

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6830437号
(P6830437)

(45) 発行日 令和3年2月17日 (2021.2.17)

(24) 登録日 令和3年1月28日 (2021.1.28)

(51) Int. Cl.

F I

A O 1 K	67/027	(2006.01)	A O 1 K	67/027	Z N A
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 K	35/12	(2015.01)	A 6 1 K	35/12	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 O 5
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/09	Z

請求項の数 19 (全 150 頁)

(21) 出願番号 特願2017-530596 (P2017-530596)
 (86) (22) 出願日 平成27年12月10日 (2015.12.10)
 (65) 公表番号 特表2018-500897 (P2018-500897A)
 (43) 公表日 平成30年1月18日 (2018.1.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/065029
 (87) 国際公開番号 W02016/094679
 (87) 国際公開日 平成28年6月16日 (2016.6.16)
 審査請求日 平成30年12月7日 (2018.12.7)
 (31) 優先権主張番号 62/090,037
 (32) 優先日 平成26年12月10日 (2014.12.10)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/253,493
 (32) 優先日 平成27年11月10日 (2015.11.10)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(73) 特許権者 305023366
 リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ
 オブ ミネソタ
 アメリカ合衆国 ミネソタ 55455-
 2020 ミネアポリス, オーク スト
 リートーエス・イー 200, マクナマ
 ラ アラムナイ センター 600
 (74) 代理人 100107489
 弁理士 大塩 竹志
 (72) 発明者 ヘリング, バーナード ジェイ.
 アメリカ合衆国 ミネソタ 55305,
 ミネトンカ, ヒロウェイ ロード ダ
 ブリュウ. 12308

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 疾患を処置するための遺伝子改変された細胞、組織および臓器

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ローラシア獣上目のメンバーである、または非ヒト霊長類である、遺伝子改変された動物であって、

a) ヒト白血球抗原 G (H L A - G) 配列を含むタンパク質をコードする外因性ポリヌクレオチド配列、および

b) 糖タンパク質ガラクトシルトランスフェラーゼアルファ 1, 3 (G G T A 1) の低減されたタンパク質発現を生じる、G G T A 1 をコードする遺伝子における破壊を含み、

前記低減されたタンパク質発現は、遺伝子改変されていない対応する動物と比較したものであり、ここで、前記遺伝子改変された動物は、前記 H L A - G 配列を含む前記タンパク質の遍在性の発現を含む、遺伝子改変された動物。

【請求項 2】

前記 H L A - G が H L A - G 1 を含む、請求項 1 に記載の遺伝子改変された動物。

【請求項 3】

前記 H L A - G 配列が β - 2 - ミクログロブリン (B 2 M) 配列をさらに含む、請求項 1 に記載の遺伝子改変された動物。

【請求項 4】

前記遺伝子改変されていない対応する動物と比較して、推定シチジナーリン酸-N-アセチルノイラミン酸ヒドロキシラーゼ様タンパク質 (C M A H)、N O D 様受容体ファミ

10

20

リーCARDドメイン含有5 (NLRC5)、 β 1, 4 N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ (B4GalNT2)、またはこれらの組み合わせの低減されたタンパク質発現をさらに含む、請求項1に記載の遺伝子改変された動物。

【請求項5】

β -2-ミクログロブリン (B2M)、ヒト白血球抗原E (HLA-E)、またはこれらの組み合わせを含むタンパク質をコードする外因性ポリヌクレオチド配列をさらに含む、請求項1に記載の遺伝子改変された動物。

【請求項6】

前記外因性ポリヌクレオチド配列が、前記GGTA1をコードする遺伝子中に挿入される、請求項1に記載の遺伝子改変された動物。

10

【請求項7】

ローラシア獣上目のメンバーを含み、ローラシア獣上目の前記メンバーが有蹄動物である、請求項1に記載の遺伝子改変された動物。

【請求項8】

前記有蹄動物がブタである、請求項7に記載の遺伝子改変された動物。

【請求項9】

前記遺伝子改変された動物が、CMAHをコードする遺伝子、NLRC5をコードする遺伝子、B4GalNT2をコードする遺伝子、またはこれらの組み合わせにおける破壊を含む、請求項1に記載の遺伝子改変された動物。

【請求項10】

20

請求項1から9のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物から単離された、遺伝子改変された細胞、組織または臓器。

【請求項11】

ローラシア獣上目のメンバーである、または非ヒト霊長類である、遺伝子改変された細胞であって、

a) ヒト白血球抗原G (HLA-G) をコードする外因性ポリヌクレオチド配列、および

b) 糖タンパク質ガラクトシルトランスフェラーゼアルファ1, 3 (GGTA1) の低減されたタンパク質発現を生じる、GGTA1をコードする遺伝子における破壊を含む、

30

前記低減されたタンパク質発現は、遺伝子改変されていない対応する細胞と比較したものであり、ここで、前記外因性ポリヌクレオチド配列は、前記遺伝子改変された細胞のゲノム中の標的遺伝子座中に挿入される、遺伝子改変された細胞。

【請求項12】

前記HLA-GがHLA-G1である、請求項11に記載の遺伝子改変された細胞。

【請求項13】

ローラシア獣上目の細胞を含み、前記ローラシア獣上目が有蹄動物である、請求項11に記載の遺伝子改変された細胞。

【請求項14】

前記有蹄動物がブタである、請求項13に記載の遺伝子改変された細胞。

40

【請求項15】

前記遺伝子改変されていない対応する細胞と比較して、推定シチジノーリン酸-N-アセチルノイラミン酸ヒドロキシラーゼ様タンパク質 (CMAH)、NOD様受容体ファミリーCARDドメイン含有5 (NLRC5)、 β 1, 4 N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ (B4GalNT2)、もしくはこれらの組み合わせの低減されたタンパク質発現をさらに含む、かつ／または β -2-ミクログロブリン (B2M)、ヒト白血球抗原E (HLA-E)、もしくはこれらの組み合わせをコードする外因性ポリヌクレオチド配列をさらに含む、請求項11に記載の遺伝子改変された細胞。

【請求項16】

前記外因性ポリヌクレオチド配列が、前記GGTA1をコードする遺伝子中に挿入され

50

る、かつ／または前記遺伝子改変された細胞がブタのものである、かつ／または前記遺伝子改変された細胞が、CMAHをコードする遺伝子、NLRC-5をコードする遺伝子、B4GalNT2をコードする遺伝子、もしくはこれらの組み合わせにおける破壊を含む、請求項11に記載の遺伝子改変された細胞。

【請求項17】

状態の処置を必要とする対象において、前記対象における前記状態を処置するための、請求項10に記載の遺伝子改変された細胞、組織もしくは臓器、または請求項11に記載の遺伝子改変された細胞を含む組成物であって、前記組成物は、前記対象に移植されることを特徴とする、組成物。

【請求項18】

10

状態の処置を必要とする対象において、前記対象における前記状態を処置するための寛容化ワクチンであって、前記寛容化ワクチンは、前記対象において、前記遺伝子改変された細胞、組織または臓器に対する寛容を生じさせるのに十分な量で、請求項17に記載の組成物と組み合わせて前記対象に投与されることを特徴とし、前記寛容化ワクチンがアポトーシス性細胞を含み、前記アポトーシス性細胞が、移植される前記遺伝子改変された細胞、組織、または臓器が単離された遺伝子改変された動物と同一の遺伝子改変された動物から単離されたものである、寛容化ワクチン。

【請求項19】

前記アポトーシス性細胞が、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDCI)で固定された細胞である、請求項18に記載の寛容化ワクチン。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

本願は、2014年12月10日に出願された米国仮特許出願第62/090,037号、および2015年11月10日に出願された米国仮特許出願第62/253,493号の利益を主張し、これら両者の全体が本明細書中に参照によって組み込まれる。

【0002】

配列表

本出願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出された、その全体が参照により本明細書に組み込まれる配列表を含む。2015年12月10日に作成されたこのASCIIコピーは、47190-701.601__SL.txtと命名され、サイズは681,444バイトである。

30

【背景技術】

【0003】

ヒトなどのレシピエントにおける移植のために利用可能な臓器、組織または細胞は不足している。ヒト中への臓器、組織または細胞の異種移植または同種移植は、この要求を満たす潜在力を有し、毎年数十万もの人々を助けている。非ヒト動物が、ヒトとのそれらの解剖学および生理学的類似性に基づいて、臓器ドナーとして選択され得る。さらに、異種移植は、ヒトだけでなく獣医学適用においても意義を有する。

40

【0004】

しかし、未改変の野生型非ヒト動物組織は、ヒトなどのレシピエントによって、免疫系によって拒絶され得る。拒絶は、組織に結合する抗体および細胞媒介性免疫によって少なくとも一部引き起こされて、グラフトの喪失を生じると考えられている。例えば、ブタのグラフトは、適応免疫細胞によって媒介される細胞機構によって拒絶され得る。

【0005】

参照による組み込み

本明細書中の全ての刊行物、特許および特許出願は、各個々の刊行物、特許または特許出願が、具体的かつ個々に参照により組み込まれると示されるのと同じ程度まで、参照により組み込まれる。本明細書中の用語と組み込まれた参考文献中の用語との間に矛盾があ

50

る場合には、本明細書中の用語が支配する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

疾患を処置または予防するための組成物および方法が本明細書で開示される。疾患を処置または予防するための、遺伝子改変された細胞および遺伝子改変された細胞を作製する方法もまた開示される。遺伝子改変された非ヒト動物、ならびに、例えば、これらの遺伝子改変された非ヒト動物から細胞、組織または臓器を後に抽出し、それらを対象中に移植することによる、疾患を処置または予防することにおいて使用され得る遺伝子改変された非ヒト動物を作製する方法が、さらに開示される。遺伝子改変された細胞、組織および臓器を使用して疾患を処置または予防するための方法もまた、本明細書で開示される。遺伝子改変された非ヒト動物由来の細胞、組織および／または臓器を使用して疾患を処置または予防するための方法が、さらに開示される。

10

【0007】

一態様では、1つまたは複数の第1の遺伝子の低減されたタンパク質発現を有する遺伝子改変された動物であって、遺伝子改変された動物は、ローラシア獣（*Laurasia*）上目のメンバーであり、または非ヒト霊長類であり、1つまたは複数の第1の遺伝子は、a) 主要組織適合遺伝子複合体（MHC）I 特異的エンハンセオソーム（*enhanceosome*）の成分、b) MHC I 結合性ペプチドのトランスポーター、および／またはc) 補体成分3（C3）を含み、低減されたタンパク質発現は、遺伝子改変されていない対応する動物と比較したものである、遺伝子改変された動物が本明細書で開示される。一部の場合には、ローラシア獣上目のメンバーは、有蹄動物である。一部の場合には、有蹄動物はブタである。一部の場合には、1つまたは複数の第1の遺伝子のタンパク質発現は、遺伝子改変された動物中には存在しない。一部の場合には、タンパク質発現の低減は、1つまたは複数の第1の遺伝子の機能を不活性化する。一部の場合には、遺伝子改変された動物は、2つまたはそれ超の第1の遺伝子の低減されたタンパク質発現を有する。一部の場合には、遺伝子改変された動物は、MHC I 特異的エンハンセオソームの成分の低減された発現を含み、MHC I 特異的エンハンセオソームの成分は、NOD様受容体ファミリーCARDドメイン含有5（*NLR C5*）である。一部の場合には、遺伝子改変された動物は、MHC I 結合性ペプチドのトランスポーターの低減された発現を含み、トランスポーターは、抗原プロセッシング関連トランスポーター1（*TAP1*）である。一部の場合には、遺伝子改変された動物は、C3の低減された発現を含む。一部の場合には、遺伝子改変された動物は、3つまたはそれ超の第1の遺伝子の低減されたタンパク質発現を有する。

20

30

【0008】

一部の場合には、遺伝子改変された動物は、1つまたは複数の第2の遺伝子の低減されたタンパク質発現をさらに含み、1つまたは複数の第2の遺伝子は、a) ナチュラルキラー（NK）群2Dリガンド、b) ヒトでは発現されない内因性遺伝子、c) CXCR3受容体（*CXCR3*）3リガンド、および／またはd) MHC II トランスアクチベーター（*CIITA*）を含み、低減されたタンパク質発現は、遺伝子改変されていない対応する動物と比較したものである。一部の場合には、1つまたは複数の第2の遺伝子のタンパク質発現は、遺伝子改変された動物中には存在しない。一部の場合には、タンパク質発現の低減は、1つまたは複数の第2の遺伝子の機能を不活性化する。一部の場合には、遺伝子改変された動物は、NK群2Dリガンドの低減されたタンパク質発現を含み、NK群2Dリガンドは、MHCクラスIポリペプチド関連配列A（*MICA*）またはMHCクラスIポリペプチド関連配列B（*MICB*）である。一部の場合には、遺伝子改変された動物は、ヒトでは発現されない内因性遺伝子の低減されたタンパク質発現を含み、ヒトでは発現されない内因性遺伝子は、糖タンパク質ガラクトシルトランスフェラーゼα1, 3（*GGTA1*）、推定シチジンーリン酸-N-アセチルノイラミン酸ヒドロキシラーゼ様タンパク質（*CMAH*）またはβ1, 4 N-アセチルガラクトサミニルトランスフ

40

50

ェラーゼ（B4GALNT2）である。一部の場合には、遺伝子改変された動物は、CXCR3リガンドの低減されたタンパク質発現を含み、CXCR3リガンドは、C-X-Cモチーフモカイン10（CXCL10）である。

【0009】

一部の場合には、遺伝子改変された動物は、1つもしくは複数のタンパク質またはそれらの機能的断片をコードする1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドをさらに含み、1つまたは複数のタンパク質は、a) MHC I形成サプレッサー、b) 補体活性化のレギュレーター、c) NK細胞に対する阻害性リガンド、d) B7ファミリーメンバー、e) CD47、f) セリンプロテアーゼ阻害剤、および／またはg) ガレクチンを含む。一部の場合には、1つまたは複数のタンパク質は、ヒトタンパク質である。一部の場合には、遺伝子改変された動物は、MHC I形成サプレッサーをコードする1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含み、MHC I形成サプレッサーは、感染細胞タンパク質47（ICP47）である。一部の場合には、遺伝子改変された動物は、補体活性化のレギュレーターをコードする1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含み、補体活性化のレギュレーターは、表面抗原分類46（CD46）、表面抗原分類55（CD55）または表面抗原分類59（CD59）である。一部の場合には、遺伝子改変された動物は、NK細胞に対する阻害性リガンドをコードする1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含み、NK細胞に対する阻害性リガンドは、白血球抗原E（HLA-E）、ヒト白血球抗原G（HLA-G）またはβ-2-ミクログロブリン（B2M）である。一部の場合には、遺伝子改変された動物は、HLA-Gをコードする1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含み、HLA-Gは、HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6またはHLA-G7である。一部の場合には、HLA-Gは、HLA-G1である。一部の場合には、遺伝子改変された動物は、B7ファミリーメンバーをコードする1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含み、B7ファミリーメンバーは、プログラム死-リガンドである。一部の場合には、プログラム死-リガンドは、プログラム死-リガンド1（PD-L1）またはプログラム死-リガンド2（PD-L2）である。一部の場合には、1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドは、PD-L1およびPD-L2の両方をコードする。一部の場合には、遺伝子改変された動物は、セリンプロテアーゼ阻害剤をコードする1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含み、セリンプロテアーゼ阻害剤は、セリンプロテアーゼ阻害剤9（Spi9）である。一部の場合には、遺伝子改変された動物は、ガレクチンをコードする1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含み、ガレクチンは、ガレクチン-9である。

【0010】

一部の場合には、遺伝子改変された動物は、NLR C5もしくはTAP1、C3の低減されたタンパク質発現、CXCL10、GGTA1、CMAHおよび／もしくはB4GALNT2の低減されたタンパク質発現；ならびに／またはHLA-G1、HLA-Eもしくはそれらの機能的断片、PD-L1もしくはその機能的断片、PD-L2もしくはその機能的断片、および／またはCD47もしくはその機能的断片をコードする1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含む。一部の場合には、1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドは、遍在性プロモーターに隣接して挿入される。一部の場合には、遍在性プロモーターは、Rosa26プロモーターである。一部の場合には、1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドは、標的化遺伝子のプロモーターに隣接して、または標的化遺伝子内に挿入される。一部の場合には、標的化遺伝子は、第1の遺伝子のうちの1つまたは第2の遺伝子のうちの1つである。一部の場合には、1つまたは複数の第1の遺伝子のタンパク質発現は、CRISPR/cas系を使用して低減される。一部の場合には、1つまたは複数の第2の遺伝子のタンパク質発現は、CRISPR/cas系を使用して低減される。

【0011】

別の一態様では、NK細胞に対する阻害性リガンドまたはその機能的断片をコードする外因性ポリヌクレオチド、および内因性遺伝子の低減されたタンパク質発現を含む、ロー

10

20

30

40

50

ロシア獣上目のメンバーである、または非ヒト霊長類である、遺伝子改変された動物が本明細書で開示され、低減されたタンパク質発現は、遺伝子改変されていない対応する動物と比較したものである。一部の場合には、NK細胞に対する阻害性リガンドは、HLA-EまたはHLA-Gである。一部の場合には、NK細胞に対する阻害性リガンドは、HLA-Gであり、このHLA-Gは、HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6またはHLA-G7である。一部の場合には、HLA-Gは、HLA-G1である。一部の場合には、内因性遺伝子は、ヒトでは発現されない遺伝子である。一部の場合には、内因性遺伝子は、GGTA1、CMAHおよび／またはB4GALNT2である。

【0012】

10

一部の場合には、遺伝子改変された動物は、a) PD-L1もしくはその機能的断片、b) PD-L2もしくはその機能的断片、および／またはc) CD47もしくはその機能的断片、をコードする外因性ポリヌクレオチドをさらに含む。一部の場合には、外因性ポリヌクレオチドは、遍在性プロモーターに隣接して挿入される。一部の場合には、遍在性プロモーターは、Rosa26プロモーターである。一部の場合には、外因性ポリヌクレオチドは、内因性遺伝子のプロモーターに隣接して、または内因性遺伝子内に挿入される。一部の場合には、内因性遺伝子のタンパク質発現は、CRISPR/cas系を使用して低減される。

【0013】

本出願で開示される2つまたはそれ超の動物を含む遺伝子改変された動物の集団が、本明細書でさらに開示される。一部の場合には、少なくとも2つまたはそれ超の動物は、同一の表現型を有する。一部の場合には、少なくとも2つまたはそれ超の動物は、同一の遺伝子型を有する。

20

【0014】

別の一態様では、1つまたは複数の第1の遺伝子の低減されたタンパク質発現を含む、ロシア獣上目のメンバーまたは非ヒト霊長類由来の遺伝子改変された細胞が本明細書で開示され、1つまたは複数の第1の遺伝子は、a) MHC I 特異的エンハンセオソームの成分、b) MHC I 結合性ペプチドのトランスポーター、および／またはc) C3を含み、低減されたタンパク質発現は、遺伝子改変されていない対応する細胞と比較したものである。一部の場合には、遺伝子改変された細胞は、MHC I 特異的エンハンセオソームの成分の低減されたタンパク質発現を含み、MHC I 特異的エンハンセオソームの成分は、NLRC5である。一部の場合には、遺伝子改変された細胞は、MHC I 結合性ペプチドのトランスポーターの低減されたタンパク質発現を含み、MHC I 結合性ペプチドのトランスポーターは、TAP1である。一部の場合には、遺伝子改変された細胞は、C3の低減されたタンパク質発現を含む。

30

【0015】

一部の場合には、遺伝子改変された細胞は、1つまたは複数の第2の遺伝子の低減されたタンパク質発現をさらに含み、1つまたは複数の第2の遺伝子は、a) NK群2Dリガンド、b) ヒトでは発現されない内因性遺伝子、c) CXCR3リガンド、および／またはd) CITAを含み、低減されたタンパク質発現は、遺伝子改変されていない対応する細胞と比較したものである。一部の場合には、遺伝子改変された細胞は、NK群2Dリガンドの低減されたタンパク質発現を含み、NK群2Dリガンドは、MICAおよび／またはMICBである。一部の場合には、遺伝子改変された細胞は、ヒトでは発現されない内因性遺伝子の低減されたタンパク質発現を含み、ヒトでは発現されない内因性遺伝子は、GGTA1、CMAHおよび／またはB4GALNT2である。一部の場合には、遺伝子改変された細胞は、CXCR3リガンドの低減されたタンパク質発現を含み、CXCR3リガンドは、CXCL10である。

40

【0016】

一部の場合には、遺伝子改変された細胞は、1つもしくは複数のタンパク質またはそれらの機能的断片をコードする1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドをさらに含み、1

50

つもしくは複数のタンパク質またはそれらの機能的断片は、MHC I 形成サブレッサー、補体活性化のレギュレーター、NK細胞に対する阻害性リガンド、B7ファミリーメンバー、CD47、セリンプロテアーゼ阻害剤および／またはガレクチンを含む。一部の場合には、1つもしくは複数のタンパク質またはそれらの機能的断片は、ヒトタンパク質である。一部の場合には、遺伝子改変された細胞は、MHC I 形成サブレッサーをコードする1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含み、MHC I 形成サブレッサーは、ICP47である。一部の場合には、遺伝子改変された細胞は、補体活性化のレギュレーターをコードする1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含み、補体活性化のレギュレーターは、CD46、CD55および／またはCD59である。一部の場合には、遺伝子改変された細胞は、NK細胞に対する阻害性リガンドをコードする1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含み、NK細胞に対する阻害性リガンドは、HLA-E、HLA-Gおよび／またはB2Mである。一部の場合には、遺伝子改変された細胞は、HLA-GであるNK細胞に対する阻害性リガンドを含み、HLA-Gは、HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6および／またはHLA-G7である。一部の場合には、遺伝子改変された細胞は、B7ファミリーメンバーをコードする1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含み、B7ファミリーメンバーは、プログラム死ーリガンドである。一部の場合には、HLA-Gは、HLA-G1である。一部の場合には、プログラム死ーリガンドは、プログラム死ーリガンド1 (PD-L1) および／またはプログラム死ーリガンド2 (PD-L2) である。一部の場合には、プログラム死ーリガンドは、PD-L1およびPD-L2の両方である。一部の場合には、遺伝子改変された細胞は、セリンプロテアーゼ阻害剤をコードする1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含み、セリンプロテアーゼ阻害剤は、セリンプロテアーゼ阻害剤9 (Spi9) である。一部の場合には、遺伝子改変された細胞は、ガレクチンをコードする1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含み、ガレクチンは、ガレクチン-9である。

【0017】

一部の場合には、遺伝子改変された細胞は、NLRC5もしくはTAP1、C3、CXCL10、GGTA1、CMAHおよび／またはB4GALNT2の低減されたタンパク質発現；ならびに／あるいはi) HLA-G1、HLA-Eもしくはそれらの機能的断片、ii) PD-L1もしくはその機能的断片、iii) PD-L2もしくはその機能的断片、および／またはiv) CD47もしくはその機能的断片をコードする外因性ポリヌクレオチドを含む。一部の場合には、1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドは、遍在性プロモーターに隣接して挿入される。一部の場合には、遍在性プロモーターは、Rosa26プロモーターである。一部の場合には、1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドは、標的化遺伝子のプロモーターに隣接して、または標的化遺伝子内に挿入される。一部の場合には、標的化遺伝子は、第1の遺伝子のうちの1つまたは第2の遺伝子のうちの1つである。一部の場合には、1つまたは複数の第1の遺伝子のタンパク質発現は、CRISPR/cas系を使用して低減される。一部の場合には、1つまたは複数の第2の遺伝子のタンパク質発現は、CRISPR/cas系を使用して低減される。

【0018】

別の一態様では、a) NK細胞に対する阻害性リガンドまたはその機能的断片をコードする外因性ポリヌクレオチド、およびb) 内因性遺伝子の低減されたタンパク質発現を含む、ローラシア獣上目のメンバーまたは非ヒト霊長類由来の遺伝子改変された細胞が本明細書で開示され、低減されたタンパク質発現は、遺伝子改変されていない対応する細胞と比較したものである。

【0019】

一部の場合には、NK細胞に対するこの阻害性リガンドは、HLA-EまたはHLA-Gである。一部の場合には、NK細胞に対するこの阻害性リガンドは、HLA-Gであり、HLA-Gは、HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6またはHLA-G7である。一部の場合には、HLA-Gは、HLA-G1である。一部の場合には、内因性遺伝子は、ヒトでは発現されない。一部の場合に

10

20

30

40

50

は、内因性遺伝子は、GGTA1、CMAHおよび／またはB4GALNT2である。一部の 경우에는、遺伝子改変された細胞は、a) PD-L1もしくはその機能的断片、b) PD-L2もしくはその機能的断片、および／またはc) CD47もしくはその機能的断片をコードする外因性ポリヌクレオチドをさらに含む。一部の 경우에는、外因性ポリヌクレオチドは、遍在性プロモーターに隣接して挿入される。一部の 경우에는、遍在性プロモーターは、Rosa26プロモーターである。一部の 경우에는、外因性ポリヌクレオチドは、内因性遺伝子のプロモーターに隣接して、または内因性遺伝子内に挿入される。一部の 경우에는、内因性遺伝子のタンパク質発現は、CRISPR/cas系を使用して低減される。一部の 경우에는、遺伝子改変された細胞は、脾、腎臓、眼、肝臓、小腸 (small bowel)、肺または心臓細胞である。一部の 경우에는、遺伝子改変された細胞は、脾島細胞である。一部の 경우에는、脾島細胞は、脾β細胞である。一部の 경우에는、遺伝子改変された細胞は、脾臓、肝臓、末梢血、リンパ節、胸腺または骨髓細胞である。一部の 경우에는、遺伝子改変された細胞は、ブタ細胞である。一部の 경우에는、遺伝子改変された細胞は、萌芽期組織、非ヒト胎仔動物、周産期非ヒト動物、新生仔非ヒト動物、離乳前非ヒト動物、若年成体非ヒト動物または成体非ヒト動物由来である。

10

【0020】

別の態様では、本出願で規定される細胞を含む注射可能な組成物を含む、対象において、移植された細胞、組織または臓器に対する寛容を生じさせることにおける使用に適したワクチンもまた、本明細書で開示される。本出願に記載される遺伝子改変された細胞を含む寛容化ワクチンもまた、本明細書で開示される。一部の 경우에는、遺伝子改変された細胞は、アポトーシス性細胞である。一部の 경우에는、遺伝子改変された細胞は、固定された細胞である。一部の 경우에는、ワクチンは、固定されていない細胞をさらに含む。一部の 경우에는、固定された細胞および固定されていない細胞は、遺伝的に同一である。一部の 경우에는、固定された細胞は、化学物質によって固定され、および／または固定された細胞は、対象において免疫細胞のアネルギーを誘導する。一部の 경우에는、遺伝子改変された細胞は、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)) カルボジイミド (ECDI) で固定された細胞である。

20

【0021】

別の態様では、本出願に記載される遺伝子改変された細胞を含む組織または臓器が、本明細書で開示される。

30

【0022】

別の態様では、本明細書に記載される遺伝子改変された細胞を含む脾臓または脾島が、本明細書で開示される。

【0023】

別の態様では、本明細書に記載される遺伝子改変された細胞および薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物が、本明細書で開示される。

【0024】

別の態様では、それを必要とする対象に移植して、対象において状態を処置することにおける使用のための、遺伝子改変された細胞、遺伝子改変された細胞を含む組織または臓器が本明細書で開示され、対象は、ワクチンの使用によって、遺伝子改変された細胞、組織または臓器に対して寛容化される。一部の 경우에는、対象には、T細胞活性化、B細胞活性化および／または樹状細胞活性化を阻害する1つまたは複数の医薬品が投与される。

40

【0025】

別の態様では、それを必要とする対象において状態を処置するための方法であって、a) 本出願に記載される遺伝子改変された細胞、組織もしくは臓器を移植するステップ；b) 本出願に記載されるワクチンを対象に投与するステップ；および／またはc) T細胞活性化、B細胞活性化および／もしくは樹状細胞活性化を阻害する1つもしくは複数の医薬品を対象に投与するステップを含む方法が本明細書で開示される。

【0026】

50

別の一態様では、それを必要とする対象において状態を処置するための方法であって、
a) ワクチンを対象に投与するステップ；およびb) 遺伝子改変された細胞、遺伝子改変された細胞を含む組織または臓器を対象に移植するステップを含む方法が本明細書で開示される。一部の場合には、T細胞活性化、B細胞活性化および／または樹状細胞活性化を阻害する1つまたは複数の医薬品を対象に投与するステップ。一部の場合には、移植される遺伝子改変された細胞は、本出願に記載される遺伝子改変された細胞である。一部の場合には、ワクチンは、本出願に記載されるワクチンである。一部の場合には、ワクチンは、対象の体重1kg当たり、0.001からまたは約0.001から1.0までのエンドトキシン単位を含む。一部の場合には、ワクチンは、1μl当たり1からまたは約1から10までの凝集体を含む。一部の場合には、ワクチンは、移植の7日前および移植の1日後に投与される。一部の場合には、ワクチンは、対象の体重1kg当たり、 1×10^8 からまたは約 1×10^8 から 4×10^8 までの脾細胞または脾臓B細胞を少なくとも含む。一部の場合には、脾細胞または脾臓B細胞は、80%からまたは約80%から100%までのCD21陽性SLAクラスII陽性B細胞を含む。一部の場合には、ワクチンは、静脈内で提供される。一部の場合には、移植された細胞、組織または臓器は、対象に移植された後少なくとも7日間にわたって機能的である。一部の場合には、移植するステップは、異種移植するステップである。一部の場合には、医薬品は、第1の用量の抗CD40抗体を含む。一部の場合には、第1の用量は、移植の約8日前に対象に与えられる。一部の場合には、第1の用量は、対象の体重1kg当たり、30mgからまたは約30mgから70mgまでの抗CD40抗体を含む。一部の場合には、方法は、1つまたは複数のさらなる免疫抑制剤を対象に投与するステップをさらに含む。一部の場合には、1つまたは複数のさらなる免疫抑制剤は、B細胞枯渇化抗体、mTOR阻害剤、TNF- α 阻害剤、IL-6阻害剤、補体C3もしくはC5阻害剤、および／またはナイトロジェンマスタードアルキル化剤を含む。一部の場合には、さらなる免疫抑制剤のうちの1つは、ナイトロジェンマスタードアルキル化剤である。一部の場合には、ナイトロジェンマスタードアルキル化剤のうちの1つは、シクロホスファミドである。一部の場合には、シクロホスファミドは、ワクチンの投与の2日後または3日後に投与される。

【0027】

一部の場合には、シクロホスファミドは、50mg/kg/日からまたは約50mg/kg/日から60mg/kg/日までの用量で投与される。一部の場合には、対象は、ヒト対象である。一部の場合には、対象は、非ヒト動物である。一部の場合には、非ヒト動物は、ネコまたはイヌである。一部の場合には、状態は、疾患である。一部の場合には、疾患は、糖尿病である。一部の場合には、糖尿病は、1型糖尿病、2型糖尿病、外科的糖尿病、嚢胞性線維症関連糖尿病および／またはミトコンドリア糖尿病である。

【0028】

別の一態様では、グラフトに対してレシピエントを免疫寛容化するための方法であって、本出願に記載されるワクチンをレシピエントに提供するステップを含む方法が本明細書で開示される。

【0029】

別の一態様では、それを必要とする対象において状態を処置するための方法であって、本出願に記載される遺伝子改変された細胞を移植するステップを含む方法が本明細書で開示される。

【0030】

別の一態様では、それを必要とする対象に移植して、対象において状態を処置することにおける使用のための、本出願に記載される遺伝子改変された細胞、または遺伝子改変された細胞を含む組織もしくは臓器が本明細書で開示され、対象は、本出願に記載されるワクチンによって、遺伝子改変された細胞、組織または臓器に対して寛容化され、T細胞活性化、B細胞活性化および／または樹状細胞活性化を阻害する1つまたは複数の医薬品が、対象に投与される。一部の場合には、移植するステップは、異種移植するステップである。

【0031】

別の一態様では、それを必要とする対象に投与して、対象において状態を処置することにおける使用のための、本出願に記載される遺伝子改変された細胞、または遺伝子改変された細胞を含む組織もしくは臓器が本明細書で開示される。

【0032】

別の一態様では、グラフトに対してレシピエントを免疫寛容化することにおける使用のための本出願に記載されるワクチンが本明細書で開示される。

【0033】

別の一態様では、本出願に記載される遺伝子改変された動物を作製するための方法であって、a) MHC I 特異的エンハンセオソームの成分、MHC I 結合性ペプチドのトランスポーターおよび／またはC3のうちの1つまたは複数の低減された発現を有する細胞を取得するステップ；b) 細胞から胚を生成するステップ；ならびにc) 胚を、遺伝子改変された動物へと成長させるステップを含む方法が本明細書で開示される。一部の場合には、細胞は接合体である。

10

【0034】

別の一態様では、本出願に記載される遺伝子改変された動物を作製するための方法であって、a) MHC I 特異的エンハンセオソームの成分、MHC I 結合性ペプチドのトランスポーターおよび／またはC3のうちの1つまたは複数の低減された発現を有する第1の細胞を取得するステップ；b) この第1の細胞の核を第2の細胞に移入して、胚を生成するステップ；ならびにc) 胚を、遺伝子改変された動物へと成長させるステップを含む方法が本明細書で開示される。一部の場合には、低減は、遺伝子編集によって実施される。一部の場合には、遺伝子編集は、CRISPR/cas系を使用して実施される。

20

【0035】

本発明の新規な特徴は、添付の特許請求の範囲で詳細に示される。本発明の特徴および利点のさらに良好な理解は、本発明の原理が利用される、例示的な実施形態を示す、以下の詳細な説明、および添付の図面を参照して得られる。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】図1は、免疫療法ストラテジーが、MHCクラスIの機能的な発現を欠く遺伝子改変された細胞および臓器グラフトの使用を中心としたことを実証する。グラフト拒絶の予防に必要な維持免疫抑制の必要性は、遺伝子改変された細胞および臓器の移植術が、拮抗性の抗CD40抗体の一過性の使用と組み合わせられた場合、さらには、抗CD40抗体の援護(cover)のもとでアポトーシス性ドナー細胞を含む寛容化ワクチンの投与と組み合わせた場合でさえ、漸進的に低下される(または細胞および臓器異種グラフトの移植術、ならびに幹細胞由来細胞同種グラフトおよび異種グラフトの移植術の適用性は、漸進的に増大される)。

30

【0037】

【図2】図2は、遺伝子改変されたブタ臍島細胞および寛容化ワクチンを作製する1つのストラテジーを実証する。ブタの2つのクローン集団を作製する。少なくともGGTA1ノックアウトされている1つの集団を使用して寛容化ワクチンを作製してもよい。少なくともGGTA1およびMHC I 遺伝子(例えば、NRLC5)ノックアウトされているブタの他のクローン集団を、細胞、組織、および／または臓器ドナーに使用してもよい。

40

【0038】

【図3】図3は、陽性および寛容化ワクチン(陰性ワクチンとも呼ばれる)の使用を実証する。

【0039】

【図4】図4は、一過性の免疫抑制の援護のもとで寛容化ワクチン接種のためのアポトーシス性ドナー脾細胞の注入を伴う対象の異種グラフトの生存を延長する例示的なアプローチを実証する。

【0040】

50

【図5】図5は、異種グラフトレシipientの慢性および全身性の免疫抑制の非存在下でのレシipientにおける異種グラフトの拒絶の予防または生存の延長に対する例示的なアプローチを示す。この例示的なアプローチは、以下の3つの構成要素を含み、組み込む：i) α Gal、MHCクラスI、補体C3およびCXC10の欠損および／または低減された発現、ならびにHLA-Gのトランスジェニック発現を有する遺伝子操作された脾島；ii) α Gal、Neu5Gc、およびSda/CADの欠損および／または低減された発現、ならびにヒトCD47、ヒトPD-L1、ヒトPD-L2を含むかまたは含まないHLA-Gのトランスジェニック発現を有する遺伝子操作されたドナーのアポトーシス性および非アポトーシス性単核細胞（例えば、脾細胞）（例えば、遺伝子操作されたワクチン）；ならびにiii) 一過性の免疫抑制、例としては、拮抗性の抗CD40 mAb、抗CD20 mAb、ラパマイシン、および一過性の抗炎症性療法、例としては、コンプスタチン（例えば、コンプスタチン誘導性APL-2）、抗IL-6受容体mAb、および可溶性TNF受容体の投与。

10

【0041】

【図6】図6は、ブタ対カニクイザルの脾島異種移植術における移植拒絶予防についての例示的なプロトコールを実証する。IE：脾島等価物；sTNFR：可溶性TNF受容体（例えば、エタネルセプト）； α -IL-6R：抗インターロイキン6受容体；Tx'd：移植された。

【0042】

【図7A】図7A～図7Eは、GGTA1を標的化するpx330-Gal2-1プラスミドをクローニングするためのストラテジーを実証する。図7Aは、GGTA1を標的化するガイドRNAを作製するためのクローニングストラテジーおよびオリゴヌクレオチドを示す。図7Bは、px330プラスミド上の挿入部位を示す。図7Cは、クローニングおよび確認ストラテジーを実証するフローチャートを示す。図7Dは、クローニング部位およびシーケンシングプライマーを示す。図7Eは、シーケンシングの結果を示す。

20

【図7B】図7A～図7Eは、GGTA1を標的化するpx330-Gal2-1プラスミドをクローニングするためのストラテジーを実証する。図7Aは、GGTA1を標的化するガイドRNAを作製するためのクローニングストラテジーおよびオリゴヌクレオチドを示す。図7Bは、px330プラスミド上の挿入部位を示す。図7Cは、クローニングおよび確認ストラテジーを実証するフローチャートを示す。図7Dは、クローニング部位およびシーケンシングプライマーを示す。図7Eは、シーケンシングの結果を示す。

