

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7702878号
(P7702878)

(45)発行日 令和7年7月4日(2025.7.4)

(24)登録日 令和7年6月26日(2025.6.26)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09 1 1 0
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864 1 0 0 Z
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10 Z N A
C 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 1 2 N	5/0783
請求項の数 23 (全60頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-557392(P2021-557392)	(73)特許権者	515041446
(86)(22)出願日	令和2年3月27日(2020.3.27)		リサーチ インスティテュート アット
(65)公表番号	特表2022-527709(P2022-527709 A)		ネーションワイド チルドレンズ ホスピタル
(43)公表日	令和4年6月3日(2022.6.3)		RESEARCH INSTITUTE
(86)国際出願番号	PCT/US2020/025454		AT NATIONWIDE CHILD
(87)国際公開番号	WO2020/198675		REN ' S HOSPITAL
(87)国際公開日	令和2年10月1日(2020.10.1)		アメリカ合衆国 オハイオ州 4 3 2 0 5
審査請求日	令和5年3月23日(2023.3.23)		、 コロンバス、 7 0 0 チルドレンズ
(31)優先権主張番号	62/825,007		ドライブ
(32)優先日	平成31年3月27日(2019.3.27)	(74)代理人	100092783
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 小林 浩
		(74)代理人	100120134
			弁理士 大森 規雄
		(72)発明者	リー, ディーン, アンソニー
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C A S 9／RNPおよびA A Vウイルスの組み合わせを使用したがん免疫療法のための、キメラ抗原受容体（C A R）－初代NK細胞の生成

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

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 R I S P R 関連 9（C a s 9）組み込み系とともに使用するためのプラスミドであって、前記プラスミドが、左相同アーム、スプライスアクセプター、導入遺伝子、ポリアデニル化ターミネーター、および右相同アームを順に含み、前記左相同アームおよび右相同アームが、ヒトの19番染色体のアデノ随伴ウイルス組み込み部位1（A A V S 1）に特異的にハイブリダイズし、30bp～100bpの長さを有し、前記右相同アームが、配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号7から選択される核酸配列を含み、前記左相同アームが、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号8から選択される核酸配列を含む、プラスミド。

【請求項 2】

前記左相同アームおよび右相同アームが、同じ長さである、請求項1に記載のプラスミド。

【請求項 3】

前記左相同アームおよび右相同アームが、異なる長さである、請求項1に記載のプラスミド。

【請求項 4】

前記導入遺伝子が、腫瘍抗原のキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドを含む、請求項1～3のいずれか一項に記載のプラスミド。

【請求項 5】

請求項 1～4 のいずれか一項に記載のプラスミドの左相同アーム、スプライスアクセプター、導入遺伝子、ポリアデニル化ターミネーター、および右相同アームを順に含む、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター。

【請求項 6】

前記 AAV の血清型が、AAV 6 を含む、請求項 5 に記載の AAV ベクター。

【請求項 7】

前記ベクターが、crRNA、トレーサーRNA（trcrRNA）、およびCASSエンドヌクレアーゼをコードするプラスミドをさらに含む、請求項 5 に記載の AAV ベクター。

【請求項 8】

前記ベクターが、一本鎖 AAV（ssAAV）または自己相補的 AAV（scAAV）である、請求項 5 に記載の AAV ベクター。

【請求項 9】

請求項 1～4 のいずれか一項に記載のプラスミドまたは請求項 5 に記載の AAV ベクターを含む、改変ナチュラルキラー（NK）細胞。

【請求項 10】

がんを治療するための、請求項 9 に記載の改変細胞。

【請求項 11】

相同性指向修復によって、ナチュラルキラー（NK）細胞を遺伝子改変するエクスビボの方法であって、

a) 対応するCRISPR/CasガイドRNAと複合体化したクラス2 CRISPR/Casエンドヌクレアーゼを含むリボ核タンパク質（RNP）複合体、および請求項 5 に記載の AAV ベクターを得ることであって、前記左および右相同アームが、それぞれ 800bp 以下の長さである、ことと、

b) 前記NK細胞に、前記導入遺伝子および前記RNP複合体を導入することと、を含み、前記導入遺伝子が、前記NK細胞への請求項 5 に記載の AAV ベクターの感染を介して前記NK細胞に導入され、前記RNP複合体が、前記NK細胞のゲノムDNA内の標的配列にハイブリダイズし、前記NK細胞のDNA修復酵素が、前記導入遺伝子を、前記NK細胞の前記ゲノムDNA内の前記標的配列で宿主ゲノムに挿入し、それによって、遺伝子改変NK細胞を生成する、方法。

【請求項 12】

前記NK細胞が初代細胞であり、感染の前に、IL-2 の存在下で、4日間インキュベートされる、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記NK細胞が、感染の前に、照射されたフィーダー細胞の存在下で、さらに4日間増殖された初代細胞である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

感染の後に、mbIL-21とともに前記改変NK細胞を増殖することをさらに含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 15】

前記mbIL-21が、照射されたmbIL-21発現フィーダー細胞、PM21粒子、EX21エクソソーム、またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記AAVベクターが、エレクトロポレーションを介して前記細胞に導入される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 17】

前記AAVベクターが、トランスフェクションを介して前記細胞に導入される、請求項 11 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 18】

相同性指向修復（HDR）によって、ナチュラルキラー（NK）細胞を遺伝子改変するエキソビボの方法であって、

（a）前記細胞内に、（i）前記細胞のゲノム内の標的配列をコードするCRISPR／CasガイドRNAと複合体化したクラス2 CRISPR／Casエンドヌクレアーゼを含むリボ核タンパク質（RNP）複合体、ならびに（ii）請求項5に記載のAAVベクターを導入することであって、前記導入遺伝子が、キメラ抗原受容体をコードする、ことと、

（b）前記NK細胞を、（i）前記RNP複合体が、標的配列にハイブリダイズし、前記標的配列に二本鎖切断（DSB）を導入し、かつ（ii）前記NK細胞が、前記標的配列でそのゲノムに前記導入遺伝子を挿入し、HDRによって前記切断を修復し、それによって、前記導入遺伝子を前記DSBの部位で前記NK細胞のゲノムに組み込むのに十分な時間および条件下で、維持することと、を含む、方法。

10

【請求項 19】

NK細胞が、初代NK細胞または増殖NK細胞である、請求項11または18に記載の方法。

【請求項 20】

前記クラス2 CRISPR／Casエンドヌクレアーゼが、Cas9である、請求項18に記載の方法。

【請求項 21】

前記NK細胞が初代細胞であり、前記方法が、ステップ（a）の前に、前記NK細胞をIL-2の存在下で少なくとも約4日間インキュベートすることをさらに含む、請求項18に記載の方法。

20

【請求項 22】

前記NK細胞が初代細胞であり、前記方法が、ステップ（b）の後に、前記NK細胞をmbIL-21の存在下で少なくとも約4日間増殖させることをさらに含む、請求項18に記載の方法。

【請求項 23】

前記mbIL-21が、照射されたmbIL-21発現フィーダー細胞、PM21粒子、EX21エクソソーム、またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項22に記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

近年、CRISPR／Cas9技術が細胞の操作に使用されている。この技術は、DNA切断を生成するか、または小さな置換もしくは小さな挿入を行うことによって、遺伝子をサイレンシングするためのロバストな方法であることが証明されている。しかしながら、その技術は、技術的なハードルに悩まされている。マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、およびヌクレオフェクションなどの（任意のドナーDNAまたはRNAとともに）CRISPR／Cas9を細胞に送達するための技術は、インビボでの使用には適していない。さらに、ノックイン変異は、典型的には、インビトロ、インビボ、および臨床応用において非常に低い効率を有する。ウイルスベクターを使用して（任意のドナーDNAまたはRNAとともに）CRISPR／Cas9を細胞内に送達することは、インビボ適合性に対処するが、導入遺伝子のサイズに制限を有し、宿主免疫応答を誘導して、手順に関連する実質的な細胞アポトーシスをもたらす、遺伝子操作された細胞の産生を制限する可能性がある。必要とされるのは、細胞を遺伝子操作する新しい方法およびベクターである。

40

【発明の概要】

【0002】

CRISPR／CAS9遺伝子編集系を細胞に送達するための、AAVプラスミドに関

50

連する方法および組成物が開示される。一部の態様では、AAVプラスミドは、導入遺伝子をさらに含む。

【0003】

一態様では、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（CRISPR）／CRISPR関連9（Cas9）組み込み系において使用するためのプラスミドが本明細書に開示され、プラスミドは、左相同アーム、スプライスアクセプター、導入遺伝子、および右相同アームを順に含み、左相同アームおよび右相同アームは、各々800bp以下の長さ（例えば、プラスミド1および2の300bp、プラスミド3および4の300bp、プラスミド5および6の500bp、または800bp）である。一部の態様では、プラスミドは、導入遺伝子と右相同アームとの間にポリアデニル化シグナルをさらに含むことができる。

10

【0004】

左相同アームおよび右相同アームが、同じ長さまたは異なる長さである、任意の先行する態様のプラスミドもまた本明細書に開示される。

【0005】

一態様では、1つまたは2つのプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）、およびCRISPR RNA（crRNA）、および導入遺伝子からなるCRISPR paint（または非相同末端結合）方法において使用するためのプラスミドが本明細書に開示され、コードされた核酸の順序は、PAM、gRNA、および導入遺伝子を含み、2つのPAMおよびgRNAが使用される場合、コードされた核酸のは、第1のPAM、第1のgRNA、導入遺伝子、第2のPAM、および第2のgRNAを含む。

20

【0006】

一態様では、プラスミドの相同アームまたはPAMが、ヒトの19番染色体のアデノ随伴ウイルス組み込み部位1（AAVS1）に特異的にハイブリダイズする、任意の先行する態様のプラスミドが本明細書に開示される。

【0007】

導入遺伝子が、腫瘍抗原のキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドを含む、任意の先行する態様のプラスミドもまた開示される。

【0008】

一態様では、任意の先行する態様のプラスミドを含む、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター（血清型AAV6のAAVベクターなど）が、本明細書に開示される。一態様では、AAVは、一本鎖AAVまたは自己相補的AAVであり得る。

30

【0009】

ベクターが、gRNA（crispr RNA（crRNA）、トレーサーRNA（tracrRNA））、およびCASPaseエンドヌクレアーゼをコードするプラスミドをさらに含む、任意の先行するベクターもまた本明細書に開示される。

【0010】

一態様では、任意の先行する態様のプラスミドまたはベクターを含む改変細胞が本明細書に開示される。

【0011】

がんを有する対象に、任意の先行する態様の改変細胞を投与することを含む、対象におけるがんを治療する方法もまた本明細書に開示される。

40

【0012】

一態様では、相同性指向修復によって、細胞（初代細胞または増殖細胞を含むが、これらに限定されないT細胞、B細胞、マクロファージ、NK細胞、線維芽細胞、骨芽細胞、肝細胞、神経細胞、上皮細胞、および／または筋細胞）を遺伝子改変する方法が本明細書に開示され、a) 対応するCRISPR／CasガイドRNAと複合体化したクラス2 CRISPR／Casエンドヌクレアーゼ（Cas9）を含むリボ核タンパク質（RNP）複合体、および導入遺伝子（例えば、腫瘍抗原のキメラ抗原受容体など）を含むプラスミドを含むAAVベクターを得ることであって、導入遺伝子は、相同アームと隣接してお

50

り、相同アームは、800bp以下の長さである、得ることと、b)細胞に、導入遺伝子およびRNP複合体を導入することと、を含み、導入遺伝子は、細胞へのアデノ随伴ウイルス(AAV)の感染を介して細胞に導入され、RNP複合体は、細胞のゲノムDNA内の標的配列にハイブリダイズし、細胞のDNA修復酵素は、導入遺伝子を標的配列で宿主ゲノムに挿入し(例えば、相同修復によって)、それによって、改変細胞を生成する。一部の態様では、RNP複合体は、エレクトロポレーションを介して細胞に導入され得る。一部の態様では、RNP複合体は、同じまたは異なるAAV内でのウイルス送達(すなわち、重感染)を介して細胞に導入され得る。

【0013】

一態様では、非相同末端結合によって、細胞(初代細胞または増殖細胞を含むが、これらに限定されないT細胞、B細胞、マクロファージ、NK細胞、線維芽細胞、骨芽細胞、肝細胞、神経細胞、上皮細胞、および/または筋細胞)を遺伝子改変する方法が本明細書に開示され、a)対応するCRISPR/CasガイドRNAと複合体化したクラス2 CRISPR/Casエンドヌクレアーゼ(Cas9)を含むリボ核タンパク質(RNP)複合体、および導入遺伝子(例えば、腫瘍抗原のキメラ抗原受容体など)を含むプラスミドを含むAAVベクターを得ることであって、導入遺伝子は、1つのPAMおよびcrRNAに隣接している(adjacent to)か、または2つのPAMおよびcrRNAと隣接している(flanked by)、得ることと、b)細胞に、導入遺伝子およびRNP複合体を導入することと、を含み、導入遺伝子は、標的細胞へのアデノ随伴ウイルス(AAV)の感染を介して細胞に導入され、リボ核タンパク質(RNP)複体内で、細胞のゲノムDNA内の標的配列にハイブリダイズし、切断し、細胞のDNA修復酵素は、導入遺伝子を標的配列で宿主ゲノムに挿入し(例えば、非相同末端結合によって)、それによって、改変細胞を生成する。

【0014】

任意の先行する態様の細胞を遺伝子改変する方法であって、初代細胞は、感染および/またはエレクトロポレーションの前に、IL-2および/または照射されたフィーダー細胞の存在下で4日間インキュベートされる方法もまた本明細書に開示される。

【0015】

任意の先行する態様の細胞を遺伝子改変する方法であって、感染および/またはエレクトロポレーションの後に、照射されたmbIL-21発現フィーダー細胞とともに、改変細胞を増殖することをさらに含む方法もまた本明細書に開示される。

【0016】

本明細書に組み込まれ、その一部を構成する添付の図面は、一部の実施形態を例示し、説明とともに、開示される組成物および方法を例示する。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1-1】CRISPR/Cas9および導入遺伝子の送達のためのAAVベクターを使用した、CRISPR/Cas9複合体の概略図を示す。概略図は、相同性指向修復を介した導入遺伝子の組み込みにおけるCRISPR/Cas9系の作用の詳細を示し、19番染色体上のAAVS1標的部位を示し、30、300、500、または800bpの相同アームを有するドナープラスミドの詳細を提供する。

【図1-2】図1-1の続きである。

【図2】CRISPR/Cas9含有プラスミドの概略図を示す。

【図3A】単一のPAM+crRNAと、第2のPAM+crRNAを添加するプラスミド11および12(3A)とを有する、本明細書でプラスミド9および10(3B)と称されるHITIまたはCRISPaintなどの非相同末端結合方法で使用される導入遺伝子のプラスミドの概略図を示す。図は、PAMおよびcrRNAを含むと理解されるgRNAを示すことに留意されたい。

【図3B】単一のPAM+crRNAと、第2のPAM+crRNAを添加するプラスミド11および12(3A)とを有する、本明細書でプラスミド9および10(3B)と称

10

20

30

40

50

されるHIT IまたはCRISPaintなどの非相同末端結合方法で使用する導入遺伝子のプラスミドの概略図を示す。図は、PAMおよびcrRNAを含むと理解されるgRNAを示すことに留意されたい。

【図4A】NK細胞をトランスフェクトするためのAAV血清型の決定を示す。図4Aは、異なるトランスフェクション条件下での様々なAAV血清型に対するGFPの発現を示す。

【図4B】NK細胞をトランスフェクトするためのAAV血清型の決定を示す。図4Bは、NK細胞におけるAAV6ゲノムDNAのコピー数を示す。

【図5A】HEK293細胞のAAVS1遺伝子座へのmCherryレポーター遺伝子の組み込みが、PCR(5A)を使用して評価されたことを示す。mCherry1(フォワードプライマーは、配列番号2であり、リバースプライマーは、配列番号3である)およびmCherry2(フォワードプライマーは、配列番号4であり、リバースプライマーは、配列番号5である)の増幅のためのフォワードプライマーおよびリバースプライマーを示す。mCherryの安定遺伝子発現が、フローサイトメトリー(5B)および蛍光顕微鏡検査(5C)を使用して研究されたことも示されている。*結果は、12個の設計されたAAV構築物のうちの2個を表す。使用されるgRNA、GGGGCCACTAGGGACAGGAT(配列番号1)。

【図5B】図5Aの続きである。

【図5C】図5Aの続きである。

【図6A】ヒト初代NK細胞のAAVS1遺伝子座へのmCherryレポーター遺伝子の組み込みが、PCR(6A)を使用して評価されたことを示す。増殖後のmCherryの安定遺伝子発現が、フローサイトメトリー(6B)を使用して研究された。*結果は、12個の設計されたAAV構築物のうちの2個を表す。

【図6B】図6Aの続きである。

【図7A】プラスミド1、2、3、4、5、6、7および8を含有するmCherry導入遺伝子の概略図を示し、左相同アーム(LHA)、スプライスアクセプター、導入遺伝子、ポリアデニル化ターミネーター、および右相同アーム(RHA)の相対位置、ならびに構築物全体の対応する配列を示す。図7Aおよび図7Bは、30bpの相同アームプラスミド1および2の概略図および配列(配列番号13)を示す。図7Cおよび図7Dは、300bpの相同アームプラスミド3および4の概略図および配列(配列番号14)を示す。図7Eおよび図7Fは、500bpの相同アームプラスミド5および6の概略図および配列(配列番号15)を示す。図7Gおよび図7Hは、800bpのLHAおよび1000bpのRHAを含む800bpの相同アームプラスミド7および8の概略図および配列(配列番号16)を示す。

【図7B】図7Aの続きである。

【図7C】図7Aの続きである。

【図7D】図7Aの続きである。

【図7E】図7Aの続きである。

【図7F】図7Aの続きである。

【図7G】図7Aの続きである。

【図7H】図7Aの続きである。

【図8】NKの単離および増殖のスキームを示す。初代ヒトNK細胞を、健康なドナーからのバフィーコートから単離し、mbIL21 K562を使用して7日間増殖した。

【図9】単離されたNK細胞のフローサイトメトリーの結果を示し、NK細胞の純度を示す。バフィーコートから単離された細胞を、CD3およびCD56の染色によってT細胞汚染について評価した。フローサイトメトリーの結果に基づいて、単離されたリンパ球は、>90%のCD3陰性、CD56陽性であった。

【図10】ATAC-seq解析は、NK細胞におけるAAVS1が、遺伝子挿入に好適なクロマチンアクセシビリティを有することを示す。オープンクロマチン領域を表すATAC-seqピーク。データは、AAVS1が、ナイーブおよび増殖7日目のNK細胞に

10

20

30

40

50

において同様のクロマチンアクセシビリティを有することを示す。

【図11】ヒト初代NK細胞における目的の遺伝子を標的にするCas9/RNPの産生およびエレクトロポレーションを示す。gRNAを作製するために、事前に転写されたcrRNAおよびトレーサーRNAを95℃で5分間アニールした。次いで、事前翻訳されたCas9エンドヌクレアーゼタンパク質を、gRNAと室温で10分間混合した。Cas9/RNPおよびエレクトロポレーションエンハンサーをNK細胞に添加した。次いで、混合物をLonza4Dヌクレオフェクションキュベットに移した。細胞を、Lonza4Dを使用してEN-138プログラムでエレクトロポレーションした。

【図12】ICE解析は、Cas9/RNPを使用したNK細胞における成功した遺伝子(AAVS1)標的化を示す。ICEは、サンガーシーケンシングデータを使用して、CRISPR編集の定量解析を生成する。この方法を使用して、我々は、85%を超えるNK細胞を、AAVS1遺伝子座で標的にすることに成功したことを示した。

10

【図13】AAVS1をロックアウトしても、NK細胞の細胞毒性を変えないことを示す。カルセイン-AM細胞毒性アッセイは、AAVS1-KOおよび野生型NK細胞によるAML細胞株に対するNK細胞媒介性殺傷において差異を示さなかった。これは、NK細胞内のAAVS1遺伝子座を標的とすることの安全性を実証する。

【図14】ヒト初代NK細胞を形質導入するためのAAVの最良の血清型を同定することを示す。4つの異なる血清型のAAVのうち、AAV6で形質導入されたNK細胞のみが、GFPの発現を示した(上位のパネル)。300,000のMOIでのNK細胞の形質導入の48時間後に、AAV6ウイルスゲノムを検出することができた(下位のパネル)。

20

【図15-1】HR指向性遺伝子挿入には、HAの最適な長さが必要であることを示す。非相同末端結合(NHEJ)DNA修復機構は、Cas9DSBに続いて活性化され、遺伝子ロックアウトをもたらす。相同修復(HR)DNA修復機構は、Cas9標的部位(AAVS1)のための最適な相同アームを有するDNAテンプレートの存在下で、その活性化が遺伝子挿入をもたらす経路である。左側のHAの場合、30bp、300bp、500bpおよび800bpのHA、右側のHAの場合、30bp、300bp、500bpおよび1000bpを設計した。HRテンプレートを、ssAAV6またはscAAV6ベクターのITR内でクローニングした。

【図15-2】図15-1の続きである。

【図16A-1】Cas9標的部位の隣接領域に対してHAを必要としない、CRISPRaintアプローチによる遺伝子組み込みを示す。CRISPRaintアプローチによる非相同遺伝子挿入(図15A)について、単一(PAMg)または二重(PAMgPAMg)AAVS1標的部位(crRNA+PAM配列)をITR内に含めた。CRISPRaintは、HR遺伝子挿入のためのHAを設計する時間のかかるプロセスを克服するのに役立つ(図15B)。

30

【図16A-2】図16A-1の続きである。

【図16B】図16A-1の続きである。

【図17】フローサイトメトリーの結果は、HEK293細胞における導入遺伝子発現に成功したことを示した。ベクターの精度をアッセイするための、HEK293細胞への1μgのmCherryをコードするDNAのエレクトロポレーションは、遺伝子発現に成功したことを示した。フローサイトメトリーは、mCherryの安定発現を示した。

40

【図18】ナイーブおよび増殖NK細胞におけるHRおよびCRISPRaint調節酵素の発現レベルを研究することを示す。HR関連酵素は、ナイーブNK細胞と比較して、7日目の増殖NK細胞において上方調節された。ナイーブ細胞と増殖NK細胞との間には、非相同性関連酵素LIG4の差はない。このデータは、7日目の増殖NK細胞が、HRおよびCRISPRaintの両方による指向性遺伝子挿入のためのAAV6でのエレクトロポレーションおよび形質導入のための潜在的な最適条件を有することを示す。

【図19】遺伝子挿入のためのCas9/RNPのエレクトロポレーションおよびAAV6の形質導入の組み合わせを示す。mCherryをコードするDNAを送達するHRおよびCRISPRaintウイルスの500,000、300,000、または150,0

50

00のMOIのssAAV6またはscAAV6を使用して、Cas9／RNPでエレクトロポレーションした7日目の増殖NK細胞を形質導入した。

【図20】フローサイトメトリーの結果は、AAV6のより高いMOIで形質導入されたCRISPR改変NK細胞において安定したmCherry発現を示したことを示す。500,000のMOIまたは300,000のMOIのHR-800bpを送達するssAAV6またはCRISPaint PAMg PAMgを送達するscAAV6で形質導入された細胞間のmCherry陽性NK細胞のパーセンテージに有意差は見られなかった。したがって、残りの実験では、300,000のMOIおよび150,000のMOIのAAV6を使用した。

【図21】CRISPR改変初代NK細胞のフローサイトメトリーの結果が、高効率な導入遺伝子発現を実証したことを示す。NK細胞をCas9／RNPでエレクトロポレーションし、HRおよびCRISPaint DNAテンプレートを送達する300,000のMOIまたは150,000のMOIのssAAV6またはscAAV6で形質導入した。CRISPR改変の6日後、フローサイトメトリーの結果は、scAAV6を使用して、Cas9標的部位の隣接領域に対して300bpの最小最適相同アーム長でmCherryをコードするDNAを送達することが、初代NK細胞における高効率な遺伝子挿入をもたらすことを示す。小さな導入遺伝子に対して500bpおよび800～1000bpを含む大きなHAはまた、NK細胞への遺伝子挿入に利用することができる。大きな導入遺伝子について30bpのHAも遺伝子挿入に使用することができることを示している。加えて、CRISPaintが、ヒト初代NK細胞への遺伝子挿入に適用可能なアプローチであることを実証する。

【図22】mCherry陽性NK細胞を、mb-IL21発現フィーダー細胞上で増殖させることができることを示す。ssAAV6-HR-800bpおよびscAAV6-CRISPaint-PAMg PAMgで生成し、低効率を有したmCherry NK細胞を、FACSで選別し、フィーダー細胞を使用して20日間増殖させた。選別の20日後のフローサイトメトリー結果は、HRおよびCRISPaintの両方を介して生成されたCRISPR改変NK細胞における安定および富化したmCherry発現を示した。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明の化合物、組成物、物品、デバイス、および／または方法が開示および説明する前に、それらは、特に明記しない限り、特定の合成方法または特定の組換えバイオテクノロジー方法に限定されず、特に明記しない限り、特定の試薬（当然、変化し得るため）に限定されないことを理解されたい。また、本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を説明することのみを目的とし、限定することを意図するものではないことも理解されたい。

