列を含む、実施形態 369、370、または 376 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2106】

実施形態 II-378. 1 つ以上の制御配列を更に含む、実施形態 346 ~ 369 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2107】

実施形態 II-379. 前記 1 つ以上の制御配列が、細胞外シグナルペプチドをコード

10

20

30

40

50

する、実施形態 378 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2108】

実施形態 II-380. 前記細胞外シグナルペプチドが前記第 1 の導入遺伝子によりコードされ、前記第 1 の導入遺伝子が配列番号 51 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列を含む、実施形態 378 または 379 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2109】

実施形態 II-381. 前記 1 つ以上の制御配列がプロモーターを含む、実施形態 378 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2110】

実施形態 II-382. 前記プロモーターが、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターである、実施形態 381 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2111】

実施形態 II-383. 前記プロモーターが、天然に存在するプロモーター、ハイブリッドプロモーター、または合成プロモーターである、実施形態 381 または 382 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2112】

実施形態 II-384. 前記プロモーターが、EF1 α プロモーター、EF1 α ショートプロモーター、CAGプロモーター、ユビキチン/S27aプロモーター、SV40初期プロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター、マウスメタロチオネイン-Iプロモーター、RSVプロモーター、MMTVプロモーター、モロニー Maus 白血病ウイルス、末端反復配列領域、CMVプロモーター、アクチンプロモーター、免疫グロブリンプロモーター、熱ショックプロモーター、ポリオマウイルスプロモーター、鶏痘ウイルスプロモーター、ウシ乳頭腫ウイルスプロモーター、トリ肉腫ウイルスプロモーター、レトロウイルスプロモーター、B型肝炎ウイルスプロモーター、PGKプロモーター、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス 7.5Kプロモーター、SV40プロモーター、HSVのtkプロモーター、マウス乳癌ウイルス(MMTV)プロモーター、HIVのLTRプロモーター、モロニーウイルスのプロモーター、エプスタイン・バーウイルス(EBV)プロモーター、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター、またはUBCプロモーターであるか、またはそれを含む、実施形態 381~383 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2113】

実施形態 II-385. 前記プロモーターが、CAGプロモーターであるか、またはそれを含む、実施形態 381~384 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2114】

実施形態 II-386. 前記第 1 の導入遺伝子が前記プロモーターを含み、前記プロモーターが、配列番号 49 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列を含む、実施形態 381~385 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2115】

実施形態 II-387. 前記プロモーターが、EF1 α プロモーターであるか、またはそれを含む、実施形態 381~384 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2116】

実施形態 II-388. 前記第 1 の導入遺伝子が前記プロモーターを含み、前記プロモーターが、配列番号 50 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列を含む、実施形態 381~385 または 387 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2117】

実施形態 II-389. 前記 1 つ以上の制御配列が、リボソーム結合部位、エンハンサーエレメント、アクチベーターエレメント、翻訳開始配列、翻訳終結配列、転写開始配列、転写終結配列、ポリアデニル化シグナル配列、複製エレメント、RNA プロセシング及び輸送エレメント、トランスポゾン配列、トランスポザーゼ配列、インスレーター配列、内部リボソーム進入部位(IRES)、5'UTR、3'UTR、mRNA 3'末端プロセ

10

20

30

40

50

シング配列、境界エレメント、遺伝子座制御領域（LCR）、マトリックス結合領域（MAR）、組換えもしくはカセット交換用配列、リンカー配列、分泌シグナル、耐性マーカー、アンカーペプチド、局在化シグナル、融合タグ、アフィニティータグ、シャペロニン、プロテアーゼ、またはそれらの組み合わせを含む、実施形態 378 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2118】

実施形態 II-390. 前記 1 個以上の細胞外ドメインが、細胞外ヒンジドメインを更に含む、実施形態 346～389 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2119】

実施形態 II-391. 前記細胞外ヒンジドメインが、CD47 ヒンジ、CD8a ヒンジ、CD28 ヒンジ、PDGFR ヒンジ、または IgG4 ヒンジであるか、またはそれを含む、実施形態 390 に記載の遺伝子操作された細胞。

10

【2120】

実施形態 II-392. 前記細胞外ヒンジドメインが、CD47 ヒンジであるか、またはそれを含む、実施形態 390 または 391 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2121】

実施形態 II-393. 前記細胞外ヒンジドメインが前記第 1 の導入遺伝子によりコードされ、前記第 1 の導入遺伝子が配列番号 75 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列を含む、実施形態 390～392 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2122】

実施形態 II-394. 前記細胞外ヒンジドメインが、CD8a ヒンジであるか、またはそれを含む、実施形態 390 または 391 に記載の遺伝子操作された細胞。

20

【2123】

実施形態 II-395. 前記細胞外ヒンジドメインが前記第 1 の導入遺伝子によりコードされ、前記第 1 の導入遺伝子が配列番号 76 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列を含む、実施形態 390、391、または 394 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2124】

実施形態 II-396. 前記細胞外ヒンジドメインが、CD28 ヒンジであるか、またはそれを含む、実施形態 390 または 391 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2125】

実施形態 II-397. 前記細胞外ヒンジドメインが前記第 1 の導入遺伝子によりコードされ、前記第 1 の導入遺伝子が配列番号 77 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列を含む、実施形態 390、391、または 396 に記載の遺伝子操作された細胞。

30

【2126】

実施形態 II-398. 前記細胞外ヒンジドメインが、PDGFR ヒンジであるか、またはそれを含む、実施形態 390 または 391 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2127】

実施形態 II-399. 前記細胞外ヒンジドメインが前記第 1 の導入遺伝子によりコードされ、前記第 1 の導入遺伝子が配列番号 78 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列を含む、実施形態 390、391、または 398 に記載の遺伝子操作された細胞。

40

【2128】

実施形態 II-400. 前記細胞外ヒンジドメインが、IgG4 ヒンジであるか、またはそれを含む、実施形態 390 または 391 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2129】

実施形態 II-401. 前記細胞外ヒンジドメインが前記第 1 の導入遺伝子によりコードされ、前記第 1 の導入遺伝子が配列番号 79 と少なくとも 80 % 同一な核酸配列を含む、実施形態 390、391、または 400 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2130】

実施形態 II-402. 前記第 1 の導入遺伝子が、細胞内ドメインをコードする 1 つ以上の核酸配列を更に含む、実施形態 346～401 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作さ

50

れた細胞。

【2131】

実施形態ⅠⅠ－４０３．前記細胞内ドメインが、ＣＤ４７細胞内ドメインまたはその一部であるか、またはそれを含む、実施形態４０２に記載の遺伝子操作された細胞。

【2132】

実施形態ⅠⅠ－４０４．前記細胞内ドメインが前記第１の導入遺伝子によりコードされ、前記第１の導入遺伝子が配列番号５５と少なくとも８０％同一な核酸配列を含む、実施形態４０２または４０３に記載の遺伝子操作された細胞。

【2133】

実施形態ⅠⅠ－４０５．前記細胞内ドメインが前記第１の導入遺伝子によりコードされ、前記第１の導入遺伝子が配列番号５９と少なくとも８０％同一な核酸配列を含む、実施形態４０２または４０３に記載の遺伝子操作された細胞。

10

【2134】

実施形態ⅠⅠ－４０６．前記細胞内ドメインが前記第１の導入遺伝子によりコードされ、前記第１の導入遺伝子が配列番号６３と少なくとも８０％同一な核酸配列を含む、実施形態４０２または４０３に記載の遺伝子操作された細胞。

【2135】

実施形態ⅠⅠ－４０７．前記細胞内ドメインが前記第１の導入遺伝子によりコードされ、前記第１の導入遺伝子が配列番号６４と少なくとも８０％同一な核酸配列を含む、実施形態４０２または４０３に記載の遺伝子操作された細胞。

20

【2136】

実施形態ⅠⅠ－４０８．前記細胞内ドメインが、ＣＤ８α細胞内ドメインまたはその一部であるか、またはそれを含む、実施形態４０２に記載の遺伝子操作された細胞。

【2137】

実施形態ⅠⅠ－４０９．前記細胞内ドメインが前記第１の導入遺伝子によりコードされ、前記第１の導入遺伝子が配列番号７０と少なくとも８０％同一な核酸配列を含む、実施形態４０２または４０８に記載の遺伝子操作された細胞。

【2138】

実施形態ⅠⅠ－４１０．前記細胞内ドメインが、ＣＤ２８細胞内ドメインまたはその一部であるか、またはそれを含む、実施形態４０２に記載の遺伝子操作された細胞。

30

【2139】

実施形態ⅠⅠ－４１１．前記細胞内ドメインが前記第１の導入遺伝子によりコードされ、前記第１の導入遺伝子が配列番号７２と少なくとも８０％同一な核酸配列を含む、実施形態４０２または４０３に記載の遺伝子操作された細胞。

【2140】

実施形態ⅠⅠ－４１２．前記細胞内ドメインが、ＰＤＧＦＲ細胞内ドメインまたはその一部であるか、またはそれを含む、実施形態４０２に記載の遺伝子操作された細胞。

【2141】

実施形態ⅠⅠ－４１３．前記細胞内ドメインが前記第１の導入遺伝子によりコードされ、前記第１の導入遺伝子が配列番号７４と少なくとも８０％同一な核酸配列を含む、実施形態４０２または４１２に記載の遺伝子操作された細胞。

40

【2142】

実施形態ⅠⅠ－４１４．前記細胞内ドメインが、野生型ＣＤ４７細胞内ドメインと比較して１種以上の改変を含む、実施形態４０２～４１３のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2143】

実施形態ⅠⅠ－４１５．前記細胞内ドメインが、野生型ＣＤ４７細胞内ドメインと比較して１種以上の欠失を含む、実施形態４０２～４１４のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2144】

50

実施形態ⅠⅠ－４１６．前記細胞内ドメインが、野生型ＣＤ４７細胞内ドメインと比較して１種以上の挿入を含む、実施形態４０２～４１４のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２１４５】

実施形態ⅠⅠ－４１７．前記細胞内ドメインが、野生型ＣＤ４７細胞内ドメインと比較して改変された機能を含む、実施形態４０２～４１６のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２１４６】

実施形態ⅠⅠ－４１８．前記細胞内ドメインが、野生型ＣＤ４７細胞内ドメインと比較して低減された機能を含む、実施形態４０２～４１７のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

10

【２１４７】

実施形態ⅠⅠ－４１９．前記細胞内ドメインが、野生型ＣＤ４７細胞内ドメインと比較して低減されたレベルのＣＤ４７細胞内シグナル伝達を含む、実施形態４０２～４１８のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２１４８】

実施形態ⅠⅠ－４２０．前記細胞内ドメインが、非機能的細胞内ドメインを含む、実施形態４０２～４１９のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２１４９】

実施形態ⅠⅠ－４２１．前記第１の導入遺伝子が、表３１から選択される配列と少なくとも８０％同一なアミノ酸配列を含む、実施形態３４６～４２０のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

20

【２１５０】

実施形態ⅠⅠ－４２２．前記第１の導入遺伝子が、配列番号１３と少なくとも８０％同一な核酸配列を含む、実施形態３４６～４２１のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２１５１】

実施形態ⅠⅠ－４２３．前記第１の導入遺伝子が、配列番号１４と少なくとも８０％同一な核酸配列を含む、実施形態３４６～４２１のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

30

【２１５２】

実施形態ⅠⅠ－４２４．前記第１の導入遺伝子が、配列番号１８と少なくとも８０％同一な核酸配列を含む、実施形態３４６～４２１のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２１５３】

実施形態ⅠⅠ－４２５．配列番号１３３と少なくとも８０％同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態３４６～４２１のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２１５４】

実施形態ⅠⅠ－４２６．配列番号１３４と少なくとも８０％同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態３４６～４２１のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

40

【２１５５】

実施形態ⅠⅠ－４２７．配列番号１３５と少なくとも８０％同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態３４６～４２１のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２１５６】

実施形態ⅠⅠ－４２８．配列番号１３６と少なくとも８０％同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態３４６～４２１のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２１５７】

実施形態ⅠⅠ－４２９．配列番号１３７と少なくとも８０％同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態３４６～４２１のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２１５８】

50

50

【2175】

実施形態ⅠⅠ－447．配列番号155と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態346～421のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2176】

実施形態ⅠⅠ－448．配列番号156と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態346～421のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2177】

実施形態ⅠⅠ－449．配列番号157と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態346～421のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2178】

実施形態ⅠⅠ－450．配列番号158と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態346～421のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2179】

実施形態ⅠⅠ－451．配列番号159と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態346～421のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2180】

実施形態ⅠⅠ－452．配列番号160と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態346～421のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2181】

実施形態ⅠⅠ－453．配列番号161と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態346～421のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2182】

実施形態ⅠⅠ－454．配列番号162と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態346～421のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2183】

実施形態ⅠⅠ－455．配列番号163と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態346～421のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2184】

実施形態ⅠⅠ－456．配列番号164と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態346～421のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2185】

実施形態ⅠⅠ－457．配列番号165と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態346～421のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2186】

実施形態ⅠⅠ－458．配列番号166と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態346～421のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2187】

実施形態ⅠⅠ－459．配列番号167と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態346～421のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2188】

実施形態ⅠⅠ－460．配列番号168と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態346～421のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2189】

実施形態ⅠⅠ－461．配列番号169と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態346～421のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2190】

実施形態ⅠⅠ－462．配列番号170と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態346～421のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2191】

実施形態ⅠⅠ－463．配列番号171と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を

10

20

30

40

50

含む、実施形態 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 1 9 2】

実施形態 I I - 4 6 4 . 配列番号 1 7 2 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 1 9 3】

実施形態 I I - 4 6 5 . 配列番号 1 7 3 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 1 9 4】

実施形態 I I - 4 6 6 . 配列番号 1 7 4 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

10

【2 1 9 5】

実施形態 I I - 4 6 7 . 配列番号 1 7 5 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 1 9 6】

実施形態 I I - 4 6 8 . 配列番号 1 7 6 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 1 9 7】

実施形態 I I - 4 6 9 . 配列番号 1 7 7 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 1 9 8】

実施形態 I I - 4 7 0 . 配列番号 1 7 8 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

20

【2 1 9 9】

実施形態 I I - 4 7 1 . 配列番号 1 7 9 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 2 0 0】

実施形態 I I - 4 7 2 . 配列番号 1 8 0 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 2 0 1】

実施形態 I I - 4 7 3 . 配列番号 1 8 1 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

30

【2 2 0 2】

実施形態 I I - 4 7 4 . 配列番号 1 8 2 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 2 0 3】

実施形態 I I - 4 7 5 . 配列番号 1 8 3 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 2 0 4】

実施形態 I I - 4 7 6 . 配列番号 1 8 4 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

40

【2 2 0 5】

実施形態 I I - 4 7 7 . 配列番号 1 8 5 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 2 0 6】

実施形態 I I - 4 7 8 . 配列番号 3 4 1 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 2 0 7】

実施形態 I I - 4 7 9 . 配列番号 3 4 2 と少なくとも 8 0 % 同一なヌクレオチド配列を含む、実施形態 3 4 6 ~ 4 2 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 2 0 8】

50

実施形態ⅠⅠ－４８０．前記第１の導入遺伝子が、表３３から選択される１つ以上の配列と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態３４６～４１３のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２２０９】

実施形態ⅠⅠ－４８１．前記第１の導入遺伝子が、表３３及び／または表３１から選択される１つ以上の配列と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態３４６のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２２１０】

実施形態ⅠⅠ－４８２．前記第１の導入遺伝子が、配列番号４９及び配列番号１４と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態３４６～４１３のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

10

【２２１１】

実施形態ⅠⅠ－４８３．前記第１の導入遺伝子が、配列番号１４と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態３４６～４１３のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２２１２】

実施形態ⅠⅠ－４８４．前記第１の導入遺伝子が、配列番号４９及び配列番号１３と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態３４６～４１３のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２２１３】

実施形態ⅠⅠ－４８５．前記第１の導入遺伝子が、配列番号１３と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態３４６～４１３のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

20

【２２１４】

実施形態ⅠⅠ－４８６．前記第１の導入遺伝子が、配列番号４９及び配列番号１８と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態３４６～４１３のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２２１５】

実施形態ⅠⅠ－４８７．前記第１の導入遺伝子が、配列番号１８と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態３４６～４１３のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

30

【２２１６】

実施形態ⅠⅠ－４８８．前記第１の導入遺伝子が、配列番号５１、５２、５４、５５、５６、及び５７と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態３４６～４１３のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２２１７】

実施形態ⅠⅠ－４８９．前記第１の導入遺伝子が、配列番号５１、５２、５４、５５、及び５６と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態３４６～４１３のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２２１８】

実施形態ⅠⅠ－４９０．前記第１の導入遺伝子が、配列番号５１、５２、５４、及び５５と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態３４６～４１３のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

40

【２２１９】

実施形態ⅠⅠ－４９１．前記第１の導入遺伝子が、配列番号５１、５２、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、及び６２と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態３４６～４１３のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２２２０】

実施形態ⅠⅠ－４９２．前記第１の導入遺伝子が、配列番号５１、５２、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、及び６１と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列

50

を含む、実施形態 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 2 2 1】

実施形態 I I - 4 9 3 . 前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 5 1、5 2、5 4、5 5、5 6、5 7、5 8、5 9、及び 6 0 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、実施形態 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 2 2 2】

実施形態 I I - 4 9 4 . 前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 5 1、5 2、5 4、5 5、5 6、5 7、5 8、及び 5 9 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、実施形態 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 2 2 3】

実施形態 I I - 4 9 5 . 前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 4 9、5 3、及び 6 5 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、実施形態 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 2 2 4】

実施形態 I I - 4 9 6 . 前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 5 3 及び 6 5 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、実施形態 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 2 2 5】

実施形態 I I - 4 9 7 . 前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 4 9、5 3、及び 6 6 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、実施形態 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 2 2 6】

実施形態 I I - 4 9 8 . 前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 5 3 及び 6 6 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、実施形態 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 2 2 7】

実施形態 I I - 4 9 9 . 前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 4 9、5 3、及び 6 7 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、実施形態 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 2 2 8】

実施形態 I I - 5 0 0 . 前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 5 3 及び 6 7 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、実施形態 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 2 2 9】

実施形態 I I - 5 0 1 . 前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 4 9、5 3、6 9、及び 7 0 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、実施形態 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 2 3 0】

実施形態 I I - 5 0 2 . 前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 5 3、6 9、及び 7 0 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、実施形態 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 2 3 1】

実施形態 I I - 5 0 3 . 前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 4 9、5 3、7 1、及び 7 2 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、実施形態 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 2 3 2】

実施形態 I I - 5 0 4 . 前記第 1 の導入遺伝子が、配列番号 5 3、7 1、及び 7 2 と少なくとも 8 0 % 同一な 1 つ以上の核酸配列を含む、実施形態 3 4 6 ~ 4 1 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 2 3 3】

10

20

30

40

50

実施形態ⅠⅠ－５０５．前記第１の導入遺伝子が、配列番号４９、５３、７３、及び７４と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態３４６～４１３のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２２３４】

実施形態ⅠⅠ－５０６．前記第１の導入遺伝子が、配列番号５３、７３、及び７４と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態３４６～４１３のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２２３５】

実施形態ⅠⅠ－５０７．前記第１の導入遺伝子が、配列番号４９、５２、７８、７３、及び７４と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態３４６～４１３のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

10

【２２３６】

実施形態ⅠⅠ－５０８．前記第１の導入遺伝子が、配列番号５２、７８、７３、及び７４と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態３４６～４１３のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２２３７】

実施形態ⅠⅠ－５０９．前記第１の導入遺伝子が、配列番号４９、５２、７９、７１、及び７２と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態３４６～４１３のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２２３８】

20

実施形態ⅠⅠ－５１０．前記第１の導入遺伝子が、配列番号５２、７９、７１、及び７２と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態３４６～４１３のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２２３９】

実施形態ⅠⅠ－５１１．前記第１の導入遺伝子が、配列番号４９、５２、７９、６９、及び７０と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態３４６～４１３のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２２４０】

実施形態ⅠⅠ－５１２．前記第１の導入遺伝子が、配列番号５２、７９、６９、及び７０と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態３４６～４１３のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

30

【２２４１】

実施形態ⅠⅠ－５１３．前記第１の導入遺伝子が、配列番号４９、５２、７７、７１、及び７２と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態３４６～４１３のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２２４２】

実施形態ⅠⅠ－５１４．前記第１の導入遺伝子が、配列番号５２、７７、７１、及び７２と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態３４６～４１３のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２２４３】

40

実施形態ⅠⅠ－５１５．前記第１の導入遺伝子が、配列番号４９、５２、７７、６９、及び７０と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態３４６～４１３のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２２４４】

実施形態ⅠⅠ－５１６．前記第１の導入遺伝子が、配列番号５２、７７、６９、及び７０と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態３４６～４１３のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２２４５】

実施形態ⅠⅠ－５１７．前記第１の導入遺伝子が、配列番号４９、５２、７６、７１、及び７２と少なくとも８０％同一な１つ以上の核酸配列を含む、実施形態３４６～４１３

50

のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2246】

実施形態ⅠⅠ－518．前記第1の導入遺伝子が、配列番号52、76、71、及び72と少なくとも80%同一な1つ以上の核酸配列を含む、実施形態346～413のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2247】

実施形態ⅠⅠ－519．前記第1の導入遺伝子が、配列番号49、52、76、69、及び70と少なくとも80%同一な1つ以上の核酸配列を含む、実施形態346～413のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2248】

実施形態ⅠⅠ－520．前記第1の導入遺伝子が、配列番号52、76、69、及び70と少なくとも80%同一な1つ以上の核酸配列を含む、実施形態346～413のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2249】

実施形態ⅠⅠ－521．前記第1の導入遺伝子が、配列番号49及び200と少なくとも80%同一な1つ以上の核酸配列を含む、実施形態346～413のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2250】

実施形態ⅠⅠ－522．前記第1の導入遺伝子が、配列番号50及び200と少なくとも80%同一な1つ以上の核酸配列を含む、実施形態346～413のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2251】

実施形態ⅠⅠ－523．前記第1の導入遺伝子が、配列番号200と少なくとも80%同一な1つ以上の核酸配列を含む、実施形態346～413のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2252】

実施形態ⅠⅠ－524．ゲノムの第1の挿入部位に前記第1の導入遺伝子を含む、請求項346～523のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2253】

実施形態ⅠⅠ－525．前記第1の挿入部位が、T細胞受容体（TCR）遺伝子座である、実施形態524に記載の遺伝子操作された細胞。

【2254】

実施形態ⅠⅠ－526．前記TCR遺伝子座が、TRAC遺伝子座、TRBC1遺伝子座、またはTRBC2遺伝子座であるか、またはそれを含む、実施形態525に記載の遺伝子操作された細胞。

【2255】

実施形態ⅠⅠ－527．前記第1の挿入部位が、β2ミクログロブリン（B2M）遺伝子座である、実施形態525に記載の遺伝子操作された細胞。

【2256】

実施形態ⅠⅠ－528．前記第1の挿入部位が、クラスⅡトランス活性化因子（CIITA）遺伝子座である、実施形態525に記載の遺伝子操作された細胞。

【2257】

実施形態ⅠⅠ－529．前記第1の挿入部位が、セーフハーバー遺伝子座である、実施形態525に記載の遺伝子操作された細胞。

【2258】

実施形態ⅠⅠ－530．前記セーフハーバー遺伝子座が、AAVS1、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1、MICA、MICB、RHD、ROSA26、またはSHS231遺伝子座である、実施形態529に記載の遺伝子操作された細胞。

【2259】

10

20

30

40

50

実施形態ⅠⅠ－５３１．前記第１の挿入部位がエキソンである、実施形態５２５～５３０のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２２６０】

実施形態ⅠⅠ－５３２．前記第１の挿入部位がイントロンである、実施形態５２５～５３０のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２２６１】

実施形態ⅠⅠ－５３３．前記第１の挿入部位がイントロンとエキソンとの間に存在する、実施形態５２５～５３０のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２２６２】

実施形態ⅠⅠ－５３４．前記第１の挿入部位が制御領域に存在する、実施形態５２５～５３０のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２２６３】

実施形態ⅠⅠ－５３５．前記遺伝子操作された細胞が、前記遺伝子操作されたタンパク質の細胞表面発現を有する、実施形態３４６～５３４のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２２６４】

実施形態ⅠⅠ－５３６．前記遺伝子操作された細胞が、遺伝子操作されなかった同等の細胞と比較して減少したＴＣＲの細胞表面発現を有する、実施形態３４６～５３５のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２２６５】

実施形態ⅠⅠ－５３７．前記遺伝子操作された細胞が、遺伝子操作されなかった同等の細胞と比較して減少したＢ２Ｍの細胞表面発現を有する、実施形態３４６～５３６のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２２６６】

実施形態ⅠⅠ－５３８．前記遺伝子操作された細胞が、遺伝子操作されなかった同等の細胞と比較して減少したＣＩＩＴＡの発現を有する、実施形態３４６～５３７のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２２６７】

実施形態ⅠⅠ－５３９．前記遺伝子操作された細胞が、ＴＣＲ遺伝子座、Ｂ２Ｍ遺伝子座、ＴＡＰⅠ遺伝子座、ＮＬＲＣ５遺伝子座、ＣＩＩＴＡ遺伝子座、ＨＬＡ－Ａ遺伝子座、ＨＬＡ－Ｂ遺伝子座、ＨＬＡ－Ｃ遺伝子座、ＨＬＡ－ＤＰ遺伝子座、ＨＬＡ－ＤＭ遺伝子座、ＨＬＡ－ＤＯＡ遺伝子座、ＨＬＡ－ＤＯＢ遺伝子座、ＨＬＡ－ＤＱ遺伝子座、ＨＬＡ－ＤＲ遺伝子座、ＲＦＸ５遺伝子座、ＲＦＸＡＮＫ遺伝子座、ＲＦＸＡＰ遺伝子座、ＮＦＹ－Ａ遺伝子座、ＮＦＹ－Ｂ遺伝子座、ＮＦＹ－Ｃ遺伝子座、またはそれらの組み合わせでの改変を含む、実施形態３４６～５３８のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２２６８】

実施形態ⅠⅠ－５４０．前記遺伝子操作された細胞が、ＨＬＡ－Ａ遺伝子座、ＨＬＡ－Ｂ遺伝子座、ＨＬＡ－Ｃ遺伝子座、またはそれらの組み合わせをノックアウトするように遺伝子操作されている、実施形態３４６～５３９のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２２６９】

実施形態ⅠⅠ－５４１．前記遺伝子操作された細胞が、ＨＬＡ－ＤＭ遺伝子座、ＨＬＡ－ＤＯ遺伝子座、ＨＬＡ－ＤＰ遺伝子座、ＨＬＡ－ＤＱ遺伝子座、ＨＬＡ－ＤＲ遺伝子座、またはそれらの組み合わせをノックアウトするように遺伝子操作されている、実施形態３４６～５３９のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２２７０】

実施形態ⅠⅠ－５４２．前記遺伝子操作された細胞が、ＴＣＲ遺伝子座をノックアウトするように遺伝子操作されている、実施形態３４６～５４１のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

10

20

30

40

50

【2271】

実施形態ⅠⅠ－543．前記遺伝子操作された細胞が、B2M遺伝子座をロックアウトするように遺伝子操作されている、実施形態346～542のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2272】

実施形態ⅠⅠ－544．前記遺伝子操作された細胞が、CIITA遺伝子座をロックアウトするように遺伝子操作されている、実施形態346～543のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2273】

実施形態ⅠⅠ－545．前記細胞が、

(a) 1種以上の主要組織適合複合体(MHC)クラスⅠ分子、もしくは前記1種以上のMHCクラスⅠ分子の発現を調節する1種以上の分子、及び／または

(b) 1種以上のMHCクラスⅡ分子、もしくは前記1種以上のMHCクラスⅡ分子の発現を調節する1種以上の分子

の1つ以上のアレルを不活性化または破壊する1種以上の改変を含む、実施形態346～544のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2274】

実施形態ⅠⅠ－546．前記細胞が、1種以上のMHCクラスⅠ分子、または前記1種以上のMHCクラスⅠ分子の発現を調節する1種以上の分子の1つ以上のアレルを不活性化または破壊する1種以上の改変を含む、実施形態346～545のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2275】

実施形態ⅠⅠ－547．前記細胞が、1種以上のMHCクラスⅡ分子、または前記1種以上のMHCクラスⅡ分子の発現を調節する1種以上の分子の1つ以上のアレルを不活性化または破壊する1種以上の改変を含む、実施形態346～546のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2276】

実施形態ⅠⅠ－548．前記細胞が、

(a) 1種以上のMHCクラスⅠ分子、または前記1種以上のMHCクラスⅠ分子の発現を調節する1種以上の分子、及び

(b) 1種以上のMHCクラスⅡ分子、または前記1種以上のMHCクラスⅡ分子の発現を調節する1種以上の分子

の1つ以上のアレルを不活性化または破壊する1種以上の改変を含む、実施形態346～547のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2277】

実施形態ⅠⅠ－549．前記1種以上の改変が、前記1種以上のMHCクラスⅠ分子の細胞表面タンパク質発現を低減する、実施形態346～548のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2278】

実施形態ⅠⅠ－550．前記1種以上の改変が、前記1種以上のMHCクラスⅠ分子の細胞表面輸送を低減する、実施形態346～549のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2279】

実施形態ⅠⅠ－551．前記1種以上の改変が、前記1種以上のMHCクラスⅠ分子の機能を低減し、任意により、前記機能が抗原提示である、実施形態346～550のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2280】

実施形態ⅠⅠ－552．前記1種以上のMHCクラスⅠ分子が、1種以上のヒト白血球抗原(HLA)クラスⅠ分子である、実施形態346～551のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

10

20

30

40

50

【2281】

実施形態ⅠⅠ－553．前記1種以上のHLAクラスⅠ分子が、HLA－A、HLA－B、及びHLA－Cからなる群から選択される、実施形態552に記載の遺伝子操作された細胞。

【2282】

実施形態ⅠⅠ－554．前記1種以上のMHCクラスⅠ分子の発現を調節する前記1種以上の分子が、B2M、NLRC5、及びTAP1からなる群から選択される、実施形態346～551のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2283】

実施形態ⅠⅠ－555．前記1種以上の改変が、前記1種以上のMHCクラスⅠⅠ分子の細胞表面タンパク質発現を低減する、実施形態346～554のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

10

【2284】

実施形態ⅠⅠ－556．前記1種以上の改変が、前記1種以上のMHCクラスⅠⅠ分子の細胞表面輸送を低減する、実施形態346～555のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2285】

実施形態ⅠⅠ－557．前記1種以上の改変が、前記1種以上のMHCクラスⅠⅠ分子の機能を低減し、任意により、前記機能が抗原提示である、実施形態346～556のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

20

【2286】

実施形態ⅠⅠ－558．前記1種以上のMHCクラスⅠⅠ分子が、1種以上のヒト白血球抗原（HLA）クラスⅠⅠ分子である、実施形態346～557のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2287】

実施形態ⅠⅠ－559．前記1種以上のHLAクラスⅠⅠ分子が、HLA－DP、HLA－DQ、及び／またはHLA－DRからなる群から選択される、実施形態558に記載の遺伝子操作された細胞。