30

【図7C】図7A～図7Eは、GGTA1を標的化するpx330-Gal2-1プラスミドをクローニングするためのストラテジーを実証する。図7Aは、GGTA1を標的化するガイドRNAを作製するためのクローニングストラテジーおよびオリゴヌクレオチドを示す。図7Bは、px330プラスミド上の挿入部位を示す。図7Cは、クローニングおよび確認ストラテジーを実証するフローチャートを示す。図7Dは、クローニング部位およびシーケンシングプライマーを示す。図7Eは、シーケンシングの結果を示す。

【図7D】図7A～図7Eは、GGTA1を標的化するpx330-Gal2-1プラスミドをクローニングするためのストラテジーを実証する。図7Aは、GGTA1を標的化するガイドRNAを作製するためのクローニングストラテジーおよびオリゴヌクレオチドを示す。図7Bは、px330プラスミド上の挿入部位を示す。図7Cは、クローニングおよび確認ストラテジーを実証するフローチャートを示す。図7Dは、クローニング部位およびシーケンシングプライマーを示す。図7Eは、シーケンシングの結果を示す。

40

【図7E】図7A～図7Eは、GGTA1を標的化するpx330-Gal2-1プラスミドをクローニングするためのストラテジーを実証する。図7Aは、GGTA1を標的化するガイドRNAを作製するためのクローニングストラテジーおよびオリゴヌクレオチドを示す。図7Bは、px330プラスミド上の挿入部位を示す。図7Cは、クローニングおよび確認ストラテジーを実証するフローチャートを示す。図7Dは、クローニング部位およびシーケンシングプライマーを示す。図7Eは、シーケンシングの結果を示す。

【0043】

50

【図9C】図9A～図9Eは、NLRC5を標的化するp x 330-NL1-FIRSTプラスミドをクローニングするための戦略を実証する。図9Aは、NLRC5を標的化するガイドRNAを作製するためのクローニング戦略およびオリゴヌクレオチドを示す。図9Bは、p x 330プラスミド上の挿入部位を示す。図9Cは、クローニングおよび確認戦略を実証するフローチャートを示す。図9Dは、クローニン

50

グ部位およびシーケンシングプライマーを示す。図 9 E は、シーケンシングの結果を示す。

【図 9 D】図 9 A～図 9 E は、NLRC5 を標的化する p x 3 3 0 - NL 1 _ F I R S T プラスミドをクローニングするためのストラテジーを実証する。図 9 A は、NLRC5 を標的化するガイド RNA を作製するためのクローニングストラテジーおよびオリゴヌクレオチドを示す。図 9 B は、p x 3 3 0 プラスミド上の挿入部位を示す。図 9 C は、クローニングおよび確認ストラテジーを実証するフローチャートを示す。図 9 D は、クローニング部位およびシーケンシングプライマーを示す。図 9 E は、シーケンシングの結果を示す。

【図 9 E】図 9 A～図 9 E は、NLRC5 を標的化する p x 3 3 0 - NL 1 _ F I R S T プラスミドをクローニングするためのストラテジーを実証する。図 9 A は、NLRC5 を標的化するガイド RNA を作製するためのクローニングストラテジーおよびオリゴヌクレオチドを示す。図 9 B は、p x 3 3 0 プラスミド上の挿入部位を示す。図 9 C は、クローニングおよび確認ストラテジーを実証するフローチャートを示す。図 9 D は、クローニング部位およびシーケンシングプライマーを示す。図 9 E は、シーケンシングの結果を示す。

【0045】

【図 10 A】図 10 A～図 10 E は、C3 を標的化する p x 3 3 0 / C 3 - 5 プラスミドをクローニングするためのストラテジーを実証する。図 10 A は、C3 を標的化するガイド RNA を作製するためのクローニングストラテジーおよびオリゴヌクレオチドを示す。図 10 B は、p x 3 3 0 プラスミド上の挿入部位を示す。図 10 C は、クローニングおよび確認ストラテジーを実証するフローチャートを示す。図 10 D は、クローニング部位およびシーケンシングプライマーを示す。図 10 E は、シーケンシングの結果を示す。

【図 10 B】図 10 A～図 10 E は、C3 を標的化する p x 3 3 0 / C 3 - 5 プラスミドをクローニングするためのストラテジーを実証する。図 10 A は、C3 を標的化するガイド RNA を作製するためのクローニングストラテジーおよびオリゴヌクレオチドを示す。図 10 B は、p x 3 3 0 プラスミド上の挿入部位を示す。図 10 C は、クローニングおよび確認ストラテジーを実証するフローチャートを示す。図 10 D は、クローニング部位およびシーケンシングプライマーを示す。図 10 E は、シーケンシングの結果を示す。

【図 10 C】図 10 A～図 10 E は、C3 を標的化する p x 3 3 0 / C 3 - 5 プラスミドをクローニングするためのストラテジーを実証する。図 10 A は、C3 を標的化するガイド RNA を作製するためのクローニングストラテジーおよびオリゴヌクレオチドを示す。図 10 B は、p x 3 3 0 プラスミド上の挿入部位を示す。図 10 C は、クローニングおよび確認ストラテジーを実証するフローチャートを示す。図 10 D は、クローニング部位およびシーケンシングプライマーを示す。図 10 E は、シーケンシングの結果を示す。

【図 10 D】図 10 A～図 10 E は、C3 を標的化する p x 3 3 0 / C 3 - 5 プラスミドをクローニングするためのストラテジーを実証する。図 10 A は、C3 を標的化するガイド RNA を作製するためのクローニングストラテジーおよびオリゴヌクレオチドを示す。図 10 B は、p x 3 3 0 プラスミド上の挿入部位を示す。図 10 C は、クローニングおよび確認ストラテジーを実証するフローチャートを示す。図 10 D は、クローニング部位およびシーケンシングプライマーを示す。図 10 E は、シーケンシングの結果を示す。

【図 10 E】図 10 A～図 10 E は、C3 を標的化する p x 3 3 0 / C 3 - 5 プラスミドをクローニングするためのストラテジーを実証する。図 10 A は、C3 を標的化するガイド RNA を作製するためのクローニングストラテジーおよびオリゴヌクレオチドを示す。図 10 B は、p x 3 3 0 プラスミド上の挿入部位を示す。図 10 C は、クローニングおよび確認ストラテジーを実証するフローチャートを示す。図 10 D は、クローニング部位およびシーケンシングプライマーを示す。図 10 E は、シーケンシングの結果を示す。

【0046】

【図 11 A】図 11 A～図 11 E は、B4 GALNT2 を標的化する p x 3 3 0 / B 4 1 _ 第 2 プラスミドをクローニングするためのストラテジーを実証する。図 11 A は、B 4

10

20

30

40

50

G A L N T 2を標的化するガイドRNAを作製するためのクローニングストラテジーおよびオリゴヌクレオチドを示す。図11Bは、p x 3 3 0プラスミド上の挿入部位を示す。図11Cは、クローニングおよび確認ストラテジーを実証するフローチャートを示す。図11Dは、クローニング部位およびシークエンシングプライマーを示す。図11Eは、シークエンシングの結果を示す。

【図11B】図11A～図11Eは、B 4 G A L N T 2を標的化するp x 3 3 0 / B 4 1 __第2プラスミドをクローニングするためのストラテジーを実証する。図11Aは、B 4 G A L N T 2を標的化するガイドRNAを作製するためのクローニングストラテジーおよびオリゴヌクレオチドを示す。図11Bは、p x 3 3 0プラスミド上の挿入部位を示す。図11Cは、クローニングおよび確認ストラテジーを実証するフローチャートを示す。図11Dは、クローニング部位およびシークエンシングプライマーを示す。図11Eは、シークエンシングの結果を示す。

10

【図11C】図11A～図11Eは、B 4 G A L N T 2を標的化するp x 3 3 0 / B 4 1 __第2プラスミドをクローニングするためのストラテジーを実証する。図11Aは、B 4 G A L N T 2を標的化するガイドRNAを作製するためのクローニングストラテジーおよびオリゴヌクレオチドを示す。図11Bは、p x 3 3 0プラスミド上の挿入部位を示す。図11Cは、クローニングおよび確認ストラテジーを実証するフローチャートを示す。図11Dは、クローニング部位およびシークエンシングプライマーを示す。図11Eは、シークエンシングの結果を示す。

【図11D】図11A～図11Eは、B 4 G A L N T 2を標的化するp x 3 3 0 / B 4 1 __第2プラスミドをクローニングするためのストラテジーを実証する。図11Aは、B 4 G A L N T 2を標的化するガイドRNAを作製するためのクローニングストラテジーおよびオリゴヌクレオチドを示す。図11Bは、p x 3 3 0プラスミド上の挿入部位を示す。図11Cは、クローニングおよび確認ストラテジーを実証するフローチャートを示す。図11Dは、クローニング部位およびシークエンシングプライマーを示す。図11Eは、シークエンシングの結果を示す。

20

【図11E】図11A～図11Eは、B 4 G A L N T 2を標的化するp x 3 3 0 / B 4 1 __第2プラスミドをクローニングするためのストラテジーを実証する。図11Aは、B 4 G A L N T 2を標的化するガイドRNAを作製するためのクローニングストラテジーおよびオリゴヌクレオチドを示す。図11Bは、p x 3 3 0プラスミド上の挿入部位を示す。図11Cは、クローニングおよび確認ストラテジーを実証するフローチャートを示す。図11Dは、クローニング部位およびシークエンシングプライマーを示す。図11Eは、シークエンシングの結果を示す。

30

【0047】

【図12】図12は、実施例2でシークエンシングされたR o s a 2 6遺伝子座のマップを実証する。

【0048】

【図13A】図13A～図13Eは、R o s a 2 6を標的化するp x 3 3 0 / R o s a エクソン1プラスミドをクローニングするためのストラテジーを実証する。図13Aは、R o s a 2 6を標的化するガイドRNAを作製するためのクローニングストラテジーおよびオリゴヌクレオチドを示す。図13Bは、p x 3 3 0プラスミド上の挿入部位を示す。図13Cは、クローニングおよび確認ストラテジーを実証するフローチャートを示す。図13Dは、クローニング部位およびシークエンシングプライマーを示す。図13Eは、シークエンシングの結果を示す。

40

【図13B】図13A～図13Eは、R o s a 2 6を標的化するp x 3 3 0 / R o s a エクソン1プラスミドをクローニングするためのストラテジーを実証する。図13Aは、R o s a 2 6を標的化するガイドRNAを作製するためのクローニングストラテジーおよびオリゴヌクレオチドを示す。図13Bは、p x 3 3 0プラスミド上の挿入部位を示す。図13Cは、クローニングおよび確認ストラテジーを実証するフローチャートを示す。図13Dは、クローニング部位およびシークエンシングプライマーを示す。図13Eは、シー

50

クエンシングの結果を示す。

【図13C】図13A～図13Eは、Rosa26を標的化するpx330/Rosaエクソン1プラスミドをクローニングするためのストラテジーを実証する。図13Aは、Rosa26を標的化するガイドRNAを作製するためのクローニングストラテジーおよびオリゴヌクレオチドを示す。図13Bは、px330プラスミド上の挿入部位を示す。図13Cは、クローニングおよび確認ストラテジーを実証するフローチャートを示す。図13Dは、クローニング部位およびシークエンシングプライマーを示す。図13Eは、シークエンシングの結果を示す。

【図13D】図13A～図13Eは、Rosa26を標的化するpx330/Rosaエクソン1プラスミドをクローニングするためのストラテジーを実証する。図13Aは、Rosa26を標的化するガイドRNAを作製するためのクローニングストラテジーおよびオリゴヌクレオチドを示す。図13Bは、px330プラスミド上の挿入部位を示す。図13Cは、クローニングおよび確認ストラテジーを実証するフローチャートを示す。図13Dは、クローニング部位およびシークエンシングプライマーを示す。図13Eは、シークエンシングの結果を示す。

【図13E】図13A～図13Eは、Rosa26を標的化するpx330/Rosaエクソン1プラスミドをクローニングするためのストラテジーを実証する。図13Aは、Rosa26を標的化するガイドRNAを作製するためのクローニングストラテジーおよびオリゴヌクレオチドを示す。図13Bは、px330プラスミド上の挿入部位を示す。図13Cは、クローニングおよび確認ストラテジーを実証するフローチャートを示す。図13Dは、クローニング部位およびシークエンシングプライマーを示す。図13Eは、シークエンシングの結果を示す。

【0049】

【図14A】図14Aは、GGTA1のゲノム配列のマップを示す。図14Bは、GGTA1のcDNA配列のマップを示す。

【図14B】図14Aは、GGTA1のゲノム配列のマップを示す。図14Bは、GGTA1のcDNA配列のマップを示す。

【0050】

【図15】図15は、pSpCas9(BB)-2A-GFPをトランスフェクトされたブタの胎仔線維芽細胞の例示的な顕微鏡写真を示す。

【0051】

【図16】図16は、第1染色体上の位置を明らかにする特異的なプローブによるGGTA1遺伝子に対する蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)を示す。

【0052】

【図17】図17A～図17Bは、cas9/sgRNA媒介性GGTA1/NLRC5破壊を有する細胞の表現型選択の例を実証する。図17Aは、アルファガラクトシダーゼを発現しない、遺伝子改変された細胞を示す。図17Bは、アルファガラクトシダーゼを発現し、かつイソレクチンB4(IB)連結第一鉄ビーズで標識された、遺伝子改変されていない細胞を示す。

【0053】

【図18A】図18A～図18Cは、ブタ細胞におけるGGTA1、CMAH、およびNLRC5破壊の確認を実証する。図18Aは、ブタ細胞におけるGGTA1破壊の確認を実証する。図18Bは、ブタ細胞におけるCMAH破壊の確認を実証する。図18Cは、ブタ細胞におけるNLRC5破壊の確認を実証する。

【図18B】図18A～図18Cは、ブタ細胞におけるGGTA1、CMAH、およびNLRC5破壊の確認を実証する。図18Aは、ブタ細胞におけるGGTA1破壊の確認を実証する。図18Bは、ブタ細胞におけるCMAH破壊の確認を実証する。図18Cは、ブタ細胞におけるNLRC5破壊の確認を実証する。

【図18C】図18A～図18Cは、ブタ細胞におけるGGTA1、CMAH、およびNLRC5破壊の確認を実証する。図18Aは、ブタ細胞におけるGGTA1破壊の確認を

実証する。図18Bは、ブタ細胞におけるCMAH破壊の確証を実証する。図18Cは、ブタ細胞におけるNLRC5破壊の確証を実証する。

【0054】

【図19】図19A～図19Bは、ブタの膵島誘導性ヒトCD8+T細胞活性化に対する抗SLA抗体の阻害性効果を実証する。図19Aは、抗SLA抗体の存在下（黒のバー）または不在下（白のバー）における7日間の、成体ブタ膵島と混合された培養物中のCD8+T細胞、CD4+T細胞およびナチュラルキラー（NK）細胞の増殖を示す。図19Bは、抗SLAクラスI抗体の存在下（黒のバー）または不在下（白のバー）における7日間の、高度に精製されたリンパ球とともにまたはそれを含まずに培養された成体ブタ膵島の生存度（AO/PI染色で評価された）を示す。

10

【0055】

【図20】図20A～図20Bは、ブタ膵島によって誘発されたT細胞活性化を実証する。図20Aは、ELISPOTアッセイの結果を実証する。この結果、カニクイザルにおいてIFN- γ を分泌する直接および間接的な特異性を有する抗ドナーT細胞の移植後増大の抑制が示される。サルを、GT-KOドナーブタ由来のアポトーシス性ドナー脾細胞、および0日目の同じドナーブタ由来の膵島の移植前後の注入を用いて、抗CD40モノクローナル抗体、ラパマイシン、sTNFR、および抗IL-6Rモノクローナル抗体による一過性の免疫抑制の援護のもとで処置した。図20Bは、移植術後141日の拒絶を受けている門脈内移植された成体ブタ膵島のCD8染色を実証する。

【0056】

20

【図21AB】図21A～図21Dは、維持免疫抑制がないサルにおけるブタ膵島グラフト生存を実証する。図21Aは、血糖値および移植術前後の正常な血糖値を維持するために必要な外因性のインスリンを実証する。図21Bは、サルの血清ブタCペプチドのレベルを実証する。図21Cは、グルコース負荷に応答した血糖値を実証する。図21Dは、グルコース負荷に応答した血清ブタCペプチドレベルを実証する。

【図21CD】図21A～図21Dは、維持免疫抑制がないサルにおけるブタ膵島グラフト生存を実証する。図21Aは、血糖値および移植術前後の正常な血糖値を維持するために必要な外因性のインスリンを実証する。図21Bは、サルの血清ブタCペプチドのレベルを実証する。図21Cは、グルコース負荷に応答した血糖値を実証する。図21Dは、グルコース負荷に応答した血清ブタCペプチドレベルを実証する。

30

【0057】

【図22】図22Aは、膵島を移植されて、移植術ならびにCTL A4-Igおよびラパマイシンによる維持免疫抑制の後に14日目にわたって抗CD40抗体を4回投与されたサルによる遺伝子改変されていないブタ膵島の拒絶を実証する。図22Bは、移植術ならびにCTL A4-Igおよびラパマイシンによる維持免疫抑制の後に14日目にわたって抗CD40抗体を4回投与されたサルにおける移植されたブタ膵島による糖尿病の好転を実証する。

【0058】

【図23】図23Aは、移植術後毎週ラパマイシンおよび抗CD40抗体での維持免疫抑制を受けているサル（ID#13CP7）における移植されたブタ膵島による糖尿病の好転（持続する正常血糖およびインスリン非依存性の回復）を実証する。サルは、移植術の日から開始して21日間、抗CD40抗体およびラパマイシンを投与された。図23Bは、同じレシピエント（ID#13CP7）における血清ブタCペプチドレベル（絶食、ランダムおよび刺激）を実証する。

40

【0059】

【図24】図24は、屠殺の時点で肝臓単核細胞におけるCD8+T細胞区画内のCD8+CD2hi CD28-エフェクターメモリーT細胞のベースラインおよび高い存在率（prevalence）と比較して屠殺の時点で（推定される拒絶後）2匹のカニクイザルにおける循環中のCD8+CD2hi CD28-エフェクターメモリーT細胞の増大を示す。両方のサルとも成体ブタ膵島の門脈内異種移植を受けた。Pre Tx：移植

50

前；PBL：末梢血白血球；Sac：屠殺；Lym：リンパ球；LMNC：肝臓単核細胞。

【0060】

【図25】図25は、同じ一過性の免疫抑制を受けたが、アポトーシス性ドナー脾細胞（MX-ECDI-対照）は受けなかった対照と比較して、アポトーシス性ドナー脾細胞（MX-ECDI-ワクチン）の移植前後の注入による循環中のCD8+CD2hi CD28-エフェクターメモリーT細胞の抑制を示す。Pre Tx：移植前；Sac：屠殺；Lym：リンパ球；LMNC：肝臓単核細胞。

【0061】

【図26】図26は、アポトーシス性ドナー脾細胞およびα-CD40抗体による循環中のCD8+CD2hi CD28-エフェクターメモリーT細胞の抑制を示す。CM：カニクイザル；Pre Tx：移植前；D：日目。

10

【0062】

【図27】図27は、アポトーシス性ドナー脾細胞およびα-CD40抗体による循環中のCD4+CD25hi FoxP3+CD127低制御性T細胞の抑制を示す。CM：カニクイザル；Pre Tx：移植前；D：日目。

【0063】

【図28】図28は、アポトーシス性ドナー脾細胞およびα-CD40抗体による循環中のCD8+CD122+ナチュラルサプレッサー細胞の抑制を示す。CM：カニクイザル；Pre Tx：移植前；D：日目。

20

【0064】

【図29A】図29A～図29Bは、GGTA1（Sus scrofa品種混合第1染色体、Sscrofa10.2 NCBI参照配列：NC_010443.4と比較した）標的領域のPCR増幅に供された2つの別々の同腹仔の胎仔細胞から単離したDNAのシーケンシングを示し（妊娠1：図29Aまたは妊娠2：図29B）、得られたアンプリコンは、1%アガロースゲル上で分離した。アンプリコンはまた、各々の反応からのフォワードプライマーのみを使用してサンガーシーケンシングによって解析した。図29Aでは、結果は、GGTA1の標的部位の後で6ヌクレオチド短縮された妊娠1の胎仔1、2、4、5、6、および7から示される。胎仔3は、切断部位の後で17ヌクレオチド短縮され、それに続いて、2, 511（668～3179）ヌクレオチド欠失、それに続いて単一塩基置換であった。標的遺伝子の両方のコピー由来の対立遺伝子を含有する単一のシーケンシング実験からの短縮、欠失および置換は、遺伝子改変が生じたことを示唆し得るだけで、各々の対立遺伝子について正確な配列は明らかにしない。この解析から、全ての7匹の胎仔は、GGTA1について単一の対立遺伝子改変を有すると思われる。図29Bによって、妊娠2の胎仔DNA試料1、3、4、および5は、GGTA1遺伝子標的部位から3ヌクレオチド短縮されたことが示される。胎仔2は、サンガーシーケンシングで変動を有し、このことは、DNA変異の複雑な変動または試料の質が劣ることを示唆する。しかし、胎仔のDNA鋳型の質は、上記のGGTA1遺伝子スクリーニング実験の生成に十分であった。

30

【図29B】図29A～図29Bは、GGTA1（Sus scrofa品種混合第1染色体、Sscrofa10.2 NCBI参照配列：NC_010443.4と比較した）標的領域のPCR増幅に供された2つの別々の同腹仔の胎仔細胞から単離したDNAのシーケンシングを示し（妊娠1：図29Aまたは妊娠2：図29B）、得られたアンプリコンは、1%アガロースゲル上で分離した。アンプリコンはまた、各々の反応からのフォワードプライマーのみを使用してサンガーシーケンシングによって解析した。図29Aでは、結果は、GGTA1の標的部位の後で6ヌクレオチド短縮された妊娠1の胎仔1、2、4、5、6、および7から示される。胎仔3は、切断部位の後で17ヌクレオチド短縮され、それに続いて、2, 511（668～3179）ヌクレオチド欠失、それに続いて単一塩基置換であった。標的遺伝子の両方のコピー由来の対立遺伝子を含有する単一のシーケンシング実験からの短縮、欠失および置換は、遺伝子改変が生じたことを示唆

40

50

し得るだけで、各々の対立遺伝子について正確な配列は明らかにしない。この解析から、全ての7匹の胎仔は、GGTA1について単一の対立遺伝子改変を有すると思われる。図29Bによって、妊娠2の胎仔DNA試料1、3、4、および5は、GGTA1遺伝子標的部から3ヌクレオチド短縮されたことが示される。胎仔2は、サンガーシーケンシングで変動を有し、このことは、DNA変異の複雑な変動または試料の質が劣ることを示唆する。しかし、胎仔のDNA鋳型の質は、上記のGGTA1遺伝子スクリーニング実験の生成に十分であった。

【0065】

【図30A】図30A～図30Bは、NLRC5（コンセンサス配列）標的領域のPCR増幅に供された2つの別々の同腹仔の胎仔細胞から単離されたDNAのシーケンシングを示し（妊娠1：図30Aまたは妊娠2：図30B）、得られたアンプリコンを、1%アガロースゲル上で分離した。アンプリコンはまた、各々の反応からのフォワードプライマーのみを使用してサンガーシーケンシングによって解析した。妊娠1由来の胎仔のNLRC5標的領域の配列解析では（図30A）、一貫性のあるアラインメントを示すことはできず、サンガーシーケンシング反応および解析を複雑にするNLRC5対立遺伝子の間のシーケンシング反応における未知の複雑性または種々のDNA改変を示唆した。妊娠2からのNLRC5遺伝子アンプリコン（図30B）は全て、NLRC5遺伝子切断部位下流の短縮された120ヌクレオチドであった。

10

【図30B】図30A～図30Bは、NLRC5（コンセンサス配列）標的領域のPCR増幅に供された2つの別々の同腹仔の胎仔細胞から単離されたDNAのシーケンシングを示し（妊娠1：図30Aまたは妊娠2：図30B）、得られたアンプリコンを、1%アガロースゲル上で分離した。アンプリコンはまた、各々の反応からのフォワードプライマーのみを使用してサンガーシーケンシングによって解析した。妊娠1由来の胎仔のNLRC5標的領域の配列解析では（図30A）、一貫性のあるアラインメントを示すことはできず、サンガーシーケンシング反応および解析を複雑にするNLRC5対立遺伝子の間のシーケンシング反応における未知の複雑性または種々のDNA改変を示唆した。妊娠2からのNLRC5遺伝子アンプリコン（図30B）は全て、NLRC5遺伝子切断部位下流の短縮された120ヌクレオチドであった。

20

【0066】

【図31】図31A～図31Bは、後肢の生検から単離した胎仔DNA（wtおよび1～7（図31A：妊娠1）または1～5（図31B：妊娠2）からのデータを示す。標的遺伝子は、PCRによって増幅し、PCR生成物は、1%アガロースゲル上で分離し、かつ蛍光DNA染色によって可視化した。wtレーンに存在するアンプリコンのバンドは、未改変のDNA配列に相当する。アンプリコンのサイズの増減によって、それぞれ、そのアンプリコン内の挿入または欠失が示唆される。1つの試料中の対立遺伝子の間のDNA改変の変動によって、バンドはさらに拡散されるようになり得る。妊娠1（図31A）は、7つの胎仔を生じたが、妊娠2（図31B）は、5匹の胎仔を生じ、それぞれ、45日および43日で回収した。図31Aの胎仔1、3および4におけるNLRC5ゲル中のバンドがないこと（底部のゲル）によって、標的領域に対する改変が、DNA増幅プライマーの結合を破壊したことが示唆される。図31AにおけるGGTA1中の全てのバンドの存在（頂部のゲル）によって、DNAの質が、NLRC5を標的化するPCR反応中でDNAアンプリコンを生成するのに十分であったことが示唆される。妊娠1の胎仔1、2、4および5（図31A）は、WTよりも大きいGGTA1アンプリコンを有し、このことは、標的エリア内の挿入を示唆する。妊娠1の胎仔3（図31A）では、GGTA1アンプリコンは、WT対照よりも早く移動し、このことは、標的エリア内の欠失を示唆する。妊娠1の胎仔6および7（図31A）NLRC5アンプリコンは、WTよりも早く移動し、このことは、標的エリア内の欠失を示唆する。胎仔1～5（図31B）GGTA1アンプリコンは、サイズで解釈することが困難であって、WT対照と比較して拡散された。胎仔1～5（図31B）NLRC5アンプリコンは、野生型対照と比較してサイズおよび密度が均一であった。

30

40

50

【0067】

【図32A-1】図32A～図32Bは、ブタの2つの別々の同腹仔由来の胎仔の表現型解析を示す（図32A：妊娠1または図32B：妊娠2）。胎仔は、45日目（妊娠1）または43日目（妊娠2）で回収し、DNAおよび培養細胞単離のために処理した。組織断片および細胞を、2日間培養培地中に平板培養して、胎仔細胞を接着および増殖させた。野生型細胞（遺伝子改変されていない胎仔細胞）ならびに妊娠1および2由来の胎仔細胞を、培養プレートから取り出し、alex fluor 488にコンジュゲートされたIB4レクチン、またはFITCにコンジュゲートされた抗ブタMHCクラスI抗体で標識した。フローサイトメトリー解析は、試験した細胞の標識強度を示すヒストグラムとして示す。WT細胞のヒストグラムは、各々の群の胎仔細胞の全体的強度における低下を強調するために各々のパネル中に含まれる。ピーク強度の低下として示される、妊娠1におけるアルファGalおよびMHCクラスI標識に低下がある（図32A）。妊娠2（図32B）では、胎仔1および3は、WT胎仔細胞と比較して、アルファgal標識の大きい低下、およびMHCクラスI標識の有意な低下がある。

10

【図32A-2】図32A～図32Bは、ブタの2つの別々の同腹仔由来の胎仔の表現型解析を示す（図32A：妊娠1または図32B：妊娠2）。胎仔は、45日目（妊娠1）または43日目（妊娠2）で回収し、DNAおよび培養細胞単離のために処理した。組織断片および細胞を、2日間培養培地中に平板培養して、胎仔細胞を接着および増殖させた。野生型細胞（遺伝子改変されていない胎仔細胞）ならびに妊娠1および2由来の胎仔細胞を、培養プレートから取り出し、alex fluor 488にコンジュゲートされたIB4レクチン、またはFITCにコンジュゲートされた抗ブタMHCクラスI抗体で標識した。フローサイトメトリー解析は、試験した細胞の標識強度を示すヒストグラムとして示す。WT細胞のヒストグラムは、各々の群の胎仔細胞の全体的強度における低下を強調するために各々のパネル中に含まれる。ピーク強度の低下として示される、妊娠1におけるアルファGalおよびMHCクラスI標識に低下がある（図32A）。妊娠2（図32B）では、胎仔1および3は、WT胎仔細胞と比較して、アルファgal標識の大きい低下、およびMHCクラスI標識の有意な低下がある。

20

【図32A-3】図32A～図32Bは、ブタの2つの別々の同腹仔由来の胎仔の表現型解析を示す（図32A：妊娠1または図32B：妊娠2）。胎仔は、45日目（妊娠1）または43日目（妊娠2）で回収し、DNAおよび培養細胞単離のために処理した。組織断片および細胞を、2日間培養培地中に平板培養して、胎仔細胞を接着および増殖させた。野生型細胞（遺伝子改変されていない胎仔細胞）ならびに妊娠1および2由来の胎仔細胞を、培養プレートから取り出し、alex fluor 488にコンジュゲートされたIB4レクチン、またはFITCにコンジュゲートされた抗ブタMHCクラスI抗体で標識した。フローサイトメトリー解析は、試験した細胞の標識強度を示すヒストグラムとして示す。WT細胞のヒストグラムは、各々の群の胎仔細胞の全体的強度における低下を強調するために各々のパネル中に含まれる。ピーク強度の低下として示される、妊娠1におけるアルファGalおよびMHCクラスI標識に低下がある（図32A）。妊娠2（図32B）では、胎仔1および3は、WT胎仔細胞と比較して、アルファgal標識の大きい低下、およびMHCクラスI標識の有意な低下がある。

30

40

【図32B-1】図32A～図32Bは、ブタの2つの別々の同腹仔由来の胎仔の表現型解析を示す（図32A：妊娠1または図32B：妊娠2）。胎仔は、45日目（妊娠1）または43日目（妊娠2）で回収し、DNAおよび培養細胞単離のために処理した。組織断片および細胞を、2日間培養培地中に平板培養して、胎仔細胞を接着および増殖させた。野生型細胞（遺伝子改変されていない胎仔細胞）ならびに妊娠1および2由来の胎仔細胞を、培養プレートから取り出し、alex fluor 488にコンジュゲートされたIB4レクチン、またはFITCにコンジュゲートされた抗ブタMHCクラスI抗体で標識した。フローサイトメトリー解析は、試験した細胞の標識強度を示すヒストグラムとして示す。WT細胞のヒストグラムは、各々の群の胎仔細胞の全体的強度における低下を強調するために各々のパネル中に含まれる。ピーク強度の低下として示される、妊娠1

50

におけるアルファGalおよびMHCクラスI標識に低下がある（図32A）。妊娠2（図32B）では、胎仔1および3は、WT胎仔細胞と比較して、アルファgal標識の大きい低下、およびMHCクラスI標識の有意な低下がある。

【図32B-2】図32A～図32Bは、ブタの2つの別々の同腹仔由来の胎仔の表現型解析を示す（図32A：妊娠1または図32B：妊娠2）。胎仔は、45日目（妊娠1）または43日目（妊娠2）で回収し、DNAおよび培養細胞単離のために処理した。組織断片および細胞を、2日間培養培地中に平板培養して、胎仔細胞を接着および増殖させた。野生型細胞（遺伝子改変されていない胎仔細胞）ならびに妊娠1および2由来の胎仔細胞を、培養プレートから取り出し、alexafluor 488にコンジュゲートされたIB4レクチン、またはFITCにコンジュゲートされた抗ブタMHCクラスI抗体で標識した。フローサイトメトリ解析は、試験した細胞の標識強度を示すヒストグラムとして示す。WT細胞のヒストグラムは、各々の群の胎仔細胞の全体的強度における低下を強調するために各々のパネル中に含まれる。ピーク強度の低下として示される、妊娠1におけるアルファGalおよびMHCクラスI標識に低下がある（図32A）。妊娠2（図32B）では、胎仔1および3は、WT胎仔細胞と比較して、アルファgal標識の大きい低下、およびMHCクラスI標識の有意な低下がある。

【0068】

【図33A】図33A～図33Bは、遺伝子クローン由来の野生型胎仔細胞と比較して、胎仔3（妊娠1）由来の細胞でのMHCクラスI発現の低下の影響を示す。ブタの対照の線維芽細胞およびNLRC5ノックアウト胎仔細胞に対するヒトCD8+細胞およびCD4 T細胞の増殖応答を測定した。図33A。細胞は、増殖の評価の前にCD4またはCD8としてゲーティングされた。図33B。CD8 T細胞増殖は、対照の未改変のブタ線維芽細胞と比較して、ブタ胎仔GGTA1/NLRC5ノックアウト細胞による処置刺激後に低下した。CD8 T細胞増殖におけるほとんど55%の低下が、ヒトの応答物がブタ胎仔GGTA1/NLRC5ノックアウト細胞で1:1の比で処置されたときに観察された。野生型胎仔細胞は、ヒトCD8 T細胞で17.2%の増殖を誘発したが、胎仔3（妊娠1）由来のMHCクラスI欠損細胞は、7.6%の増殖しか誘導しなかった。未改変の胎仔細胞と比較して1:5および1:10の比で、CD8 T細胞増殖応答に相違は見られなかった。研究した全ての比で、NLRC5ノックアウトおよび対照の未改変のブタ胎仔細胞に応答した、CD4 T細胞増殖の変化は観察されなかった。

【図33B-1】図33A～図33Bは、遺伝子クローン由来の野生型胎仔細胞と比較して、胎仔3（妊娠1）由来の細胞でのMHCクラスI発現の低下の影響を示す。ブタの対照の線維芽細胞およびNLRC5ノックアウト胎仔細胞に対するヒトCD8+細胞およびCD4 T細胞の増殖応答を測定した。図33A。細胞は、増殖の評価の前にCD4またはCD8としてゲーティングされた。図33B。CD8 T細胞増殖は、対照の未改変のブタ線維芽細胞と比較して、ブタ胎仔GGTA1/NLRC5ノックアウト細胞による処置刺激後に低下した。CD8 T細胞増殖におけるほとんど55%の低下が、ヒトの応答物がブタ胎仔GGTA1/NLRC5ノックアウト細胞で1:1の比で処置されたときに観察された。野生型胎仔細胞は、ヒトCD8 T細胞で17.2%の増殖を誘発したが、胎仔3（妊娠1）由来のMHCクラスI欠損細胞は、7.6%の増殖しか誘導しなかった。未改変の胎仔細胞と比較して1:5および1:10の比で、CD8 T細胞増殖応答に相違は見られなかった。研究した全ての比で、NLRC5ノックアウトおよび対照の未改変のブタ胎仔細胞に応答した、CD4 T細胞増殖の変化は観察されなかった。

【図33B-2】図33A～図33Bは、遺伝子クローン由来の野生型胎仔細胞と比較して、胎仔3（妊娠1）由来の細胞でのMHCクラスI発現の低下の影響を示す。ブタの対照の線維芽細胞およびNLRC5ノックアウト胎仔細胞に対するヒトCD8+細胞およびCD4 T細胞の増殖応答を測定した。図33A。細胞は、増殖の評価の前にCD4またはCD8としてゲーティングされた。図33B。CD8 T細胞増殖は、対照の未改変のブタ線維芽細胞と比較して、ブタ胎仔GGTA1/NLRC5ノックアウト細胞による処置刺激後に低下した。CD8 T細胞増殖におけるほとんど55%の低下が、ヒトの応答

物がブタ胎仔 G G T A 1 / N L R C 5 ノックアウト細胞で 1 : 1 の比で処置されたときに観察された。野生型胎仔細胞は、ヒト C D 8⁺ T 細胞で 17.2 % の増殖を誘発したが、胎仔 3 (妊娠 1) 由来の M H C クラス I 欠損細胞は、7.6 % の増殖しか誘導しなかった。未改変の胎仔細胞と比較して 1 : 5 および 1 : 10 の比で、C D 8⁺ T 細胞増殖応答に相違は見られなかった。研究した全ての比で、N L R C 5 ノックアウトおよび対照の未改変のブタ胎仔細胞に応答した、C D 4⁺ T 細胞増殖の変化は観察されなかった。

【発明を実施するための形態】

【0069】

以下の説明および例は、本発明の実施形態を詳細に説明する。本発明は、本明細書に記載される特定の実施形態に限定されず、変動し得ることを理解すべきである。当業者は、その範囲内に包含される、本発明の多数のバリエーションおよび改変が存在することを認識する。

10

【0070】

臓器および組織機能の不全は、個体の早死にを生じ得る。移植は、この問題を潜在的に解決し得、多くの個体の生命を延長させ得る。しかし、移植に使用できる細胞、臓器および／または組織は不足している。

【0071】

異種グラフトまたは同種グラフト（例えば、胚性または誘導多能性幹細胞）は、移植に使用される細胞、臓器および／または組織の無制限の供給を創出するために使用され得る。一般に、一部の移植は、移植拒絶を最終的にもたらし得る増加した免疫応答をもたらし得る。同系グラフトまたは自家グラフトは典型的に、拒絶を生じない。しかし、同種グラフトおよび異種グラフトは、免疫反応を生じ得、グラフトの破壊を最終的にもたらし得る。拒絶のリスクは、一部の場合には、免疫応答を抑制することによって軽減され得る。