【0019】

A. 定義

本明細書および添付の特許請求の範囲で 사용되는場合、単数形の「1つの」（「a」、「an」、および「the」）は、文脈上別段明らかに指示されない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「薬学的担体」への言及は、2つ以上のそのような担体の混合物などを含む。

【0020】

本明細書では、範囲は、「約」ある特定の値から、および／または「約」別の特定の値まで、のように表現され得る。そのような範囲が表現される場合、別の実施形態は、ある特定の値から、および／または他の特定の値まで、を含む。同様に、値が近似値として表現される場合、先行詞の「約」を使用することによって、特定の値は別の実施形態を形成することが理解されよう。さらに、範囲の各終点は、他の終点と関連して、および他の終点とは独立して、両方とも重要であることが理解されよう。本明細書に開示されるいくつかの値が存在し、各値は、値自体に加えて、その特定の値を「約」として本明細書に開示

されることも理解される。例えば、値「10」が開示される場合、次いで「約10」も開示される。当業者によって適切に理解されるように、値が「値以下」であることが開示される場合、「値以上」および値間の可能な範囲も開示されることも理解される。例えば、値「10」が開示される場合、「10以下」ならびに「10以上」も開示される。また、本出願全体にわたって、データは、いくつかの異なる形式で提供され、このデータは、終点および始点、ならびにデータポイントの任意の組み合わせの範囲を表すことも理解される。例えば、特定のデータポイント「10」および特定のデータポイント15が開示される場合、10と15との間に加えて、10超、10以上、10に等しい、15未満、15以下、および15に等しいが開示されるとみなされることが理解される。また、2つの特定のユニット間の各ユニットも開示されることが理解される。例えば、10および15が開示される場合、11、12、13、および14も開示される。

10

【0021】

本明細書および添付の特許請求の範囲では、以下の意味を有するべく定義されたいくつかの用語を参照されたい。

【0022】

「任意選択的」または「任意選択的に」とは、後で説明する事象または状況が生じても生じなくてもよいことを意味し、説明には、当該事象または状況が生じる事例および生じない事例を含む。

【0023】

「プライマー」は、ある種の酵素マニピュレーションを支持することができ、酵素マニピュレーションが生じ得るように標的核酸とハイブリダイズすることができるプローブのサブセットである。プライマーは、酵素マニピュレーションを妨げない、当該技術分野で入手可能なヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体または類似体の任意の組み合わせから作製することができる。

20

【0024】

「プローブ」は、典型的には、例えばハイブリダイゼーションを通して、配列特異的な様式で標的核酸と相互作用することができる分子である。核酸のハイブリダイゼーションは、当該技術分野で十分に理解され、本明細書で論じられる。典型的には、プローブは、当該技術分野で入手可能なヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体または類似体の任意の組み合わせから作製することができる。

30

【0025】

特定のRNAを「コードする」DNA配列は、RNAに転写されるDNA核酸配列である。DNAポリヌクレオチドは、タンパク質に翻訳されたRNA(mRNA)をコードしてもよく(したがって、DNAおよびmRNAはともにタンパク質をコードする)、またはDNAポリヌクレオチドは、タンパク質に翻訳されないRNA(例えば、tRNA、rRNA、マイクロRNA(miRNA)、「非コード」RNA(ncRNA)、ガイドRNAなど)をコードしてもよい。

【0026】

「タンパク質コード配列」または特定のタンパク質もしくはポリペプチドをコードする配列は、適切な調節配列の制御下に置かれた場合、mRNAに転写され、(DNAの場合)、インビトロまたはインビボでポリペプチドに翻訳される(mRNAの場合)核酸配列である。コード配列の境界は、5'末端(N末端)での開始コドンおよび3'末端(C末端)での翻訳停止ナンセンスコドンによって決定される。コード配列には、原核生物または真核生物mRNA由来のcDNA、原核生物または真核生物DNA由来のゲノムDNA配列、および合成核酸が挙げられるが、これらに限定されない。転写終結配列は、通常、コード配列の3'に位置する。

40

【0027】

本明細書で使用される場合、核酸、ポリペプチド、細胞、または生物に適用される「天然に存在する」または「未改変」または「野生型」という用語は、天然に見出される核酸、ポリペプチド、細胞、または生物を指す。例えば、自然界の供給源から単離することが

50

でき、かつ実験室内でヒトによって意図的に改変されていない生物（ウイルスを含む）中に存在するポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は、野生型である（および天然に存在する）。

【0028】

「対象への投与」には、対象に薬剤を導入または送達する任意の経路が含まれる。投与は、経口、局所、静脈内、皮下、経皮（transcutaneous）、経皮（transdermal）、筋肉内、関節内、非経口、動脈内、皮内、心室内、頭蓋内、腹腔内、病巣内、鼻腔内、直腸、膣、吸入による、移植リザーバー経由、非経口（例えば、皮下、静脈内、筋肉内、関節内、滑液内、胸骨内、髄腔内、腹腔内、肝臓内、病巣内、および頭蓋内注射または注入技術）などを含む、任意の好適な経路によって実施することができる。本明細書で使用される「同時投与」（concurrent administration、administration in combination、simultaneous administration、またはadministered simultaneously）は、化合物が、時間的に同じ時点で投与されるか、または本質的に互いの直後に投与されることを意味する。後者の場合、2つの化合物は、観察された結果が、時間的に同じ時点で投与された場合に得られる結果と区別できないような十分近い時間に投与される。「全身投与」とは、例えば、循環系またはリンパ系への入口を通して、対象の身体の広範な領域（例えば、身体の50%超の領域）に薬剤を導入または送達する経路を介して、対象に薬剤を導入または送達することを指す。対照的に、「局所投与」は、投与点の領域またはそれに直接隣接する領域に薬剤を導入または送達し、治療上有意な量で薬剤を全身的に導入しない経路を介して、対象に薬剤を導入または送達することを指す。例えば、局所投与される薬剤は、投与点の局所的な近傍で容易に検出可能であるが、対象の身体の遠位部分では検出不能であるか、または無視できる量で検出可能である。投与には、自己投与および他者による投与が含まれる。

【0029】

薬剤の「有効量」とは、所望の効果を提供するのに十分な量の薬剤を指す。「有効」である薬剤の量は、対象の年齢および一般状態、特定の薬剤（複数可）などの多くの要因に応じて、対象によって異なるであろう。したがって、定量化された「有効量」を指定することは必ずしも可能ではない。しかしながら、任意の対象の場合における適切な「有効量」は、日常の実験を使用して当業者によって決定されてもよい。また、本明細書で使用される場合、特に明記しない限り、薬剤の「有効量」とは、治療上有効量および予防上有効量の両方をカバーする量も指すことができる。治療効果を達成するのに必要な薬剤の「有効量」は、対象の年齢、性別、および体重などの要因に従って変化し得る。投与計画は、最適な治療応答を提供するように調整することができる。例えば、一日に用量をいくつかに分割して投与してもよく、または治療状況の緊急性によって示されるように、用量を比例して低減してもよい。

【0030】

「薬学的に許容される」構成要素は、生物学的または他の望ましくないものではない構成要素、すなわち、著しく望ましくない生物学的効果を引き起こすことなく、またはそれが含有される製剤の他の構成要素のいずれかと有害な様式で相互作用することなく、本発明の医薬製剤に組み込んで、本明細書に記載のように対象に投与することができる構成要素を指すことができる。ヒトへの投与に関して使用される場合、この用語は、一般に、構成要素が毒性試験および製造試験の必要な基準を満たしているか、またはそれが、米国食品医薬品局によって調製された不活性成分ガイドに含まれることを意味する。

【0031】

「薬学的に許容される担体」（「担体」と称されることがある）は、一般に安全かつ無毒の薬学的または治療組成物の調製において有用な担体または賦形剤を意味し、獣医学的および／またはヒトの薬学的または治療的使用が許容される担体を含む。「担体」または「薬学的に許容される担体」という用語は、限定されないが、リン酸緩衝食塩水、水、エマルジョン（油／水もしくは水／油エマルジョンなど）、および／または様々な種類の湿

10

20

30

40

50

潤剤を含むことができる。本明細書で使用される場合、「担体」という用語は、任意の賦形剤、希釈剤、充填剤、塩、緩衝液、安定剤、可溶化剤、脂質、安定剤、または医薬製剤で使用するために当該技術分野でよく知られた材料、および本明細書にさらに記載される材料を包含するが、これらに限定されない。

【0032】

「薬理学的活性」（または単に「活性」）は、「薬理学的活性」誘導体または類似体において、親化合物と同じ種類の薬理学的活性を有し、程度がほぼ同等な誘導体または類似体（例えば、塩、エステル、アミド、複合体、代謝産物、異性体、断片など）を指し得る。

【0033】

「治療剤」は、有益な生物学的効果を有する任意の組成物を指す。有益な生物学的効果としては、治療効果、例えば、障害または他の望ましくない生理学的状態の治療、および予防効果、例えば、障害または他の望ましくない生理学的状態（例えば、非免疫原性がん）の予防の両方が挙げられる。これらの用語はまた、本明細書に具体的に言及される有益な薬剤の薬理学的に許容される活性な誘導体を包含し、限定されないが、塩、エステル、アミド、前駆薬剤、活性代謝産物、異性体、断片、類似体などを含む。「治療剤」という用語が使用される場合、次いで、または特定の薬剤が具体的に同定される場合、この用語は、薬剤自体、ならびに薬学的に許容される薬理学的に活性な塩、エステル、アミド、前駆薬剤、複合体、活性代謝産物、異性体、断片、類似体などを含むことを理解されたい。

【0034】

組成物（例えば、薬剤を含む組成物）の「治療上有効量」または「治療上有効用量」は、所望の治療結果を得るのに有効な量を指す。一部の実施形態では、所望の治療結果は、I型糖尿病の制御である。一部の実施形態では、所望の治療結果は、肥満の制御である。所与の治療剤の治療上有効量は、典型的には、治療される障害または疾患の種類および重症度、ならびに対象の年齢、性別、および体重などの要因に関して異なるであろう。この用語はまた、疼痛緩和などの所望の治療効果を促進するのに有効な、治療剤の量、または治療剤の送達速度（例えば、経時的な量）を指すこともできる。正確な所望の治療効果は、治療される状態、対象の耐容性、投与される薬剤および／または薬剤製剤（例えば、治療剤の効力、製剤中の薬剤の濃度など）、ならびに当業者によって理解される様々な他の因子に従って異なるであろう。場合によっては、所望の生物学的応答または医学的応答は、数日、数週間、または数年にわたって、組成物を複数回投与した後に達成される。

【0035】

本出願全体を通して、様々な刊行物が参照される。これらの刊行物の開示は、本出願に關係する技術水準をより完全に説明するために参照により本出願に援用される。開示される参考文献はまた、参考文献に依る文章で論じられ、それらに含まれる材料について、個別にかつ具体的に参照により本明細書に援用される。

【0036】

B. プラスミドおよび細胞を遺伝子改変する方法

一態様では、ドナー導入遺伝子を細胞に送達し、当該導入遺伝子をCRISPR/Cas9と組み合わせて細胞に組み込むためのプラスミドが本明細書に開示される。

【0037】

エンドヌクレアーゼ/RNP（例えば、Cas9/RNP）は、CRISPR遺伝子座と複合体化した3成分性の組換えエンドヌクレアーゼタンパク質（例えば、Cas9エンドヌクレアーゼ）からなる。CRISPR遺伝子座と複合体化したエンドヌクレアーゼは、CRISPR/CasガイドRNAと称され得る。CRISPR遺伝子座は、標的配列と複合体化した相補的反復RNA（crRNA）およびトランス相補的反復RNA（tracrRNA）にハイブリダイズし得るRNAからなる合成単一ガイドRNA（gRNA）を含む。したがって、CRISPR/CasガイドRNAは、細胞のゲノムDNA内の標的配列にハイブリダイズする。一部の 경우에는、クラス2 CRISPR/Casエンドヌクレアーゼは、II型CRISPR/Casエンドヌクレアーゼである。一部の 경우에는、クラス2 CRISPR/Casエンドヌクレアーゼは、Cas9ポリペプチドで

あり、対応するC R I S P R / C a s ガイドRNAは、C a s 9 ガイドRNAである。これらのC a s 9 / R N P は、機能複合体としてそれらが送達されるために、外来DNAに依存したアプローチと比較して、より高い効率でゲノム標的を切断することができる。加えて、細胞からのC a s 9 / R N P の迅速なクリアランスは、アポトーシスの誘導などのオフターゲット効果を低減することができる。

【0038】

R N P 複合体を作製するために、c r R N A および t r a c r R N A を、約50 μ M ~ 約500 μ M (例えば、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、または500 μ M)、好ましくは100 μ M ~ 約300 μ M、最も好ましくは約200 μ M の濃度の1:1、2:1、1:2の比で、95℃で約5分間混合して、c r R N A : t r a c r R N A 複合体(すなわち、ガイドRNA)を形成することができる。次いで、c r R N A : t r a c r R N A 複合体を、C a s エンドヌクレアーゼ(例えば、C a s 9 など)の約20 μ M ~ 約50 μ M (例えば、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、または50 μ M)の最終希釈で混合することができる。

【0039】

標的細胞中の標的配列に結合すると、C R I S P R 遺伝子座は、標的DNAに、1つ以上の塩基対の挿入もしくは欠失、異種DNA断片(例えば、ドナーポリヌクレオチド)の挿入、内因性DNA断片の欠失、内因性DNA断片の反転もしくは転座、またはそれらの組み合わせ、を導入することによってゲノムを改変することができる。したがって、本開示の方法を使用して、相同組換えのためにDNAと組み合わせた場合、ノックアウト、またはノックインを生成することができる。本明細書では、C a s 9 / R N P のアデノ随伴ウイルス(A A V)を介した形質導入は、細胞(例えば、T細胞、B細胞、マクロファージ、NK細胞、線維芽細胞、骨芽細胞、肝細胞、神経細胞、上皮細胞、および/または筋細胞など)における遺伝子改変の以前の制約を克服する容易かつ比較的効率的な方法であることが示される。

【0040】

C R I S P R / C a s 9 系は、相同組換え(H R)の間、ドナーテンプレートDNAとして機能するために、アデノ随伴ウイルス(A A V)ベクターを使用して、高レベルの正確なゲノム編集を促進することが最近示されている。しかしながら、A A Vの先行使用は、NK細胞が、ウイルスおよび細菌ベクター、ならびに当該ベクターによるNK細胞のアポトーシスの誘導に耐性がある、それらの免疫機能により、制限されている。したがって、本方法以前は、NK細胞のC R I S P R / C a s 改変は成功していなかった。さらに、約4.5キロベースの最大A A V パッケージング容量は、相同アームを含むドナーサイズを制限する。推奨されるのは、100 b p を超える任意の転写産物および任意の導入遺伝子が、各アームに対して少なくとも800 b p である相同アームを有し、多くの系が、800 b p および1000 b p の非対称アームを合計1800 b p 使用することである。したがって、A A V ベクターは、約2.5 k b を超える導入遺伝子を送達することができない。一態様では、表1に示されるように、30、50、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、または1000 b p を含むが、こ

れらに限定されない30bp～1000bpの相同アームを有するドナー構築物プラスミドを含むAAV CRISPR/CAS9ヌクレオチド送達系が、本明細書に開示される。例えば、相同アームは、相同組換え（HR）の場合、プラスミド1および2（図7Aおよび図7B）のような対称的30bp相同アーム、プラスミド3および4（図7Cおよび図7D）のような対称的300bp相同アーム、プラスミド5および6（図7Eおよび図7F）のような対称的500bp相同アーム、または800bp左相同アーム（LHA）および1000bp右相同アーム（RHA）を含む、プラスミド7および8（図7Gおよび図7H）のような非対称的800bp相同アームであり得るか、あるいは相同性非依存的標的組み込み（HITI）プラスミドを使用した非相同末端結合の場合、相同アームをまったく有しない（プラスミド9、10、11、および12）ものであり得る。任意の既存のプラスミドに比べて、プラスミド1、2、3、4、5、および6の利点は、挿入だけでなく、大きな転写産物にも使用することができることである。プラスミド1、2、3、4、5、および6は、任意の細胞型でも使用することができ、臨床的に承認されたスプライスアクセプター（SA）（配列番号10）および臨床的に承認されたポリアデニル化ターミネーター（PA）（例えば、BGHポリAターミネーター配列番号11など）を有する。プラスミド7および8は、臨床的に承認されたスプライスアクセプター（SA）および臨床的に承認されたポリアデニル化ターミネーター（PA）を有する。相同アームは、異なる導入遺伝子長に対応するために、対称的（各側の同じ長さ）または非対称的（各側の異なる長さ）であり得ることが理解され、本明細書で企図される。すなわち、相同アーム長は、LHA 30bp（配列番号2）およびRHA 30bp（配列番号1）、LHA 30bpおよびRHA 100bp、LHA 30bpおよびRHA 300bp（配列番号3）、LHA 30bpおよびRHA 500bp（配列番号5）、LHA 30bpおよびRHA 800bp（実際にプラスミド7および8の1000bp、配列番号7）、LHA 30bpおよびRHA 1000bp、LHA 100bpおよびRHA 30bp、LHA 100bpおよびRHA 100bp、LHA 100bpおよびRHA 300bp、LHA 100bpおよびRHA 500bp、LHA 100bpおよびRHA 800bp、LHA 100bpおよびRHA 1000bp、LHA 300bp（配列番号4）およびRHA 30bp、LHA 300bpおよびRHA 100bp、LHA 300bpおよびRHA 300bp、LHA 300bpおよびRHA 500bp、LHA 300bpおよびRHA 800bp、LHA 300bpおよびRHA 1000bp、LHA 500bp（配列番号6）およびRHA 30bp、LHA 500bpおよびRHA 100bp、LHA 500bpおよびRHA 300bp、LHA 500bpおよびRHA 500bp、LHA 500bpおよびRHA 800bp、LHA 500bpおよびRHA 1000bp、LHA 800bp（配列番号8）およびRHA 30bp、LHA 800bpおよびRHA 100bp、LHA 800bpおよびRHA 300bp、LHA 800bpおよびRHA 500bp、LHA 800bpおよびRHA 800bp、LHA 800bpおよびRHA 1000bp、LHA 1000bpおよびRHA 30bp、LHA 1000bpおよびRHA 100bp、LHA 1000bpおよびRHA 300bp、LHA 1000bpおよびRHA 500bp、LHA 1000bpおよびRHA 800bp、ならびにLHA 1000bpおよびRHA 1000bpを含むが、これらに限定されない左相同アーム（LHA）長および右相同アーム（RHA）長の組み合わせを有することができる。

【0041】

プラスミド9、10、11、および12は、プラスミド1～8または当該技術分野に記載される任意のプラスミドと著しく異なる。これらのプラスミドは、同じ臨床的に承認されたSAおよびPAを有し、任意の細胞型で使用するすることができるが、相同性指向修復（HDR）を介して組み込まれるのではなく、HITI、CRISPAint、または他の非相同末端結合（NHEJ）を介して組み込まれる。したがって、それらはより高い効率で組み込まれるという利点がある。組み込みのための導入遺伝子を除去するための切断部位の同定を支援するために、プラスミドは、ドナー導入遺伝子組み込みを標的とするため

10

20

30

40

50

のプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）およびcrRNA（すなわち、grNA）（配列番号9）を含む。プラスミド11および12は、ドナー導入遺伝子プラスミド上の少なくとも1つの部位を標的化するCas9の可能性を増加させるために、2つのPAM配列を含む。

【0042】

表1に示されるように、相同アームおよびの変化は、プラスミドが一本鎖または自己相補的であるかどうかと同様に、ドナー導入遺伝子を組み込む能力に劇的に影響を与えることができる。

【表1】

新規プラスミド番号		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
導入遺伝子	サイズ・BP	30BP-SS	30BP-SC	300BP-SS	300BP-SC	500BP-SS	500BP-SC	800BP-SS	800BP-SC	PAMG-HITI-SS	PAMG-HITI-SC	PAMGPAMG-HITI-SS	PAMGPAMG-HITI-SC
	MCHERRY (配列番号12)	有	有	有	有	有	有	有	有	有	有	有	有
	CAR-JAK/STAT	有	無	無	無	無	無	無	無	有	無	有	無
CAR-IL2R	3176	有	有	無	無	無	無	無	無	有	有	有	有
相同的方向スキーム										相同性非依存的標的組み込み (HITI) スキーム			

SS=一本鎖 (4.5kb の全構築物の長さ)
SC=自己相補的 (2.5kb の全構築物の長さ)

【0043】

加えて、一本鎖（SS）プラスミドを使用してより大きな導入遺伝子を挿入することの利点にもかかわらず、SSプラスミドは、いくつかの細胞（例えば、T細胞、B細胞、マクロファージ、NK細胞、線維芽細胞、骨芽細胞、肝細胞、神経細胞、上皮細胞、および／または筋細胞など）におけるDNA感知機構および細胞毒性を増加させる組み込み前に、細胞内で折り畳まれ、二本鎖DNAとして機能するにはより長い時間が必要である。この問題は、細胞内の外因性DNAへの曝露時間を減少させるために、自己相補的（SC）（二本鎖）構築物を使用することにより、本明細書では、プラスミド2、4、6、8、10、および12によって克服される。本開示のプラスミド。

【0044】

本明細書では、Cas9ヌクレアーゼ活性を標的部位に標的化し、またドナープラスミドを切断して、ドナー導入遺伝子の宿主DNAへの組換えを可能にするために、crisprRNA（crRNA）を使用することが理解され、企図される。一部の 경우에는、crRNAをtracrRNAと組み合わせて、ガイドRNA（gRNA）を形成する。開示されるプラスミドは、AAVS1と称される、ヒトの19番染色体上のタンパク質ホスファターゼ1の調節サブユニット12C（PPP1R12C）遺伝子のイントロン1を、導入遺伝子の組み込みの標的部位とした、AAV組み込みを使用する。この遺伝子座は、「セーフハーバー遺伝子」であり、多くの細胞型において安定した長期の導入遺伝子発現を可能にする。PPP1R12Cの破壊は、いかなる既知の疾患とも関連しないため、AAVS1遺伝子座は、導入遺伝子の標的化のための安全なハーバーとみなされることが多い。AAVS1部位が標的位置として使用されているため、CRSPR RNA（crRNA）は、当該DNAを標的にしなければならない。ここで、開示されるプラスミドで使用されるガイドRNAは、GGGGCCACTAGGGACAGGAT（配列番号1）、またはその任意の10ヌクレオチドのセンスもしくはアンチセンスの連続した断片を含む。AAVS1は、本明細書で例示的な目的のために使用されるが、他の「セーフハーバー遺伝子」が、同等の結果で使用され得、トランスフェクトされる特定の細胞型または導入遺伝子を考慮してより適切であれば、AAVS1に置換され得ることが理解され、本明細書で企図される。他のセーフハーバー遺伝子の例としては、限定されないが、C-Cケモカイン受容体5型（CCR5）、ROSA26遺伝子座、およびTRACが挙げられる。

【0045】

上述のように、開示されるCRISPR/Cas9プラスミドおよび任意のドナー導入遺伝子を送達するためのベクターとしてのAAVの使用は、最大で約4.5 kbに制限される。導入遺伝子の許容サイズを増加させる1つの方法は、典型的に使用されるStreptococcus pyogenes（SpCas9）のCas9を、異なる細菌源からの合成Cas9またはCas9に交換することによって、追加の余地を生成することであることが理解され、本明細書で企図される。Cas9の置換を使用して、標的特異性を増やすこともできるため、gRNAを使用する必要がより少なくなる。したがって、例えば、Cas9は、Staphylococcus aureus（SaCas9）、Acidaminococcus属種（AsCpf1）、Lachnospiracase bacterium（LbCpf1）、Neisseria meningitidis（NmCas9）、Streptococcus thermophilus（StCas9）、Campylobacter jejuni（CjCas9）、強化SpCas9（eSpCas9）、SpCas9-HF1、FokI融合dCas9、増殖Cas9（xCas9）、および／または触媒不活性Cas9（dCas9）、に由来し得る。

【0046】

特定のCas9を使用すると、Cas9エンドヌクレアーゼ（または代替物）を使用して標的をスクリーニングするPAM配列を変えることができることが理解され、本明細書で企図される。本明細書で使用される場合、好適なPAM配列は、NGG（SpCas9 PAM）NNGRRT（SaCas9 PAM）NNNNGATT（NmCas9 PAM）、NNNNRYAC（CjCas9 PAM）、NNAGAAW（St）、TTTV（LbCpf1 PAMおよびAsCpf1 PAM）；TYCV（LbCpf1 PAMバ