【2288】

実施形態ⅠⅠ－560．前記1種以上のMHCクラスⅠⅠ分子の発現を調節する前記1種以上の分子が、CIITA及びCD74からなる群から選択される、実施形態346～557のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

30

【2289】

実施形態ⅠⅠ－561．免疫寛容誘導因子をコードする第2の導入遺伝子を更に含む、実施形態346～547のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2290】

実施形態ⅠⅠ－562．前記免疫寛容誘導因子が、A20／TNFAIP3、B2M－HLA－E、CD16、CD16Fc受容体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、CD52、CD55、CD59、CD64、CD200、CCL21、CCL22、CTLA4－Ig、C1阻害因子、CR1、DUX4、FASL、HLA－C、HLA－E、HLA－E重鎖、HLA－F、HLA－G、H2－M3、IDO1、IL－10、IL15－RF、IL－35、IL－39、MANF、Mfge8、PD－L1、またはSerpinb9であるか、またはそれを含む、実施形態561に記載の遺伝子操作された細胞。

40

【2291】

実施形態ⅠⅠ－563．前記免疫寛容誘導因子をコードする前記第2の導入遺伝子が、TCR遺伝子座の挿入部位で挿入されている、実施形態561または562に記載の遺伝子操作された細胞。

【2292】

実施形態ⅠⅠ－564．前記免疫寛容誘導因子をコードする前記第2の導入遺伝子が、

50

B 2 M 遺伝子座の挿入部位で挿入されている、実施形態 5 6 1 または 5 6 2 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 2 9 3】

実施形態 I I - 5 6 5 . 前記免疫寛容誘導因子をコードする前記第 2 の導入遺伝子が、C I I T A 遺伝子座の挿入部位で挿入されている、実施形態 5 6 1 または 5 6 2 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 2 9 4】

実施形態 I I - 5 6 6 . 前記免疫寛容誘導因子をコードする前記第 2 の導入遺伝子が、セーフハーバー遺伝子座の挿入部位で挿入されている、実施形態 5 6 1 または 5 6 2 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 2 9 5】

実施形態 I I - 5 6 7 . 前記セーフハーバー遺伝子座が、A A V S 1、A B O、C C R 5、C L Y B L、C X C R 4、F 3、F U T 1、H M G B 1、K D M 5 D、L R P 1、M I C A、M I C B、R H D、R O S A 2 6、または S H S 2 3 1 遺伝子座である、実施形態 5 6 6 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 2 9 6】

実施形態 I I - 5 6 8 . 前記遺伝子操作された細胞が、前記免疫寛容誘導因子の細胞表面発現を有する、実施形態 5 6 1 ~ 5 6 5 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 2 9 7】

実施形態 I I - 5 6 9 . キメラ抗原受容体 (C A R) をコードする第 3 の導入遺伝子を更に含む、実施形態 3 4 6 ~ 5 6 8 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 2 9 8】

実施形態 I I - 5 7 0 . 前記 C A R が、C D 5 特異的 C A R、C D 1 9 特異的 C A R、C D 2 0 特異的 C A R、C D 2 2 特異的 C A R、C D 2 3 特異的 C A R、C D 3 0 特異的 C A R、C D 3 3 特異的 C A R、C D 3 8 特異的 C A R、C D 7 0 特異的 C A R、C D 1 2 3 特異的 C A R、C D 1 3 8 特異的 C A R、 κ 、 λ 、B 細胞成熟物質 (B C M A) 特異的 C A R、G タンパク質共役受容体ファミリー C グループ 5 メンバー D (G P R C 5 D) 特異的 C A R、C D 1 2 3 特異的 C A R、L e Y 特異的 C A R、N K G 2 D リガンド特異的 C A R、W T 1 特異的 C A R、G D 2 特異的 C A R、H E R 2 特異的 C A R、E G F R 特異的 C A R、E G F R v I I I 特異的 C A R、B 7 H 3 特異的 C A R、P S M A 特異的 C A R、P S C A 特異的 C A R、C A I X 特異的 C A R、C D 1 7 1 特異的 C A R、C E A 特異的 C A R、C S P G 4 特異的 C A R、E P H A 2 特異的 C A R、F A P 特異的 C A R、F R α 特異的 C A R、I L - 1 3 R α 特異的 C A R、メソテリン特異的 C A R、M U C 1 特異的 C A R、M U C 1 6 特異的 C A R、R O R 1 特異的 C A R、C - M e t 特異的 C A R、C D 1 3 3 特異的 C A R、E p - C A M 特異的 C A R、G P C 3 特異的 C A R、H P V 1 6 - E 6 特異的 C A R、I L 1 3 R α 2 特異的 C A R、M A G E A 3 特異的 C A R、M A G E A 4 特異的 C A R、M A R T 1 特異的 C A R、N Y - E S O - 1 特異的 C A R、V E G F R 2 特異的 C A R、 α 葉酸受容体特異的 C A R、C D 2 4 特異的 C A R、C D 4 4 v 7 / 8 特異的 C A R、E G P - 2 特異的 C A R、E G P - 4 0 特異的 C A R、e r b - B 2 特異的 C A R、e r b - B 2, 3, 4 特異的 C A R、F B P 特異的 C A R、胎児アセチルコリン受容体特異的 C A R、G D 2 特異的 C A R、G D 3 特異的 C A R、H M W - M A A 特異的 C A R、I L - 1 1 R α 特異的 C A R、K D R 特異的 C A R、ルイス Y 特異的 C A R、L 1 細胞接着分子特異的 C A R、M A G E - A 1 特異的 C A R、癌胎児性抗原 (h 5 T 4) 特異的 C A R、T A G - 7 2 特異的 C A R、または C D 1 9 / C D 2 2 二重特異性 C A R であるか、またはそれを含む、実施形態 5 6 9 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 2 9 9】

実施形態 I I - 5 7 1 . 前記 C A R が、C D 1 9 特異的 C A R、C D 2 0 特異的 C A R、C D 2 2 特異的 C A R、C D 3 8 特異的 C A R、C D 1 2 3 特異的 C A R、C D 1 3 8

10

20

30

40

50

特異的 C A R、B C M A 特異的 C A R、または C D 1 9 / C D 2 2 二重特異性 C A R であるか、またはそれを含む、実施形態 5 6 9 または 5 7 0 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2300】

実施形態 I I - 5 7 2 . 前記遺伝子操作された細胞が、前記 C A R の細胞表面発現を有する、実施形態 5 6 9 ~ 5 7 1 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2301】

実施形態 I I - 5 7 3 . キメラ自己抗原受容体 (C A A R) をコードする第 3 の導入遺伝子を更に含む、実施形態 3 4 6 ~ 5 6 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2302】

実施形態 I I - 5 7 4 . 前記 C A A R が、膵 β 細胞抗原、滑膜関節抗原、ミエリン塩基性タンパク質、プロテオリピドタンパク質、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質、M u S K、ケラチノサイト接着タンパク質デスモグレイン 3 (D s g 3)、R o - R N P 複合体、L a 抗原、ミエロペルオキシダーゼ、プロテインナーゼ 3、カルジオリピン、シトルリン化タンパク質、カルバミル化タンパク質、及び基底膜コラーゲンの $\alpha 3$ 鎖からなる群から選択される抗原を含む、実施形態 5 7 3 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2303】

実施形態 I I - 5 7 5 . 前記遺伝子操作された細胞が、前記 C A A R の細胞表面発現を有する、実施形態 5 7 3 または 5 7 4 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2304】

実施形態 I I - 5 7 6 . B 細胞自己抗体受容体 (B A R) をコードする第 3 の導入遺伝子を更に含む、実施形態 3 4 6 ~ 5 6 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2305】

実施形態 I I - 5 7 7 . 前記遺伝子操作された細胞が、前記 B A R の細胞表面発現を有する、実施形態 5 7 6 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2306】

実施形態 I I - 5 7 8 . 前記第 3 の導入遺伝子がセーフハーバー遺伝子座に挿入されている、実施形態 5 6 9 ~ 5 7 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2307】

実施形態 I I - 5 7 9 . 前記第 3 の導入遺伝子が、T R A C 遺伝子座、T R B C 1 遺伝子座、T R B C 2 遺伝子座、B 2 M 遺伝子座、C I I T A 遺伝子座、M I C A 遺伝子座、M I C B 遺伝子座、またはセーフハーバー遺伝子座に挿入されている、実施形態 5 6 9 ~ 5 7 8 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2308】

実施形態 I I - 5 8 0 . 前記第 3 の導入遺伝子が、A A V S 1 遺伝子座、A B O 遺伝子座、C C R 5 遺伝子座、C L Y B L 遺伝子座、C X C R 4 遺伝子座、F 3 遺伝子座、F U T 1 遺伝子座、H M G B 1 遺伝子座、K D M 5 D 遺伝子座、L R P 1 遺伝子座、R H D 遺伝子座、R O S A 2 6 遺伝子座、または S H S 2 3 1 遺伝子座に挿入されている、実施形態 5 6 9 ~ 5 7 9 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2309】

実施形態 I I - 5 8 1 . 前記第 1 の導入遺伝子及び前記第 2 の導入遺伝子が、同じ挿入部位に挿入されている、実施形態 3 4 6 ~ 5 6 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2310】

実施形態 I I - 5 8 2 . 前記第 1 の導入遺伝子及び前記第 3 の導入遺伝子が、同じ挿入部位に挿入されている、実施形態 3 4 6 ~ 5 6 6 または 5 7 6 ~ 5 8 0 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2311】

実施形態 I I - 5 8 3 . 前記第 2 の導入遺伝子及び前記第 3 の導入遺伝子が、同じ挿入部位に挿入されている、実施形態 5 6 1 ~ 5 8 0 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作され

10

20

30

40

50

た細胞。

【2312】

実施形態ⅠⅠ－584．前記第1の導入遺伝子、前記第2の導入遺伝子、及び前記第3の導入遺伝子が、同じ挿入部位に挿入されている、実施形態346～580のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2313】

実施形態ⅠⅠ－585．前記第1の導入遺伝子、前記第2の導入遺伝子、及び前記第3の導入遺伝子が、3種の別個の構築物によりコードされる、実施形態346～584のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2314】

実施形態ⅠⅠ－586．前記第1の導入遺伝子、前記第2の導入遺伝子、及び前記第3の導入遺伝子が、2種の別個の構築物によりコードされる、実施形態346～584のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2315】

実施形態ⅠⅠ－587．前記第1の導入遺伝子、前記第2の導入遺伝子、及び前記第3の導入遺伝子が、多シストロン性構築物によりコードされる、実施形態346～584のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2316】

実施形態ⅠⅠ－588．前記第1の導入遺伝子及び／または前記第2の導入遺伝子及び／または前記第3の導入遺伝子が、ゲノム編集複合体をコードする、実施形態346～587のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2317】

実施形態ⅠⅠ－589．前記ゲノム編集複合体が、ゲノム標的化物質及びゲノム改変物質を含む、実施形態588に記載の遺伝子操作された細胞。

【2318】

実施形態ⅠⅠ－590．前記ゲノム標的化物質が核酸誘導型標的化物質である、実施形態589に記載の遺伝子操作された細胞。

【2319】

実施形態ⅠⅠ－591．前記ゲノム標的化物質が、配列特異的ヌクレアーゼ、核酸によりプログラム化可能なDNA結合タンパク質、RNA誘導型ヌクレアーゼ、Casヌクレアーゼ及びガイドRNAを含むRNA誘導型ヌクレアーゼ（CRISPR-Casの組み合わせ）、gRNA及びCasヌクレアーゼを含むリボ核タンパク質（RNP）複合体、ホーミングエンドヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZF）核酸結合性物質、転写活性化因子様エフェクター（TALE）核酸結合性物質、メガヌクレアーゼ、Casヌクレアーゼ、コアCasタンパク質、ホーミングエンドヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ欠損Casタンパク質、酵素的に不活性なCasタンパク質、CRISPR関連トランスポザゼ（CAST）、ⅠⅠ型もしくはⅤ型Casタンパク質、またはそれらの機能部分からなる群から選択される、実施形態589または590に記載の遺伝子操作された細胞。

【2320】

実施形態ⅠⅠ－592．前記ゲノム標的化物質が、Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a（Cpf1）、Cas12b（C2c1）、Cas12c（C2c3）、Cas12d（CasY）、Cas12e（CasX）、Cas12f（C2c10）、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k（C2c5）、Cas13、Cas13a（C2c2）、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr1、Cmr2、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csd1、Csd2、Cas5d、Cse1、Cse2、Cse3、Cse4、Cas5e、Csf1、Csm1、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csn1、Csn2、Cst1、Cst2、Cas5t、Csh1、Csh2、

10

20

30

40

50

Cas5h、Csa1、Csa2、Csa3、Csa4、Csa5、Cas5a、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3、Csy4、Mad7、SpCas9、SpCas9のeSpCas9、SpCas9-HF1、HypaSpCas9、HeFSpCas9、及びevoSpCas9高忠実度バリエーション、SaCas9、NmeCas9、CjCas9、StCas9、TdCas9、LbCas12a、AsCas12a、AacCas12b、BhCas12bv4、TnpB、dCas(D10A)、dCas(H840A)、dCas13a、dCas13b、またはそれらの機能部分からなる群から選択される、実施形態589～591のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2321】

実施形態II-593．前記ゲノム改変物質が、標的遺伝子座を開裂するか、脱アミノ化するか、それにニックを入れるか、それを重合させるか、調査するか、融合させるか、切断するか、ほどこか、破壊するか、変化させるか、メチル化するか、脱メチル化するか、または別様に不安定化する、実施形態589～592のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2322】

実施形態II-594．前記ゲノム改変物質が、リコンビナーゼ、インテグラーゼ、トランスポザーゼ、エンドヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼ、ニッカーゼ、ヘリカーゼ、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、逆転写酵素、デアミナーゼ、フリッパーゼ、メチラーゼ、デメチラーゼ、アセチラーゼ、核酸修飾タンパク質、RNA修飾タンパク質、DNA修飾タンパク質、アルゴノートタンパク質、エピジェネティック修飾タンパク質、ヒストン修飾タンパク質、またはそれらの機能部分を含む、実施形態589～593のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2323】

実施形態II-595．前記ゲノム改変物質が、配列特異的ヌクレアーゼ、核酸によりプログラム化可能なDNA結合タンパク質、RNA誘導型ヌクレアーゼ、Casヌクレアーゼ及びガイドRNAを含むRNA誘導型ヌクレアーゼ(CRISPR-Casの組み合わせ)、gRNA及びCasヌクレアーゼを含むリボ核タンパク質(RNP)複合体、ホーミングエンドヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、メガヌクレアーゼ、Casヌクレアーゼ、コアCasタンパク質、TnpBヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ欠損Casタンパク質、酵素的に不活性なCasタンパク質、CRISPR関連トランスポザーゼ(CAST)、II型もしくはV型Casタンパク質、塩基編集、プライム編集、部位特異的標的化エレメントによるプログラム化可能な付加(PASTE)、またはそれらの機能部分からなる群から選択される、実施形態589～594のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2324】

実施形態II-596．前記ゲノム改変物質が、Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a(Cpf1)、Cas12b(C2c1)、Cas12c(C2c3)、Cas12d(CasY)、Cas12e(CasX)、Cas12f(C2c10)、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k(C2c5)、Cas13、Cas13a(C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr1、Cmr2、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csd1、Csd2、Cas5d、Cse1、Cse2、Cse3、Cse4、Cas5e、Csf1、Csm1、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csn1、Csn2、Cst1、Cst2、Cas5t、Csh1、Csh2、Cas5h、Csa1、Csa2、Csa3、Csa4、Csa5、Cas5a、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3、Csy4、Mad7、SpCas9、SpCas9のeSpCas9、SpCas9-HF1、HypaSpCas9、HeF

10

20

30

40

50

S p C a s 9、及び e v o S p C a s 9 高忠実度バリエーション、S a C a s 9、N m e C a s 9、C j C a s 9、S t C a s 9、T d C a s 9、L b C a s 1 2 a、A s C a s 1 2 a、A a c C a s 1 2 b、B h C a s 1 2 b v 4、T n p B、F o k I、d C a s (D 1 0 A)、d C a s (H 8 4 0 A)、d C a s 1 3 a、d C a s 1 3 b、塩基エディター、プライムエディター、標的プライムド逆転写 (T P R T) エディター、A P O B E C 1、シチジンデアミナーゼ、アデノシンデアミナーゼ、ウラシルグリコシラーゼ阻害剤 (U G I)、アデニン塩基エディター (A B E)、シトシン塩基エディター (C B E)、逆転写酵素、セリンインテグラーゼ、リコンビナーゼ、トランスポザーゼ、ポリメラーゼ、アデニン→チミンもしくは「A T B E」(またはチミン→アデニンもしくは「T A B E」) トランスバージョン塩基エディター、1 0 - 1 1 転座メチルシトシンジオキシゲナーゼ (T E T)、T E T 1、T E T 3、T E T 1 C D、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ p 3 0 0、ヒストンメチルトランスフェラーゼ S M Y D 3、ヒストンメチルトランスフェラーゼ P R D M 9、H 3 K 7 9 メチルトランスフェラーゼ D O T 1 L、転写抑制因子、またはそれらの機能部分からなる群から選択される、実施形態 5 8 9 ~ 5 9 5 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

10

【2 3 2 5】

実施形態 I I - 5 9 7 . 前記ゲノム標的化物質及び前記ゲノム改変物質が、単一のポリペプチドの異なるドメインである、実施形態 5 8 9 ~ 5 9 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

20

【2 3 2 6】

実施形態 I I - 5 9 8 . 前記ゲノム標的化物質及び前記ゲノム改変物質が、互いに作動可能に連結されている 2 つの異なるポリペプチドである、実施形態 5 8 9 ~ 5 9 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 3 2 7】

実施形態 I I - 5 9 9 . 前記ゲノム標的化物質及び前記ゲノム改変物質が、互いに連結されていない 2 つの異なるポリペプチドである、実施形態 5 8 9 ~ 5 9 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 3 2 8】

実施形態 I I - 6 0 0 . 前記ゲノム編集複合体が、少なくとも 1 つの標的遺伝子座に相補的な標的化ドメインを有するガイド核酸を含み、任意により、前記ガイド核酸がガイド R N A (g R N A) である、実施形態 5 8 9 ~ 5 9 9 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

30

【2 3 2 9】

実施形態 I I - 6 0 1 . 前記ゲノム編集複合体が R N A 誘導型ヌクレアーゼを含む、実施形態 5 8 8 ~ 5 9 8 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 3 3 0】

実施形態 I I - 6 0 2 . 前記 R N A 誘導型ヌクレアーゼが C a s ヌクレアーゼを含む、実施形態 6 0 1 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 3 3 1】

実施形態 I I - 6 0 3 . 前記ゲノム編集複合体が、C a s ヌクレアーゼ及び g R N A を含むリボ核タンパク質 (R N P) 複合体を含む、実施形態 6 0 2 に記載の遺伝子操作された細胞。

40

【2 3 3 2】

実施形態 I I - 6 0 4 . 前記 C a s ヌクレアーゼが、I I 型または V 型 C a s タンパク質である、実施形態 6 0 2 または 6 0 3 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2 3 3 3】

実施形態 I I - 6 0 5 . 前記 C a s ヌクレアーゼが、C a s 3、C a s 4、C a s 5、C a s 8 a、C a s 8 b、C a s 8 c、C a s 9、C a s 1 0、C a s 1 2、C a s 1 2 a (C p f 1)、C a s 1 2 b (C 2 c 1)、C a s 1 2 c (C 2 c 3)、C a s 1 2 d (C a s Y)、C a s 1 2 e (C a s X)、C a s 1 2 f (C 2 c 1 0)、C a s 1 2 g

50

、Cas12h、Cas12i、Cas12k (C2c5)、Cas13、Cas13a (C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr5、Cse1、Cse2、Csf1、Csm2、Csn2、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3、及びMad7からなる群から選択される、実施形態602～604のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2334】

実施形態II-606．前記遺伝子操作された細胞が、ヒト細胞または非ヒト動物細胞である、実施形態346～587のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2335】

実施形態II-607．前記非ヒト動物細胞が、ブタ、ウシ、またはヒツジ細胞である、実施形態606に記載の遺伝子操作された細胞。

10

【2336】

実施形態II-608．前記遺伝子操作された細胞がヒト細胞である、実施形態606に記載の遺伝子操作された細胞。

【2337】

実施形態II-609．前記遺伝子操作された細胞が、幹細胞または前駆細胞に由来する分化した細胞である、実施形態346～608のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2338】

実施形態II-610．前記幹細胞が多能性幹細胞である、実施形態609に記載の遺伝子操作された細胞。

20

【2339】

実施形態II-611．前記多能性幹細胞が人工多能性幹細胞 (iPSC) である、実施形態610に記載の遺伝子操作された細胞。

【2340】

実施形態II-612．前記多能性幹細胞が胚性幹細胞 (ESC) である、実施形態610に記載の遺伝子操作された細胞。

【2341】

実施形態II-613．前記細胞がドナーから単離された初代細胞である、実施形態346～612のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

30

【2342】

実施形態II-614．前記ドナーが、前記初代細胞が前記ドナーから採取される時点で健常であり、及び／または疾患もしくは病態を有すると疑われていない、実施形態613に記載の遺伝子操作された細胞。

【2343】

実施形態II-615．前記遺伝子操作された細胞が、複数のドナーから単離された初代細胞の集団の一部である、実施形態346～614のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2344】

実施形態II-616．前記複数のドナーが、前記初代細胞が前記ドナーから採取される時点で健常であり、及び／または疾患もしくは病態を有すると疑われていない、実施形態346～615のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

40

【2345】

実施形態II-617．前記細胞が、島細胞、β 膵島細胞、膵島細胞、免疫細胞、B細胞、T細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞、ナチュラルキラーT (NKT) 細胞、マクロファージ細胞、内皮細胞、筋細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、骨格筋細胞、ドーパミン作動性ニューロン、網膜色素上皮細胞、視細胞、肝実質細胞、甲状腺細胞、皮膚細胞、グリア前駆細胞、神経細胞、心臓細胞、幹細胞、造血幹細胞、人工多能性幹細胞 (iPSC)、間葉系幹細胞 (MSC)、胚性幹細胞 (ESC)、多能性幹細胞 (PSC)、血液細胞、またはそれらの組み合わせである、実施形態346～616のいずれか1項に記載の遺

50

伝子操作された細胞。

【2346】

実施形態ⅠⅠ－618．前記細胞がT細胞である、実施形態346～617のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2347】

実施形態ⅠⅠ－619．前記T細胞が、CD3＋T細胞、CD4＋T細胞、CD8＋T細胞、ナイーブT細胞、制御性T（Treg）細胞、非制御性T細胞、Th1細胞、Th2細胞、Th9細胞、Th17細胞、濾胞性ヘルパーT（Tfh）細胞、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）、エフェクターT（Teff）細胞、セントラルメモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞、CD45RAを発現するエフェクターメモリーT細胞（TEMRA細胞）、組織常在性メモリー（Tm）細胞、バーチャルメモリーT細胞、自然免疫メモリーT細胞、メモリー幹細胞（Tsc）、 $\gamma\delta$ T細胞、またはそれらの組み合わせである、実施形態618に記載の遺伝子操作された細胞。

10

【2348】

実施形態ⅠⅠ－620．前記T細胞が、細胞傷害性T細胞、ヘルパーT細胞、メモリーT細胞、制御性T細胞、腫瘍浸潤リンパ球、またはそれらの組み合わせである、実施形態618または619に記載の遺伝子操作された細胞。

【2349】

実施形態ⅠⅠ－621．前記細胞がヒトT細胞である、実施形態618～620のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

20

【2350】

実施形態ⅠⅠ－622．前記細胞が自家T細胞である、実施形態618～621のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2351】

実施形態ⅠⅠ－623．前記細胞が同種異系T細胞である、実施形態618～621のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2352】

実施形態ⅠⅠ－624．前記同種異系T細胞が初代T細胞である、実施形態623に記載の遺伝子操作された細胞。

【2353】

実施形態ⅠⅠ－625．前記同種異系T細胞が、胚性幹細胞（ESC）または人工多能性幹細胞（iPSC）から分化している、実施形態623または624に記載の遺伝子操作された細胞。

30

【2354】

実施形態ⅠⅠ－626．前記遺伝子操作されたタンパク質が、前記遺伝子操作された細胞と同じ細胞種の対照細胞における内在性CD47タンパク質と比べて少なくとも約1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、25倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、150倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、1100倍、1200倍、1300倍、1400倍、1500倍、2000倍、2500倍、3000倍、3500倍、4000倍、4500倍、または5000倍を超えるレベルで前記遺伝子操作された細胞において発現される、実施形態346～625のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

40

【2355】

実施形態ⅠⅠ－627．前記遺伝子操作されたタンパク質が、前記遺伝子操作された細胞と同じ細胞種の対照細胞における内在性CD47タンパク質と比べて少なくとも約1倍～少なくとも約15倍を超えるレベルで前記遺伝子操作された細胞において発現される、実施形態346～625のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2356】

実施形態ⅠⅠ－628．前記遺伝子操作されたタンパク質が、前記遺伝子操作された細胞

50

胞と同じ細胞種の対照細胞における内在性CD47タンパク質と比べて少なくとも約1倍～少なくとも約10倍を超えるレベルで前記遺伝子操作された細胞において発現される、実施形態346～625のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2357】

実施形態II-629. 前記遺伝子操作されたタンパク質が、前記遺伝子操作された細胞と同じ細胞種の対照細胞における内在性CD47タンパク質と比べて少なくとも約1倍～少なくとも約5倍を超えるレベルで前記遺伝子操作された細胞において発現される、実施形態346～625のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2358】

実施形態II-630. 前記遺伝子操作されたタンパク質が、前記遺伝子操作された細胞と同じ細胞種の対照細胞における内在性CD47タンパク質と比べて少なくとも約3倍～少なくとも約4倍を超えるレベルで前記遺伝子操作された細胞において発現される、実施形態346～625のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

10

【2359】

実施形態II-631. 前記遺伝子操作されたタンパク質が、前記遺伝子操作された細胞と同じ細胞種の対照細胞における内在性CD47タンパク質と比べて少なくとも約3倍～少なくとも約10倍を超えるレベルで前記遺伝子操作された細胞において発現される、実施形態346～625のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2360】

実施形態II-632. 前記遺伝子操作されたタンパク質が、前記遺伝子操作された細胞と同じ細胞種の対照細胞における内在性CD47タンパク質と比べて少なくとも約4倍～少なくとも約10倍を超えるレベルで前記遺伝子操作された細胞において発現される、実施形態346～625のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

20

【2361】

実施形態II-633. 前記遺伝子操作されたタンパク質が、前記遺伝子操作された細胞と同じ細胞種の対照細胞における内在性CD47タンパク質と比べて少なくとも約500倍～少なくとも約2000倍を超えるレベルで前記遺伝子操作された細胞において発現される、実施形態346～625のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2362】

実施形態II-634. 前記遺伝子操作されたタンパク質が、前記遺伝子操作された細胞と同じ細胞種の対照細胞における内在性CD47タンパク質と比べて少なくとも約500倍～少なくとも約1500倍を超えるレベルで前記遺伝子操作された細胞において発現される、実施形態346～625のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

30

【2363】

実施形態II-635. 前記遺伝子操作されたタンパク質が、前記遺伝子操作された細胞と同じ細胞種の対照細胞における内在性CD47タンパク質と比べて少なくとも約900倍～少なくとも約1000倍を超えるレベルで前記遺伝子操作された細胞において発現される、実施形態346～625のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2364】

実施形態II-636. 前記遺伝子操作されたタンパク質が、前記遺伝子操作された細胞と同じ細胞種の対照細胞における内在性CD47タンパク質と比べて少なくとも約1000倍を超えるレベルで前記遺伝子操作された細胞において発現される、実施形態346～625のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

40

【2365】

実施形態II-637. 実施形態345～636のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞を含む組成物。

【2366】

実施形態II-638. (i) 実施形態345～636のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞及び(ii)薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物。

【2367】

50

実施形態ⅠⅠ－６３９．実施形態３４５～６３６のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞、実施形態６３７に記載の組成物、または実施形態６３８に記載の医薬組成物を対象に投与することを含む方法。

【２３６８】

実施形態ⅠⅠ－６４０．前記方法が対象の疾患を処置する方法である、実施形態６３９に記載の方法。

【２３６９】

実施形態ⅠⅠ－６４１．対象の疾患を処置するのに使用される、実施形態３４５～６３６のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞を含む細胞集団。

【２３７０】

実施形態ⅠⅠ－６４２．対象の疾患を処置するのに使用される実施形態６３７に記載の組成物。

【２３７１】

実施形態ⅠⅠ－６４３．対象の疾患を処置するのに使用される実施形態６３８に記載の医薬組成物。

【２３７２】

実施形態ⅠⅠ－６４４．対象の疾患を処置するのに使用される、実施形態３４５～６３６のいずれか１項に記載の遺伝子改変細胞、実施形態５６に記載の細胞集団、実施形態５４もしくは５６ａに記載の組成物、または実施形態５４ａもしくは５４ｂに記載の医薬組成物の使用。

【２３７３】

実施形態ⅠⅠ－６４５．疾患の処置のための薬剤の製造における実施形態３４５～６３６のいずれか１項に記載の遺伝子改変細胞、実施形態５６に記載の細胞集団、実施形態５４もしくは５６ａに記載の組成物、または実施形態５４ａもしくは５４ｂに記載の医薬組成物の使用。

【２３７４】

実施形態ⅠⅠ－６４６．前記疾患ががんである、先行実施形態のいずれか１項に記載の遺伝子改変細胞、細胞集団、組成物、医薬組成物、または使用。

【２３７５】

実施形態ⅠⅠ－６４７．前記がんが、ＣＤ５、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＤ７０、κ、λ、Ｂ細胞成熟物質（ＢＣＭＡ）、Ｇタンパク質共役受容体ファミリーＣグループ５メンバーＤ（ＧＰＲＣ５Ｄ）、ＣＤ１２３、ＬｅＹ、ＮＫＧ２Ｄリガンド、ＷＴ１、ＧＤ２、ＨＥＲ２、ＥＧＦＲ、ＥＧＦＲｖⅢⅢ、Ｂ７Ｈ３、ＰＳＭＡ、ＰＳＣＡ、ＣＡⅩ、ＣＤ１７１、ＣＥＡ、ＣＳＰＧ４、ＥＰＨＡ２、ＦＡＰ、ＦＲα、ＩＬ－１３Ｒα、メソテリン、ＭＵＣ１、ＭＵＣ１６、ＲＯＲ１、Ｃ－Ｍｅｔ、ＣＤ１３３、Ｅｐ－ＣＡＭ、ＧＰＣ３、ＨＰＶ１６－Ｅ６、ＩＬ１３Ｒα２、ＭＡＧＥＡ３、ＭＡＧＥＡ４、ＭＡＲＴ１、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＶＥＧＦＲ２、α葉酸受容体、ＣＤ２４、ＣＤ４４ｖ７／８、ＥＧＰ－２、ＥＧＰ－４０、ｅｒｂ－Ｂ２、ｅｒｂ－Ｂ２、３、４、ＦＢＰ、胎児アセチルコリン受容体、ＧＤ２、ＧＤ３、ＨＭＷ－ＭＡＡ、ＩＬ－１１Ｒα、ＫＤＲ、ルイスＹ、Ｌ１細胞接着分子、ＭＡＧＥ－Ａ１、癌胎児性抗原（ｈ５Ｔ４）、及び／またはＴＡＧ－７２の発現に関連する、先行実施形態のいずれか１項に記載の遺伝子改変細胞、細胞集団、組成物、医薬組成物、または使用。