20

【0072】

伝統的には、免疫抑制薬は、移植後に使用された。しかし、がんおよび感染の増加したリスクが含まれるがこれらに限定されない、免疫抑制薬を用いた長期処置に関連する多くの有害効果が存在する。グラフト拒絶を予防し免疫系を抑制するための代替方法が求められた。免疫応答は、本明細書に記載されるものを含む種々の技術の使用によって抑えられ得る。例えば、最小限の免疫抑制薬の使用なしまたはありの、移植拒絶を予防するためまたは移植拒絶までの時間を延長させるための、本明細書に記載される 1 つの方法では、動物、例えばドナー非ヒト動物は、例えば、遺伝的に変更され得る。引き続いて、変更された動物、例えばドナー非ヒト動物の細胞、臓器および／または組織が回収され得、同種グラフトまたは異種グラフトにおいて使用され得る。あるいは、細胞は、動物、例えば、ヒトもしくは非ヒト動物から抽出され得（初代細胞が含まれるがこれらに限定されない）、または細胞は、以前に抽出された動物細胞、例えば、細胞株であり得る。これらの細胞は、遺伝的に変更された細胞を創出するために使用され得る。

30

【0073】

移植拒絶（例えば、T 細胞媒介性移植拒絶）は、慢性免疫抑制によって予防され得る。しかし、免疫抑制は費用がかかり、重篤な副作用のリスクと関連する。慢性免疫抑制の必要を回避するために、

40

i) M H C クラス I の機能的発現を欠く遺伝子改変されたグラフトを利用し、それによって、直接的な特異性で C D 8⁺ T 細胞の活性化を妨害し、これらの C D 8⁺ T 細胞の細胞溶解性エフェクター機能を除外する、

i i) 拮抗性の抗 C D 40 m A b（ならびに枯渇化抗 C D 20 m A b および m T O R 阻害剤）を含む誘導免疫療法を使用して、B 細胞（および他の A P C）媒介性プライミングおよび抗ドナー T 細胞のメモリー生成を妨害する、および／または

i i i) アポトーシス性ドナー細胞ワクチンの移植前後の注入を介して、間接的な特異性で抗ドナー T 細胞を欠失させる、
多面的な T 細胞標的化拒絶予防が開発された（図 1）。

【0074】

50

遺伝子改変された非ヒト動物（例えば、非ヒト霊長類、またはローラシア獣上目のメンバー、例えば有蹄動物である遺伝子改変された動物）およびそれから単離された臓器、組織または細胞、寛容化ワクチン、ならびに非ヒト動物から単離された臓器、組織または細胞の移植によって、それを必要とするレシピエントにおいて疾患を処置または予防するための方法が本明細書に記載される。非ヒト動物（例えば、非ヒト霊長類、またはローラシア獣上目のメンバー、例えば有蹄動物である遺伝子改変された動物）から単離された臓器、組織または細胞は、同じ種（同種移植片）または異なる種（異種移植片）から、それを必要とするレシピエント中に移植され得る。レシピエントは、寛容化ワクチンおよび／または1つもしくは複数の免疫調節剤（例えば、抗体）で寛容化され得る。異種移植が関与する実施形態では、このレシピエントは、ヒトであり得る。処置され得る適切な疾患は、レシピエントの臓器、組織または細胞（例えば、心臓、肺、肝臓、静脈、皮膚または脾島細胞）が欠損しているまたは傷害される任意の疾患であり、レシピエントは、非ヒト動物から単離された臓器、組織または細胞の移植によって処置され得る。

10

【0075】

定義

本明細書で使用される場合、参照数値およびその文法的等価物に関して、用語「約」は、その数値自体およびその数値からプラスまたはマイナス10%の範囲の値を含み得る。例えば、量「約10」は、10および9から11までの任意の量を含む。例えば、参照数値に関して、用語「約」は、その値からプラスまたはマイナス10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%または1%の範囲の値もまた含み得る。

20

【0076】

用語「非ヒト動物」およびその文法的等価物は、本明細書で使用する場合、ネイティブ動物または遺伝子改変された非ヒト動物であり得る非ヒト哺乳動物を含む、ヒト以外の全ての動物種を含む。非ヒト哺乳動物には、有蹄動物、例えば、偶蹄動物（例えば、ブタ、ペッカリー、カバ、ラクダ、ラマ、マメジカ（ネズミジカ）、シカ、キリン、プロングホーン、アンテロープ、ヤギーアンテロープ（ヒツジ、ヤギなどを含む）またはウシ）もしくは奇蹄動物（例えば、ウマ、バクおよびサイ）、非ヒト霊長類（例えば、サルまたはチンパンジー）、イヌ科（Canidae）（例えば、イヌ）またはネコが含まれる。非ヒト動物は、ローラシア獣上目のメンバーであり得る。ローラシア獣上目には、Waddellら、Towards Resolving the Interordinal Relationships of Placental Mammals. Systematic Biology 48巻（1号）：1～5頁（1999年）に記載されるような哺乳動物の群が含まれ得る。ローラシア獣上目のメンバーには、真無盲腸目（Eulipotyphla）（ハリネズミ、トガリネズミおよびモグラ）、奇蹄目（Perissodactyla）（サイ、ウマおよびバク）、食肉目（Carnivora）（肉食動物）、鯨偶蹄目（Cetartiodactyla）（偶蹄目およびクジラ目）、翼手目（Chiroptera）（コウモリ）および有鱗目（Pholidota）（センザンコウ）が含まれ得る。ローラシア獣上目のメンバーは、本明細書に記載される有蹄動物、例えば、奇蹄動物または偶蹄動物であり得る。有蹄動物はブタであり得る。メンバーは、食肉目のメンバー、例えば、ネコまたはイヌであり得る。一部の場合には、ローラシア獣上目のメンバーは、ブタであり得る。

30

40

【0077】

用語「ブタ」およびその文法的等価物は、本明細書で使用する場合、イノシシ科（Suidae）の偶蹄動物内のイノシシ（Sus）属中の動物を指し得る。例えば、ブタは、野生ブタ、家畜ブタ、ミニブタ、Sus scrofaブタ、Sus scrofa domesticaブタまたは近交系ブタであり得る。

【0078】

用語「導入遺伝子」およびその文法的等価物は、本明細書で使用する場合、生物中に移入され得る遺伝子または遺伝物質を指し得る。例えば、導入遺伝子は、生物中に導入される遺伝子を含むDNAのストレッチまたはセグメントであり得る。導入遺伝子が生物中に

50

移入される場合、生物は、トランスジェニック生物と呼ばれ得る。導入遺伝子は、トランスジェニック生物においてRNAまたはポリペプチド（例えば、タンパク質）を産生するその能力を保持し得る。導入遺伝子は、タンパク質またはその断片（例えば、機能的断片）をコードするポリヌクレオチドを含み得る。導入遺伝子のポリヌクレオチドは、外因性ポリヌクレオチドであり得る。タンパク質の断片（例えば、機能的断片）は、タンパク質のアミノ酸配列の少なくともまたは少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%を含み得る。タンパク質の断片は、タンパク質の機能的断片であり得る。タンパク質の機能的断片は、タンパク質の機能の一部または全てを保持し得る。

【0079】

10

用語「遺伝子改変」およびその文法的等価物は、本明細書で使用する場合、核酸、例えば、生物のゲノム内の核酸の1つまたは複数の変更を指し得る。例えば、遺伝子改変とは、遺伝子の変更、付加および／または欠失を指し得る。遺伝子改変された細胞は、付加された、欠失されたおよび／または変更された遺伝子を有する細胞もまた指し得る。遺伝子改変された細胞は、遺伝子改変された非ヒト動物由来であり得る。遺伝子改変された非ヒト動物由来の遺伝子改変された細胞は、かかる遺伝子改変された非ヒト動物から単離された細胞であり得る。遺伝子改変された非ヒト動物由来の遺伝子改変された細胞は、かかる遺伝子改変された非ヒト動物に起源する細胞であり得る。例えば、細胞

【0080】

20

用語「島」または「島細胞」およびそれらの文法的等価物は、本明細書で使用する場合、生物の膵臓中に存在する内分泌（例えば、ホルモン産生）細胞を指し得る。例えば、島細胞は、膵α細胞、膵β細胞、膵δ細胞、膵F細胞および／または膵ε細胞が含まれるがこれらに限定されない、異なる型の細胞を含み得る。島細胞は、細胞の群、細胞クラスターなどもまた指し得る。

【0081】

用語「状態」状態およびその文法的等価物は、本明細書で使用する場合、疾患、事象、または健康状態における変化を指し得る。

【0082】

用語「糖尿病」およびその文法的等価物は、本明細書で使用する場合、延長された期間にわたる高い血糖レベルを特徴とする疾患を指し得る。例えば、用語「糖尿病」およびその文法的等価物は、本明細書で使用する場合、1型、2型、嚢胞性線維症関連、外科的、妊娠糖尿病およびミトコンドリア糖尿病が含まれるがこれらに限定されない、全てのまたは任意の型の糖尿病を指し得る。一部の場合には、糖尿病は、遺伝性糖尿病の一形態であり得る。

30

【0083】

用語「表現型」およびその文法的等価物は、本明細書で使用する場合、生物の観察可能な特徴または形質、例えば、その形態学、発生、生化学的もしくは生理学的特性、生物季節学、行動および行動の所産の複合を指し得る。文脈に依存して、用語「表現型」とは、時折、集団の観察可能な特徴または形質の複合を指し得る。

【0084】

40

用語「破壊すること」およびその文法的等価物は、本明細書で使用する場合、例えば、欠失、挿入、変異、再編成またはそれらの任意の組合せによって遺伝子を変更するプロセスを指し得る。例えば、遺伝子は、ノックアウトによって破壊され得る。遺伝子を破壊することは、遺伝子の発現（例えば、mRNAおよび／またはタンパク質発現）を部分的に低減させるまたは完全に抑制することであり得る。破壊することは、阻害テクノロジー、例えば、shRNA、siRNA、microRNA、ドミナントネガティブ、または遺伝子もしくはタンパク質の機能性もしくは発現を阻害するための任意の他の手段もまた含み得る。

【0085】

用語「遺伝子編集」およびその文法的等価物は、本明細書で使用する場合、1つまたは

50

複数のヌクレオチドが挿入、置き換えまたはゲノムから除去される遺伝子操作を指し得る。例えば、遺伝子編集は、ヌクレアーゼ（例えば、天然に存在するヌクレアーゼまたは人工的に操作されたヌクレアーゼ）を使用して実施され得る。

【0086】

用語「移植拒絶」およびその文法的等価物は、本明細書で使用する場合、臓器移植レシピエントの免疫応答が、移植された材料の機能を損なうまたは破壊するのに十分な、移植された材料（例えば、細胞、組織および／または臓器）に対する反応を開始させる、プロセス（単数または複数）を指し得る。

【0087】

用語「超急性拒絶」およびその文法的等価物は、本明細書で使用する場合、移植後最初の24時間以内に生じるまたは開始する、移植された材料または組織の拒絶を指し得る。例えば、超急性拒絶は、「急性体液性拒絶」および「抗体媒介性拒絶」を包含し得るがこれらに限定されない。

【0088】

用語「陰性ワクチン」、「寛容化ワクチン」およびそれらの文法的等価物は、本明細書で使用する場合、相互交換可能に使用され得る。寛容化ワクチンは、適切な免疫療法の援護の下に使用される場合、グラフトに対してレシピエントを寛容化し得る、またはグラフトに対するレシピエントの寛容化に寄与し得る。これは、移植拒絶の予防を助け得る。

【0089】

用語「レシピエント」、「対象」およびそれらの文法的等価物は、本明細書で使用する場合、相互交換可能に使用され得る。レシピエントまたは対象は、ヒトまたは非ヒト動物であり得る。レシピエントまたは対象は、移植グラフト、寛容化ワクチンおよび／もしくは本出願で開示される他の組成物を受ける、それらを受けている、またはそれらを受けた、ヒトまたは非ヒト動物であり得る。レシピエントまたは対象は、移植グラフト、寛容化ワクチンおよび／または本出願で開示される他の組成物を必要とするレシピエントまたは対象であり得る。一部の場合には、レシピエントは、移植グラフトを受けることになる、受けている、または受けたヒトまたは非ヒト動物であり得る。

【0090】

全体で開示される一部の数値は、例えば、「Xは、少なくともまたは少なくとも約100；または200 [または任意の数字] である」と言われる。この数値は、その数自体、および以下の全てを含む：

- i) Xは、少なくとも100である；
- ii) Xは、少なくとも200である；
- iii) Xは、少なくとも約100である；および
- iv) Xは、少なくとも約200である。

全てのこれらの異なる組合せは、全体で開示される数値によって企図される。全ての開示された数値は、治療剤の投与を指すのであれ、日数、月数、年数、重量、投薬量などを指すのであれ、反対のものが具体的に示されない限り、この様式で解釈すべきである。

【0091】

全体で開示される範囲は、時折、例えば、「Xは、1日目からもしくは約1日目から2日目まで；または2日目からしくは約2日目から3日目まで [または任意の数値範囲] に投与される」と言われる。この範囲は、その数自体（例えば、範囲の終点）、および以下の全てを含む：

- i) Xは、1日目と2日目との間に投与される；
- ii) Xは、2日目と3日目との間に投与される；
- iii) Xは、約1日目と2日目との間に投与される；
- iv) Xは、約2日目と3日目との間に投与される；
- v) Xは、1日目と約2日目との間に投与される；
- vi) Xは、2日目と約3日目との間に投与される；
- vii) Xは、約1日目と約2日目との間に投与される；および

10

20

30

40

50

v i i i) Xは、約2日目と約3日目との間に投与される。
全てのこれらの異なる組合せは、全体で開示される範囲によって企図される。全ての開示された範囲は、治療剤の投与を指すのであれ、日数、月数、年数、重量、投薬量などを指すのであれ、反対のものが具体的に示されない限り、この様式で解釈すべきである。

【0092】

用語「および／または」および「それらの任意の組合せ」ならびにそれらの文法的等価物は、本明細書で使用する場合、相互交換可能に使用され得る。これらの用語は、任意の組合せが具体的に企図されることを伝え得る。例示のみを目的として、以下の語句「A、Bおよび／またはC」または「A、B、C、またはそれらの任意の組合せ」は、「個々にA；個々にB；個々にC；AおよびB；BおよびC；AおよびC；ならびにA、BおよびC」を意味し得る。

10

【0093】

I. 遺伝子改変された非ヒト動物

移植のための細胞、組織および／または臓器のドナーであり得る遺伝子改変された動物が、本明細書で提供される。遺伝子改変された非ヒト動物は、任意の所望の種であり得る。例えば、本明細書に記載される遺伝子改変された非ヒト動物は、遺伝子改変された非ヒト哺乳動物であり得る。遺伝子改変された非ヒト哺乳動物は、遺伝子改変された偶蹄動物（例えば、ブタ、ペッカリー、カバ、ラクダ、ラマ、マメジカ（ネズミジカ）、シカ、キリン、ブロングホーン、アンテロープ、ヤギーアンテロープ（ヒツジ、ヤギなどを含む）またはウシ）もしくは遺伝子改変された奇蹄動物（例えば、ウマ、バクおよびサイ）が含まれる遺伝子改変された有蹄動物、遺伝子改変された非ヒト霊長類（例えば、サルまたはチンパンジー）または遺伝子改変されたイヌ科（例えば、イヌ）であり得る。遺伝子改変された非ヒト動物は、ローラシア獣上目のメンバーであり得る。遺伝子改変された非ヒト動物は、非ヒト霊長類、例えば、サルまたはチンパンジーであり得る。非ヒト動物がブタである場合、このブタは、少なくともまたは少なくとも約5、50、100または300ポンドであり得る、例えば、このブタは、5ポンドからもしくは約5ポンドから50ポンドの間；25ポンドからしくは約25ポンドから100ポンドの間；または75ポンドからしくは約75ポンドから300ポンドの間であり得る。一部の場合には、非ヒト動物は、少なくとも1回出産したブタである。

20

【0094】

遺伝子改変された非ヒト動物は、任意の齢の動物であり得る。例えば、遺伝子改変された非ヒト動物は、胎仔；1日からまたは約1日から1ヵ月；1ヵ月からまたは約1ヵ月から3ヵ月；3ヵ月からまたは約3ヵ月から6ヵ月；6ヵ月からまたは約6ヵ月から9ヵ月；9ヵ月からまたは約9ヵ月から1歳；1歳からまたは約1歳から2歳までであり得る。遺伝子改変された非ヒト動物は、非ヒト胎仔動物、周産期非ヒト動物、新生仔非ヒト動物、離乳前非ヒト動物、若年成体非ヒト動物または成体非ヒト動物であり得る。

30

【0095】

遺伝子改変された非ヒト動物は、遺伝子改変されていない対応する動物と比較して、1つまたは複数の遺伝子の低減された発現を含み得る。遺伝子改変されていない対応する動物は、遺伝子改変された動物と実質的に同一であるが、ゲノム中に遺伝子改変を有さない、動物であり得る。例えば、遺伝子改変されていない対応する動物は、遺伝子改変された動物と同じ種の野生型動物であり得る。非ヒト動物は、それを必要とするレシピエントまたは対象に移植するための細胞、組織または臓器を提供できる。それを必要とするレシピエントまたは対象は、状態を有することが既知のまたは状態を有すると疑われるレシピエントまたは対象であり得る。状態は、本明細書で開示される方法および組成物によって、処置、予防、低減、排除または増大され得る。レシピエントは、移植された細胞、組織もしくは臓器に対する低い免疫応答を示し得る、または移植された細胞、組織もしくは臓器に対する免疫応答を示さなくてもよい。移植された細胞、組織または臓器は、レシピエント（例えば、ヒトまたは別の動物）のCD8+T細胞、NK細胞またはCD4+T細胞によって認識不能であり得る。その発現が低減される遺伝子には、MHC分子、MHC分子

40

50

発現のレギュレーター、およびドナー非ヒト動物とレシピエント（例えば、ヒトまたは別の動物）との間で示差的に発現される遺伝子が含まれ得る。低減された発現は、1つまたは複数の遺伝子のmRNA発現またはタンパク質発現であり得る。例えば、低減された発現は、1つまたは複数の遺伝子のタンパク質発現であり得る。低減された発現は、発現なしもまた含み得る。例えば、遺伝子の低減された発現を有する動物、細胞、組織または臓器は、遺伝子の発現（例えば、mRNAおよび／またはタンパク質発現）なしであり得る。遺伝子の発現の低減は、遺伝子の機能を不活性化し得る。一部の場合には、遺伝子の発現が遺伝子改変された動物において低減される場合、遺伝子の発現は、遺伝子改変された動物中には存在しない。

【0096】

10

遺伝子改変された非ヒト動物は、遺伝子改変されていない対応する動物と比較して、1つまたは複数のMHC分子の低減された発現を含み得る。例えば、非ヒト動物は、1つまたは複数の豚白血球抗原（SLA）クラスIおよび／またはSLAクラスII分子の低減された発現を有する有蹄動物、例えばブタであり得る。

【0097】

遺伝子改変された非ヒト動物は、遺伝子改変されていない対応する動物と比較して、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）分子（例えば、MHC I分子および／またはMHC II分子）を調節する任意の遺伝子の低減された発現を含み得る。かかる遺伝子の発現を低減させることは、MHC分子（例えば、MHC I分子および／またはMHC II分子）の低減された発現および／または機能を生じ得る。一部の場合には、その発現が非ヒト動物において低減される1つまたは複数の遺伝子は、MHC I特異的エンハンセオソームの成分、MHC I結合性ペプチドのトランスポーター、ナチュラルキラー群2Dリガンド、CXCKEモカイン（chemical）受容体（CXCR）3リガンド、補体成分3（C3）および主要組織適合遺伝子複合体IIトランスアクチベーター（CIITA）のうちの1つまたは複数を含み得る。一部の場合には、MHC I特異的エンハンセオソームの成分は、NLRC5であり得る。一部の場合には、MHC I特異的エンハンセオソームの成分は、調節因子X（RFX）（例えば、RFX1）、核転写因子Y（NFY）およびcAMP応答エレメント結合タンパク質（CREB）もまた含み得る。一部の例では、MHC I結合性ペプチドのトランスポーターは、抗原プロセッシング関連トランスポーター1（TAP1）であり得る。一部の場合には、ナチュラルキラー（NK）群2Dリガンドは、MICAおよびMICBを含み得る。例えば、遺伝子改変された非ヒト動物は、以下の遺伝子：NOD様受容体ファミリーCARDドメイン含有5（NLRC5）、抗原プロセッシング関連トランスポーター1（TAP1）、C-X-Cモチーフケモカイン10（CXCL10）、MHCクラスIポリペプチド関連配列A（MICA）、MHCクラスIポリペプチド関連配列B（MICB）、補体成分3（C3）およびCIITAのうちの1つまたは複数の低減された発現を含み得る。遺伝子改変された動物は、以下の遺伝子：MHC I特異的エンハンセオソームの成分（例えば、NLRC5）、MHC I結合性ペプチドのトランスポーター（TAP1）およびC3のうちの1つまたは複数の低減された発現を含み得る。

20

30

【0098】

40

遺伝子改変された非ヒト動物は、非ヒト動物と、非ヒト動物由来の細胞、組織または臓器を受けているレシピエントとの間で異なるレベルで発現される1つまたは複数の遺伝子の遺伝子改変されていない対応動物と比較して、低減された発現を含み得る。例えば、1つまたは複数の遺伝子は、非ヒト動物中よりも、ヒトにおいてより低いレベルで発現され得る。一部の場合には、1つまたは複数の遺伝子は、非ヒト動物の内因性遺伝子であり得る。内因性遺伝子は、一部の場合には、別の種では発現されない遺伝子である。例えば、非ヒト動物の内因性遺伝子は、ヒトでは発現されない遺伝子であり得る。例えば、一部の場合には、1つまたは複数の遺伝子のホモログ（例えば、オルソログ）は、ヒトには存在しない。別の例では、1つまたは複数の遺伝子のホモログ（例えば、オルソログ）は、ヒトに存在し得るが、発現はされない。

50

【0099】

一部の場合には、非ヒト動物は、ブタであり得、レシピエントは、ヒトであり得る。これらの場合には、1つまたは複数の遺伝子は、ブタでは発現されるがヒトでは発現されない任意の遺伝子であり得る。例えば、1つまたは複数の遺伝子は、糖タンパク質ガラクトシルトランスフェラーゼアルファ1, 3 (GGTA1)、推定シチジナーリン酸-N-アセチルノイラミン酸ヒドロキシラーゼ様タンパク質 (CMAH) およびβ1, 4 N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ (B4GALNT2) を含み得る。遺伝子改変された非ヒト動物は、B4GALNT2、GGTA1またはCMAHの低減された発現を含み得、低減された発現は、遺伝子改変されていない対応する動物と比較したものである。遺伝子改変された非ヒト動物は、B4GALNT2およびGGTA1の低減された発現を含み得、低減された発現は、遺伝子改変されていない対応する動物と比較したものである。遺伝子改変された非ヒト動物は、B4GALNT2およびCMAHの低減された発現を含み得、低減された発現は、遺伝子改変されていない対応する動物と比較したものである。遺伝子改変された非ヒト動物は、B4GALNT2、GGTA1およびCMAHの低減された発現を含み得、低減された発現は、遺伝子改変されていない対応する動物と比較したものである。

10

【0100】

遺伝子改変された非ヒト動物は、NLRC5、TAP1、CXCL10、MICA、MICB、C3、CIIITA、GGTA1、CMAHおよびB4GALNT2が含まれる本明細書で開示される遺伝子のいずれかのうちの1つまたは複数の遺伝子改変されていない対応動物と比較して低減された発現を含み得る。

20

【0101】

遺伝子改変された非ヒト動物は、その発現が低減される、例えば、遺伝子発現が低減される、1つまたは複数の遺伝子を含み得る。その発現が低減される1つまたは複数の遺伝子には、NOD様受容体ファミリーCARDドメイン含有5 (NLRC5)、抗原プロセッシング関連トランスポーター1 (TAP1)、糖タンパク質ガラクトシルトランスフェラーゼアルファ1, 3 (GGTA1)、推定シチジナーリン酸-N-アセチルノイラミン酸ヒドロキシラーゼ様タンパク質 (CMAH)、C-X-Cモチーフケモカイン10 (CXCL10)、MHCクラスIポリペプチド関連配列A (MICA)、MHCクラスIポリペプチド関連配列B (MICB)、クラスII主要組織適合遺伝子複合体トランスアクチベーター (CIIITA)、ベーター1, 4-N-アセチル-ガラクトサミニルトランスフェラーゼ2 (B4GALNT2)、補体成分3 (C3)、および/またはそれらの任意の組合せが含まれるがこれらに限定されない。

30

【0102】

遺伝子改変された非ヒト動物は、その発現が破壊されている1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20またはそれ超の遺伝子を含み得る。種々の組合せを限定するのではなく例示目的のために、当業者は、遺伝子改変された非ヒト動物が、個々に破壊されたNLRC5およびTAP1を有し得ることを想定できる。遺伝子改変された非ヒト動物はまた、破壊されたNLRC5およびTAP1の両方を有し得る。遺伝子改変された非ヒト動物は、破壊された以下のGGTA1、CMAH、CXCL10、MICA、MICB、B4GALNT2またはCIIITA遺伝子のうちの1つまたは複数に加えて、破壊されたNLRC5およびTAP1もまた有し得る；例えば、「NLRC5、TAP1およびGGTA1」または「NLRC5、TAP1およびCMAH」が破壊され得る。遺伝子改変された非ヒト動物は、破壊されたNLRC5、TAP1、GGTA1およびCMAHもまた有し得る。あるいは、遺伝子改変された非ヒト動物は、破壊されたNLRC5、TAP1、GGTA1、B4GALNT2およびCMAHもまた有し得る。一部の場合には、遺伝子改変された非ヒト動物は、破壊されたC3およびGGTA1を有し得る。一部の場合には、遺伝子改変された非ヒト動物は、NLRC5、C3、GGTA1、B4GALNT2、CMAHおよびCXCL10の低減された発現を有し得る。一部の場合には、遺伝子改変された非ヒト動物は、TA

40

50

P1、C3、GGTA1、B4GALNT2、CMAHおよびCXCL10の低減された発現を有し得る。一部の場合には、遺伝子改変された非ヒト動物は、NLRC5、TAP1、C3、GGTA1、B4GALNT2、CMAHおよびCXCL10の低減された発現を有し得る。

【0103】

移植されたヒト細胞上のMHCクラスI発現の欠如は、ナチュラルキラー（NK）細胞の受動的活性化を引き起こし得る（Ohlenら、1989年）。MHCクラスI発現の欠如は、NLRC5、TAP1またはB2M遺伝子欠失に起因し得る。NK細胞の細胞傷害性は、NK細胞上の阻害性受容体CD94／NKG2Aを刺激して細胞死滅を防止できるヒトMHCクラスI遺伝子HLA-Eの発現によって克服され得る（Weissら、2009年；Lilienfeldら、2007年；Sasakiら、1999年）。HLA-E遺伝子の首尾よい発現は、ヒトB2M（ベータ2ミクログロブリン）遺伝子および同族ペプチドの共発現に依存し得る（Weissら、2009年；Lilienfeldら、2007年；Sasakiら、1999年；Pascasovaら、1999年）。幹細胞DNAにおけるヌクレアーゼ媒介性切断は、相同組換え修復を介した1つまたは複数の遺伝子の挿入を可能にし得る。HLA-EおよびhB2M遺伝子は、順番に、ヌクレアーゼ媒介性DNA切断の領域において組み込まれ得、そうして、標的遺伝子（例えば、NLRC5）の発現を防止しつつ、導入遺伝子を挿入する。

【0104】

遺伝子の発現レベルは、種々の程度まで低減され得る。例えば、1つまたは複数の遺伝子の発現は、100%または約100%低減され得る。一部の場合には、1つまたは複数の遺伝子の発現は、例えば、未改変対照の発現と比較して、正常な発現の99%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%もしくは50%または約99%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%もしくは50%、低減され得る。一部の場合には、1つまたは複数の遺伝子の発現は、例えば、未改変対照の発現と比較して、正常な発現の少なくともまたは少なくとも約99%から90%；89%から80%、79%から70%；69%から60%；59%から50%、低減され得る。例えば、1つまたは複数の遺伝子の発現は、正常発現の少なくとももしくは少なくとも約90%、または少なくとももしくは少なくとも約90%から99%、低減され得る。

【0105】

発現は、任意の公知の方法、例えば、PCR、リアルタイムPCR（例えば、Sybr-green）および／またはホットPCRが含まれるがこれらに限定されない定量的PCR（qPCR）によって測定され得る。一部の場合には、1つまたは複数の遺伝子の発現は、遺伝子の転写物のレベルを検出することによって測定され得る。例えば、1つまたは複数の遺伝子の発現は、ノザンブロッティング、ヌクレアーゼ保護アッセイ（例えば、RNase保護アッセイ）、逆転写PCR、定量的PCR（例えば、リアルタイムPCR、例えば、リアルタイム定量的逆転写PCR）、in situハイブリダイゼーション（例えば、蛍光in situハイブリダイゼーション（FISH））、ドットプロット分析、ディファレンシャルディスプレイ、遺伝子発現の連続的分析、サブトラクティブハイブリダイゼーション、マイクロアレイ、ナノストリングおよび／またはシークエンシング（例えば、次世代シークエンシング）によって測定され得る。一部の場合には、1つまたは複数の遺伝子の発現は、遺伝子によってコードされるタンパク質のレベルを検出することによって測定され得る。例えば、1つまたは複数の遺伝子の発現は、タンパク質免疫染色、タンパク質免疫沈降、電気泳動（例えば、SDS-PAGE）、ウエスタンブロッティング、ビシンコニン酸アッセイ、分光光度測定、質量分析、酵素アッセイ（例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ）、免疫組織化学、フローサイトメトリーおよび／または免疫細胞化学によって測定される。1つまたは複数の遺伝子の発現は、顕微鏡によっても測定され得る。顕微鏡は、光学、電子または走査型プローブ顕微鏡であり得る。光学顕微鏡は、明視野、傾斜照明（oblique illumination）、交差偏光、分散染

10

20

30

40

50

色、暗視野、位相差、微分干渉、干渉反射顕微鏡 (interference reflection microscopy)、蛍光 (例えば、粒子、例えば細胞が免疫染色される場合)、共焦点、単一平面照明顕微鏡、ライトシート蛍光顕微鏡、デコンボリューションまたは連続時間符号化増幅顕微鏡 (serial time-encoded amplified microscopy) の使用を含み得る。MHC I 分子の発現は、本明細書に記載される、発現を試験するための任意の方法によっても検出され得る。

【0106】

破壊された遺伝子

本発明者らは、異なる組合せの破壊された遺伝子を有する細胞、臓器および／または組織が、レシピエント中に移植された場合、拒絶に対してあまり感受性でない細胞、臓器および／または組織を生じ得ることを見出した。例えば、本発明者らは、特定の遺伝子、例えば、NLRC5、TAP1、GGTA1、B4GALNT2、CMAH、CXCL10、MICA、MICB、C3および／またはCIIITAを破壊すること (例えば、それらの発現を低減させること) が、グラフト生存の見込みを増加させ得ることを見出した。

【0107】

しかし、破壊は、これらの遺伝子のみに限定されない。破壊は、任意の特定の遺伝子の破壊であり得る。本出願内の遺伝子の遺伝子ホモログ (例えば、任意の哺乳動物バージョンの遺伝子) が網羅されることが企図される。例えば、破壊される遺伝子は、本明細書で開示される遺伝子、例えば、NLRC5、TAP1、GGTA1、B4GALNT2、CMAH、CXCL10、MICA、MICB、C3および／またはCIIITAに対して特定の同一性および／または相同性を示し得る。したがって、(核酸レベルまたはタンパク質レベルで) 少なくともまたは少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%または100%の相同性を示す遺伝子、例えば、少なくともまたは少なくとも約50%から60%；60%から70%；70%から80%；80%から90%；または90%から99%までの相同性を示す遺伝子が破壊され得ることが企図される。(核酸レベルまたはタンパク質レベルで) 少なくともまたは少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、99%または100%の同一性を示す遺伝子、例えば、少なくともまたは少なくとも約50%から60%；60%から70%；70%から80%；80%から90%；または90%から99%までの同一性を示す遺伝子が破壊され得ることもまた企図される。一部の遺伝子ホモログは、当該分野で公知であるが、一部の場合には、ホモログは未知である。しかし、哺乳動物間の相同遺伝子は、NCBI BLASTなどの公に利用可能なデータベースを使用して核酸 (DNAまたはRNA) 配列またはタンパク質配列を比較することによって見出され得る。例示的な遺伝子のゲノム配列、cDNAおよびタンパク質配列は、表1中に示される。

【0108】

遺伝子抑制もまた、いくつかの方法で実施され得る。例えば、遺伝子発現は、ノックアウト、遺伝子のプロモーターを変更すること、および／または干渉RNAを投与すること (ノックダウン) によって、低減され得る。これは、生物レベルで、または組織、臓器および／もしくは細胞レベルで実施され得る。1つまたは複数の遺伝子が、非ヒト動物、細胞、組織および／または臓器においてノックダウンされる場合、1つまたは複数の遺伝子は、RNA干渉試薬、例えば、siRNA、shRNAまたはmiRNAを投与することによって低減され得る。例えば、shRNAを発現し得る核酸は、発現をノックダウンするために、細胞中に安定にトランスフェクトされ得る。さらに、shRNAを発現し得る核酸は、非ヒト動物のゲノム中に挿入され得、そうして、非ヒト動物内の遺伝子をノックダウンする。

【0109】

破壊方法は、ドミナントネガティブタンパク質を過剰発現させることもまた含み得る。この方法は、機能的野生型遺伝子の全体的に減少した機能を生じ得る。さらに、ドミナントネガティブ遺伝子が発現させることは、ノックアウトおよび／またはノックダウンの表

10

20

30

40

50

現型と類似した表現型を生じ得る。

【0110】

時折、停止コドンが、1つまたは複数の遺伝子において（例えば、ヌクレオチド置き換えによって）挿入または創出され得、これは、非機能的な転写物またはタンパク質を生じ得る（時折、ノックアウトと呼ばれる）。例えば、停止コドンが1つまたは複数の遺伝子の内部に創出される場合、得られた転写および／またはタンパク質は、短縮され得、非機能的であり得る。しかし、一部の場合には、短縮は、活性な（部分的にまたは過度に活性な）タンパク質をもたらす得る。一部の場合には、タンパク質が過度に活性である場合、これは、ドミナントネガティブタンパク質、例えば、野生型タンパク質の活性を破壊する変異体ポリペプチドを生じ得る。

10

【0111】

このドミナントネガティブタンパク質は、任意のプロモーターの制御範囲内の核酸中で発現され得る。例えば、プロモーターは、遍在性プロモーターであり得る。プロモーターは、誘導性プロモーター、組織特異的プロモーターおよび／または発生特異的プロモーターでもあり得る。

【0112】

次いで、ドミナントネガティブタンパク質をコードする核酸は、細胞または非ヒト動物中に挿入され得る。任意の公知の方法が使用され得る。例えば、安定なトランスフェクションが使用され得る。さらに、ドミナントネガティブタンパク質をコードする核酸は、非ヒト動物のゲノム中に挿入され得る。

20

【0113】

非ヒト動物中の1つまたは複数の遺伝子は、当該分野で公知の任意の方法を使用してノックアウトされ得る。例えば、1つまたは複数の遺伝子をノックアウトすることは、非ヒト動物のゲノムから1つまたは複数の遺伝子を欠失させることを含み得る。ノックアウトすることは、非ヒト動物から遺伝子配列の全てまたは一部を除去することもまた含み得る。ノックアウトすることは、非ヒト動物のゲノム中の遺伝子の全てまたは一部を、1つまたは複数のヌクレオチドで置き換えることを含み得ることもまた企図される。1つまたは複数の遺伝子をノックアウトすることは、1つまたは複数の遺伝子中に配列を挿入し、それによって、1つまたは複数の遺伝子の発現を破壊することもまた含み得る。例えば、配列を挿入することは、1つまたは複数の遺伝子の内部に停止コドンを生成し得る。配列を挿入することはまた、1つまたは複数の遺伝子のオープンリーディングフレームをシフトさせ得る。

30

【0114】

ノックアウトは、非ヒト動物中の任意の細胞、臓器および／または組織において実施され得る。例えば、ノックアウトは、全身ノックアウトであり得る、例えば、1つまたは複数の遺伝子の発現が、非ヒト動物の全ての細胞において低減される。ノックアウトはまた、非ヒト動物の1つまたは複数の細胞、組織および／または臓器に対して特異的であり得る。これは、コンディショナルノックアウトによって達成され得、このとき、1つまたは複数の遺伝子の発現が、1つまたは複数の臓器、組織、または細胞の型において、選択的に低減される。コンディショナルノックアウトは、Cre-lox系によって実施され得、このとき、Creは、細胞、組織および／または臓器特異的プロモーターの制御下で発現される。例えば、1つまたは複数の遺伝子は、1つまたは複数の組織または臓器においてノックアウトされ得（または発現が低減され得）、1つまたは複数の組織または臓器には、脳、肺、肝臓、心臓、脾臓、膵臓、小腸（small intestine）、大腸、骨格筋、平滑筋、皮膚、骨、脂肪組織、毛髪、甲状腺、気管、胆嚢、腎臓、尿管、膀胱、大動脈、静脈、食道、横隔膜、胃、直腸、副腎、気管支、耳、眼、網膜、生殖器、視床下部、喉頭、鼻、舌、脊髄もしくは尿管、子宮、卵巣、精巣、および／またはそれらの任意の組合せが含まれ得る。1つまたは複数の遺伝子はまた、1つの型の細胞においてノックアウトされ得（または発現が低減され得）、細胞の1つまたは複数の型には、毛包（trichocyte）、ケラチノサイト、ゴナドトロピン産生細胞、コルチコトロピン産