10

20

30

40

50

リアントおよび A s C p f 1 P A M バリエーション) を含み、式中、N は、任意のヌクレオチドであり、V は、A、C または G であり、Y は、C または T であり、W は、A または T であり、R は、A または G である。

【0047】

一態様では、細胞を遺伝子改変する方法が本明細書に提供され、細胞の標的 DNA 配列に特異的な対応する C R I S P R / C a s ガイド RNA (gRNA) と複合体化したクラス 2 C R I S P R / C a s エンドヌクレアーゼ (C a s 9) を含むリボ核タンパク質 (RNP) 複合体、および導入遺伝子 (例えば、腫瘍抗原のキメラ抗原受容体など) を含むプラスミドを得ることであって、導入遺伝子は、相同アームと隣接している、得ることと、b) 細胞に、導入遺伝子および RNP 複合体を導入することと、を含み、導入遺伝子は、標的細胞へのアデノ随伴ウイルス (AAV) の感染を介して細胞に導入され、RNP 複合体は、細胞のゲノム DNA 内の標的配列にハイブリダイズする。一態様では、本方法は、エレクトロポレーション (NK 細胞を改変する場合などの) を介して、RNP 複合体を細胞に導入することをさらに含むことができる。一態様では、本方法は、標的細胞を、RNP 複合体を含む第 2 の AAV ウイルスで重感染させることをさらに含むことができる。導入遺伝子が十分に小さい一態様では、同じ AAV は、導入遺伝子および RNP 複合体の両方を含むことができる。なおさらなる態様では、導入遺伝子および RNP 複合体は、同じプラスミド上でコードされることができる。

【0048】

本開示の方法は、T 細胞、B 細胞、マクロファージ、NK 細胞、線維芽細胞、骨芽細胞、肝細胞、神経細胞、上皮細胞、および / または筋細胞ならびに任意の他の細胞型を含む任意の細胞型で利用できることが理解され、本明細書で企図される。ヒト NK 細胞は、開示されるプラスミドおよびそれらの使用方法のための特に優れた標的である。NK 細胞は、CD56 または CD16 の発現および T 細胞受容体 (CD3) の不在によって定義される末梢血リンパ球のサブセットである。NK 細胞は、主要組織適合複合体 (MHC) のクラス I 分子を欠く標的細胞を感知し、死滅させる。NK 細胞活性化受容体には、とりわけ、自然細胞毒性受容体 (NKp30、NKp44 および NKp46)、ならびにレクチン様受容体 NKG2D および DNAM-1 が含まれる。それらのリガンドは、ストレスを受けた細胞、形質転換した細胞、または感染した細胞で発現されるが、正常細胞では発現されないため、正常細胞は、NK 細胞殺傷に対して耐性となる。NK 細胞の活性化は、キラー免疫グロビン (Ig) 様受容体 (KIR)、NKG2A / CD94、TGFβ、および白血球 Ig 様受容体-1 (LIR-1) などの抑制性受容体を介して負に調節される。一態様では、標的細胞は、ドナー源 (例えば、養子移植療法のための同種ドナー源もしくは自己ドナー源 (すなわち、改変細胞の最終レシピエント)、NK 細胞株 (NK RPMI 8866、HFWT、K562、および EBV-LCL を含むが、これらに限定されない)、または初代 NK 細胞源もしくは NK 細胞株に由来する増殖 NK 細胞源からの初代 NK 細胞) であり得る。

【0049】

細胞 (例えば、T 細胞、B 細胞、マクロファージ、NK 細胞、線維芽細胞、骨芽細胞、肝細胞、神経細胞、上皮細胞、および / または筋細胞など) の形質導入の前に、細胞を、細胞の増殖に好適な培地中でインキュベートすることができる。培養条件は、サイトカイン、抗体、および / またはフィーダー細胞の添加を含み得ることが理解され、本明細書で企図される。したがって、一態様では、細胞 (例えば、T 細胞、B 細胞、マクロファージ、NK 細胞、線維芽細胞、骨芽細胞、肝細胞、神経細胞、上皮細胞、および / または筋細胞など) を遺伝子改変する方法であって、細胞の増殖を支持する培地中で細胞を形質導入する前に、細胞を 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、または 14 日間インキュベートすることをさらに含み、培地が、サイトカイン、抗体、および / またはフィーダー細胞をさらに含む、方法が、本明細書に開示される。例えば、培地は、IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、および / または IL-21 を含むことができる。一態様では、培地はまた、抗 CD3 抗体を含むことができる。一態様では、

フィーダー細胞は、細胞を刺激するフィーダー細胞から精製され得る。例えば、本明細書に開示される、請求項に記載の発明において使用するためのNK細胞刺激フィーダー細胞は、照射された自己もしくは同種末梢血単核細胞（P B M C）または照射されていない自己もしくはP B M C、R P M I 8 8 6 6、H F W T、K 5 6 2、膜結合型I L - 1 5および4 1 B B L、もしくはI L - 2 1、もしくはこれらの任意の組み合わせでトランスフェクトされたK 5 6 2細胞、あるいはE B V - L C L、のいずれかであり得る。一部の態様では、フィーダー細胞は、I L - 2 1、I L - 1 5、および／または4 1 B B Lの溶液と組み合わせて提供される。フィーダー細胞は、1：2、1：1、または2：1の比率で、細胞の培養に播種することができる。培養期間は、A A V感染後1～14日間（すなわち、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、または14日間）、好ましくは3～7日間、最も好ましくは4～6日間であり得ることが理解され、本明細書で企図される。

【0050】

初代細胞および増殖細胞（初代および増殖T細胞、NK細胞、またはB細胞を含むが、これに限定されない）のインキュベーション条件は、異なる場合があることを理解され、本明細書で企図される。一態様では、A A V感染前の初代NK細胞の培養は、培地、サイトカイン（例えば、I L - 2、I L - 1 2、I L - 1 5、I L - 1 8、および／またはI L - 2 1など）、および／または抗C D 3抗体を5日間未満（例えば、1、2、3、または4日間）含む。増殖NK細胞について、培養は、サイトカイン（例えば、I L - 2、I L - 1 2、I L - 1 5、I L - 1 8、および／またはI L - 2 1など）および／または抗C D 3抗体に加えて、またはそれに代えて、NKフィーダー細胞の存在下で（例えば、1：1の比率で）行われ得る。増殖NK細胞の培養は、形質導入前に1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10日間行うことができる。したがって、一態様では、細胞（例えば、T細胞、B細胞、マクロファージ、NK細胞、線維芽細胞、神経細胞、骨芽細胞、肝細胞、上皮細胞、および／または筋細胞など）を遺伝子改変する方法が、本明細書に開示され、A A Vベクターでの感染および／またはエレクトロポレーション（R N P複合体がエレクトロポレーションを介して導入されるとき）の前に、初代細胞を、I L - 2の存在下で4日間インキュベートすること、あるいはR N P複合体がエレクトロポレーションを介して導入されるときに、A A Vでの感染および／またはエレクトロポレーションの前に、増殖細胞を、照射されたフィーダー細胞の存在下で4、5、6、または7日間インキュベートすること、を含む。

【0051】

細胞（例えば、T細胞、B細胞、マクロファージ、NK細胞、線維芽細胞、骨芽細胞、肝細胞、神経細胞、上皮細胞、および／または筋細胞など）の形質導入（例えば、A A V感染またはエレクトロポレーションを介して）後、改変細胞は、ようやく、改変細胞（例えば、T細胞、B細胞、マクロファージ、NK細胞、線維芽細胞、骨芽細胞、肝細胞、神経細胞、上皮細胞、および／または筋細胞など）を刺激するフィーダー細胞を含む培地で増殖させることができる。したがって、改変細胞は、照射されたフィーダー細胞を使用して、A A V感染および／またはエレクトロポレーション（R N P複合体がエレクトロポレーションを介して導入されるとき）後に増殖することができるため、生存能および増殖可能性を保持する。例えば、本明細書に開示される、請求項に記載の発明において使用するためのNK細胞刺激フィーダー細胞は、照射された自己もしくは同種末梢血単核細胞（P B M C）または照射されていない自己もしくはP B M C、R P M I 8 8 6 6、H F W T、K 5 6 2、膜結合型I L - 1 5および4 1 B B L、もしくはI L - 2 1、もしくはこれらの任意の組み合わせでトランスフェクトされたK 5 6 2細胞、あるいはE B V - L C L、のいずれかであり得る。一部の態様では、NK細胞フィーダー細胞は、I L - 2 1、I L - 1 5、および／または4 1 B B Lの溶液と組み合わせて提供される。フィーダー細胞は、1：2、1：1、または2：1の比率で、NK細胞の培養に播種することができる。培養期間は、感染および／またはエレクトロポレーション後1～14日間（すなわち、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、または14日間）、好まし

10

20

30

40

50

くは3～7日間、最も好ましくは4～6日間であり得ることが理解され、本明細書で企図される。一部の態様では、改変NK細胞を培養するための培地は、例えば、IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、および／またはIL-21などのサイトカインをさらに含むことができる。

【0052】

一態様では、開示されたプラスミドを使用して、がんの治療に有用な細胞を改変することができることが理解され、本明細書で企図される。がん免疫療法は、近年進歩してきており、遺伝子改変キメラ抗原受容体(CAR)T細胞は、がん免疫療法で成功裏に展開された操作された免疫細胞の優れた例である。これらの細胞は、最近、CD19+B細胞悪性腫瘍に対する治療のためにFDAによって承認されたが、これまでのところ、成功は、少数の標的化可能な抗原を有する疾患に限定され、そのような限られた抗原レパートリーを標的にすることは、免疫逃避によって失敗しやすい。さらに、CAR T細胞は、同種異系T細胞によって引き起こされる移植片対宿主病のリスクのために、自己T細胞の使用に焦点が当てられてきた。対照的に、NK細胞は、抗原非依存的な様式で腫瘍標的を死滅させることができ、移植片対宿主病(GvHD)を引き起こさないため、がん免疫療法の優れた候補となる。開示される改変プラスミドおよび方法を使用して、T細胞および／またはNK細胞をがんに標的化するために、CAR T細胞およびCAR NK細胞を生成することができることが理解され、本明細書で企図される。

【0053】

本明細書で使用される場合、「キメラ抗原受容体」は、がん抗原を標的とし、受容体を発現する細胞を、標的抗原を発現するがん細胞にもたらすキメラ受容体を指す。典型的には、CARは、腫瘍抗原の天然リガンド、MHC分子によって提示される腫瘍抗原に由来するペプチドを認識する分子、またはがん抗原を標的とするCAR細胞の表面上に発現する抗体もしくはその断片(例えば、Fab'、scFv、Fvなど)を含む。受容体は、リンカーを介してシグナル伝達ドメイン(例えば、TおよびNKGD2CについてのCD3ζドメイン、NKP44、またはNK細胞についてのCD3ζドメインなど)に融合される。腫瘍抗原標的は、免疫応答、特にB細胞、NK細胞、およびT細胞媒介性免疫応答を誘発する腫瘍細胞によって産生されるタンパク質である。抗原結合ドメインの選択は、治療される特定の種類のがんに依存する。腫瘍抗原は、当該技術分野で既知であり、例えば、神経膠腫関連抗原、がん胎児性抗原(CEA)、EGFRvIII、IL-11Ra、IL-13Ra、EGFR、FAP、B7H3、Kit、CALX、CS-1、MUC1、BCMA、bcr-abl、HER2、β-ヒト絨毛性ゴナドトロピン、アルファフェトプロテイン(AFP)、ALK、CD19、CD123、サイクリンB1、レクチン反応性AFP、Fos関連抗原1、ADRB3、サイログロブリン、EphA2、RAGE-1、RUL、RU2、SSX2、AKAP-4、LCK、OY-TES1、PAX5、SART3、CLL-1、フコシルGM1、GloboH、MN-CAIX、EPCAM、EVT6-AML、TGS5、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、ポリシアル酸、PLAC1、RUL、RU2(AS)、腸管カルボキシルエステラーゼ、LewisY、sLe、LY6K、mut hsp70-2、M-CSF、MYCN、RhoC、TRP-2、CYP1B1、BORIS、プロスターゼ、前立腺特異抗原(PSA)、PAX3、PAP、NY-ESO-1、LAGE-la、LMP2、NCAM、p53、p53変異体、Ra変異体、gp100、プロステイン(prostein)、OR51E2、PANX3、PSMA、PSCA、Her2/neu、hTERT、HMWMAA、HAVCR1、VEGFR2、PDGFR-β、サバイビンおよびテロメラーゼ、レグマイン、HPV E6、E7、精子タンパク質17、SSEA-4、チロシナーゼ、TARP、WT1、前立腺癌腫瘍抗原-1(PCTA-1)、ML-IAP、MAGE、MAGE-A1、MAD-CT-1、MAD-CT-2、MelanA/MART1、XAGE1、ELF2M、ERG(TMPRSS2-ETS融合遺伝子)、NA17、好中球エラスターゼ、肉腫転座切断点、NY-BR-1、ephnnB2、CD20、CD22、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44v6、CD97、CD171、CD179a、アン

ドロゲン受容体、FAP、インスリン成長因子(IGF)-I、IGFII、IGF-I受容体、GD2、o-アセチル-GD2、GD3、GM3、GPRC5D、GPR20、CXORF61、葉酸受容体(FRa)、葉酸受容体 β 、ROR1、Flt3、TAG72、TN Ag、Tie 2、TEM1、TEM7R、CLDN6、TSHR、UPK2、ならびにメソセリンが挙げられる。腫瘍抗原の非限定的な例としては、以下の、分化抗原、例えばチロシナーゼ、TRP-1、TRP-2および腫瘍特異性多系統抗原、例えばMAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、pi 5；過剰発現胚抗原、例えばCEA；過剰発現がん遺伝子および変異腫瘍抑制遺伝子、例えばp53、Ra、HER-2/neu；染色体転座に起因する独自の腫瘍抗原；例えばBCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR；ならびにウイルス性抗原、例えばエプスタインバールウイルス抗原EBVAおよびヒト・パピローマウイルス(HPV)抗原E6およびE7が挙げられる。他の大きなタンパク質ベースの抗原としては、TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、RAGE、NY-ESO、pl85erbB2、pl80erbB-3、c-met、nm-23H1、PSA、IL13Ra2、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、Numa、K-ras、 β -カテニン、CDK4、Mum-1、p 15、p 16、43-9F、5T4、791Tgp72、 α -フェトプロテイン、 β -HCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3\CA 27.29\BCAA、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、CD68\p1、CO-029、FGF-5、G250、Ga733\EpCAM、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/70K、NY-CO-1、RCASL、SDCCAG16、TA-90\Mac-2結合タンパク質 γ シクロフィル化 C関連タンパク質、TAAL6、TAG72、TLP、TPS、GPC3、MUC16、LMP1、EBMA-1、BARF-1、CS1、CD319、HER1、B7H6、L1CAM、IL6、およびMETが挙げられる。

【0054】

一態様では、細胞を遺伝子改変する開示された方法の1つの目的は、改変細胞を産生することであることが理解され、本明細書において企図される。したがって、本開示の方法によって作製される改変T細胞、B細胞、マクロファージ、NK細胞、線維芽細胞、骨芽細胞、肝細胞、神経細胞、上皮細胞、および／または筋細胞が本明細書に開示される。

【0055】

本開示全体を通して指摘されるように、開示される改変NK細胞は、理想的には、改変(すなわち、操作された)NK細胞を、それ必要とする対象に養子移植するなどの免疫療法における使用に好適である。したがって、一態様では、操作された細胞を、それを必要とする対象に養子移植する方法が本明細書に開示され、当該方法は、a)改変される標的細胞(例えば、T細胞、B細胞、マクロファージ、NK細胞、線維芽細胞、骨芽細胞、肝細胞、神経細胞、上皮細胞、および／または筋細胞など)を得ることと、b)対応するCRISPR/CasガイドRNAと複合体化したクラス2 CRISPR/Casエンドヌクレアーゼ(Cas9)を含むリボ核タンパク質(RNP)複合体、および導入遺伝子(例えば、腫瘍抗原のキメラ抗原受容体など)を含むプラスミドを含むAAVベクターを得ることであって、導入遺伝子は、相同アームと隣接しており、相同アームは、長さが800bp未満である、得ることと、c)細胞に、導入遺伝子およびRNP複合体を導入することであって、導入遺伝子は、標的細胞へのアデノ随伴ウイルス(AAV)の感染を介して細胞に導入され、RNP複合体は、細胞のゲノムDNA内の標的配列にハイブリダイズし、細胞のDNA修復酵素は、導入遺伝子を、標的細胞のゲノムDNA内の標的配列で宿主ゲノムに挿入し(例えば、相同修復によって)、それによって、操作された細胞(例えば、T細胞、B細胞、マクロファージ、NK細胞、線維芽細胞、骨芽細胞、肝細胞、神経細胞、上皮細胞、および／または筋細胞など)を生成する、導入することと、d)操作された細胞(例えば、T細胞、B細胞、マクロファージ、NK細胞、線維芽細胞、骨芽細胞、肝細胞、神経細胞、上皮細胞、および／または筋細胞など)を対象に移植することと

、を含む。一態様では、導入遺伝子は、Cas9エンドヌクレアーゼと同じプラスミド上に含まれるか、または同じもしくは異なるAAVベクター内の第2のプラスミド上にコードされることができる。一態様では、標的細胞は、AAVを含む導入遺伝子による細胞の感染の前に、またはそれと同時に、エレクトロポレーションを介してRNP複合体で形質導入され得る。

【0056】

一態様では、非相同末端結合によって、細胞（初代細胞または増殖細胞を含むが、これらに限定されないT細胞、B細胞、マクロファージ、NK細胞、線維芽細胞、骨芽細胞、肝細胞、神経細胞、上皮細胞、および／または筋細胞）を遺伝子改変する方法が本明細書に開示され、a) 対応するCRISPR/CasガイドRNAと複合体化したクラス2 CRISPR/Casエンドヌクレアーゼ（Cas9）を含むリボ核タンパク質（RNP）複合体、および導入遺伝子（例えば、腫瘍抗原のキメラ抗原受容体など）を含むプラスミドを含むAAVベクターを得ることであって、導入遺伝子は、1つのPAMおよびcrRNAに隣接しているか、または2つのPAMおよびcrRNAと隣接している、得ることと、b) 細胞に、導入遺伝子およびRNP複合体を導入することと、を含み、導入遺伝子は、標的細胞へのアデノ随伴ウイルス（AAV）の感染を介して細胞に導入され、リボ核タンパク質（RNP）複体内で、細胞のゲノムDNA内の標的配列にハイブリダイズし、切断し、細胞のDNA修復酵素は、導入遺伝子を標的配列で宿主ゲノムに挿入し（例えば、非相同末端結合によって）、それによって、改変細胞を生成する。

【0057】

一態様では、本開示の免疫療法の方法で使用される改変細胞細胞（例えば、改変T細胞、B細胞、マクロファージ、NK細胞、線維芽細胞、骨芽細胞、肝細胞、神経細胞、上皮細胞、および／または筋細胞など）は、ドナー源（例えば、養子移植療法のための同種ドナー源もしくは自己ドナー源（すなわち、改変細胞の最終レシピエント）、細胞株（NK細胞株NK RPMI 8866、HFWT、K562、およびEBV-LCLを含むが、これらに限定されない）、または初代細胞源もしくは細胞株に由来する増殖細胞の供与源からの初代細胞であり得る。初代細胞を使用することができるため、細胞の開示される改変は、エクスピボまたはインビトロで生じることができることが理解され、本明細書で企図される。

【0058】

細胞細胞（例えば、T細胞、B細胞、マクロファージ、NK細胞、線維芽細胞、骨芽細胞、肝細胞、神経細胞、上皮細胞、および／または筋細胞など）の形質導入後、改変（すなわち、操作された）細胞を対象に投与する前に、改変細胞を増殖および刺激することができる。例えば、免疫細胞を、それを必要とする対象に養子移植する方法が本明細書に開示され、免疫細胞（例えば、T細胞、B細胞、マクロファージ、ナチュラルキラー（NK）細胞、NK T細胞、腫瘍浸潤リンパ球（TIM）、骨髓浸潤リンパ球（MIL）、腫瘍浸潤NK細胞（TINK）、線維芽細胞、骨芽細胞、肝細胞、神経細胞、上皮細胞、および／または筋細胞など）は、対象に投与する前に、照射されたフィーダー細胞、形質膜（PM）粒子、またはエクソソーム（EX）発現膜結合型IL-21（mbIL-21）（PM粒子およびEXエクソソーム発現mbIL-21は、本明細書ではそれぞれ、PM21粒子およびEX21エクソソームと称される）で増殖される。一部の態様では、増殖は、照射されたフィーダー細胞、形質膜（PM）粒子、もしくはエクソソーム発現膜結合型IL-15（mbIL-15）、および／または膜結合型4-1BBL（mb4-1BBL）をさらに含むことができる。一部の態様では、改変（すなわち、操作された）細胞の刺激および増殖は、対象への改変細胞の投与後または投与と同時に、インビボで生じ得ることが理解され、本明細書で企図される。したがって、IL-21もしくはmbIL-21を有するPM粒子、mbIL-21を有するエクソソーム、および／または照射されたmbIL-21発現フィーダー細胞の投与を介して対象に細胞を移植した後で、対象において細胞（例えば、T細胞、B細胞、マクロファージ、NK細胞、NK T細胞、TIM、MIL、TINK、線維芽細胞、骨芽細胞、肝細胞、神経細胞、上皮細胞、および

／または筋細胞など）を増殖させる免疫療法の方法が、本明細書に開示される。一部の態様では、増殖は、IL-15および／もしくは4-1BBもしくはPM粒子、エクソソーム、ならびに／または膜結合型IL-15および／もしくは4-1BBを発現する照射されたフィーダー細胞の投与をさらに含む。

【0059】

開示される改変細胞（例えば、T細胞、B細胞、マクロファージ、NK細胞、線維芽細胞、骨芽細胞、肝細胞、神経細胞、上皮細胞、および／または筋細胞など、ならびに本明細書に開示されるCAR NK細胞およびCAR T細胞を含むがこれらに限定されない）および改変細胞の養子移植の方法は、がんに対する効果的な免疫療法であり得ることが理解され、本明細書で企図される。本開示の方法および組成物を使用して、がんなどの未制御な細胞増殖が生じる任意の疾患を治療することができる。異なる種類のがん（cancers）の非限定的なリストは、以下のとおりである：リンパ腫（ホジキンおよび非ホジキン）、白血病、がん（carcinomas）、固形組織のがん、扁平上皮細胞癌、腺癌、肉腫、神経膠腫、高悪性度神経膠腫、芽細胞腫、神経芽細胞腫、形質細胞腫、組織球腫、黒色腫、腺腫、低酸素腫瘍、骨髄腫、AIDS関連リンパ腫もしくは肉腫、転移性がん、または一般的ながん。

【0060】

開示される組成物を使用して治療することができる代表的であるが、非限定的ながんのリストは、以下のとおりである：リンパ腫、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、菌状息肉症、ホジキン病、骨髄性白血病、膀胱癌、脳癌、神経系癌、頭頸部癌（head and neck cancer）、頭頸部の扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌および非小細胞肺癌などの肺癌（lung cancers）、神経芽細胞腫／神経膠芽腫、卵巣癌、皮膚癌、肝臓癌、黒色腫、口、咽頭、喉頭、および肺の扁平上皮細胞癌、子宮頸癌（cervical cancer）、子宮頸癌（cervical carcinoma）、乳癌、ならびに上皮癌、腎臓癌、泌尿生殖器癌、肺癌（pulmonary cancer）、食道癌、頭頸部癌（head and neck carcinoma）、大腸癌、造血癌、精巣癌、結腸癌、直腸癌、前立腺癌、または膵臓癌。

【0061】

「治療する（treat）」、「治療すること（treating）」、「治療（treatment）」、およびそれらの文法的変形は、本明細書で使用される場合、1つ以上の疾患または状態の強度または頻度、疾患または状態の症状、あるいは疾患または状態の根本的な原因を、部分的または完全に予防、遅延、治療、快癒、緩和、軽減（relieving）、変更、治療（remedying）、改善（ameliorating）、改善（improving）、安定化、軽減（mitigating）、および／または低減することを、意図または目的とする組成物の投与が含まれる。本発明による治療は、防止的、予防的、姑息的、または治療的に適用され得る。予防的治療は、発症前（例えば、がんの明らかな兆候の前）、早期発症中（例えば、がんの初期の兆候および症状時）、または確立されたがんの発達後に対象に投与される。予防的投与は、感染症の症状の発現の1日（数日）から数年前に行われ得る。

【0062】

1. ハイブリダイゼーション／選択的ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションという用語は、典型的には、プライマーまたはプローブと遺伝子などの、少なくとも2つの核酸分子間の、配列駆動性の相互作用を意味する。配列駆動性の相互作用とは、2つのヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体もしくはヌクレオチド誘導体間で、ヌクレオチド特異的な様式で生じる相互作用を意味する。例えば、Cと相互作用するG、またはTと相互作用するAは、配列駆動性の相互作用である。典型的には、配列駆動性の相互作用は、ヌクレオチドのワトソン-クリック面またはフーグスティーン面上で生じる。2つの核酸のハイブリダイゼーションは、当業者に既知のいくつかの条件およびパラメータによって影響される。例えば、反応の塩濃度、pH、および温度はすべて、2つの核酸分子がハイブリダイズするかどうかに影響する。