【２３７６】

実施形態ⅠⅠ－６４８．前記がんが血液悪性腫瘍である、先行実施形態のいずれか１項に記載の遺伝子改変細胞、細胞集団、組成物、医薬組成物、または使用。

【２３７７】

実施形態ⅠⅠ－６４９．前記血液悪性腫瘍が、骨髄性新生物、骨髄異形成症候群（ＭＤＳ）、骨髄増殖／骨髄異形成症候群、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、急性転化慢性骨髄性白血病（ｂｃＣＭＬ）、Ｂ細胞急性リンパ性白血病（Ｂ－ＡＬＬ）、Ｔ細胞

10

20

30

40

50

胞急性リンパ性白血病（T-A L L）、T細胞リンパ腫、及びB細胞リンパ腫からなる群から選択される、先行実施形態のいずれか1項に記載の遺伝子改変細胞、細胞集団、組成物、医薬組成物、または使用。

【2378】

実施形態II-650．前記がんが固形悪性腫瘍である、先行実施形態のいずれか1項に記載の遺伝子改変細胞、細胞集団、組成物、医薬組成物、または使用。

【2379】

実施形態II-651．前記固形悪性腫瘍が、乳癌、卵巣癌、大腸癌、前立腺癌、上皮癌、腎細胞腫、膵臓腺癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、神経膠芽腫、横紋筋肉腫、神経芽細胞腫、黒色腫、ユーイング肉腫、骨肉腫、中皮腫、及び腺癌から選択される、先行実施形態のいずれか1項に記載の遺伝子改変細胞、細胞集団、組成物、医薬組成物、または使用。

10

【2380】

実施形態II-652．前記疾患が自己免疫疾患である、先行実施形態のいずれか1項に記載の遺伝子改変細胞、細胞集団、組成物、医薬組成物、または使用。

【2381】

実施形態II-653．前記自己免疫疾患が、ループス、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、乾癬、乾癬性関節炎、多発性硬化症、クローン病、潰瘍性大腸炎、アジソン病、グレーブス病、シェーグレン症候群、橋本甲状腺炎、及びセリアック病からなる群から選択される、先行実施形態のいずれか1項に記載の遺伝子改変細胞、細胞集団、組成物、医薬組成物、または使用。

20

【2382】

実施形態II-654．前記疾患が糖尿病である、先行実施形態のいずれか1項に記載の遺伝子改変細胞、先行実施形態のいずれか1項に記載の細胞集団、先行実施形態のいずれか1項に記載の組成物、先行実施形態のいずれか1項に記載の医薬組成物、または先行実施形態のいずれか1項に記載の使用。

【2383】

実施形態II-655．前記糖尿病が、I型糖尿病、II型糖尿病、前糖尿病、及び妊娠性糖尿病からなる群から選択される、先行実施形態のいずれか1項に記載の遺伝子改変細胞、細胞集団、組成物、医薬組成物、または使用。

30

【2384】

実施形態II-656．前記疾患が神経系疾患である、先行実施形態のいずれか1項に記載の遺伝子改変細胞、細胞集団、組成物、医薬組成物、または使用。

【2385】

実施形態II-657．前記神経系疾患が、強直症、てんかん、脳炎、髄膜炎、片頭痛、ハンチントン病、アルツハイマー病、パーキンソン病、ペリツェウス・メルツバッハー病、及び多発性硬化症からなる群から選択される、先行実施形態のいずれか1項に記載の遺伝子改変細胞、細胞集団、組成物、医薬組成物、または使用。

【2386】

実施形態II-658．核酸構築物を含む遺伝子操作された細胞を作製する方法であって、実施形態1～184のいずれか1項に記載の核酸構築物を細胞に送達し、これにより、遺伝子操作された細胞を作製することを含む、前記方法。

40

【2387】

実施形態II-659．前記核酸構築物が、前記遺伝子操作されたタンパク質をコードする第1の導入遺伝子を含む、実施形態658に記載の方法。

【2388】

実施形態II-660．前記方法が、前記遺伝子操作されたタンパク質をコードする第1の導入遺伝子を前記細胞のゲノムの第1の挿入部位に挿入することを含む、実施形態658または659に記載の方法。

50

【2389】

実施形態ⅠⅠ－661．前記第1の挿入部位がT細胞受容体（TCR）遺伝子座である、実施形態660に記載の方法。

【2390】

実施形態ⅠⅠ－662．前記TCR遺伝子座が、TRAC遺伝子座、TRBC1遺伝子座、またはTRBC2遺伝子座であるか、またはそれを含む、実施形態661に記載の方法。

【2391】

実施形態ⅠⅠ－663．前記第1の挿入部位がβ2ミクログロブリン（B2M）遺伝子座である、実施形態661に記載の方法。

10

【2392】

実施形態ⅠⅠ－664．前記第1の挿入部位が、クラスⅠⅠトランス活性化因子（CIITA）遺伝子座である、実施形態661に記載の方法。

【2393】

実施形態ⅠⅠ－665．前記第1の挿入部位が、セーフハーバー遺伝子座である、実施形態661に記載の方法。

【2394】

実施形態ⅠⅠ－666．前記セーフハーバー遺伝子座が、AAVS1、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1、MICA、MICB、RHD、ROSA26、またはSHS231遺伝子座である、実施形態665に記載の方法。

20

【2395】

実施形態ⅠⅠ－667．前記第1の挿入部位がエキソンである、実施形態660～664のいずれか1項に記載の方法。

【2396】

実施形態ⅠⅠ－668．前記第1の挿入部位がイントロンである、実施形態660～664のいずれか1項に記載の方法。

【2397】

実施形態ⅠⅠ－669．前記第1の挿入部位が、イントロンとエキソンとの間に存在する、実施形態660～664のいずれか1項に記載の方法。

30

【2398】

実施形態ⅠⅠ－670．前記第1の挿入部位が制御領域に存在する、実施形態660～664のいずれか1項に記載の方法。

【2399】

実施形態ⅠⅠ－671．挿入するステップが、遺伝子治療ベクター、トランスポザーゼ、レンチウイルスベクター、レトロウイルス、フソソーム、piggyBacトランスポゾン、Sleeping Beauty（SB11）トランスポゾン、Mos1トランスポゾン、またはTol2トランスポゾンを使用した挿入を含む、実施形態660～670のいずれか1項に記載の方法。

【2400】

実施形態ⅠⅠ－672．挿入するステップが、レンチウイルスベクターを使用した挿入を含む、実施形態660～671のいずれか1項に記載の方法。

40

【2401】

実施形態ⅠⅠ－673．挿入するステップが、ゲノム改変タンパク質を使用した相同組換え修復（HDR）により媒介される挿入を含む、実施形態660～670のいずれか1項に記載の方法。

【2402】

実施形態ⅠⅠ－674．ゲノム編集複合体を前記細胞に導入することを更に含む、実施形態658～673のいずれか1項に記載の方法。

【2403】

50

実施形態ⅠⅠ－６７５．前記ゲノム編集複合体が、ゲノム標的化物質及びゲノム改変物質を含む、実施形態６７４に記載の方法。

【２４０４】

実施形態ⅠⅠ－６７６．前記ゲノム標的化物質が前記ゲノム編集複合体をセーフハーバー部位に局在させ、任意により、前記ゲノム標的化物質が核酸誘導型標的化物質である、実施形態６７５に記載の方法。

【２４０５】

実施形態ⅠⅠ－６７７．前記ゲノム標的化物質が、配列特異的ヌクレアーゼ、核酸によりプログラム化可能なDNA結合タンパク質、RNA誘導型ヌクレアーゼ、Casヌクレアーゼ及びガイドRNAを含むRNA誘導型ヌクレアーゼ（CRISPR-Casの組み合わせ）、gRNA及びCasヌクレアーゼを含むリボ核タンパク質（RNP）複合体、ホーミングエンドヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZF）核酸結合性物質、転写活性化因子様エフェクター（TALE）核酸結合性物質、メガヌクレアーゼ、Casヌクレアーゼ、コアCasタンパク質、ホーミングエンドヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ欠損Casタンパク質、酵素的に不活性なCasタンパク質、CRISPR関連トランスポザーゼ（CAST）、ⅠⅠ型もしくはⅤ型Casタンパク質、またはそれらの機能部分からなる群から選択される、実施形態６７５または６７６に記載の方法。

【２４０６】

実施形態ⅠⅠ－６７８．前記ゲノム標的化物質が、Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a（Cpf1）、Cas12b（C2c1）、Cas12c（C2c3）、Cas12d（CasY）、Cas12e（CasX）、Cas12f（C2c10）、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k（C2c5）、Cas13、Cas13a（C2c2）、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr1、Cmr2、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csd1、Csd2、Cas5d、Cse1、Cse2、Cse3、Cse4、Cas5e、Csf1、Csm1、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csn1、Csn2、Cst1、Cst2、Cas5t、Csh1、Csh2、Cas5h、Csa1、Csa2、Csa3、Csa4、Csa5、Cas5a、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3、Csy4、Mad7、SpCas9、SpCas9のeSpCas9、SpCas9-HF1、HypaSpCas9、HeFSpCas9、及びevoSpCas9高忠実度バリエーション、SaCas9、NmeCas9、CjCas9、StCas9、TdCas9、LbCas12a、AscCas12a、AacCas12b、BhCas12b v4、TnpB、dCas（D10A）、dCas（H840A）、dCas13a、dCas13b、またはそれらの機能部分からなる群から選択される、実施形態６７５～６７７のいずれか１項に記載の方法。

【２４０７】

実施形態ⅠⅠ－６７９．前記ゲノム改変物質が、標的遺伝子座を開裂するか、脱アミノ化するか、それにニックを入れるか、それを重合させるか、調査するか、融合させるか、切断するか、ほどこか、破壊するか、変化させるか、メチル化するか、脱メチル化するか、または別様に不安定化する、実施形態６７５～６７８のいずれか１項に記載の方法。

【２４０８】

実施形態ⅠⅠ－６８０．前記ゲノム改変物質が、リコンビナーゼ、インテグラーゼ、トランスポザーゼ、エンドヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼ、ニッカーゼ、ヘリカーゼ、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、逆転写酵素、デアミナーゼ、フリッパーゼ、メチラーゼ、デメチラーゼ、アセチラーゼ、核酸修飾タンパク質、RNA修飾タンパク質、DNA修飾タンパク質、アルゴノートタンパク質、エピジェネティック修飾タンパク質、ヒストン修飾タンパク質、またはそれらの機能部分を含む、実施形態６７５～６７９のいずれか１項に記載の方法。

【２４０９】

10

20

30

40

50

実施形態ⅠⅠ－６８１．前記ゲノム改変物質が、配列特異的ヌクレアーゼ、核酸によりプログラム化可能なDNA結合タンパク質、RNA誘導型ヌクレアーゼ、Casヌクレアーゼ及びガイドRNAを含むRNA誘導型ヌクレアーゼ（CRISPR-Casの組み合わせ）、gRNA及びCasヌクレアーゼを含むリボ核タンパク質（RNP）複合体、ホーミングエンドヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、メガヌクレアーゼ、Casヌクレアーゼ、コアCasタンパク質、TnpBヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ欠損Casタンパク質、酵素的に不活性なCasタンパク質、CRISPR関連トランスポザーゼ（CAST）、ⅠⅠ型もしくはⅤ型Casタンパク質、塩基編集、プライム編集、部位特異的標的化エレメントによるプログラム化可能な付加（PASTE）、またはそれらの機能部分からなる群から選択される、実施形態６７５～６８０のいずれか１項に記載の方法。

10

【２４１０】

実施形態ⅠⅠ－６８２．前記ゲノム改変物質が、Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a（Cpf1）、Cas12b（C2c1）、Cas12c（C2c3）、Cas12d（CasY）、Cas12e（CasX）、Cas12f（C2c10）、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k（C2c5）、Cas13、Cas13a（C2c2）、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr1、Cmr2、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csd1、Csd2、Cas5d、Cse1、Cse2、Cse3、Cse4、Cas5e、Csf1、Csm1、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csn1、Csn2、Cst1、Cst2、Cas5t、Csh1、Csh2、Cas5h、Csa1、Csa2、Csa3、Csa4、Csa5、Cas5a、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3、Csy4、Mad7、SpCas9、SpCas9のeSpCas9、SpCas9-HF1、HypaSpCas9、HeFSpCas9、及びevoSpCas9高忠実度バリエーション、SaCas9、NmeCas9、CjCas9、StCas9、TdCas9、LbCas12a、AscCas12a、AacCas12b、BhCas12b v4、TnpB、FokI、dCas（D10A）、dCas（H840A）、dCas13a、dCas13b、塩基エディター、プライムエディター、標的プライムド逆転写（TPRT）エディター、APOBEC1、シチジンデアミナーゼ、アデノシンデアミナーゼ、ウラシルグリコシラーゼ阻害剤（UGI）、アデニン塩基エディター（ABE）、シトシン塩基エディター（CBE）、逆転写酵素、セリンインテグラーゼ、リコンビナーゼ、トランスポザーゼ、ポリメラーゼ、アデニン→チミンもしくは「ATBE」（またはチミン→アデニンもしくは「TABE」）トランスバージョン塩基エディター、10-11転座メチルシトシンジオキシゲナーゼ（TET）、TET1、TET3、TET1CD、ヒストンアセチルトランスフェラーゼp300、ヒストンメチルトランスフェラーゼSMYD3、ヒストンメチルトランスフェラーゼPRDM9、H3K79メチルトランスフェラーゼDOT1L、転写抑制因子、またはその機能部分からなる群から選択される、実施形態６７５～６８１のいずれか１項に記載の方法。

20

30

40

【２４１１】

実施形態ⅠⅠ－６８３．前記ゲノム標的化物質及び前記ゲノム改変物質が、単一のポリペプチドの異なるドメインである、実施形態６７５～６８２のいずれか１項に記載の方法。

【２４１２】

実施形態ⅠⅠ－６８４．前記ゲノム標的化物質及び前記ゲノム改変物質が、互いに作動可能に連結されている２つの異なるポリペプチドである、実施形態６７５～６８３のいずれか１項に記載の方法。

【２４１３】

実施形態ⅠⅠ－６８５．前記ゲノム標的化物質及び前記ゲノム改変物質が、互いに連結

50

されていない2つの異なるポリペプチドである、実施形態675～683のいずれか1項に記載の方法。

【2414】

実施形態II-686. 前記ゲノム編集複合体が、ゲノムのセーフハーバー部位内の少なくとも1つの配列に相補的な標的化ドメインを有するガイド核酸を含み、任意により、前記ガイド核酸がガイドRNA (gRNA) である、実施形態674～685のいずれか1項に記載の方法。

【2415】

実施形態II-687. 前記ゲノム編集複合体がRNA誘導型ヌクレアーゼを含む、実施形態674～686のいずれか1項に記載の方法。

【2416】

実施形態II-688. 前記RNA誘導型ヌクレアーゼがCasヌクレアーゼを含む、実施形態687に記載の方法。

【2417】

実施形態II-689. 前記ゲノム編集複合体が、Casヌクレアーゼ及びgRNAを含むリボ核タンパク質 (RNP) 複合体を含む、実施形態688に記載の方法。

【2418】

実施形態II-690. 前記Casヌクレアーゼが、II型またはV型Casタンパク質である、実施形態688または689に記載の方法。

【2419】

実施形態II-691. 前記Casヌクレアーゼが、Cas3、Cas4、Cas5、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a (Cpf1)、Cas12b (C2c1)、Cas12c (C2c3)、Cas12d (CasY)、Cas12e (CasX)、Cas12f (C2c10)、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k (C2c5)、Cas13、Cas13a (C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr5、Cse1、Cse2、Csf1、Csm2、Csn2、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3、及びMad7からなる群から選択される、実施形態688～690のいずれか1項に記載の方法。

【2420】

実施形態II-692. 前記gRNAが相補的領域を含み、前記相補的領域が遺伝子座内の標的核酸配列に相補的な核酸配列を含み、前記標的核酸配列が前記挿入部位を含む、実施形態678に記載の方法。

【2421】

実施形態II-693. 前記遺伝子座がTCR遺伝子座である、実施形態692に記載の方法。

【2422】

実施形態II-694. 前記遺伝子座がB2M遺伝子座である、実施形態692に記載の方法。

【2423】

実施形態II-695. 前記遺伝子座がCIITA遺伝子座である、実施形態692に記載の方法。

【2424】

実施形態II-696. 前記第1の挿入部位が、プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 配列から25ヌクレオチド以下であり、前記PAM配列が、ngg、nag、ngr、rrt、ngr、rrn、nnnnngatt、nnnnnryac、nnagaaaw、naaaac、ttttv、tttn、atttn、tttn、gttn、またはytttnであり、

(i) r = a または g であり、

(ii) y = c または t であり、

(iii) w = a または t であり、

10

20

30

40

50

(i v) $v = a$ または c または g であり、

(v) $n = a, c, t$ 、または g である、実施形態 660～695 のいずれか 1 項に記載の方法。

【2425】

実施形態 II-697. 挿入するステップが、SpCas9 を使用した相同組換え修復 (HDR) により媒介される挿入を含み、前記 PAM が、ngg または nag であり、 $n = a, c, t$ 、または g である、実施形態 660～696 のいずれか 1 項に記載の方法。

【2426】

実施形態 II-698. 挿入するステップが、SaCas9 を使用した相同組換え修復 (HDR) により媒介される挿入を含み、前記 PAM が、ngrrt または ngrrn であり、

10

(i) $r = a$ または g であり、

(ii) $n = a, c, t$ 、または g である、実施形態 660～696 のいずれか 1 項に記載の方法。

【2427】

実施形態 II-699. 挿入するステップが、NmeCas9 を使用した相同組換え修復 (HDR) により媒介される挿入を含み、前記 PAM が、nnnngatt であり、 $n = a, c, t$ 、または g である、実施形態 660～696 のいずれか 1 項に記載の方法。

【2428】

実施形態 II-700. 挿入するステップが、CjCas9 を使用した相同組換え修復 (HDR) により媒介される挿入を含み、前記 PAM が、nnnnryac であり、

20

(i) $r = a$ または g であり、

(ii) $y = c$ または t であり、

(iii) $n = a, c, t$ 、または g である、実施形態 660～696 のいずれか 1 項に記載の方法。

【2429】

実施形態 II-701. 挿入するステップが、StCas9 を使用した相同組換え修復 (HDR) により媒介される挿入を含み、前記 PAM が、nnagaaaw であり、

(i) $w = a$ または t であり、

(ii) $n = a, c, t$ 、または g である、実施形態 660～696 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【2430】

実施形態 II-702. 挿入するステップが、TdCas9 を使用した相同組換え修復 (HDR) により媒介される挿入を含み、前記 PAM が、naaaaaac であり、 $n = a, c, t$ 、または g である、実施形態 660～696 のいずれか 1 項に記載の方法。

【2431】

実施形態 II-703. 挿入するステップが、LbCas12a を使用した相同組換え修復 (HDR) により媒介される挿入を含み、前記 PAM が、tttv であり、 $v = a$ または c または g である、実施形態 660～696 のいずれか 1 項に記載の方法。

【2432】

実施形態 II-704. 挿入するステップが、AsCas12a を使用した相同組換え修復 (HDR) により媒介される挿入を含み、前記 PAM が、tttv であり、 $v = a$ または c または g である、実施形態 660～696 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【2433】

実施形態 II-705. 挿入するステップが、AacCas12b を使用した相同組換え修復 (HDR) により媒介される挿入を含み、前記 PAM が、ttn であり、 $n = a, c, t$ 、または g である、実施形態 660～696 のいずれか 1 項に記載の方法。

【2434】

実施形態 II-706. 挿入するステップが、BhCas12b を使用した相同組換え修復 (HDR) により媒介される挿入を含み、前記 PAM が、attn、tttn、また

50

は $g t t n$ であり、 $n = a, c, t$ 、または g である、実施形態 660～696 のいずれか 1 項に記載の方法。

【2435】

実施形態 $II-707$ ．挿入するステップが、 $MAD7$ ($ErCas12a$) を使用した相同組換え修復 (HDR) により媒介される挿入を含み、前記 PAM が、 $y t t n$ であり、

(i) $y = c$ または t であり、

(ii) $n = a, c, t$ 、または g である、実施形態 660～696 のいずれか 1 項に記載の方法。

【2436】

実施形態 $II-708$ ．部位特異的ヌクレアーゼを使用した相同組換え修復 (HDR) により媒介される挿入が、レンチウイルスを使用した HDR による挿入と等しいか、またはそれより高い HDR 効率で実行される、実施形態 660、678、または 697～707 のいずれか 1 項に記載の方法。

【2437】

実施形態 $II-709$ ．挿入するステップが、 ZFN を使用した相同組換え修復 (HDR) により媒介される挿入を含む、実施形態 660～673、675、676、または 677 のいずれか 1 項に記載の方法。

【2438】

実施形態 $II-710$ ．前記第 1 の挿入部位が、ジンクフィンガー結合配列から 25 ヌクレオチド以下である、実施形態 660～673、675、676、677、または 709 のいずれか 1 項に記載の方法。

【2439】

実施形態 $II-711$ ．挿入するステップが、 $TALEN$ を使用した相同組換え修復 (HDR) により媒介される挿入を含み、実施形態 660～673、675、676、または 677 のいずれか 1 項に記載の方法。

【2440】

実施形態 $II-712$ ．前記第 1 の挿入部位が、転写活性化因子様エフェクター ($TALE$) 結合配列から 25 ヌクレオチド以下である、実施形態 660～673、675、676、677、または 711 のいずれか 1 項に記載の方法。

【2441】

実施形態 $II-713$ ．挿入するステップが、ガイド RNA ($gRNA$) 及び $TnpB$ ポリペプチドを使用した相同組換え修復 (HDR) により媒介される挿入を含み、実施形態 660～675 または 677 のいずれか 1 項に記載の方法。

【2442】

実施形態 $II-714$ ．前記 $gRNA$ が相補的領域を含み、前記相補的領域が遺伝子座内の標的核酸配列に相補的な核酸配列を含み、前記標的核酸配列が前記挿入部位を含む、実施形態 713 に記載の方法。

【2443】

実施形態 $II-715$ ．前記遺伝子座が TCR 遺伝子座である、実施形態 714 に記載の方法。

【2444】

実施形態 $II-716$ ．前記遺伝子座が $B2M$ 遺伝子座である、実施形態 714 に記載の方法。

【2445】

実施形態 $II-717$ ．前記遺伝子座が $CIITA$ 遺伝子座である、実施形態 714 に記載の方法。

【2446】

実施形態 $II-718$ ．前記遺伝子座がセーフハーバー遺伝子座である、実施形態 714 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【2447】

実施形態Ⅱ-719. 前記セーフハーバー遺伝子座が、AAVS1、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1、MICA、MICB、RHD、ROSA26、またはSHS231遺伝子座である、実施形態718に記載の方法。

【2448】

実施形態Ⅱ-720. 前記挿入部位が、標的隣接モチーフ(TAM)配列から25ヌクレオチド以下であり、前記TAM配列が、tca、tcac、tcag、tcatt、tcaa、ttcan、ttcaa、ttcag、またはttgatであり、

(i) n=a、c、t、またはgである、実施形態713~719のいずれか1項に記載の方法。

10

【2449】

実施形態Ⅱ-721. 挿入するステップが、TnpBポリペプチドを使用した相同組換え修復(HDR)により媒介される挿入を含み、前記TAMが、tcaである、実施形態713~720のいずれか1項に記載の方法。

【2450】

実施形態Ⅱ-722. 挿入するステップが、TnpBポリペプチドを使用した相同組換え修復(HDR)により媒介される挿入を含み、前記TAMが、tcacである、実施形態713~720のいずれか1項に記載の方法。

【2451】

実施形態Ⅱ-723. 挿入するステップが、TnpBポリペプチドを使用した相同組換え修復(HDR)により媒介される挿入を含み、前記TAMが、tcagである、実施形態713~720のいずれか1項に記載の方法。

20

【2452】

実施形態Ⅱ-724. 挿入するステップが、TnpBポリペプチドを使用した相同組換え修復(HDR)により媒介される挿入を含み、前記TAMが、tcattである、実施形態713~720のいずれか1項に記載の方法。

【2453】

実施形態Ⅱ-725. 挿入するステップが、TnpBポリペプチドを使用した相同組換え修復(HDR)により媒介される挿入を含み、前記TAMが、tcaaである、実施形態713~720のいずれか1項に記載の方法。

30

【2454】

実施形態Ⅱ-726. 挿入するステップが、TnpBポリペプチドを使用した相同組換え修復(HDR)により媒介される挿入を含み、前記TAMが、ttcanであり、n=a、c、t、またはgである、実施形態713~720のいずれか1項に記載の方法。

【2455】

実施形態Ⅱ-727. 挿入するステップが、TnpBポリペプチドを使用した相同組換え修復(HDR)により媒介される挿入を含み、前記TAMが、ttcaaである、実施形態713~720のいずれか1項に記載の方法。

【2456】

実施形態Ⅱ-728. 挿入するステップが、TnpBポリペプチドを使用した相同組換え修復(HDR)により媒介される挿入を含み、前記TAMが、ttcagである、実施形態713~720のいずれか1項に記載の方法。

40

【2457】

実施形態Ⅱ-729. 挿入するステップが、TnpBポリペプチドを使用した相同組換え修復(HDR)により媒介される挿入を含み、前記TAMが、ttgatである、実施形態713~720のいずれか1項に記載の方法。

【2458】

実施形態Ⅱ-730. 前記核酸構築物を前記細胞に送達するステップが、レトロウイルスまたはアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターによるウイルス形質導入を含む、実施

50

形態 6 5 8 または 6 5 9 に記載の方法。

【 2 4 5 9 】

実施形態 I I - 7 3 1 . 前記レトロウイルスが、モロニー Maus 白血病ウイルス (M - M u L V) 、モロニー Maus 肉腫ウイルス (M o M S V) 、ハーベイ Maus 肉腫ウイルス (H a M u S V) 、マウス乳癌ウイルス (M u M T V) 、テナガザル白血病ウイルス (G a L V) 、ネコ白血病ウイルス (F L V) 、スプマウイルス、フレンド Maus 白血病ウイルス、マウス幹細胞ウイルス (M S C V) 、ラウス肉腫ウイルス (R S V) 、レンチウイルス、ガンマレトロウイルス、イプシロンレトロウイルス、アルファレトロウイルス、ベータレトロウイルス、デルタレトロウイルス、またはスプーマレトロウイルスであるか、またはそれを含む、実施形態 7 3 0 に記載の方法。

10

【 2 4 6 0 】

実施形態 I I - 7 3 2 . 前記 A A V ベクターが、A A V 6 ベクターまたは A A V 9 ベクターである、実施形態 7 3 0 に記載の方法。

【 2 4 6 1 】

実施形態 I I - 7 3 3 . T C R 遺伝子座の前記挿入部位の前記遺伝子操作されたタンパク質をコードする前記第 1 の導入遺伝子が、機能的 T C R の発現を低減する、実施形態 6 6 0 、6 6 1 、6 6 2 、6 7 3 ~ 6 9 3 、6 9 6 ~ 7 1 5 、または 7 2 0 ~ 7 3 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【 2 4 6 2 】

実施形態 I I - 7 3 4 . T C R 遺伝子座の前記挿入部位の前記遺伝子操作されたタンパク質をコードする前記第 1 の導入遺伝子が、機能的 T C R の発現を破壊する、実施形態 6 6 0 、6 6 1 、6 6 2 、6 7 3 ~ 6 9 3 、6 9 6 ~ 7 1 5 、または 7 2 0 ~ 7 3 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【 2 4 6 3 】

実施形態 I I - 7 3 5 . B 2 M 遺伝子座の前記挿入部位の前記遺伝子操作されたタンパク質をコードする前記第 1 の導入遺伝子が、機能的 B 2 M の発現を低減する、実施形態 6 6 0 、6 6 1 、6 6 2 、6 7 3 ~ 6 9 3 、6 9 6 ~ 7 1 5 、または 7 2 0 ~ 7 3 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【 2 4 6 4 】

実施形態 I I - 7 3 6 . B 2 M 遺伝子座の前記挿入部位の前記遺伝子操作されたタンパク質をコードする前記第 1 の導入遺伝子が、機能的 M H C I 分子の発現を低減する、実施形態 6 6 0 、6 6 1 、6 6 2 、6 7 3 ~ 6 9 3 、6 9 6 ~ 7 1 5 、または 7 2 0 ~ 7 3 2 、または 7 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【 2 4 6 5 】

実施形態 I I - 7 3 7 . B 2 M 遺伝子座の前記挿入部位の前記遺伝子操作されたタンパク質をコードする前記第 1 の導入遺伝子が、機能的 B 2 M の発現を破壊する、実施形態 6 6 0 、6 6 1 、6 6 2 、6 7 3 ~ 6 9 3 、6 9 6 ~ 7 1 5 、または 7 2 0 ~ 7 3 2 、または 7 3 5 ~ 7 3 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【 2 4 6 6 】

実施形態 I I - 7 3 8 . B 2 M 遺伝子座の前記挿入部位の前記遺伝子操作されたタンパク質をコードする前記第 1 の導入遺伝子が、機能的 M H C I 分子の発現を破壊する、実施形態 6 6 0 、6 6 1 、6 6 2 、6 7 3 ~ 6 9 3 、6 9 6 ~ 7 1 5 、または 7 2 0 ~ 7 3 2 、または 7 3 5 ~ 7 3 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【 2 4 6 7 】

実施形態 I I - 7 3 9 . C I I T A 遺伝子座の前記挿入部位の前記遺伝子操作されたタンパク質をコードする前記第 1 の導入遺伝子が、機能的 C I I T A の発現を低減する、実施形態 6 6 0 、6 6 1 、6 6 2 、6 7 3 ~ 6 9 3 、6 9 6 ~ 7 1 5 、または 7 2 0 ~ 7 3 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【 2 4 6 8 】

実施形態 I I - 7 4 0 . C I I T A 遺伝子座の前記挿入部位の前記遺伝子操作されたタ

50

ンパク質をコードする前記第1の導入遺伝子が、機能的MHCII分子の発現を低減する、実施形態660、661、662、673～693、696～715、または720～732、または739のいずれか1項に記載の方法。

【2469】

実施形態II-741. CIIITA遺伝子座の前記挿入部位の前記遺伝子操作されたタンパク質をコードする前記第1の導入遺伝子が、機能的CIIITAの発現を破壊する、実施形態660、661、662、673～693、696～715、または720～732、または739～740のいずれか1項に記載の方法。