40

50

生細胞、甲状腺刺激ホルモン産生細胞、成長ホルモン産生細胞、プロラクチン分泌細胞、クロマフィン細胞、傍濾胞細胞、糸球小体細胞 (glomerulus cell) メラニン細胞 (melanocyte)、母斑細胞、メルケル細胞、象牙芽細胞、セメント芽細胞、角膜実質細胞、網膜ミューラー細胞、網膜色素上皮細胞、ニューロン、グリア (例えば、オリゴデンドロサイト アストロサイト)、上皮細胞、松果体細胞、肺胞細胞 (例えば、I 型肺胞細胞および II 型肺胞細胞)、クララ細胞、杯細胞、G 細胞、D 細胞、腸クロマフィン様細胞、胃主細胞、壁細胞 (parietal cell)、小窩細胞、K 細胞、D 細胞、I 細胞、杯細胞、パネート細胞、腸細胞、ミクロフォールド細胞、肝細胞、肝星細胞 (例えば、中胚葉由来のクッパー細胞)、胆嚢細胞 (cholecystocyte)、房心細胞、臍星細胞、臍 α 細胞、臍 β 細胞、臍 δ 細胞、臍 F 細胞、臍 ϵ 細胞、甲状腺 (例えば、濾胞細胞)、副甲状腺 (例えば、副甲状腺主細胞)、好酸性細胞、尿路上皮細胞、骨芽細胞、骨細胞、軟骨芽細胞、軟骨細胞、線維芽細胞、線維細胞、筋芽細胞、筋細胞、筋衛星細胞 (myosatellite cell)、腱細胞、心筋細胞、脂肪芽細胞、脂肪細胞、カハールの間質細胞、血管芽細胞、内皮細胞、メサングウム細胞 (例えば、糸球体内メサングウム細胞および糸球体外メサングウム細胞)、傍糸球体細胞、緻密斑細胞 (macula densa cell)、間質細胞 (stromal cell)、間質細胞 (interstitial cell)、テロサイト単純上皮細胞 (telocytes simple epithelial cell)、有足細胞、腎臓近位尿細管刷子縁細胞 (kidney proximal tubule brush border cell)、セルトリ細胞、ライディッヒ細胞、顆粒膜細胞、栓細胞 (peg cell)、生殖細胞、精子卵子、リンパ球、骨髓系細胞、内皮前駆体細胞、内皮幹細胞、血管芽細胞、中胚葉性血管芽細胞 (mesoangioblast)、周皮細胞 壁細胞 (mural cell)、および／またはそれらの任意の組合せが含まれる。

10

20

【0115】

コンディショナルノックアウトは、例えば、テトラサイクリン誘導性プロモーター、発生特異的プロモーターを使用することによって、誘導可能であり得る。これは、任意の時点または特定の時点において遺伝子／タンパク質の発現を排除または抑制することを可能にし得る。例えば、テトラサイクリン誘導性プロモーターの場合、テトラサイクリンが、誕生後のいつでも非ヒト動物に与えられ得る。非ヒト動物が胎内で発生する存在である場合、プロモーターは、妊娠の間に母親にテトラサイクリンを与えることによって誘導され得る。非ヒト動物が卵中で発生する場合、プロモーターは、テトラサイクリンを注射すること、またはテトラサイクリン中でインキュベートすることによって誘導され得る。テトラサイクリンが非ヒト動物に与えられると、テトラサイクリンは、目的の遺伝子の切り出しを次いで生じる cre の発現を生じる。

30

【0116】

cre/lox 系は、発生特異的プロモーターの制御下にあってもよい。例えば、一部のプロモーターは、誕生後、またはさらには思春期の開始後にオンになる。これらのプロモーターは、cre 発現を制御するために使用され得、したがって、発生特異的ノックアウトにおいて使用され得る。

【0117】

ノックアウトテクノロジーの任意の組合せが組み合わせられ得ることもまた企図される。例えば、組織特異的ノックアウトは、誘導性テクノロジーと組み合わせられて、組織特異的な誘導性ノックアウトを創出し得る。さらに、他の系、例えば発生特異的プロモーターが、組織特異的プロモーターおよび／または誘導性ノックアウトと組み合わせて使用され得る。

40

【0118】

ノックアウトテクノロジーは、遺伝子編集もまた含み得る。例えば、遺伝子編集は、CRISPR 関連タンパク質 (Cas タンパク質、例えば Cas9)、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) およびメガヌクレアーゼが含まれるヌクレアーゼを使用して実施され得る。ヌクレアーゼ

50

は、天然に存在するヌクレアーゼ、遺伝子改変された、および／または組換えであり得る。例えば、CRISPR/cas系は、遺伝子編集系として適切であり得る。

【0119】

非ヒト動物の1つまたは複数の遺伝子の全て未満の対立遺伝子がノックアウトされ得ることもまた企図される。例えば、二倍体非ヒト動物では、2つの対立遺伝子のうち一方がノックアウトされることが企図される。これは、遺伝子の減少した発現および減少したタンパク質レベルを生じ得る。全体的に減少した発現は、両方の対立遺伝子が機能している場合、例えば、ノックアウトされていないおよび／またはノックダウンされていない場合と比較して、99%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%もしくは20%未満または約99%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%もしくは20%未満；例えば、99%からもしくは約99%から90%；90%からもしくは約90%から80%；80%からもしくは約80%から70%；70%からもしくは約70%から60%；60%からもしくは約60%から50%；50%からもしくは約50%から40%；40%からもしくは約40%から30%、または30%からもしくは約30%から20%までであり得る。さらに、タンパク質レベルにおける全体的な減少は、全体的な発現における減少と同じであり得る。タンパク質レベルにおける全体的な減少は、両方の対立遺伝子が機能している場合、例えば、ノックアウトされていないおよび／またはノックダウンされていない場合と比較して、99%、95%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%もしくは20%未満または約99%、95%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%もしくは20%未満、例えば、99%からもしくは約99%から90%；90%からもしくは約90%から80%；80%からもしくは約80%から70%；70%からもしくは約70%から60%；60%からもしくは約60%から50%；50%からもしくは約50%から40%；40%からもしくは約40%から30%、または30%からもしくは約30%から20%までであり得る。しかし、非ヒト動物中の1つまたは複数の遺伝子の全ての対立遺伝子がノックアウトされ得ることもまた企図される。

【0120】

1つまたは複数の遺伝子のノックアウトは、遺伝子型決定によって検証され得る。遺伝子型決定のための方法には、シーケンシング、制限断片長多型同定(RFLPI)、ランダム増幅多型検出(RAPD)、増幅断片長多型検出(AFLPD)、PCR(例えば、ロングレンジPCRまたはステップワイズPCR)、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド(ASO)プローブ、およびDNAマイクロアレイまたはビーズに対するハイブリダイゼーションが含まれ得る。例えば、遺伝子型決定は、シーケンシングによって実施され得る。一部の 경우에는、シーケンシングは、高忠実度シーケンシングであり得る。シーケンシングの方法には、Maxam-Gilbertシーケンシング、鎖終結方法(例えば、Sangerシーケンシング)、ショットガンシーケンシングおよびブリッジPCRが含まれ得る。一部の 경우에는、遺伝子型決定は、次世代シーケンシングによって実施され得る。次世代シーケンシングの方法には、大規模並列シグネチャーシーケンシング、ポロニーシーケンシング、ピロシーケンシング(例えば、454 Life Sciencesによって開発されたピロシーケンシング)、単分子リアルタイムシーケンシング(例えば、Pacific Biosciencesによる)、Ion半導体シーケンシング(例えば、Ion Torrent半導体シーケンシングによる)、合成によるシーケンシング(例えば、IlluminaによるSolexシーケンシングによる)、ライゲーションによるシーケンシング(例えば、Applied BiosystemsによるSOLiDシーケンシング)、DNAナノボールシーケンシングおよびヘリスコープ単分子シーケンシングが含まれ得る。一部の 경우에는、本明細書の非ヒト動物の遺伝子型決定は、全ゲノムシーケンシング分析を含み得る。一部の 경우에는、動物における遺伝子のノックアウトは、遺伝子の一部または遺伝子全体をシーケンシング(例えば、次世代シーケンシング)することによって検証さ

10

20

30

40

50

れ得る。例えば、ブタにおけるNLRC5遺伝子のノックアウトは、NLRC5全体の次世代シーケンシングによって検証され得る。NLRC5の次世代シーケンシングは、例えば、フォワードプライマー5'-gctgtggcatatggcagtttc-3'（配列番号1）およびリバースプライマー5'-tccatgtataagttctttta-3'（配列番号2）、またはフォワードプライマー5'-ggcaatgccagatcctcaac-3'（配列番号3）およびリバースプライマー5'-tgtcttgatgtctttctcatg-3'（配列番号4）を使用して実施され得る。

【表1】

表1.例示的な破壊される遺伝子のゲノム配列、cDNA およびタンパク質

	ゲノム配列	cDNA		タンパク質	
遺伝子	配列番号	配列番号	受託番号	配列番号	受託番号
NLRC5	5	6	KC514136.1	7	AGG68119.1
TAP1	8	9	NM_001044581	10	NP_001038046.1
GGTA1	11	12	AF221508	13	NP_998975.1
CMAH	14	15	NM_001113015	16	NP_001106486.1
CXCL10	17	18	NM_001008691.1	19	NP_001008691.1
CIITA	20	21	XM_013995652.1	22	XP_013851106.1
B4GALNT2	23	24	NM_001244330.1	25	NP_001231259.1
C3	26	27	NM_214009.1	28	NP_999174.1
MICA	29	30	NM_000247.2	31	NP_000238.1
MICB	32	33	NM_001289160.1	34	NP_001276089.1

【0121】

導入遺伝子

導入遺伝子は、導入遺伝子なしよりも高いレベルで内因性遺伝子を過剰発現させるために有用であり得る。さらに、導入遺伝子は、外因性遺伝子を発現させるために使用され得る。導入遺伝子は、他の型の遺伝子、例えばドミナントネガティブ遺伝子もまた包含し得る。

【0122】

タンパク質Xの導入遺伝子は、タンパク質Xをコードするヌクレオチド配列を含む導入遺伝子を指し得る。本明細書で使用する場合、一部の場合には、タンパク質Xをコードする導入遺伝子は、タンパク質Xのアミノ酸配列の100%または約100%をコードする導入遺伝子であり得る。一部の場合には、タンパク質Xをコードする導入遺伝子は、タンパク質Xの完全または部分的アミノ酸配列をコードし得る。例えば、この導入遺伝子は、タンパク質Xのアミノ酸配列の少なくともまたは少なくとも約99%、95%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%もしくは5%、例えば、99%からもしくは約99%から90%；90%からしくは約90%から80%；80%からしくは約80%から70%；70%からしくは約70%から60%；または60%からしくは約60%から50%までをコードし得る。導入遺伝子の発現は、機能的なタンパク質、例えば、部分的にまたは完全に機能的なタンパク質を最終的に生じ得る。上で議論したように、部分的配列が発現される場合、最終的な結果は、一部の場合には、非機能的タンパク質またはドミナントネガティブタンパク質であり得る。非機能的タンパク質またはドミナントネガティブタンパク質はまた、機能的（内因性または外因性）タンパク質と競合し得る。導入遺伝子は、RNA（例えば、mRNA、shRNA、si

RNAまたはmicroRNA)もまたコードし得る。一部の場合には、導入遺伝子がmRNAをコードする場合、これは、次に、ポリペプチド(例えば、タンパク質)へと翻訳され得る。したがって、導入遺伝子は、タンパク質をコードし得ることが企図される。導入遺伝子は、一部の例では、タンパク質またはタンパク質の一部分をコードし得る。さらに、タンパク質は、野生型ポリペプチドと比較して、1つまたは複数の変異(例えば、欠失、挿入、アミノ酸置き換えまたは再編成)を有し得る。タンパク質は、天然ポリペプチドまたは人工ポリペプチド(例えば、組換えポリペプチド)であり得る。導入遺伝子は、2つまたはそれ超のポリペプチドによって形成される融合タンパク質をコードし得る。

【0123】

導入遺伝子は、導入遺伝子の産物を産生する様式で、生物、細胞、組織または臓器中に配置され得る。例えば、1つまたは複数の導入遺伝子を含む非ヒト動物が、本明細書で開示される。1つまたは複数の導入遺伝子は、本明細書に記載される1つまたは複数の破壊と組み合わせてであり得る。導入遺伝子は、細胞中に取り込まれ得る。例えば、導入遺伝子は、生物の生殖系列中に取り込まれ得る。細胞中に挿入される場合、導入遺伝子は、メッセンジャーRNA(mRNA)のコピーである相補的DNA(cDNA)セグメント、またはゲノムDNAのその元の領域中に存在する遺伝子自体(イントロンありまたはなし)のいずれかであり得る。

【0124】

非ヒト動物は、1つまたは複数のポリヌクレオチド挿入物を含む1つまたは複数の導入遺伝子を含み得る。これらのポリヌクレオチド挿入物は、1つもしくは複数のタンパク質またはそれらの機能的断片をコードし得る。一部の場合には、非ヒト動物は、MHC分子(例えば、MHC I分子および/またはMHC II分子)の発現および/または機能を低減させ得るタンパク質をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチド挿入物を含む1つまたは複数の導入遺伝子を含み得る。1つまたは複数の導入遺伝子は、MHC I形成サブレッサー、補体活性化のレギュレーター、NK細胞に対する阻害性リガンド、B7ファミリーメンバー、CD47、セリンプロテアーゼ阻害剤、ガレクチン、および/またはそれらの任意の断片をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチド挿入物を含み得る。一部の場合には、MHC I形成サブレッサーは、感染細胞タンパク質47(ICP47)であり得る。一部の場合には、補体活性化のレギュレーターは、表面抗原分類46(CD46)、表面抗原分類55(CD55)および表面抗原分類59(CD59)を含み得る。一部の場合には、NK細胞に対する阻害性リガンドは、白血球抗原E(HLA-E)、ヒト白血球抗原G(HLA-G)および β -2-ミクログロブリン(B2M)を含み得る。NK細胞に対する阻害性リガンドは、HLA-Gのアイソフォーム、例えば、HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6またはHLA-G7であり得る。例えば、NK細胞に対する阻害性リガンドは、HLA-G1であり得る。HLA-G(例えば、HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6またはHLA-G7)の導入遺伝子は、HLA-G(例えば、HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6またはHLA-G7)をコードするヌクレオチド配列を含む導入遺伝子を指し得る。本明細書で使用する場合、一部の場合には、HLA-G(例えば、HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6またはHLA-G7)をコードする導入遺伝子は、HLA-G(例えば、HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6またはHLA-G7)のアミノ酸配列の100%または約100%をコードする導入遺伝子であり得る。他の場合には、HLA-G(例えば、HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6またはHLA-G7)をコードする導入遺伝子は、HLA-G(例えば、HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6またはHLA-G7)の完全または部分的配列をコードする導入遺伝子であり得る。例えば、導入遺伝子は、HLA-G(例えば、HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6またはHLA-G7)のアミノ酸

10

20

30

40

50

配列の少なくともまたは少なくとも約99%、95%、90%、80%、70%、60%または50%をコードし得る。例えば、導入遺伝子は、HLA-Gアミノ酸配列の90%をコードし得る。導入遺伝子は、機能的な（例えば、部分的にまたは完全に機能的な）HLA-G（例えば、HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6またはHLA-G7）をコードするポリヌクレオチドを含み得る。一部の場合には、1つまたは複数の導入遺伝子は、ICP47、CD46、CD55、CD59、HLA-E、HLA-G（例えば、HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6またはHLA-G7）およびB2Mのうちの1つまたは複数のコードする1つまたは複数のポリヌクレオチド挿入物を含み得る。HLA-GゲノムDNA配列は、8つのエクソンを有し得、選択的スプライシングが7つのアイソフォームを生じる。HLA-G1アイソフォームは、エクソン7を排除し得る。HLA-G2アイソフォームは、エクソン3および7を排除し得る。イントロン2またはイントロン4の翻訳は、膜貫通ドメイン発現の喪失に起因して、分泌型アイソフォームを生じ得る。HLA-Gのゲノム配列およびcDNAのマップは、図14A～14Bに示される。一部の場合には、B7ファミリーメンバーは、CD80、CD86、プログラム死ーリガンド1（PD-L1）、プログラム死ーリガンド2（PD-L2）、CD275、CD276、V-setドメイン含有T細胞活性化阻害剤1（VTCN1）、血小板受容体Gi24、ナチュラル細胞傷害性誘発受容体3リガンド1（NR3L1）およびHERV-H LTR関連2（HHLA2）を含み得る。例えば、B7ファミリーメンバーは、PD-L1またはPD-L2であり得る。一部の場合には、セリンプロテアーゼ阻害剤は、セリンプロテアーゼ阻害剤9（Spi9）であり得る。一部の場合には、ガレクチンは、ガレクチン-1、ガレクチン-2、ガレクチン-3、ガレクチン-4、ガレクチン-5、ガレクチン-6、ガレクチン-7、ガレクチン-8、ガレクチン-9、ガレクチン-10、ガレクチン-11、ガレクチン-12、ガレクチン-13、ガレクチン-14およびガレクチン-15を含み得る。例えば、ガレクチンは、ガレクチン-9であり得る。

【0125】

遺伝子改変された非ヒト動物は、本明細書で開示される1つまたは複数の遺伝子の低減された発現および1つまたは複数の導入遺伝子を含み得る。一部の場合には、遺伝子改変された非ヒト動物は、NLRC5、TAP1、CXCL10、MICA、MICB、C3、CIITA、GGTA1、CMAHおよびB4GALNT2のうちの1つまたは複数の低減された発現、ならびにICP47、CD46、CD55、CD59、HLA-E、HLA-G（例えば、HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6またはHLA-G7）、B2M、PD-L1、PD-L2、CD47、Spi9およびガレクチン-9のうちの1つまたは複数のコードする1つまたは複数のポリヌクレオチド挿入物を含む1つまたは複数の導入遺伝子を含み得る。一部の場合には、遺伝子改変された非ヒト動物は、GGTA1、CMAHおよびB4GALNT2の低減された発現、ならびにHLA-G（例えば、HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6またはHLA-G7）、CD47（例えば、ヒトCD47）、PD-L1（例えば、ヒトPD-L1）およびPD-L2（例えば、ヒトPD-L2）をコードする外因性ポリヌクレオチドを含み得る。一部の場合には、遺伝子改変された非ヒト動物は、GGTA1、CMAHおよびB4GALNT2の低減された発現、ならびにHLA-E、CD47（例えば、ヒトCD47）、PD-L1（例えば、ヒトPD-L1）およびPD-L2（例えば、ヒトPD-L2）をコードする外因性ポリヌクレオチドを含み得る。一部の場合には、遺伝子改変された非ヒト動物は、NLRC5、C3、CXCL10、GGTA1、CMAHおよびB4GALNT2の低減された発現、ならびにHLA-G（例えば、HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6またはHLA-G7）、CD47（例えば、ヒトCD47）、PD-L1（例えば、ヒトPD-L1）およびPD-L2（例えば、ヒトPD-L2）をコードする外因性ポリヌクレオチドを含み得る。一部の場合には、遺伝子改変された非ヒト動物は、TAP1、C3、CXCL10、GGTA1、CMAHおよびB4GA

10

20

30

40

50

LNT 2 の低減された発現、ならびにHLA-G（例えば、HLA-G 1、HLA-G 2、HLA-G 3、HLA-G 4、HLA-G 5、HLA-G 6 またはHLA-G 7）、CD 47（例えば、ヒトCD 47）、PD-L 1（例えば、ヒトPD-L 1）およびPD-L 2（例えば、ヒトPD-L 2）をコードする外因性ポリヌクレオチドを含み得る。一部の場合には、遺伝子改変された非ヒト動物は、NLRC 5、C 3、CXCL 10、GGTA 1、CMAH およびB 4 GALNT 2 の低減された発現、ならびにHLA-E、CD 47（例えば、ヒトCD 47）、PD-L 1（例えば、ヒトPD-L 1）およびPD-L 2（例えば、ヒトPD-L 2）をコードする外因性ポリヌクレオチドを含み得る。一部の場合には、遺伝子改変された非ヒト動物は、TAP 1、C 3、CXCL 10、GGTA 1、CMAH およびB 4 GALNT 2 の低減された発現、ならびにHLA-E をコードする外因性ポリヌクレオチドを含み得る。一部の場合には、遺伝子改変された非ヒト動物は、GGTA 1 の低減された発現、およびHLA-E をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチド挿入物を含む導入遺伝子を含み得る。一部の場合には、遺伝子改変された非ヒト動物は、GGTA 1 の低減された発現、およびHLA-G（例えば、HLA-G 1、HLA-G 2、HLA-G 3、HLA-G 4、HLA-G 5、HLA-G 6 またはHLA-G 7）をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチド挿入物を含む導入遺伝子を含み得る。一部の場合には、遺伝子改変された非ヒト動物は、Rosa 26 プロモーター、例えば、ブタRosa 26 プロモーターに隣接して挿入された、HLA-G（例えば、HLA-G 1、HLA-G 2、HLA-G 3、HLA-G 4、HLA-G 5、HLA-G 6 またはHLA-G 7）をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチド挿入物を含む導入遺伝子を含み得る。一部の場合には、遺伝子改変された非ヒト動物は、NLRC 5、C 3、GGTA 1、CMAH およびB 4 GALNT 2 の低減された発現、ならびにタンパク質またはその機能的断片をコードするポリヌクレオチドを含む導入遺伝子を含み得、タンパク質は、HLA-G 1、Spi 9、PD-L 1、PD-L 2、CD 47 およびガレクチン-9を含む。一部の場合には、遺伝子改変された非ヒト動物は、TAP 1、C 3、GGTA 1、CMAH およびB 4 GALNT 2 の低減された発現、ならびにタンパク質またはその機能的断片をコードするポリヌクレオチドを含む導入遺伝子を含み得、タンパク質は、HLA-G 1、Spi 9、PD-L 1、PD-L 2、CD 47 およびガレクチン-9を含む。一部の場合には、遺伝子改変された非ヒト動物は、NLRC 5、TAP 1、C 3、GGTA 1、CMAH およびB 4 GALNT 2 の低減された発現、ならびにタンパク質またはその機能的断片をコードするポリヌクレオチドを含む導入遺伝子を含み得、タンパク質は、HLA-G 1、Spi 9、PD-L 1、PD-L 2、CD 47 およびガレクチン-9を含む。一部の場合には、遺伝子改変された非ヒト動物は、NLRC 5、C 3、GGTA 1 およびCXCL 10 の低減されたタンパク質発現、ならびにタンパク質またはその機能的断片をコードするポリヌクレオチドを含む導入遺伝子を含み得、タンパク質は、HLA-G 1 またはHLA-E を含む。一部の場合には、遺伝子改変された非ヒト動物は、TAP 1、C 3、GGTA 1 およびCXCL 10 の低減されたタンパク質発現、ならびにタンパク質またはその機能的断片をコードするポリヌクレオチドを含む導入遺伝子を含み得、タンパク質は、HLA-G 1 またはHLA-E を含む。一部の場合には、遺伝子改変された非ヒト動物は、NLRC 5、TAP 1、C 3、GGTA 1 およびCXCL 10 の低減されたタンパク質発現、ならびにタンパク質またはその機能的断片をコードするポリヌクレオチドを含む導入遺伝子を含み得、タンパク質は、HLA-G 1 またはHLA-E を含む。一部の場合には、本明細書の導入遺伝子によってコードされるCD 47、PD-L 1 およびPD-L 2 は、ヒトCD 47、ヒトPD-L 1 およびヒトPD-L 2 であり得る。

【0126】

遺伝子改変された非ヒト動物は、動物のゲノム中の遺伝子座中に挿入された導入遺伝子を含み得る。一部の場合には、導入遺伝子は、標的化遺伝子のプロモーターに隣接して、または標的化遺伝子の内側に、挿入され得る。一部の場合には、導入遺伝子の挿入は、標的化遺伝子の発現を低減させ得る。標的化遺伝子は、本明細書で開示される、その発現が低減される遺伝子であり得る。例えば、導入遺伝子は、NLRC 5、TAP 1、CXCL

10

20

30

40

50

10、MICA、MICB、C3、CIITA、GGTA1、CMAHおよびB4GALNT2のうちの1つもしくは複数のプロモーターに隣接して、またはそれらの内側に、挿入され得る。一部の場合には、導入遺伝子は、GGTA1のプロモーターに隣接して、またはGGTA1の内側に、挿入され得る。

【0127】

例えば、非ヒト動物は、感染細胞タンパク質47（ICP47）、表面抗原分類46（CD46）、表面抗原分類55（CD55）、表面抗原分類59（CD59）、HLA-E、HLA-G（例えば、HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6またはHLA-G7）、B2M、Sp19、PD-L1、PD-L2、CD47、ガレクチン-9、それらの任意の機能的断片、またはそれらの任意の組合せの1つまたは複数のポリヌクレオチド挿入物を含む1つまたは複数の導入遺伝子を含み得る。ICP47、CD46、CD55、CD59、HLA-E、HLA-G（例えば、HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6またはHLA-G7）またはB2Mをコードするポリヌクレオチドは、ICP47、CD46、CD55、CD59、HLA-E、HLA-G（例えば、HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6またはHLA-G7）、B2M、Sp19、PD-L1、PD-L2、CD47またはガレクチン-9ヒトタンパク質のうちの1つまたは複数をコードし得る。非ヒト動物は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20またはそれ超の導入遺伝子を含み得る。例えば、非ヒト動物は、ICP47、CD46、CD55、CD59、HLA-E、HLA-G（例えば、HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6またはHLA-G7）、B2M、Sp19、PD-L1、PD-L2、CD47、ガレクチン-9、それらの任意の機能的断片、またはそれらの任意の組合せを含む1つまたは複数の導入遺伝子を含み得る。非ヒト動物はまた、ICP47をコードする単一の導入遺伝子を含み得る。非ヒト動物は、時折、CD59をコードする単一の導入遺伝子を含み得る。非ヒト動物は、時折、HLA-G（例えば、HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6またはHLA-G7）をコードする単一の導入遺伝子を含み得る。非ヒト動物は、時折、HLA-Eをコードする単一の導入遺伝子を含み得る。非ヒト動物は、時折、B2Mをコードする単一の導入遺伝子を含み得る。非ヒト動物はまた、2つまたはそれ超の導入遺伝子を含み得、2つまたはそれ超の導入遺伝子は、ICP47、CD46、CD55、CD59、および／またはそれらの任意の組合せである。例えば、2つまたはそれ超の導入遺伝子は、CD59およびCD46またはCD59およびCD55を含み得る。非ヒト動物はまた、3つまたはそれ超の導入遺伝子を含み得、3つまたはそれ超の導入遺伝子は、ICP47、CD46、CD55、CD59、またはそれらの任意の組合せを含み得る。例えば、3つまたはそれ超の導入遺伝子は、CD59、CD46およびCD55を含み得る。非ヒト動物はまた、4つまたはそれ超の導入遺伝子を含み得、4つまたはそれ超の導入遺伝子は、ICP47、CD46、CD55およびCD59を含み得る。非ヒト動物は、ICP47、CD46、CD55およびCD59を含む4つまたはそれ超の導入遺伝子を含み得る。

【0128】

導入遺伝子および遺伝子破壊の組合せが使用され得る。非ヒト動物は、1つまたは複数の低減された遺伝子および1つまたは複数の導入遺伝子を含み得る。例えば、その発現が低減される1つまたは複数の遺伝子は、NLRC5、TAP1、GGTA1、B4GALNT2、CMAH、CXCL10、MICA、MICB、C3、CIITA、および／またはそれらの任意の組合せのうちいずれか1つを含み得、1つまたは複数の導入遺伝子は、ICP47、CD46、CD55、CD59、それらの任意の機能的断片、および／またはそれらの任意の組合せを含み得る。例えば、様々な組合せを単に例示するために、その発現が破壊される1つまたは複数の遺伝子は、NLRC5を含み得、1つまたは複数の導入遺伝子は、ICP47を含む。その発現が破壊される1つまたは複数の遺伝子はまた

、T A P 1を含み得、1つまたは複数の導入遺伝子は、I C P 4 7を含む。その発現が破壊される1つまたは複数の遺伝子はまた、N L R C 5およびT A P 1を含み得、1つまたは複数の導入遺伝子は、I C P 4 7を含む。その発現が破壊される1つまたは複数の遺伝子はまた、N L R C 5、T A P 1およびG G T A 1を含み得、1つまたは複数の導入遺伝子は、I C P 4 7を含む。その発現が破壊される1つまたは複数の遺伝子はまた、N L R C 5、T A P 1、B 4 G A L N T 2およびC M A Hを含み得、1つまたは複数の導入遺伝子は、I C P 4 7を含む。その発現が破壊される1つまたは複数の遺伝子はまた、N L R C 5、T A P 1、G G T A 1、B 4 G A L N T 2およびC M A Hを含み得、1つまたは複数の導入遺伝子は、I C P 4 7を含む。その発現が破壊される1つまたは複数の遺伝子はまた、N L R C 5を含み得、1つまたは複数の導入遺伝子は、C D 5 9を含む。その発現が破壊される1つまたは複数の遺伝子はまた、T A P 1を含み得、1つまたは複数の導入遺伝子は、C D 5 9を含む。その発現が破壊される1つまたは複数の遺伝子はまた、N L R C 5およびT A P 1を含み得、1つまたは複数の導入遺伝子は、C D 5 9を含む。その発現が破壊される1つまたは複数の遺伝子はまた、N L R C 5、T A P 1およびG G T A 1を含み得、1つまたは複数の導入遺伝子は、C D 5 9を含む。その発現が破壊される1つまたは複数の遺伝子はまた、N L R C 5、T A P 1、B 4 G A L N T 2およびC M A Hを含み得、1つまたは複数の導入遺伝子は、C D 5 9を含む。その発現が破壊される1つまたは複数の遺伝子はまた、N L R C 5、T A P 1、G G T A 1、B 4 G A L N T 2およびC M A Hを含み得、1つまたは複数の導入遺伝子は、C D 5 9を含む。

10

【0129】

20

使用され得、具体的に企図される導入遺伝子は、本明細書で開示される遺伝子、例えば、I C P 4 7、C D 4 6、C D 5 5、C D 5 9、H L A - E、H L A - G（例えば、H L A - G 1、H L A - G 2、H L A - G 3、H L A - G 4、H L A - G 5、H L A - G 6またはH L A - G 7）、B 2 M、S p i 9、P D - L 1、P D - L 2、C D 4 7、ガレクチン-9、それらの任意の機能的断片、および／またはそれらの任意の組合せに対して特定の同一性および／または相同性を示す遺伝子が含まれ得る。したがって、遺伝子が、（核酸レベルまたはタンパク質レベルで）少なくともまたは少なくとも約60%、70%、80%、90%、95%、98%または99%の相同性、例えば、少なくともまたは少なくとも約99%から90%；90%から80%；80%から70%；70%から60%の相同性を示す場合、それが導入遺伝子として使用され得ることが企図される。（核酸レベルまたはタンパク質レベルで）少なくともまたは少なくとも約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%の同一性、例えば、少なくとも99%または少なくとも約99%から90%；90%から80%；80%から70%；70%から60%の同一性を示す遺伝子が導入遺伝子として使用され得ることもまた企図される。

30

【0130】

非ヒト動物は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20またはそれ超のドミナントネガティブ導入遺伝子もまた含み得る。ドミナントネガティブ導入遺伝子の発現は、ドミナントネガティブ導入遺伝子の野生型対応動物の発現および／または機能を抑制し得る。したがって、例えば、ドミナントネガティブ導入遺伝子Xを含む非ヒト動物は、その発現が低減されるX遺伝子を含む異なる非ヒト動物と比較して、類似の表現型を有し得る。1つまたは複数のドミナントネガティブ導入遺伝子は、ドミナントネガティブN L R C 5、ドミナントネガティブT A P 1、ドミナントネガティブG G T A 1、ドミナントネガティブC M A H、ドミナントネガティブB 4 G A L N T 2、ドミナントネガティブC X C L 1 0、ドミナントネガティブM I C A、ドミナントネガティブM I C B、ドミナントネガティブC I I T A、ドミナントネガティブC 3、またはそれらの任意の組合せであり得る。

40

【0131】

遺伝子発現を抑制し得る、例えば、遺伝子をノックダウンし得る1つまたは複数の核酸をコードする1つまたは複数の導入遺伝子を含む非ヒト動物もまた提供される。遺伝子発

50

現を抑制するRNAは、shRNA、siRNA、RNAiおよびmicroRNAを含み得るがこれらに限定されない。例えば、siRNA、RNAiおよび／またはmicroRNAは、遺伝子発現を抑制するために、非ヒト動物に与えられ得る。さらに、非ヒト動物は、shRNAをコードする1つまたは複数の導入遺伝子を含み得る。shRNAは、特定の遺伝子に対して特異的であり得る。例えば、shRNAは、NLRC5、TAP1、GGTA1、B4GALNT2、CMAH、CXCL10、MICA、MICB、B4GALNT2、CIIITA、C3、および／またはそれらの任意の組合せが含まれるがこれらに限定されない、本出願に記載される任意の遺伝子に対して特異的であり得る。

【0132】

対象に移植される場合、遺伝子改変された非ヒト動物由来の細胞、組織または臓器は、
10 遺伝子改変されていない対応動物由来の細胞、組織または臓器と比較して、対象においてより低い免疫応答（例えば、移植拒絶）を誘発し得る。一部の場合には、免疫応答には、T細胞（例えば、CD8+T細胞および／またはCD4+T細胞）およびNK細胞の活性化、増殖および細胞傷害性が含まれ得る。したがって、本明細書で開示される遺伝子改変された細胞の表現型は、細胞をNK細胞、T細胞（例えば、CD8+T細胞またはCD4+T細胞）と共培養し、NK細胞またはT細胞の活性化、増殖および細胞傷害性を試験することによって測定され得る。一部の場合には、遺伝子改変された細胞によって誘導される、T細胞またはNK細胞の活性化、増殖および細胞傷害性は、遺伝子改変されていない細胞によって誘導されるものよりも低い可能性がある。一部の場合には、本明細書の遺伝子改変された細胞の表現型は、酵素免疫スポット（ELISPOT）アッセイによって測
20 定され得る。

【0133】

1つまたは複数の導入遺伝子は、異なる種由来であり得る。例えば、1つまたは複数の導入遺伝子は、ヒト遺伝子、マウス遺伝子、ラット遺伝子、ブタ遺伝子、ウシ遺伝子、イヌ遺伝子、ネコ遺伝子、サル遺伝子、チンパンジー遺伝子、またはそれらの任意の組合せを含み得る。例えば、導入遺伝子は、ヒト遺伝子配列を有する、ヒト由来であり得る。1つまたは複数の導入遺伝子は、ヒト遺伝子を含み得る。一部の場合には、1つまたは複数の導入遺伝子は、アデノウイルス遺伝子ではない。

【0134】

導入遺伝子は、ランダムまたは部位特異的様式で、非ヒト動物のゲノム中に挿入され得る。例えば、導入遺伝子は、非ヒト動物のゲノム中のランダム遺伝子座に挿入され得る。これらの導入遺伝子は、ゲノムのどこに挿入されても、完全に機能的であり得る。例えば、導入遺伝子は、それ自身のプロモーターをコードし得る、または内因性プロモーターの制御下にある位置に挿入され得る。あるいは、導入遺伝子は、遺伝子、例えば、遺伝子のイントロンもしくは遺伝子のエクソン、プロモーターまたは非コード領域中に挿入され得る。

【0135】

時折、1コピーよりも多い導入遺伝子が、ゲノム中の1つよりも多いランダム遺伝子座中に挿入され得る。例えば、複数のコピーが、ゲノム中の1つのランダム遺伝子座中に挿入され得る。これは、導入遺伝子がランダムに1回挿入される場合よりも、増加した全体的発現をもたらし得る。あるいは、1コピーの導入遺伝子が、ある遺伝子中に挿入され得、別のコピーの導入遺伝子が、異なる遺伝子中に挿入され得る。導入遺伝子は、非ヒト動物のゲノム中の特定の遺伝子座に挿入され得るように、標的化され得る。

【0136】

導入遺伝子の発現は、1つまたは複数のプロモーターによって制御され得る。プロモーターは、遍在性、組織特異的プロモーターまたは誘導性プロモーターであり得る。プロモーターに隣接して挿入された導入遺伝子の発現は、調節され得る。例えば、導入遺伝子が、遍在性プロモーターの近傍またはその隣に挿入される場合、導入遺伝子は、非ヒト動物の全ての細胞において発現される。一部の遍在性プロモーターは、CAGGSプロモーター、hCMVプロモーター、PGKプロモーター、SV40プロモーターまたはRosa
50

26プロモーターであり得る。

【0137】

プロモーターは、内因性または外因性であり得る。例えば、1つまたは複数の導入遺伝子は、内因性または外因性のRos26プロモーターに隣接して挿入され得る。さらに、プロモーターは、非ヒト動物に特異的であり得る。例えば、1つまたは複数の導入遺伝子は、ブタRos26プロモーターに隣接して挿入され得る。

【0138】

組織特異的プロモーター（これは、細胞特異的プロモーターと同義語であり得る）は、発現の位置を制御するために使用され得る。例えば、1つまたは複数の導入遺伝子は、組織特異的プロモーターに隣接して挿入され得る。組織特異的プロモーターは、FABPプロモーター、Lckプロモーター、CamKIIプロモーター、CD19プロモーター、ケラチンプロモーター、アルブミンプロモーター、aP2プロモーター、インスリンプロモーター、MCKプロモーター、MyHCプロモーター、WAPプロモーターまたはCol2Aプロモーターであり得る。例えば、プロモーターは、膵臓特異的プロモーター、例えば、インスリンプロモーターであり得る。