10

20

30

40

50

【0063】

2つの核酸分子間の選択的ハイブリダイゼーションのパラメータは、当業者に既知である。例えば、一部の実施形態では、選択的ハイブリダイゼーションの条件は、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件として定義することができる。例えば、ハイブリダイゼーションのストリンジエンスは、ハイブリダイゼーションおよび洗浄ステップのいずれかまたは両方の温度および塩濃度の両方によって制御される。例えば、選択的ハイブリダイゼーションを達成するためのハイブリダイゼーションの条件は、 T_m （分子の半分がそれらのハイブリダイゼーションパートナーから解離する融解温度）より約12〜25℃低い温度での高イオン強度溶液（6X SSCまたは6X SPE）中のハイブリダイゼーション、続いて、洗浄温度が T_m より約5℃〜20℃低いように選択される温度および塩濃度の組み合わせでの洗浄、を伴い得る。フィルタ上に固定化された参照DNAの試料を目的の標識核酸にハイブリダイズし、次いで異なるストリンジエンスの条件下で洗浄する予備実験において、温度および塩条件を容易に経験的に決定する。ハイブリダイゼーション温度は、典型的には、DNA-RNAおよびRNA-RNAハイブリダイゼーションに関してより高い。上述のように、または当該技術分野で知られているように、これらの条件を使用して、ストリンジエンスを達成することができる。DNA:DNAハイブリダイゼーションの好ましいストリンジエントなハイブリダイゼーション条件は、6X SSCまたは6X SPE中で約68℃（水溶液中）で、続いて68℃で洗浄することができる。所望により、ハイブリダイゼーションおよび洗浄のストリンジエンスは、所望の相補性の程度が減少するにつれて、さらに、可変性が検索される任意の領域のG-CまたはA-T豊富さに応じて、低減させることができる。所望により、ハイブリダイゼーションおよび洗浄のストリンジエンスは、所望の相補性の程度が増加するにつれて、さらに、すべて当該技術分野で知られているように高い相補性が望まれる任意の領域のG-CまたはA-T豊富さに応じて、増加させることができる。

【0064】

選択的ハイブリダイゼーションを定義する別の方法は、他方の核酸に結合した核酸の一方の量（パーセンテージ）を見ることによるものである。例えば、一部の実施形態では、選択的ハイブリダイゼーション条件は、少なくとも約60、65、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%の制限核酸が非制限核酸に結合されるときである。典型的には、非制限プライマーは、例えば、10または100または1000倍過剰である。この種類のアッセイは、制限プライマーおよび非制限プライマーの両方が、例えば、それらの k_d の10倍もしくは100倍もしくは1000倍未満であるか、または核酸分子のうちの1つのみが10倍もしくは100倍もしくは1000倍であるか、または片方もしくは両方の核酸分子がそれらの k_d を上回る条件下で実施することができる。

【0065】

選択的ハイブリダイゼーションを定義する別の方法は、ハイブリダイゼーションが所望の酵素マニピュレーションを促進するために必要とされる条件下で、酵素的にマニピュレートされるプライマーのパーセンテージを調べることによるものである。例えば、一部の実施形態では、選択的ハイブリダイゼーションの条件は、少なくとも約60、65、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%のプライマーが酵素マニピュレーションを促進する条件下で酵素的にマニピュレートされるときであり、例えば、酵マニピュレーションがDNA伸長であれば、選択的ハイブリダイゼーションの条件は、少なくとも約60、65、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%のプライマー分子が伸長されるときである。また、好ましい条件には、製造業者によって示唆される条件、またはマニピュレーションを実施する酵素に適切な

当該技術分野で示された条件、も含まれる。

【0066】

正に相同性と同様に、2つの核酸分子間のハイブリダイゼーションのレベルを決定するための様々な方法が、本明細書に開示されていることが理解される。これらの方法および条件は、2つの核酸分子間のハイブリダイゼーションの異なるパーセンテージを提供し得ることが理解されるものの、特に指示しない限り、いずれかの方法のパラメータを満たすことは十分であろう。例えば、80%のハイブリダイゼーションが必要であった場合、これらの方法のいずれか1つで必要なパラメータ内で、ハイブリダイゼーションが生じる限り、本明細書に開示されているものとみなされる。

【0067】

当業者であれば、組成物または方法が、いずれか集合的にまたは個別に、ハイブリダイゼーションを決定するためのこれらの基準のいずれか1つを満たす場合、それが、本明細書に開示された組成物または方法であることを理解するであろう。

【0068】

2. 核酸

核酸に基づく本明細書に開示される様々な分子が存在し、例えば、核酸（例えば、TGFβR2をコードする核酸、またはTGFβR2ノックアウトを作製するための本明細書に開示される核酸のいずれか）、またはその断片、ならびに様々な機能性核酸が含まれる。開示される核酸は、例えば、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、またはヌクレオチド代替物から構成される。これらおよび他の分子の非限定的な例が、本明細書で論じられる。例えば、ベクターが細胞内で発現される場合、発現したmRNAは典型的にはA、C、G、およびUから構成されることが理解される。同様に、例えば、アンチセンス分子が、例えば外因性送達を通して細胞または細胞環境に導入される場合、アンチセンス分子が、細胞環境中のアンチセンス分子の分解を低減するヌクレオチド類似体から構成されることが有利であることが理解される。

【0069】

a) ヌクレオチドおよび関連分子

ヌクレオチドは、塩基部分、糖部分、およびリン酸部分を含有する分子である。ヌクレオチドは、それらのリン酸部分および糖部分を通して、一緒に連結され、ヌクレオチド間結合を生成することができる。ヌクレオチドの塩基部分は、アデニン-9-イル(A)、シトシン-1-イル(C)、グアニン-9-イル(G)、ウラシル-1-イル(U)、およびチミン-1-イル(T)であり得る。ヌクレオチドの糖部分は、リボースまたはデオキシリボースである。ヌクレオチドのリン酸部分は、五価リン酸である。ヌクレオチドの非限定的な例は、3'-AMP(3'-アデノシン-リン酸)または5'-GMP(5'-グアノシン-リン酸)であろう。当該技術分野で入手可能であり、本明細書で入手可能である、多種多様なこれらの種類の分子が存在する。

【0070】

ヌクレオチド類似体は、塩基、糖、またはリン酸部分のいずれかに、何らかの種類の改変を含有するヌクレオチドである。ヌクレオチドに対する改変は、当該技術分野で既知であり、例えば、5-メチルシトシン(5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、および2-アミノアデニン、ならびに糖またはリン酸部分における改変を含むであろう。当該技術分野で入手可能であり、本明細書で入手可能である、多種多様なこれらの種類の分子が存在する。

【0071】

ヌクレオチド代替物は、ヌクレオチドと同様の機能特性を有するが、ペプチド核酸(PNA)などのリン酸部分を含有しない分子である。ヌクレオチド代替物は、ワトソン-クリックまたはフーグスティーン様式で核酸を認識するが、リン酸部分以外の部分を通して一緒に連結される分子である。ヌクレオチド代替物は、適切な標的核酸と相互作用するときに、二重らせん型構造に適合することができる。当該技術分野で入手可能であり、本明細書で入手可能である、多種多様なこれらの種類の分子が存在する。

【0072】

他の種類の分子（複合体）をヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体に連結して、例えば、細胞取り込みを増強することも可能である。複合体は、ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体に化学的に連結され得る。そのような複合体としては、限定されないが、脂質部分、例えば、コレステロール部分が挙げられる（*Letsinger et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, 6553-6556）。当該技術分野で入手可能であり、本明細書で入手可能である、多種多様なこれらの種類の分子が存在する。

【0073】

ワトソン-クリック相互作用は、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、またはヌクレオチド代替物のワトソン-クリック面との少なくとも1つの相互作用である。ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、またはヌクレオチド代替物のワトソン-クリック面は、プリン系のヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、またはヌクレオチド代替物のC2、N1、およびC6位、ならびにピリミジン系のヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、またはヌクレオチド代替物のC2、N3、C4位を含む。

【0074】

フーグスティーン相互作用は、二重鎖DNAの主溝に曝されるヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体のフーグスティーン面上で起こる相互作用である。フーグスティーン面は、プリンヌクレオチドのN7位およびC6位の反応性基（NH₂またはO）を含む。

【0075】

b) 配列

本明細書に開示されるシグナル伝達経路に関与するタンパク質分子、例えば、TGFβR2、に関連する様々な配列が存在し、これらのすべては、核酸によってコードされるか、または核酸である。これらの遺伝子のヒト類似体、ならびに他の類似体、およびこれらの遺伝子のアレル、ならびにスプライスバリエーションおよび他の種類のバリエーションの配列は、Genbankを含む様々なタンパク質および遺伝子データベースで入手可能である。当業者は、配列の不一致および相違を解析する方法、ならびに特定の配列に関連する組成物および方法を、他の関連配列に調整する方法を理解している。プライマーおよび／またはプローブは、本明細書に開示され当該技術分野で既知の情報を与える任意の所与の配列について設計され得る。

【0076】

c) プライマーおよびプローブ

本明細書に開示されるTGFβR2および／またはHPR1などの開示される核酸と相互作用し得るプライマーおよびプローブを含む組成物が開示される。特定の実施形態では、プライマーを使用して、DNA増幅反応を支持する。典型的には、プライマーは、配列特異的な様式で伸長され得るであろう。配列特異的な様式でのプライマーの伸長は、プライマーがハイブリダイズするもしくは別途会合する核酸分子の配列および／または組成物が、プライマーの伸長によって産生される産物の組成物もしくは配列を誘導または影響する任意の方法を含む。したがって、配列特異的な様式でのプライマーの伸長には、PCR、DNA配列決定、DNA伸長、DNA重合、RNA転写、または逆転写が含まれるが、これらに限定されない。配列特異的な様式でプライマーを増幅する技術および条件が好ましい。特定の実施形態では、プライマーは、PCRまたは直接配列決定などのDNA増幅反応に使用される。特定の実施形態では、プライマーはまた、非酵素技術を使用して伸長することができ、例えば、プライマーを伸長するために使用されるヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、それらが化学反応して配列特異的な様式でプライマーを伸長するように改変されることを理解されたい。典型的には、開示されるプライマーは、開示される核酸もしくは核酸の領域にハイブリダイズするか、またはそれらは、核酸の相補体もしくは核酸の領域の相補体とハイブリダイズする。

【0077】

特定の実施形態では、核酸と相互作用するためのプライマーもしくはプローブのサイズ

10

20

30

40

50

は、DNA増幅、またはプローブもしくはプライマーの単なるハイブリダイゼーションなどのプライマーの所望の酵素マニピュレーションを支持する任意のサイズであり得る。典型的なプライマーまたはプローブは、少なくとも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、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1250、1500、1750、2000、2250、2500、2750、3000、3500、または4000ヌクレオチド長である。

【0078】

他の実施形態では、プライマーまたはプローブは、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、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1250、1500、1750、2000、2250、2500、2750、3000、3500、または4000ヌクレオチド長以下であり得る。

【0079】

TGF β R2およびHPRT1遺伝子のプライマーは、典型的には、TGF β R2およびHPRT1遺伝子の領域または完全な遺伝子を含む増幅DNA産物を産生するために使用される。一般に、典型的には、この産物のサイズは、サイズが3ヌクレオチド以内、または2ヌクレオチド以内、または1ヌクレオチド以内に正確に決定され得るようになる。

【0080】

特定の実施形態では、この産物は、少なくとも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、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1250、1500、1750、2000、2250、2500、2750、3000、3500、または4000ヌクレオチド長である。

【0081】

他の実施形態では、産物は、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、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1250、1500、1750、2000、2250、2500、2750、3000、3500、または4000ヌクレオチド長以下である。

【0082】

3. 組成物の細胞への送達

インビトロまたはインビボのいずれかで、核酸を細胞に送達するために使用することができるいくつかの組成物および方法が存在する。これらの方法および組成物は、ウイルスベースの送達系および非ウイルスベースの送達系の2つのクラスに大別することができる。例えば、核酸は、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウム沈殿、プラスミド、ウイルスベクター、ウイルス核酸、ファージ核酸、ファージ、コスミドなどのいくつかの直接送達系を介して、またはカチオン性リポソームなどの細胞もしくは担体中の遺伝物質の移動を介して送達することができる。ウイルスベクター、化学的トランスフェクタント、またはエレクトロポレーションおよびDNAの直接拡散などの物理的機械的方法を含む、トランスフェクションのための適切な手段は、例えば、Wolff, J. A., et al., Science, 247, 1465-1468, (1990)、およびWolff, J. A. Nature, 352, 815-818, (1991)によって記載されている。かかる方法は、当該技術分野で周知であり、本明細書に記載の組成物および方法とともに使用するために容易に適応可能である。特定の場合では、本方法は、大きなDNA分子で特異的に機能するように改変されるであろう。さらに、これらの方法を使用して、担体の標的化特性を使用することによって、特定の疾患および細胞集団を標的化することができる。

【0083】

a) 核酸ベースの送達系

導入ベクターは、遺伝子を細胞内に送達するために使用されるか（例えば、プラスミド）、または遺伝子を送達するための一般的な戦略の一部として、例えば、組換えレトロウイルスまたはアデノウイルスの一部として使用される任意のヌクレオチド構築物であり得る (Ram et al. Cancer Res. 53:83-88, (1993))。

【0084】

本明細書で使用される場合、プラスミドまたはウイルスベクターは、分解せずに開示される核酸を細胞内に輸送し、それが送達される細胞内で遺伝子の発現をもたらすプロモーターを含む薬剤である。ウイルスベクターは、例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクチニアウイルス、ポリオウイルス、AIDSウイルス、ニューロン栄養ウイルス、シンドビス、およびHIV骨格を有するこれらのウイルスを含む他のRNAウイルスである。好ましくは、これらのウイルスの特性を共有する任意のウイルスファミリーであって、ベクターとしての使用に適しているウイルスファミリーでもある。レトロウイルスとしては、マウスマロニー白血病ウイルス、MMLV、およびMMLVの所望の特性をベクターとして発現するレトロウイルスが挙げられる。レトロウイルスベクターは、他のウイルスベクターよりも大きな遺伝子ペイロード、すなわち、導入遺伝子またはマーカー遺伝子を担持することができ、このために、一般的に使用されるベクターである。しかしながら、これらは、非増殖細胞において有用ではない。アデノウイルスベクターは、比較的安定であり、取り扱いが容易であり、高い力価を有し、エアロゾル製剤で送達され、非分裂細胞をトランスフェクトすることができる。ポックスウイルスベクターは大きく、遺伝子を挿入するためのいくつかの部位を有し、熱安定性があり、室温で保存することができる。好ましい実施形態は、ウイルス抗原によって誘発される宿主生物の免疫応答を抑制するように操作されたウイルスベクターである。この種類の好ましいベクターは、インターロイキン8または10のコード領域を担持する。

【0085】

ウイルスベクターは、細胞に遺伝子を導入するための化学的または物理的方法よりも高いトランザクション（遺伝子導入能力）能力を有することができる。典型的には、ウイルスベクターは、非構造的な初期遺伝子、構造的な後期遺伝子、RNAポリメラーゼIII転写産物、複製およびキャプシド形成に必要な逆位末端反復、ならびにウイルスゲノムの転写および複製を制御するプロモーターを含有する。ベクターとして操作される場合、ウイルスは、典型的には、初期遺伝子のうちの1つ以上を除去し、除去されたウイルスDNAの代わりに、遺伝子または遺伝子／プロモーターカセットをウイルスゲノムに挿入する。この種類の構築物は、最大約8 kbの外來遺伝物質を担持することができる。除去された初期遺伝子の必要な機能は、典型的には、初期遺伝子の遺伝子産物をトランスで発現するように操作された細胞株によって供給される。

10

【0086】

(1) アデノ随伴ウイルスベクター

別の種類のウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス(AAV)に基づく。この欠陥のあるパルボウイルスは、多くの細胞型に感染する可能性があり、ヒトに対して非病原性であるため、好ましいベクターである。AAV型ベクターは、約4～5 kbを輸送することができ、野生型AAVは、19番染色体に安定的に挿入することが知られている（例えば、AAV組み込み部位1(AAVS1)など）。この部位特異的組み込み特性を含有するベクターが好ましい。使用されるAAVは、AAC1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、および例えば、AAV-Rh74などの組換え(rAAV)、および／または合成AAV（例えば、AAV-DJ、Anc80など）を含むが、これらに限定されない任意のAAV血清型に由来し得る。AAV血清型は、細胞または組織トロピズムに基づいて選択することができる。開示される組成物および方法において使用するためのAAVベクターは、一本鎖(SS)または自己相補的(SC)であり得る。

20

【0087】

別の種類のAAVウイルスでは、AAVは、異種遺伝子に作用可能に連結された細胞特異的発現を指示するプロモーターを含有する少なくとも1つのカセットに隣接する、一対の逆位末端反復(ITR)を含有する。この文脈において異種とは、AAVまたはB19パルボウイルスに対して天然ではない任意のヌクレオチド配列または遺伝子を指す。

30

【0088】

典型的には、AAVおよびB19コード領域が欠失され、安全な無細胞毒性ベクターが得られている。AAV ITR、またはその改変は、感染性および部位特異的組み込みを付与するが、細胞毒性は付与せず、プロモーターは、細胞特異的発現を指示する。

【0089】

したがって、開示されるベクターは、実質的な毒性なしに哺乳動物染色体に組み込むことができるDNA分子を提供する。

【0090】

ウイルスおよびレトロウイルスにおける挿入遺伝子は、通常、所望の遺伝子産物の発現を制御するのに役立つプロモーター、および／またはエンハンサーを含有する。プロモーターは、一般に、転写開始部位に関して相対的に固定された位置にあるときに機能するDNAの配列（複数可）である。プロモーターは、RNAポリメラーゼおよび転写因子の基本的な相互作用に必要なコア要素を含有し、上流要素および応答要素を含有し得る。

40

【0091】

AAVのパッケージング容量が制限されることが理解され、本明細書で企図される。AAVベクターの負荷容量を克服する1つの方法は、2つのベクターの使用を通じてであり、導入遺伝子は、2つのプラスミド間で分割され、3'スプライスドナーおよび5'スプライスアクセプターは、導入遺伝子の2つの切片を単一の全長導入遺伝子に連結するために使用される。あるいは、2つの導入遺伝子は、実質的な重複で作製することができ、相同組換えは、2つのセグメントを全長転写産物に結合する。

50

【0092】

4. 発現系

細胞に送達される核酸は、典型的には、発現制御系を含有する。例えば、ウイルスおよびレトロウイルス系における挿入遺伝子は、通常、所望の遺伝子産物の発現を制御するのに役立つプロモーター、および／またはエンハンサーを含有する。プロモーターは、一般に、転写開始部位に関して相対的に固定された位置にあるときに機能するDNAの配列である。プロモーターは、RNAポリメラーゼおよび転写因子の基本的な相互作用に必要なコア要素を含有し、上流要素および応答要素を含有し得る。

【0093】

a) ウイルスプロモーターおよびエンハンサー

哺乳動物宿主細胞内のベクターからの転写を制御する好ましいプロモーターは、様々な供給源、例えば、ポリオーマ、シミアンウイルス40 (SV40)、アデノウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、および最も好ましくはサイトメガロウイルスなどのウイルスのゲノムから、または異種哺乳動物プロモーター、例えば、βアクチンプロモーターから得ることができる。SV40ウイルスの初期および後期プロモーターは、SV40ウイルス複製起点も含有するSV40制限断片として好都合に得られる (Fiers et al., Nature, 273:113 (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-E制限断片として好都合に得られる (Greenway, P. J. et al., Gene 18:355-360 (1982))。もちろん、宿主細胞または関連種由来のプロモーターも、本明細書で有用である。

【0094】

エンハンサーは、一般に、転写開始部位から一定距離になくても機能し、転写単位に対して5'側 (Laimins, L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 78:993 (1981)) または3'側 (Lusky, M. L., et al., Mol. Cell Biol. 3:1108 (1983)) のいずれかであり得るDNAの配列を指す。さらに、エンハンサーは、イントロン内 (Banerji, J. L. et al., Cell 33:729 (1983))、およびコード配列自体内 (Osborne, T. F., et al., Mol. Cell Biol. 4:1293 (1984)) にあってもよい。これらは、通常、10~300bpの長さで、シスで機能する。エンハンサーは、近くのプロモーターからの転写を増加させるように機能する。エンハンサーはまた、しばしば、転写の調節を媒介する応答要素を含有する。プロモーターは、転写の調節を媒介する応答要素も含有し得る。エンハンサーは、しばしば、遺伝子の発現の調節を決定する。多くのエンハンサー配列は、現在、哺乳動物遺伝子 (グロビン、エラスターゼ、アルブミン、フェトプロテイン、およびインスリン) から既知であるが、典型的には、一般的な発現用に真核生物細胞のウイルス由来のエンハンサーを使用する。好ましい例は、複製起点の後期側のSV40エンハンサー (100~270bp)、サイトメガロウイルスの初期プロモーターのエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマのエンハンサー、およびアデノウイルスのエンハンサーである。

【0095】

プロモーターおよび／またはエンハンサーは、それらの機能を引き起こす光または特定の化学的事象のいずれかによって特異的に活性化され得る。系は、テトラサイクリンおよびデキサメタゾンなどの試薬によって、調節することができる。また、ガンマ線照射などの照射への曝露、またはアルキル化の化学療法薬によって、ウイルスベクターの遺伝子発現を増強する方法も存在する。

【0096】

特定の実施形態では、プロモーターおよび／またはエンハンサー領域は、転写される転写単位の領域の発現を最大化するための構成的プロモーターおよび／またはエンハンサーとして作用することができる。特定の構築物では、プロモーターおよび／またはエンハンサー領域は、特定の時間に特定の種類の細胞でのみ発現する場合であっても、すべての真核生物の細胞型において活性である。この種類の好ましいプロモーターは、CMVプロモ

ーター（650塩基）である。他の好ましいプロモーターは、SV40プロモーター、サイトメガロウイルス（全長プロモーター）、およびレトロウイルスベクターのLTRである。

【0097】

すべての特定の調節要素は、クローニングされ、黒色腫細胞などの特定の細胞型において選択的に発現される発現ベクターを構築するために使用され得ることが示されてきた。グリア線維酢酸タンパク質（GFAP）プロモーターは、グリア起源の細胞で、遺伝子を選択的に発現するために使用されてきた。

【0098】

また、真核生物宿主細胞（酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、または有核細胞）で使用される発現ベクターは、mRNAの発現に影響を及ぼし得る転写の終結に必要な配列を含有してもよい。これらの領域は、組織因子タンパク質をコードするmRNAの非翻訳部分において、ポリアデニル化セグメントとして転写される。3'非翻訳領域には、転写終結部位も含まれる。転写単位は、ポリアデニル化領域も含有することが好ましい。この領域の利点の1つは、転写単位が、mRNAのようにプロセッシングおよび輸送される可能性を増加させることである。発現構築物におけるポリアデニル化シグナルの同定および使用は、十分に確立されている。相同的なポリアデニル化シグナルが、導入遺伝子構築物に使用されることが好ましい。特定の転写単位において、ポリアデニル化領域は、SV40初期ポリアデニル化シグナルに由来し、約400塩基からなる。また、転写単位は、単独で、または上記配列と組み合わせて、構築物からの発現または安定性を改善する、他の標準的な配列を含有することも好ましい。

【0099】

b) マーカー

ウイルスベクターは、マーカー産物をコードする核酸配列を含むことができる。このマーカー産物を使用して、遺伝子が細胞に送達され、送達されると発現されているかどうかを決定する。好ましいマーカー遺伝子は、β-ガラクトシダーゼをコードするE. coli lacZ遺伝子、および緑色蛍光タンパク質である。

【0100】

一部の実施形態では、マーカーは、選択可能なマーカーであってもよい。哺乳動物細胞に好適な選択可能なマーカーの例は、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）、チミジンキナーゼ、ネオマイシン、ネオマイシン類似体G418、ヒドロマイシン、およびピューロマイシンである。このような選択可能なマーカーが哺乳動物宿主細胞に成功裏に移行されると、形質転換された哺乳動物宿主細胞は、選択圧下に置かれた場合、生存することができる。選択的レジームには、広く使用される2つの異なるカテゴリが存在する。第1のカテゴリは、細胞の代謝、および補充培地から独立して成長する能力を欠く変異細胞株の使用、に基づく。2つの例としては、CHO DHFR細胞およびマウスLTK細胞、がある。これらの細胞は、チミジンまたはヒポキサンチンなどの栄養素を添加せずに成長する能力を欠いている。これらの細胞は、完全なヌクレオチド合成経路に必要な特定の遺伝子を欠いているため、欠損したヌクレオチドが補充培地に提供されない限り、生存することはできない。培地を補充する代替手段は、それぞれの遺伝子を欠く細胞に、無傷のDHFRまたはTK遺伝子を導入することで、それらの成長要件を変化させることである。DHFRまたはTK遺伝子で形質転換されなかった個々の細胞は、非補充培地において生存することができないであろう。