【2470】

実施形態II-742. CIIITA遺伝子座の前記挿入部位の前記遺伝子操作されたタンパク質をコードする前記第1の導入遺伝子が、機能的MHCII分子の発現を破壊する、実施形態660、661、662、673～693、696～715、または720～732、または739～741のいずれか1項に記載の方法。

【2471】

実施形態II-743. 前記細胞が、

(a) 1種以上の主要組織適合複合体(MHC)クラスI分子、もしくは前記1種以上のMHCクラスI分子の発現を調節する1種以上の分子、及び／または

(b) 1種以上のMHCクラスII分子、もしくは前記1種以上のMHCクラスII分子の発現を調節する1種以上の分子

の1つ以上のアレルを不活性化または破壊する1種以上の改変を含む、実施形態658～742のいずれか1項に記載の方法。

【2472】

実施形態II-744. 前記細胞が、1種以上のMHCクラスI分子、または前記1種以上のMHCクラスI分子の発現を調節する1種以上の分子の1つ以上のアレルを不活性化または破壊する1種以上の改変を含む、実施形態658～743のいずれか1項に記載の方法。

【2473】

実施形態II-745. 前記細胞が、1種以上のMHCクラスII分子、または前記1種以上のMHCクラスII分子の発現を調節する1種以上の分子の1つ以上のアレルを不活性化または破壊する1種以上の改変を含む、実施形態658～744のいずれか1項に記載の方法。

【2474】

実施形態II-746. 前記細胞が、

(a) 1種以上のMHCクラスI分子、または前記1種以上のMHCクラスI分子の発現を調節する1種以上の分子、及び

(b) 1種以上のMHCクラスII分子、もしくは前記1種以上のMHCクラスII分子の発現を調節する1種以上の分子

の1つ以上のアレルを不活性化または破壊する1種以上の改変を含む、実施形態658～745のいずれか1項に記載の方法。

【2475】

実施形態II-747. 前記1種以上の改変が、前記1種以上のMHCクラスI分子の細胞表面タンパク質発現を低減する、実施形態743～746のいずれか1項に記載の方法。

【2476】

実施形態II-748. 前記1種以上の改変が、前記1種以上のMHCクラスI分子の細胞表面輸送を低減する、実施形態743～747のいずれか1項に記載の方法。

【2477】

実施形態II-749. 前記1種以上の改変が、前記1種以上のMHCクラスI分子の機能を低減し、任意により、前記機能が抗原提示である、実施形態743～748のいずれか1項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【2478】

実施形態ⅠⅠ－750．前記1種以上のMHCクラスⅠ分子が、1種以上のヒト白血球抗原（HLA）クラスⅠ分子である、実施形態743～749のいずれか1項に記載の方法。

【2479】

実施形態ⅠⅠ－751．前記1種以上のHLAクラスⅠ分子が、HLA－A、HLA－B、及びHLA－Cからなる群から選択される、実施形態750に記載の方法。

【2480】

実施形態ⅠⅠ－752．前記1種以上のMHCクラスⅠ分子の発現を調節する前記1種以上の分子が、B2M、NLRC5、及びTAP1からなる群から選択される、実施形態743～751のいずれか1項に記載の方法。

10

【2481】

実施形態ⅠⅠ－753．前記1種以上の改変が、前記1種以上のMHCクラスⅠⅠ分子の細胞表面タンパク質発現を低減する、実施形態743～752のいずれか1項に記載の方法。

【2482】

実施形態ⅠⅠ－754．前記1種以上の改変が、前記1種以上のMHCクラスⅠⅠ分子の細胞表面輸送を低減する、実施形態743～753のいずれか1項に記載の方法。

【2483】

実施形態ⅠⅠ－755．前記1種以上の改変が、前記1種以上のMHCクラスⅠⅠ分子の機能を低減し、任意により、前記機能が抗原提示である、実施形態743～754のいずれか1項に記載の方法。

20

【2484】

実施形態ⅠⅠ－756．前記1種以上のMHCクラスⅠⅠ分子が、1種以上のヒト白血球抗原（HLA）クラスⅠⅠ分子である、実施形態743～755のいずれか1項に記載の方法。

【2485】

実施形態ⅠⅠ－757．前記1種以上のHLAクラスⅠⅠ分子が、HLA－DP、HLA－DQ、及び／またはHLA－DRからなる群から選択される、実施形態756に記載の方法。

30

【2486】

実施形態ⅠⅠ－758．前記1種以上のMHCクラスⅠⅠ分子の発現を調節する前記1種以上の分子が、CIITA及びCD74からなる群から選択される、実施形態743～757のいずれか1項に記載の方法。

【2487】

実施形態ⅠⅠ－759．セーフハーバー遺伝子座の挿入部位の遺伝子操作されたタンパク質をコードする第1の導入遺伝子は、機能的AAVS1、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1、MICA、MICB、RHD、ROSA26、またはSHS231．の発現を破壊する、実施形態660～758のいずれか1項に記載の方法。

40

【2488】

実施形態ⅠⅠ－760．セーフハーバー遺伝子座の前記挿入部位の前記遺伝子操作されたタンパク質をコードする前記第1の導入遺伝子が、機能的AAVS1、ABO、CCR5、CLYBL、CXCR4、F3、FUT1、HMGB1、KDM5D、LRP1、MICA、MICB、RHD、ROSA26、またはSHS231分子の発現を破壊する、実施形態660～758のいずれか1項に記載の方法。

【2489】

実施形態ⅠⅠ－761．前記遺伝子操作された細胞が、前記遺伝子操作されたタンパク質の細胞表面発現を有する、実施形態658～760のいずれか1項に記載の方法。

【2490】

50

実施形態ⅠⅠ－７６２．前記核酸構築物が、免疫寛容誘導因子をコードする第２の導入遺伝子を更に含む、実施形態６５８～７６１のいずれか１項に記載の方法。

【２４９１】

実施形態ⅠⅠ－７６３．前記方法が、前記第２の導入遺伝子を前記細胞のゲノムの第２の挿入部位に挿入することを更に含む、実施形態７６２に記載の方法。

【２４９２】

実施形態ⅠⅠ－７６４．前記免疫寛容誘導因子が、Ａ２０／ＴＮＦＡＩＰ３、Ｂ２Ｍ－ＨＬＡ－Ｅ、ＣＤ１６、ＣＤ１６ Ｆｃ受容体、ＣＤ２４、ＣＤ２７、ＣＤ３５、ＣＤ３９、ＣＤ４６、ＣＤ４７、ＣＤ５２、ＣＤ５５、ＣＤ５９、ＣＤ６４、ＣＤ２００、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ２２、ＣＴＬＡ４－Ｉｇ、Ｃ１阻害因子、ＣＲ１、ＤＵＸ４、ＦＡＳＬ、
ＨＬＡ－Ｃ、ＨＬＡ－Ｅ、ＨＬＡ－Ｅ重鎖、ＨＬＡ－Ｆ、ＨＬＡ－Ｇ、Ｈ２－Ｍ３、ＩＤ
Ｏ１、ＩＬ－１０、ＩＬ１５－ＲＦ、ＩＬ－３５、ＩＬ－３９、ＭＡＮＦ、Ｍｆｇｅ８、
ＰＤ－Ｌ１、またはＳｅｒｐｉｎｂ９であるか、またはそれを含む、実施形態７６２に記載の方法。

10

【２４９３】

実施形態ⅠⅠ－７６５．前記免疫寛容誘導因子をコードする前記第２の導入遺伝子が、ＴＣＲ遺伝子座の前記第２の挿入部位で挿入されている、実施形態７６２～７６４のいずれか１項に記載の方法。

【２４９４】

実施形態ⅠⅠ－７６６．前記免疫寛容誘導因子をコードする前記第２の導入遺伝子が、Ｂ２Ｍ遺伝子座の前記第２の挿入部位で挿入されている、実施形態７６２～７６４のいずれか１項に記載の方法。

20

【２４９５】

実施形態ⅠⅠ－７６７．前記免疫寛容誘導因子をコードする前記第２の導入遺伝子が、ＣＩＩＴＡ遺伝子座の前記第２の挿入部位で挿入されている、実施形態７６２～１２１ｂ
７６４のいずれか１項に記載の方法。

【２４９６】

実施形態ⅠⅠ－７６８．前記免疫寛容誘導因子をコードする前記第２の導入遺伝子が、セーフハーバー遺伝子座の前記第２の挿入部位で挿入されている、実施形態７６２～７６
４のいずれか１項に記載の方法。

30

【２４９７】

実施形態ⅠⅠ－７６９．前記セーフハーバー遺伝子座が、ＡＡＶＳ１、ＡＢＯ、ＣＣＲ
５、ＣＬＹＢＬ、ＣＸＣＲ４、Ｆ３、ＦＵＴ１、ＨＭＧＢ１、ＫＤＭ５Ｄ、ＬＲＰ１、Ｍ
ＩＣＡ、ＭＩＣＢ、ＲＨＤ、ＲＯＳＡ２６、またはＳＨＳ２３１遺伝子座である、実施形
態７６８に記載の方法。

【２４９８】

実施形態ⅠⅠ－７７０．前記遺伝子操作された細胞が、前記免疫寛容誘導因子の細胞表面発現を有する、実施形態７６２～７６９のいずれか１項に記載の方法。

【２４９９】

実施形態ⅠⅠ－７７１．前記核酸構築物が、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする
第３の導入遺伝子を更に含む、実施形態６５８～７７０のいずれか１項に記載の方法。

40

【２５００】

実施形態ⅠⅠ－７７２．前記方法が、前記第３の導入遺伝子を前記細胞のゲノムの第３の挿入部位に挿入することを更に含む、実施形態７７１に記載の方法。

【２５０１】

実施形態ⅠⅠ－７７３．前記ＣＡＲが、ＣＤ５特異的ＣＡＲ、ＣＤ１９特異的ＣＡＲ、
ＣＤ２０特異的ＣＡＲ、ＣＤ２２特異的ＣＡＲ、ＣＤ２３特異的ＣＡＲ、ＣＤ３０特異的
ＣＡＲ、ＣＤ３３特異的ＣＡＲ、ＣＤ３８特異的ＣＡＲ、ＣＤ７０特異的ＣＡＲ、ＣＤ１
２３特異的ＣＡＲ、ＣＤ１３８特異的ＣＡＲ、κ、λ、Ｂ細胞成熟物質（ＢＣＭＡ）特異
的ＣＡＲ、Ｇタンパク質共役受容体ファミリーＣグループ５メンバーＤ（ＧＰＲＣ５Ｄ）

50

特異的CAR、CD123特異的CAR、LeY特異的CAR、NKG2Dリガンド特異的CAR、WT1特異的CAR、GD2特異的CAR、HER2特異的CAR、EGFR特異的CAR、EGFRvIII特異的CAR、B7H3特異的CAR、PSMA特異的CAR、PSCA特異的CAR、CAIX特異的CAR、CD171特異的CAR、CEA特異的CAR、CSPG4特異的CAR、EPHA2特異的CAR、FAP特異的CAR、FR α 特異的CAR、IL-13R α 特異的CAR、メソテリン特異的CAR、MUC1特異的CAR、MUC16特異的CAR、ROR1特異的CAR、C-Met特異的CAR、CD133特異的CAR、Ep-CAM特異的CAR、GPC3特異的CAR、HPV16-E6特異的CAR、IL13Ra2特異的CAR、MAGEA3特異的CAR、MAGEA4特異的CAR、MART1特異的CAR、NY-ESO-1特異的CAR、VEGFR2特異的CAR、 α 葉酸受容体特異的CAR、CD24特異的CAR、CD44v7/8特異的CAR、EGP-2特異的CAR、EGP-40特異的CAR、erb-B2特異的CAR、erb-B2, 3, 4特異的CAR、FBP特異的CAR、胎児アセチルコリン受容体特異的CAR、GD2特異的CAR、GD3特異的CAR、HMW-MAA特異的CAR、IL-11R α 特異的CAR、KDR特異的CAR、ルイスY特異的CAR、L1細胞接着分子特異的CAR、MAGE-A1特異的CAR、癌胎児性抗原(h5T4)特異的CAR、TAG-72特異的CAR、またはCD19/CD22二重特異性CARであるか、またはそれを含む、実施形態771に記載の方法。

10

【2502】

実施形態II-774. 前記CARが、CD19特異的CAR、CD20特異的CAR、CD22特異的CAR、CD38特異的CAR、CD123特異的CAR、CD138特異的CAR、BCMA特異的CAR、またはCD19/CD22二重特異性CARであるか、またはそれを含む、実施形態771~773のいずれか1項に記載の方法。

20

【2503】

実施形態II-775. 前記遺伝子操作された細胞が、前記CARの細胞表面発現を有する、実施形態771~774のいずれか1項に記載の方法。

【2504】

実施形態II-776. 前記核酸構築物が、キメラ自己抗原受容体(CAAR)をコードする第3の導入遺伝子を更に含む、実施形態658~770のいずれか1項に記載の方法。

30

【2505】

実施形態II-777. 前記方法が、前記第3の導入遺伝子を前記細胞のゲノムの第3の挿入部位に挿入することを更に含む、実施形態776に記載の方法。

【2506】

実施形態II-778. 前記CAARが、 β 細胞抗原、滑膜関節抗原、ミエリン塩基性タンパク質、プロテオリピドタンパク質、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質、MuSK、ケラチノサイト接着タンパク質デスモグレイン3(Dsg3)、RorNP複合体、La抗原、ミエロペルオキシダーゼ、プロテインナーゼ3、カルジオリピン、シトルリン化タンパク質、カルバミル化タンパク質、及び基底膜コラーゲンの α 3鎖からなる群から選択される抗原を含む、実施形態776に記載の方法。

40

【2507】

実施形態II-779. 前記遺伝子操作された細胞が、前記CAARの細胞表面発現を有する、実施形態776~778のいずれか1項に記載の方法。

【2508】

実施形態II-780. 前記核酸構築物が、B細胞自己抗体受容体(BAR)をコードする第3の導入遺伝子を更に含む、実施形態658~770のいずれか1項に記載の方法。

【2509】

実施形態II-781. 前記方法が、前記第3の導入遺伝子を前記細胞のゲノムの第3の挿入部位に挿入することを更に含む、実施形態780に記載の方法。

50

【2510】

実施形態ⅠⅠ－782．前記遺伝子操作された細胞が、前記BARの細胞表面発現を有する、実施形態780に記載の方法。

【2511】

実施形態ⅠⅠ－783．前記第3の導入遺伝子がセーフハーバー遺伝子座に挿入されている、実施形態771～782のいずれか1項に記載の方法。

【2512】

実施形態ⅠⅠ－784．前記第3の導入遺伝子が、TRAC遺伝子座、TRBC1遺伝子座、TRBC2遺伝子座、B2M遺伝子座、CIITA遺伝子座、MICA遺伝子座、MICB遺伝子座、またはセーフハーバー遺伝子座に挿入されている、実施形態771～783のいずれか1項に記載の方法。

10

【2513】

実施形態ⅠⅠ－785．前記第3の導入遺伝子が、AAVS1遺伝子座、ABO遺伝子座、CCR5遺伝子座、CLYBL遺伝子座、CXCR4遺伝子座、F3遺伝子座、FUT1遺伝子座、HMG B1遺伝子座、KDM5D遺伝子座、LRP1遺伝子座、RHD遺伝子座、ROSA26遺伝子座、またはSHS231遺伝子座に挿入されている、実施形態771～784のいずれか1項に記載の方法。

【2514】

実施形態ⅠⅠ－786．前記第1の導入遺伝子及び前記第2の導入遺伝子が、同じ挿入部位に挿入されている、実施形態658～785のいずれか1項に記載の方法。

20

【2515】

実施形態ⅠⅠ－787．前記第1の導入遺伝子及び前記第3の導入遺伝子が、同じ挿入部位に挿入されている、実施形態658～768または780～785のいずれか1項に記載の方法。

【2516】

実施形態ⅠⅠ－788．前記第2の導入遺伝子及び前記第3の導入遺伝子が、同じ挿入部位に挿入されている、実施形態762～785のいずれか1項に記載の方法。

【2517】

実施形態ⅠⅠ－789．前記第1の導入遺伝子、前記第2の導入遺伝子、及び前記第3の導入遺伝子が、同じ挿入部位に挿入されている、実施形態658～785のいずれか1項に記載の方法。

30

【2518】

実施形態ⅠⅠ－790．前記第1の導入遺伝子、前記第2の導入遺伝子、及び前記第3の導入遺伝子が、3種の別個の構築物によりコードされる、実施形態658～789のいずれか1項に記載の方法。

【2519】

実施形態ⅠⅠ－791．前記第1の導入遺伝子、前記第2の導入遺伝子、及び前記第3の導入遺伝子が、2種の別個の構築物によりコードされる、実施形態658～789のいずれか1項に記載の方法。

【2520】

実施形態ⅠⅠ－792．前記第1の導入遺伝子、前記第2の導入遺伝子、及び前記第3の導入遺伝子が、多シストロン性構築物によりコードされる、実施形態658～789のいずれか1項に記載の方法。

40

【2521】

実施形態ⅠⅠ－793．前記遺伝子操作された細胞が、ヒト細胞または非ヒト動物細胞である、実施形態658～792のいずれか1項に記載の方法。

【2522】

実施形態ⅠⅠ－794．前記非ヒト動物細胞が、ブタ、ウシ、またはヒツジ細胞である、実施形態793に記載の方法。

【2523】

50

実施形態ⅠⅠ－７９５．前記遺伝子操作された細胞がヒト細胞である、実施形態７９３に記載の方法。

【２５２４】

実施形態ⅠⅠ－７９６．前記遺伝子操作された細胞が、幹細胞または前駆細胞に由来する分化した細胞である、実施形態６５８～７９５のいずれか１項に記載の方法。

【２５２５】

実施形態ⅠⅠ－７９７．前記細胞が幹細胞または前駆細胞である、実施形態６５８～７９６のいずれか１項に記載の方法。

【２５２６】

実施形態ⅠⅠ－７９８．前記細胞が、幹細胞または前駆細胞に由来する分化した細胞である、実施形態６５８～７９６のいずれか１項に記載の方法。

【２５２７】

実施形態ⅠⅠ－７９９．前記幹細胞が多能性幹細胞である、実施形態７９６に記載の方法。

【２５２８】

実施形態ⅠⅠ－８００．前記多能性幹細胞が人工多能性幹細胞（iPSC）である、実施形態７９９に記載の方法。

【２５２９】

実施形態ⅠⅠ－８０１．前記多能性幹細胞が胚性幹細胞（ESC）である、実施形態７９９に記載の方法。

【２５３０】

実施形態ⅠⅠ－８０２．前記細胞がドナーから単離された初代細胞である、実施形態６５８～８０１のいずれか１項に記載の方法。

【２５３１】

実施形態ⅠⅠ－８０３．前記ドナーが、前記初代細胞が前記ドナーから採取される時点で健常であり、及び／または疾患もしくは病態を有すると疑われていない、実施形態８０２に記載の方法。

【２５３２】

実施形態ⅠⅠ－８０４．前記細胞が、島細胞、β膵島細胞、膵島細胞、免疫細胞、Ｂ細胞、Ｔ細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、ナチュラルキラーＴ（NKT）細胞、マクロファージ細胞、内皮細胞、筋細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、骨格筋細胞、ドーパミン作動性ニューロン、網膜色素上皮細胞、視細胞、肝実質細胞、甲状腺細胞、皮膚細胞、グリア前駆細胞、神経細胞、心臓細胞、幹細胞、造血幹細胞、人工多能性幹細胞（iPSC）、

間葉系幹細胞（MSC）、胚性幹細胞（ESC）、多能性幹細胞（PSC）、血液細胞、またはそれらの組み合わせである、実施形態６５８～８０３のいずれか１項に記載の方法。

【２５３３】

実施形態ⅠⅠ－８０５．前記細胞がＴ細胞である、実施形態６５８～８０４のいずれか１項に記載の方法。

【２５３４】

実施形態ⅠⅠ－８０６．前記Ｔ細胞が、CD3＋Ｔ細胞、CD4＋Ｔ細胞、CD8＋Ｔ細胞、ナイーブＴ細胞、制御性Ｔ（Treg）細胞、非制御性Ｔ細胞、Th1細胞、Th2細胞、Th9細胞、Th17細胞、濾胞性ヘルパーＴ（Tfh）細胞、細胞傷害性Ｔリンパ球（CTL）、エフェクターＴ（Teff）細胞、セントラルメモリーＴ細胞、エフェクターメモリーＴ細胞、CD45RAを発現するエフェクターメモリーＴ細胞（TEMRA細胞）、組織常在性メモリー（Tm）細胞、バーチャルメモリーＴ細胞、自然免疫メモリーＴ細胞、メモリー幹細胞（Tsc）、γδＴ細胞、またはそれらの組み合わせである、実施形態８０５に記載の方法。

【２５３５】

10

20

30

40

50

実施形態Ⅱ－８０７．前記Ｔ細胞が、細胞傷害性Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、メモリーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、腫瘍浸潤リンパ球、またはそれらの組み合わせである、実施形態８０５または８０６に記載の方法。

【２５３６】

実施形態Ⅱ－８０８．前記細胞がヒトＴ細胞である、実施形態８０５～８０７のいずれか１項に記載の方法。

【２５３７】

実施形態Ⅱ－８０９．前記細胞が自家Ｔ細胞である、実施形態８０５～８０８のいずれか１項に記載の方法。

【２５３８】

実施形態Ⅱ－８１０．前記細胞が同種異系Ｔ細胞である、実施形態８０５～８０８のいずれか１項に記載の方法。

【２５３９】

実施形態Ⅱ－８１１．前記同種異系Ｔ細胞が初代Ｔ細胞である、実施形態８１０に記載の方法。

【２５４０】

実施形態Ⅱ－８１２．前記同種異系Ｔ細胞が、胚性幹細胞（ＥＳＣ）または人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）から分化している、実施形態８１０または８１１に記載の方法。

【２５４１】

実施形態Ⅲ－３８６．（ｉ）１種以上のＭＨＣクラスⅠ分子及び／または１種以上のＭＨＣクラスⅡ分子の発現を低減し、及び／または（ｉｉ）１種以上の免疫寛容誘導因子の発現を増強する１種以上の改変を含む遺伝子操作された細胞であって、（ｉ）の発現の前記低減及び（ｉｉ）の発現の前記増強が、前記改変を含まない同じ細胞種の細胞と比較したものである、前記遺伝子操作された細胞。

【２５４２】

実施形態Ⅲ－３８６ａ．１種以上の改変を含む遺伝子操作された細胞であって、前記改変が、

（ａ）

（ｉ）１種以上のＭＨＣクラスⅠ分子、及び／または前記１種以上のＭＨＣクラスⅠ分子の発現を調節する１種以上の分子、及び／または

（ｉｉ）１種以上のＭＨＣクラスⅡ分子、及び／または前記１種以上のＭＨＣクラスⅡ分子の発現を調節する１種以上の分子の１つ以上のアレルを不活性化または破壊し、及び／または

（ｂ）１種以上の免疫寛容誘導因子の発現を増強し、

（ｉｉ）の発現の前記増強が、前記改変を含まない脾島細胞と比較したものである、前記遺伝子操作された細胞。

【２５４３】

実施形態Ⅲ－３８７．（ｉ）における前記１種以上の改変が、

a．１種以上のＭＨＣクラスⅠ分子、

b．１種以上のＭＨＣクラスⅡ分子、または

c．１種以上のＭＨＣクラスⅠ分子及び１種以上のＭＨＣクラスⅡ分子の発現を低減する、実施形態３８８に記載の遺伝子操作された細胞。

【２５４４】

実施形態Ⅲ－３８８．（ｉ）における前記１種以上の改変が、B2M、TAPⅠ、NLRC5、CIITA、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DQ、HLA-DR、HLA-DM、HLA-DO、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B、NFY-C、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される１つ以上の分子の発現を低減する、実施形態３８８または実施形態３８９に記載の遺伝子操作された細胞。

【２５４５】

10

20

30

40

50

実施形態ⅠⅠⅠ－３８９．前記遺伝子操作された細胞が、Ｂ２Ｍ、ＴＡＰⅠ、ＮＬＲＣ５、ＣⅠⅠＴＡ、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃ、ＨＬＡ－ＤＰ、ＨＬＡ－ＤＱ、ＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－ＤＭ、ＨＬＡ－ＤＯ、ＲＦＸ５、ＲＦＸＡＮＫ、ＲＦＸＡＰ、ＮＦＹ－Ａ、ＮＦＹ－Ｂ、ＮＦＹ－Ｃ、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される１つ以上の分子を発現しない、実施形態３９０に記載の遺伝子操作された細胞。

【２５４６】

実施形態ⅠⅠⅠ－３９０．発現を増強する前記１種以上の改変が、細胞表面発現の増強を含み、及び／または発現を低減する前記１種以上の改変が、細胞表面発現の低減を含む、実施形態３８８～３９１のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２５４７】

実施形態ⅠⅠⅠ－３９１．（ｉ）における前記１種以上の改変が、１種以上のＭＨＣクラスⅠ分子の発現を低減する、実施形態３８８～３９２のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２５４８】

実施形態ⅠⅠⅠ－３９２．（ｉ）における前記１種以上の改変が、Ｂ２Ｍの発現を低減する、実施形態３８８～３９３のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２５４９】

実施形態ⅠⅠⅠ－３９３．（ｉ）における前記１種以上の改変が、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、及び／またはＨＬＡ－Ｃの発現を低減する、実施形態３８８～３９４のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２５５０】

実施形態ⅠⅠⅠ－３９４．（ｉ）における前記１種以上の改変が、１種以上のＭＨＣクラスⅠⅠ分子の発現を低減する、実施形態３８８～３９５のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２５５１】

実施形態ⅠⅠⅠ－３９５．（ｉ）における前記１種以上の改変が、ＣⅠⅠＴＡの発現を低減する、実施形態３８８～３９６のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２５５２】

実施形態ⅠⅠⅠ－３９６．（ｉ）における前記１種以上の改変が、ＨＬＡ－ＤＭ、ＨＬＡ－ＤＯ、ＨＬＡ－ＤＰ、ＨＬＡ－ＤＱ、ＨＬＡ－ＤＲ、ＲＦＸ５、ＲＦＸＡＮＫ、及び／またはＲＦＸＡＰの発現を低減する、実施形態３８８～３９７のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２５５３】

実施形態ⅠⅠⅠ－３９７．前記１種以上の免疫寛容誘導因子が、Ａ２０／ＴＮＦＡⅠＰ３、Ｃ１阻害因子、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ２２、ＣＤ１６、ＣＤ１６ Ｆｃ受容体、ＣＤ２４、ＣＤ２７、ＣＤ３５、ＣＤ３９、ＣＤ４６、ＣＤ４７、ＣＤ５２、ＣＤ５５、ＣＤ５９、ＣＤ６４、ＣＤ２００、ＣＲ１、ＣＴＬＡ４－Ⅰｇ、ＤＵＸ４、ＦasL、Ｈ２－Ｍ３、ＨＬＡ－Ｃ、ＨＬＡ－Ｅ、ＨＬＡ－Ｅ重鎖、ＨＬＡ－Ｆ、ＨＬＡ－Ｇ、ＩＤＯ１、ⅠＬ－１０、ⅠＬ１５－ＲＦ、ⅠＬ－３５、ＭＡＮＦ、Ｍｆｇｅ８、ＰＤ－Ｌ１、Ｓerpinb9、Ａ２０／ＴＮＦＡⅠＰ３、ＣＤ３９、ＣＲ１、ＨＬＡ－Ｆ、ⅠＬ１５－ＲＦ、ＭＡＮＦ、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される１つ以上の免疫寛容誘導因子を含む、実施形態３８８～３９８のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２５５４】

実施形態ⅠⅠⅠ－３９８．前記１種以上の免疫寛容誘導因子がＣＤ４７を含む、実施形態３８８～３９９のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２５５５】

実施形態ⅠⅠⅠ－３９９．前記１種以上の免疫寛容誘導因子がＣＣＬ２２を含む、実施形態３８８～４００のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２５５６】

10

20

30

40

50

実施形態ⅠⅠⅠ－４００．前記１種以上の免疫寛容誘導因子がＣＤ１６またはＣＤ１６Ｆｃ受容体を含む、実施形態３８８～４０１のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２５５７】

実施形態ⅠⅠⅠ－４０１．前記１種以上の免疫寛容誘導因子がＣＤ２４を含む、実施形態３８８～４０２のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２５５８】

実施形態ⅠⅠⅠ－４０２．前記１種以上の免疫寛容誘導因子がＣＤ３９を含む、実施形態３８８～４０３のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２５５９】

実施形態ⅠⅠⅠ－４０３．前記１種以上の免疫寛容誘導因子がＣＲ１を含む、実施形態３８８～４０４のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２５６０】

実施形態ⅠⅠⅠ－４０４．前記１種以上の免疫寛容誘導因子がＣＤ５２を含む、実施形態３８８のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２５６１】

実施形態ⅠⅠⅠ－４０５．前記１種以上の免疫寛容誘導因子がＣＤ５５を含む、実施形態３８８～４０６のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２５６２】

実施形態ⅠⅠⅠ－４０６．前記１種以上の免疫寛容誘導因子がＣＤ２００を含む、実施形態３８８～４０７のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２５６３】

実施形態ⅠⅠⅠ－４０７．前記１種以上の免疫寛容誘導因子がＤＵＸ４を含む、実施形態３８８～４０８のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２５６４】

実施形態ⅠⅠⅠ－４０８．前記１種以上の免疫寛容誘導因子がＨＬＡ－Ｅを含む、実施形態３８８～４０９のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２５６５】

実施形態ⅠⅠⅠ－４０９．前記１種以上の免疫寛容誘導因子がＨＬＡ－Ｇを含む、実施形態３８８～４１０のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２５６６】

実施形態ⅠⅠⅠ－４１０．前記１種以上の免疫寛容誘導因子がＩＤＯ１を含む、実施形態３８８～４１１のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２５６７】

実施形態ⅠⅠⅠ－４１１．前記１種以上の免疫寛容誘導因子がＩＬ１５－ＲＦを含む、実施形態３８８～４１２のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２５６８】

実施形態ⅠⅠⅠ－４１２．前記１種以上の免疫寛容誘導因子がＩＬ３５を含む、実施形態３８８～４１３のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２５６９】

実施形態ⅠⅠⅠ－４１３．前記１種以上の免疫寛容誘導因子がＰＤ－Ｌ１を含む、実施形態３８８～４１４のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２５７０】

実施形態ⅠⅠⅠ－４１４．前記１種以上の免疫寛容誘導因子がＭＡＮＦを含む、実施形態３８８～４１５のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２５７１】

実施形態ⅠⅠⅠ－４１５．前記１種以上の免疫寛容誘導因子が、Ａ２０／ＴＮＦＡＩＰ３を含む、実施形態３８８～４１６のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２５７２】

実施形態ⅠⅠⅠ－４１６．前記１種以上の免疫寛容誘導因子が、ＨＬＡ－Ｅ及びＣＤ４

10

20

30

40

50

7を含む、実施形態388～417のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2573】

実施形態III-417. 前記1種以上の免疫寛容誘導因子が、CD47、CD46、及びCD59からなる群から選択される2つ以上の免疫寛容誘導因子を含み、任意により、前記1種以上の免疫寛容誘導因子が、CD47、CD46、及びCD59を含む、実施形態388～31のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2574】