【0139】

誘導性プロモーターも同様に使用され得る。これらの誘導性プロモーターは、誘導剤を添加または除去することによって、所望に応じて、オンおよびオフにされ得る。誘導性プロモーターは、Lac、tac、trc、trp、araBAD、phoA、recA、proU、cst-1、tetA、cadA、nar、PL、cspA、T7、VHB、Mxおよび／またはTrexであり得ることが企図される。

【0140】

本明細書に記載される非ヒト動物または細胞は、インスリンをコードする導入遺伝子を含み得る。インスリンをコードする導入遺伝子は、ヒト遺伝子、マウス遺伝子、ラット遺伝子、ブタ遺伝子、ウシ遺伝子、イヌ遺伝子、ネコ遺伝子、サル遺伝子、チンパンジー遺伝子または任意の他の哺乳動物遺伝子であり得る。例えば、インスリンをコードする導入遺伝子は、ヒト遺伝子であり得る。インスリンをコードする導入遺伝子は、キメラ遺伝子、例えば、部分的にヒトの遺伝子でもあり得る。

【0141】

導入遺伝子の発現は、導入遺伝子の転写物のレベルを検出することによって測定され得る。例えば、導入遺伝子の発現は、ノザンブロッティング、ヌクレアーゼ保護アッセイ（例えば、RNase保護アッセイ）、逆転写PCR、定量的PCR（例えば、リアルタイムPCR、例えば、リアルタイム定量的逆転写PCR）、in situハイブリダイゼーション（例えば、蛍光in situハイブリダイゼーション（FISH））、ドットブロット分析、ディファレンシャルディスプレイ、遺伝子発現の連続的分析、サブトラクティブハイブリダイゼーション、マイクロアレイ、ナノストリングおよび／またはシーケンシング（例えば、次世代シーケンシング）によって測定され得る。一部の場合には、導入遺伝子の発現は、遺伝子によってコードされるタンパク質を検出することによって測定され得る。例えば、1つまたは複数の遺伝子の発現は、タンパク質免疫染色、タンパク質免疫沈降、電気泳動（例えば、SDS-PAGE）、ウェスタンブロッティング、ピシンコニン酸アッセイ、分光光度測定、質量分析、酵素アッセイ（例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ）、免疫組織化学、フローサイトメトリー、および／または免疫細胞化学によって測定され得る。一部の場合には、導入遺伝子の発現は、顕微鏡によって測定され得る。顕微鏡は、光学、電子または走査型プローブ顕微鏡であり得る。一部の場合には、光学顕微鏡は、明視野、傾斜照明、交差偏光、分散染色、暗視野、位相差、微分干渉、干渉反射顕微鏡、蛍光（例えば、粒子、例えば細胞が免疫染色される場合）、共焦点、単一平面照明顕微鏡、ライトシート蛍光顕微鏡、デコンボリューションまたは連続時間符号化増幅顕微鏡の使用を含む。

【0142】

導入遺伝子の挿入は、遺伝子型決定によって検証され得る。遺伝子型決定のための方法

には、シーケンシング、制限断片長多型同定（RFLPI）、ランダム増幅多型検出（RAPD）、増幅断片長多型検出（AFLPD）、PCR（例えば、ロングレンジPCRまたはステップワイズPCR）、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド（ASO）プローブ、およびDNAマイクロアレイまたはビーズに対するハイブリダイゼーションが含まれ得る。一部の場合には、遺伝子型決定は、シーケンシングによって実施され得る。一部の場合には、シーケンシングは、高忠実度シーケンシングであり得る。シーケンシングの方法には、Maxam-Gilbertシーケンシング、鎖終結方法（例えば、Sangerシーケンシング）、ショットガンシーケンシングおよびブリッジPCRが含まれ得る。一部の場合には、遺伝子型決定は、次世代シーケンシングによって実施され得る。次世代シーケンシングの方法には、大規模並列シグネチャーシーケンシング、ポロニーシーケンシング、ピロシーケンシング（例えば、454 Life Sciencesによって開発されたピロシーケンシング）、単分子リアルタイムシーケンシング（例えば、Pacific Biosciencesによる）、Ion半導体シーケンシング（例えば、Ion Torrent半導体シーケンシングによる）、合成によるシーケンシング（例えば、IlluminaによるSolexaシーケンシングによる）、ライゲーションによるシーケンシング（例えば、Applied BiosystemsによるSOLiDシーケンシング）、DNAナノボールシーケンシングおよびヘリスコープ単分子シーケンシングが含まれ得る。一部の場合には、本明細書の非ヒト動物の遺伝子型決定は、全ゲノムシーケンシング分析を含み得る。

【0143】

一部の場合には、動物における導入遺伝子の挿入は、導入遺伝子の一部または導入遺伝子全体をシーケンシング（例えば、次世代シーケンシング）することによって検証され得る。例えば、ブタにおけるRosa26プロモーターに隣接した導入遺伝子の挿入は、例えば、フォワードプライマー5'-cgccctagagagaggctgtg-3'（配列番号35）およびリバースプライマー5'-ctgctgtggctgtggtag-3'（配列番号36）を使用して、Rosaのエクソン1から4の次世代シーケンシングによって検証され得る。

【表2】

表 2.例示的な導入遺伝子の cDNA 配列

配列番号	遺伝子	受託番号
37	CD46	NM_213888
38	CD55	AF228059.1
39	CD59	AF020302
40	ICP47	EU445532.1
41	HLA-G1	NM_002127.5
42	HLA-E	NM_005516.5
43	ヒト β -2-ミクログロブリン	NM_004048.2
44	ヒト PD-L1	NM_001267706.1
45	ヒト PD-L2	NM_025239.3
46	ヒト Spi9	NM_004155.5
47	ヒト CD47	NM_001777.3
48	ヒトガレクチン-9	NM_009587.2

【表 3】

表 3.例示的な導入遺伝子によってコードされるタンパク質の配列

配列番号	タンパク質	受託番号
49	CD46	NP_999053.1
50	CD55	AAG14412.1
51	CD59	AAC67231.1
52	ICP47	ACA28836.1
53	HLA-G1	NP_002118.1
54	HLA-E	NP_005507.3
55	ヒト β -2-ミクログロブリン	NP_004039.1
56	ヒト PD-L1	NP_001254635.1
57	ヒト PD-L2	NP_079515.2
58	ヒト Spi9	NP_004146.1
59	ヒト CD47	NP_001768.1
60	ヒトガレクチン-9	NP_033665.1

10

20

【0144】

非ヒト動物の集団

単一の非ヒト動物、およびまた非ヒト動物の集団が、本明細書で提供される。非ヒト動物の集団は、遺伝的に同一であり得る。非ヒト動物の集団はまた、表現型的に同一であり得る。非ヒト動物の集団は、表現型的に同一および遺伝的に同一の両方であり得る。

【0145】

遺伝子改変され得る非ヒト動物の集団が、本明細書でさらに提供される。例えば、集団は、本明細書で開示されるように、少なくともまたは少なくとも約 2、5、10、50、100 または 200 の非ヒト動物を含み得る。集団の非ヒト動物は、同一の表現型を有し得る。例えば、集団の非ヒト動物は、クローンであり得る。非ヒト動物の集団は、同一の肉体的特徴を有し得る。同一の表現型を有する集団の非ヒト動物は、同じ導入遺伝子を含み得る。同一の表現型を有する集団の非ヒト動物はまた、その発現が低減される同じ遺伝子を含み得る。同一の表現型を有する集団の非ヒト動物はまた、その発現が低減される同じ遺伝子を含み得、同じ導入遺伝子を含み得る。非ヒト動物の集団は、少なくともまたは少なくとも約 2、5、10、50、100 または 200 の、同一の表現型を有する非ヒト動物を含み得る。例えば、任意の特定の同腹仔の表現型は、同一の表現型を有し得る（例えば、一例では、1 から約 20 までのいずれかの非ヒト動物）。集団の非ヒト動物は、同一の表現型を有するブタであり得る。

30

40

【0146】

集団の非ヒト動物は、同一の遺伝子型を有し得る。例えば、集団中の非ヒト動物の染色体中の全ての核酸配列は、同一であり得る。同一の遺伝子型を有する集団の非ヒト動物は、同じ導入遺伝子を含み得る。同一の遺伝子型を有する集団の非ヒト動物はまた、その発現が低減される同じ遺伝子を含み得る。同一の遺伝子型を有する集団の非ヒト動物はまた、その発現が低減される同じ遺伝子を含み得、同じ導入遺伝子を含み得る。非ヒト動物の集団は、少なくともまたは少なくとも約 2、5、50、100 または 200 の、同一の遺伝子型を有する非ヒト動物を含み得る。集団の非ヒト動物は、同一の遺伝子型を有するブタであり得る。

【0147】

50

同一の遺伝子型および／または表現型を有する2つまたはそれ超の非ヒト動物由来の細胞は、寛容化ワクチンにおいて使用され得る。一部の場合には、本明細書で開示される寛容化ワクチンは、同一の遺伝子型および／または表現型を有する2つまたはそれ超の非ヒト動物（例えば、ブタ）由来の複数の細胞（例えば、遺伝子改変された細胞）を含み得る。グラフトに対してレシピエントを免疫寛容化するための方法は、同一の遺伝子型または表現型を有する2つまたはそれ超の非ヒト動物由来の複数の細胞（例えば、遺伝子改変された細胞）を含む寛容化ワクチンをレシピエントに投与するステップを含み得る。

【0148】

同一の遺伝子型および／または表現型を有する2つまたはそれ超の非ヒト動物由来の細胞は、移植において使用され得る。一部の場合には、グラフト（例えば、異種グラフトまたは同種グラフト）は、同一の遺伝子型および／または表現型を有する2つまたはそれ超の非ヒト動物由来の複数の細胞を含み得る。本明細書に記載される方法の実施形態では、例えば、それを必要とする対象において疾患を処置するための方法は、同一の遺伝子型および／または表現型を有する2つまたはそれ超の非ヒト動物由来の複数の細胞（例えば、遺伝子改変された細胞）を移植するステップを含み得る。

10

【0149】

非ヒト動物の集団は、当該分野で公知の任意の方法を使用して生成され得る。一部の場合には、非ヒト動物の集団は、繁殖によって生成され得る。例えば、同系交配は、表現型的にまたは遺伝的に同一の非ヒト動物または非ヒト動物の集団を生成するために使用され得る。同系交配、例えば、同胞対同胞または親対仔、または孫対祖父母、またはひ孫対曾祖父母が使用され得る。連続的ラウンドの同系交配は、表現型的にまたは遺伝的に同一の非ヒト動物を最終的に生じ得る。例えば、少なくともまたは少なくとも約2、3、4、5、10、20、30、40または50世代の同系交配は、表現型的におよび／または遺伝的に同一の非ヒト動物を生じ得る。10～20世代の同系交配後に、非ヒト動物の遺伝的構成は、少なくとも99%純粋であると考えられる。非ヒト動物は、同一の双生児でない可能性があるので、継続的な同系交配は、本質的に同質遺伝子的な、または同質遺伝的に近い、非ヒト動物をもたらす得る。

20

【0150】

繁殖は、同じ遺伝子型を有する非ヒト動物を使用して実施され得る。例えば、非ヒト動物は、その発現が低減される同じ遺伝子（複数可）を有する、および／または同じ導入遺伝子（複数可）を保有する。繁殖は、異なる遺伝子型を有する非ヒト動物を使用しても実施され得る。繁殖は、遺伝子改変された非ヒト動物および遺伝子改変されていない非ヒト動物、例えば、遺伝子改変された雌性ブタおよび野生型雄性ブタ、または遺伝子改変された雄性ブタおよび野生型雌性ブタを使用して実施され得る。繁殖の全てのこれらの組合せは、所望の非ヒト動物を産生するために使用され得る。

30

【0151】

遺伝子改変された非ヒト動物の集団は、クローニングによっても生成され得る。例えば、遺伝子改変された非ヒト動物細胞の集団は、遺伝的にまたは表現型的に同一の個々の非ヒト動物の類似の集団を無性生殖的に生成し得る。クローニングは、種々の方法、例えば、双子化（twinning）（例えば、1つまたは複数の細胞を胚から分割し、それらを新たな胚へと成長させる）、体細胞核移入または人工授精によって、実施され得る。方法のさらなる詳細は、本開示を通して提供される。

40

【0152】

II. 遺伝子改変された細胞

疾患を処置または予防するために使用され得る1つまたは複数の遺伝子改変された細胞が、本明細書で開示される。これらの遺伝子改変された細胞は、遺伝子改変された非ヒト動物由来であり得る。例えば、上に開示された遺伝子改変された非ヒト動物は、1つまたは複数の細胞が、単離された遺伝子改変された細胞を生成するために単離されるように、処理され得る。これらの単離された細胞はまた、一部の場合には、さらに遺伝子改変された細胞であり得る。しかし、細胞は、改変されたまたは未改変のヒトまたは非ヒト動物細胞

50

胞を使用して、*ex vivo*で、例えば、動物の外側で、改変され得る。例えば、細胞（ヒトおよび非ヒト動物細胞を含む）は、培養物中で改変され得る。遺伝子改変された細胞は、本明細書に記載される遺伝子改変された非ヒト動物を生成するために使用され得ることもまた企図される。一部の場合には、遺伝子改変された細胞は、遺伝子改変された動物から単離され得る。一部の場合には、遺伝子改変された細胞は、遺伝子改変されていない動物由来の細胞に由来し得る。細胞の単離は、初代細胞の単離および培養の方法を含む、当該分野で公知の方法によって実施され得る。遺伝子改変された細胞は、ヒトからは抽出されることが、具体的に企図される。

【0153】

したがって、全体で記載されるような作製する種々の方法を含む、遺伝子改変された非ヒト動物に適用され得るどんなものも、本明細書に同様に適用され得る。例えば、破壊される遺伝子および過剰発現される導入遺伝子は全て、本明細書で使用する遺伝子改変された細胞を作製する際に適用可能である。さらに、全体で記載される遺伝子改変された非ヒト動物において遺伝子型および遺伝子の発現を試験するための任意の方法は、細胞の遺伝子改変を試験するために使用され得る。

【0154】

遺伝子改変された細胞は、ローラシア獣上目のメンバーまたは非ヒト霊長類由来であり得る。かかる遺伝子改変された細胞は、ローラシア獣上目のメンバーまたは非ヒト霊長類から単離され得る。あるいは、かかる遺伝子改変された細胞は、ローラシア獣上目のメンバーまたは非ヒト霊長類に起源し得る。例えば、遺伝子改変された細胞は、例えば、細胞培養または遺伝子改変方法を使用して、ローラシア獣上目のメンバーまたは非ヒト霊長類から単離された細胞から作製され得る。

【0155】

遺伝子改変された細胞、例えば、遺伝子改変された動物由来の細胞または*ex vivo*で作製された細胞は、分析および選別され得る。一部の場合には、遺伝子改変された細胞は、フローサイトメトリー、例えば、蛍光活性化細胞選別によって分析および選別され得る。例えば、導入遺伝子を発現する遺伝子改変された細胞は、導入遺伝子によってコードされるポリペプチドを認識する標識（例えば、蛍光標識）に基づくフローサイトメトリーを使用して検出され得、他の細胞から精製され得る。

【0156】

非ヒト動物およびヒトの幹細胞を含む幹細胞が使用され得る。幹細胞は、生存可能なヒトを生成する能力を有さない。例えば、幹細胞は、生存可能なヒトを生成することができないように、不可逆的に分化され得る。幹細胞は、幹細胞が生存可能なヒトを生成できないという警告付きで、多能性であり得る。

【0157】

遺伝子改変された非ヒト動物に関するセクションにおいて上で議論したように、遺伝子改変された細胞は、その発現が低減される1つまたは複数の遺伝子を含み得る。遺伝子改変された非ヒト動物について上で開示したのと同じ遺伝子が、破壊され得る。例えば、遺伝子改変された細胞は、その発現が破壊、例えば低減されている1つまたは複数の遺伝子を含み、1つまたは複数の遺伝子は、*NLR C5*、*TAP1*、*GGTA1*、*B4GALNT2*、*CMAH*、*CXCL10*、*MICA*、*MICB*、*C3*、*CIITA*および／またはそれらの任意の組合せを含む。さらに、遺伝子改変された細胞は、1つまたは複数のポリヌクレオチド挿入物を含む1つまたは複数の導入遺伝子を含み得る。例えば、遺伝子改変された細胞は、*ICP47*、*CD46*、*CD55*、*CD59*、*HLA-E*、*HLA-G*（例えば、*HLA-G1*、*HLA-G2*、*HLA-G3*、*HLA-G4*、*HLA-G5*、*HLA-G6*または*HLA-G7*）、*B2M*、*Sp19*、*PD-L1*、*PD-L2*、*CD47*、*ガレクチン-9*、それらの任意の機能的断片、またはそれらの任意の組合せの1つまたは複数のポリヌクレオチド挿入物を含む1つまたは複数の導入遺伝子を含み得る。遺伝子改変された細胞は、1つまたは複数の低減された遺伝子および1つまたは複数の導入遺伝子を含み得る。例えば、その発現が低減される1つまたは複数の遺伝子は、*NLR C5*

、TAP1、GGTA1、B4GALNT2、CMAH、CXCL10、MICA、MICB、CITA、および／またはそれらの任意の組合せのうちいずれか1つを含み得、1つまたは複数の導入遺伝子は、ICP47、CD46、CD55、CD59、HLA-E、HLA-G（例えば、HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6またはHLA-G7）、B2M、Sp19、PD-L1、PD-L2、CD47、ガレクチン-9、それらの任意の機能的断片、および／またはそれらの任意の組合せを含み得る。一部の場合には、遺伝子改変された細胞は、NLR5、C3、GGTA1、CMAHおよびB4GALNT2の低減された発現、ならびにタンパク質またはその機能的断片をコードするポリヌクレオチドを含む導入遺伝子を含み得、タンパク質は、HLA-G1、Sp19、PD-L1、PD-L2、CD47およびガレクチン-9を含む。一部の場合には、遺伝子改変された細胞は、TAP1、C3、GGTA1、CMAHおよびB4GALNT2の低減された発現、ならびにタンパク質またはその機能的断片をコードするポリヌクレオチドを含む導入遺伝子を含み得、タンパク質は、HLA-G1、Sp19、PD-L1、PD-L2、CD47およびガレクチン-9を含む。一部の場合には、遺伝子改変された細胞は、NLR5、TAP1、C3、GGTA1、CMAHおよびB4GALNT2の低減された発現、ならびにタンパク質またはその機能的断片をコードするポリヌクレオチドを含む導入遺伝子を含み得、タンパク質は、HLA-G1、Sp19、PD-L1、PD-L2、CD47およびガレクチン-9を含む。一部の場合には、本明細書の導入遺伝子によってコードされるCD47、PD-L1およびPD-L2は、ヒトCD47、ヒトPD-L1およびヒトPD-L2であり得る。一部の場合には、遺伝子改変された細胞は、その表面上がCD47でコーティングされ得る。細胞の表面上のCD47のコーティングは、細胞表面をビオチン化し、その後、ビオチン化細胞をストレプトアビジン-CD47キメラタンパク質と共にインキュベートすることによって達成され得る。コーティングされるCD47は、ヒトCD47であり得る。

【0158】

遺伝子改変された非ヒト動物に関するセクションにおいて上で議論したように、遺伝子改変された細胞は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20またはそれ超の破壊された遺伝子を含み得る。遺伝子改変された細胞は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20またはそれ超の導入遺伝子もまた含み得る。

【0159】

上で詳細に議論したように、遺伝子改変された細胞、例えば、ブタ細胞は、ドミナントネガティブ導入遺伝子および／または1つもしくは複数のノックダウン遺伝子を発現する導入遺伝子もまた含み得る。上でも議論したように、導入遺伝子の発現は、1つまたは複数のプロモーターによって制御され得る。

【0160】

遺伝子改変された細胞は、組織または臓器由来の1つまたは複数の細胞であり得、組織または臓器には、脳、肺、肝臓、心臓、脾臓、膵臓、小腸、大腸、骨格筋、平滑筋、皮膚、骨、脂肪組織、毛髪、甲状腺、気管、胆嚢、腎臓、尿管、膀胱、大動脈、静脈、食道、横隔膜、胃、直腸、副腎、気管支、耳、眼、網膜、生殖器、視床下部、喉頭、鼻、舌、脊髄もしくは尿管、子宮、卵巣および精巣が含まれる。例えば、遺伝子改変された細胞、例えば、ブタ細胞は、脳、心臓、肝臓、皮膚、腸、肺、腎臓、眼、小腸または膵臓由来であり得る。一部の場合には、遺伝子改変された細胞は、膵臓由来であり得る。より具体的には、膵臓細胞は、島細胞であり得る。さらに、1つまたは複数の細胞は、膵α細胞、膵β細胞、膵δ細胞、膵F細胞（例えば、PP細胞）または膵ε細胞であり得る。例えば、遺伝子改変された細胞は、膵β細胞であり得る。本明細書で開示される組織または臓器は、1つまたは複数の遺伝子改変された細胞を含み得る。組織または臓器、例えば、1つまたは複数の遺伝子改変されたブタ由来の膵組織、例えば膵島は、本出願に記載される1つまたは複数の遺伝子改変された動物由来であり得る。

【0161】

遺伝子改変された細胞、例えば、ブタ細胞は、1つまたは複数の型の細胞を含み得、細胞の1つまたは複数の型には、毛包、ケラチノサイト、ゴナドトロピン産生細胞、コルチコトロピン産生細胞、甲状腺刺激ホルモン産生細胞、成長ホルモン産生細胞、プロラクチン分泌細胞、クロマフィン細胞、傍濾胞細胞、糸球小体細胞、メラニン細胞、母斑細胞、メルケル細胞、象牙芽細胞、セメント芽細胞、角膜実質細胞、網膜ミューラー細胞、網膜色素上皮細胞、ニューロン、グリア（例えば、オリゴデンドロサイト、アストロサイト）、上衣細胞、松果体細胞、肺胞細胞（例えば、I型肺胞細胞およびII型肺胞細胞）、クララ細胞、杯細胞、G細胞、D細胞、ECL細胞、胃主細胞、壁細胞、小窩細胞、K細胞、D細胞、I細胞、杯細胞、パネート細胞、腸細胞、ミクロフォールド細胞、肝細胞、肝星細胞（例えば、中胚葉由来のクッパー細胞）、胆嚢細胞、房心細胞、膵星細胞、膵α細胞、膵β細胞、膵δ細胞、膵F細胞（例えば、PP細胞）、膵ε細胞、甲状腺（例えば、濾胞細胞）、副甲状腺（例えば、副甲状腺主細胞）、好酸性細胞、尿路上皮細胞、骨芽細胞、骨細胞、軟骨芽細胞、軟骨細胞、線維芽細胞、線維細胞、筋芽細胞、筋細胞、筋衛星細胞、腱細胞、心筋細胞、脂肪芽細胞、脂肪細胞、カハールの間質細胞、血管芽細胞、内皮細胞、メサングウム細胞（例えば、糸球体内メサングウム細胞および糸球体外メサングウム細胞）、傍糸球体細胞、緻密斑細胞、間質細胞、間質細胞、テロサイト単純上皮細胞、有足細胞、腎臓近位尿細管刷子縁細胞、セルトリ細胞、ライディッヒ細胞、顆粒膜細胞、栓細胞、生殖細胞、精子卵子、リンパ球、骨髄系細胞、内皮前駆体細胞、内皮幹細胞、血管芽細胞、中胚葉性血管芽細胞および周皮細胞、壁細胞が含まれる。遺伝子改変された細胞は、潜在的に、細胞治療において使用される任意の細胞であり得る。例えば、細胞治療は、糖尿病などの疾患に対する膵β細胞補充または置換であり得る。

10

20

【0162】

遺伝子改変された細胞、例えば、ブタ細胞は、非ヒト動物由来であり（例えば、非ヒト動物から抽出され）得る。1つまたは複数の細胞は、成熟成体非ヒト動物由来であり得る。しかし、1つまたは複数の細胞は、胎仔または新生仔組織由来であり得る。

【0163】

疾患に依存して、1つまたは複数の細胞は、成体ドナー、例えば、島細胞ドナーとして有用であるのに十分なサイズまで成長したトランスジェニック非ヒト動物由来であり得る。一部の場合には、非ヒト動物は、離乳後の齢であり得る。例えば、非ヒト動物は、少なくともまたは少なくとも約6月齢であり得る。一部の場合には、非ヒト動物は、少なくともまたは少なくとも約18月齢であり得る。非ヒト動物は、一部の場合には、繁殖齢に達するまで生存する。例えば、異種移植のための島は、新生仔（例えば、3〜7日齢）または離乳前（例えば、14から21日齢）のドナーブタ由来であり得る。1つまたは複数の遺伝子改変された細胞、例えば、ブタ細胞は、培養細胞であり得る。例えば、培養細胞は、野生型細胞由来または遺伝子改変された細胞（本明細書に記載される）由来であり得る。さらに、培養細胞は、初代細胞であり得る。初代細胞は、抽出され得、例えば、液体窒素中でまたは−20℃から−80℃で凍結され得る。培養細胞はまた、公知の方法によって不死化され得、例えば、液体窒素中でまたは−20℃から−80℃で、凍結および貯蔵され得る。

30

40

【0164】

本明細書に記載される遺伝子改変された細胞、例えば、ブタ細胞は、野生型の遺伝子改変されていない細胞が移植される場合と比較した場合、拒絶のより低いリスクを有し得る。

【0165】

ICP47、CD46、CD55、CD59、HLA-E、HLA-G（例えば、HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6またはHLA-G7）、B2M、Sp19、PD-L1、PD-L2、CD47、ガレクチン-9、それらの任意の機能的断片、またはそれらの任意の組合せのポリヌクレオチド配列を含むベクターが、本明細書で開示される。これらのベクターは、（トランスフェクシ

50

ョン、形質転換、ウイルス送達、または任意の他の公知の方法によって) 細胞のゲノム中に挿入され得る。これらのベクターは、I C P 4 7、C D 4 6、C D 5 5、C D 5 9、H L A - E、H L A - G (例えば、H L A - G 1、H L A - G 2、H L A - G 3、H L A - G 4、H L A - G 5、H L A - G 6またはH L A - G 7)、B 2 M S p i 9、P D - L 1、P D - L 2、C D 4 7および／もしくはガレクチン-9タンパク質またはそれらの機能的断片をコードし得る。

【0166】

企図されるベクターには、プラスミドベクター、人工／ミニ染色体、トランスポゾンおよびウイルスベクターが含まれるがこれらに限定されない。RNAを含む単離されたまたは合成核酸が本明細書でさらに開示され、RNAは、表2中の任意の配列によってコードされる。RNAはまた、表2中の任意の配列に対して少なくともまたは少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%または100%の相同性を示す任意の配列をコードし得る。RNAはまた、表2中の任意の配列に対して少なくともまたは少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%または100%の同一性を示す任意の配列をコードし得る。

10

【0167】

RNAは、単鎖ガイドRNAであり得る。本開示は、表1中の任意の配列を含む単離されたまたは合成された核酸もまた提供する。RNAはまた、表1中の任意の配列に対して少なくともまたは少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%または100%の相同性を示す単離されたまたは合成された核酸を提供し得る。RNAはまた、表1中の任意の配列に対して少なくともまたは少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%または100%の同一性を示す単離されたまたは合成された核酸を提供し得る。

20

【0168】

ガイドRNA配列は、非ヒト動物のゲノム中の1つまたは複数の遺伝子を標的化する際に使用され得る。例えば、ガイドRNA配列は、非ヒト動物のゲノム中の単一の遺伝子を標的化し得る。一部の場合には、ガイドRNA配列は、非ヒト動物のゲノム中の1つまたは複数の遺伝子の各々の1つまたは複数の標的部位を標的化し得る。

【0169】

遺伝子改変された細胞はまた、白血球、リンパ球、Bリンパ球または任意の他の細胞、例えば、島細胞、島ベータ細胞もしくは肝細胞であり得る。これらの細胞は、本明細書で開示される任意の方法によって、例えば、ECDI固定によって、固定され得る、またはアポトーシス性にされ得る。

30

【0170】

遺伝子改変された細胞は、非ヒト胎仔動物、周産期非ヒト動物、新生仔非ヒト動物、離乳前非ヒト動物、若年成体非ヒト動物、成体非ヒト動物、またはそれらの任意の組合せに由来し得る(例えば、そこから回収され得る)。一部の場合には、遺伝子改変された非ヒト動物細胞は、胚性組織、例えば、胚性膀胱組織に由来し得る。例えば、遺伝子改変された細胞は、胎生42日目(E42)由来の胚性ブタ膀胱組織に由来し得る(例えば、そこから回収され得る)。

40

【0171】

用語「胎仔動物」およびその文法的等価物は、動物の任意の未誕生子孫を指し得る。用語「周産期動物」およびその文法的等価物は、誕生の直前または直後の動物を指し得る。例えば、周産期は、妊娠期間の20週目から28週目に開始し得、誕生の1から4週間後に終了し得る。用語「新生仔動物」およびその文法的等価物は、任意の新たに生まれた動物を指し得る。例えば、新生仔動物は、1ヵ月以内に誕生した動物であり得る。用語「離乳前非ヒト動物」およびその文法的等価物は、母親の乳汁から引き離される前の任意の動物を指し得る。

【0172】

遺伝子改変された非ヒト動物細胞は、医薬組成物へと製剤化され得る。例えば、遺伝子

50

改変された非ヒト動物細胞は、薬学的に許容される賦形剤と組み合わせられ得る。使用され得る賦形剤は、生理食塩水である。医薬組成物は、移植を必要とする患者を処置するために使用され得る。

【0173】

遺伝子改変された細胞は、本明細書で開示される任意の遺伝子の低減された発現および／または任意の導入遺伝子を含み得る。細胞の遺伝子改変は、遺伝子改変された動物を作製するために本明細書に記載されるのと同じ方法のいずれかを使用することによって実施され得る。一部の 경우에는、非ヒト動物に起源する遺伝子改変された細胞を作製する方法は、1つもしくは複数の遺伝子の発現を低減させるステップおよび／または1つもしくは複数の導入遺伝子を挿入するステップを含み得る。遺伝子発現の低減および／または導入遺伝子挿入は、本出願に記載される任意の方法、例えば、遺伝子編集を使用して実施され得る。

10

【0174】

幹細胞に由来する遺伝子改変された細胞

遺伝子改変された細胞は、幹細胞であり得る。これらの遺伝子改変された幹細胞は、本明細書で開示される方法によって、固定された細胞またはアポトーシス性細胞へと引き続いて処理され得る細胞の、潜在的に無制限の供給を行うために使用され得る。上で議論したように、幹細胞は、生存可能なヒトを生成することが不可能である。

【0175】

ヒト多能性幹細胞からの、数億のインスリン産生性グルコース応答性膵ベータ細胞の産生は、糖尿病における細胞移植治療のための前例のない細胞供給源を提供する（Pagliucaら、2014年）。糖尿病および他の疾患における細胞移植治療のための他のヒト幹細胞（胚性、多能性、胎盤、誘導多能性など）由来の細胞供給源が、開発されている。

20

【0176】

これらの幹細胞由来の細胞性グラフトは、拒絶に供される。拒絶は、CD8+T細胞によって媒介され得る。1型糖尿病レシピエントでは、ヒト幹細胞由来の機能的ベータ細胞は、拒絶および自己免疫性再発（autoimmune recurrence）に供される。両方とも、CD8+T細胞によって媒介されることが考えられる。

【0177】

これらの同種反応性および自己反応性CD8+T細胞の活性化およびエフェクター機能を妨害するために、CRISP/Cas9遺伝子標的化を含む、遺伝子改変の確立された分子的方法が、幹細胞由来の、部分的にまたは完全に分化した細胞性グラフトにおいて、機能的MHCクラスIの細胞表面発現を防止することを目的として、ヒト幹細胞中のNLRC5、TAP1および／またはB2M遺伝子を変異させるために使用され得る。したがって、MHCクラスIの機能的発現を欠くヒト幹細胞由来の細胞性グラフトを移植することは、拒絶および自己免疫性再発を予防するために他に必要とされる免疫抑制の要求を最小化し得る。

30

【0178】

しかし、移植されたヒト細胞上のMHCクラスI発現の欠如は、ナチュラルキラー（NK）細胞の受動的活性化を引き起こす可能性が高い（Ohlenら、1989年）。NK細胞の細胞傷害性は、NK細胞上の阻害性受容体CD94/NKG2Aを刺激して細胞死滅を防止するヒトMHCクラスI遺伝子HLA-Eの発現によって克服され得る（Weissら、2009年；Lilienfeldら、2007年；Sasakiら、1999年）。HLA-E遺伝子の首尾よい発現は、ヒトB2M（ベータ2ミクログロブリン）遺伝子および同族ペプチドの共発現に依存した（Weissら、2009年；Lilienfeldら、2007年；Sasakiら、1999年；Pascasovaら、1999年）。幹細胞DNAにおけるヌクレアーゼ媒介性切断は、相同組換え修復を介した1つまたは複数の遺伝子の挿入を可能にする。HLA-EおよびhB2M遺伝子は、順番に、ヌクレアーゼ媒介性DNA切断の領域において組み込まれ得、そうして、導入遺伝子を挿

40

50

入しながら、標的遺伝子（例えば、NLR C5）の発現を防止する。

【0179】

排除までいかないとしても、MHCクラスIの機能的発現を欠く幹細胞由来の細胞性グラフトのレシピエントにおける維持免疫抑制の必要をさらに最小化するために、これらのグラフトのレシピエントは、本明細書で開示される寛容化アポトーシス性ドナー細胞によっても処置され得る。

【0180】

インスリン産生性膵ベータ細胞の産生のための方法（Pagliucaら、2014年）は、潜在的に、非ヒト（例えば、ブタ）の初代の単離された多能性、胚性幹細胞または幹様細胞に適用され得る（Goncalvesら、2014年；Hallら V. 2008年）。しかし、これらのインスリン産生性膵ベータ細胞のレシピエントは、グラフトの成功を脅かす活性な免疫応答を有する可能性が高い。抗体媒介性およびCD8+T細胞免疫攻撃を克服するために、ドナー動物は、本願を通して開示されるGGTA1、CMAH、B4GalNT2またはMHCクラスI関連遺伝子の発現を防止するために、初代非ヒト多能性、胚性幹細胞または幹様細胞の単離の前に遺伝子改変され得る。次いで、遺伝子改変された動物から単離された多能性、胚性幹細胞または幹様細胞は、数百万のインスリン産生性膵ベータ細胞へと分化され得る。

【0181】

一部の場合には、異種幹細胞由来の細胞移植片が望まれ得る。例えば、ヒト胚性幹細胞の使用は、レシピエントにとって倫理的に不愉快であり得る。したがって、ヒトレシピエントは、非ヒト供給源の胚性幹細胞に由来する細胞性グラフトを受けることをより心地よく感じ得る。

【0182】

非ヒト幹細胞には、ブタ幹細胞が含まれ得る。これらの幹細胞は、野生型ブタまたは遺伝子操作されたブタに由来し得る。野生型ブタに由来する場合、CRISP/Cas9遺伝子標的化を含む、遺伝子改変の確立された分子的方法を使用する遺伝子操作が、幹細胞段階で最良に実施され得る。遺伝子操作は、MHCクラスIの機能的発現を防止するために、NLR C5、TAP1および／またはB2M遺伝子の発現を破壊するために標的化され得る。グラフトにおいてNLR C5、TAP1およびB2Mなどの遺伝子を破壊することは、島ベータ細胞上を含むグラフト細胞上でのMHCクラスIの機能的発現の欠如を引き起こし、それによって、自己反応性CD8+T細胞の移植後活性化を妨害し得る。したがって、これは、自己反応性CD8+T細胞の細胞溶解性エフェクター機能から、移植片、例えば、移植された島ベータ細胞を保護できる。

【0183】

しかし、幹細胞の遺伝子操作は、分化の潜在力を変更し得るので、1つのアプローチは、NLR C5、TAP1および／またはB2M遺伝子の発現が破壊されたブタを含む、遺伝子操作されたブタ由来の幹細胞株を生成することであり得る。

【0184】

本願を通して開示される、GGTA1、CMAH、B4GalNT2遺伝子の発現もまた防止するために遺伝子改変された、または補体調節タンパク質CD46、CD55もしくはCD59をコードする導入遺伝子を発現するように改変されたブタからの幹細胞の生成は、インスリン産生性膵ベータ細胞または他の細胞性治療産物の治療的使用をさらに改善し得る。同様に、本明細書に記載されるのと同じストラテジーが、全体で記載される他の方法および組成物において使用され得る。

【0185】

MHCクラスIの機能的発現を欠くヒト幹細胞由来の細胞性グラフトのレシピエント中と同様に、ブタ幹細胞由来のグラフトのレシピエントにおける維持免疫抑制の必要は、寛容化アポトーシス性ドナー細胞による移植前後の処置によってさらに最小化され得る。

【0186】

III. 寛容化ワクチン

伝統的に、ワクチンは、宿主に免疫を付与するために使用される。例えば、不活性化ウイルスをアジュバントと共に皮膚の下に注射することは、活性および／または毒性バージョンのウイルスに対する一時的または永久的な免疫をもたらす得る。これは、陽性ワクチンと呼ばれ得る（図3）。しかし、静脈内注射される不活性化細胞（例えば、ドナーまたはドナーとは遺伝的に異なる動物由来の細胞）は、ドナー細胞、または類似の細胞性マーカーを有する細胞の寛容を生じ得る。これは、寛容化ワクチン（陰性ワクチンとも呼ばれる）と呼ばれ得る（図3）。不活性細胞は、アジュバントなしで注射され得る。あるいは、不活性細胞は、アジュバントと共に注射され得る。これらの寛容化ワクチンは、レシピエントを寛容化し、拒絶を予防することによって、移植、例えば異種移植において有利であり得る。寛容化は、免疫抑制治療の使用なしに、レシピエントに付与され得る。しかし、一部の場合には、寛容化ワクチンと組み合わせた他の免疫抑制治療が、移植拒絶を減少させ得る。