【0101】

第2のカテゴリは、任意の細胞型で使用される選択スキームを指し、変異細胞株の使用を必要としない優性選択である。これらのスキームは、典型的には、宿主細胞の成長を停止するために薬物を使用する。新規遺伝子を有するそれらの細胞は、薬剤耐性を伝達するタンパク質を発現し、選択で生き残るであろう。このような優性選択の例としては、薬物のネオマイシン（Southern P. and Berg, P., J. Molec. Appl. Genet. 1:327 (1982)）、ミコフェノール酸（Mulligan,

10

20

30

40

50

R. C. and Berg, P. Science 209:1422 (1980))、またはハイグロマイシン (Sugden, B. et al., Mol. Cell. Biol. 5:410-413 (1985)) を使用する。3つの実施例は、真核細胞の制御下の細菌遺伝子を用いて、それぞれ適切な薬物 G 4 1 8 またはネオマイシン (ジェネティシン)、x g p t (ミコフェノール酸) またはハイグロマイシン、への耐性を伝達する。他には、ネオマイシン類似体 G 4 1 8 およびピュラマイシンが含まれる。

【0102】

5. ペプチド

a) タンパク質バリエーション

タンパク質バリエーションおよび誘導体は、当業者によく理解され、アミノ酸配列改変を含むことができる。例えば、アミノ酸配列改変は、典型的には、置換、挿入、または欠失バリエーションの3つのクラスのうちの1つ以上に分類される。挿入には、アミノ末端および／またはカルボキシル末端の融合、ならびに単一もしくは複数のアミノ酸残基の配列内挿入が含まれる。挿入は、通常、例えば、1～4個の残基程度で、アミノ末端またはカルボキシル末端の融合の挿入よりは小さいであろう。実施例に記載されるものなどの免疫原性融合タンパク質の誘導体は、インビトロで架橋することによって、またはその融合体をコードするDNAで形質転換された組換え細胞培養物によって、標的配列に免疫原性を付与するのに十分な大きさのポリペプチドを融合することによって作製される。欠失は、タンパク質の配列から、1個以上のアミノ酸残基を除去することを特徴とする。典型的には、約2～6個以下の残基が、タンパク質分子内の任意の1つの部位で欠失される。これらのバリエーションは、通常、タンパク質をコードするDNA内のヌクレオチドの部位特異的変異誘発によって調製され、それによって、バリエーションをコードするDNAを産生し、その後、組換え細胞培養物中でDNAを発現する。既知の配列を有するDNA中の所定の部位で置換変異を作製するための技術、例えば、M13プライマー変異誘発およびPCR変異誘発がよく知られている。アミノ酸置換は、典型的には、単一残基のものであるが、一度にいくつかの異なる場所で生じ得、挿入は、通常、約1～10個のアミノ酸残基程度であり、欠失は約1～30個の残基の範囲である。欠失または挿入は、好ましくは、隣接する対、すなわち、2個の残基の欠失または2個の残基の挿入で行われる。置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせ、を組み合わせ、最終構築物に到達することができる。変異は、配列をリーディングフレームから外れさせてはならず、好ましくは、二次mRNA構造を産生し得る相補的領域を生成しない。置換バリエーションは、少なくとも1個の残基が除去され、その位置に、異なる残基が挿入されているバリエーションである。このような置換は、概して、以下の表2および3に従って行われ、保存的置換と称される。

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2 : アミノ酸の略称		
アミノ酸	略称	
アラニン	A l a	A
アロソロイシン	A l l e	
アルギニン	A r g	R
アスパラギン	A s n	N
アスパラギン酸	A s p	D
システイン	C y s	C
グルタミン酸	G l u	E
グルタミン	G l n	Q
グリシン	G l y	G
ヒスチジン	H i s	H
イソレルシン	I l e	I
ロイシン	L e u	L
リジン	L y s	K
フェニルアラニン	P h e	F
プロリン	P r o	P
ピログルタミン酸	p G l u	
セリン	S e r	S
スレオニン	T h r	T
チロシン	T y r	Y
トリプトファン	T r p	W
バリン	V a l	V

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3：アミノ酸置換

元の残基の例示的な保存的置換、他は当該技術分野で既知である。

A l a	S e r
A r g	L y s ; G l n
A s n	G l n ; H i s
A s p	G l u
C y s	S e r
G l n	A s n、L y s
G l u	A s p
G l y	P r o
H i s	A s n ; G l n
I l e	L e u ; V a l
L e u	I l e ; V a l
L y s	A r g ; G l n
M e t	L e u ; I l e
P h e	M e t ; L e u ; T y r
S e r	T h r
T h r	S e r
T r p	T y r
T y r	T r p ; P h e
V a l	I l e ; L e u

10

20

30

【0103】

機能または免疫学的同一性の実質的な変化は、表 3 のものよりも保存性が低い置換を選択することによって、すなわち、(a) 例えば、シートもしくはヘリックスの立体構造としての置換エリアにおけるポリペプチド骨格の構造、(b) 標的部位における分子の電荷もしくは疎水性、または (c) 側鎖のかさ、を維持することに対するそれらの効果が著しく異なる残基、を選択することによって行われる。一般に、タンパク質特性において最大の変化をもたらすことが予想される置換は、(a) 親水性残基、例えば、セリルまたはスレオニルが、疎水性残基、例えば、ロイシル、イソロイシル、フェニルアラニル、バリル、またはアラニルに（またはそれによって）置換され、(b) システインまたはプロリンが、任意の他の残基に（またはそれによって）置換され、(c) 電気陽性側鎖、例えば、リシル、アルギニル、またはヒスチジルを有する残基が、電気陰性残基、例えば、グルタミンまたはアスパルチルに（またはそれによって）置換されるか、あるいは (d) かさばった側鎖、例えば、フェニルアラニンに有する残基が、側鎖を有しない残基、例えば、グリシンに（またはそれによって）置換され、この場合、(e) 硫酸化および／またはグリコシル化の部位の数を増加させることによって置換される、置換であろう。

40

【0104】

例えば、あるアミノ酸残基を、生物学的および／または化学的に類似する別のアミノ酸残基に置き換えることは、保存的置換として当業者には既知である。例えば、保存的置換は、ある疎水性残基を別の疎水性残基に置き換えること、またはある極性残基を別の極性残基に置き換えることである。置換は、例えば、G l y、A l a、V a l、I l e、L e

50

u、Asp、Glu、Asn、Gln、Ser、Thr、Lys、Arg、およびPhe、Tyrなどの組み合わせを含む。このような、各明示的に開示された配列の保存的に置換されたバリエーションは、本明細書に提供されるモザイクポリペプチドに含まれる。

【0105】

置換または欠失変異誘発を用いて、N-グリコシル化 (Asn-X-Thr/Ser) またはO-グリコシル化 (SerまたはThr) のための部位を挿入することができる。システインまたは他の不安定な残基の欠失も望ましい場合がある。潜在的なタンパク質分解部位 (例えば、Arg) の欠失または置換は、例えば、塩基性残基のうちの1つを欠失させるか、またはグルタミルまたはヒスチジル残基で置換することによって達成される。

【0106】

特定の翻訳後の誘導体化は、発現したポリペプチドに対する組換え宿主細胞の作用の結果である。グルタミルおよびアスパラギン残基は、翻訳後、対応するグルタミルおよびアスパリル残基にしばしば脱アミド化される。あるいは、これらの残基は、弱酸性条件下で脱アミド化される。他の翻訳後改変としては、プロリンおよびリジンのヒドロキシル化、セリルまたはスレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン、およびヒスチジン側鎖のo-アミノ基のメチル化 (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco pp 79-86 [1983])、N末端アミンのアセチル化、および、場合によっては、C末端カルボキシルのアミド化、が挙げられる。

【0107】

本明細書に開示されるタンパク質のバリエーションおよび誘導体を定義する1つの方法は、特定の既知の配列に対する相同性/同一性の観点からバリエーションおよび誘導体を定義することによるものであることを理解されたい。記載の配列と、少なくとも70%または75%または80%または85%または90%または95%の相同性を有する、これらのバリエーションおよび本明細書に開示される他のタンパク質が、具体的に開示される。当業者であれば、2つのタンパク質の相同性を決定する方法を、容易に理解することができる。例えば、相同性は、相同性が最も高いレベルにあるように、2つの配列を整列した後に計算することができる。

【0108】

相同性を計算する別の方法は、公開されたアルゴリズムによって実施することができる。比較のための配列の最適整列は、Smith and Waterman *Adv. Math.* 2:482 (1981) の局所相同性アルゴリズムによって、Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970) の相同性アライメントアルゴリズムによって、Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85:2444 (1988) の類似性検索法によって、これらのアルゴリズムのコンピュータ実装によって (GAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA、Wisconsin Genetics Software Package上で、Genetics Computer Group、575 Science Dr、Madison、WI)、行ってもよい。

【0109】

核酸に関して、同じ種類の相同性は、例えば、Zuker, *M. Science* 244:48-52, 1989, Jaeger et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:7706-7710, 1989, Jaeger et al. *Methods Enzymol.* 183:281-306, 1989. に開示されているアルゴリズムによって、得ることができる。

【0110】

保存的変異および相同性の説明は、任意の組み合わせで、例えば、バリエーションが保存的変異である特定の配列に対して少なくとも70%の相同性を有する実施形態のように、一緒に組み合わせることができることが理解される。

10

20

30

40

50

【0111】

本明細書は、様々なタンパク質およびタンパク質配列を論じるため、それらのタンパク質配列をコードすることができる核酸もまた開示されることが理解される。これには、特定のタンパク質配列に関連するすべての縮重配列、すなわち、1つの特定のタンパク質配列をコードする配列を有するすべての核酸、ならびにタンパク質配列の開示されたバリエーションおよび誘導体をコードする縮重核酸を含むすべての核酸、が含まれるであろう。したがって、各特定の核酸配列が本明細書に記載されていない場合があるが、各配列およびすべての配列が、開示されたタンパク質配列を介して、実際に本明細書に開示および記載されていることを理解される。また、開示されたタンパク質の特定のバリエーションが本明細書に開示されている生物内のタンパク質をコードする特定のDNA配列を示すアミノ酸配列はないが、そのタンパク質をコードする既知の核酸配列もまた、本明細書に既知であり、開示され、記載されていることも理解される。

10

【0112】

開示された組成物に組み込まれ得る多数のアミノ酸およびペプチド類似体が存在することが理解される。例えば、表2および表3に示されるアミノ酸とは異なる機能的置換基を有する多数のDアミノ酸またはアミノ酸が存在する。天然に存在するペプチドの反対の立体異性体、ならびにペプチド類似体の立体異性体が開示される。これらのアミノ酸は、tRNA分子に選択したアミノ酸を負荷することによって、および、例えば、アンバーコドンを利用して、部位特異的な方法で、類似体アミノ酸をペプチド鎖に挿入する遺伝子構築物を操作することによって、容易にポリペプチド鎖に組み込まれ得る。

20

【0113】

ペプチドに似ているが、天然のペプチド結合を介して結合されていない分子を生成することができる。例えば、アミノ酸またはアミノ酸類似体についての結合としては、 $\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $- \text{CH}_2\text{S}-$ 、 $- \text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $- \text{CH}=\text{CH}-$ （シスおよびトランス）、 $- \text{COCH}_2-$ 、 $- \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 、および $- \text{CHH}_2\text{SO}-$ が挙げられる（これらおよび他のものは、Spatola, A. F. in *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins*, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983)、Spatola, A. F., *Vega Data* (March 1983), Vol. 1, Issue 3, *Peptide Backbone Modifications* (general review)、Morley, *Trends Pharm Sci* (1980) pp. 463-468; Hudson, D. et al., *Int J Pept Prot Res* 14:177-185 (1979) ($- \text{CH}_2\text{NH}-$ 、 CH_2CH_2-)、Spatola et al. *Life Sci* 38:1243-1249 (1986) ($- \text{CHH}_2-\text{S}$)、Hann J. *Chem. Soc Perkin Trans. I* 307-314 (1982) ($- \text{CH}-\text{CH}-$ 、シスおよびトランス)、Almquist et al. *J. Med. Chem.* 23:1392-1398 (1980) ($- \text{COCH}_2-$)、Jennings-White et al. *Tetrahedron Lett* 23:2533 (1982) ($- \text{COCH}_2-$)、Szelke et al. *European Appln*, EP 45665 CA (1982):97:39405 (1982) ($- \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$)、Holladay et al. *Tetrahedron. Lett* 24:4401-4404 (1983) ($- \text{C}(\text{OH})\text{CH}_2-$)、およびHruby *Life Sci* 31:189-199 (1982) ($- \text{CH}_2-\text{S}-$)に見出され得、これらの各々は、参照により本明細書に援用される。特に好ましい非ペプチド結合は、 $- \text{CH}_2\text{NH}-$ である。ペプチド類似体は、b-アラニン、g-アミノ酪酸などの結合原子間に2つ以上の原子を有し得ることが理解される。

30

40

【0114】

アミノ酸類似体および類似体ならびにペプチド類似体は、しばしば、より経済的な産生

50

、より大きな化学的安定性、より強化された薬理学的特性（半減期、吸収、効力、有効性など）、特異性の変化（例えば、広域の生物学的活性）、抗原性の低減などを有する。

【0115】

D-アミノ酸は、ペプチダーゼなどによって認識されないため、D-アミノ酸は、より安定なペプチドを生成するために使用され得る。コンセンサス配列の1つ以上のアミノ酸を同じ種類のD-アミノ酸（例えば、L-リジンの代わりにD-リジン）で系統的に置換することを使用して、より安定なペプチドを生成することができる。システイン残基は、2つ以上のペプチドと一緒に環化するまたは結合するために使用され得る。これは、ペプチドを、特定の立体構造に拘束するのに有益であり得る。

【0116】

6. 薬学的担体／薬学的製品の送達

上述のように、組成物は、薬学的に許容される担体中でインビボで投与することもできる。「薬学的に許容される」とは、任意の望ましくない生物学的効果を引き起こすことなく、またはそれと接触する薬学的組成物の他の構成要素のいずれとも有害な様式で相互作用することなく、生物学的にまたは別途望ましくないものではない材料、すなわち、核酸またはベクターとともに、対象に投与され得る材料、を意味する。担体は、当業者には周知であるように、活性成分の任意の分解を最小限に抑え、対象における任意の有害な副作用を最小限に抑えるために当然選択されるであろう。

【0117】

組成物は、経口的に、非経口的に（例えば、静脈内に）、筋肉内注射によって、腹腔内注射によって、経皮的に、体外的に、局所的に（局所鼻腔内投与または吸入剤による投与を含む）など、投与され得る。本明細書で使用される場合、「局所鼻腔内投与」とは、鼻孔の一方または両方を介して組成物を鼻および鼻道に送達することを意味し、噴霧機構もしくは液滴機構による、または核酸もしくはベクターのエアロゾル化による送達を含むことができる。吸入剤による組成物の投与は、噴霧または液滴機構による送達を介して鼻または口を通して行うことができる。送達は、挿管を介して呼吸器系の任意の領域（例えば、肺）に直接送達することもできる。必要とされる組成物の正確な量は、対象の種、年齢、体重、および一般状態、治療されるアレルギー障害の重症度、使用される特定の核酸またはベクター、その投与方法などに応じて、対象によって異なるであろう。したがって、すべての組成物に対して正確な量を指定することは不可能である。しかしながら、適切な量は、本明細書の教示を与える日常的な実験のみを使用して、当業者によって決定され得る。

【0118】

組成物の非経口投与は、使用される場合、概して、注射を特徴とする。注射剤は、液体溶液または懸濁液、注射前の液体中の懸濁液の溶液に適した固体形態、あるいはエマルジョンのいずれかとして、従来の形態で調製され得る。最近改訂された非経口投与のアプローチでは、一定の投与量が維持されるような徐放または持続放出系の使用を伴う。例えば、米国特許第3,610,795号を参照されたい（参照により本明細書に援用される）。

【0119】

材料は、溶液、懸濁液（例えば、微小粒子、リポソーム、または細胞に組み込まれる）中であってもよい。これらは、抗体、受容体、または受容体リガンドを介して、特定の細胞型を標的にし得る。以下の参考文献は、腫瘍組織に特定のタンパク質を標的にするための本技術の使用例である（Senter, et al., Bioconjugate Chem., 2:447-451, (1991)、Bagshawe, K. D., Br. J. Cancer, 60:275-281, (1989)、Bagshawe, et al., Br. J. Cancer, 58:700-703, (1988)、Senter, et al., Bioconjugate Chem., 4:3-9, (1993)、Battelli, et al., Cancer Immunol. Immunother., 35:421-425, (1992)、Pietersz and McKenzie, Immunolog. Reviews, 129:57-80, (1992)、およびRooffl

10

20

30

40

50

er, et al., Biochem. Pharmacol, 42:2062-2065, (1991))。ビヒクル、例えば、「ステルス」および他の抗体コンジュゲートリポソーム（結腸癌を標的化する脂質媒介性薬物を含む）、細胞特異的リガンドを通したDNAの受容体媒介性標的化、リンパ球特異的腫瘍標的化、ならびにインビボでのマウス神経膠腫細胞の高度に特異的な治療用レトロウイルス標的化。以下の参考文献は、腫瘍組織に特定のタンパク質を標的にするための本技術の使用例である（Hughes et al., Cancer Research, 49:6214-6220, (1989)、および Litzinger and Huang, Biochimica et Biophysica Acta, 1104:179-187, (1992)）。一般に、受容体は、構成的またはリガンド誘導のいずれかのエンドサイトーシスの経路に関与する。これらの受容体は、クラスリン被覆ピット内でクラスター化し、クラスリン被覆小胞を介して細胞内に入り、受容体が選別される酸性化エンドソームを通過し、次いで細胞表面にリサイクルされるか、細胞内に貯蔵されるか、またはリソソーム中で分解されるかのいずれかである。内部移行経路は、栄養素の取り込み、活性化タンパク質の除去、巨大分子のクリアランス、ウイルスおよび毒素の日和見進入、リガンドの解離および分解、ならびに受容体レベルの調節などの様々な機能を果たす。多くの受容体は、細胞型、受容体濃度、リガンドの種類、リガンド価、およびリガンド濃度に応じて、2つ以上の細胞内経路に従う。受容体媒介性エンドサイトーシスの分子および細胞機構が概説されている（Brown and Greene, DNA and Cell Biology 10:6, 399-409 (1991)）。

【0120】

左相同アーム、スプライスアクセプター、導入遺伝子、および右相同アームを順に含むプラスミドもまた、本明細書に提供され、左相同アームおよび右相同アームは、各々800bp以下の長さである。

【0121】

一態様では、1つまたは2つのプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）、およびCRISPR RNA（crRNA）、および導入遺伝子を含むか、またはそれらからなるプラスミドが本明細書に提供され、コードされた核酸の順序は、PAM、crRNA、および導入遺伝子を含み、2つのPAMおよびcrRNAが使用される場合、コードされた核酸は、第1のPAM、第1のcrRNA、導入遺伝子、第2のPAM、および第2のgRNAを含む。

【0122】

医薬品として使用するための、本発明のプラスミド、本発明のAAVベクター、または本発明の改変細胞もまた、本明細書に提供される。本発明は、医薬品の製造のための、本発明のプラスミド、本発明のAAVベクター、または本発明の改変細胞の使用をさらに提供する。本発明はまた、がんの治療に使用するための、本発明のプラスミド、本発明のAAVベクター、または本発明の改変細胞も提供する。本発明は、がんの治療のための医薬品の製造のための、本発明のプラスミド、本発明のAAVベクター、または本発明の改変細胞の使用をさらに提供する。

本発明の様々な実施形態を以下に示す。

1. 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）／CRISPR関連9（Cas9）組み込み系とともに使用するためのプラスミドであって、前記プラスミドが、左相同アーム、スプライスアクセプター、導入遺伝子、および右相同アームを順に含み、前記左相同アームおよび右相同アームが、各々800bp以下の長さである、プラスミド。

2. 前記導入遺伝子と前記右相同アームとの間にポリアデニル化シグナルをさらに含む、上記1に記載のプラスミド。

3. 前記左相同アームおよび右相同アームが、同じ長さである、上記1または2に記載のプラスミド。

4. 前記相同アームが、30bpの長さである、上記3に記載のプラスミド。

5. 前記相同アームが、300bpの長さである、上記3に記載のプラスミド。
6. 前記相同アームが、500bpの長さである、上記3に記載のプラスミド。
7. 前記相同アームが、800bpの長さである、上記3に記載のプラスミド。
8. 前記左相同アームおよび右相同アームが、異なる長さである、上記1または2に記載のプラスミド。
9. 1つまたは2つのプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）、およびCRISPR RNA（crRNA）、および導入遺伝子からなるCRISPR/Cas9組み込み方法において使用するためのプラスミドであって、コードされた核酸の順序が、PAM、crRNA、および導入遺伝子を含み、2つのPAMおよびcrRNAが使用される場合、前記コードされた核酸のが、第1のPAM、第1のcrRNA、導入遺伝子、第2のPAM、および第2のgRNAを含む、プラスミド。
10. 上記1～8のいずれかに記載のプラスミドの前記相同アームおよび上記9に記載のプラスミドの前記PAMが、ヒトの19番染色体のアデノ随伴ウイルス組み込み部位1（AAVS1）に特異的にハイブリダイズする、上記1～9のいずれかに記載のプラスミド。
11. 前記導入遺伝子が、腫瘍抗原のキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドを含む、上記1～10のいずれかに記載のプラスミド。
12. 上記1～11のいずれかに記載のプラスミドを含む、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター。
13. 前記AAVの血清型が、AAV6を含む、上記12に記載のAAVベクター。
14. 前記ベクターが、crRNA、トレーサーRNA（trcrRNA）、およびCASSエンドヌクレアーゼをコードするプラスミドをさらに含む、上記12または13に記載のAAVベクター。
15. 前記ベクターが、一本鎖AAV（ssAAV）である、上記12～14のいずれかに記載のAAVベクター。
16. 前記ベクターが、自己相補的AAV（scAAV）である、上記12～15のいずれかに記載のAAVベクター。
17. 上記1～11のいずれかに記載のプラスミドまたは上記12～16のいずれかに記載のAAVベクターを含む、改変細胞。
18. 前記改変細胞が、CAR NK細胞である、上記17に記載の改変細胞。
19. 対象におけるがんを治療する方法であって、がんを有する対象に、上記17または18に記載の改変細胞を投与することを含む、方法。
20. 相同性指向修復によって、細胞を遺伝子改変する方法であって、
- a) 対応するCRISPR/CasガイドRNAと複合体化したクラス2 CRISPR/Casエンドヌクレアーゼ（Cas9）を含むリボ核タンパク質（RNP）複合体、および導入遺伝子（例えば、腫瘍抗原のキメラ抗原受容体など）を含むプラスミドを含むAAVベクターを得ることであって、前記導入遺伝子が、相同アームと隣接しており、前記相同アームが、800bp以下の長さである、得ることと、
- b) 前記細胞に、前記導入遺伝子および前記RNP複合体を導入することと、を含み、前記導入遺伝子が、前記細胞への前記アデノ随伴ウイルス（AAV）の感染を介して前記細胞に導入され、前記RNP複合体が、前記細胞のゲノムDNA内の標的配列にハイブリダイズし、前記細胞のDNA修復酵素が、前記導入遺伝子を、前記細胞の前記ゲノムDNA内の前記標的配列で宿主ゲノムに挿入し、それによって、改変細胞を生成する、方法。
21. 前記細胞が、初代細胞または増殖細胞である、上記20に記載の方法。
22. 前記初代細胞が、感染の前に、IL-2の存在下で、4日間インキュベートされる、上記21に記載の方法。
23. 前記初代細胞が、感染の前に、照射されたフィーダー細胞の存在下で、4日間増殖される、上記22に記載の方法。
24. 感染の後に、照射されたmbIL-21発現フィーダー細胞とともに前記改変細胞を増殖することをさらに含む、上記20～23のいずれかに記載の方法。
25. 前記細胞が、NK細胞である、上記20～24のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

26. 前記導入遺伝子が、腫瘍抗原のキメラ抗原受容体である、上記20～25のいずれかに記載の方法。

27. 前記RNP複合体が、エレクトロポレーションを介して前記細胞に導入される、上記20～26のいずれかに記載の方法。

28. 前記RNP複合体が、トランスフェクションを介して前記細胞に導入され、前記RNP複合体が、同じまたは異なるAAV上にコードされる、上記20～27のいずれかに記載の方法。