実施形態III-418. 前記1種以上の免疫寛容誘導因子が、CD47及びCD39からなる群から選択される2つ以上の免疫寛容誘導因子を含み、任意により、前記1種以上の免疫寛容誘導因子が、CD47及びCD39を含む、実施形態388～419のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

10

【2575】

実施形態III-419. 前記1種以上の免疫寛容誘導因子が、CD47及びCCL2からなる群から選択される2つ以上の免疫寛容誘導因子を含み、任意により、前記1種以上の免疫寛容誘導因子が、CD47及びCCL2を含む、実施形態388～420のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2576】

実施形態III-420. 前記1種以上の免疫寛容誘導因子が、CD47、HLA-G、及びPD-L1からなる群から選択される2つ以上の免疫寛容誘導因子を含み、任意により、前記1種以上の免疫寛容誘導因子がCD47及びPD-L1を含み、任意により、前記1種以上の免疫寛容誘導因子が、CD47、HLA-G、及びPD-L1を含む、実施形態388～421のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

20

【2577】

実施形態III-421. 前記1種以上の免疫寛容誘導因子が、CD24、CD47、及びPD-L1からなる群から選択される2つ以上の免疫寛容誘導因子を含み、任意により、前記1種以上の免疫寛容誘導因子が、CD24、CD47及びPD-L1を含む、実施形態388～422のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2578】

実施形態III-422. 前記1種以上の免疫寛容誘導因子が、HLA-E、CD24、CD47、及びPD-L1からなる群から選択される2つ以上の免疫寛容誘導因子を含み、任意により、前記1種以上の免疫寛容誘導因子が、HLA-E、CD24、CD47、及びPD-L1を含む、実施形態388～423のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

30

【2579】

実施形態III-423. 前記1種以上の免疫寛容誘導因子が、CD46、CD55、CD59、及びCR1からなる群から選択される2つ以上の免疫寛容誘導因子を含み、任意により、前記1種以上の免疫寛容誘導因子が、CD46、CD55、CD59、及びCR1を含む、実施形態388～424のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2580】

実施形態III-424. 前記1種以上の免疫寛容誘導因子が、HLA-E、CD46、CD55、CD59、及びCR1からなる群から選択される2つ以上の免疫寛容誘導因子を含み、任意により、前記1種以上の免疫寛容誘導因子が、HLA-E、CD46、CD55、CD59、及びCR1を含む、実施形態388～425のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

40

【2581】

実施形態III-425. 前記1種以上の免疫寛容誘導因子が、HLA-E、CD24、CD47、PD-L1、CD46、CD55、CD59、及びCR1からなる群から選択される2つ以上の免疫寛容誘導因子を含み、任意により、前記1種以上の免疫寛容誘導因子が、HLA-E、CD24、CD47、PD-L1、CD46、CD55、CD59、及びCR1を含む、実施形態388～426のいずれか1項に記載の遺伝子操作された

50

細胞。

【2582】

実施形態ⅠⅠⅠ－426．前記1種以上の免疫寛容誘導因子が、HLA－E及びPD－L1を含む、実施形態388～427のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2583】

実施形態ⅠⅠⅠ－427．前記1種以上の免疫寛容誘導因子が、HLA－E、PD－L1、及びA20／TNFAIPからなる群から選択される2つ以上の免疫寛容誘導因子を含み、任意により、前記1種以上の免疫寛容誘導因子が、HLA－E、PD－L1、及びA20／TNFAIPを含む、実施形態388～428のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

10

【2584】

実施形態ⅠⅠⅠ－428．前記1種以上の免疫寛容誘導因子が、HLA－E、PD－L1、及びMANFからなる群から選択される2つ以上の免疫寛容誘導因子を含み、任意により、前記1種以上の免疫寛容誘導因子が、HLA－E、PD－L1、及びMANFを含む、実施形態388～429のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2585】

実施形態ⅠⅠⅠ－429．前記1種以上の免疫寛容誘導因子が、HLA－E、PD－L1、A20／TNFAIP、及びMANFからなる群から選択される2つ以上の免疫寛容誘導因子を含み、任意により、前記1種以上の免疫寛容誘導因子が、HLA－E、PD－L1、A20／TNFAIP、及びMANFを含む、実施形態388～430のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

20

【2586】

実施形態ⅠⅠⅠ－430．(i) 1種以上のMHCクラスⅠ分子及び1種以上のMHCクラスⅡ分子の発現を低減し、

(ii) CD47の発現を増強する1種以上の改変を含む遺伝子操作された細胞であって、(i)の発現の前記低減及び(ii)の発現の前記増強が、改変を含まない同じ細胞種の細胞と比較したものである、前記遺伝子操作された細胞。

【2587】

実施形態ⅠⅠⅠ－431．(i)における前記1種以上の改変が、B2M、TAPⅠ、NLRC5、CIITA、HLA－A、HLA－B、HLA－C、HLA－DP、HLA－DQ、HLA－DR、HLA－DM、HLA－DO、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY－A、NFY－B、NFY－C、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される1つ以上の分子の発現を低減する、実施形態432に記載の遺伝子操作された細胞。

30

【2588】

実施形態ⅠⅠⅠ－432．(i)における前記1種以上の改変が、B2Mの発現を低減する、実施形態432または実施形態46に記載の遺伝子操作された細胞。

【2589】

実施形態ⅠⅠⅠ－433．(i)における前記1種以上の改変が、HLA－A、HLA－B、及び／またはHLA－Cの発現を低減する、実施形態432～434のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

40

【2590】

実施形態ⅠⅠⅠ－434．(i)における前記1種以上の改変が、CIITAの発現を低減する、実施形態432～435のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2591】

実施形態ⅠⅠⅠ－435．(i)における前記1種以上の改変が、HLA－DP、HLA－DR、及び／またはHLA－DQの発現を低減する、実施形態432～435のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2592】

実施形態ⅠⅠⅠ－436．前記遺伝子操作された細胞が、1種以上の追加の免疫寛容誘

50

導因子の発現を増強する1種以上の改変を更に含む、実施形態388～437のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2593】

実施形態III-437. 前記1種以上の追加の免疫寛容誘導因子が、A20/TNFAIP3、C1阻害因子、CCL21、CCL22、CD16、CD16Fc受容体、CD24、CD27、CD35、CD39、CD46、CD47、CD52、CD55、CD59、CD64、CD200、CR1、CTLA4-Ig、DUX4、FasL、H2-M3、HLA-C、HLA-E、HLA-E重鎖、HLA-F、HLA-G、IDO1、IL-10、IL15-RF、IL-35、MANF、Mfge8、PD-L1、Serpinb9、A20/TNFAIP3、CD39、CR1、HLA-F、IL15-RF、MANF、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される1つ以上の免疫寛容誘導因子を含む、実施形態438に記載の遺伝子操作された細胞。

10

【2594】

実施形態III-438. 1つ以上の更なる免疫寛容誘導因子がCD47を含む、実施形態439に記載の遺伝子操作された細胞。

【2595】

実施形態III-439. 前記遺伝子操作された細胞が、1種以上の追加の分子の発現を低減する1種以上の改変を更に含む、実施形態388～440のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2596】

実施形態III-440. 前記1種以上の追加の分子が、B2M、TAP I、NLR C5、CIITA、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DQ、HLA-DR、HLA-DM、HLA-DO、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B、NFY-C、ABO、CADM1、CD58、CD38、CD142、CD155、CEACAM1、CTLA-4、FUT1、ICAM1、IRF1、MIC-A、MIC-B、NLGN4Y、PCDH11Y、PD-1、酸化ストレスまたはERストレスに関与するタンパク質、RHD、TRAC、TRBを含み、任意により、前記酸化ストレスまたはERストレスに関与するタンパク質が、TXNIP、PERK、IRE1α、及びDJ-1(PARK7)からなる群から選択される、実施形態441に記載の遺伝子操作された細胞。

20

【2597】

実施形態III-441. 前記1種以上の追加の分子が、1種以上のY染色体タンパク質、任意により、Y連鎖プロトカドヘリン-11(PCDH11Y)及び／またはY連鎖ニューロリジン-4(NLGN4Y)を含む、実施形態441または442に記載の遺伝子操作された細胞。

【2598】

実施形態III-442. 前記1種以上の追加の分子が、1種以上のNK細胞リガンド、任意により、MIC-A及び／またはMIC-Bを含む、実施形態441～443のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2599】

実施形態III-443. 前記1種以上の追加の分子が、酸化ストレスまたはERストレスに関与する1種以上のタンパク質、任意により、チオレドキシン相互作用タンパク質(TXNIP)、PKR様ERキナーゼ(PERK)、イノシトール要求性酵素1α(IRE1α)、及び／またはDJ-1(PARK7)を含む、実施形態441～444のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

30

【2600】

実施形態III-444. 前記1種以上の追加の分子が、1種以上の血液抗原タンパク質、任意により、ABO、FUT1、及び／またはRHDを含む、実施形態441～446のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2601】

40

50

実施形態ⅠⅠⅠ－４４５．前記遺伝子操作された細胞が、B2M、TAPⅠ、NLR C5、CIITA、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DQ、HLA-DR、HLA-DM、HLA-DO、RFX5、RFXANK、RFXAP、NFY-A、NFY-B、NFY-C、ABO、CADM1、CD58、CD38、CD142、CD155、CEACAM1、CTLA-4、FUT1、ICAM1、IRF1、MIC-A、MIC-B、NLGN4Y、PCDH11Y、PD-1、酸化ストレスまたはERストレスに關与するタンパク質、RHD、TRAC、TRBを含み、任意により、前記酸化ストレスまたはERストレスに關与するタンパク質が、TXNIP、PERK、IRE1α、及びDJ-1(PARK7)の発現を低減する１種以上の改変を更に含む、実施形態３８８～４４６のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

10

【２６０２】

実施形態ⅠⅠⅠ－４４６．TRBが、TRBC1、TRBC2、またはTRBC1及びTRBC2である、実施形態４４７に記載の遺伝子操作された細胞。

【２６０３】

実施形態ⅠⅠⅠ－４４７．発現の低減が、細胞表面発現しないこと、または細胞表面発現が検出可能でないことを含む、実施形態３８８～４４８のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２６０４】

実施形態ⅠⅠⅠ－４４８．発現の低減がmRNA発現の低減を含み、任意により、発現の低減がmRNA発現が検出可能でないことを含む、実施形態３８８～４４９のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

20

【２６０５】

実施形態ⅠⅠⅠ－４４９．発現の低減がタンパク質発現の低減またはタンパク質活性の低減を含み、任意により、発現の低減がタンパク質発現またはタンパク質活性が検出可能でないことを含む、実施形態３８８～４６０のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２６０６】

実施形態ⅠⅠⅠ－４５０．発現の低減が、i)前記１種以上のMHCクラスⅠ分子及び／または前記１種以上のMHCクラスⅡ分子、またはii)前記１種以上の追加の分子をコードするか、またはその発現を調節する遺伝子の活性を除去することを含む、実施形態３８８～４５１のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

30

【２６０７】

実施形態ⅠⅠⅠ－４５１．発現の低減が、i)前記１種以上のMHCクラスⅠ分子及び／または前記１種以上のMHCクラスⅡ分子、またはii)前記１種以上の追加の分子をコードするか、またはその発現を調節する遺伝子のアレルの不活性化または破壊を含む、実施形態３８８～４５２のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２６０８】

実施形態ⅠⅠⅠ－４５２．発現の低減が、i)前記１種以上のMHCクラスⅠ分子及び／または前記１種以上のMHCクラスⅡ分子、またはii)前記１種以上の追加の分子をコードするか、またはその発現を調節する遺伝子の両方のアレルの不活性化または破壊を含む、実施形態３８８～４５３のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

40

【２６０９】

実施形態ⅠⅠⅠ－４５３．発現を低減するための前記１種以上の改変が、i)前記１種以上のMHCクラスⅠ分子及び／または前記１種以上のMHCクラスⅡ分子、またはii)前記１種以上の追加の分子をコードするか、またはその発現を調節する遺伝子におけるインデルを含む、実施形態３８８～４５４のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２６１０】

実施形態ⅠⅠⅠ－４５４．発現を低減するための前記１種以上の改変が、i)前記１種以上のMHCクラスⅠ分子及び／または前記１種以上のMHCクラスⅡ分子、またはi

50

i) 前記 1 種以上の追加の分子をコードするか、またはその発現を調節する遺伝子のフレームシフト変異またはゲノム DNA の連続した区間の欠失を含む、実施形態 388~455 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2611】

実施形態 III-455. 発現を低減するための前記 1 種以上の改変が、i) 前記 1 種以上の MHC クラス I 分子及び／または前記 1 種以上の MHC クラス II 分子、または i) 前記 1 種以上の追加の分子をコードするか、またはその発現を調節する遺伝子の全てのコード配列の不活性化または破壊を含む、実施形態 388~456 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2612】

実施形態 III-456. 発現を低減するための前記 1 種以上の改変が、i) 前記 1 種以上の MHC クラス I 分子及び／または前記 1 種以上の MHC クラス II 分子、または i) 前記 1 種以上の追加の分子をコードするか、またはその発現を調節する遺伝子のノックアウトを含む、実施形態 388~456 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2613】

実施形態 III-457. 前記遺伝子操作された細胞が、

- a. MHC クラス I 及び／または MHC クラス II 分子の発現を低減し、
- b. CD47 の発現を増強し、
- c. CCL22 の発現を増強する 1 種以上の改変を含む、実施形態 388~458 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2614】

実施形態 III-458. 前記遺伝子操作された細胞が、

- a. MHC クラス I 及び／または MHC クラス II 分子の発現を低減し、
- b. CD47 の発現を増強し、
- c. CD39 の発現を増強する 1 種以上の改変を含む、実施形態 388~458 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2615】

実施形態 III-459. 前記遺伝子操作された細胞が、

- a. MHC クラス I 及び／または MHC クラス II 分子の発現を低減し、
- b. CD47 の発現を増強し、
- c. CD46 及び CD59 の発現を増強する 1 種以上の改変を含む、実施形態 388~458 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2616】

実施形態 III-460. 前記遺伝子操作された細胞が、

- a. MHC クラス I 及び／または MHC クラス II 分子の発現を低減し、
- b. CD47 の発現を増強し、
- c. PD-L1 の発現を増強する 1 種以上の改変を含む、実施形態 388~458 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2617】

実施形態 III-461. 前記遺伝子操作された細胞が、

- a. MHC クラス I 及び／または MHC クラス II 分子の発現を低減し、
- b. CD47 の発現を増強し、
- c. HLA-G 及び PD-L1 の発現を増強する 1 種以上の改変を含む、実施形態 388~458 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2618】

実施形態 III-462. 前記遺伝子操作された細胞が、

- a. MHC クラス I 及び／または MHC クラス II 分子の発現を低減し、
- b. CD47 の発現を増強し、
- c. CD142 の発現を低減する 1 種以上の改変を含む、実施形態 388~458 のい

れか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2619】

実施形態ⅠⅠⅠ－463．前記遺伝子操作された細胞が、

- a．MHCクラスⅠ及び／またはMHCクラスⅠⅠ分子の発現を低減し、
- b．CD47の発現を増強し、
- c．MIC－A及び／またはMIC－Bの発現を低減する1種以上の改変を含む、実施形態388～458のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2620】

実施形態ⅠⅠⅠ－464．前記遺伝子操作された細胞が、

- a．MHCクラスⅠ及び／またはMHCクラスⅠⅠ分子の発現を低減し、
- b．CD24の発現を増強する1種以上の改変を含む、実施形態388～458のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2621】

実施形態ⅠⅠⅠ－465．前記遺伝子操作された細胞が、

- a．MHCクラスⅠ及び／またはMHCクラスⅠⅠ分子の発現を低減し、
- b．CD200の発現を増強する1種以上の改変を含む、実施形態388～458のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2622】

実施形態ⅠⅠⅠ－466．前記遺伝子操作された細胞が、

- a．MHCクラスⅠ及び／またはMHCクラスⅠⅠ分子の発現を低減し、
- b．CD52の発現を増強する1種以上の改変を含む、実施形態388～458のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2623】

実施形態ⅠⅠⅠ－467．前記遺伝子操作された細胞が、

- a．MHCクラスⅠ及び／またはMHCクラスⅠⅠ分子の発現を低減し、
- b．DUX4の発現を増強する1種以上の改変を含む、実施形態388～458のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2624】

実施形態ⅠⅠⅠ－468．前記遺伝子操作された細胞が、

- a．MHCクラスⅠ及び／またはMHCクラスⅠⅠ分子の発現を低減し、
- b．IDO1の発現を増強する1種以上の改変を含む、実施形態388～458のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2625】

実施形態ⅠⅠⅠ－469．前記遺伝子操作された細胞が、

- a．MHCクラスⅠ及び／またはMHCクラスⅠⅠ分子の発現を低減し、
- b．IL－35の発現を増強する1種以上の改変を含む、実施形態388～458のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2626】

実施形態ⅠⅠⅠ－470．前記遺伝子操作された細胞が、

- a．MHCクラスⅠ及び／またはMHCクラスⅠⅠ分子の発現を低減し、
- b．PD－L1の発現を増強する1種以上の改変を含む、実施形態388～458のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2627】

実施形態ⅠⅠⅠ－471．前記遺伝子操作された細胞が、

- a．MHCクラスⅠ及び／またはMHCクラスⅠⅠ分子の発現を低減し、
- b．HLA－Eの発現を増強する1種以上の改変を含む、実施形態388～458のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2628】

実施形態ⅠⅠⅠ－472．前記遺伝子操作された細胞が、

- a．MHCクラスⅠ及び／またはMHCクラスⅠⅠ分子の発現を低減し、

b. H L A - G の発現を増強する 1 種以上の改変を含む、実施形態 3 8 8 ~ 4 5 8 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【 2 6 2 9 】

実施形態 I I I - 4 7 3 . 前記遺伝子操作された細胞が、

- a. M H C クラス I 及び / または M H C クラス I I 分子の発現を低減し、
- b. C D 1 5 5 の発現を低減し、
- c. H L A - E の発現を増強する 1 種以上の改変を含む、実施形態 3 8 8 ~ 4 5 8 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【 2 6 3 0 】

実施形態 I I I - 4 7 4 . 前記遺伝子操作された細胞が、

- a. M H C クラス I 分子の発現を低減し、
- b. R F X A N K の発現を低減し、
- c. H L A - E の発現を増強する 1 種以上の改変を含む、実施形態 3 8 8 ~ 4 5 8 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【 2 6 3 1 】

実施形態 I I I - 4 7 5 . 前記遺伝子操作された細胞が、

- a. M H C クラス I 及び / または M H C クラス I I 分子の発現を低減し、
- b. M I C - A 及び / または M I C - B の発現を低減し、
- c. C D 4 7 、 C D 2 4 、 及び P D - L 1 のうちの 1 つ以上の発現を増強し、
- d. C D 4 6 、 C D 5 5 、 C D 5 9 、 及び C R 1 の発現を増強する 1 種以上の改変を含む、実施形態 3 8 8 ~ 4 5 8 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【 2 6 3 2 】

実施形態 I I I - 4 7 6 . 前記遺伝子操作された細胞が、

- a. M H C クラス I 分子の発現を低減し、
- b. M I C - A 及び / または M I C - B の発現を低減し、
- c. T X N I P の発現を低減し、
- d. P D - L 1 及び H L A - E の発現を増強する 1 種以上の改変を含む、実施形態 3 8 8 ~ 4 5 8 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【 2 6 3 3 】

実施形態 I I I - 4 7 7 . 前記改変が、 A 2 0 / T N F A I P 3 及び M A N F の発現を更に増強する、実施形態 4 7 7 に記載の遺伝子操作された細胞。

【 2 6 3 4 】

実施形態 I I I - 4 7 8 . M H C クラス I 及び / または M H C クラス I I 分子の発現を低減する前記 1 種以上の改変が、 M H C クラス I 分子の発現を低減する 1 種以上の改変からなる、実施形態 3 8 8 ~ 4 7 9 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【 2 6 3 5 】

実施形態 I I I - 4 7 9 . M H C クラス I 及び / または M H C クラス I I 分子の発現を低減する前記 1 種以上の改変が、 M H C クラス I I 分子の発現を低減する 1 種以上の改変からなる、実施形態 3 8 8 ~ 4 7 9 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【 2 6 3 6 】

実施形態 I I I - 4 8 0 . M H C クラス I 及び / または M H C クラス I I 分子の発現を低減する前記 1 種以上の改変が、 M H C クラス I 分子及び M H C クラス I I 分子の発現を低減する 1 種以上の改変からなる、実施形態 3 8 8 ~ 4 7 9 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【 2 6 3 7 】

実施形態 I I I - 4 8 1 . 発現の増強が m R N A 発現の増強を含む、実施形態 3 8 8 ~ 4 8 2 に記載の遺伝子操作された細胞。

【 2 6 3 8 】

実施形態 I I I - 4 8 2 . 発現の増強がタンパク質発現またはタンパク質活性の増強を含む、実施形態 3 8 8 ~ 4 8 3 に記載の遺伝子操作された細胞。

10

20

30

40

50

【2639】

実施形態ⅠⅠⅠ－483．発現の増強が、i) 前記1種以上の免疫寛容誘導因子、またはii) 前記1種以上の追加の免疫寛容誘導因子をコードするか、またはその発現を調節する遺伝子の活性を増強することを含む、実施形態388～484のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2640】

実施形態ⅠⅠⅠ－484．前記遺伝子が内在性遺伝子であり、前記1種以上の改変が内在性プロモーターの1種以上の改変を含む、実施形態485に記載の遺伝子操作された細胞。

【2641】

実施形態ⅠⅠⅠ－485．前記遺伝子が内在性遺伝子であり、前記1種以上の改変が異種プロモーターの導入を含む、実施形態485に記載の遺伝子操作された細胞。

【2642】

実施形態ⅠⅠⅠ－486．前記異種プロモーターが、CAGプロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、EF1aプロモーター、EF1αショートプロモーター、PGKプロモーター、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター、SV40プロモーター、HSVのtkプロモーター、マウス乳癌ウイルス(MMTV)プロモーター、HIVのLTRプロモーター、モロニーウイルスのプロモーター、エプスタイン・バーウイルス(EBV)プロモーター、及びラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター、及びUBCプロモーターからなる群から選択される、実施形態487に記載の遺伝子操作された細胞。

【2643】

実施形態ⅠⅠⅠ－487．前記遺伝子操作された細胞が1種以上の導入遺伝子を含む、実施形態388～481のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2644】

実施形態ⅠⅠⅠ－488．前記1種以上の導入遺伝子が、前記1種以上の免疫寛容誘導因子または前記1種以上の追加の免疫寛容誘導因子のうちの少なくとも1つをコードする、実施形態489に記載の遺伝子操作された細胞。

【2645】

実施形態ⅠⅠⅠ－489．前記1種以上の導入遺伝子が、前記1種以上の追加の免疫寛容誘導因子のうちの少なくとも1つをコードする、実施形態489または490に記載の遺伝子操作された細胞。

【2646】

実施形態ⅠⅠⅠ－490．前記1種以上の導入遺伝子が、1種以上の追加の分子をコードする、実施形態489～491のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2647】

実施形態ⅠⅠⅠ－491．前記1種以上の導入遺伝子が、1種以上の調節エレメントを含む、実施形態489～492のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2648】

実施形態ⅠⅠⅠ－492．前記1種以上の導入遺伝子が、前記1種以上の調節エレメントに作動可能に連結されている、実施形態489～493のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2649】

実施形態ⅠⅠⅠ－493．前記1種以上の調節エレメントが、1種以上のプロモーター、エンハンサー、イントロン、ターミネーター、翻訳開始シグナル、ポリアデニル化シグナル、複製エレメント、RNAプロセシング及び輸送エレメント、トランスポゾン、トランスポザーゼ、インスレーター、内部リボソーム進入部位(IRES)、5'UTR、3'UTR、mRNA 3'末端プロセシング配列、境界エレメント、遺伝子座制御領域(LCR)、マトリックス結合領域(MAR)、組換えもしくはカセット交換用配列、リンカー配列、分泌シグナル、耐性マーカー、アンカーペプチド、局在化シグナル、融合タグ、ア

10

20

30

40

50

フィニティータグ、シャペロニン、ならびにプロテアーゼを含む、実施形態 493 または実施形態 107 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2650】

実施形態 III-494. 前記 1 種以上の調節エレメントがプロモーターを含む、実施形態 493、実施形態 495、または実施形態 107 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2651】

実施形態 III-497. 前記プロモーターが、CAG プロモーター、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、EF1a プロモーター、EF1 α ショートプロモーター、PGK プロモーター、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス 7.5K プロモーター、SV40 プロモーター、HSV の tk プロモーター、マウス乳癌ウイルス (MMTV) プロモーター、HIV の LTR プロモーター、モロニーウイルスのプロモーター、エプスタイン・バーウイルス (EBV) プロモーター、及びラウス肉腫ウイルス (RSV) プロモーター、及び UBC プロモーターからなる群から選択される、実施形態 495 または 496 に記載の遺伝子操作された細胞。

10

【2652】

実施形態 III-498. 前記遺伝子操作された細胞が、前記 1 種以上の導入遺伝子をコードする 1 種以上のベクターを含む、実施形態 489 ~ 497 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2653】

実施形態 III-499. 前記 1 種以上のベクターのうちの少なくとも 1 つが多シストロン性ベクターである、実施形態 498 に記載の遺伝子操作された細胞。

20

【2654】

実施形態 III-500. 前記多シストロン性ベクターが、前記 1 種以上の免疫寛容誘導因子または前記 1 種以上の追加の免疫寛容誘導因子のうちの少なくとも 1 つをコードする、実施形態 499 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2655】

実施形態 III-501. 前記多シストロン性ベクターが、前記 1 種以上の免疫寛容誘導因子または前記 1 種以上の追加の免疫寛容誘導因子のうちの少なくとも 1 つを更にコードする、実施形態 499 または実施形態 113 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2656】

実施形態 III-502. 前記多シストロン性ベクターが、前記 1 種以上の追加の分子のうちの少なくとも 1 つを更にコードする、実施形態 500 または実施形態 501 に記載の遺伝子操作された細胞。

30

【2657】

実施形態 III-503. 前記 1 種以上の導入遺伝子が 1 種以上のリンカー配列により分離されている、実施形態 489 ~ 502 のいずれか 1 項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2658】

実施形態 III-504. 前記 1 種以上のリンカー配列が、IRES 配列または切断可能なペプチド配列を含む、実施形態 503 に記載の遺伝子操作された細胞。

40

【2659】

実施形態 III-505. 前記切断可能なペプチド配列が自己切断可能なペプチド、任意により、2A ペプチドを含む、実施形態 504 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2660】

実施形態 III-506. 前記 2A ペプチドが、F2A 配列、E2A 配列、P2A 配列、及び T2A 配列からなる群から選択される、実施形態 505 に記載の遺伝子操作された細胞。

【2661】

実施形態 III-507. 前記切断可能なペプチド配列が、プロテアーゼ切断可能な配列または化学的に切断可能な配列を含む、実施形態 504 ~ 506 のいずれか 1 項に記載

50

の遺伝子操作された細胞。

【2662】

実施形態ⅠⅠⅠ－508．前記1種以上の免疫寛容誘導因子、前記1種以上の追加の免疫寛容誘導因子、及び／または前記1種以上の追加の分子が、同じプロモーターに作動可能に連結されている、実施形態500～507のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2663】

実施形態ⅠⅠⅠ－509．前記プロモーターが構成的プロモーターである、実施形態508のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2664】

実施形態ⅠⅠⅠ－510．前記プロモーターが、CAGプロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、EF1aプロモーター、EF1αショートプロモーター、PGKプロモーター、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター、SV40プロモーター、HSVのtkプロモーター、マウス乳癌ウイルス(MMTV)プロモーター、HIVのLTRプロモーター、モロニーウイルスのプロモーター、エプスタイン・バーウイルス(EBV)プロモーター、及びラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター、及びUBCプロモーターからなる群から選択される、実施形態508または509に記載の遺伝子操作された細胞。

【2665】

実施形態ⅠⅠⅠ－511．前記1種以上の追加の分子がキメラ抗原受容体(CAR)を含む、実施形態492～510のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2666】

実施形態ⅠⅠⅠ－512．前記CARが、シグナルペプチド、CD19に特異的な細胞外結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内共刺激ドメイン、及び／または細胞内シグナル伝達ドメインを含む、実施形態511に記載の遺伝子操作された細胞。

【2667】

実施形態ⅠⅠⅠ－513．前記CARが、CD19、CD20、CD22、CD38、CD123、CD138、BCMA、またはそれらの任意の組み合わせに特異的である、実施形態511または実施形態125に記載の遺伝子操作された細胞。

【2668】

実施形態ⅠⅠⅠ－514．前記CARがCD19／CD22二重特異性CARである、実施形態513に記載の遺伝子操作された細胞。

【2669】

実施形態ⅠⅠⅠ－515．前記1種以上の追加の分子が、1種以上の安全スイッチを含む、実施形態492～514のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2670】

実施形態ⅠⅠⅠ－516．前記1種以上の安全スイッチが、前記遺伝子操作された細胞の制御された殺傷が可能である、実施形態515に記載の遺伝子操作された細胞。

【2671】

実施形態ⅠⅠⅠ－517．前記1種以上の安全スイッチが、薬物もしくはプロドラッグの存在下で、または外来性選択的化合物による活性化時に、制御された細胞死を誘発する、実施形態515または516に記載の遺伝子操作された細胞。

【2672】

実施形態ⅠⅠⅠ－518．前記1種以上の安全スイッチが、前記遺伝子操作された細胞のアポトーシスを誘発することができる誘導性タンパク質を含む、実施形態515～517のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2673】

実施形態ⅠⅠⅠ－519．前記遺伝子操作された細胞のアポトーシスを誘発することができる前記誘導性タンパク質が、カスパーゼタンパク質である、実施形態518に記載の遺伝子操作された細胞。

10

20

30

40

50

【2674】

実施形態ⅠⅠⅠ－520．前記カスパーゼタンパク質が、カスパーゼ9である、実施形態519に記載の遺伝子操作された細胞。

【2675】

実施形態ⅠⅠⅠ－521．前記1種以上の安全スイッチが、1種以上の自殺遺伝子を含む、実施形態515～520のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2676】

実施形態ⅠⅠⅠ－522．前記1種以上の自殺遺伝子が、シトシンデアミナーゼ（C y D）、ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（H S V－T k）、誘導性カスパーゼ9（i C a s p a s e 9）、及びラパマイシン活性化カスパーゼ9（r a p a C a s p 9）からなる群から選択される、実施形態521に記載の遺伝子操作された細胞。

10

【2677】

実施形態ⅠⅠⅠ－523．前記1種以上の導入遺伝子のうちの少なくとも1つが、前記遺伝子操作された細胞のゲノムに組み込まれている、実施形態489～522のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2678】