【0187】

図4は、一過的免疫抑制の援護の下での寛容化ワクチン接種のための、ドナー由来のアポトーシス性細胞の注入（例えば、静脈内注入）による、対象（例えば、ヒトまたは非ヒト霊長類）における移植されたグラフト（例えば、異種グラフト）の生存を延長させるための例示的なアプローチを実証している。ドナーは、寛容化ワクチンとしての、移植のための異種グラフト（例えば、島）、ならびに細胞（例えば、脾細胞）を提供し得る。寛容化ワクチン細胞は、（例えば、ECDI固定による）アポトーシス性細胞であり得、移植の前（例えば、移植の7日前の最初のワクチン）および移植の後（例えば、移植の1日後の追加免疫ワクチン）に、レシピエントに投与され得る。寛容化ワクチンは、移植されたグラフト（例えば、島）の生存の時間を延長させる一過的免疫抑制を提供し得る。

【0188】

寛容化ワクチンは、以下の型の細胞：i) GGTA1単独、またはGGTA1およびCMAH、またはGGTA1、CMAHおよびB4GALNT2の低減された発現を有する遺伝子型的に同一な細胞を含むアポトーシス性細胞のうちの1つまたは複数を含み得る。これは、アポトーシス性細胞ワクチンドナー動物と遺伝子型的に同一な動物由来の、またはさらなる遺伝子改変（例えば、NLRC5、TAP1、MICA、MICB、CXCL10、C3、C11TA遺伝子の抑制、またはICP47、CD46、CD55、HLA-E、HLA-G（例えば、HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6またはHLA-G7）、B2M、CD59、もしくはそれらの任意の機能的断片の2もしくはそれ超のポリヌクレオチド挿入物を含む導入遺伝子の発現）を受けているが、アポトーシス性細胞ワクチンが由来するドナー動物と遺伝子型的に類似している動物由来の、臓器、組織、細胞および細胞株グラフト（例えば、異種グラフト）に対する細胞媒介性免疫および細胞依存的抗体媒介性免疫を最小化または排除し得る；ii) アポトーシス性細胞ワクチンドナー動物と遺伝子型的に同一な動物由来の、またはさらなる遺伝子改変（例えば、NLRC5、TAP1、MICA、MICB、CXCL10、C3、C11TA遺伝子の抑制、またはICP47、CD46、CD55、HLA-E、HLA-G（例えば、HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6またはHLA-G7）、B2M、CD59、もしくはそれらの任意の機能的断片の2もしくはそれ超のポリヌクレオチド挿入物を含む導入遺伝子の発現）を受けているが、アポトーシス性幹細胞由来の細胞ワクチンが由来するドナー動物と遺伝子型的に類似している動物由来の、臓器、組織、細胞および細胞株グラフト（例えば、異種グラフト）に対する細胞媒介性免疫および細胞依存的抗体媒介性免疫を最小化または排除するための、アポトーシス性幹細胞（例えば、胚性、多能性、胎盤、誘導多能性など）由来のドナー細胞（例えば、白血球、リンパ球、Tリンパ球、Bリンパ球、赤血球、グラフト細胞または任意の他のドナー細胞）；iii) 遺伝子改変（例えば、NLRC5、TAP1、MICA、MICB、CXCL10、C3、C11TA遺伝子の抑制）を受けているが、アポトーシス性ヒト幹細胞由来のドナー細胞ワクチンと他の点では遺伝子型的に類似している同じ幹細胞株に由来するヒト幹細胞株またはグラフト（例えば、同

種グラフト)と遺伝子型的に同一な臓器、組織、細胞および細胞グラフト(例えば、同種グラフト)に対する細胞媒介性免疫および細胞依存的抗体媒介性免疫を最小化または排除するための、アポトーシス性幹細胞(例えば、胚性、多能性、胎盤、誘導多能性など)由来のドナー細胞(白血球、リンパ球、Tリンパ球、Bリンパ球、赤血球、グラフト細胞、例えば、機能的島ベータ細胞または任意の他のドナー細胞);iv)アポトーシス性ドナー細胞であって、細胞は、UV照射、ガンマー照射、またはECDIの存在下でのインキュベーションが関与しない他の方法によってアポトーシス性にされる、アポトーシス性ドナー細胞。一部の場合には、寛容化ワクチン細胞は、それを必要とする対象に投与され得る、例えば、注入(一部の場合には反復して注入)され得る。寛容化ワクチンは、細胞由来の1つまたは複数の遺伝子を破壊する(例えば、発現を低減させる)ことによって産生され得る。例えば、本出願を通じて記載される遺伝子改変された細胞は、寛容化ワクチンを作製するために使用され得る。例えば、細胞は、糖タンパク質ガラクトシルトランスフェラーゼアルファ1,3(GGTA1)、推定シチジナーリン酸-N-アセチルノイラミン酸ヒドロキシラーゼ様タンパク質(CMAH)、B4GALNT2、および/またはそれらの任意の組合せを含む、破壊され得る(例えば、低減された発現)1つまたは複数の遺伝子を有し得る。例えば、細胞は、破壊されたGGTA1のみ、または破壊されたCMAHのみ、または破壊されたB4GALNT2のみを有し得る。細胞はまた、破壊されたGGTA1およびCMAH、破壊されたGGTA1およびB4GALNT2、または破壊されたCMAHおよびB4GALNT2を有し得る。細胞は、破壊されたGGTA1、CMAHおよびB4GALNT2を有し得る。一部の場合には、破壊された遺伝子は、GGTA1を含まない。細胞はまた、NLRC5を(内因的にまたは外因的に)発現し得、一方で、GGTA1および/またはCMAHは破壊される。細胞はまた、破壊されたC3を有し得る。

【0189】

寛容化ワクチンは、例えば、本出願を通じて記載される1つまたは複数の導入遺伝子をさらに発現するものを含む細胞を用いて産生され得る。例えば、寛容化ワクチンは、感染細胞タンパク質47(ICP47)、表面抗原分類46(CD46)、表面抗原分類55(CD55)、表面抗原分類59(CD59)、HLA-E、HLA-G(例えば、HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6またはHLA-G7)、B2M、PD-L1、PD-L2、CD47、それらの任意の機能的断片、またはそれらの任意の組合せの1つまたは複数のポリヌクレオチド挿入物を含む1つまたは複数の導入遺伝子を含む細胞を含み得る。一部の場合には、寛容化ワクチンは、GGTA1、CMAHおよびB4GALNT2の低減されたタンパク質発現、ならびにタンパク質またはその機能的断片をコードするポリヌクレオチドを含む導入遺伝子を含む遺伝子改変された細胞を含み得、タンパク質は、HLA-G1、PD-L1、PD-L2およびCD47を含む。一部の場合には、寛容化ワクチンは、GGTA1、CMAHおよびB4GALNT2の低減されたタンパク質発現、ならびにタンパク質またはその機能的断片をコードするポリヌクレオチドを含む導入遺伝子を含む遺伝子改変された細胞を含み得、タンパク質は、HLA-E、PD-L1、PD-L2およびCD47を含む。一部の場合には、寛容化ワクチンは、その表面上がCD47でコーティングされた細胞を含み得る。細胞の表面上のCD47のコーティングは、細胞表面をビオチン化し、その後、これらのビオチン化細胞をストレプトアビジン-CD47キメラタンパク質と共にインキュベートすることによって達成され得る。例えば、寛容化ワクチンは、その表面上がCD47でコーティングされた細胞を含み得、細胞は、GGTA1、CMAHおよびB4GALNT2の低減されたタンパク質発現、ならびにタンパク質またはその機能的断片をコードするポリヌクレオチドを含む導入遺伝子を含み、タンパク質は、HLA-G1、PD-L1およびPD-L2を含む。CD47でコーティングされた細胞は、非アポトーシス性細胞であり得る。あるいは、CD47でコーティングされた細胞は、アポトーシス性細胞であり得る。

【0190】

対象に投与される場合、寛容化ワクチンの細胞は、循環半減期を有し得る。寛容化ワクチンの細胞は、少なくともまたは少なくとも約0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、18、24、36、48、60もしくは72時間の循環半減期を有し得る。例えば、寛容化ワクチンの循環半減期は、0.1からもしくは約0.1から0.5；0.5からしくは約0.5から1.0；1.0からしくは約1.0から2.0；1.0からしくは約1.0から3.0；1.0からしくは約1.0から4.0；1.0からしくは約1.0から5.0；5からしくは約5から10；10からしくは約10から15；15からしくは約15から24；24からしくは約24から36；36からしくは約36から48；48からしくは約48から60；または60からしくは約60から72時間までであり得る。寛容化ワクチン中の細胞は、その循環半減期を増強するために処理され得る。かかる処理は、細胞をタンパク質、例えばCD47でコーティングすることを含み得る。その循環半減期を増強するために処理された細胞は、非アポトーシス性細胞であり得る。その循環半減期を増強するために処理された細胞は、アポトーシス性細胞であり得る。あるいは、寛容化ワクチン中の細胞は、その循環半減期を増強するために、遺伝子改変され得る（例えば、そのゲノム中での、CD47などの導入遺伝子の挿入）。その循環半減期を増強するために遺伝子改変された細胞は、非アポトーシス性細胞であり得る。その循環半減期を増強するために遺伝子改変された細胞は、アポトーシス性細胞であり得る。

10

【0191】

寛容化ワクチンは、1つまたは複数の破壊された遺伝子（例えば、低減された発現）および1つまたは複数の導入遺伝子の両方を有し得る。本明細書に記載される任意の遺伝子および／または導入遺伝子が使用され得る。

20

【0192】

1つまたは複数の破壊された遺伝子（例えば、低減された発現）を含む細胞は、寛容化ワクチンとして、または寛容化ワクチンの一部として、使用され得る。言い換えると、1つまたは複数の破壊された遺伝子を含む細胞は、寛容化ワクチンであり得る、または寛容化ワクチンにされ得る。

【0193】

寛容化ワクチンは、移植において使用される細胞、臓器および／または組織と同じ遺伝子型および／または表現型を有し得る。時折、寛容化ワクチンおよび移植片の遺伝子型および／または表現型は、異なる。移植レシピエントのために使用される寛容化ワクチンは、移植グラフトドナー由来の細胞を含み得る。移植レシピエントのために使用される寛容化ワクチンは、移植グラフトとは遺伝的におよび／または表現型的に異なる細胞を含み得る。一部の場合には、移植レシピエントのために使用される寛容化ワクチンは、移植グラフトドナー由来の細胞ならびに移植グラフトとは遺伝的におよび／または表現型的に異なる細胞を含み得る。移植グラフトとは遺伝的におよび／または表現型的に異なる細胞は、同じ種の移植グラフトドナーの動物由来であり得る。

30

【0194】

寛容化ワクチンのための細胞の供給源は、ヒトまたは非ヒト動物由来であり得る。

【0195】

40

本出願全体で開示される細胞は、寛容化ワクチンにされ得る。例えば、寛容化ワクチンは、本明細書で開示される1つまたは複数の移植される細胞から作製され得る。あるいは、寛容化ワクチンは、移植される細胞のいずれとも異なる1つまたは複数の細胞から作製され得る。例えば、寛容化ワクチンにされる細胞は、移植される細胞のいずれとも遺伝子型および／または表現型的に異なり得る。しかし、一部の場合には、寛容化ワクチンは、NLR C5を（内因的にまたは外因的に）発現する。寛容化ワクチンは、移植における細胞、臓器および／または組織の生存を促進し得る。寛容化ワクチンは、ドナー細胞、臓器および／または組織と遺伝子型的に同一または類似の非ヒト動物に由来し得る。例えば、寛容化ワクチンは、ドナーブタ細胞、臓器および／または組織と遺伝子型的に同一または類似のブタに由来する細胞（例えば、アポトーシス性ブタ細胞）であり得る。引き続

50

いて、ドナー細胞、臓器および／または組織は、同種グラフトまたは異種グラフトにおいて使用され得る。一部の 경우에는、寛容化ワクチンのための細胞は、G G T A 1、C M A H および B 4 G a 1 N T 2 の低減された発現を有し、H L A - G（または H L A - E -）、ヒト C D 4 7、ヒト P D - L 1 およびヒト P D - L 2 をコードする導入遺伝子を有する、遺伝子改変された動物（例えば、ブタ）由来であり得る。グラフトドナー動物は、寛容化ワクチン細胞のために動物（例えば、ブタ）をさらに遺伝子改変することによって生成され得る。例えば、グラフトドナー動物は、寛容化ワクチン細胞のための上述の動物においてさらなる遺伝子（例えば、N L R C 5（または T A P 1）、C 3 および C X C L 1 0）を破壊することによって生成され得る（図 5）。

【0196】

寛容化ワクチンは、非ヒト動物細胞（例えば、非ヒト哺乳動物細胞）を含み得る。例えば、非ヒト動物細胞は、ブタ、ネコ、ウシ、シカ、イヌ、フェレット、ガウル、ヤギ、ウマ、マウス、ムフロネ、ラバ、ウサギ、ラット、ヒツジまたは霊長類由来であり得る。具体的には、非ヒト動物細胞は、ブタ細胞であり得る。寛容化ワクチンはまた、遺伝子改変された非ヒト動物細胞を含み得る。例えば、遺伝子改変された非ヒト動物細胞は、死細胞（例えば、アポトーシス性細胞）であり得る。寛容化ワクチンはまた、本明細書で開示される任意の遺伝子改変された細胞を含み得る。

【0197】

寛容化ワクチンを作製するための細胞の処理

寛容化ワクチンは、化学物質で処理された細胞を含み得る。一部の 경우에는、処理は、細胞のアポトーシスを誘導し得る。理論に束縛されることなく、アポトーシス性細胞は、宿主抗原提示細胞（例えば、脾臓中の）によって捕らえられ得、免疫細胞（例えば、T 細胞）におけるアネルギーの誘導をもたらす非免疫原性の様式で、宿主免疫細胞（例えば、T 細胞）に提示され得る。

【0198】

寛容化ワクチンは、アポトーシス性細胞および非アポトーシス性細胞を含み得る。寛容化ワクチン中のアポトーシス性細胞は、寛容化ワクチン中の非アポトーシス性細胞と遺伝的に同一であり得る。あるいは、寛容化ワクチン中のアポトーシス性細胞は、寛容化ワクチン中の非アポトーシス性細胞とは遺伝的に異なり得る。寛容化ワクチンは、固定された細胞および固定されていない細胞を含み得る。寛容化ワクチン中の固定された細胞は、寛容化ワクチン中の固定されていない細胞と遺伝的に同一であり得る。あるいは、寛容化ワクチン中の固定された細胞は、寛容化ワクチン中の固定されていない細胞とは遺伝的に異なり得る。一部の 경우에는、固定された細胞は、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド (E C D I) で固定された細胞であり得る。

【0199】

寛容化ワクチン中の細胞は、化学物質、例えば、E C D I を使用して固定され得る。固定は、細胞をアポトーシス性にし得る。本明細書で開示される寛容化ワクチン、細胞、キットおよび方法は、E C D I および／または E C D I 処理を含み得る。例えば、寛容化ワクチンは、細胞、例えば、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド (E C D I) で処理された、本明細書で開示される遺伝子改変された細胞であり得る。言い換えると、全体で記載される遺伝子改変された細胞は、寛容化ワクチンを創出するために E C D I で処理され得る。次いで、寛容化ワクチンは、移植された細胞、臓器および／または組織の生存を促進するために、移植において使用され得る。E C D I 誘導体、官能化 E C D I および／または置換 E C D I もまた、寛容化ワクチンのために細胞を処理するために使用され得ることもまた企図される。一部の 경우에는、寛容化ワクチンのための細胞は、任意の適切なカルボジイミド誘導体、例えば、E C D I、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド (D I C)、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (D C C)、および当業者に理解される他のカルボジイミド誘導体で処理され得る。

【0200】

寛容化ワクチンのための細胞はまた、E C D I の存在下でのインキュベーションが関与

10

20

30

40

50

しない方法、例えば、他の化学物質または照射、例えば、UV照射もしくはガンマ照射によってアポトーシス性にされ得る。

【0201】

ECDIは、遊離アミンおよびカルボキシル基を化学的に架橋し得、例えば、寛容化ワクチンおよびドナー非ヒト動物の両方を生じさせた動物由来の細胞、臓器および／または組織においてアポトーシスを効果的に誘導できる。言い換えると、同じ遺伝子改変された動物は、移植において使用される寛容化ワクチンならびに細胞、組織および／または臓器を生じさせ得る。例えば、本明細書で開示される遺伝子改変された細胞は、ECDIで処理され得る。このECDI固定は、寛容化ワクチンの創出をもたらし得る。

【0202】

寛容化ワクチンを作製するために使用され得る遺伝子改変された細胞は、脾臓（脾臓B細胞を含む）、肝臓、末梢血（末梢血B細胞を含む）、リンパ節、胸腺、骨髄、またはそれらの任意の組合せに由来し得る。例えば、細胞は、脾臓細胞、例えば、ブタ脾臓細胞であり得る。一部の場合には、細胞は、*ex vivo*で拡大増殖され得る。一部の場合には、細胞は、胎仔、周産期、新生仔、離乳前および／または若年成体の非ヒト動物に由来し得る。一部の場合には、細胞は、非ヒト動物の胚に由来し得る。

【0203】

寛容化ワクチン中の細胞は、2つまたはそれ超の破壊された（例えば、低減された発現）遺伝子もまた含み得、2つまたはそれ超の破壊された遺伝子は、糖タンパク質ガラクトシルトランスフェラーゼアルファ1, 3 (GGTA1)、推定シチジンーリン酸-N-アセチルノイラミン酸ヒドロキシラーゼ様タンパク質 (CMAH)、HLA-E、HLA-G（例えば、HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6またはHLA-G7）、B2MおよびB4GALNT2、それらの任意の機能的断片、またはそれらの任意の組合せであり得る。一部の場合には、2つまたはそれ超の破壊された遺伝子は、GGTA1を含まない。上記のように、破壊は、ノックアウトまたは遺伝子発現の抑制であり得る。ノックアウトは、例えば、CRISPR/cas系を使用することによって、遺伝子編集によって実施され得る。あるいは、遺伝子発現の抑制は、例えば、RNA干渉、shRNA、1つまたは複数のドミナントネガティブ導入遺伝子を使用するノックダウンによって、実施され得る。一部の場合には、細胞は、本明細書で開示される1つまたは複数の導入遺伝子をさらに含み得る。例えば、1つまたは複数の導入遺伝子は、CD46、CD55、CD59、またはそれらの任意の組合せであり得る。

【0204】

寛容化ワクチン中の細胞はまた、1つまたは複数のドナー非ヒト動物に由来し得る。一部の場合には、細胞は、同じドナー非ヒト動物に由来し得る。細胞は、1つまたは複数のレシピエント非ヒト動物に由来し得る。一部の場合には、細胞は、2つまたはそれ超の非ヒト動物（例えば、ブタ）に由来し得る。

【0205】

寛容化ワクチンは、見込まれるレシピエントの体重1kg当たり、0.001からまたは約0.001から約5.0まで、例えば、0.001からまたは約0.001から1.0までの、エンドトキシン単位を含み得る。例えば、寛容化ワクチンは、見込まれるレシピエントの体重1kg当たり、0.01からもしくは約0.01から5.0；0.01からもしくは約0.01から4.5；0.01からもしくは約0.01から4.0、0.01からしくは約0.01から3.5；0.01からしくは約0.01から3.0；0.01からしくは約0.01から2.5；0.01からしくは約0.01から2.0；0.01からしくは約0.01から1.5；0.01からしくは約0.01から1.0；0.01からしくは約0.01から0.9；0.01からしくは約0.01から0.8；0.01からしくは約0.01から0.7；0.01からしくは約0.01から0.6；0.01からしくは約0.01から0.5；0.01からしくは約0.01から0.4；0.01からしくは約0.01から0.3；0.01からしくは

10

20

30

40

50

約0.01から0.2；または0.01からもしくはは約0.01から0.1までの、エンドトキシン単位を含み得る。

【0206】

寛容化ワクチンは、1 μ l 当たり1からまたは約1から100までの凝集体を含み得る。例えば、寛容化ワクチンは、1 μ l 当たり1からもしくはは約1から5；1からしくは約1から10、または1からしくは約1から20までの凝集体を含み得る。寛容化ワクチンは、少なくともまたは少なくとも約1、5、10、20、50または100の凝集体を含み得る。

【0207】

寛容化ワクチンは、約50,000の凍結から解凍されたヒト末梢血単核細胞が約160,000細胞の寛容化ワクチン（例えば、ブタ細胞）と共にインキュベートされる場合、0.001 pg/mlからまたは約0.001 pg/mlから10.0 pg/mlまで、例えば、0.001 pg/mlからまたは約0.001 pg/mlから1.0 pg/mlまでのIL-1ベータの放出を誘発し得る。例えば、寛容化ワクチンは、約50,000の凍結から解凍されたヒト末梢血単核細胞が約160,000細胞の寛容化ワクチン（例えば、ブタ細胞）と共にインキュベートされる場合、0.001からしくは約0.001から10.0；0.001からしくは約0.001から5.0；0.001からしくは約0.001から1.0；0.001からしくは約0.001から0.8；0.001からしくは約0.001から0.2；または0.001からしくは約0.001から0.1 pg/mlまでのIL-1ベータの放出を誘発する。寛容化ワクチンは、約50,000の凍結から解凍されたヒト末梢血単核細胞が約160,000細胞の寛容化ワクチン（例えば、ブタ細胞）と共にインキュベートされる場合、0.001からまたは約0.001から2.0 pg/mlまで、例えば、0.001からまたは約0.001から0.2 pg/mlまでのIL-6の放出を誘発し得る。例えば、寛容化ワクチンは、約50,000の凍結から解凍されたヒト末梢血単核細胞が約160,000細胞の寛容化ワクチン（例えば、ブタ細胞）と共にインキュベートされる場合、0.001からしくは約0.001から2.0；0.001からしくは約0.001から1.0；0.001からしくは約0.001から0.5；または0.001からしくは約0.001から0.1 pg/mlまでのIL-6の放出を誘発し得る。

【0208】

寛容化ワクチンは、37℃で4時間の放出後インキュベーションの後に、または37℃で約4時間の放出後インキュベーションの後に、60%よりも多いまたは約60%よりも多い、例えば、85%よりも多いまたは約85%よりも多い、Annexin V陽性アポトーシス性細胞を含み得る。例えば、寛容化ワクチンは、37℃で約4時間の放出後インキュベーションの後に、60%、70%、80%、90%または99%よりも多い、Annexin V陽性のアポトーシス性細胞を含む。

【0209】

寛容化ワクチンは、0.01%からまたは約0.01%から10%まで、例えば、0.01%からまたは約0.01%から2%までの壊死細胞を含み得る。例えば、寛容化ワクチンは、0.01%からしくは約0.01%から10%；0.01%からしくは約0.01%から7.5%；0.01%からしくは約0.01%から5%；0.01%からしくは約0.01%から2.5%；または0.01%からしくは約0.01%から1%までの壊死細胞を含む。

【0210】

ドナー細胞の投与の前、その間および／またはその後に、ECDI処理された細胞、臓器および／または組織を含む寛容化ワクチンを投与することは、レシピエント（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）において細胞、臓器および／または組織に対する寛容を誘導し得る。ECDI処理細胞は、静脈内注入によって投与され得る。

【0211】

ECDI処理脾細胞を含む寛容化ワクチンの注入によって誘導される寛容は、インタク

10

20

30

40

50

トなプログラム死1受容体-プログラム死リガンド1シグナル伝達経路とCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺調節性T細胞との間の相乗効果に依存する可能性が高い。

【0212】

寛容化ワクチン中の細胞は、ECDI固定だけでなく、他の方法によっても、アポトーシス性細胞（例えば、寛容化ワクチン）にされ得る。例えば、全体で開示される遺伝子改変された細胞、例えば、非ヒト細胞動物細胞またはヒト細胞（幹細胞を含む）のいずれかは、遺伝子改変された細胞をUV照射に曝露させることによって、アポトーシス性にされ得る。遺伝子改変された細胞は、それをガンマー照射に曝露させることによって、アポトーシス性にされ得る。例えば、EtOH固定による、ECDIが関与しない他の方法もまた企図される。

10

【0213】

寛容化ワクチン中の細胞、例えば、ECDI処理細胞、抗原カップリング細胞および／またはエピトープカップリング細胞は、ドナー細胞（例えば、移植グラフトのドナー由来の細胞）を含み得る。寛容化ワクチン中の細胞、例えば、ECDI処理細胞、抗原カップリング細胞および／またはエピトープカップリング細胞は、レシピエント細胞（例えば、移植グラフトのレシピエント由来の細胞）を含み得る。寛容化ワクチン中の細胞、例えば、ECDI処理細胞、抗原カップリング細胞および／またはエピトープカップリング細胞は、第三者（例えば、ドナーでもレシピエントでもない）細胞を含み得る。一部の場合には、第三者細胞は、レシピエントおよび／またはドナーと同じ種の非ヒト動物由来である。他の場合には、第三者細胞は、レシピエントおよび／またはドナーとは異なる種の非ヒト動物由来である。

20

【0214】

細胞のECDI処理は、1つまたは複数の抗原および／またはエピトープの存在下で実施され得る。ECDI処理細胞は、ドナー、レシピエントおよび／または第三者の細胞を含み得る。同様に、抗原および／またはエピトープは、ドナー、レシピエントおよび／または第三者の抗原および／またはエピトープを含み得る。一部の場合には、ドナー細胞は、レシピエント抗原および／またはエピトープにカップリング（例えば、ECDI誘導性カップリング）される。例えば、遺伝子操作されたおよび遺伝子型的に同一なドナー細胞（例えば、ブタ細胞）に由来する可溶性ドナー抗原は、ECDIを用いてレシピエント末梢血単核細胞にカップリングされ、このECDIでカップリングされた細胞は、静脈内注入を介して投与される。

30

【0215】

一部の場合には、レシピエント細胞は、ドナー抗原および／またはエピトープにカップリング（例えば、ECDI誘導性カップリング）される。一部の場合には、レシピエント細胞は、第三者抗原および／またはエピトープにカップリング（例えば、ECDI誘導性カップリング）される。一部の場合には、ドナー細胞は、レシピエント抗原および／またはエピトープにカップリング（例えば、ECDI誘導性カップリング）される。一部の場合には、ドナー細胞は、第三者抗原および／またはエピトープにカップリング（例えば、ECDI誘導性カップリング）される。一部の場合には、第三者細胞は、ドナー抗原および／またはエピトープにカップリング（例えば、ECDI誘導性カップリング）される。一部の場合には、第三者細胞は、レシピエント抗原および／またはエピトープにカップリング（例えば、ECDI誘導性カップリング）される。例えば、遺伝子操作されたおよび遺伝子型的に同一なドナー細胞（例えば、ブタ細胞）に由来する可溶性ドナー抗原は、ECDIを用いてポリスチレンナノ粒子にカップリングされ、ECDIでカップリングされた細胞は、静脈内注入を介して投与される。

40

【0216】

これらの寛容化細胞ワクチンのいずれかの寛容原性効力は、IFN- γ 、NF- κ B阻害剤（例えば、クルクミン、トリプトライド、Bay-117085）、ビタミンD3、sICD40、コバルトプロトポルフィリン、インスリンB9-23、または宿主抗原提示細胞および宿主リンパ球の機能を改変する他の免疫調節分子のうちの1つまたは複数を

50

細胞の表面にカップリングさせることによってさらに最適化され得る。

【0217】

これらのアポトーシス性細胞ワクチンはまた、ドナー反応性細胞のアポトーシス死を誘発する分子（例えば、FasL、PD-L1、ガレクチン-9、CD8アルファ）をそれらの表面上にディスプレイするように操作されたドナー細胞によって補完され得る。

【0218】

本明細書で開示される寛容化ワクチンは、レシピエント中での移植片（例えば、異種グラフトまたは同種グラフト移植片）の生存の持続時間を増加させ得る。本明細書で開示される寛容化ワクチンは、移植後の免疫抑制の必要を低減または排除することもできる。異種グラフト移植片または同種グラフト移植片は、臓器、組織、細胞または細胞株であり得る。異種グラフト移植片および寛容化ワクチンはまた、異なる種由来であり得る。あるいは、異種グラフト移植片および寛容化ワクチンは、同じ種由来であり得る。例えば、異種グラフト移植片および寛容化ワクチンは、実質的に遺伝的に同一の個体（例えば、同じ個体）由来であり得る。

10

【0219】

ECDIで固定された細胞は、医薬組成物へと製剤化され得る。例えば、ECDIで固定された細胞は、薬学的に許容される賦形剤と組み合わせられ得る。使用され得る賦形剤は、生理食塩水である。使用され得る賦形剤は、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）である。次いで、医薬組成物は、移植を必要とする患者を処置するために使用され得る。

【0220】

幹細胞由来の細胞から作製された寛容化ワクチン

寛容化ワクチンを作製するための細胞は、幹細胞に由来し得る。かかる細胞は、幹細胞由来の機能的インスリン分泌性島β細胞、または同一のもしくは遺伝子型的に類似の幹細胞株から分化した他の細胞のいずれかである寛容化アポトーシス性ドナー細胞を含み得る。これらの他の細胞には、白血球、リンパ球、Tリンパ球、Bリンパ球、赤血球、または任意の他のドナー細胞が含まれ得る。

20

【0221】

これらの幹細胞由来の寛容化アポトーシス性ドナー細胞は、MHCクラスIの機能的発現を欠くように遺伝子操作される必要はない。アポトーシス性ドナー細胞上でのMHCクラスIの機能的発現は、それらの寛容原性潜在力を増強し得る。

30

【0222】

幹細胞由来の細胞は、UV照射、ガンマ照射、またはECDIの存在下でのインキュベーションが関与しない他の方法によって、アポトーシス性にされ得る。

【0223】

これらの陰性細胞ワクチンは、各々、拮抗性の抗CD40抗体（例えば、ヒト化2C10）、B細胞枯渇化または標的化抗体（例えば、リツキシマブ）、mTOR阻害剤（例えば、ラパマイシン）、およびTNF-α阻害剤（例えば、エタネルセプトを含むsTNFR）、およびIL-6阻害剤（例えば、トシリズマブを含む抗IL-6R抗体）が含まれるがこれらに限定されない一過的免疫抑制の援護の下で、移植前、または移植前および移植後に間隔をおいての両方で、静脈内注入され得る。

40

【0224】

これらの寛容化細胞ワクチンのいずれかの寛容原性効力は、以下の分子：IFN-γ、NF-κB阻害剤（例えば、クルクミン、トリプトライド、Bay-117085）、ビタミンD3、siCD40、コバルトプロトポルフィリン、インスリンB9-23、または宿主抗原提示細胞および宿主リンパ球の機能を改変する他の免疫調節分子のうちの1つまたは複数を細胞の表面にカップリングさせることによってさらに最適化され得る。

【0225】

これらのアポトーシス性細胞ワクチンはまた、ドナー反応性細胞のアポトーシス死を誘発する分子（例えば、FasL、PD-L1、ガレクチン-9、CD8アルファ）をそれらの表面上にディスプレイするように操作されたドナー細胞によって補完され得る。

50

【0226】

ヒト幹細胞由来の寛容化ワクチンと同様、寛容化アポトーシス性ドナーブタワクチンは、同じ細胞供給源に由来し得、MHCクラスI抗原を発現し得、同じ方法を使用してアポトーシス性にされ得、細胞の表面に1つまたは複数の免疫調節分子をカップリングさせることによって最適化され得、併用の免疫療法の援護の下で、移植前、または移植前および移植後に間隔をおいての両方で、静脈内注入され得る。

【0227】

I V. 遺伝子改変された非ヒト動物を作製する方法

上記のように遺伝子改変された非ヒト動物を作製するために、種々の技術が使用され得る。遺伝子改変された動物を創出するためのいくつかの例が本明細書で開示される。本明細書で開示される方法は、単なる例であり、決して限定を意味しないことを理解すべきである。

10

【0228】

遺伝子破壊

遺伝子破壊は、上記の任意の方法、例えば、ノックアウト、ノックダウン、RNA干渉、ドミナントネガティブなどによって実施され得る。方法の詳細な記載は、遺伝子改変された非ヒト動物に関するセクションにおいて上に開示される。

【0229】

CRISPR/cas系

【0230】

20

本明細書に記載される方法は、CRISPR/cas系を利用し得る。例えば、二本鎖切断(DSB)は、CRISPR/cas系、例えば、I型CRISPR/cas系を使用して生成され得る。本明細書で開示される方法で使用されるCas酵素は、DNA切断を触媒するCas9であり得る。Streptococcus pyogenes由来のCas9または任意の近縁のCas9による酵素作用は、20ヌクレオチドのガイド配列にハイブリダイズし、20ヌクレオチドの標的配列の後ろにプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)を有する標的配列において、二本鎖切断を生成し得る。

【0231】

ベクターは、CRISPR酵素、例えば、Casタンパク質をコードする酵素コード配列に作動可能に連結され得る。Casタンパク質の非限定的な例には、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas5d、Cas5t、Cas5h、Cas5a、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9(Csn1またはCsx12としても公知)、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Csy4、Cse1、Cse2、Cse3、Cse4、Cse5e、Csc1、Csc2、Csa5、Csn1、Csn2、Csm1、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx1S、Cs1f1、Cs1f2、CsO、Cs1f4、Csd1、Csd2、Cst1、Cst2、Csh1、Csh2、Csa1、Csa2、Csa3、Csa4、Csa5、それらのホモログ、またはそれらの改変されたバージョンが含まれる。未改変のCRISPR酵素、例えば、Cas9は、DNA切断活性を有し得る。CRISPR酵素は、標的配列において、例えば、標的配列内および/または標的配列の相補体内で、一方または両方の鎖の切断を指向し得る。例えば、CRISPR酵素は、標的配列の最初のヌクレオチドまたは最後のヌクレオチドから約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50、100、200、500またはそれ超の塩基対内で、一方または両方の鎖の切断を指向し得る。対応する野生型酵素に対して、変異したCRISPR酵素が標的配列を含む標的ポリヌクレオチドの一方または両方の鎖を切断する能力を欠くように変異したCRISPR酵素をコードするベクターが、使用され得る。

30

40

【0232】

1つまたは複数の核局在化配列(NLS)を含むCRISPR酵素をコードするベクタ

50

ーが使用され得る。例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個のNLSが使用され得る。CRISPR酵素は、アミノ（ammo）末端もしくはその近傍においてNLSを、カルボキシ末端もしくはその近傍において、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個のNLSもしくは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個超のNLSを、またはこれらの任意の組合せ（例えば、アミノ末端における1つまたは複数のNLSおよびカルボキシ末端における1つまたは複数のNLS）を含み得る。1つよりも多いNLSが存在する場合、単一のNLSが、1よりも多いコピーで存在し得るように、および／または1つもしくは複数のコピーで存在する1つもしくは複数の他のNLSと組み合わせて存在し得るように、各々は互いに独立して選択され得る。

10

【0233】

方法で使用するCRISPR酵素は、多くても6個のNLSを含み得る。NLSは、NLSに対して最も近いアミノ酸が、N末端またはC末端からポリペプチド鎖に沿って約50アミノ酸以内、例えば、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、40または50アミノ酸以内にある場合、N末端またはC末端の近傍にあるとみなされる。

【0234】**ガイドRNA**

本明細書で使用する場合、用語「ガイドRNA」およびその文法的等価物は、標的DNAに対して特異的であり得、Casタンパク質と複合体を形成し得るRNAを指し得る。RNA/Cas複合体は、Casタンパク質を標的DNAへと「ガイドする」ことを補助し得る。

20

【0235】

本明細書で開示される方法は、少なくとも1つのガイドRNAまたは核酸、例えば、少なくとも1つのガイドRNAをコードするDNAを、細胞または胚中に導入するステップもまた含み得る。ガイドRNAは、エンドヌクレアーゼを特異的標的部位に指向させるように、RNAガイドされるエンドヌクレアーゼと相互作用し得、この部位において、ガイドRNAの5'末端は、染色体配列中の特異的プロトスペーサー配列と塩基対合する。

【0236】

ガイドRNAは、2つのRNA、例えば、CRISPR RNA（crRNA）およびトランス活性化crRNA（tracrRNA）を含み得る。ガイドRNAは、時折、単鎖RNA、またはcrRNAおよびtracrRNAの一部（例えば、機能的部分）の融合によって形成される単一ガイドRNA（sgRNA）を含み得る。ガイドRNAはまた、crRNAおよびtracrRNAを含むdual RNAであり得る。さらに、crRNAは、標的DNAとハイブリダイズし得る。

30

【0237】

上で議論したように、ガイドRNAは、発現産物であり得る。例えば、ガイドRNAをコードするDNAは、ガイドRNAをコードする配列を含むベクターであり得る。ガイドRNAは、細胞または生物に、単離されたガイドRNA、またはガイドRNAをコードする配列およびプロモーターを含むプラスミドDNAをトランスフェクトすることによって、細胞または生物中に移入され得る。ガイドRNAはまた、例えば、ウイルス媒介性遺伝子送達を使用して、細胞または生物中に他の方法で移入され得る。

40

【0238】

ガイドRNAは、単離され得る。例えば、ガイドRNAは、細胞または生物中に、単離されたRNAの形態でトランスフェクトされ得る。ガイドRNAは、当該分野で公知の任意のin vitro転写系を使用するin vitro転写によって調製され得る。ガイドRNAは、ガイドRNAのコード配列を含むプラスミドの形態ではなく、単離されたRNAの形態で、細胞に移入され得る。