29. 相同性指向修復(HDR)によって、少なくとも1つの細胞を遺伝子改変する方法であって、

(a) 前記細胞内に、(i) 前記細胞のゲノム内の標的配列をコードするCRISPR/CasガイドRNAと複合体化したクラス2 CRISPR/Casエンドヌクレアーゼを含むリボ核タンパク質(RNP)複合体、ならびに(ii) 各々800bp以下の長さを有する第1および第2の相同アームに隣接する導入遺伝子を含むプラスミドを含むAAVベクターを導入することであって、前記導入遺伝子が、キメラ抗原受容体をコードする、導入することと、

(b) 前記細胞を、(i) 前記RNP複合体が、前記標的配列にハイブリダイズし、前記標的配列に二本鎖切断(DSB)を導入し、かつ(ii) 前記細胞が、前記標的配列で前記細胞のゲノムに前記導入遺伝子を挿入し、HDRによって前記切断を修復し、それによって、前記導入遺伝子を前記DSBの部位で前記細胞のゲノムに組み込むのに十分な時間および条件下で、維持することと、を含む、方法。

30. 細胞が、初代細胞または増殖細胞である、上記28に記載の方法。

31. 前記細胞が、ナチュラルキラー(NK)細胞である、上記28または29に記載の方法。

32. 前記クラス2 CRISPR/Casエンドヌクレアーゼが、Cas9である、上記28または29に記載の方法。

33. 前記細胞が初代細胞であり、前記方法が、ステップ(a)の前に、前記細胞をIL-2の存在下で少なくとも約4日間インキュベートすることをさらに含む、上記28または29に記載の方法。

34. 前記細胞が初代細胞であり、前記方法が、ステップ(b)の後に、前記細胞をmbIL-21の存在下で少なくとも約4日間増殖させることをさらに含む、上記28または29に記載の方法。

35. 前記mbIL-21が、照射されたmbIL-21発現フィーダー細胞、PM21粒子、EX21エクソソーム、またはそれらの任意の組み合わせを含む、上記33に記載の方法。

【実施例】

【0123】

C. 実施例

以下の実施例は、当業者に、本明細書で特許請求される化合物、組成物、物品、デバイス、および／または方法の作製方法および評価方法の完全な開示および説明を提供するために示されるものであり、純粹に例示的であることを意図するものであって、本開示を限定するものではない。数値(例えば、量、温度など)に関して精度を保証するように努力がなされてはいるが、いくつかの誤差および偏差が考慮されるべきである。特に指定しない限り、部(parts)は重量部であり、温度は℃、または周囲温度であり、圧力は、大気圧またはその付近である。

【0124】

1. 実施例1

遺伝子改変キメラ抗原受容体(CAR)T細胞は、がん免疫療法で成功裏に展開された操作された免疫細胞の優れた例である。これらの細胞は、最近、CD19+B細胞悪性腫瘍に対する治療のためにFDAによって承認されたが、これまでのところ、成功は、少数の標的化可能な抗原を有する疾患に限定されている。また、NK細胞をより良い代替物と

するいくつかの副作用を有する。

【0125】

Cas9リボ核タンパク質複合体(Cas9/RNP)を利用する、初代および増殖ヒト細胞(NK細胞を含む)のゲノム編集のためのDNAを含まない技術が、本明細書に開示される(図1を参照のこと)。

【0126】

非病原性ウイルスである天然組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ドナーベクターを用いた導入遺伝子送達、相同性指向または相同性非依存的標的組み込みによる部位特異的遺伝子挿入(HITI、CRISPaint)を可能にすることが示されている(図3)。

【0127】

異なる血清型のAAVプラスミドからの必須配列を使用して、NK細胞およびHEK293細胞を含むヒト初代細胞への目的の遺伝子の指向性組み込みのために、Cas9/RNP(図2)と組み合わせて使用される12個の新規プラスミドを開発した。

【0128】

新たな方法論では、Cas9 RNP複合体は、DNAを切断する(AAVS1遺伝子座において)。HDR誘導遺伝子挿入または相同性独立誘導挿入(DNAテンプレートにcrRNA+PAM配列を提供することによって)のためのCas9切断部位に隣接する各側の標的とドナーDNAとの間の30~1000bpの相同アームを有する、我々の12個のAAVプラスミド(一本鎖または自己相補的)のうちの1つによって提供される選択したDNA断片(CAR発現DNAまたはレポーター遺伝子)の存在下で、外因性遺伝子を、証明としてヒトNK細胞およびHEK293細胞のゲノムに挿入した。

【0129】

システムを試験するために、NK細胞を、導入遺伝子を含むCRISPR/Cas9プラスミドおよびプラスミドを送達されたAAVでトランスフェクトした。NK細胞における感染のための適切なAAV血清型を決定するために、緑色蛍光タンパク質(GFP)コード化をコードするプラスミドを含む様々なAAV血清型を使用して、様々なトランスフェクション条件下でNK細胞に感染させた(図4A)。AAV6は、任意の培養条件下で一貫して最大の発現を提供することが決定された。さらに、AAV6の感染は、 3×10^6 のMOIの後6時間、約 2.5×10^7 コピーのウイルスを有するが、感染後48時間までにほぼ検出不能なレベルに低下することが示された(4B)。これは、標的外感染のリスクの低下を示すため、特に重要である。

【0130】

次に、HEK293細胞を、対応するCRISPR/CasガイドRNAと複合体化したクラス2 CRISPR/Casエンドヌクレアーゼ(Cas9)を含むリボ核タンパク質(RNP)複合体でエレクトロポレーションし、AAVS1遺伝子座を標的にしたmCherry導入遺伝子をコードするAAVで感染させた(図5)。mCherry1またはmCherry2のプライマーによるPCRを使用して、HEK293細胞内のmCherryの組み込みを試験した(5A)。これらの結果をフローサイトメトリー(5B)および顕微鏡検査(5C)によって確認した。

【0131】

次に、30bpの相同アーム、500bpの相同アーム、または800bpの相同アーム(6A)を有するプラスミドのいずれかを使用して、AAVS1遺伝子座で安定した発現を有する同一の結果を示すヒト初代NK細胞(図6)を使用して実験を繰り返し、フローサイトメトリー(6B)によって確認した。様々なサイズの構築物を組み込みにおけるすべてのプラスミドの成功を表1に要約する。

【0132】

2. 実施例2

ウイルスまたは非ウイルスベクターを使用したNK細胞の遺伝子改変は、ロバストな外来DNAおよびRNA感知機構のために困難であり、したがって、NK細胞への遺伝子送

10

20

30

40

50

達方法の効率を制限する。この制限を克服するために、Cas9／リボ核タンパク質複合体（Cas9／RNP）をヒト初代NK細胞に直接エレクトロポレーションするための新しい方法を開発した。本方法は、NK細胞のゲノムに二本鎖切断（DSB）を導入し、遺伝子ノックアウトに成功し、抗腫瘍活性が向上する。Cas9タンパク質は、その速い作用およびクリアランスのために、mRNA送達よりも好ましい。遺伝子サイレンシングにおけるこの初期成功後、本方法は、遺伝子挿入のためにさらに開発された。DSBを導入するCas9の作用に続いて、相同組換え（HR）および相同非依存性修復として知られる、2つの独立した経路を利用して、損傷を修復することができる。目的の遺伝子をコードするDNAテンプレートの存在下で、外因性遺伝子は、いずれかの修復機構を使用して、Cas9標的部位に組み込むことができる。ウイルス法および非ウイルス法を含む、そのようなDNAテンプレートを提供するためのいくつかの方法が存在する。非ウイルスアプローチでは、一本鎖または二本鎖DNAテンプレートは、典型的には、Cas9／RNPとともにエレクトロポレーションされる。ウイルス遺伝子送達のために、アデノ随伴ウイルス（AAV）を臨床試験で安全に使用し、T細胞を含む感受性初代免疫細胞のベクターとして有効である。AAVベクターを介して送達される転写産物は、約4.7 kbの長さを有する直鎖一本鎖（ss）DNA（ssAAV）または直鎖自己相補的（sc）DNA（scAAV）としてパッケージ化することができる。scAAVは、ssDNAを二本鎖（ds）DNAに変換するための第2の鎖生成の速度制限ステップを迂回するのに役立つ変異ITRを含有する。しかしながら、結果として、ssAAVと比較して、scAAVはパッケージング容量の半分しか有さず、したがって、より大きな導入遺伝子には適していない。ssAAVおよびscAAVの両方が、NK細胞へのDNAテンプレート送達のために設計および試験される。

【0133】

HR機構を介した安定した遺伝子組み込みは、DSBの隣接領域のための最適な相同アームを導入遺伝子に提供することに依存する。相同アームの最適な長さを見出し、ssAAVおよびscAAVへの導入遺伝子のパッケージング容量を最適化するために、30 bp、300 bp、500 bp、および800～1000 bpのHAを、Cas9標的部位の右側および左側のために設計した。相同アームの設計は時間のかかる手順であり、複数の最適化を必要とするため、遺伝子挿入またはタグ付けのための相同性非依存的な方法であるCRISPaIntアプローチも調査した。本方法では、crRNAおよびPAM配列を含む、同じCas9標的部位が、目的の遺伝子をコードするDNAテンプレートに提供される。Cas9複合体の導入のときに、テンプレートおよびゲノムDNAの両方が同時に切断される。その結果、CRISPaIntテンプレートは、非相同修復機構を介して組み込むことができる直線化された二本鎖DNAとして提示される。両方の方法で、概念の証明として、mCherryを使用して、高効率かつ安定した導入遺伝子改変NK細胞を生成した。

【0134】

3. 実施例3

a) ヒトNK細胞の精製および増殖

NK細胞を精製した。簡潔に述べると、NK細胞を、RosetteSep（商標）ヒトNK細胞富化カクテルを使用してPBMCから単離した（図8）。>90%のCD3陰性／CD56陽性集団としてフローサイトメトリーを使用して、精製NK細胞の表現型が決められた（図9）。これらの細胞を、精製の日に、照射されたmbIL21発現K562フィーダー細胞で2：1（フィーダー：NK）の比率で刺激した（図9）。刺激細胞を、100 IU/mLのIL-2を含有する無血清AIM-V／ICSR増殖培地中で7日間培養した。

【0135】

b) 遺伝子挿入のためのゲノムセーフハーバーの標的化。

ゲノムセーフハーバー（GSH）は、宿主細胞の正常な機能の変化なしに改変され、導入遺伝子の適切な発現を可能にすることができるゲノム内の部位である。GSHの1つで

10

20

30

40

50

あり、ホスファターゼ1調節サブユニット12C (PPP1R12C) 遺伝子内の例示的な遺伝子座である、アデノ随伴ウイルス部位1 (AAVS1) を選択した。この遺伝子座は、いくつかの細胞型への指向性遺伝子挿入のために成功裏に使用されている。まず、AAVS1のクロマチンアクセシビリティを、ATAC-seqアッセイによってナীবおよび増殖NK細胞において評価し、ナীবおよびIL-21増殖細胞の間に差を示さなかった(図10)。前述のように、増殖NK細胞へのCas9/RNPのエレクトロポレーションを介して、1つのgRNA (crRNA。5' GGGGCCACTAGGGACAGGAT (配列番号17)) を使用して、AAVS1を標的化した。

【0136】

簡潔に述べると、 3×10^6 個の増殖NK細胞を採取し、13mLのPBSで2回洗浄した後、300gで7分間遠心分離し、PBSを吸引した。細胞ペレットを、20ulのP3 Primary Cell 4D-Nucleofector溶液に再懸濁した。細胞懸濁液に、5ulの予備複合体化Cas9/RNP (Alt-R (登録商標) CRISPR-Cas9 crRNA、Alt-R (登録商標) CRISPR-Cas9 tracrRNAおよびAlt-R (登録商標) S.p. HiFi Cas9ヌクレアーゼV3) (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, Iowa)、標的AAVS1、ならびに1ulの100uMのエレクトロポレーションエンハンサー (Alt-R (登録商標) Cas9エレクトロポレーションエンハンサー) を添加した。CRISPR反応の26ulの総体積を、4D-Nucleofector (商標) 16ウェルストリップに移し、プログラムEN-138を使用してエレクトロポレーションした。エレクトロポレーション後、細胞を、12ウェルプレート(図11)中の100IUのIL-2を含有する2mLの無血清培地に移し、37℃、5%CO₂圧力でインキュベートした。

【0137】

48時間後、NK細胞DNAを、CRISPR編集NK細胞における挿入欠失(インデル)の検出のために単離した。Cas9標的部位に隣接する領域をPCR増幅し、増幅産物をサンガー配列決定した。CRISPR編集の推論(ICE)を使用して、インデルの頻度を分析した(図12)。ICE結果は、CRISPR改変NK細胞の85%超が、AAVS1 Cas9標的部位に少なくとも1つのインデルを有したことを示した。この遺伝子座におけるゲノム改変が、がん細胞を標的とする能力を妨げないことを確実にするために、AAVS1-KO NK細胞の細胞毒性を、AMLがん細胞株であるKasumiを使用して評価した。カルセインAMアッセイを使用して、野生型とCRISPR改変NK細胞との間に、それらの殺傷能力の差は観察されなかった(図13)。

【0138】

c) DNAテンプレート送達のための様々なアデノ随伴ウイルスベクター血清型の試験。

初代NK細胞の形質導入のためのAAVの最良の血清型を決定し、NK細胞に目的の遺伝子をコードする最高数のDNAテンプレートを提供するために、我々は、GFPをコードするAAV4、AAV6、AAV8、およびAAV9を含むいくつかの血清型で、300,000の感染多重度(MOI)で細胞を形質導入した。AAV6で形質導入されたNK細胞は、フローサイトメトリーによって検出された最高発現レベルのGFPを有した。重要なことに、AAV6ウイルスゲノムは、qPCR解析によって形質導入後最大48時間検出することができ、これは、Cas9タンパク質のエンドヌクレアーゼ機能のための臨界時間である(図14)。

【0139】

d) HRおよびCRISPRaint遺伝子送達構築物の設計。

AAVS1遺伝子座が、がん細胞を標的とする能力を変更することなく、NK細胞において改変され得ることを成功裏に示した後、AAVS1における遺伝子挿入のためのmCherry導入遺伝子のAAV媒介性送達を評価した。HR指向性遺伝子挿入のために、Cas9標的部位の隣接領域に相同アーム(HA)を有するmCherryをコードする

10

20

30

40

50

DNAを、一本鎖または自己相補的AAVベクターの骨格にクローニングした。30bp、300bp、500bpおよび1000bpのHAを右用に設計し、30bp、300bp、500bpおよび800bpを左用HAに設計した(図15)。CRISPaint DNAテンプレートについては、単一(PAMg)または二重(PAMgPAMg) Cas9標的配列は、mCherry導入遺伝子の周りに組み込まれるが、ITR内に組み込まれる。したがって、Cas9は、gDNAおよびCRISPaint DNAテンプレートを同時に切断することができ、ゲノムDSBでの組み込みを可能にする(図16A~16B)。導入遺伝子をAAV6にパッケージングする前に、設計されたHRおよびCRISPaint DNAテンプレートの精度を確保するために、mCherryをコードする環状DNAを、AAVS1を標的とするCas9/RNPとともにHEK293細胞に共エレクトロポレーションした。結果は、HRおよびCRISPaint DNAの両方が、ゲノムDSBで成功裏に組み込まれ、mCherryが効率的に発現されたことを示した(図17)。

【0140】

e) 初代NK細胞におけるNHEJおよびHR経路を研究して、ゲノム編集のための最適経路を決定する。

CRISPaintおよびHRは、酵素反応によって調節される。CRISPaintは、LIG4依存性プロセスであり、一方、BRCA1およびBRCA2などの他のタンパク質は、HRを調節する。したがって、NK細胞におけるこれらの遺伝子の発現レベルを分析して、どの修復経路がこの細胞型においてより効率的であり得るかを評価した。RNA-seq解析は、増殖NK細胞が、ナイーブNK細胞と比較して、BRCA1およびBRCA2のより高い発現を有し、これらの細胞におけるLIG4レベルの減少がないことを示し(図18)、CRISPaintを介したHRまたはNHEJ指向性遺伝子挿入のいずれかに最適な条件を提供する。

【0141】

f) Cas9/RNPおよびAAV6を組み合わせて、mCherry NK細胞を生成する。

実験マニピュレーションの1日前のNK細胞増殖の6日目に、 5×10^5 個の細胞/mLで培地交換および再懸濁を行った。次いで、NK細胞を、上述のように7日目にAAVS1を標的とするCas9/RNPでエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションの30分後、生細胞を回収し、1mL当たり 1×10^6 個の細胞で、24ウェルプレート中の100IUのIL2を含有する培地中に再懸濁した。mCherryをコードするHRまたはCRISPaint DNAを送達するssAAV6またはscAAV6を用いた各形質導入条件について、300,000のエレクトロポレーション細胞を300,000のMOIまたは150,000のMOIで形質導入した。あるいは、AAV6のより高いMOIの形質導入効率を試験するために、150,000個の細胞を、HR 800bpを送達するssAAV6およびCRISPaint PAMgPAMgを送達するscAAV6の500,000のMOIで形質導入した(図19)。陰性対照には、エレクトロポレーションしていない、Cas9/RNPでエレクトロポレーションしたがAAV形質導入していないか、またはCas9/RNPのエレクトロポレーションなしで300,000のMOIのAAV6で形質導入したNK細胞が含まれた。エレクトロポレーションおよび形質導入の翌日、100IUのIL2を含有する150uLの新鮮な培地を、古い培地を変更することなく各ウェルに添加した。細胞をエレクトロポレーション後48時間培養し、次いでK562フィーダー細胞で2:1の比率で再刺激し、24ウェルプレート中で1mLの総体積で維持した。

【0142】

g) CRISPR改変ヒトNK細胞のフローサイトメトリーは、mCherry遺伝子の組み込みに成功したことを示す。

エレクトロポレーションおよび形質導入の2日後、および増殖の前に、フローサイトメトリーを行い、mCherry発現および生存率(GhostRed 780色素)を評

10

20

30

40

50

価した。全体として、AAV6送達HRベクターで形質導入されたNK細胞は、CRISPaintよりも高いノックイン効率を有した。さらに、scAAV6は、著しく良好な遺伝子挿入を示した。mCherry発現は、対照NK細胞において観察されなかった。HRベクターを使用して、800bpのHAを有するmCherryをコードするDNAを送達するssAAV6を用いて細胞を形質導入した実験条件では、NK細胞のほぼ20%が、mCherry陽性であった。CRISPaint PAMgを送達する300,000のMOIのscAAV6または300,000のMOIおよび500,000のMOIのPAMg PAMgで形質導入したNK細胞については、最大8%のmCherry陽性細胞が見出された。重要なことに、mCherry陽性細胞のパーセンテージは、より短い相同アームを含有するscAAV6 HRベクターで形質導入された細胞において著しく高かった。これらの条件は、30bp (19~20%)、300bp (80~85%)、500bp (75~85%)、および800bp (80~89%)を有する300,000のMOIまたは150,000のMOIのHR scAAV6ベクターでの形質導入を含む。より低い形質導入効率を有する細胞(ssAAV6-HR-800bp、scAAV6-CRISPaint PAMg PAMg)について、mCherry陽性集団を、FACS選別によって85%に富化し、mCherry陽性NK細胞のパーセンテージに変化がない照射されたmbIL21発現K562フィーダー細胞を使用して、最大20日間拡張した(図20~図22)。形質導入後最大20日間増殖されたmCherry陽性NK細胞についてフロー解析を繰り返し、Cas9/RNPとssAAV6またはscAAV6との組み合わせによって生成された細胞において、mCherryのパーセンテージに有意な変化は観察されなかった。HR指向性遺伝子挿入と比較して、CRISPaintを使用して遺伝子組み込みの効率が低いことが観察されたが、本方法は、研究者が相同アームを設計する必要なしに、目的の遺伝子をユーザ定義の遺伝子座に組み込むことができるため、依然として非常に魅力的である。さらに、CRISPaintベクターで形質導入されたNK細胞におけるより良い増殖が観察された。

【0143】

h) Cas9/RNPを非ウイルス遺伝子送達と組み合わせることは、初代ヒトNK細胞において細胞死を引き起こす。

ウイルス産生の時間およびコストを最小限に抑えるために、非ウイルス遺伝子組み込みがT細胞で使用されている。このアプローチはまた、AAVS1を標的とするCas9/RNPを、mCherryをコードする裸の化学合成DNAでエレクトロポレーションすることによって、NK細胞において試験した。導入遺伝子は、Cas9標的部位に隣接する領域について80bpの相同アームを有するIDTからのMegamer(登録商標)一本鎖DNA断片としての形態と、AAV骨格にクローニングされたが、任意のAAVキャプシドにパッケージ化されなかった同じHRおよびCRISPaint DNAを有する別の形態との、2つの形態で生成された。増殖されたNK細胞を、AAVS1を標的とするCas9/RNP、およびmCherryをコードする1または2ugのDNAでエレクトロポレーションし、総体積を26ulとした。2日後、Megamer(登録商標)を有する細胞は100%死滅し、HRおよびCRISPaint DNAでエレクトロポレーションした細胞の10%のみが生存した。これらの細胞は増殖することができるが、DNAはDSBの部位に組み込まれたが、得られた細胞の1%未満がmCherry陽性であった。これは、裸のDNA送達と比較して、AAV媒介性NK細胞改変がより良好な耐容性であり、より効率的であることを示す。

配列

配列番号1 30bpの右相同アーム

g a t t g g t g a c a g a a a a g c c c c a t c c t t a g g

配列番号2 30bpの左相同アーム

t t a t c t g t c c c c t c c a c c c c a c a g t g g g g c

配列番号3 300bpの右相同アーム

g a t t g g t g a c a g a a a a g c c c c a t c c t t a g g c c t c c t c c t t

c c t a g t c t c c t g a t a t t g g g t c t a a c c c c c a c c t c c t g t t
a g g c a g a t t c c t t a t c t g g t g a c a c a c c c c c a t t t c c t g g
a g c c a t c t c t c t c c t t g c c a g a a c c t c t a a g g t t t g c t t a
c g a t g g a g c c a g a g a g g a t c c t g g g a g g g a g a g c t t g g c a
g g g g g t g g g a g g g a a g g g g g g g a t g c g t g a c c t g c c c g g t
t c t c a g t g g c c a c c c t g c g c t a c c c t c t c c c a g a a c c t g a
g c t g c t c t g a c g c g g c t g t c

配列番号4 300bpの左相同アーム

g t t c t c c t g t g g a t t c g g g t c a c c t c t c a c t c c t t t c a t t
t g g g c a g c t c c c c t a c c c c c c t t a c c t c t c t a g t c t g t g c
t a g c t c t t c c a g c c c c c t g t c a t g g c a t c t t c c a g g g g t c
c g a g a g c t c a g c t a g t c t t c t t c c t c c a a c c c g g g c c c c t
a t g t c c a c t t c a g g a c a g c a t g t t t g c t g c c t c c a g g g a t
c c t g t g t c c c c g a g c t g g g a c c a c c t t a t a t t c c c a g g g c
c g g t t a a t g t g g c t c t g g t t c t g g g t a c t t t t a t c t g t c c
c c t c c a c c c c a c a g t g g g g c

10

配列番号5 500bpの右相同アーム

g a t t g g t g a c a g a a a a g c c c c a t c c t t a g g c c t c c t c c t t
c c t a g t c t c c t g a t a t t g g g t c t a a c c c c c a c c t c c t g t t
a g g c a g a t t c c t t a t c t g g t g a c a c a c c c c c a t t t c c t g g
a g c c a t c t c t c t c c t t g c c a g a a c c t c t a a g g t t t g c t t a
c g a t g g a g c c a g a g a g g a t c c t g g g a g g g a g a g c t t g g c a
g g g g g t g g g a g g g a a g g g g g g g a t g c g t g a c c t g c c c g g t
t c t c a g t g g c c a c c c t g c g c t a c c c t c t c c c a g a a c c t g a
g c t g c t c t g a c g c g g c t g t c t g g t g c g t t t c a c t g a t c c t
g g t g c t g c a g c t t c c t t a c a c t t c c c a a g a g g a g a a g c a g
t t t g g a a a a c a a a a t c a g a a t a a g t t g g t c c t g a g t t c t
a a c t t t g g c t c t t c a c c t t t c t a g t c c c c a a t t t a t a t t g
t t c c t c c g t g c g t c a g t t t t a c c t g t g a g a t a a g g c c a g t
a g c c a g c c c c g t c c t g g c a g

20

30

配列番号6 500bpの左相同アーム

t c c c t t t t c c t t c t c c t t c t g g g g c c t g t g c c a t c t c t c g
t t t c t t a g g a t g g c c t t c t c c g a c g g a t g t c t c c c t t g c g
t c c c g c c t c c c c t t c t t g t a g g c c t g c a t c a t c a c c g t t t
t t c t g g a c a a c c c c a a a g t a c c c c g t c t c c c t g g c t t t a g
c c a c c t c t c c a t c c t c t t g c t t t c t t t g c c t g g a c a c c c c
g t t c t c c t g t g g a t t c g g g t c a c c t c t c a c t c c t t t c a t t
t g g g c a g c t c c c c t a c c c c c c t t a c c t c t c t a g t c t g t g c
t a g c t c t t c c a g c c c c c t g t c a t g g c a t c t t c c a g g g g t c
c g a g a g c t c a g c t a g t c t t c t t c c t c c a a c c c g g g c c c c t
a t g t c c a c t t c a g g a c a g c a t g t t t g c t g c c t c c a g g g a t
c c t g t g t c c c c g a g c t g g g a c c a c c t t a t a t t c c c a g g g c
c g g t t a a t g t g g c t c t g g t t c t g g g t a c t t t t a t c t g t c c
c c t c c a c c c c a c a g t g g g g c