実施形態ⅠⅠⅠ－524．組み込みが、前記遺伝子操作された細胞のゲノムへの非標的化挿入によるものである、実施形態523に記載の遺伝子操作された細胞。

【2679】

実施形態ⅠⅠⅠ－525．組み込みが、前記遺伝子操作された細胞のゲノムへのレンチウイルスベクターを使用した非標的化挿入によるものである、実施形態524に記載の遺伝子操作された細胞。

20

【2680】

実施形態ⅠⅠⅠ－526．組み込みが、前記遺伝子操作された細胞の標的ゲノム遺伝子座への標的化挿入によるものである、実施形態523に記載の遺伝子操作された細胞。

【2681】

実施形態ⅠⅠⅠ－527．標的化挿入が、ヌクレアーゼにより媒介される相同組換え修復を用いた遺伝子編集によるものである、実施形態526に記載の遺伝子操作された細胞。

【2682】

実施形態ⅠⅠⅠ－528．前記標的ゲノム遺伝子座が、アルブミン遺伝子座、A B O 遺伝子座、B 2 M 遺伝子座、C I I T A 遺伝子座、C C R 5 遺伝子座、C D 1 4 2 遺伝子座、C L Y B L 遺伝子座、C X C R 4 遺伝子座、F 3 遺伝子座、F U T 1 遺伝子座、H M G B 1 遺伝子座、K D M 5 D 遺伝子座、L R P 1 遺伝子座、M I C－A 遺伝子座、M I C－B 遺伝子座、P P P 1 R 1 2 C（A A V S 1としても公知）遺伝子座、R H D 遺伝子座、R O S A 2 6 遺伝子座、セーフハーバー遺伝子座、S H S 2 3 1 遺伝子座、T A P 1 遺伝子座、T R A C 遺伝子座、及びT R B C 遺伝子座からなる群から選択される、実施形態526または527に記載の遺伝子操作された細胞。

30

【2683】

実施形態ⅠⅠⅠ－529．前記遺伝子操作された細胞のゲノムが、発現が低減された実施形態388～141のいずれか1項に記載の1種以上の分子をコードする1種以上の遺伝子における1つ以上の遺伝子編集を含む、実施形態388～528のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

40

【2684】

実施形態ⅠⅠⅠ－530．前記遺伝子操作された細胞がゲノム編集複合体を含む、実施形態388～529のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2685】

実施形態ⅠⅠⅠ－531．前記ゲノム編集複合体が、ゲノム標的化物質及びゲノム改変物質を含む、実施形態530に記載の遺伝子操作された細胞。

【2686】

50

実施形態ⅠⅠⅠ－５３２．前記ゲノム標的化物質が前記ゲノム編集複合体を標的遺伝子座に局在させ、任意により、前記ゲノム標的化物質が核酸誘導型標的化物質である、実施形態５３１に記載の遺伝子操作された細胞。

【２６８７】

実施形態ⅠⅠⅠ－５３３．前記ゲノム標的化物質が、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）結合タンパク質、ジンクフィンガー（ＺＦ）結合タンパク質、メガヌクレアーゼ、Ｃａｓタンパク質、ＴｎｐＢタンパク質、ホーミングエンドヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ欠損Ｃａｓタンパク質、酵素的に不活性なＣａｓタンパク質、核酸によりプログラム化可能なＤＮＡ結合タンパク質、またはそれらの機能部分を含む、実施形態５３１または実施形態５３２に記載の遺伝子操作された細胞。

【２６８８】

実施形態ⅠⅠⅠ－５３４．前記ゲノム標的化物質が、Ｃａｓ１、Ｃａｓ２、Ｃａｓ３、Ｃａｓ４、Ｃａｓ５、Ｃａｓ６、Ｃａｓ７、Ｃａｓ８ａ、Ｃａｓ８ｂ、Ｃａｓ８ｃ、Ｃａｓ９、Ｃａｓ１０、Ｃａｓ１２、Ｃａｓ１２ａ（Ｃｐｆ１）、Ｃａｓ１２ｂ（Ｃ２ｃ１）、Ｃａｓ１２ｃ（Ｃ２ｃ３）、Ｃａｓ１２ｄ（ＣａｓＹ）、Ｃａｓ１２ｅ（ＣａｓＸ）、Ｃａｓ１２ｆ（Ｃ２ｃ１０）、Ｃａｓ１２ｇ、Ｃａｓ１２ｈ、Ｃａｓ１２ｉ、Ｃａｓ１２ｋ（Ｃ２ｃ５）、Ｃａｓ１３、Ｃａｓ１３ａ（Ｃ２ｃ２）、Ｃａｓ１３ｂ、Ｃａｓ１３ｃ、Ｃａｓ１３ｄ、Ｃ２ｃ４、Ｃ２ｃ８、Ｃ２ｃ９、Ｃｍｒ１、Ｃｍｒ２、Ｃｍｒ３、Ｃｍｒ４、Ｃｍｒ５、Ｃｍｒ６、Ｃｓｄ１、Ｃｓｄ２、Ｃａｓ５ｄ、Ｃｓｅ１、Ｃｓｅ２、Ｃｓｅ３、Ｃｓｅ４、Ｃａｓ５ｅ、Ｃｓｆ１、Ｃｓｍ１、Ｃｓｍ２、Ｃｓｍ３、Ｃｓｍ４、Ｃｓｍ５、Ｃｓｎ１、Ｃｓｎ２、Ｃｓｔ１、Ｃｓｔ２、Ｃａｓ５ｔ、Ｃｓｈ１、Ｃｓｈ２、Ｃａｓ５ｈ、Ｃｓａ１、Ｃｓａ２、Ｃｓａ３、Ｃｓａ４、Ｃｓａ５、Ｃａｓ５ａ、Ｃｓｘ１０、Ｃｓｘ１１、Ｃｓｙ１、Ｃｓｙ２、Ｃｓｙ３、Ｃｓｙ４、Ｍａｄ７、ＳｐＣａｓ９、ＳｐＣａｓ９のｅＳｐＣａｓ９、ＳｐＣａｓ９－ＨＦ１、ＨｙｐａＳｐＣａｓ９、ＨｅＦＳｐＣａｓ９、及びｅｖｏＳｐＣａｓ９高忠実度バリエーション、ＳａＣａｓ９、ＮｍｅＣａｓ９、ＣｊＣａｓ９、ＳｔＣａｓ９、ＴｄＣａｓ９、ＬｂＣａｓ１２ａ、ＡｓＣａｓ１２ａ、ＡａｃＣａｓ１２ｂ、ＢｈＣａｓ１２ｂ ｖ４、ＴｎｐＢ、ｄＣａｓ（Ｄ１０Ａ）、ｄＣａｓ（Ｈ８４０Ａ）、ｄＣａｓ１３ａ、ｄＣａｓ１３ｂ、コアＣａｓタンパク質、核酸によりプログラム化可能なＤＮＡ結合タンパク質、ＲＮＡ誘導型ヌクレアーゼ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、メガヌクレアーゼ、ＣＲＩＳＰＲ関連トランスポザラーゼ、またはそれらの機能部分からなる群から選択される、実施形態５３１～５３３のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２６８９】

実施形態ⅠⅠⅠ－５３５．前記ゲノム改変物質が、標的遺伝子座を開裂するか、脱アミノ化するか、それにニックを入れるか、それを重合させるか、調査するか、融合させるか、切断するか、ほどくか、破壊するか、変化させるか、メチル化するか、脱メチル化するか、または別様に不安定化する、実施形態５３１に記載の遺伝子操作された細胞。

【２６９０】

実施形態ⅠⅠⅠ－５３６．前記ゲノム改変物質が、リコンビナーゼ、インテグラーゼ、トランスポザラーゼ、エンドヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼ、ニッカーゼ、ヘリカーゼ、ポリメラーゼ、逆転写酵素、デアミナーゼ、フリッパーゼ、メチラーゼ、デメチラーゼ、アセチラーゼ、核酸修飾タンパク質、ＲＮＡ修飾タンパク質、ＤＮＡ修飾タンパク質、アルゴノートタンパク質、エピジェネティック修飾タンパク質、ヒストン修飾タンパク質、またはそれらの機能部分を含む、実施形態５３１または実施形態５３５に記載の遺伝子操作された細胞。

【２６９１】

実施形態ⅠⅠⅠ－５３７．前記ゲノム改変物質が、Ｃａｓ１、Ｃａｓ２、Ｃａｓ３、Ｃａｓ４、Ｃａｓ５、Ｃａｓ６、Ｃａｓ７、Ｃａｓ８ａ、Ｃａｓ８ｂ、Ｃａｓ８ｃ、Ｃａｓ９、Ｃａｓ１０、Ｃａｓ１２、Ｃａｓ１２ａ（Ｃｐｆ１）、Ｃａｓ１２ｂ（Ｃ２ｃ１）、

10

20

30

40

50

Cas12c (C2c3)、Cas12d (CasY)、Cas12e (CasX)、Cas12f (C2c10)、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k (C2c5)、Cas13、Cas13a (C2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr1、Cmr2、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csd1、Csd2、Cas5d、Cse1、Cse2、Cse3、Cse4、Cas5e、Csf1、Csm1、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csn1、Csn2、Cst1、Cst2、Cas5t、Csh1、Csh2、Cas5h、Csa1、Csa2、Csa3、Csa4、Csa5、Cas5a、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3、Csy4、Mad7、SpCas9、SpCas9のeSpCas9、SpCas9-HF1、HypaSpCas9、HeFSpCas9、及びevoSpCas9高忠実度バリエーション、SaCas9、NmeCas9、CjCas9、StCas9、TdCas9、LbCas12a、AsCas12a、AacCas12b、BhCas12b v4、TnpB、FokI、dCas (D10A)、dCas (H840A)、dCas13a、dCas13b、コアCasタンパク質、核酸によりプログラム化可能なDNA結合タンパク質、RNA誘導型ヌクレアーゼ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、メガヌクレアーゼ、CRISPR関連トランスポザラーゼ、APOBEC1、シチジンデアミナーゼ、アデノシンデアミナーゼ、ウラシルグリコシラーゼ阻害剤 (UGI)、アデニン塩基エディター (ABE)、シトシン塩基エディター (CBE)、逆転写酵素、セリンインテグラーゼ、ポリメラーゼ、アデニン→チミンもしくは「ATBE」 (またはチミン→アデニンもしくは「TABE」) トランスバージョン塩基エディター、10-11転座メチルシトシンジオキシゲナーゼ (TET)、TET1、TET3、TET1CD、ヒストンアセチルトランスフェラーゼp300、ヒストンメチルトランスフェラーゼSMYD3、ヒストンメチルトランスフェラーゼPRDM9、H3K79メチルトランスフェラーゼDOT1L、転写抑制因子、またはそれらの機能部分からなる群から選択される、実施形態536に記載の遺伝子操作された細胞。

10

20

30

40

50

【2692】

実施形態III-538. 前記ゲノム標的化物質及び前記ゲノム改変物質が、単一のポリペプチドの異なるドメインである、実施形態531～537のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2693】

実施形態III-539. 前記ゲノム編集物質及びゲノム改変物質が、互いに作動可能に連結されている2つの異なるポリペプチドである、実施形態531～538のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2694】

実施形態III-540. 前記ゲノム編集物質及びゲノム改変物質が、互いに連結されていない2つの異なるポリペプチドである、実施形態531～538のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2695】

実施形態III-541. 前記改変がゲノム改変タンパク質によるものである、実施形態462～469のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2696】

実施形態III-542. ゲノム改変タンパク質による前記改変が、CRISPR関連トランスポザラーゼ、プライム編集、または部位特異的標的化エレメントによるプログラム化可能な付加 (PASTE) による改変である、実施形態470のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2697】

実施形態III-543. 前記ゲノム改変タンパク質による前記改変が、ヌクレアーゼにより媒介される遺伝子編集である、実施形態470～471のいずれか1項に記載の遺

伝子操作された細胞。

【2698】

実施形態ⅠⅠⅠ－544．前記ヌクレアーゼにより媒介される遺伝子編集が、B2M遺伝子を標的とするジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、TALEエフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、またはCRISPR-Casの組み合わせによるものであり、任意により、前記Casが、Cas9またはCas12から選択される、実施形態472に記載の遺伝子操作された細胞。

【2699】

実施形態ⅠⅠⅠ－545．前記ゲノム改変タンパク質による前記改変が、Cas3、Cas4、Cas5、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12、Cas12a（Cpf1）、Cas12b（C2c1）、Cas12c（C2c3）、Cas12d（CasY）、Cas12e（CasX）、Cas12f（C2c10）、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12k（C2c5）、Cas13、Cas13a（C2c2）、Cas13b、Cas13c、Cas13d、C2c4、C2c8、C2c9、Cmr5、Cse1、Cse2、Csf1、Csm2、Csn2、Csx10、Csx11、Csy1、Csy2、Csy3、Mad7、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、メガヌクレアーゼ、及びCRISPR関連トランスポザラーゼからなる群から選択される1つ以上のタンパク質により実行される、実施形態470～472のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2700】

実施形態ⅠⅠⅠ－546．前記ヌクレアーゼにより媒介される遺伝子編集が、CRISPR-Casの組み合わせによるものであり、前記CRISPR-Casの組み合わせが、B2M遺伝子内の少なくとも1つの標的部位に相補的な標的化ドメインを有するガイドRNA（gRNA）を含む、実施形態473に記載の遺伝子操作された細胞。

【2701】

実施形態ⅠⅠⅠ－547．前記CRISPR-Casの組み合わせが、gRNA及びCasタンパク質を含むリボ核タンパク質（RNP）複合体である、実施形態475に記載の遺伝子操作された細胞。

【2702】

実施形態ⅠⅠⅠ－548．前記遺伝子操作された細胞が、ヒト細胞または動物細胞である、実施形態1～547のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2703】

実施形態ⅠⅠⅠ－549．前記動物細胞が、ブタ細胞、ウシ細胞、またはヒツジ細胞である、実施形態548に記載の遺伝子操作された細胞。

【2704】

実施形態ⅠⅠⅠ－550．前記遺伝子操作された細胞がヒト細胞である、実施形態548に記載の遺伝子操作された細胞。

【2705】

実施形態ⅠⅠⅠ－551．前記遺伝子操作された細胞が幹細胞または前駆細胞である、実施形態388～550のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞。

【2706】

実施形態ⅠⅠⅠ－552．前記遺伝子操作された細胞が、幹細胞または前駆細胞に由来する分化した細胞である、実施形態551に記載の遺伝子操作された細胞。

【2707】

実施形態ⅠⅠⅠ－553．前記幹細胞または前駆細胞が、人工多能性幹細胞、胚性幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、内皮幹細胞、上皮幹細胞、脂肪幹細胞、生殖系列幹細胞、肺幹細胞、臍帯血幹細胞、多能性幹細胞（PSC）、及び多能性幹細胞からなる群から選択される、実施形態551または552に記載の遺伝子操作された細胞。

【2708】

実施形態ⅠⅠⅠ－５５４．前記遺伝子操作された細胞が、多能性幹細胞またはその子孫に由来する分化した細胞である、実施形態３８８～５５０のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２７０９】

実施形態ⅠⅠⅠ－５５５．前記多能性幹細胞が人工多能性幹細胞である、実施形態５５４に記載の遺伝子操作された細胞。

【２７１０】

実施形態ⅠⅠⅠ－５５６．前記遺伝子操作された細胞が、ドナー対象から単離された初代細胞である、実施形態３８８～５５０のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２７１１】

実施形態ⅠⅠⅠ－５５７．前記ドナー対象が、ドナー試料が個別のドナーから採取される時点で健常であるか、または疾患もしくは病態を有すると疑われていない、実施形態５５６に記載の遺伝子操作された細胞。

【２７１２】

実施形態ⅠⅠⅠ－５５８．前記遺伝子操作された細胞が、膵島細胞、β膵島細胞、膵島細胞、免疫細胞、Ｂ細胞、Ｔ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、ナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞、マクロファージ細胞、内皮細胞、筋細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、骨格筋細胞、ドーパミン作動性ニューロン、網膜色素上皮細胞、視細胞、肝実質細胞、甲状腺細胞、皮膚細胞、グリア前駆細胞、神経細胞、心臓細胞、幹細胞、造血幹細胞、人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）、間葉系幹細胞（ＭＳＣ）、胚性幹細胞（ＥＳＣ）、多能性幹細胞（ＰＳＣ）、及び血液細胞からなる群から選択される、実施形態３８８～５５７のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２７１３】

実施形態ⅠⅠⅠ－５５９．前記細胞がＡＢＯ血液型のＯ型である、実施形態３８８～５５８のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２７１４】

実施形態ⅠⅠⅠ－５６０．前記細胞が、機能的ＡＢＯ遺伝子Ａアレル及び／または機能的ＡＢＯ遺伝子Ｂアレルを含む、実施形態３８８～５５９のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２７１５】

実施形態ⅠⅠⅠ－５６１．前記細胞がＲｈ因子陰性（Ｒｈ－）である、実施形態３８８～５６０のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２７１６】

実施形態ⅠⅠⅠ－５６２．前記細胞がＲｈ因子陽性（Ｒｈ＋）である、実施形態３８８～５６０のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２７１７】

実施形態ⅠⅠⅠ－５６３．実施形態３８８～５６２のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞を作製する方法であって、

a.細胞を採取することと、

b.実施形態３８８～５６２のいずれか１項に記載の１種以上の改変を前記細胞に導入することと、を含む、前記方法。

【２７１８】

実施形態ⅠⅠⅠ－５６４．前記方法が、前記改変のうちの１つ以上の存在及び／または程度に基づいて細胞集団から前記遺伝子操作された細胞を選別することを更に含む、実施形態５６３に記載の方法。

【２７１９】

実施形態ⅠⅠⅠ－５６５．前記細胞が幹細胞または前駆細胞であり、前記方法が、前記幹細胞または前記前駆細胞を分化させることを更に含む、実施形態５６３または５６４に記載の方法。

【２７２０】

10

20

30

40

50

実施形態ⅠⅠⅠ－５６６．前記細胞が多能性幹細胞またはその子孫であり、前記方法が、前記多能性幹細胞またはその子孫を分化させることを含む、実施形態５６３または５６４に記載の方法。

【２７２１】

実施形態ⅠⅠⅠ－５６７．前記細胞が初代細胞である、実施形態５６３または５６４に記載の方法。

【２７２２】

実施形態ⅠⅠⅠ－５６８．前記方法が、前記細胞のゲノムに１種以上の遺伝子編集を導入することを含む、実施形態５６３～５６７のいずれか１項に記載の方法。

【２７２３】

実施形態ⅠⅠⅠ－５６９．前記１種以上の遺伝子編集が、非標的化挿入により前記細胞のゲノムに導入される、実施形態５６８に記載の方法。

【２７２４】

実施形態ⅠⅠⅠ－５７０．前記１種以上の遺伝子編集が、標的化挿入により前記細胞のゲノムに導入される、実施形態５６８に記載の方法。

【２７２５】

実施形態ⅠⅠⅠ－５７１．前記１種以上の遺伝子編集が、実施形態３８８～５６１のいずれか１項に記載の１種以上の分子をコードする１種以上の遺伝子に導入される、実施形態５６８または５７０に記載の方法。

【２７２６】

実施形態ⅠⅠⅠ－５７２．前記遺伝子操作された細胞が、１種以上の編集された遺伝子によりコードされる１種以上の分子の増強された発現を有する、実施形態５７１に記載の方法。

【２７２７】

実施形態ⅠⅠⅠ－５７３．前記遺伝子操作された細胞が、１種以上の編集された遺伝子によりコードされる１種以上の分子の低減された発現を有する、実施形態５７１または５７２に記載の方法。

【２７２８】

実施形態ⅠⅠⅠ－５７４．前記１種以上の遺伝子編集が、実施形態５３０～５４７のいずれか１項に記載のゲノム編集複合体のうちの少なくとも１つを使用して細胞のゲノムに導入される、実施形態５６８～１８５のいずれか１項に記載の方法。

【２７２９】

実施形態ⅠⅠⅠ－５７５．前記１種以上の遺伝子編集が、アルブミン遺伝子座、ＡＢＯ遺伝子座、Ｂ２Ｍ遺伝子座、ＣＩＩＴＡ遺伝子座、ＣＣＲ５遺伝子座、ＣＤ１４２遺伝子座、ＣＬＹＢＬ遺伝子座、ＣＸＣＲ４遺伝子座、Ｆ３遺伝子座、ＦＵＴ１遺伝子座、ＨＭＧＢ１遺伝子座、ＫＤＭ５Ｄ遺伝子座、ＬＲＰ１遺伝子座、ＭＩＣ－Ａ遺伝子座、ＭＩＣ－Ｂ遺伝子座、ＰＰＰ１Ｒ１２Ｃ（ＡＡＶＳ１としても公知）遺伝子座、ＲＨＤ遺伝子座、ＲＯＳＡ２６遺伝子座、セーフハーバー遺伝子座、ＳＨＳ２３１遺伝子座、ＴＡＰ１遺伝子座、ＴＲＡＣ遺伝子座、及びＴＲＢＣ遺伝子座からなる群から選択される１つ以上の標的ゲノム遺伝子座で細胞のゲノムに導入される、実施形態５６８～５７４のいずれか１項に記載の方法。

【２７３０】

実施形態ⅠⅠⅠ－５７６．実施形態５６３～５７５のいずれか１項に記載の方法により作製された遺伝子操作された細胞。

【２７３１】

実施形態ⅠⅠⅠ－５７７．前記遺伝子操作された細胞または子孫もしくはは分化した細胞が、前記１種以上の改変を含まない同じ種類の細胞と比較して、対象に投与された際にＮＫ細胞媒介性細胞傷害を回避する増強された能力を有する、実施形態３８８～５６２及び５７６のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２７３２】

10

20

30

40

50

実施形態ⅠⅠⅠ－５７８．前記遺伝子操作された細胞、または前記遺伝子操作された細胞に由来する子孫もしくは分化した細胞が、前記１種以上の改変を含まない同じ種類の細胞と比較して、対象に投与された際に成熟ＮＫ細胞による低減された細胞溶解を受ける、実施形態３８８～５６２、５７６、及び５７７のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２７３３】

実施形態ⅠⅠⅠ－５７９．前記遺伝子操作された細胞、または前記遺伝子操作された細胞に由来する子孫もしくは分化した細胞が、前記１種以上の改変を含まない同じ種類の細胞と比較して、対象に投与された際に低減された免疫応答を誘発する、実施形態３８８～５６２及び５７６～５７８のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

10

【２７３４】

実施形態ⅠⅠⅠ－５８０．前記遺伝子操作された細胞、または前記遺伝子操作された細胞に由来する子孫もしくは分化した細胞が、前記１種以上の改変を含まない同じ種類の細胞と比較して、対象に投与された際に低減された全身性炎症反応を誘発する、実施形態３８８～５６２及び５７６～５７９のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２７３５】

実施形態ⅠⅠⅠ－５８１．前記遺伝子操作された細胞、または前記遺伝子操作された細胞に由来する子孫もしくは分化した細胞が、前記１種以上の改変を含まない同じ種類の細胞と比較して、対象に投与された際に低減された局所炎症反応を誘発する、実施形態３８８～５６２及び５７６～５８０のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

20

【２７３６】

実施形態ⅠⅠⅠ－５８２．前記遺伝子操作された細胞、または前記遺伝子操作された細胞に由来する子孫もしくは分化した細胞が、前記１種以上の改変を含まない（同じ種類の）細胞と比較して、対象に投与された際に低減された補体経路活性化を誘発する、実施形態３８８～５６２及び５７６～５８１のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２７３７】

実施形態ⅠⅠⅠ－５８３．前記遺伝子操作された細胞、または前記遺伝子操作された細胞に由来する子孫もしくは分化した細胞が、対象に投与された際に生着及び機能する能力を保持している、実施形態３８８～５６２及び５７６～５８２のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

30

【２７３８】

実施形態ⅠⅠⅠ－５８４．前記遺伝子操作された細胞、または前記遺伝子操作された細胞に由来する子孫もしくは分化した細胞が、前記１種以上の改変を含まない（同じ種類の）細胞と比較して、対象に投与された際に生着及び機能する増強された能力を有する、実施形態３８８～５６２及び５７６～５８３のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞。

【２７３９】

実施形態ⅠⅠⅠ－５８５．複数の実施形態３８８～５６２及び５７６～５８４のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞を含む、遺伝子操作された細胞の集団。

【２７４０】

実施形態ⅠⅠⅠ－５８６．前記集団における少なくとも約３０％の細胞が、前記複数の前記遺伝子操作された細胞からなる、実施形態５８５に記載の遺伝子操作された細胞の集団。

40

【２７４１】

実施形態ⅠⅠⅠ－５８７．前記複数の前記遺伝子操作された細胞が、２人以上のドナー対象から単離された初代細胞である、実施形態５８５または実施形態５８６に記載の遺伝子操作された細胞の集団。

【２７４２】

実施形態ⅠⅠⅠ－５８８．各ドナー対象が、ドナー試料が個別のドナーから採取される時点で健常であるか、または疾患もしくは病態を有すると疑われていない、実施形態５８

50

7 に記載の遺伝子操作された細胞の集団。

【2743】

実施形態ⅠⅠⅠ-589. 実施形態1～562及び576～196のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞または実施形態585～588のいずれか1項に記載の遺伝子操作された細胞の集団を含む組成物を作製する方法であって、

a. 実施形態548～562のいずれか1項に記載の細胞を採取することと、

b. 実施形態388～562のいずれか1項に記載の1種以上の改変を前記細胞に導入することと、

c. 前記改変のうちの1つ以上の程度に基づいて細胞集団から前記遺伝子操作された細胞を選別するか、

または前記遺伝子操作された細胞の集団を選別することと、

d. 選別された遺伝子操作された細胞または遺伝子操作された細胞の選別された集団を含む前記組成物を製剤化することと、を含む、前記方法。

【2744】

実施形態ⅠⅠⅠ-590. 前記方法が、実施形態388～561のいずれかにおける1種以上の改変された分子の細胞表面発現のレベルに基づいて前記遺伝子操作された細胞または前記遺伝子操作された細胞の集団を選別することを含む、実施形態589に記載の方法。

【2745】

実施形態ⅠⅠⅠ-591. 前記遺伝子操作された細胞または前記遺伝子操作された細胞の集団が、前記遺伝子操作された細胞または前記遺伝子操作された細胞において発現が低減された1種以上の改変された分子のレベルに基づいて選別される、実施形態589または実施形態590に記載の方法。

【2746】

実施形態ⅠⅠⅠ-592. 前記遺伝子操作された細胞または前記遺伝子操作された細胞の集団が、前記遺伝子操作された細胞または前記遺伝子操作された細胞において発現が増強された1種以上の改変された分子のレベルに基づいて選別される、実施形態589～591のいずれか1項に記載の方法。

【2747】

実施形態ⅠⅠⅠ-593. 前記方法が、前記組成物を薬学的に許容される添加剤、担体、希釈液、または賦形剤で製剤化することを含む、実施形態589～592のいずれか1項に記載の方法。

【2748】

実施形態ⅠⅠⅠ-594. 前記薬学的に許容される添加剤、担体、希釈液、または賦形剤が、薬学的に許容される緩衝液を含む、実施形態593に記載の方法。

【2749】

実施形態ⅠⅠⅠ-595. 前記薬学的に許容される緩衝液が、中性緩衝食塩水またはリン酸緩衝食塩水を含む、実施形態594に記載の方法。

【2750】

実施形態ⅠⅠⅠ-596. 前記方法が、前記組成物をPlasma-Lyte A（登録商標）、デキストロース、デキストラン、塩化ナトリウム、ヒト血清アルブミン（HSA）、ジメチルスルホキシド（DMSO）、またはそれらの組み合わせと共に製剤化することを含む、実施形態589～595のいずれか1項に記載の方法。

【2751】

実施形態ⅠⅠⅠ-597. 前記方法が、前記組成物を凍結保護物質と共に製剤化することを含む、実施形態589～596のいずれか1項に記載の方法。

【2752】

実施形態ⅠⅠⅠ-598. 前記方法が、凍結保護物質を含む無血清凍結保存媒体で前記組成物を製剤化することを含む、実施形態589～597のいずれか1項に記載の方法。

【2753】

10

20

30

40

50

実施形態ⅠⅠⅠ－５９９．前記凍結保護物質がＤＭＳＯを含む、実施形態５９７または実施形態５９８に記載の方法。

【２７５４】

実施形態ⅠⅠⅠ－６００．前記無血清凍結保存媒体が、約５％～約１０％のＤＭＳＯ（ v/v ）を含む、実施形態５９８または実施形態５９９に記載の方法。

【２７５５】

実施形態ⅠⅠⅠ－６０１．前記無血清凍結保存媒体が、約１０％のＤＭＳＯ（ v/v ）を含む、実施形態５９８～６００のいずれか１項に記載の方法。

【２７５６】

実施形態ⅠⅠⅠ－６０２．前記方法が、前記組成物を容器で保存することを更に含む、実施形態５８９～６０１のいずれか１項に記載の方法。

10

【２７５７】

実施形態ⅠⅠⅠ－６０３．前記方法が、ステップ（ｂ）の前に前記細胞を解凍することを更に含む、実施形態５８９～６０２のいずれか１項に記載の方法。

【２７５８】

実施形態ⅠⅠⅠ－６０４．前記方法が、前記遺伝子操作された細胞、前記遺伝子操作された細胞の集団、または前記組成物を凍結させることを更に含む、実施形態５８９～６０３のいずれか１項に記載の方法。

【２７５９】

実施形態ⅠⅠⅠ－６０５．前記遺伝子操作された細胞または前記遺伝子操作された細胞の集団が、ステップ（ｂ）の後に凍結である、実施形態６０４に記載の方法。

20

【２７６０】

実施形態ⅠⅠⅠ－６０６．前記遺伝子操作された細胞または前記遺伝子操作された細胞の集団が、ステップ（ｃ）の前に解凍される、実施形態６０５に記載の方法。

【２７６１】

実施形態ⅠⅠⅠ－６０７．前記遺伝子操作された細胞または前記遺伝子操作された細胞の集団が、ステップ（ｃ）の後に凍結される、実施形態６０４に記載の方法。

【２７６２】

実施形態ⅠⅠⅠ－６０８．前記遺伝子操作された細胞または前記遺伝子操作された細胞の集団が、ステップ（ｄ）の前に解凍される、実施形態６０７に記載の方法。

30

【２７６３】

実施形態ⅠⅠⅠ－６０９．前記遺伝子操作された細胞または前記遺伝子操作された細胞の集団が、ステップ（ｃ）の後に凍結される、実施形態６０４に記載の方法。

【２７６４】

実施形態ⅠⅠⅠ－６１０．前記組成物がステップ（ｄ）の後に凍結される、実施形態５８９～６０９のいずれか１項に記載の方法。

【２７６５】

実施形態ⅠⅠⅠ－６１１．実施形態１～５６２及び５７６～１９６のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞、または実施形態５８５～５８８のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞の集団を含む組成物。