【0239】

ガイドRNAは、3つの領域を含み得る：染色体配列中の標的部位に対して相補的であり得る、5'末端の第1の領域、ステムループ構造を形成し得る第2の内部領域、および

50

一本鎖であり得る第3の3'領域。各ガイドRNAの第1の領域はまた、各ガイドRNAが、融合タンパク質を特異的標的部位にガイドするように、異なり得る。さらに、各ガイドRNAの第2および第3の領域は、全てのガイドRNAにおいて同一であり得る。

【0240】

ガイドRNAの第1の領域は、ガイドRNAの第1の領域が標的部位と塩基対合できるように、染色体配列中の標的部位における配列に対して相補的であり得る。一部の場合には、ガイドRNAの第1の領域は、10ヌクレオチドからまたは約10ヌクレオチドから25ヌクレオチドまで（即ち、10ヌクレオチドから25ヌクレオチドまで；または約10ヌクレオチドから約25ヌクレオチドまで；または10ヌクレオチドから約25ヌクレオチドまで；または約10ヌクレオチドから25ヌクレオチドまで）またはそれ超を含み得る。例えば、ガイドRNAの第1の領域と染色体配列中の標的部位との間で塩基対合する領域は、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、23、24、25もしくはそれを超えるヌクレオチド長であり得る、または約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、23、24、25もしくはそれを超えるヌクレオチド長であり得る。時折、ガイドRNAの第1の領域は、19、20もしくは21ヌクレオチド長であり得る、または約19、20もしくは21のヌクレオチド長であり得る。

10

【0241】

ガイドRNAは、二次構造を形成する第2の領域もまた含み得る。例えば、ガイドRNAによって形成される二次構造は、ステム（またはヘアピン）およびループを含み得る。ループおよびステムの長さは変動し得る。例えば、ループは、3からまたは約3から10ヌクレオチド長までの範囲であり得、ステムは、6からまたは約6から20塩基対長までの範囲であり得る。ステムは、1から10ヌクレオチドまたは約10ヌクレオチドの1つまたは複数のバルジを含み得る。第2の領域の全体的な長さは、16からまたは約16から60ヌクレオチド長までの範囲であり得る。例えば、ループは、4ヌクレオチド長であり得る、または約4ヌクレオチド長であり得、ステムは、12塩基対であり得る、または約12塩基対であり得る。

20

【0242】

ガイドRNAは、本質的に一本鎖であり得る、3'末端における第3の領域もまた含み得る。例えば、第3の領域は、時折、目的の細胞中のいずれの染色体配列に対しても相補的でなく、時折、ガイドRNAの残部に対して相補的でない。さらに、第3の領域の長さは変動し得る。第3の領域は、4ヌクレオチド長よりも長いまたは約4ヌクレオチド長よりも長い可能性がある。例えば、第3の領域の長さは、5からまたは約5から60ヌクレオチド長までの範囲であり得る。

30

【0243】

ガイドRNAは、RNA分子として細胞または胚中に導入され得る。例えば、RNA分子は、*in vitro*で転写され得る、および／または化学合成され得る。RNAは、合成DNA分子、例えば、gBlocks（登録商標）遺伝子断片から転写され得る。次いで、ガイドRNAは、RNA分子として細胞または胚中に導入され得る。ガイドRNAは、非RNA核酸分子、例えば、DNA分子の形態でも、細胞または胚中に導入され得る。例えば、ガイドRNAをコードするDNAは、目的の細胞または胚におけるガイドRNAの発現のためのプロモーター制御配列に作動可能に連結され得る。RNAコード配列は、RNAポリメラーゼIII（Pol III）によって認識されるプロモーター配列に作動可能に連結され得る。ガイドRNAを発現させるために使用され得るプラスミドベクターには、p330ベクターおよびp333ベクターが含まれるがこれらに限定されない。一部の場合には、プラスミドベクター（例えば、p333ベクター）は、2つのガイドRNAコードDNA配列を含み得る。

40

【0244】

ガイドRNAをコードするDNA配列はまた、ベクターの一部であり得る。さらに、ベクターは、さらなる発現制御配列（例えば、エンハンサー配列、Kozak配列、ポリA

50

デニル化配列、転写終結配列など）、選択可能なマーカー配列（例えば、抗生物質耐性遺伝子）、複製起点などを含み得る。ガイドRNAをコードするDNA分子は、線状であってもよい。ガイドRNAをコードするDNA分子は、環状であってもよい。

【0245】

RNAガイドされるエンドヌクレアーゼおよびガイドRNAをコードするDNA配列が細胞中に導入される場合、各DNA配列は、別々の分子の一部であり得る（例えば、RNAガイドされるエンドヌクレアーゼコード配列を含む1つのベクター、およびガイドRNAコード配列を含む第2のベクター）、または両方とも、同じ分子の一部であり得る（例えば、RNAガイドされるエンドヌクレアーゼおよびガイドRNAの両方のコード（および調節）配列を含む1つのベクター）。

10

【0246】

ガイドRNAは、ブタまたはブタ細胞中の遺伝子を標的化し得る。一部の場合には、ガイドRNAは、ブタNLRC5遺伝子、例えば、表4に列挙される配列を標的化し得る。一部の場合には、ガイドRNAは、ブタNLRC5、GGTA1またはCMAH遺伝子を標的化するように設計され得る。ガイドRNAを作製するための例示的なオリゴヌクレオチドは、表5に列挙される。

【表4】

表4.ガイドRNAによって標的化されるNLRC5遺伝子の例示的な配列

配列番号	配列(5'-3')
61	ggggaggaagaacttcacct
62	gtaggacgacctctgtgtg
63	gacctctgtgtgggtctg
64	ggctcggttcattgcaaga
65	gctcggttcattgcaagat
66	ggttcattgcaagatgggc
67	gtccctctgagtgtcgaa
68	gcctcaggtacagatcaaaa
69	ggacctgggtgccaggacg
70	gtaccagagtcagatcacc
71	gtaccagagtcagatcacc
72	gtgcccttcgacactcagga
73	gtgcccttcgacactcagga
74	gtgcccttcgacactcagga
75	gggggccccaaaggcagaaga
76	ggcagtcttcagttacctgg

20

30

【表 5】

表 5. ガイド RNA 構築物を作製するための例示的なオリゴヌクレオチド

遺伝子	配列番号	フォワード配列(5'から 3')	配列番号	リバース配列(5'から 3')
NLRC5	77	acaccggggaggaagaacttcacctg	78	aaaacaggtgaagtcttctctcccg
NLRC5	79	acaccgtaggacgacctctgtgtgg	80	aaaaccacacagagggtctctctacg
NLRC5	81	acaccgacctctgtgtgggtctgtg	82	aaaaccagacccacacagagggtctg
NLRC5	83	acaccggctcgggtccattgcaagag	84	aaaactcttgcaatggaaccgagccg
NLRC5	85	acaccgctcgggtccattgcaagatg	86	aaaacatcttgcaatggaaccgagcg
NLRC5	87	acaccgggtccattgcaagatggcg	88	aaaacgcccattcttgcaatggaaccg
NLRC5	89	acaccgtccctctctgagtgtcgaag	90	aaaacttcgacactcaggagggggacg
NLRC5	91	acaccgctcaggtacagatcaaaag	92	aaaactttgatctgtacctgaggcg
NLRC5	93	acaccggacctgggtgccagggaacgg	94	aaaaccgttctggcaccaggtccg
NLRC5	95	acaccgtaccagagtcagatcacccg	96	aaaacggtgatctgactctgggtacg
NLRC5	97	acaccgtaccagagtcagatcacccg	98	aaaacggtgatctgactctgggtacg
NLRC5	99	acaccgtgcccttcgacactcaggag	100	aaaactctgagtgtcgaagggcacg
NLRC5	101	acaccgtgcccttcgacactcaggag	102	aaaactctgagtgtcgaagggcacg
NLRC5	103	acaccgtgcccttcgacactcaggag	104	aaaactctgagtgtcgaagggcacg
NLRC5	105	acaccgggggcccccaaggcagaagag	106	aaaactcttctgacctggggcccccg
NLRC5	107	acaccggcagttctcagttacctggg	108	aaaacccaggtactggaagactgccg
GGTA1	109	caccgagaaaataatgaatgtcaa	110	aaacttgacattcatttttctc
CMAH	111	caccgagtaagggtacgtgatctgt	112	aaacacagatcacgtaccttactc

【0247】

相同組換え

相同組換えもまた、本明細書で開示される関連する遺伝子改変のいずれかのために使用され得る。相同組換えは、内因性遺伝子における部位特異的改変を可能にし得、したがって、新規改変が、ゲノムにおいて操作され得る。例えば、DNA 分子間で遺伝子配列情報を移行させる相同組換え（遺伝子変換および古典的鎖切断／再結合）の能力は、標的化相同組換えを提供し得、遺伝子操作（genetic engineering）および遺伝子操作（gene manipulation）における強力な方法であり得る。

【0248】

相同組換えを受けた細胞は、いくつかの方法によって同定され得る。例えば、選択方法は、例えば、ヒト抗 gal 抗体によって、細胞に対する免疫応答の非存在を検出できる。選択方法は、細胞または組織に曝露された場合の、ヒト血液中の凝固のレベルを評価することもまた含み得る。抗生物質耐性を介した選択は、スクリーニングのために使用され得る。

【0249】

トランスジェニック非ヒト動物の作製

ランダム挿入

本明細書に記載される方法の 1 つまたは複数の導入遺伝子は、細胞のゲノム中の任意の遺伝子座にランダムに挿入され得る。これらの導入遺伝子は、ゲノムのどこに挿入されても、機能的であり得る。例えば、導入遺伝子は、それ自身のプロモーターをコードし得る、または内因性プロモーターの制御下になる位置に挿入され得る。あるいは、導入遺伝子は、遺伝子、例えば、遺伝子のイントロンもしくは遺伝子のエクソン、プロモーターまたは非コード領域中に挿入され得る。

【0250】

導入遺伝子配列をコードする DNA は、細胞の染色体中にランダムに挿入され得る。ランダム組込みは、当業者に公知の、細胞中に DNA を導入する任意の方法から生じ得る。これには、エレクトロポレーション、超音波処理、遺伝子銃の使用、リポトランスフェクション（lipotransfection）、リン酸カルシウムトランスフェクション、デンドリマーの使用、マイクロインジェクション、アデノウイルス、AAV およびレトロウイルスベクターが含まれるウイルスベクターの使用ならびに／または II 群リボザイ

ムが含まれ得るがこれらに限定されない。

【0251】

導入遺伝子をコードするDNAは、導入遺伝子またはその発現産物の存在が、レポーター遺伝子の活性化を介して検出され得るように、レポーター遺伝子を含むようにも設計され得る。上に開示したものなどの、当該分野で公知の任意のレポーター遺伝子を使用され得る。レポーター遺伝子が活性化された細胞を細胞培養物中で選択することによって、導入遺伝子を含む細胞が選択され得る。

【0252】

導入遺伝子をコードするDNAは、エレクトロポレーションを介して細胞中に導入され得る。DNAはまた、リポフェクション、感染または形質転換を介して、細胞中に導入され得る。エレクトロポレーションおよび／またはリポフェクションは、線維芽細胞をトランスフェクトするために使用され得る。

10

【0253】

導入遺伝子の発現は、発現アッセイ、例えばqPCRによって、またはRNAのレベルを測定することによって、確認され得る。発現レベルは、コピー数もまた示し得る。例えば、発現レベルが極端に高い場合、これは、1よりも多いコピーの導入遺伝子がゲノム中に組み込まれたことを示し得る。あるいは、高い発現は、導入遺伝子が、例えば、高度に発現されるプロモーター近傍の、高度に転写されるエリア中に組み込まれたことを示し得る。発現は、例えば、ウエスタンブロッティングを介して、タンパク質レベルを測定することによっても確認され得る。

20

【0254】

部位特異的挿入

本明細書で開示される方法のいずれかで1つまたは複数の導入遺伝子を挿入することは、部位特異的であり得る。例えば、1つまたは複数の導入遺伝子は、プロモーターに隣接して、例えば、Rosa26プロモーターに隣接してまたはRosa26プロモーターの近傍に、挿入され得る。

【0255】

細胞の標的化遺伝子座の改変は、DNAを細胞中に導入することによって生成され得、DNAは、標的遺伝子座に対する相同性を有する。DNAは、組み込まれた構築物を含む細胞の選択を可能にするマーカー遺伝子を含み得る。標的ベクター中の相同DNAは、標的遺伝子座において染色体DNAと組み換わり得る。マーカー遺伝子には、相同DNA配列、3'組換えアームおよび5'組換えアームが、両方の側で隣接し得る。

30

【0256】

種々の酵素が、宿主ゲノム中への外来DNAの挿入を触媒し得る。例えば、部位特異的リコンビナーゼは、別個の生化学的特性を有する2つのタンパク質ファミリー、即ち、チロシンリコンビナーゼ（DNAがチロシン残基に共有結合される）およびセリンリコンビナーゼ（セリン残基において共有結合が生じる）へとクラスター化され得る。一部の場合には、リコンビナーゼは、Cre、fC31インテグラーゼ（StreptomycesファージfC31に由来するセリンリコンビナーゼ）、またはバクテリオファージ由来の部位特異的リコンビナーゼ（Flp、ラムダインテグラーゼ、バクテリオファージHK022リコンビナーゼ、バクテリオファージR4インテグラーゼおよびファージTP901-1インテグラーゼが含まれる）を含み得る。

40

【0257】

発現制御配列もまた、構築物において使用され得る。例えば、発現制御配列は、広範な種々の細胞型において発現される構成的プロモーターを含み得る。例えば、適切な強力な構成的プロモーターおよび／またはエンハンサーには、DNAウイルス（例えば、SV40、ポリオマウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ポックスウイルス、CMV、HSVなど）由来またはレトロウイルスLTR由来の発現制御配列がある。組織特異的プロモーターもまた使用され得、発現を特定の細胞系譜に指向させるために使用され得る。以下の実施例で議論される実験は、Rosa26遺伝子プロモーターを使用して実

50

施されるが、遺伝子発現を指向させることが可能な他のRosa26関連プロモーターが、当業者に明らかのように、類似の結果を得るために使用され得る。したがって、本明細書の記載は、限定を意味せず、むしろ多くの可能な例のうちの1つを開示する。一部の場合には、同じ程度の発現をそれにもかかわらず達成し得るより短いRosa26 5'上流配列が、使用され得る。Rosa26プロモーターの軽微なDNA配列バリエーション、例えば、点変異、部分的欠失または化学的改変もまた、有用である。

【0258】

Rosa26プロモーターは、哺乳動物において発現可能である。例えば、他の種（例えば、ヒト、ウシ、マウス、ヒツジ、ヤギ、ウサギおよびラット）のRosa26ホモログのプロモーターが含まれるがこれらに限定されない、ブタRosa26遺伝子の5'隣接配列と類似する配列もまた、使用され得る。Rosa26遺伝子は、異なる哺乳動物種間で十分に保存され得、他の哺乳動物Rosa26プロモーターもまた使用され得る。

10

【0259】

CRISPR/Cas系は、部位特異的挿入を実施するために使用され得る。例えば、ゲノム中の挿入部位上のニックが、挿入部位における導入遺伝子の挿入を促進するために、CRISPR/Casによって作製され得る。

【0260】

本明細書に記載される方法は、リン酸カルシウム/DNA共沈殿、核中へのDNAのマイクロインジェクション、エレクトロポレーション、インタクトな細胞との細菌プロトプラスト融合、トランスフェクション、リポフェクション、感染、微粒子銃、精子（sperm）媒介性遺伝子移入、または当業者に公知の任意の他の技術が含まれるがこれらに限定されない、宿主細胞中へのDNAまたはRNA構築物の導入を可能にするために使用され得る技術を利用し得る。

20

【0261】

本明細書で開示されるある特定の態様は、ベクターを利用し得る。任意のプラスミドおよびベクターは、それらが選択された宿主において複製可能かつ生存可能である限り、使用され得る。当該分野で公知のベクターおよび市販のベクター（およびそのバリエーションまたは誘導体）は、方法における使用のために1つまたは複数の組換え部位を含むように操作され得る。使用され得るベクターには、真核生物発現ベクター、例えば、pFastBac、pFastBacHT、pFastBacDUAL、pSFVおよびpTet-Splice（Invitrogen）、pEUK-C1、pPUR、pMAM、pMAMneo、pBI101、pBI121、pDR2、pCMVEBNAおよびpYACneo（Clontech）、pSVK3、pSVL、pMSG、pCH110およびpKK232-8（Pharmacia, Inc.）、p3'SS、pXT1、pSG5、pPbac、pMbac、pMC1neoおよびpOG44（Stratagene, Inc.）、ならびにpYES2、pAC360、pBlueBacHisA、BおよびC、pVL1392、pBlueBac111、pCDM8、pcDNA1、pZeoSV、pcDNA3、pREP4、pCEP4ならびにpEBVHis（Invitrogen, Corp.）、ならびにそれらのバリエーションまたは誘導体が含まれるがこれらに限定されない。

30

40

【0262】

これらのベクターは、遺伝子、例えば、導入遺伝子、または目的の遺伝子の部分を発現させるために使用され得る。部分の遺伝子または遺伝子は、公知の方法、例えば、制限酵素ベースの技術を使用することによって挿入され得る。

【0263】

接合体を使用する遺伝子改変された非ヒト動物の作製

別の遺伝子改変された非ヒト動物由来の核酸を使用して、遺伝子改変された非ヒト動物を作製することは、例えば、接合体操作などによる、当該分野で公知の種々の技術を使用して実施され得る。

【0264】

50

例えば、接合体は、類似の遺伝子改変された非ヒト動物を作製するために使用され得る。類似の遺伝子改変された非ヒト動物を作製する方法は、a) 本明細書で開示される1つもしくは複数の遺伝子の低減された発現および／または外因性ポリヌクレオチドを有する細胞を産生するステップ、b) a) の得られた細胞を使用して胚を生成するステップ；ならびにc) 胚を、遺伝子改変された非ヒト動物へと成長させるステップ、を含む。a) の細胞は、細胞（例えば、遺伝子改変された非ヒト動物中の上記のもの）中の1つまたは複数の遺伝子を破壊する（例えば、発現を低減させる）ことによって産生され得る。

【0265】

この方法は、本明細書で開示される類似の遺伝子改変された非ヒト動物を作製するために使用され得る。例えば、遺伝子改変された非ヒト動物を作製する方法は、以下を含み得る：a) 本明細書で開示される1つまたは複数の遺伝子（例えば、上に開示される）の低減された発現を有する細胞を産生するステップであって、1つまたは複数の遺伝子は、N L R C 5、T A P 1 および／またはC 3を含む、ステップ；b) a) の得られた細胞から胚を生成するステップ；ならびにc) 胚を、遺伝子改変された非ヒト動物へと成長させるステップ。

10

【0266】

この方法で使用される細胞は、本明細書に記載される任意の開示された遺伝子改変された細胞由来であり得る。例えば、破壊される遺伝子は、N R L C 5、T A P 1 および／またはC 3に限定されない。遺伝子破壊および導入遺伝子の他の組合せは、本明細書の開示を通じて見出され得る。さらに、遺伝子改変された細胞は、任意の起源のもの、例えば、非ヒト動物（本明細書に記載される）または遺伝子改変された細胞（本明細書に記載される）由来であり得る。

20

【0267】

本明細書で開示される方法におけるa) の細胞は、接合体（例えば、精子および卵子の結合によって形成される細胞）であり得る。接合体は、i) 野生型非ヒト動物の精子および野生型非ヒト動物の卵子；i i) 野生型非ヒト動物の精子および遺伝子改変された非ヒト動物の卵子；i i i) 遺伝子改変された非ヒト動物の精子および野生型非ヒト動物の卵子；ならびに／またはi v) 遺伝子改変された非ヒト動物の精子および遺伝子改変された非ヒト動物の卵子、の結合によって形成され得る。非ヒト動物は、ブタであり得る。

30

【0268】

本明細書で開示される方法におけるa) の細胞中の1つまたは複数の遺伝子は、ゲノム中の所望の位置において切断を生成することによって破壊され得る。例えば、切断は、二本鎖切断(D S B)であり得る。D S Bは、C a s（例えば、C a s 9）、Z F N、T A L L E N およびメガヌクレアーゼが含まれるヌクレアーゼを使用して生成され得る。ヌクレアーゼは、天然に存在するヌクレアーゼまたは改変されたヌクレアーゼであり得る。ヌクレアーゼをコードする核酸はまた、細胞に送達され得、ここでヌクレアーゼが発現される。

【0269】

D S B後、1つまたは複数の遺伝子は、D N A修復機構、例えば、相同組換え(H R) および／または非相同末端結合(N H E J)によって破壊され得る。

40

【0270】

方法は、a) の細胞のゲノムに1つまたは複数の導入遺伝子を挿入するステップを含み得る。1つまたは複数の導入遺伝子は、I C P 4 7、C D 4 6、C D 5 5、C D 5 9、H L A - E、H L A - G（例えば、H L A - G 1、H L A - G 2、H L A - G 3、H L A - G 4、H L A - G 5、H L A - G 6またはH L A - G 7）、B 2 M、それらの任意の機能的断片、および／またはそれらの任意の組合せを含み得る。

【0271】

本明細書で提供される方法は、1つまたは複数の導入遺伝子を挿入するステップを含み得、1つまたは複数の導入遺伝子は、本明細書で開示される任意の非ヒト動物または遺伝子改変された細胞中の任意の導入遺伝子であり得る。導入遺伝子は、本明細書に記載され

50

るように、ランダム様式または標的化様式で、非ヒト動物または遺伝子改変された細胞のゲノム中に挿入され得る。

【0272】

導入遺伝子はまた、本明細書で開示されるように、非ヒト動物または遺伝子改変された細胞のゲノム中の特定の遺伝子座にも挿入され得る。例えば、導入遺伝子は、プロモーターに隣接して挿入され得る。導入遺伝子は、プロモーターから少なくともまたは少なくとも約1、10、50、100、500または1000塩基対であり得る、プロモーター近傍に挿入され得る。一部の場合には、異なる染色体中に挿入される遺伝子は、プロモーターによってなおも制御され得る。導入遺伝子はまた、プロモーターから、センス鎖の3'領域（例えば、プロモーターの下流）において挿入され得る。あるいは、導入遺伝子は、プロモーターから、センス鎖の5'領域（例えば、プロモーターの上流）において挿入され得る。導入遺伝子は、ブタプロモーターに隣接して挿入され得る。例えば、導入遺伝子は、ブタRos26プロモーターに隣接して挿入され得る。

10

【0273】

本明細書で使用され得るプロモーターは、本出願を通じて記載されている。例えば、方法で使用され得るプロモーターは、遍在性、組織特異的または誘導性プロモーターであり得る。プロモーターに隣接して挿入される導入遺伝子の発現は、調節され得る。例えば、導入遺伝子が、遍在性プロモーターの近傍またはその隣に挿入される場合、導入遺伝子は、非ヒト動物の全ての細胞において発現される。一部の遍在性プロモーターは、CAGGSプロモーター、hCMVプロモーター、PGKプロモーター、SV40プロモーターまたはRos26プロモーターであり得る。

20

【0274】

プロモーターは、ヒトまたは非ヒト動物、例えば、ブタ、ヒト、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、マウスまたはラットのゲノム内に存在するプロモーター配列に対して相同であり得る。プロモーターは、ヒトまたは非ヒト動物のゲノム内に存在するプロモーター配列に対して少なくともまたは少なくとも約50%、60%、70%、80、90%、95%、96%、97%、98%または99%の相同性を示し得る。プロモーターは、ヒトまたは非ヒト動物のゲノム内に存在するプロモーター配列に対して100%の相同性を示し得る。プロモーターはまた、ヒトまたは非ヒト動物のゲノム内に存在するプロモーター配列に対して少なくともまたは少なくとも約50%、60%、70%、80、90%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を示し得る。プロモーターはまた、ヒトまたは非ヒト動物のゲノム内に存在するプロモーター配列に対して100%の同一性を示し得る。

30

【0275】

細胞核移入を使用する類似の遺伝子改変された非ヒト動物の作製

遺伝子改変された非ヒト動物を作製する代替方法は、細胞核移入によるものであり得る。遺伝子改変された非ヒト動物を作製する方法は、a) 本明細書で開示される1つもしくは複数の遺伝子の低減された発現および／または外因性ポリヌクレオチドを有する細胞を産生するステップ；b) 第2の細胞を提供し、a) から得られた細胞の核を第2の細胞に移入して、胚を生成するステップ；c) 胚を、遺伝子改変された非ヒト動物へと成長させるステップを含み得る。この方法における細胞は、除核細胞であり得る。a) の細胞は、本明細書に記載されるまたは当該分野で公知の任意の方法、例えば、遺伝子破壊および／または挿入を使用して作製され得る。

40

【0276】

この方法は、本明細書で開示される類似の遺伝子改変された非ヒト動物を作製するために使用され得る。例えば、遺伝子改変された非ヒト動物を作製する方法は、a) NLR5、TAP1および／またはC3の低減された発現を有する細胞を産生するステップ；b) 第2の細胞を提供し、a) から得られた細胞の核を第2の細胞に移入して、胚を生成するステップ；ならびにc) 胚を、遺伝子改変された非ヒト動物へと成長させるステップを含み得る。この方法における細胞は、除核細胞であり得る。

50

【0277】

この方法で使用される細胞は、本明細書に記載される任意の開示された遺伝子改変された細胞由来であり得る。例えば、破壊される遺伝子は、NRLC5、TAP1および／またはC3に限定されない。遺伝子破壊および導入遺伝子の他の組合せは、本明細書の開示を通じて見出され得る。例えば、方法は、本明細書で開示される任意の非ヒト動物由来の第1の細胞を提供するステップ；第2の細胞を提供するステップ；a)の第1の細胞の核をb)の第2の細胞に移入するステップ；c)の産物から胚を生成するステップ；および胚を、遺伝子改変された非ヒト動物へと成長させるステップを含み得る。

【0278】

本明細書で開示される方法におけるa)の細胞は、接合体であり得る。接合体は、i)野生型非ヒト動物の精子および野生型非ヒト動物の卵子；ii)野生型非ヒト動物の精子および遺伝子改変された非ヒト動物の卵子；iii)遺伝子改変された非ヒト動物の精子および野生型非ヒト動物の卵子；ならびに／またはiv)遺伝子改変された非ヒト動物の精子および遺伝子改変された非ヒト動物の卵子、の結合によって形成され得る。非ヒト動物は、ブタであり得る。

【0279】

本明細書で開示される方法におけるa)の細胞中の1つまたは複数の遺伝子は、ゲノム中の所望の位置において切断を生成することによって破壊され得る。例えば、切断は、二本鎖切断(DSB)であり得る。DSBは、Cas(例えば、Cas9)、ZFN、TALENおよびメガヌクレアーゼが含まれるヌクレアーゼを使用して生成され得る。ヌクレアーゼは、天然に存在するヌクレアーゼまたは改変されたヌクレアーゼであり得る。ヌクレアーゼをコードする核酸は、細胞に送達され得、ここでヌクレアーゼが発現される。Cas9および細胞中の遺伝子を標的化するガイドRNAは、細胞に送達され得る。一部の場合には、Cas9およびガイドRNAをコードするmRNA分子は、細胞中に注射され得る。一部の場合には、Cas9をコードするプラスミドおよびガイドRNAをコードする異なるプラスミドが、(例えば、感染によって)細胞中に送達され得る。一部の場合には、Cas9およびガイドRNAの両方をコードするプラスミドが、(例えば、感染によって)細胞中に送達され得る。

【0280】

上記のように、DSB後、1つまたは複数の遺伝子は、DNA修復機構、例えば、相同組換え(HR)および／または非相同末端結合(NHEJ)によって破壊され得る。方法は、a)の細胞のゲノムに1つまたは複数の導入遺伝子を挿入するステップを含み得る。1つまたは複数の導入遺伝子は、ICP47、CD46、CD55、CD59、HLA-E、HLA-G(例えば、HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6またはHLA-G7)、B2M、それらの任意の機能的断片、および／またはそれらの任意の組合せを含み得る。

【0281】

本明細書で提供される方法は、1つまたは複数の導入遺伝子を挿入するステップを含み得、1つまたは複数の導入遺伝子は、本明細書で開示される任意の非ヒト動物または遺伝子改変された細胞中の任意の導入遺伝子であり得る。

【0282】

遺伝子改変された非ヒト動物由来の細胞を使用して非ヒト動物を作製する方法もまた、本明細書で開示される。細胞は、本明細書で開示される任意の遺伝子改変された非ヒト動物由来であり得る。方法は以下を含み得る：a)遺伝的に同一の非ヒト動物由来の細胞を提供するステップ；b)細胞を提供するステップ；c)a)の細胞の核をb)の細胞に移入するステップ；c)c)の産物から胚を生成するステップ；およびd)胚を、遺伝子改変された非ヒト動物へと成長させるステップ。この方法の細胞は、除核細胞であり得る。

【0283】

さらに、方法におけるa)の細胞は、遺伝子改変された非ヒト動物由来の任意の細胞であり得る。例えば、本明細書で開示される方法におけるa)の細胞は、体細胞、例えば、

10

20

30

40

50

線維芽細胞または胎仔線維芽細胞であり得る。

【0284】

方法における除核細胞は、生物由来の任意の細胞であり得る。例えば、除核細胞は、ブタ細胞である。除核細胞は、卵子、例えば、除核未受精卵子であり得る。

【0285】

本明細書で開示される遺伝子改変された非ヒト動物は、当該分野で公知の任意の適切な技術を使用して作製され得る。例えば、これらの技術には、マイクロインジェクション（例えば、前核の）、精子媒介性遺伝子移入、卵子もしくは接合体のエレクトロポレーション、および／または核移植が含まれるがこれらに限定されない。

【0286】

類似の遺伝子改変された非ヒト動物を作製する方法は、a) 細胞中の1つまたは複数の遺伝子を破壊するステップ、b) a) の得られた細胞を使用して胚を生成するステップ；およびc) 胚を、遺伝子改変された非ヒト動物へと成長させるステップ、を含み得る。

【0287】

本明細書で開示される方法におけるa) の細胞は、体細胞であり得る。体細胞の型または供給源に制限はない。例えば、この細胞は、ブタ由来または培養細胞株もしくは任意の他の生存可能な細胞由来であり得る。細胞はまた、真皮細胞、神経細胞、卵丘細胞、卵管上皮細胞、線維芽細胞（例えば、胎仔線維芽細胞）または肝細胞であり得る。本明細書で開示される方法におけるa) の細胞は、野生型非ヒト動物、遺伝子改変された非ヒト動物または遺伝子改変された細胞由来であり得る。さらに、b) の細胞は、除核卵子（例えば、除核未受精卵子）であり得る。

【0288】

除核もまた、公知の方法によって実施され得る。例えば、第二分裂中期の卵母細胞は、即時の除核のために、任意選択で、1ミリリットル当たり7～10マイクログラムのサイトカラシンBを含むまたは1ミリリットル当たり約7～10マイクログラムのサイトカラシンBを含むいずれかのHECM中に配置され得、または適切な培地（例えば、胚培養培地、例えば、CR1a plus 10%発情期雌ウシ血清）中に配置され得、次いで、後に除核され得る（例えば、24時間以下後、または16～18時間後）。除核はまた、極体および隣接する原形質を除去するためにマイクロピペットを使用して顕微手的に達成され得る。次いで、卵母細胞は、そのうちのどれが首尾よく除核されたかを同定するためにスクリーニングされ得る。卵母細胞をスクリーニングするための1つの方法は、適切な維持培地中で1ミリリットル当たり3～10マイクログラムの33342 Hoechst色素または1ミリリットル当たり約3～10マイクログラムの33342 Hoechst色素で卵母細胞を染色し、次いで、10秒未満にわたる紫外線照射下で卵母細胞を見ることであり得る。次いで、首尾よく除核された卵母細胞は、適切な培養培地、例えば、CR1a plus 10%血清中に配置され得る。卵母細胞の取り扱いもまた、核移入のために最適化され得る。

【0289】

本明細書で生成された胚は、子孫（例えば、子ブタ）を生成するために、代理非ヒト動物（例えば、ブタ）に移入され得る。例えば、胚は、発情の当日または発情の1日後、例えば、全身麻酔下での正中線開腹術の後に、レシピエント未経産ブタの卵管に移入され得る。妊娠は、例えば、超音波によって診断され得る。妊娠は、移入から28日後または約28日後に診断され得る。次いで、妊娠は、超音波試験によって、2週間間隔または約2週間間隔でチェックされ得る。マイクロインジェクションされた子孫（例えば、子ブタ）の全てが、自然分娩によって分娩され得る。妊娠および分娩の情報（例えば、妊娠の時間、妊娠の割合、子孫の数、生存率など）が報告され得る。子孫の遺伝子型および表現型は、本出願を通じて記載される任意の方法、例えば、シーケンシング（例えば、次世代シーケンシング）を使用して測定され得る。

【0290】

培養細胞は、核移入（例えば、体細胞核移入）、胚移入および／または妊娠の誘導のた

10

20

30

40

50

めに即座に使用され得、健康で安定な遺伝子改変に由来する胚が子孫（例えば、子ブタ）を生じさせるのを可能にする。かかるアプローチは、時間およびコストを低減させ得、例えば、遺伝子改変された細胞を生じ得る費用のかかる数ヵ月の細胞スクリーニングは、健康な子ブタを生成することができない。

【0291】

胚の成長および移入は、胚の成長および移入の産業において使用される標準的な手順を使用して実施され得る。例えば、代理母が使用され得る。胚はまた、例えば、インキュベーターを使用することによって、培養物中で成長および移入され得る。一部の場合には、胚は、妊娠を樹立するために、動物、例えば、代理動物に移入され得る。

【0292】

本明細書で開示される同一の遺伝子型および／または表現型を有する複数の遺伝子改変された非ヒト動物を複製または生成することが望まれ得る。例えば、遺伝子改変された非ヒト動物は、繁殖（例えば、選択的繁殖）によって複製され得る。遺伝子改変された非ヒト動物は、核移入（例えば、体細胞核移入）、または細胞（例えば、卵母細胞、精子、接合体または胚性幹細胞）中へのDNAの導入によって、複製され得る。これらの方法は、本明細書で開示される複数の遺伝子改変された非ヒト動物を複製または生成するために、複数回再現され得る。一部の場合には、細胞は、妊娠中の遺伝子改変された非ヒト動物の胎仔から単離され得る。単離された細胞（例えば、胎仔細胞）は、妊娠中の動物と類似または同一の複数の遺伝子改変された非ヒト動物を生成するために使用され得る。例えば、単離された胎仔細胞は、核移入（例えば、体細胞核移入）によって遺伝子改変された動物を生成するためのドナー核を提供し得る。

【0293】

V. 使用方法

細胞、臓器、および／または組織は、本明細書に記載されるような非ヒト動物から抽出され得る。細胞、臓器、および／または組織は *ex vivo* で遺伝子的に変更されて、適宜使用されてもよい。これらの細胞、臓器、および／または組織は、細胞ベースの治療に使用されてもよい。これらの細胞、臓器、および／または組織を使用して、レシピエント（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）における疾患を処置または予防してもよい。驚くべきことに、本明細書において記載されるような遺伝子改変は拒絶の防止を補助し得る。さらに、細胞、臓器、および／または組織を、寛容化ワクチンに作製して、また移植術に対して免疫系を寛容化することを補助してもよい。さらに、寛容化ワクチンは、自己免疫応答を抑止することを含め、免疫系を抑え得る。

【0294】

本明細書に開示されるのは、それを必要とする対象において疾患を処置するための方法であり、この方法は、寛容化ワクチンを対象に投与すること；T細胞活性化を阻害する医薬品を対象に投与すること；および遺伝子改変された細胞を対象に移植するステップを含み得る。T細胞活性化を阻害する医薬品は、抗体であってもよい。抗体は、本明細書に開示される抗CD40抗体であってもよい。対象に移植された細胞は、本出願全体にわたって記載される任意の遺伝子改変された細胞であってもよい。対象に移植された組織または臓器は、遺伝子改変された細胞の1つまたは複数を含んでもよい。いくつかの場合には、方法は、本出願に記載される1つまたは複数の免疫抑制剤を投与するステップをさらに含み得、例えば、これはさらに、レシピエントに、B細胞枯渇化抗体、mTOR阻害剤、TNFアルファ阻害剤、IL-6阻害剤、ナイトロジェンマスタードアルキル化剤（例えば、シクロホスファミド）、および補体C3またはC5阻害剤のうちの1つまたは複数を提供することを含む。

【0295】

また本明細書に開示されるのは、疾患を処置するための方法であって、1つまたは複数の細胞を、それを必要とする対象に移植するステップを含む方法である。1つまたは複数の細胞は、本明細書に開示される任意の遺伝子改変された細胞であってもよい。いくつかの場合には、方法は、1つまたは複数の細胞（例えば、遺伝子改変された細胞）を含む組

織または臓器を、それを必要とする対象に移植するステップを含み得る。

【0296】

本明細書に記載されるのは、レシピエント（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）における疾患を処置または予防する方法であって、レシピエント（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）に、低減された発現を有する1つまたは複数の遺伝子を含む遺伝子改変された非ヒト動物由来の1つまたは複数の細胞（臓器および／または組織を含む）を移植するステップを含む方法である。1つまたは複数の細胞は、全体を通じて記載される遺伝子改変された非ヒト動物由来であってもよい。