40

配列番号7 800bpの右相同アーム

g a t t g g t g a c a g a a a a g c c c c a t c c t t a g g c c t c c t c c t t
c c t a g t c t c c t g a t a t t g g g t c t a a c c c c c a c c t c c t g t t
a g g c a g a t t c c t t a t c t g g t g a c a c a c c c c c a t t t c c t g g
a g c c a t c t c t c t c c t t g c c a g a a c c t c t a a g g t t t g c t t a
c g a t g g a g c c a g a g a g g a t c c t g g g a g g g a g a g c t t g g c a

50

g g g g g t g g g a g g g a a g g g g g g a t g c g t g a c c t g c c c g g t
t c t c a g t g g c c a c c c t g c g c t a c c c t c t c c c a g a a c c t g a
g c t g c t c t g a c g c g g c t g t c t g g t g c g t t t c a c t g a t c c t
g g t g c t g c a g c t t c c t t a c a c t t c c c a a g a g g a g a a g c a g
t t t g g a a a a a c a a a a t c a g a a t a a g t t g g t c c t g a g t t c t
a a c t t t g g c t c t t c a c c t t t c t a g t c c c c a a t t t a t a t t g
t t c c t c c g t g c g t c a g t t t t a c c t g t g a g a t a a g g c c a g t
a g c c a g c c c c g t c c t g g c a g g g c t g t g g t g a g g a g g g g g
t g t c c g t g t g g a a a a c t c c c t t t g t g a g a a t g g t g c g t c c
t a g g t g t t c a c c a g g t c g t g g c c g c c t c t a c t c c c t t t c t
c t t t c t c c a t c c t t c t t t c c t t a a a g a g t c c c c a g t g c t a
t c t g g g a c a t a t t c c t c c g c c c a g a g c a g g g t c c c g c t t c
c c t a a g g c c c t g c t c t g g g c t t c t g g g t t t g a g t c c t t g g
c a a g c c c a g g a g a g g c g c t c a g g c t t c c c t g t c c c c c t t c
c t c g t c c a c c a t c t c a t g c c c c t g g c t c t c c t g c c c c t t c
c c t a c a g g g g t t c c t g g c t c t g c t c t t c a g a c t g a g c c c c
g t t c c c c t g c a t c c c c g t t c c c c t g c a t c c c c c t t c c c c t
g c a t c c c c c a g a g g c c c c a g g c c a c c t a c t t g g c c t g g a c
c c c a c g a g a g g c c a c c c c a g c c c t g t c t a c c a g g c t g c c t
t t t g g g t g g a t t c t c c t c c a a c t g t g g g g t g a c t g c t t g g

10

20

配列番号8 800bpの左相同アーム

t g c t t t c t c t g a c c t g c a t t c t c t c c c c t g g g c c t g t g c c
g c t t t c t g t c t g c a g c t t g t g g c c t g g g t c a c c t c t a c g g
c t g g c c c a g a t c c t t c c c t g c c g c c t c c t t c a g g t t c c g t
c t t c c t c c a c t c c c t c t t c c c c t t g c t c t c t g c t g t g t t g
c t g c c c a a g g a t g c t c t t t c c g g a g c a c t t c c t t c t c g g c
g c t g c a c c a c g t g a t g t c c t c t g a g c g g a t c c t c c c c g t g
t c t g g g t c c t c t c c g g g c a t c t c t c c t c c c t c a c c c a a c c
c c a t g c c g t c t t c a c t c g c t g g g t t c c c t t t t c c t t c t c c
t t c t g g g g c c t g t g c c a t c t c t c g t t t c t t a g g a t g g c c t
t c t c c g a c g g a t g t c t c c c t t g c g t c c c g c c t c c c c t t c t
t g t a g g c c t g c a t c a t c a c c g t t t t t c t g g a c a a c c c c a a
a g t a c c c c g t c t c c c t g g c t t t a g c c a c c t c t c c a t c c t c
t t g c t t t c t t t g c c t g g a c a c c c c g t t c t c c t g t g g a t t c
g g g t c a c c t c t c a c t c c t t t c a t t t g g g c a g c t c c c c t a c
c c c c c t t a c c t c t c t a g t c t g t g c t a g c t c t t c c a g c c c c
c t g t c a t g g c a t c t t c c a g g g g t c c g a g a g c t c a g c t a g t
c t t c t t c c t c c a a c c c g g g c c c c t a t g t c c a c t t c a g g a c
a g c a t g t t t g c t g c c t c c a g g g a t c c t g t g t c c c c g a g c t
g g g a c c a c c t t a t a t t c c c a g g g c c g g t t a a t g t g g c t c t
g g t t c t g g g t a c t t t t a t c t g t c c c c t c c a c c c c a c a g t g
g g g c

30

40

配列番号9 PAM gRNA

ccaatcctgtccctagtggcccc

配列番号10 スプライスアクセプター

a t c g a t c g c a g g c g c a a t c t t c g c a t t t c t t t t t t c c a g

配列番号11 BGHポリAターミネーター

c c t c g a c t g t g c c t t c t a g t t g c c a g c c a t c t g t t g t t t g

50

c c c c t c c c c g t g c c t t c c t t g a c c c t g g a a g g t g c c a c t
c c c a c t g t c c t t t c c t a a t a a a a t g a g g a a a t t g c a t c g c
a t t g t c t g a g t a g g t g t c a t t c t a t t c

配列番号12 mCherry

g t g a g c a a g g g c g a g g a g g a t a a c a t g g c c a t c a t c a a g g
a g t t c a t g c g c t t c a a g g t g c a c a t g g a g g g c t c c g t g a a
c g g c c a c g a g t t c g a g a t c g a g g g c g a g g g c g a g g g c g c
c c c t a c g a g g g c a c c c a g a c c g c c a a g c t g a a g g t g a c c a
a g g g t g g c c c c t g c c c t t c g c c t g g g a c a t c c t g t c c c c
t c a g t t c a t g t a c g g c t c c a a g g c c t a c g t g a a g c a c c c c
g c c g a c a t c c c c g a c t a c t t g a a g c t g t c c t t c c c c g a g g
g c t t c a a g t g g g a g c g c g t g a t g a a c t t c g a g g a c g g c g g
c g t g g t g a c c g t g a c c c a g g a c t c c t c c c t g c a g g a c g g c
g a g t t c a t c t a c a a g g t g a a g c t g c g c g g c a c c a a c t t c c
c c t c c g a c g g c c c c g t a a t g c a g a a g a a g a c c a t g g g c t g
g g a g g c c t c c t c c g a g c g g a t g t a c c c c g a g g a c g g c g c c
c t g a a g g g c g a g a t c a a g c a g a g g c t g a a g c t g a a g g a c g
g c g g c c a c t a c g a c g c t g a g g t c a a g a c c a c c t a c a a g g c
c a a g a a g c c c g t g c a g c t g c c c g g c g c c t a c a a c g t c a a c
a t c a a g t t g g a c a t c a c c t c c c a c a a c g a g g a c t a c a c c a
t c g t g g a a c a g t a c g a a c g c g c c g a g g g c c g c c a c t c c a c
c g g c g g c a t g g a c g a g c t g t a c a a g t a a

10

20

配列番号13 組み込まれたmCherry導入遺伝子を有する30bpのプラスミド。

t t a t c t g t c c c c t c c a c c c c a c a g t g g g g c c a c t a g g g a c
a g c g a t c g g g t a c a t c g a t c g c a g g c g c a a t c t t c g c a t t
t c t t t t t t c c a g g t g a g c a a g g g c g a g g a g g a t a a c a t g g
c c a t c a t c a a g g a g t t c a t g c g c t t c a a g g t g c a c a t g g a
g g g c t c c g t g a a c g g c c a c g a g t t c g a g a t c g a g g g c g a g
g g c g a g g g c c g c c c c t a c g a g g g c a c c c a g a c c g c c a a g c
t g a a g g t g a c c a a g g g t g g c c c c c t g c c c t t c g c c t g g g a
c a t c c t g t c c c c t c a g t t c a t g t a c g g c t c c a a g g c c t a c
g t g a a g c a c c c c g c c g a c a t c c c c g a c t a c t t g a a g c t g t
c c t t c c c c g a g g g c t t c a a g t g g g a g c g c g t g a t g a a c t t
c g a g g a c g g c g g c g t g g t g a c c g t g a c c c a g g a c t c c t c c
c t g c a g g a c g g c g a g t t c a t c t a c a a g g t g a a g c t g c g c g
g c a c c a a c t t c c c c t c c g a c g g c c c c g t a a t g c a g a a g a a
g a c c a t g g g c t g g g a g g c c t c c t c c g a g c g g a t g t a c c c c
g a g g a c g g c g c c c t g a a g g g c g a g a t c a a g c a g a g g c t g a
a g c t g a a g g a c g g c g g c c a c t a c g a c g c t g a g g t c a a g a c
c a c c t a c a a g g c c a a g a a g c c c g t g c a g c t g c c c g g c g c c
t a c a a c g t c a a c a t c a a g t t g g a c a t c a c c t c c c a c a a c g
a g g a c t a c a c c a t c g t g g a a c a g t a c g a a c g c g c c g a g g g
c c g c c a c t c c a c c g g c g g c a t g g a c g a g c t g t a c a a g t a a
c g c g g c c g c c c t c g a c t g t g c c t t c t a g t t g c c a g c c a t c
t g t t g t t t g c c c c t c c c c g t g c c t t c c t t g a c c c t g g a a
g g t g c c a c t c c c a c t g t c c t t t c c t a a t a a a a t g a g g a a a
t t g c a t c g c a t t g t c t g a g t a g g t g t c a t t c t a t t c g a t t
g g t g a c a g a a a a g c c c c a t c c t t a g g

30

40

配列番号14 組み込まれたmCherry導入遺伝子を有する300bpのプラスミド。

g t t c t c c t g t g g a t t c g g g t c a c c t c t c a c t c c t t t c a t t

50

t g g g c a g c t c c c c t a c c c c c c t t a c c t c t c t a g t c t g t g c
t a g c t c t t c c a g c c c c c t g t c a t g g c a t c t t c c a g g g g t c
c g a g a g c t c a g c t a g t c t t c t t c c t c c a a c c c g g g c c c c t
a t g t c c a c t t c a g g a c a g c a t g t t t g c t g c c t c c a g g g a t
c c t g t g t c c c c g a g c t g g g a c c a c c t t a t a t t c c c a g g g c
c g g t t a a t g t g g c t c t g g t t c t g g g t a c t t t t a t c t g t c c
c c t c c a c c c c a c a g t g g g g c c a c t a g g g a c a g c g a t c g g g
t a c a t c g a t c g c a g g c g c a a t c t t c g c a t t t c t t t t t c c
a g g t g a g c a a g g g c g a g g a g g a t a a c a t g g c c a t c a t c a a
g g a g t t c a t g c g c t t c a a g g t g c a c a t g g a g g g c t c c g t g
a a c g g c c a c g a g t t c g a g a t c g a g g g c g a g g g c g a g g g c c
g c c c c t a c g a g g g c a c c c a g a c c g c c a a g c t g a a g g t g a c
c a a g g g t g g c c c c c t g c c c t t c g c c t g g g a c a t c c t g t c c
c c t c a g t t c a t g t a c g g c t c c a a g g c c t a c g t g a a g c a c c
c c g c c g a c a t c c c c g a c t a c t t g a a g c t g t c c t t c c c c g a
g g g c t t c a a g t g g g a g c g c g t g a t g a a c t t c g a g g a c g g c
g g c g t g g t g a c c g t g a c c c a g g a c t c c t c c c t g c a g g a c g
g c g a g t t c a t c t a c a a g g t g a a g c t g c g c g g c a c c a a c t t
c c c c t c c g a c g g c c c c g t a a t g c a g a a g a a g a c c a t g g g c
t g g g a g g c c t c c t c c g a g c g g a t g t a c c c c g a g g a c g g c g
c c c t g a a g g g c g a g a t c a a g c a g a g g c t g a a g c t g a a g g a
c g g c g g c c a c t a c g a c g c t g a g g t c a a g a c c a c c t a c a a g
g c c a a g a a g c c c g t g c a g c t g c c c g g c g c c t a c a a c g t c a
a c a t c a a g t t g g a c a t c a c c t c c c a c a a c g a g g a c t a c a c
c a t c g t g g a a c a g t a c g a a c g c g c c g a g g g c c g c c a c t c c
a c c g g c g g c a t g g a c g a g c t g t a c a a g t a a c g c g g c c g c c
c t c g a c t g t g c c t t c t a g t t g c c a g c c a t c t g t t g t t t g c
c c c t c c c c g t g c c t t c c t t g a c c c t g g a a g g t g c c a c t c
c c a c t g t c c t t t c c t a a t a a a a t g a g g a a a t t g c a t c g c a
t t g t c t g a g t a g g t g t c a t t c t a t t c g a t t g g t g a c a g a a
a a g c c c c a t c c t t a g g c c t c c t c c t t c c t a g t c t c c t g a t
a t t g g g t c t a a c c c c c a c c t c c t g t t a g g c a g a t t c c t t a
t c t g g t g a c a c a c c c c c a t t t c c t g g a g c c a t c t c t c t c c
t t g c c a g a a c c t c t a a g g t t t g c t t a c g a t g g a g c c a g a g
a g g a t c c t g g g a g g g a g a g c t t g g c a g g g g g t g g g a g g g a
a g g g g g g g a t g c g t g a c c t g c c c g g t t c t c a g t g g c c a c c
c t g c g c t a c c c t c t c c c a g a a c c t g a g c t g c t c t g a c g c g
g c t g t c

配列番号15 組み込まれたmCherry導入遺伝子を有する500bpのプラスミド。

t c c c t t t t c c t t c t c c t t c t g g g g c c t g t g c c a t c t c t c g
t t t c t t a g g a t g g c c t t c t c c g a c g g a t g t c t c c c t t g c g
t c c c g c c t c c c c t t c t t g t a g g c c t g c a t c a t c a c c g t t t
t t c t g g a c a a c c c c a a a g t a c c c c g t c t c c c t g g c t t t a g
c c a c c t c t c c a t c c t c t t g c t t t c t t t g c c t g g a c a c c c c
g t t c t c c t g t g g a t t c g g g t c a c c t c t c a c t c c t t t c a t t
t g g g c a g c t c c c c t a c c c c c c t t a c c t c t c t a g t c t g t g c
t a g c t c t t c c a g c c c c c t g t c a t g g c a t c t t c c a g g g g t c
c g a g a g c t c a g c t a g t c t t c t t c c t c c a a c c c g g g c c c c t
a t g t c c a c t t c a g g a c a g c a t g t t t g c t g c c t c c a g g g a t
c c t g t g t c c c c g a g c t g g g a c c a c c t t a t a t t c c c a g g g c

10

20

30

40

50

c g g t t a a t g t g g c t c t g g t t c t g g g t a c t t t t a t c t g t c c
c c t c c a c c c c a c a g t g g g g c c a c t a g g g a c a g c g a t c g g g
t a c a t c g a t c g c a g g c g c a a t c t t c g c a t t t c t t t t t t c c
a g g t g a g c a a g g g c g a g g a g g a t a a c a t g g c c a t c a t c a a
g g a g t t c a t g c g c t t c a a g g t g c a c a t g g a g g g c t c c g t g
a a c g g c c a c g a g t t c g a g a t c g a g g g c g a g g g c g a g g g c c
g c c c c t a c g a g g g c a c c c a g a c c g c c a a g c t g a a g g t g a c
c a a g g g t g g c c c c c t g c c c t t c g c c t g g g a c a t c c t g t c c
c c t c a g t t c a t g t a c g g c t c c a a g g c c t a c g t g a a g c a c c
c c g c c g a c a t c c c c g a c t a c t t g a a g c t g t c c t t c c c c g a
g g g c t t c a a g t g g g a g c g c g t g a t g a a c t t c g a g g a c g g c
g g c g t g g t g a c c g t g a c c c a g g a c t c c t c c c t g c a g g a c g
g c g a g t t c a t c t a c a a g g t g a a g c t g c g c g g c a c c a a c t t
c c c c t c c g a c g g c c c c g t a a t g c a g a a g a a g a c c a t g g g c
t g g g a g g c c t c c t c c g a g c g g a t g t a c c c c g a g g a c g g c g
c c c t g a a g g g c g a g a t c a a g c a g a g g c t g a a g c t g a a g g a
c g g c g g c c a c t a c g a c g c t g a g g t c a a g a c c a c c t a c a a g
g c c a a g a a g c c c g t g c a g c t g c c c g g c g c c t a c a a c g t c a
a c a t c a a g t t g g a c a t c a c c t c c c a c a a c g a g g a c t a c a c
c a t c g t g g a a c a g t a c g a a c g c g c c g a g g g c c g c c a c t c c
a c c g g c g g c a t g g a c g a g c t g t a c a a g t a a c g c g g c c g c c
c t c g a c t g t g c c t t c t a g t t g c c a g c c a t c t g t t g t t t g c
c c c t c c c c g t g c c t t c c t t g a c c c t g g a a g g t g c c a c t c
c c a c t g t c c t t t c c t a a t a a a a t g a g g a a a t t g c a t c g c a
t t g t c t g a g t a g g t g t c a t t c t a t t c g a t t g g t g a c a g a a
a a g c c c c a t c c t t a g g c c t c c t c c t t c c t a g t c t c c t g a t
a t t g g g t c t a a c c c c c a c c t c c t g t t a g g c a g a t t c c t t a
t c t g g t g a c a c a c c c c c a t t t c c t g g a g c c a t c t c t c t c c
t t g c c a g a a c c t c t a a g g t t t g c t t a c g a t g g a g c c a g a g
a g g a t c c t g g g a g g g a g a g c t t g g c a g g g g g t g g g a g g g a
a g g g g g g g a t g c g t g a c c t g c c c g g t t c t c a g t g g c c a c c
c t g c g c t a c c c t c t c c c a g a a c c t g a g c t g c t c t g a c g c g
g c t g t c t g g t g c g t t t c a c t g a t c c t g g t g c t g c a g c t t c
c t t a c a c t t t c c c a a g a g g a g a a g c a g t t t g g a a a a c a a a
a t c a g a a t a a g t t g g t c c t g a g t t c t a a c t t t g g c t c t t c
a c c t t t c t a g t c c c c a a t t t a t a t t g t t c c t c c g t g c g t c
a g t t t t a c c t g t g a g a t a a g g c c a g t a g c c a g c c c c g t c c
t g g c a g

配列番号16 組み込まれたmCherry導入遺伝子を有する800bpのプラスミド。

t g c t t t c t c t g a c c t g c a t t c t c t c c c c t g g g c c t g t g c c
g c t t t c t g t c t g c a g c t t g t g g c c t g g g t c a c c t c t a c g g
c t g g c c c a g a t c c t t c c c t g c c g c c t c c t t c a g g t t c c g t
c t t c c t c c a c t c c c t c t t c c c c t t g c t c t c t g c t g t g t t g
c t g c c c a a g g a t g c t c t t t c c g g a g c a c t t c c t t c t c g g c
g c t g c a c c a c g t g a t g t c c t c t g a g c g g a t c c t c c c c g t g
t c t g g g t c c t c t c c g g g c a t c t c t c c t c c c t c a c c c a a c c
c c a t g c c g t c t t c a c t c g c t g g g t t c c c t t t t c c t t c t c c
t t c t g g g g c c t g t g c c a t c t c t c g t t t c t t a g g a t g g c c t
t c t c c g a c g g a t g t c t c c c t t g c g t c c c g c c t c c c c t t c t
t g t a g g c c t g c a t c a t c a c c g t t t t c t g g a c a a c c c c a a

10

20

30

40

50

agtaaccccgctctccctggccttttagccacctctccatccctc
ttgctttcttttgccctggacaccccggtctctctgtggattc
gggtcacctctcactccctttcatttgggcagctcccttac
cccccttacctctcttagtctgtgctagctcttccagcccc
ctgtcatggcatcttccagggggtccgagagctcagctagt
cttcttctctccaacccggggcccttatgtccacttcaggac
agcatgttttgctgcccctcaggggatccctgtgtcccccagact
gggaccaccttataattcccaggggccgggttaattgtggctct
ggttcttggggtaccttttatactgtcccccctccaccccaagtg
ggggccactaggggacagcgatcggggtacatcgatcgagggc
gcaatcttctgcattttcttttttccagggtgagcaaggggcga
ggaggataaacatggccatcatcaaggagttcatgcgcttcc
aagggtgcacatggaggggctccggtgaacgggccacgaggttcg
agatcgaggggcggaggggcggaggggccgccccctacgaggggcac
ccagaccggccaagctgaagggtgaccaaagggtgggcccccctg
cccccttgcctgggacatccctgtcccccctcagttcatgtacg
gctcccaaggccctacgtgaagcaccgccgacatccccga
ctacttgaagctgtcttcccccaggggcttcaagtgggag
cgcggtgatgaacttcgagggaaggcgggcggtgggtgaccggtga
cccagggaactccctcccttgccagggaaggcgagttcatctacaa
gggtgaagctgcggcggaaccaaacttcccccctcgcagggcccc
gtaattgcagaagaagacccatggggctgggaggccctctcccg
agcgggatgtaccccgagggaaggcgccctgaaggggcgagat
caagcagagggtgaagctgaagggaaggcgggccactacgac
gctgagggtcaagaccacctacaaaggccaagaagcccggtgc
agctgcccggcgccctacaaacgtcaaacatcaagtttggaacat
caccctcccaacaacgagggaactacaccatcgtgggaacagtac
gaacgcgccgaggggccgcccactccaccggcgggcatgggacg
agctgtatacaagtaaacgcgggccgccccctcgactgtgtcccttct
agttgccaagccatctgtttgtttgccccctcccccgtgacctt
ccttgacccttggaagggtgccacctcccaactgtccctttctta
ataaaaatgagggaattgcatcgcatctgtctgagtaggtgt
cattctattctgattggtgacagaaaaggccccatccttagg
cctccctcccttcttagtctctcttgatattgggtcttaaccccc
acctccctgttaggcagattctcttatactgggtgacacacccc
cattttccctggagccatctctctctcttgcagaaacctctaa
ggttttgcttacgatggaggccagagaggatccctgggaggga
gagcttggcagggggggtgggagggaagggggggagtgcgtga
cctgcccgggttctcagtgggccacccctgcgctacccctctcc
cagaacctgagctgctctgacgcggcgtgtctgggtgcgttt
cactgatccctgggtgctgcagcttcccttaacacttcccaaga
ggagaaagcagtttggaaaaaacaaaatcagaataagttggt
cctgaggttctaaactttggcctcttccacctttctagtcccca
atttataattgttctctccgtgctgtcagttttaccctgtgaga
taagggccagtagccagccccgctcctggcaggggctgtgggtg
aggagggggggtgtccgtgtggaaaaactccccctttgtgagaa
tggtgctgtccctagggtgttccaccagggtcgtggccgcccctta
ctcccccttctcttcttctcattcccttcttcttaaaagagtc
cccagtgctatctgggacataattccctccgccccagagcagg
gtccccgcttccctaaaggccctgtctctgggcttctgggttt

10

20

30

40

50

g a g t c c t t g g c a a g c c c a g g a g a g g c g c t c a g g c t t c c c t
g t c c c c c t t c c t c g t c c a c c a t c t c a t g c c c c t g g c t c t c
c t g c c c c t t c c c t a c a g g g g t t c c t g g c t c t g c t c t t c a g
a c t g a g c c c c g t t c c c c t g c a t c c c c g t t c c c c t g c a t c c
c c c t t c c c c t g c a t c c c c c a g a g g c c c c a g g c c a c c t a c t
t g g c c t g g a c c c c a c g a g a g g c c a c c c c a g c c c t g t c t a c
c a g g c t g c c t t t t g g g t g g a t t c t c c t c c a a c t g t g g g g t
g a c t g c t t g g