40

【２７６６】

実施形態ⅠⅠⅠ－６１２．実施形態５８９～６１０のいずれか１項に記載の方法により作製された組成物。

【２７６７】

実施形態ⅠⅠⅠ－６１３．前記組成物が、薬学的に許容される添加剤、担体、希釈液、または賦形剤を含む、実施形態６１１または実施形態６１２に記載の組成物。

【２７６８】

実施形態ⅠⅠⅠ－６１４．前記組成物が無菌である、実施形態６１１～６１３のいずれか１項に記載の組成物。

【２７６９】

50

実施形態ⅠⅠⅠ－６１５．実施形態６１２～６１４のいずれか１項に記載の組成物を含む容器。

【２７７０】

実施形態ⅠⅠⅠ－６１６．前記容器が無菌バッグである、実施形態６１５の容器。

【２７７１】

実施形態ⅠⅠⅠ－６１７．前記無菌バッグが凍結保存に適合可能なバッグである、実施形態６１６に記載の容器。

【２７７２】

実施形態ⅠⅠⅠ－６１８．実施形態６１２～６１４のいずれか１項に記載の組成物または実施形態６１５～６１７のいずれか１項に記載の容器を含むキット。

【２７７３】

実施形態ⅠⅠⅠ－６１９．前記キットが、前記遺伝子操作された細胞または前記遺伝子操作された細胞の集団を使用するための使用説明書を更に含む、実施形態６１８に記載のキット。

【２７７４】

実施形態ⅠⅠⅠ－６２０．病態または疾患を処置する必要がある対象の病態または疾患を処置する方法であって、有効量の実施形態１～５６２及び５７６～１９６のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞、実施形態５８５～５８８のいずれか１項に記載の遺伝子操作された細胞の集団、または実施形態６１１～６１３のいずれか１項に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、任意により、前記疾患または病態が細胞欠損症である、前記方法。

【２７７５】

実施形態ⅠⅠⅠ－６２１．前記病態または疾患が、糖尿病、がん、血管新生障害、眼疾患、甲状腺疾患、皮膚疾患、及び肝疾患からなる群から選択される、実施形態６２０に記載の方法。

【２７７６】

実施形態ⅠⅠⅠ－６２２．前記病態または疾患が、糖尿病に関連するか、または糖尿病であり、任意により、前記糖尿病がⅠ型糖尿病である、実施形態６２０または６２１に記載の方法。

【２７７７】

実施形態ⅠⅠⅠ－６２３．前記遺伝子操作された細胞の集団が、β膵島細胞が含まれる、膵島細胞の集団である、実施形態６２２に記載の方法。

【２７７８】

実施形態ⅠⅠⅠ－６２４．前記膵島細胞が、膵島前駆細胞、未成熟膵島細胞、及び成熟膵島細胞からなる群から選択される、実施形態６２３に記載の方法。

【２７７９】

実施形態ⅠⅠⅠ－６２５．前記病態または疾患が、血管病態または疾患に関連するか、または血管病態または疾患である、実施形態６２０に記載の方法。

【２７８０】

実施形態ⅠⅠⅠ－６２６．前記遺伝子操作された細胞または前記遺伝子操作された細胞の集団が、内皮細胞を含む、実施形態６２５に記載の方法。

【２７８１】

実施形態ⅠⅠⅠ－６２７．前記病態または疾患が、自己免疫性甲状腺炎に関連するか、または自己免疫性甲状腺炎である、実施形態６２０に記載の方法。

【２７８２】

実施形態ⅠⅠⅠ－６２８．前記遺伝子操作された細胞または前記遺伝子操作された細胞の集団が、甲状腺前駆細胞を含む、実施形態６２７に記載の方法。

【２７８３】

実施形態ⅠⅠⅠ－６２９．前記病態または疾患が、肝疾患に関連するか、または肝疾患である、実施形態６２０に記載の方法。

10

20

30

40

50

【2784】

実施形態ⅠⅠⅠ－630．前記肝疾患が肝硬変を含む、実施形態629に記載の方法。

【2785】

実施形態ⅠⅠⅠ－631．前記遺伝子操作された細胞または前記遺伝子操作された細胞の集団が、肝実質細胞または肝前駆細胞を含む、実施形態629または630に記載の方法。

【2786】

実施形態ⅠⅠⅠ－632．前記病態または疾患が、角膜疾患に関連するか、または角膜疾患である、実施形態620に記載の方法。

【2787】

実施形態ⅠⅠⅠ－633．前記角膜疾患が、フックスジストロフィーまたは先天遺伝性角膜内皮ジストロフィーである、実施形態632に記載の方法。

【2788】

実施形態ⅠⅠⅠ－634．前記遺伝子操作された細胞または前記遺伝子操作された細胞の集団が、角膜内皮前駆細胞または角膜内皮細胞を含む、実施形態632または633に記載の方法。

【2789】

実施形態ⅠⅠⅠ－635．前記病態または疾患が、腎臓疾患に関連するか、または腎臓疾患である、実施形態620に記載の方法。

【2790】

実施形態ⅠⅠⅠ－636．前記遺伝子操作された細胞または前記遺伝子操作された細胞の集団が、腎前駆細胞または腎細胞を含む、実施形態635に記載の方法。

【2791】

実施形態ⅠⅠⅠ－637．前記病態または疾患が、がんに関連するか、またはがんである、実施形態620に記載の方法。

【2792】

実施形態ⅠⅠⅠ－638．前記がんが、B細胞急性リンパ芽球性白血病（B－ALL）、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、肝臓癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、結腸直腸癌、肺癌、非小細胞肺癌、急性骨髄性リンパ性白血病、多発性骨髄腫、胃癌、胃腺癌、膵臓腺癌、神経膠芽腫、神経芽細胞腫、肺扁平上皮細胞癌、肝細胞癌、及び膀胱癌からなる群から選択される、実施形態637に記載の方法。

【2793】

実施形態ⅠⅠⅠ－639．前記遺伝子操作された細胞または前記遺伝子操作された細胞の集団が、T細胞、NK細胞、またはNK T細胞を含む、実施形態637または638に記載の方法。

【2794】

実施形態ⅠⅠⅠ－640．前記病態または疾患が、造血疾患または障害に関連するか、または造血疾患または障害である、実施形態620に記載の方法。

【2795】

実施形態ⅠⅠⅠ－641．前記造血疾患または障害が、脊髄形成異常、無形成性貧血、ファンconi貧血、発作性夜間ヘモグロビン尿症、鎌状赤血球症、ダイヤモンド・ブラックファン貧血、シャックマン・ダイヤモンド障害、コストマン症候群、慢性肉芽腫症、副腎白質ジストロフィー、白血球接着不全症、血友病、サラセミア、βサラセミア、白血病、例えば、急性リンパ球性白血病（ALL）、急性骨髄性（骨髄）白血病（AML）、成人リンパ芽球性白血病、慢性リンパ球性白血病（CLL）、B細胞慢性リンパ球性白血病（B－CLL）、慢性骨髄性白血病（CML）、若年性慢性骨髄性白血病（CML）、及び若年性骨髄単球性白血病（JMML）、重症複合免疫不全症（SCID）、X連鎖性重症複合免疫不全症、ウィスコット・アルドリッチ症候群（WAS）、アデノシンデアミナーゼ（ADA）欠損症、慢性肉芽腫症、チェディアック・東症候群、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫（NHL）、またはAIDSである、実施形態640に記載の方法。

10

20

30

40

50

【2796】

実施形態ⅠⅠⅠ－642．前記病態または疾患が、白血病または骨髄腫に関連するか、または白血病または骨髄腫である、実施形態620に記載の方法。

【2797】

実施形態ⅠⅠⅠ－643．前記病態または疾患が、自己免疫疾患または状態に関連するか、または自己免疫疾患または状態である、実施形態620に記載の方法。

【2798】

実施形態ⅠⅠⅠ－644．前記自己免疫疾患または状態が、急性散在性脳脊髄炎、急性出血性白質脳炎、アジソン病、無ガンマグロブリン血症、円形脱毛症、筋萎縮性側索硬化症、強直性脊椎炎、抗リン脂質抗体症候群、抗合成酵素症候群、アトピー性アレルギー、自己免疫性再生不良性貧血、自己免疫性心筋症、自己免疫性腸疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性内耳疾患、自己免疫性リンパ球増殖症候群、自己免疫性末梢神経障害、自己免疫性膵炎、多腺性自己免疫症候群、自己免疫性プロゲステロン皮膚炎、自己免疫性血小板減少性紫斑病、自己免疫性蕁麻疹、自己免疫性ブドウ膜炎、バロー病、バロー同心円性硬化症、ベーチェット病、ベルガー病、ビッカースタッフ脳炎、ブラウ症候群、水疱性類天疱瘡、がん、カストルマン病、セリアック病、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、慢性再発性多発性骨髄炎、チャグ・ストラウス症候群、癩痕性類天疱瘡、コーガン症候群、寒冷凝集素症、補体第2成分欠損症、頭蓋動脈炎、クレスト症候群、クローン病、クッシング症候群、皮膚白血球破碎性血管炎、デゴス病、ダーカム病、疱疹状皮膚炎、皮膚筋炎、1型糖尿病、びまん性皮膚硬化型全身性強皮症、ドレスラー症候群、円板状エリテマトーデス、湿疹、付着部炎関連関節炎、好酸球性筋膜炎、好酸球性胃腸炎、後天性表皮水疱症、結節性紅斑、本態性混合型寒冷グロブリン血症、エバンス症候群、進行性骨化性線維異形成症、線維化性肺炎、胃炎、消化器性類天疱瘡、巨細胞性動脈炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、グレーブス病、ギラン・バレー症候群（GBS）、橋本脳炎、橋本甲状腺炎、溶血性貧血、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、妊娠性疱疹、低ガンマグロブリン血症、特発性炎症性脱髄性疾患、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病、IgA腎症、封入体筋炎、炎症性脱髄性多発性神経障害、間質性膀胱炎、若年性特発性関節炎、若年性関節リウマチ、川崎病、ランバート・イートン筋無力症候群、白血球破碎性血管炎、扁平苔癬、硬化性苔癬、線状IgA病（LAD）、ルー・ゲーリック病、ルポイド肝炎、全身性エリテマトーデス、マジード症候群、メニエール病、顕微鏡的多発血管炎、ミラーフィッシャー症候群、混合性結合組織病、局性強皮症、ムッハ・ハーベルマン病、多発性硬化症、重症筋無力症、筋炎、視神経脊髄炎、ニューロミオトニア、眼部癩痕性類天疱瘡、オプソクロノス・ミオクロノス症候群、オールド甲状腺炎、回帰性リウマチ、傍腫瘍性小脳変性症、発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）、パリー・ロンバーグ症候群、パーソネージ・ターナー症候群、扁平部炎、天疱瘡、尋常性天疱瘡、悪性貧血、静脈周囲性脳脊髄炎、POEMS症候群、結節性多発動脈炎、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、進行性炎症性神経障害、乾癬、乾癬性関節炎、壊疽性膿皮症、赤芽球癆、ラスムッセン脳炎、レイノー現象、再発性多発性軟骨炎、ライター症候群、レストレスレッグズ症候群、後腹膜線維症、関節リウマチ、リウマチ熱、サルコイドーシス、シュミット症候群、シュニッツラー症候群、強膜炎、強皮症、シェーグレン症候群、脊椎関節炎、スティル病、スティッフパーソン症候群、亜急性細菌性心内膜炎、スザック症候群、スイート症候群、シデナム舞踏病、交感性眼炎、高安動脈炎、側頭動脈炎、トロサ・ハント症候群、横断性脊髄炎、潰瘍性大腸炎、未分化結合組織病、分類不能型脊椎関節炎、血管炎、白斑、及びウェゲナー肉芽腫症である、実施形態643に記載の方法。

【2799】

実施形態ⅠⅠⅠ－645．前記遺伝子操作された細胞または前記遺伝子操作された細胞の集団が、造血幹細胞（HSC）またはその派生物を含む、実施形態640～644のいずれか1項に記載の方法。

【2800】

10

20

30

40

50

実施形態ⅠⅠⅠ－６４６．前記状態または疾患が、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症、神経変性疾患もしくは神経変性状態、注意欠陥多動性障害（ＡＤＨＤ）、トゥレット症候群（ＴＳ）、統合失調症、精神病、うつ病、神経精神障害、脳卒中、または筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）に関連するか、あるいは前記状態または疾患が、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症、神経変性疾患もしくは神経変性状態、注意欠陥多動性障害（ＡＤＨＤ）、トゥレット症候群（ＴＳ）、統合失調症、精神病、うつ病、神経精神障害、脳卒中、または筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）である、実施形態６２０に記載の方法。

【２８０１】

実施形態ⅠⅠⅠ－６４７．前記遺伝子操作された細胞または前記遺伝子操作された細胞の集団が、神経細胞またはグリア細胞を含む、実施形態６４６に記載の方法。

10

【２８０２】

実施形態ⅠⅠⅠ－６４８．前記遺伝子操作された細胞または前記遺伝子操作された細胞の集団が、投与前に増殖及び凍結保存される、実施形態６２０～６４７のいずれか１項に記載の方法。

【２８０３】

実施形態ⅠⅠⅠ－６４９．前記方法が、前記遺伝子操作された細胞、前記遺伝子操作された細胞の集団、または前記組成物の静脈内注射、筋肉内注射、血管内注射、または移植を含む、実施形態６２０～６４８のいずれか１項に記載の方法。

【２８０４】

20

実施形態ⅠⅠⅠ－６５０．移植が血管内注射または筋肉内注射を含む、実施形態６４９に記載の方法。

【２８０５】

実施形態ⅠⅠⅠ－６５１．前記方法が、１種以上の免疫抑制剤を前記対象に投与することを更に含む、実施形態６２０～６５０のいずれか１項に記載の方法。

【２８０６】

実施形態ⅠⅠⅠ－６５２．前記対象が１種以上の免疫抑制剤を投与されている、実施形態６２０～６５１のいずれか１項に記載の方法。

【２８０７】

実施形態ⅠⅠⅠ－６５３．前記１種以上の免疫抑制剤が低分子または抗体である、実施形態６５１または実施形態６５２に記載の方法。

30

【２８０８】

実施形態ⅠⅠⅠ－６５４．前記１種以上の免疫抑制剤が、サイクロスポリン、アザチオプリン、ミコフェノール酸、ミコフェノール酸モフェチル、コルチコステロイド、プレドニゾン、メトトレキサート、金塩、スルファサラジン、抗マラリア薬、ブレキナル、レフルノミド、ミゾリビン、１５－デオキシスベルグアリン、６－メルカプトプリン、シクロホスファミド、ラパマイシン、タクロリムス（ＦＫ－５０６）、ＯＫＴ３、抗胸腺細胞グロブリン、チモペンチン（チモシン－α）、免疫調節剤、及び免疫抑制性抗体からなる群から選択される、実施形態６５１～６５３のいずれか１項に記載の方法。

【２８０９】

40

実施形態ⅠⅠⅠ－６５５．前記１種以上の免疫抑制剤がサイクロスポリンを含む、実施形態６５１～６５４のいずれか１項に記載の方法。

【２８１０】

実施形態ⅠⅠⅠ－６５６．前記１種以上の免疫抑制剤がミコフェノール酸モフェチルを含む、実施形態６５１～６５４のいずれか１項に記載の方法。

【２８１１】

実施形態ⅠⅠⅠ－６５７．前記１種以上の免疫抑制剤がコルチコステロイドを含む、実施形態６５１～６５４のいずれか１項に記載の方法。

【２８１２】

実施形態ⅠⅠⅠ－６５８．前記１種以上の免疫抑制剤がシクロホスファミドを含む、実

50

施形態 6 5 1 ~ 6 5 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【2 8 1 3】

実施形態 I I I - 6 5 9 . 前記 1 種以上の免疫抑制剤がラパマイシンを含む、実施形態 6 5 1 ~ 6 5 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【2 8 1 4】

実施形態 I I I - 6 6 0 . 前記 1 種以上の免疫抑制剤がタクロリムス (F K - 5 0 6) を含む、実施形態 6 5 1 ~ 6 5 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【2 8 1 5】

実施形態 I I I - 6 6 1 . 前記 1 種以上の免疫抑制剤が抗胸腺細胞グロブリンを含む、実施形態 6 5 1 ~ 6 5 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【2 8 1 6】

実施形態 I I I - 6 6 2 . 前記 1 種以上の免疫抑制剤が 1 種以上の免疫調節剤である、実施形態 6 5 1 ~ 6 5 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【2 8 1 7】

実施形態 I I I - 6 6 3 . 前記 1 種以上の免疫調節剤が低分子または抗体である、実施形態 6 6 2 に記載の方法。

【2 8 1 8】

実施形態 I I I - 6 6 4 . 前記抗体が、 I L - 2 受容体の p 7 5、M H C、C D 2、C D 3、C D 4、C D 7、C D 2 8、B 7、C D 4 0、C D 4 5、I F N - γ 、T N F - α 、I L - 4、I L - 5、I L - 6 R、I L - 6、I G F、I G F R 1、I L - 7、I L - 8、I L - 1 0、C D 1 1 a、C D 5 8、及びそれらのリガンドのいずれかに結合する抗体からなる群から選択される 1 つ以上の受容体またはリガンドに結合する、実施形態 6 6 2 または実施形態 6 6 3 に記載の方法。

【2 8 1 9】

実施形態 I I I - 6 6 5 . 前記 1 種以上の免疫抑制剤が、前記遺伝子操作された細胞、前記遺伝子操作された細胞の集団、または前記組成物の投与前に前記対象に投与されるか、または投与されている、実施形態 6 5 1 ~ 6 6 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【2 8 2 0】

実施形態 I I I - 6 6 6 . 前記 1 種以上の免疫抑制剤が、前記遺伝子操作された細胞、前記遺伝子操作された細胞の集団、または前記組成物の投与の少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、または 1 4 日前に前記対象に投与されるか、または投与されている、実施形態 6 5 1 ~ 6 6 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【2 8 2 1】

実施形態 I I I - 6 6 7 . 前記 1 種以上の免疫抑制剤が、前記遺伝子操作された細胞、前記遺伝子操作された細胞の集団、または前記組成物の投与の少なくとも 1 週間、2 週間、3 週間、4 週間、5 週間、6 週間、7 週間、8 週間、9 週間、1 0 週間、またはそれ以上前に前記対象に投与されるか、または投与されている、実施形態 6 5 1 ~ 6 6 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【2 8 2 2】

実施形態 I I I - 6 6 8 . 前記 1 種以上の免疫抑制剤が、前記遺伝子操作された細胞、前記遺伝子操作された細胞の集団、または前記組成物の投与後に前記対象に投与されるか、または投与されている、実施形態 6 5 1 ~ 6 6 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【2 8 2 3】

実施形態 I I I - 6 6 9 . 前記 1 種以上の免疫抑制剤が、前記遺伝子操作された細胞、前記遺伝子操作された細胞の集団、または前記組成物の投与の少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、または 1 4 日後に前記対象に投与されるか、または投与されている、実施形態 6 5 1 ~ 6 6 4 及び 6 6 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【2 8 2 4】

10

20

30

40

50

実施形態ⅠⅠⅠ－６７０．前記１種以上の免疫抑制剤が、前記遺伝子操作された細胞、前記遺伝子操作された細胞の集団、または前記組成物の投与の少なくとも１週間、２週間、３週間、４週間、５週間、６週間、７週間、８週間、９週間、１０週間、またはそれ以上後に前記対象に投与されるか、または投与されている、実施形態６５１～６６４、６６８、及び６６９のいずれか１項に記載の方法。

【２８２５】

実施形態ⅠⅠⅠ－６７１．前記１種以上の免疫抑制剤が、前記遺伝子操作された細胞、前記遺伝子操作された細胞の集団、または前記組成物の１回目投与と同じ日に前記対象に投与されるか、または投与されている、実施形態６５１～６６４のいずれか１項に記載の方法。

【２８２６】

実施形態ⅠⅠⅠ－６７２．前記１種以上の免疫抑制剤が、前記遺伝子操作された細胞、前記遺伝子操作された細胞の集団、または前記組成物の１回目及び／または２回目投与の実施後に前記対象に投与されるか、または投与されている、実施形態６５１～６６４のいずれか１項に記載の方法。

【２８２７】

実施形態ⅠⅠⅠ－６７３．前記１種以上の免疫抑制剤が、前記遺伝子操作された細胞、前記遺伝子操作された細胞の集団、または前記組成物の１回目及び／または２回目投与の実施前に前記対象に投与されるか、または投与されている、実施形態６５１～６６４のいずれか１項に記載の方法。

【２８２８】

実施形態ⅠⅠⅠ－６７４．前記１種以上の免疫抑制剤が、前記遺伝子操作された細胞、前記遺伝子操作された細胞の集団、または前記組成物の１回目及び／または２回目投与の実施の少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、または１４日前に前記対象に投与されるか、または投与されている、実施形態６５１～６６４のいずれか１項に記載の方法。

【２８２９】

実施形態ⅠⅠⅠ－６７５．前記１種以上の免疫抑制剤が、前記遺伝子操作された細胞、前記遺伝子操作された細胞の集団、または前記組成物の１回目及び／または２回目投与の実施の少なくとも１週間、２週間、３週間、４週間、５週間、６週間、７週間、８週間、９週間、１０週間、またはそれ以上前に前記対象に投与されるか、または投与されている、実施形態６５１～６６４のいずれか１項に記載の方法。

【２８３０】

実施形態ⅠⅠⅠ－６７６．前記１種以上の免疫抑制剤が、前記遺伝子操作された細胞、前記遺伝子操作された細胞の集団、または前記組成物の１回目及び／または２回目投与の実施の少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、または１４日後に前記対象に投与されるか、または投与されている、実施形態６５１～６６４のいずれか１項に記載の方法。

【２８３１】

実施形態ⅠⅠⅠ－６７７．前記１種以上の免疫抑制剤が、前記遺伝子操作された細胞、前記遺伝子操作された細胞の集団、または前記組成物の１回目及び／または２回目投与の実施の少なくとも１週間、２週間、３週間、４週間、５週間、６週間、７週間、８週間、９週間、１０週間、またはそれ以上後に前記対象に投与されるか、または投与されている、実施形態６５１～６６４のいずれか１項に記載の方法。

【２８３２】

実施形態ⅠⅠⅠ－６７８．前記１種以上の免疫抑制剤が、前記遺伝子操作された細胞または前記遺伝子操作された細胞の集団の前記１種以上の改変を含まない細胞の免疫拒絶反応を低減するために投与される投与量と比較してより低い投与量で投与される、実施形態６５１～６７７のいずれか１項に記載の方法。

【２８３３】

実施形態ⅠⅠⅠ－６７９．前記方法が、前記遺伝子操作された細胞、前記遺伝子操作された細胞の集団、または前記組成物の前記対象への前記投与後に制御された細胞死を誘発するために、前記安全スイッチを活性化することを更に含む、実施形態６２０～６７８のいずれか１項に記載の方法。

【２８３４】

実施形態ⅠⅠⅠ－６８０．前記１種以上の免疫抑制剤の前記対象への投与後に制御された細胞死を誘発するために、前記自殺遺伝子または前記自殺スイッチが活性化される、実施形態６２０～６７９のいずれか１項に記載の方法。

【２８３５】

実施形態ⅠⅠⅠ－６８１．前記１種以上の免疫抑制剤の前記対象への投与前に制御された細胞死を誘発するために、前記自殺遺伝子または前記自殺スイッチが活性化される、実施形態６２０～６７９のいずれか１項に記載の方法。

10

【２８３６】

実施形態ⅠⅠⅠ－６８２．前記対象に対して細胞傷害性があるか、または他の悪影響が生じた場合に制御された細胞死を誘発するために、前記安全スイッチが活性化される、実施形態６２０～６８１のいずれか１項に記載の方法。

【２８３７】

実施形態ⅠⅠⅠ－６８３．前記方法が、前記遺伝子操作された細胞、前記遺伝子操作された細胞の集団、または前記組成物の除去を可能にする薬剤を投与することを含む、実施形態６２０～６８２のいずれか１項に記載の方法。

20

【２８３８】

実施形態ⅠⅠⅠ－６８４．前記遺伝子操作された細胞の除去を可能にする前記薬剤が、細胞表面に発現されるタンパク質を認識する抗体である、実施形態６８３に記載の方法。

【２８３９】

実施形態ⅠⅠⅠ－６８５．前記抗体が、ＣＣＲ４、ＣＤ１６、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ３０、ＥＧＦＲ、ＧＤ２、ＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ＭＵＣ１、ＰＳＭＡ、及びＲＱＲ８を認識する抗体からなる群から選択される、実施形態６８４に記載の方法。

【２８４０】

実施形態ⅠⅠⅠ－６８６．前記抗体が、モガムリズマブ、ＡＦＭ１３、ＭＯＲ２０８、オビヌツズマブ、ウブリツキシマブ、オカラツズマ、リツキシマブ、リツキシマブ－ＲＬ１ｂ、トムゾツキシマブ、ＲＯ５０８３９４５（ＧＡ２０１）、セツキシマブ、Ｈｕ１４．１８Ｋ３２２Ａ、Ｈｕ１４．１８－ＩＬ２、Ｈｕ３Ｆ８、ジヌツキシマブ、ｃ．６０Ｃ３－ＲＬ１ｃ、及びそれらのバイオシミラーからなる群から選択される、実施形態６８４または実施形態６８５に記載の方法。

30

【２８４１】

実施形態ⅠⅠⅠ－６８７．前記方法が、細胞表面上の前記１種以上の免疫寛容誘導因子または前記１種以上の追加の免疫寛容誘導因子を認識する薬剤を投与することを含む、実施形態６２０～６８４のいずれか１項に記載の方法。

【２８４２】

実施形態ⅠⅠⅠ－６８８．前記方法が、１種以上の追加の治療薬を前記対象に投与することを更に含む、実施形態６２０～６８７のいずれか１項に記載の方法。

40

【２８４３】

実施形態ⅠⅠⅠ－６８９．前記対象が１種以上の追加の治療薬を投与されている、実施形態６２０～６８７のいずれか１項に記載の方法。

【２８４４】

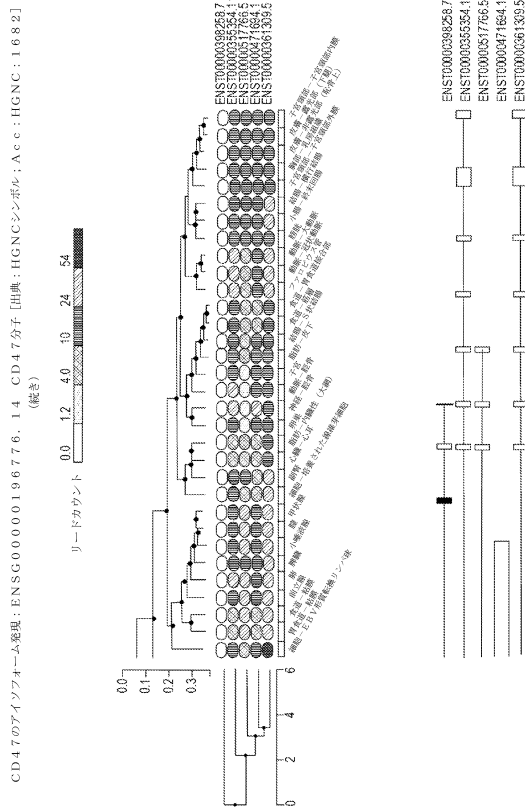
実施形態ⅠⅠⅠ－６９０．前記方法が、前記方法の治療有効性をモニタリングすることを更に含む、実施形態６２０～６８９のいずれか１項に記載の方法。

【２８４５】

実施形態ⅠⅠⅠ－６９１．前記方法の予防効力をモニタリングすることを更に含む、実施形態６２０～６９０のいずれか１項に記載の方法。

50

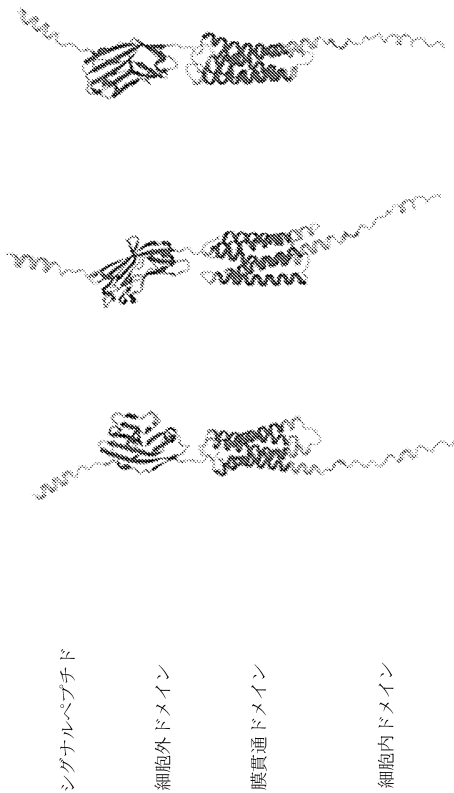
【圖 2 B】



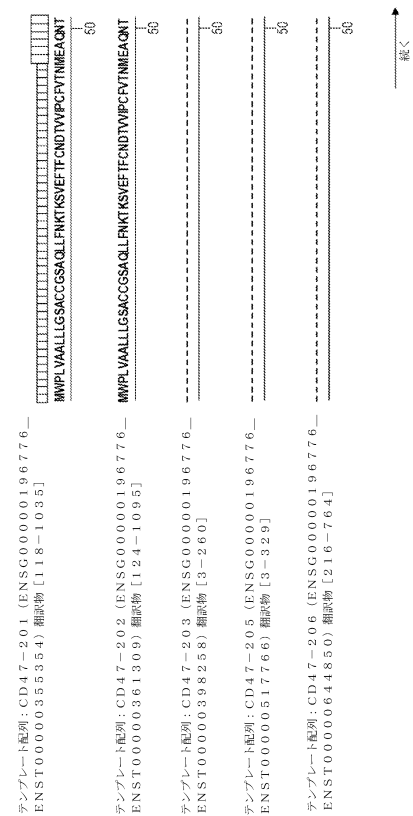
【図 3】

トポロジ	位置 (複数可)	説明	アクション	グラフィカルビュー	長さ
トポロジチャキー	19-141	細胞外 (配列解析)	追加 (BLAST)	■	123
トポロジードメイン	142-162	ヘリックス (配列解析)	追加 (BLAST)	■	21
膜貫通トポロジードメイン	163-176	細胞質内 (配列解析)	追加 (BLAST)	■	14
膜貫通トポロジードメイン	177-197	ヘリックス (配列解析)	追加 (BLAST)	■	21
トポロジードメイン	198-207	細胞外 (配列解析)	追加 (BLAST)	■	10
膜貫通トポロジードメイン	208-228	ヘリックス (配列解析)	追加 (BLAST)	■	21
トポロジードメイン	229-236	細胞質内 (配列解析)	追加 (BLAST)	■	7
膜貫通トポロジードメイン	238-256	ヘリックス (配列解析)	追加 (BLAST)	■	21
トポロジードメイン	257-268	細胞外 (配列解析)	追加 (BLAST)	■	12
膜貫通トポロジードメイン	269-289	ヘリックス (配列解析)	追加 (BLAST)	■	21
トポロジードメイン	290-373	細胞質内 (配列解析)	追加 (BLAST)	■	34