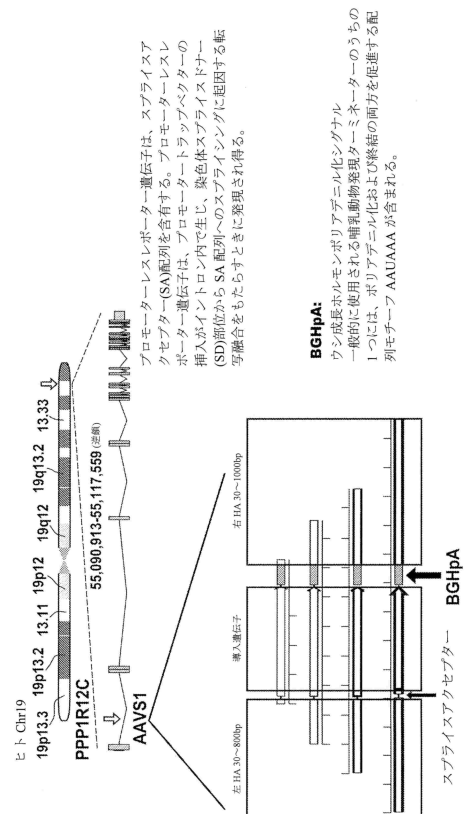
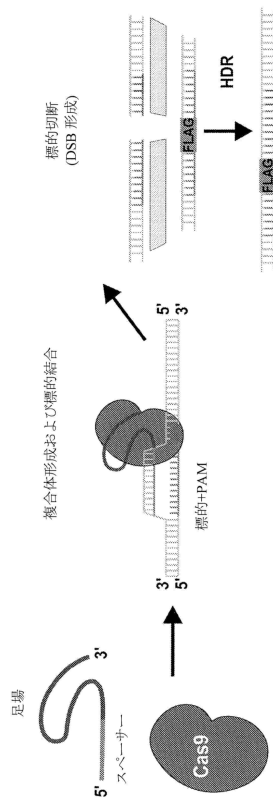
配列番号 17 (c r R N A)

G G G G C C A C T A G G G A C A G G A T

【図面】

【図 1 - 1】

【図 1 - 2】



10

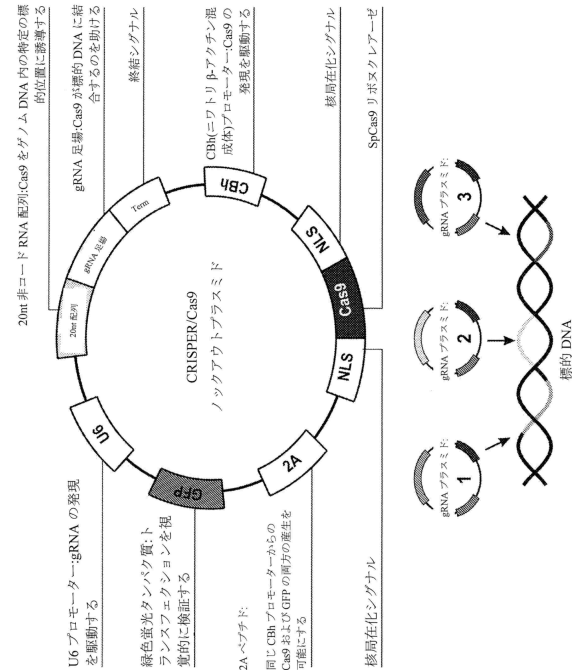
20

30

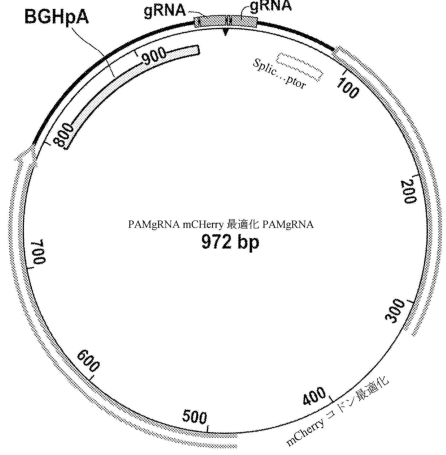
40

50

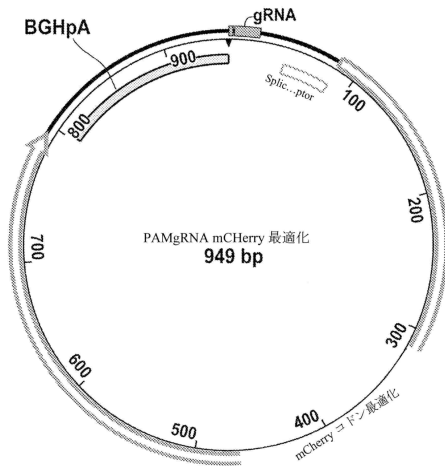
【図 2】



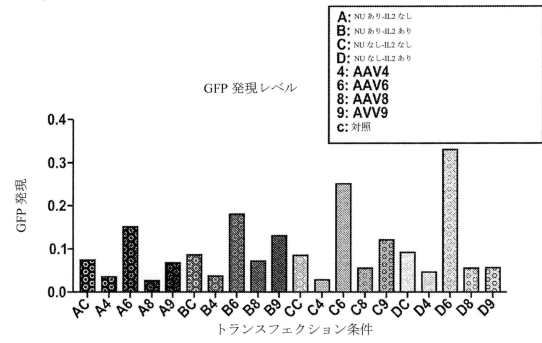
【図 3 A】



【図 3 B】



【図 4 A】



10

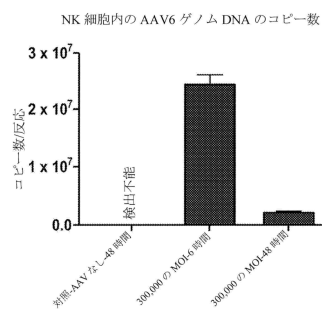
20

30

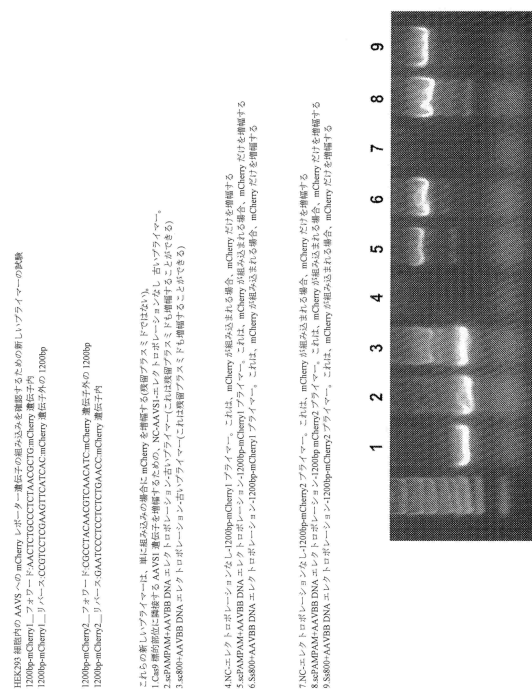
40

50

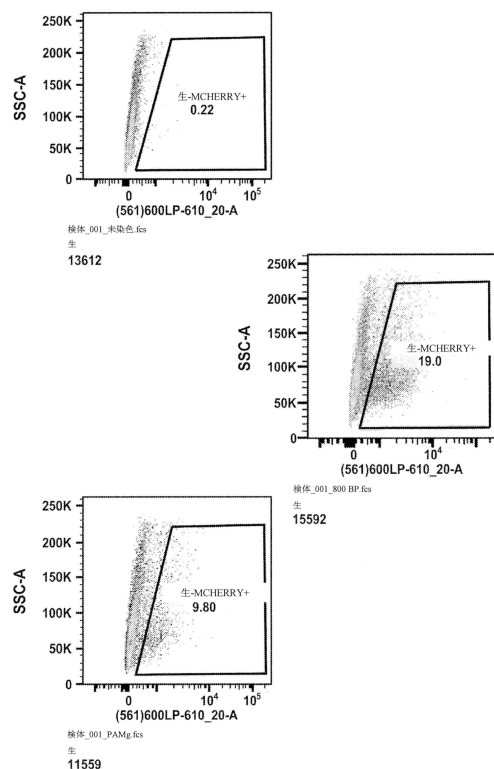
【図 4 B】



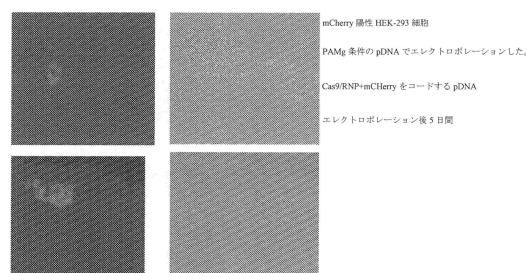
【図 5 A】



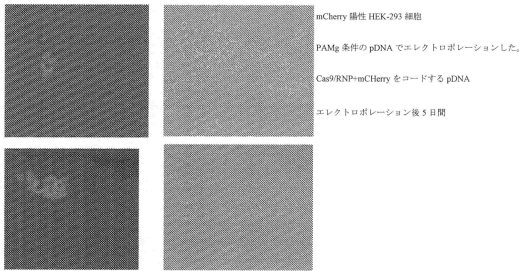
【図 5 B】



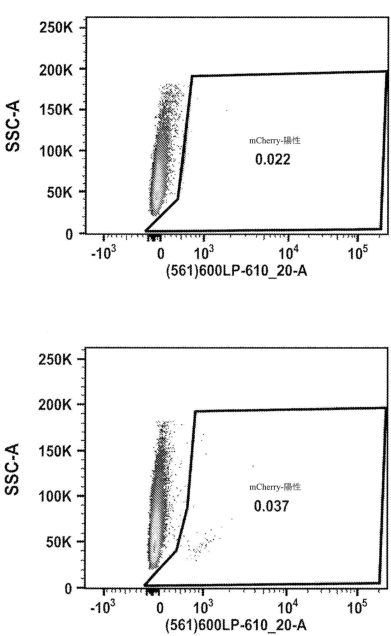
【図 5 C】



【図 6 A】



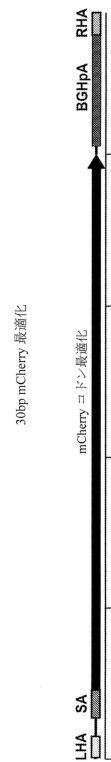
【図 6 B】



10

20

【図 7 A】



【図 7 B】

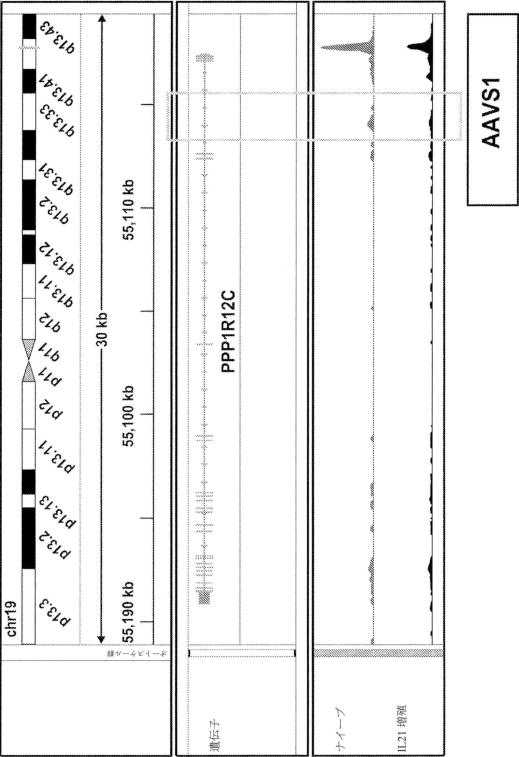
ttatctgtccctccaccacacagtgaggccacitaggacagggatcgggtacatcaatccagagccacatc
ttccgatatcttcttccaggtgagcaaggcggagagataacatggccatcaatcaaggagttcatggcct
tcaaggtagcatalggagggtccgtgaaacggccacaggttcgagatcgaggcgaggcgagggccccc
acgaggcaccagaccgccaagctgaaggtagccacaggttgccccccttccgttccgttgggacatccct
cccttcagttcatgttacggctccaaagcctacgtgaagcaccgccgcgacatcccccacttgaagcgtgt
ccttcccgagggttcaagtgaggcggttgaagccttggagacggcggtgggtgacctgacccagc
acttccctcgaggacggcggttcatctacaaggtgaagcctggcgacggaacattccctccgacgccc
ccglaatgcagaagaagacatgggctggaggccctctcggaggatgtaccgcgagggcgccctga
aggcgagatcaagcagaggctgaagcgaaggacggcgccctacgacgtgaggatcaagaccctaca
aggccaagaagccgtgcagctgcccggcgttacaagtcacatcaagttggacatcaactccacacag
aggactacaccatcgtggacagtagcaagcgcggaggccacatccacggcggtcatggagagcgtgt
acaagtaacggggccgcttcgactgtggttgaagtgccagcagcagcgtgtgttgccttcccggtgc
ttccctggccctggaggtgacacacacgttcccttccatcaatcaaatgaaggaattgaatccatctaa
gagtaggttccatctcttggatgggtggacagaaagcccatccttgg

30

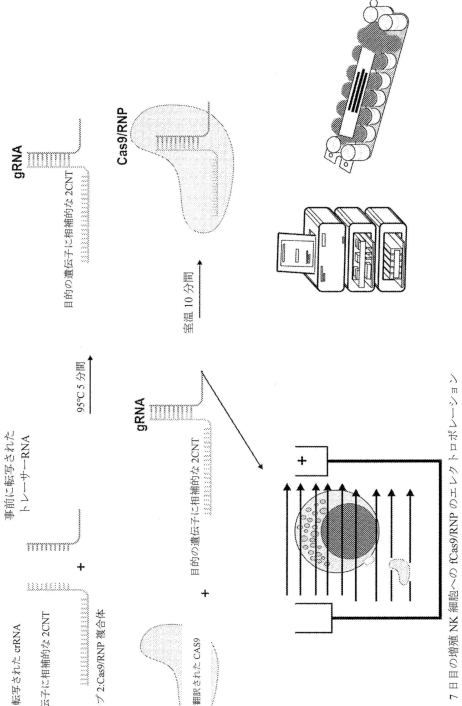
40

50

【図 10】



【図 11】

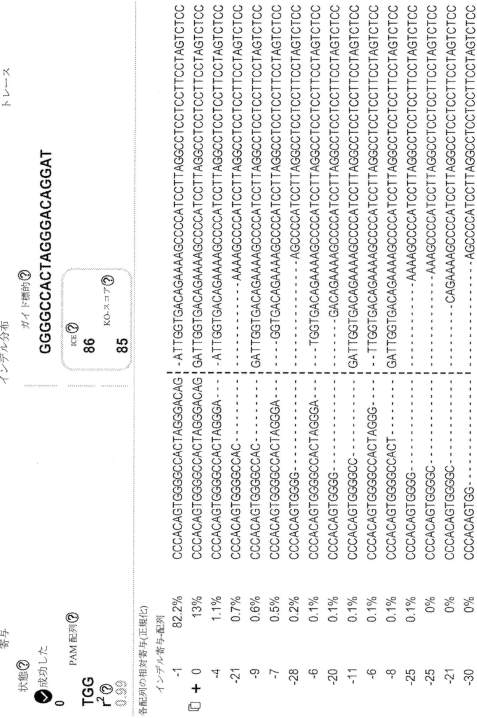


7 日目の増殖 NK 細胞への Cas9/RNP のエレクトロポレーション

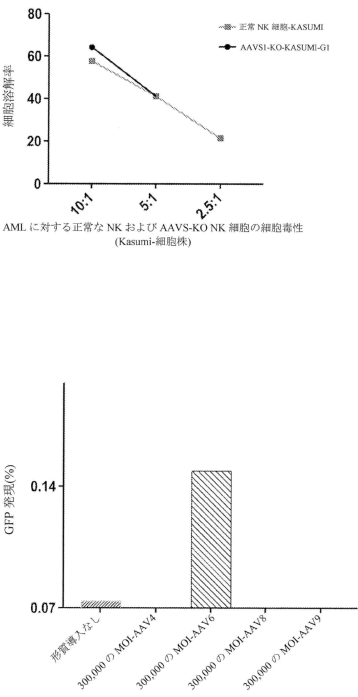
10

20

【図 12】



【図 13】

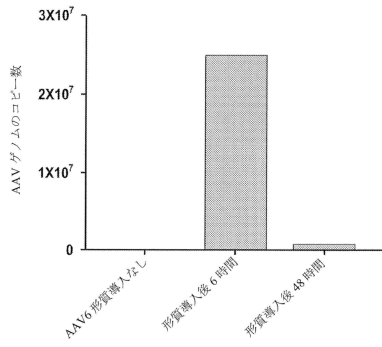


30

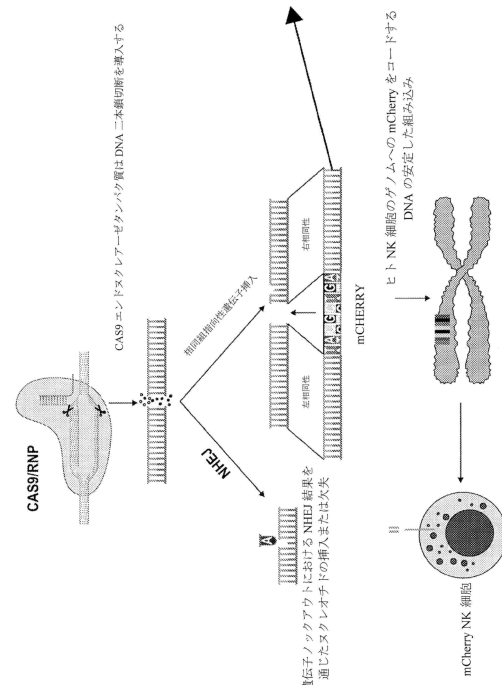
40

50

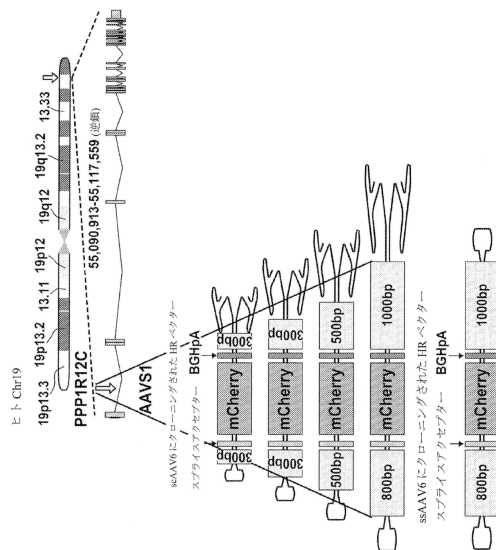
【図 14】



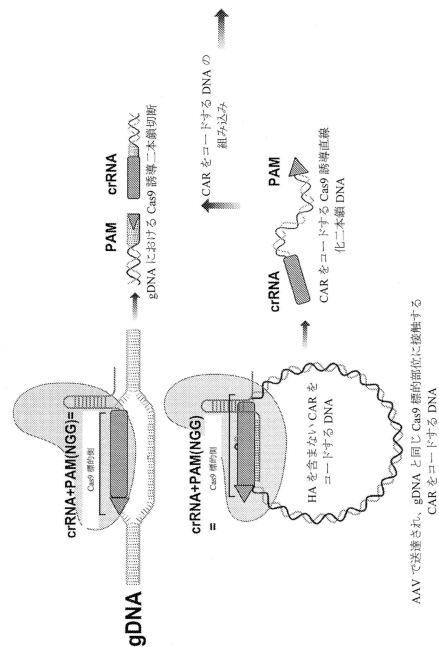
【図 15-1】



【図 15-2】



【図 16A-1】



10

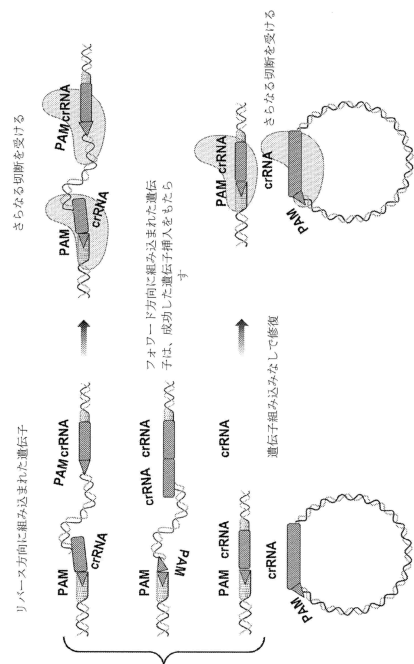
20

30

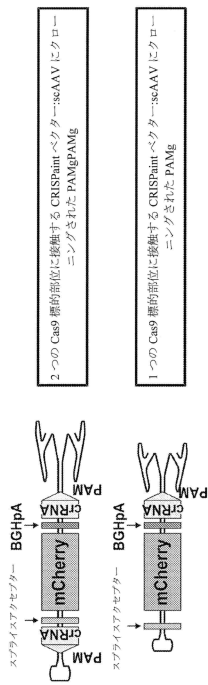
40

50

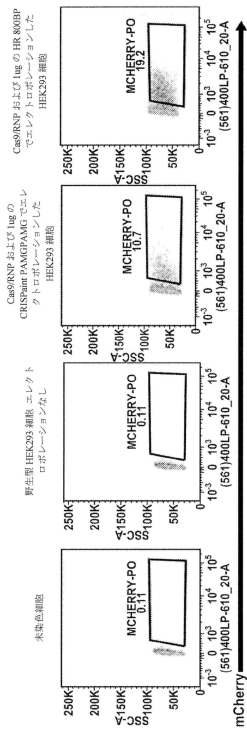
【図 16 A - 2】



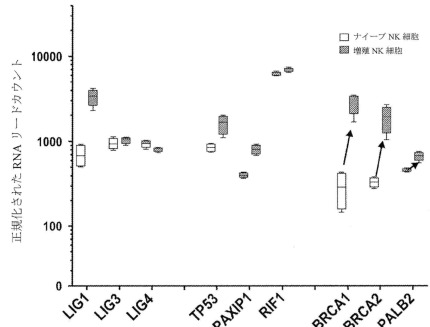
【図 16 B】



【図 17】



【図 18】



10

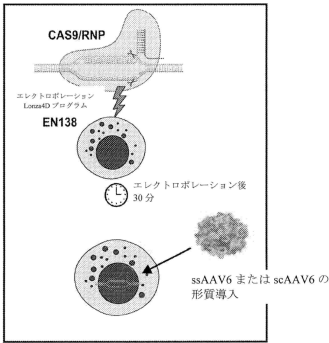
20

30

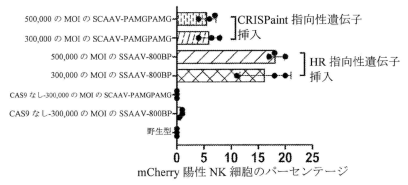
40

50

【図 19】

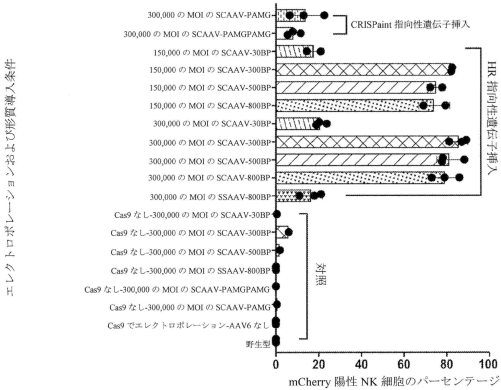


【図 20】

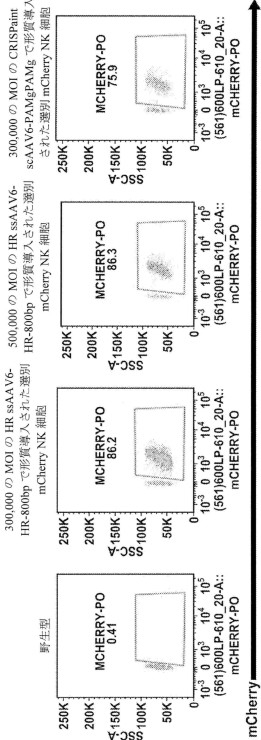


10

【図 21】



【図 22】



20

30

【配列表】

0007702878000001.app

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	40/15	(2025.01)	A 6 1 K	40/15
A 6 1 K	40/31	(2025.01)	A 6 1 K	40/31
A 6 1 K	40/42	(2025.01)	A 6 1 K	40/42
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00

アメリカ合衆国 4 3 2 0 5 オハイオ州, キャナル ウィンチェスター, シタリー ロード 2 5 6 1

(72)発明者 マイヤー, キャスリン, クリスティン

アメリカ合衆国 4 3 2 0 5 オハイオ州, コロンバス, チルドレンズ ドライブ 7 0 0

(72)発明者 カラロウディ, メイサム, ナエイミ

アメリカ合衆国 4 3 2 4 0 オハイオ州, コロンバス, シアトル アベニュー 8 3 7 2, アパートメント 1 0 1 1 0

(72)発明者 リキーテ, シビ

アメリカ合衆国 4 3 2 0 5 オハイオ州, コロンバス, チルドレンズ ドライブ 7 0 0, ダブリュエー 4 1 1 2

審査官 團野 克也

(56)参考文献 国際公開第2019/005957 (WO, A1)

国際公開第2018/081470 (WO, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

IPC C12N 15/00-15/90

DB名 CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS

/EMBASE (STN)

JSTPLUS/JST7580

/JMEDPLUS (JDreamIII)