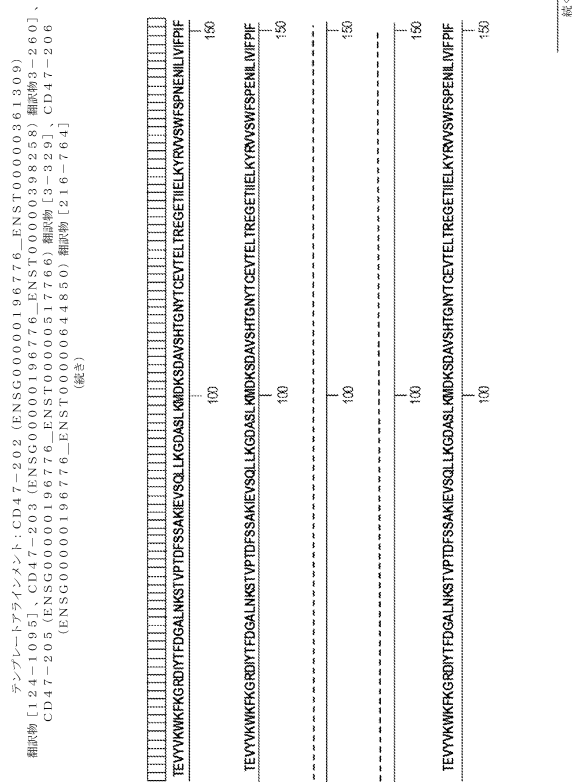
【図 4】



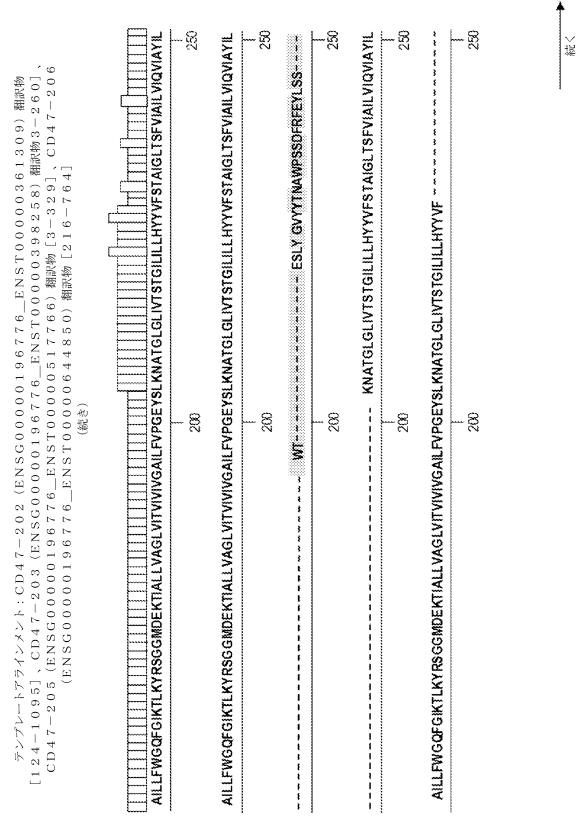
【図 5 A】



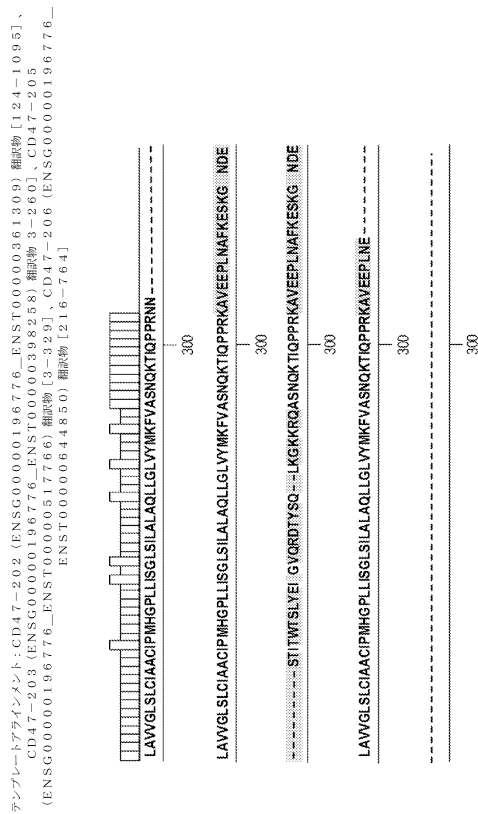
【図 5 B】



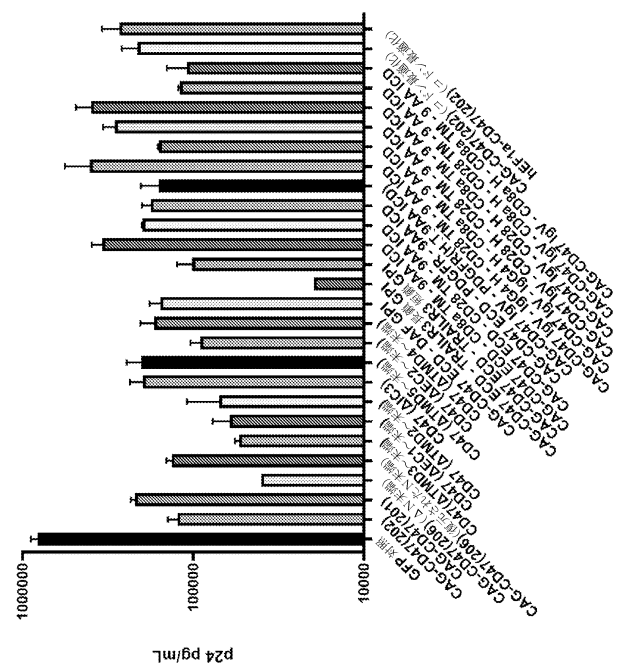
【図 5 C】



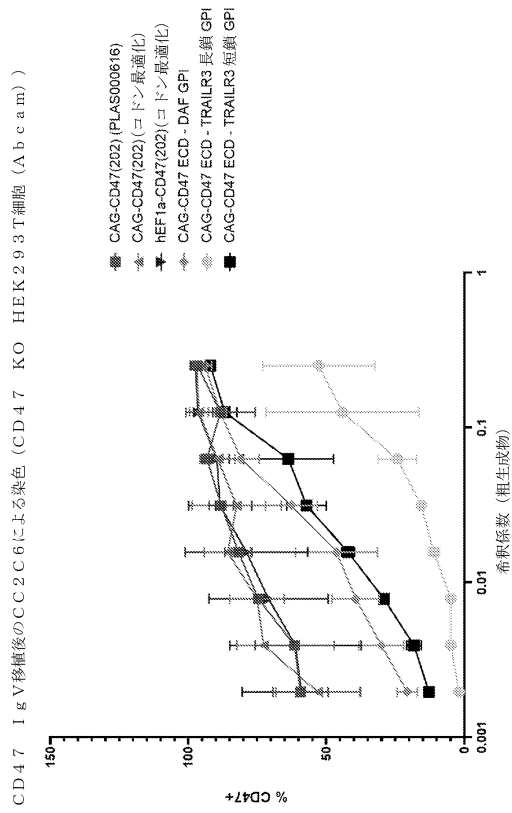
【図 5 D】



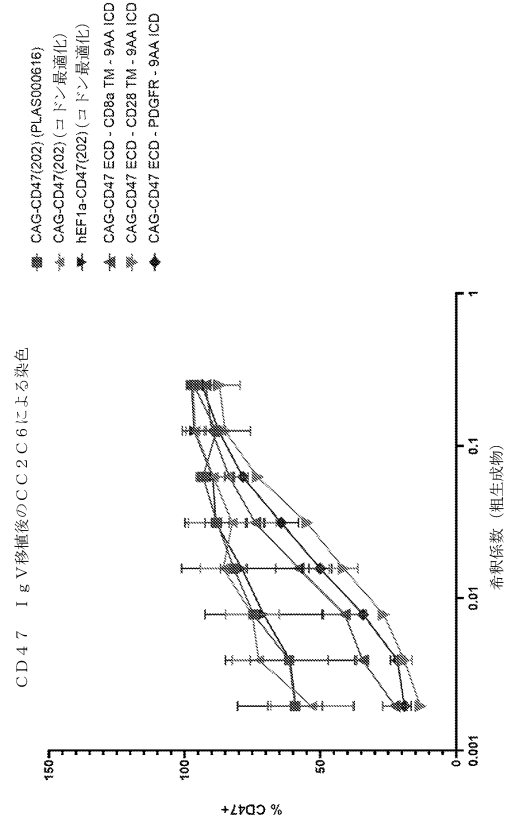
【図 6】



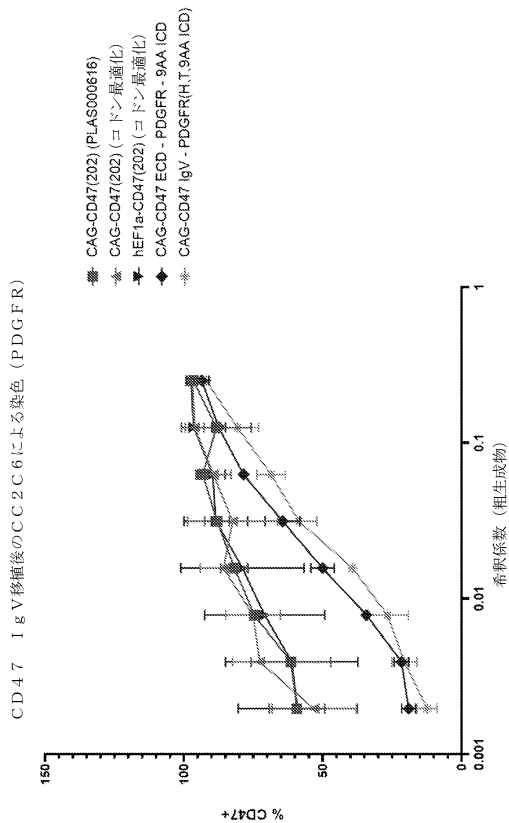
【図 7】



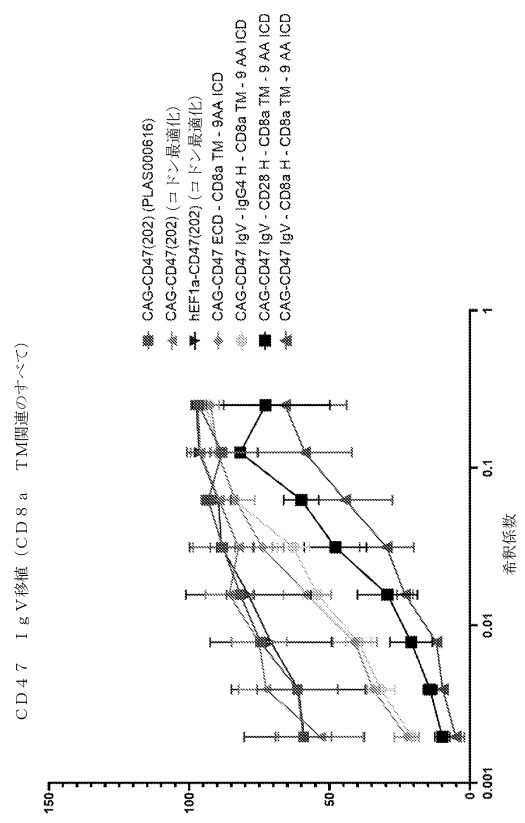
【図 8】



【図 9】



【図 10】



10

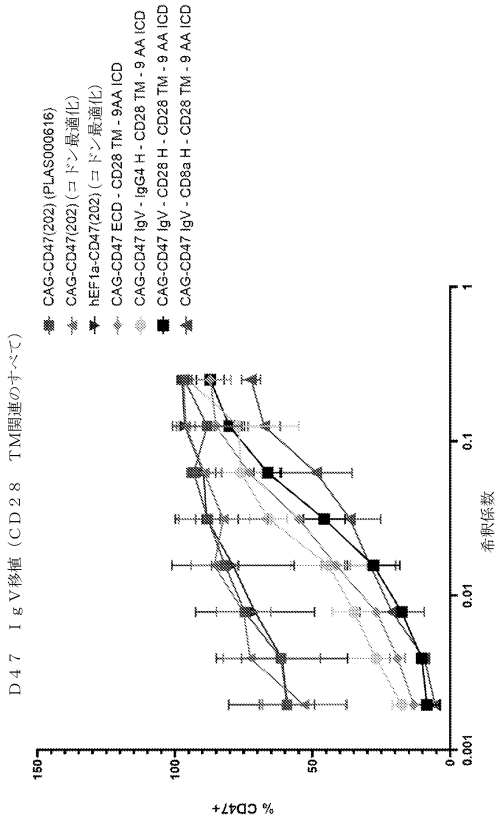
20

30

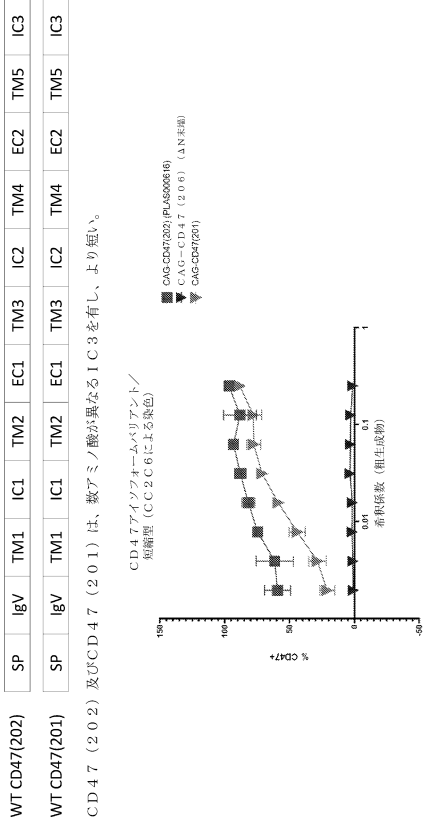
40

50

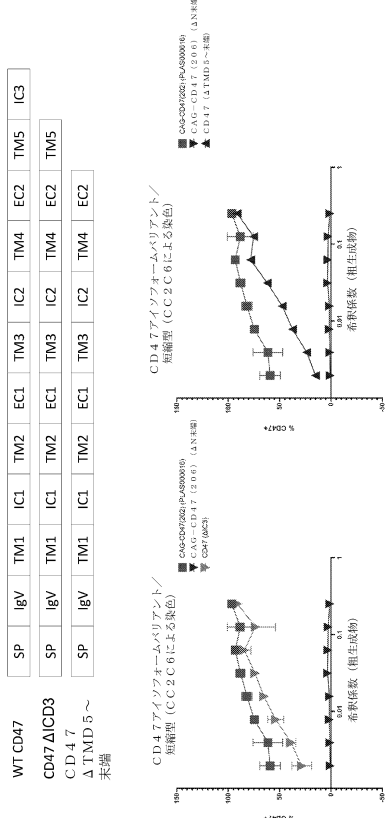
【図 1 1】



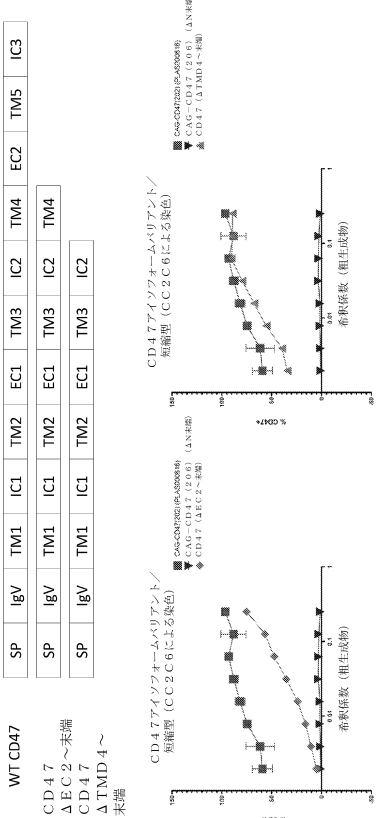
【図 1 2 A】



【図 1 2 B】



【図 1 2 C】



10

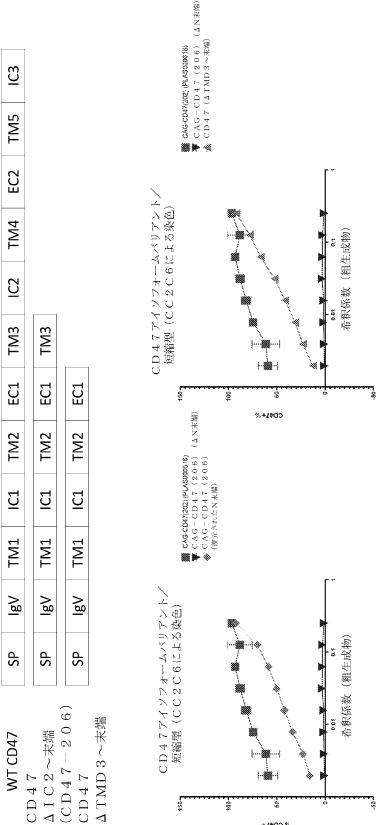
20

30

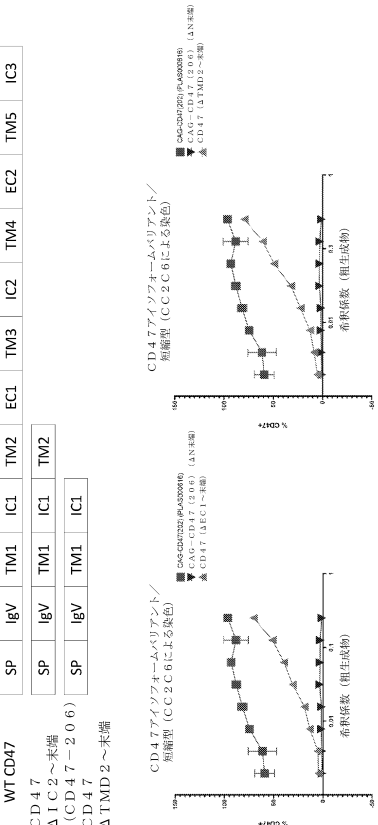
40

50

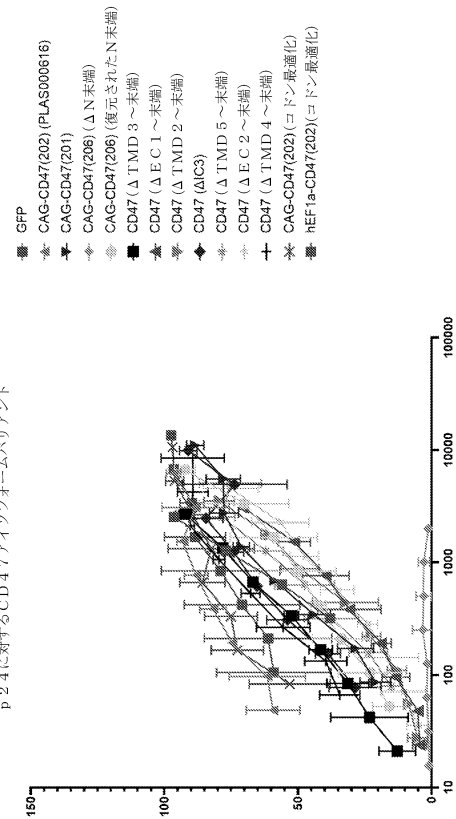
【図 1 2 D】



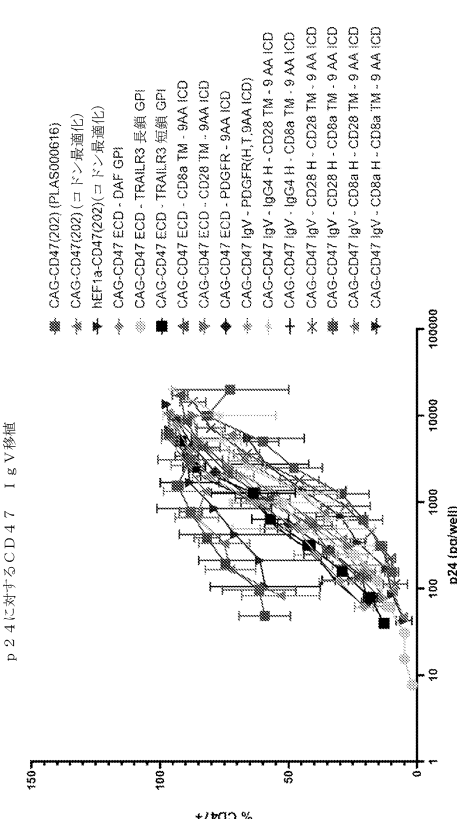
【図 1 2 E】



【図 1 3】



【図 1 4】



10

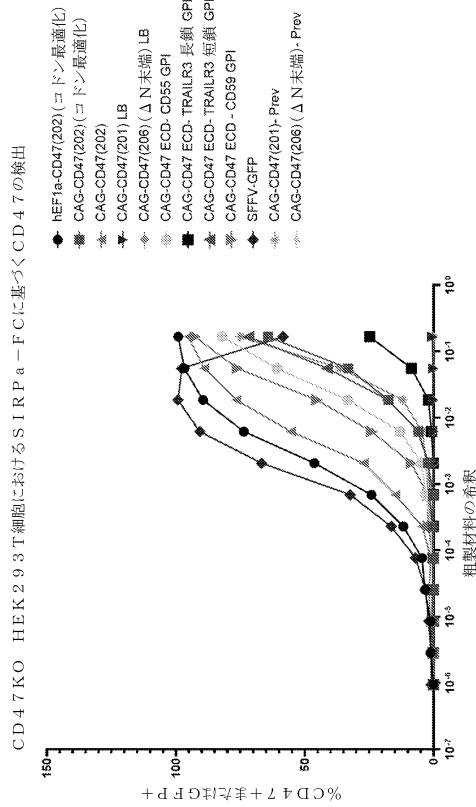
20

30

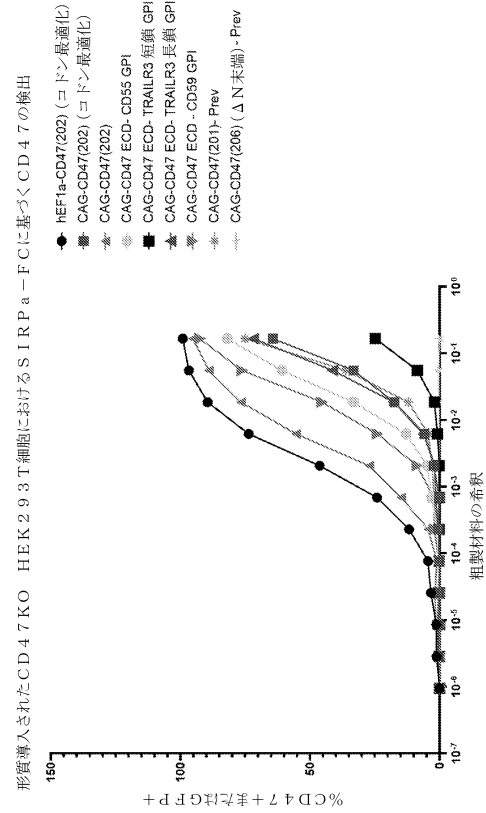
40

50

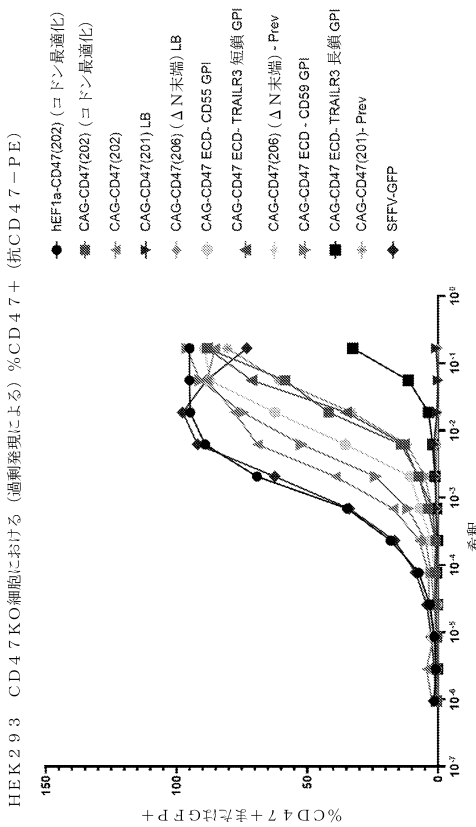
【図 15】



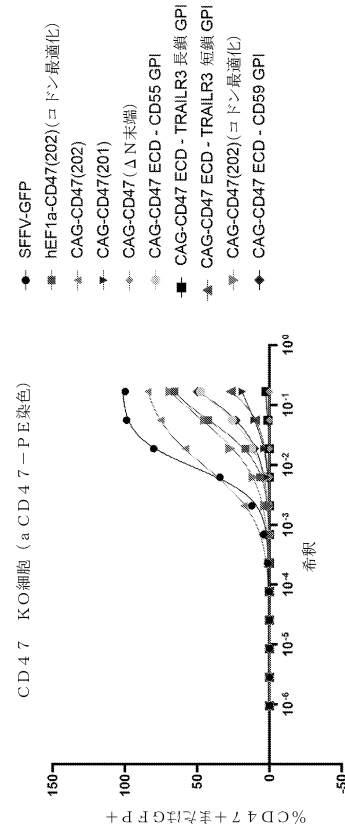
【図 16】



【図 17】



【図 18 A】



10

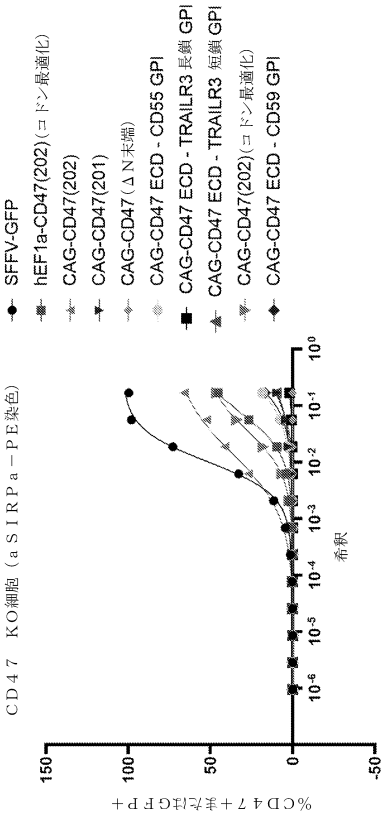
20

30

40

50

【図 18 B】



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/013364

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	C07K14/47 C07K14/705 C07K14/71 C07K16/18 C12N5/10	
	A61K38/00 A61P35/00 C07K19/00	
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K C12N A61P 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) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, 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	TICCHIONI MICHEL ET AL: "Integrin-associated protein (CD47/IAP) contributes to T cell arrest on inflammatory vascular endothelium under flow", THE FASEB JOURNAL, vol. 15, no. 2, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 341-350, XP093056189, US ISSN: 0892-6638, DOI: 10.1096/fj.99-0833com	1-4,179, 184,185, 345,346, 637
Y	abstract page 342, right-hand column, paragraph 4 - page 343, left-hand column, paragraph 1 page 343, left-hand column, paragraph 1 - right-hand column, line 2 page 348, left-hand column, paragraph 2 figure 1 -/--	638, 639, 641-645, 658
☒ 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 29 June 2023		Date of mailing of the international search report 07/07/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Tudor, Mark

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2023/013364

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☐ forming part of the international application as filed.
- b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/013364**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: **5-178, 180-183, 186-344, 347-636, 640, 646-657, 659-812**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:

30

40

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/013364

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	----- A. NEIL BARCLAY ET AL: "The Interaction Between Signal Regulatory ProteinAlpha (SIRPa) and CD47:Structure, Function, and Therapeutic Target", ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY, vol. 32, no. 1, 21 March 2014 (2014-03-21) , pages 25-50, XP055555129, ISSN: 0732-0582, DOI: 10.1146/annurev-immunol-032713-120142 abstract page 38, paragraph 5 - page 42, line 4 -----	638, 639, 641-645, 658

International Application No. PCT/US2023/013364

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 5-178, 180-183, 186-344, 347-636, 640, 646-657, 659-812

The present application contains 812 claims. There are so many dependent claims, and they are drafted in such a way that the claims as a whole are not in compliance with the provisions of clarity and conciseness of Article 6 PCT, because they create a smoke screen in front of the skilled reader when assessing what should be the subject-matter to search. The non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search (PCT Guidelines 9.19). Consequently, the extent of the search was consequently limited to independent claims 1, 179, 184, 185, 345, 346, 637, 638, 639, 641, 642, 643, 644, 645, 658 and dependent claims 2-4 which appear to comprise a reasonable definition of what is understood to be the invention for which protection is sought.

Furthermore, claims 267-320 were not searched because the subject-matter of said claims is too unclear (Article 6 PCT). Claims 267-320 refer to a nucleic acid construct of claims 185-263, however, the subject-matter of claims 185-263 actually concerns a protein.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guidelines C-IV, 7.2), should the problems which led to the Article 17(2) PCT declaration be overcome.

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)	
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	C 0 7 K	16/18	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 0 0
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z
A 6 1 K	35/39 (2015.01)	A 6 1 K	35/39	
A 6 1 K	35/17 (2025.01)	A 6 1 K	35/17	
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	35/12	
A 6 1 K	35/34 (2015.01)	A 6 1 K	35/34	
A 6 1 K	35/30 (2015.01)	A 6 1 K	35/30	
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	
A 6 1 K	35/55 (2015.01)	A 6 1 K	35/55	
A 6 1 K	35/28 (2015.01)	A 6 1 K	35/28	
A 6 1 K	35/545 (2015.01)	A 6 1 K	35/545	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	17/06 (2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	5/38 (2006.01)	A 6 1 P	5/38	
A 6 1 P	5/14 (2006.01)	A 6 1 P	5/14	
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	25/08 (2006.01)	A 6 1 P	25/08	
A 6 1 P	25/06 (2006.01)	A 6 1 P	25/06	
A 6 1 P	25/14 (2006.01)	A 6 1 P	25/14	
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,C O,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,I R,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX ,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV, SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. パイレックス

アメリカ合衆国，ワシントン州 9 8 1 0 2 シアトル イースト ブレイン ストリート 1 8 8 ス
イート 4 0 0 サナ バイオテクノロジー，インコーポレイテッド内

(72)発明者 ドゥードル，ウィリアム

アメリカ合衆国，ワシントン州 9 8 1 0 2 シアトル イースト ブレイン ストリート 1 8 8 ス
イート 4 0 0 サナ バイオテクノロジー，インコーポレイテッド内

(72)発明者 キプニス，ネイサン ヒルトン

アメリカ合衆国，ワシントン州 9 8 1 0 2 シアトル イースト ブレイン ストリート 1 8 8 ス
イート 4 0 0 サナ バイオテクノロジー，インコーポレイテッド内

F ターム (参考) 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44
4C087 AA01 AA02 BB65 NA14 ZA01 ZA06 ZA08 ZA16 ZA22 ZA68
ZA89 ZA96 ZB08 ZB15 ZB26 ZB27 ZC03 ZC06 ZC35
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA75 EA20
FA74