【0297】

本明細書に開示される方法は、限定するものではないが、糖尿病、心血管系疾患、肺疾患、肝疾患、皮膚疾患、または神経学的障害を含む疾患を処置または予防するために使用され得る。例えば、方法は、パーキンソン病またはアルツハイマー病を処置または予防するために使用されてもよい。方法はまた、1型、2型、嚢胞性線維症関連、外科的糖尿病、妊娠糖尿病、ミトコンドリア糖尿病、またはそれらの組合せを含む糖尿病を処置または予防するためにも使用されてもよい。いくつかの場合には、方法は、遺伝性糖尿病またはある形態の遺伝性糖尿病を処置または予防するために使用されてもよい。さらに、方法は、1型糖尿病を処置または予防するために使用されてもよい。方法はまた、2型糖尿病を処置または予防するために使用されてもよい。この方法は、前糖尿病を処置または予防するために使用されてもよい。

【0298】

例えば、糖尿病を処置する場合、遺伝子改変された脾細胞を、ECDIで固定して、レシピエントに与えてもよい。さらに、遺伝子改変された膵島細胞を、同じレシピエントにグラフト移植して、インスリンを生成してもよい。遺伝子改変された脾細胞および膵島細胞は遺伝子的に同一であってもよく、また同じ遺伝子改変された非ヒト動物由来であってもよい。

【0299】

本明細書に提供されるものとしては、i) 対象における状態を処置するためにそれを必要とする対象に対する投与における使用のための遺伝子改変された細胞、組織もしくは臓器；ii) グラフトに対して対象を免疫寛容化するのにおける使用のための寛容化ワクチンであって、遺伝子改変された細胞、組織、もしくは臓器を含む寛容化ワクチン；iii) 対象において、T細胞活性化、B細胞活性化、樹状細胞活性化、もしくはそれらの組合せを阻害するのにおける使用のための1つまたは複数の医薬品；または、iv) それらの任意の組合せが挙げられる。

【0300】

また本明細書に提供されるものとしては、対象における状態を処置するためにそれを必要とする対象に対する投与における使用のための遺伝子改変された細胞、組織または臓器も挙げられる。対象は、寛容化ワクチンの使用による遺伝子改変された細胞、組織、または臓器に対して寛容化されたか、または寛容化されてもよい。さらに、対象は、T細胞活性化、B細胞活性化、樹状細胞活性化、またはそれらの組合せを阻害する1つまたは複数の医薬品を投与されてもよい。

【0301】

移植術

本明細書に開示される方法は、移植を含んでもよい。移植は、自己移植、同種移植、異種移植または任意の他の移植であってもよい。例えば、移植は、異種移植であってもよい。移植はまた、同種移植であってもよい。

【0302】

「異種移植術」およびその文法上の等価物は、本明細書において使用する場合、レシピエントおよびドナーが異なる種である、レシピエントへの細胞、組織、または臓器の移植術、植え込みまたは注入を含む任意の手順を包含し得る。本明細書に記載される細胞、臓器、および／または組織の移植術は、ヒトへの異種移植術に使用されてもよい。異種移植

10

20

30

40

50

術としては限定するものではないが、血管柄付き異種移植 (vascularized allotransplant)、部分的血管柄付き異種移植 (partially vascularized allotransplant)、血管柄付きでない異種移植 (unvascularized allotransplant)、異種ドレッシング (xenodressing)、異種バンテージ (xenobandage)、および異種構造 (xenost structure) が挙げられる。

【0303】

「同種移植術」およびその文法上の等価物は、本明細書において使用する場合、レシピエントおよびドナーが同じ種である、レシピエントへの細胞、組織、または臓器の移植術、植え込みまたは注入を含む任意の手順を包含し得る。本明細書に記載される細胞、臓器、および／または組織の移植術は、ヒトへの同種移植術のために使用してもよい。同種移植術としては限定するものではないが、血管柄付き同種移植、部分的血管柄付き同種移植、血管柄付きでない同種移植、同種ドレッシング (allodressing)、同種バンテージ (allobandage)、および同種構造 (allostructure) が挙げられる。

10

【0304】

処置（例えば、本明細書で開示されるような任意の処置）の後、移植拒絶は、1つまたは複数の野生型細胞がレシピエントに移植された場合と比較して改善され得る。例えば、移植拒絶は、超急性拒絶である場合がある。移植拒絶はまた、急性拒絶である場合がある。他の種の拒絶は、慢性拒絶を含む場合がある。移植拒絶はまた、細胞媒介性拒絶である場合も、またはT細胞媒介性拒絶である場合もある。移植拒絶はまた、ナチュラルキラー細胞媒介性拒絶である場合がある。

20

【0305】

「改善すること」およびその文法上の等価物は、本明細書において使用する場合、当業者によって認識される任意の改善を意味し得る。例えば、移植術の改善とは、望ましくない効果または症状の低下、軽減または低減を包含し得る、超急性拒絶の軽減を意味し得る。

【0306】

本開示は、糖尿病または前糖尿病を処置または予防する方法を記載する。例えば、この方法は、限定するものではないが、レシピエントにまたはそれを必要とするレシピエントに、本明細書に記載されるドナー非ヒト動物由来の1つまたは複数の膵島細胞を投与するステップを含み得る。方法は、移植術であっても、またはいくつかの場合には異種移植術であってもよい。ドナー動物は、非ヒト動物であってもよい。レシピエントは、霊長類、例えば、非ヒト霊長類、例としては、限定するものではないが、サルであってもよい。レシピエントは、ヒトであっても、いくつかの場合には、糖尿病または前糖尿病を有するヒトであってもよい。いくつかの場合には、糖尿病または前糖尿病を有する患者を、移植術で処置し得るか否かは、例えば、その全体が参照によって本明細書に援用される Diabetes Care、2015年；38巻：1016～1029頁に記載のようなアルゴリズムを使用して決定され得る。

30

【0307】

方法はまた、本明細書に提供されるトランスジェニック細胞、組織および／または臓器、例えば、膵臓の組織または細胞が、霊長類、例えば、ヒトに移植されて、移植後に、その霊長類が、免疫抑制療法をそれほどまたは全く必要としない、異種移植術の方法を含み得る。免疫抑制療法が少ないかまたは全くないとしては、限定するものではないが、他の方法によって必要とされるものと比較して免疫抑制薬／剤の用量の低下（またはその完全な排除）；他の方法によって必要とされるものと比較して免疫抑制薬／剤の種類の数の減少（またはその完全な排除）；他の方法によって必要とされるものと比較した免疫抑制処置の期間の低下（またはその完全な排除）；および／または他の方法によって必要とされるものと比較した維持免疫抑制における低下（またはその完全な排除）が挙げられる。

40

【0308】

50

本明細書に開示される方法は、レシピエント（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）における疾患を処置または予防するために使用してもよい。レシピエントは、任意の非ヒト動物であっても、またはヒトであってもよい。例えば、レシピエントは、哺乳動物であってもよい。レシピエントの他の例としては、限定するものではないが、霊長類、例えば、サル、チンパンジー、バンブー（bamboo）、またはヒトが挙げられる。レシピエントがヒトである場合、レシピエントは、それを必要とするヒトであり得る。本明細書に記載される方法はまた、非霊長類、非ヒトレシピエントに使用されてもよく、例えば、レシピエントは、愛玩動物、例としては、限定するものではないが、イヌ、ネコ、ウマ、オオカミ、ウサギ、フェレット、アレチネズミ、ハムスター、チンチラ、ファンシーラット（fancy rat）、モルモット、カナリア、インコ、またはオウムであってもよい。レシピエントが愛玩動物である場合、愛玩動物は、それを必要とする愛玩動物であってもよい。例えば、レシピエントは、それを必要とするイヌであっても、またはそれを必要とするネコであってもよい。

10

【0309】

移植は、当該分野で公知の任意の移植によってもよい。グラフトは、レシピエントにおける種々の部位に移植されてもよい。部位としては、限定するものではないが、肝臓被膜下腔、脾臓被膜下腔、腎臓被膜下腔、網、胃もしくは小腸の粘膜下組織、小腸の血管部分、静脈囊（venous sac）、精巣、脳、脾臓または角膜が挙げられる。例えば、移植は、被膜下移植であってもよい。移植はまた、筋肉内移植術であってもよい。移植は、門脈内移植術であってもよい。

20

【0310】

移植は、ヒトまたは非ヒト動物由来の1つまたは複数の細胞、組織、および／または臓器であってもよい。例えば、上記組織および／もしくは臓器は、脳、心臓、肺、眼、胃、脾臓、腎臓、肝臓、腸、子宮、膀胱、皮膚、毛髪、爪、耳、腺、鼻、口、唇、脾臓、歯茎、歯、舌、唾液腺、扁桃腺、咽頭、食道、大腸、小腸、直腸、肛門、甲状腺、胸腺、骨、軟骨、腱、靱帯、腎上腺、骨格筋、平滑筋、血管、血液、脊髄、気管、尿管、尿道、視床下部、下垂体、幽門、副腎、卵巣、卵管、子宮、膣、乳腺、精巣、精囊、陰茎、リンパ、リンパ節またはリンパ管由来であってもよく、または上記1つもしくは複数の細胞は、上記のものに由来してもよい。1つまたは複数の細胞はまた、脳、心臓、肝臓、皮膚、腸、肺、腎臓、眼、小腸、または脾臓由来であってもよい。1つまたは複数の細胞は、脾臓、腎臓、眼、肝臓、小腸、肺、または心臓由来である。1つまたは複数の細胞は、脾臓由来であってもよい。1つまたは複数の細胞は、脾臓細胞、例えば、脾臓のβ細胞であってもよい。さらに、1つまたは複数の細胞は、脾臓細胞であっても、および／または細胞クラスターなど、例としては、限定するものではないが、脾臓のα細胞、脾臓のβ細胞、脾臓のδ細胞、脾臓のF細胞（例えば、PP細胞）、または脾臓のε細胞であってもよい。ある場合には、1つまたは複数の細胞は、脾臓のα細胞であってもよい。別の場合には、1つまたは複数の細胞は、脾臓のβ細胞であってもよい。

30

【0311】

上記で考察されるとおり、遺伝子改変された非ヒト動物を、異種グラフト（例えば、細胞、組織および／または臓器）の提供に使用してもよい。単に例示の目的のために、遺伝子改変された非ヒト動物、例えば、ブタを、脾臓の組織、例としては、限定するものではないが、脾臓および／または脾臓細胞のドナーとして使用してもよい。このような組織由来の脾臓の組織または細胞は、脾臓細胞、または脾臓、または脾臓細胞クラスターを含んでもよい。例えば、細胞は、移植され得る脾臓であってもよい。さらに具体的には、細胞は、脾臓のβ細胞であってもよい。細胞はまた、インスリン産生性であってもよい。あるいは、細胞は、脾臓様細胞であってもよい。脾臓細胞クラスターは、α、β、δ、PPまたはε細胞のうちの任意の1つまたは複数を含んでもよい。適切には、本明細書の方法および組成物によって処置されるべき疾患は糖尿病であってもよい。適切には、移植可能なグラフトは、脾臓であっても、および／または脾臓由来の細胞であってもよい。適切には、トランスジェニック動物に対する改変は、脾臓または脾臓由来の細胞に対してのもので

40

50

ある。適切には、膵島または膵島由来の細胞は、ブタのものである。いくつかの場合には、膵島由来の細胞は、膵臓のβ細胞であるか、またはそれを含む。

【0312】

ドナーの非ヒト動物は、限定するものではないが、胎仔、新生仔、若年および成体を含む任意の発生段階であってもよい。例えば、ドナー細胞膵島細胞は、成体非ヒト動物から単離されてもよい。ドナー細胞、例えば、膵島細胞はまた、胎仔または新生仔の非ヒト動物から単離されてもよい。ドナー非ヒト動物は、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1歳未満であってもよい。例えば、膵島細胞は、6歳未満の非ヒト動物から単離されてもよい。膵島細胞はまた、3歳未満の非ヒト動物から単離されてもよい。ドナーは、非ヒト動物であってもよく、0からもしくはは約0から（胎仔を含む）2歳；2からもしくはは約2から4歳；4からしくは約4から6歳；6からしくは約6から8歳；または8からしくは約8から10歳までのいずれかの年齢であってもよい。非ヒト動物は、10歳超または約10歳超であってもよい。ドナー細胞は、同様にヒトに由来してもよい。

10

【0313】

膵島細胞は、種々の年齢の非ヒト動物から単離されてもよい。例えば、膵島細胞は、新生仔からまたはほぼ新生仔から2歳までの非ヒト動物から単離されてもよい。膵島細胞はまた、胎仔からまたはほぼ胎仔から2歳までの非ヒト動物から単離されてもよい。膵島細胞は、6ヵ月齢からまたは約6ヵ月齢から2歳までの非ヒト動物から単離されてもよい。膵島細胞はまた、7ヵ月齢からまたは約7ヵ月齢から1歳までの非ヒト動物から単離されてもよい。膵島細胞は、2歳からまたは約2歳から3歳までの非ヒト動物から単離されてもよい。いくつかの場合には、非ヒト動物は、0歳未満（例えば、胎仔または胚）であってもよい。いくつかの場合には、新生仔の膵島は、成体膵島よりも元気でかつ単離後に一貫性がある場合があり、酸化的ストレスにさらに耐性である場合があり、有意な増殖能を示し得（おそらく、発生期の膵島幹細胞小集団由来）、その結果、その膵島は、移植部位に移植および生着後に増殖する能力を有し得る。

20

【0314】

糖尿病を処置することに関して、新生仔の膵島は、有意なレベルのインスリンを生じるのに十分成熟するまで最大4～6週間または最大約4～6週間かかる場合があるという不利な点があり得るが、これは、新生仔の膵島の成熟に十分な期間にわたって外因性のインスリンでの処置によって克服できる。異種グラフト移植術では、新生仔の膵島の生存および機能的な生着は、任意のレシピエントの内因性cペプチドから容易に識別されるドナー特異的なcペプチドレベルを測定することによって決定され得る。

30

【0315】

上記で考察されるとおり、成体細胞は単離され得る。例えば、成体非ヒト動物膵島、例えば、成体ブタ細胞は、単離されてもよい。次いで、膵島は、混入する外分泌組織の調製物を枯渇するために、移植術前に1～3日間または約1～3日間培養してもよい。処置の前に、膵島をカウントしてもよく、生存度を、二重蛍光カルセインAMおよびヨウ化プロピジウム染色によって評価してもよい。膵島細胞の生存度>75%を使用してもよい。しかし、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%超または約40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%超の細胞生存度を使用してもよい。例えば、40%からしくは約40%から50%；50%からしくは約50%から60%；60%からしくは約60%から70%；70%からしくは約70%から80%；80%からしくは約80%から90%；90%からしくは約90%から95%、または90%からしくは約90%から100%までの生存度を示す細胞を使用してもよい。さらに、純度は、全組織あたり80%超または約80%超の膵島であってもよい。純度はまた、全組織あたり、少なくともまたは少なくとも約40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の膵島であってもよい。例えば、純度は、40%からまたは約40%から50%；50%からまたは約50%から60%；60%からまたは約60%から70%；70%からまたは約70%から80%；80%からまたは約80%から90%；90%からまたは約90%から100%；90%からまたは

40

50

約90%から95%、または95%からまたは約95%から100%までであってもよい。

【0316】

動的な洗い流し(perfusion)および生存度を含む膵島の機能的な特性は、処置前にin vitroで決定され得る(Balamurugan、2006年)。例えば、非ヒト動物膵島細胞、例えば、トランスジェニックのブタ膵島細胞は、それらがグラフト移植に適切であるように、それらを拡大増殖、成熟および／または精製するためにin vitroで培養してもよい。

【0317】

膵島細胞はまた、刻んだ膵臓の標準的なコラゲナーゼ消化によって単離してもよい。例えば、無菌技術を使用して、腺を、組織解離性の酵素(膵臓の迅速な解離およびランゲルハンスの健康、インタクトかつ機能的な膵島の最大回収のために処方された精製された酵素の混合物、ここでこれらの酵素の標的基質は、完全には特定されないが、膵臓腺房組織の細胞間マトリクスを含む、コラーゲンおよび非コラーゲタンパク質であると仮定される)(1.5mg/ml)を用いて膨張させて、過剰の脂肪、血管および結合組織を取り除いて、刻んで、120rpmで、15分間振盪水浴中で、37℃で消化することができる。消化は、消化の間の細胞損傷を回避するために組織解離性の酵素と混合されたリグノカインを使用して達成してもよい。消化の後、細胞は、無菌のビーカー中に、無菌の50mm~1000mmのメッシュ、例えば、100mm、200mm、300mm、400mm、500mm、600mm、700mm、800mm、900mm、または1000mmのメッシュを通過させてもよい。さらに、第2の消化プロセスを、任意の未消化組織に使用してもよい。

【0318】

膵島は、成体ブタ膵臓から単離してもよい(Brandhorstら、1999年)。膵臓は、適切な供給源のブタから回収し、膵臓周囲の組織を除去し、膵臓を、脾臓の葉に、および十二指腸／接続葉(connecting lobe)で分けて、各々の葉の管にカニユーレ挿入し、その葉を組織解離性の酵素で膨張させる。膵臓の葉は、リコルディ・チャンバ(Ricordi chamber)に入れ、温度を28~32℃まで漸増し、膵臓の葉を、酵素活性および機械的な力によって解離する。解放された膵島を、腺房および管状組織から、連続密度勾配を使用して分離する。精製された膵島を、2~7日間または約2~7日間培養し、特徴付けに供し、全ての仕様を満たす膵島生成物を、移植術にリリースする(Korbuttら、2009年)。

【0319】

ドナーの細胞、臓器、および／または組織は、移植術の前、後、および／または間に機能的であり得る。例えば、移植された細胞、臓器、および／または組織は、移植術後、少なくともまたは少なくとも約1、5、10、20、30日の間、機能的であり得る。移植された細胞、臓器、および／または組織は、移植術後、少なくともまたは少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12ヵ月の間、機能的であり得る。移植された細胞、臓器、および／または組織は、移植術後、少なくともまたは少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25または30年の間、機能的であり得る。いくつかの場合には、移植された細胞、臓器、および／または組織は、レシピエントの寿命まで機能的であり得る。これによって移植術が成功したことが示され得る。これによって、また、移植された細胞、組織、および／または臓器の拒絶がないことも示され得る。

【0320】

さらに、移植された細胞、臓器、および／または組織は、その正常な意図される作用(operation)の100%で機能し得る。移植された細胞、臓器、および／または組織はまた、その正常な意図される作用の少なくともまたは少なくとも約50、60、65、70、75、80、85、90、95、99もしくは100%で、例えば、50からまたは約50から60；60からまたは約60から70；70からまたは約70から80

；80からまたは約80から90；90からまたは約90から100%までで機能し得る。特定の場合には、移植された細胞、臓器、および／または組織は、その正常な意図される作用のうち100%超で機能し得る（American Medical Associationによって決定される、移植されていない正常な機能性の細胞、臓器または組織と比較した場合）。例えば、移植された細胞、臓器、および／または組織は、その正常な意図される作用の110、120、130、140、150、175、200%もしくはそれ超で、または約110、120、130、140、150、175、200%もしくはそれ超で、例えば、100からまたは約100から125；125からまたは約125から150；150からまたは約150から175；175からまたは約175から200%までで機能し得る。

10

【0321】

ある特定の場合には、移植された細胞は、少なくともまたは少なくとも約1日間機能し得る。移植された細胞は、少なくともまたは少なくとも約7日間、機能し得る。移植された細胞は、少なくともまたは少なくとも約14日間、機能し得る。移植された細胞は、少なくともまたは少なくとも約21日間、機能し得る。移植された細胞は、少なくともまたは少なくとも約28日間、機能し得る。移植された細胞は、少なくともまたは少なくとも約60日間、機能し得る。

【0322】

首尾よい移植術の別の指標は、レシピエントが免疫抑制療法を必要としない日数である場合がある。例えば、本明細書に提供される処置（例えば、移植術）後、レシピエントは、少なくともまたは少なくとも約1、5、10、100、365、500、800、1000、2000、4000日もしくはそれを超える日数の間、免疫抑制療法を必要としない場合がある。これによって、移植術が成功したことが示され得る。これはまた、移植された細胞、組織、および／または臓器の拒絶がないことを示し得る。

20

【0323】

いくつかの場合には、レシピエントは、少なくともまたは少なくとも約1日間、免疫抑制療法を必要としない場合がある。レシピエントはまた、少なくともまたは少なくとも約7日間、免疫抑制療法を必要としない場合もある。レシピエントは、少なくともまたは少なくとも約14日間、免疫抑制療法を必要としない場合がある。レシピエントは、少なくともまたは少なくとも約21日間、免疫抑制療法を必要としない場合がある。レシピエントは、少なくともまたは少なくとも約28日間、免疫抑制療法を必要としない場合がある。レシピエントは、少なくともまたは少なくとも約60日間、免疫抑制療法を必要としない場合がある。さらに、レシピエントは、少なくともまたは少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40もしくは50年の間、例えば、少なくともまたは少なくとも約1～2；2～3；3～4；4～5；1～5；5～10；10～15；15～20；20～25；25～50年の間、免疫抑制療法を必要としない場合がある。

30

【0324】

首尾よい移植術の別の指標は、レシピエントが低減された免疫抑制療法を要する日数である場合がある。例えば、本明細書に提供される処置後、レシピエントは、少なくともまたは少なくとも約1、5、10、50、100、200、300、365、400、500日の間、例えば、少なくともまたは少なくとも約1～30；30～120；120～365；365～500日の間、低減された免疫抑制療法を必要とし得る。これによって、移植術が成功したことが示され得る。これによってまた、移植された細胞、組織、および／または臓器の拒絶がないかまたは最小であることが示され得る。

40

【0325】

例えば、レシピエントは、少なくともまたは少なくとも約1日間、低減された免疫抑制療法を必要とし得る。レシピエントはまた、少なくとも約7日間、低減された免疫抑制療法を必要とし得る。レシピエントは、少なくともまたは少なくとも約14日間、低減された免疫抑制療法を必要とし得る。レシピエントは、少なくともまたは少なくとも約21日間

50

、低減された免疫抑制療法を必要とし得る。レシピエントは、少なくともまたは少なくとも約28日間、低減された免疫抑制療法を必要とし得る。レシピエントは、少なくともまたは少なくとも約60日間、低減された免疫抑制療法を必要とし得る。さらにレシピエントは、少なくともまたは少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40もしくは50年の間、例えば、少なくともまたは少なくとも約1～2；2～3；3～4；4～5；1～5；5～10；10～15；15～20；20～25；25～50年の間、低減された免疫抑制療法を必要とし得る。

【0326】

「低減された(reduced)」およびその文法上の等価物は、本明細書において使用する場合、1つまたは複数の野生型細胞がレシピエントに移植されるとき、必要な免疫抑制療法と比較して少ない免疫抑制療法を指し得る。

【0327】

免疫抑制療法

免疫抑制療法は、免疫系を抑制する任意の処置を含んでもよい。免疫抑制療法は、レシピエントにおける移植拒絶を緩和、最小化または排除することを補助し得る。例えば、免疫抑制療法は、免疫抑制薬を含んでもよい。移植の前、間および／または後に使用される免疫抑制薬は、当業者に公知の任意のものであり、これには限定するものではないが、MMF(ミコフェノール酸モフェチル(Cellcept))、ATG(抗胸腺細胞グロブリン)、抗CD154(CD4OL)、抗CD40(2C10、ASKP1240、CCFZ533X2201)、アレムツズマブ(Campath)、抗CD20(リツキシマブ)、抗IL-6R抗体(トシリズマブ、Actemra)、抗IL-6抗体(サリルマブ、オロキズマブ(oklizumab))、CTLA4-Ig(アバタセプト／オレンシア)、ベラタセプト(LEA29Y)、シロリムス(Rapimune)、エベロリムス、タクロリムス(Prograf)、ダクリズマブ(Zenapax)、バシリキシマブ(Simulect)、インフリキシマブ(Remicade)、シクロスポリン、デオキシスパガリン、可溶性補体受容体1、コブラ毒因子、コンプスタチン、抗C5抗体(エクリズマブ／Soliris)、メチルプレドニゾロン、FTY720、エベロリムス、レフルノミド、抗IL-2R-Ab、ラパマイシン、抗CXCR3抗体、抗ICOS抗体、抗OX40抗体、および抗CD122抗体が挙げられる。さらに、1つまたは1つより多い免疫抑制剤／薬を一緒に使用しても、または逐次使用してもよい。1つまたは1つより多い免疫抑制剤／薬を誘導療法に使用してもよいし、または維持療法に使用してもよい。同じ薬物または異なる薬物を、誘導および維持の段階の間に使用してもよい。いくつかの場合には、ダクリズマブ(Zenapax)を誘導療法に使用してもよく、タクロリムス(Prograf)およびシロリムス(Rapimune)を維持療法に使用してもよい。ダクリズマブ(Zenapax)をまた誘導療法にも使用してもよく、低用量タクロリムス(Prograf)および低用量シロリムス(Rapimune)を維持療法に使用してもよい。免疫抑制はまた、全身照射、胸腺照射、ならびに完全および／または部分的な脾臓摘出を含むがこれに限定されない非薬物レジメンを使用して達成してもよい。これらの技術はまた、1つまたは複数の免疫抑制薬と併用してもよい。

【0328】

トランスジェニック脾臓細胞は、限定されるものではないが、レシピエント生物の門脈、肝臓被膜下腔、脾臓被膜下腔、腎臓被膜下腔、網、胃または腸の粘膜下組織、小腸の血管部分、静脈囊、精巣、脳、角膜または脾臓を介する導入を含む当技術分野で公知の任意の手段を使用して移植してもよい。例えば、本明細書に提供される脾臓細胞、例えば、ブタの脾臓細胞を霊長類、例えば、ヒトに移植するために異種移植術の方法を用いてもよく、ここでは脾臓が、門脈内の注入によって投与される。本明細書に提供される脾臓細胞を霊長類に移植するために異種移植術の方法を提供してもよく、ここでは脾臓が、腹腔内腔、腎被膜下、腎被膜、網を介して、または脾臓のベッドインフュージョン(bed infusion)を介して投与される。例えば、移植は、被膜下移植であっても、筋肉内移植であっても、または門脈内移植であってもよい。

【0329】

同種移植および異種移植の両方とも、自己免疫を再発させやすい場合がある。例えば、膵島細胞移植術に関して、膵島β細胞は、自己反応性T細胞により、例えば、CD8+自己反応性T細胞、および自己反応性抗体によって、移植術後、攻撃されて、破壊される場合がある。レシピエントが、寛容化ワクチンを与えられる場合、自己免疫性再発は妨げられ得る。例えば、寛容化ワクチンが、自己抗原、例えば、インスリンB9-23を、アポトーシス性キャリア細胞またはマイクロ粒子、例えば、ポリスチレン粒子の表面上に存在するように操作される場合、自己抗原に対する寛容は、回復され得、自己免疫性再発は、妨げられ得る。例えば、糖尿病に関して、本明細書に開示される寛容化ワクチンは、自己免疫1型糖尿病の発生を妨げるか、または移植された膵島β細胞における自己免疫性再発を妨げ得る。

10

【0330】

寛容化ワクチンはまた、レシピエントに与えて、糖尿病を予防または処置してもよい（例えば、1型、2型、妊娠性、外科的、嚢胞性線維症関連糖尿病、またはミトコンドリア糖尿病。いくつかの場合には、疾患は、遺伝性の糖尿病であっても、またはある種の遺伝性の糖尿病であってもよい）。

【0331】

さらに、同種移植および異種移植の両方に関して、グラフト中でNLRC5、TAP1、およびB2Mのような遺伝子を破壊することは、膵島ベータ細胞上を含む、グラフト細胞上のMHCクラスIの機能的発現の欠失を生じ得、それによって、自己反応性CD8+T細胞の移植後活性を妨げる。したがって、これは、自己反応性CD8+T細胞の細胞溶解性のエフェクター機能から移植片、例えば、移植された膵島ベータ細胞を防御し得る。

20

【0332】

寛容化ワクチンを使用するレシピエントにおける移植グラフトの寛容の誘導

ECDI処置細胞を含む寛容化ワクチンは、ドナーの細胞、臓器、および／または組織の移植の前、後、および／または間に投与して、レシピエントにおいてドナー特異的な寛容を誘導してもよい。図4に示される例としては、ブタ膵島が0日目にレシピエント（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）に移植される。同じドナーブタ由来のアポトーシス性細胞（例えば、寛容化ワクチン）を最初に、異種グラフト（例えば、同じドナー由来のブタ膵島）に対する寛容を誘導するために膵島移植の7日前（-7日目）に投与してもよい。追加の寛容化ワクチンは、寛容を増進する（booster）ために膵島移植の1日後（1日目）に投与してもよい（図4）。さらに、寛容化ワクチンの投与は、一過性の免疫抑制の投与を伴ってもよい（図4）。いくつかの場合には、ECDI処置細胞を含む寛容化ワクチンを、0日目のドナーの細胞、臓器および／または組織の移植に対して、-100日目、-90日目、-80日目、-70日目、-60日目、-50日目、-40日目、-30日目、-20日目、-15日目、-14日目、-13日目、-12日目、-11日目、-10日目、-9日目、-8日目、-7日目、-6日目、-5日目、-4日目、-3日目、-2日目もしくは-1日目に、または約-100日目、約-90日目、約-80日目、約-70日目、約-60日目、約-50日目、約-40日目、約-30日目、約-20日目、約-15日目、約-14日目、約-13日目、約-12日目、約-11日目、約-10日目、約-9日目、約-8日目、約-7日目、約-6日目、約-5日目、約-4日目、約-3日目、約-2日目もしくは約-1日目に、例えば、-100~-50日目；-50~-40日目；-40~-30日目；-30~-20日目；-20~-10日目；-10~-5日目；-7~-1日目に、または約-100~-50日目；約-50~-40日目；約-40~-30日目；約-30~-20日目；約-20~-10日目；約-10~-5日目；約-7~-1日目に投与してもよい。例えば、ECDI処置細胞を含む寛容化ワクチンを、ドナーの細胞、臓器、および／または組織の移植の7日前（例えば、-7日目）に投与してもよい。いくつかの場合には、ECDI処置細胞を含む寛容化ワクチンを、ドナーの細胞、臓器、および／または組織の移植と同じ日（例えば、0日目）に投与してもよい。いくつかの場合には、ECDI処置細胞は、0日目のドナーの細胞、臓器、およ

30

40

50

び／または組織の移植に対して100日目、90日目、80日目、70日目、60日目、50日目、40日目、30日目、20日目、15日目、14日目、13日目、12日目、11日目、10日目、9日目、8日目、7日目、6日目、5日目、4日目、3日目、2日目もしくは1日目に、または約100日目、約90日目、約80日目、約70日目、約60日目、約50日目、約40日目、約30日目、約20日目、約15日目、約14日目、約13日目、約12日目、約11日目、約10日目、約9日目、約8日目、約7日目、約6日目、約5日目、約4日目、約3日目、約2日目もしくは約1日目に、投与され得る。例えば、ECDI処置細胞を含む寛容化ワクチンは、ドナーの細胞、臓器、および／または組織の移植の1日後（例えば、1日目）に投与されてもよい。いくつかの場合には、寛容化ワクチンは、ドナーの細胞、臓器、および／または組織の移植術の前および後に投与されてもよい。

【 0 3 3 3 】

遺伝子改変された細胞、寛容化ワクチンおよび抗体と一緒に使用して、移植拒絶を抑制してもよい。図5は、グラフト（例えば、異種グラフト）の拒絶を防ぐか、および／またはその生存を延長する例示的なアプローチを実証する。このアプローチは、i) グラフトドナーの遺伝子操作；ii) ワクチンドナーの遺伝子操作、ならびにiii) 遺伝子操作された寛容化ワクチン（アポトーシス性細胞単独または非アポトーシス性細胞とともに）の投与、および一過性の免疫抑制の援護のもとでのグラフト移植を組み込んでもよい。グラフトドナーおよびワクチンドナーは、同じ遺伝子型を有してもよい。あるいは、グラフトドナーおよびワクチンドナーは、異なる遺伝子型を有してもよい。いくつかの場合には、グラフトドナーは、NLRC5、C3、CXCL10およびGGTA1の低減された発現、ならびにHLA-G（例えば、HLA-G1）またはHLA-Eをコードするポリヌクレオチドを含む導入遺伝子を含み得る。いくつかの場合には、グラフトドナーは、TAP1、C3、CXCL10およびGGTA1の低減された発現、ならびにHLA-G（例えば、HLA-G1）またはHLA-Eをコードするポリヌクレオチドを含む導入遺伝子を含んでもよい。いくつかの場合には、グラフトドナーは、NLRC5およびTAP1、C3、CXCL10およびGGTA1の低減された発現、ならびにHLA-G（例えば、HLA-G1）またはHLA-Eをコードするポリヌクレオチドを含む導入遺伝子を含んでもよい。ワクチンドナーは、GGTA1、CMAH、B4GALNT2の低減された発現、ならびに／またはHLA-G（例えば、HLA-G1）、CD47（例えば、ヒトCD47）、PD-L1（例えば、ヒトPD-L1）、およびPD-L2（例えば、ヒトPD-L2）をコードするポリヌクレオチドを含む導入遺伝子を有し得る。ワクチンドナーは、GGTA1、CMAH、B4GALNT2の低減された発現、ならびに／またはHLA-E、CD47（例えば、ヒトCD47）、PD-L1（例えば、ヒトPD-L1）、およびPD-L2（例えば、ヒトPD-L2）をコードするポリヌクレオチドを含む導入遺伝子を有し得る。このワクチンはいくつかの場合には、移植レシピエントに、前に（例えば、-7日目に）および／または後に（例えば、1日目に）与えられてもよい。他の免疫抑制試薬、例えば、抗CD40抗体、抗CD20抗体、ラパマイシン、コンプスタチン、抗IL-6R抗体、およびsTNFR、ナイトロジェンマスタードアルキル化剤（例えば、シクロホスファミド）のうちの1つまたは複数もまた、移植の前および／または後に対象に与えられてもよい。

【 0 3 3 4 】

本明細書に開示される、遺伝子改変された細胞、組織、臓器、寛容化ワクチンおよび抗CD40抗体に加えて、1つまたは複数の追加の免疫抑制剤を、遺伝子改変された細胞、組織、臓器、寛容化ワクチンおよび／または抗CD40抗体を受容している対象に投与してもよい。追加の免疫抑制剤を対象に投与して、例えば、対象における寛容化ワクチンの寛容原性の有効性を増強してもよい。追加の免疫抑制剤は、B細胞枯渇化抗体、mTOR阻害剤、TNFアルファ阻害剤、IL-6阻害剤、ナイトロジェンマスタードアルキル化剤（例えば、シクロホスファミド）、補体C3もしくはC5阻害剤、またはそれらの任意の組合せを含んでもよい。

【0335】

追加の免疫抑制剤は、例えば、ナイトロジェンマスタードアルキル化剤であってもよい。例えば、追加の免疫抑制剤は、シクロホスファミドであってもよい。

【0336】

追加の免疫抑制剤は、寛容化ワクチンの投与の前、後、および／または間に投与されてもよい。いくつかの場合には、追加の免疫抑制剤は、寛容化ワクチンの投与に対して、－100日目～0日目の間に、例えば、－90日目、－80日目、－70日目、－60日目、－50日目、－40日目、－30日目、－20日目、－15日目、－14日目、－13日目、－12日目、－11日目、－10日目、－9日目、－8日目、－7日目、－6日目、－5日目、－4日目、－3日目、－2日目または－1日目に投与されてもよい。いくつかの場合には、追加の免疫抑制剤は、寛容化ワクチンの投与に対して、－100～－50日目；－50～－40日目；－40～－30日目；－30～－20日目；－20～－10日目；－10～－5日目；－7～－1日目に、または約－100～－50日目；約－50～－40日目；約－40～－30日目；約－30～－20日目；約－20～－10日目；約－10～－5日目；約－7～－1日目に投与されてもよい。いくつかの場合には、追加の免疫抑制剤は、寛容化ワクチンの投与に対して、0日～100日目の間に、例えば、100日目、90日目、80日目、70日目、60日目、50日目、40日目、30日目、20日目、15日目、14日目、13日目、12日目、11日目、10日目、9日目、8日目、7日目、6日目、5日目、4日目、3日目、2日目または1日目に投与されてもよい。例えば、この免疫抑制剤は、寛容化ワクチンの投与に対して、100～50日目；50～40日目；40～30日目；30～20日目；20～10日目；10～5日目；7～1日目に、または約100～50日目；約50～40日目；約40～30日目；約30～20日目；約20～10日目；約10～5日目；約7～1日目に投与されてもよい。いくつかの場合には、追加の免疫抑制剤は、寛容化ワクチンが投与される日に投与されてもよい。他の場合には、追加の免疫抑制は、寛容化ワクチンの投与の前後に投与されてもよい。例えば、シクロホスファミドは、寛容化ワクチンの投与後3日目または約3日目に投与されてもよい。

【0337】

寛容原性の有効性レギュレーター（例えば、シクロホスファミド）を、5からまたは約5から100mg/kg/日までの用量で投与してもよい。「mg/kg/日」という単位は、1日あたり対象の体重1キログラムあたりに投与される寛容原性の有効性レギュレーターのミリグラム数を指す場合がある。いくつかの場合には、寛容原性の有効性レギュレーター（例えば、シクロホスファミド）は、20mg/kg/日からもしくは約20mg/kg/日から100mg/kg/日；30mg/kg/日からもしくは約30mg/kg/日から90mg/kg/日；40mg/kg/日からもしくは約40mg/kg/日から80mg/kg/日；50mg/kg/日からもしくは約50mg/kg/日から70mg/kg/日；50mg/kg/日からもしくは約50mg/kg/日から60mg/kg/日；または40mg/kg/日からもしくは約40mg/kg/日から60mg/kg/日までの用量で投与されてもよい。

【0338】

細胞（例えば、脾細胞）を、適切な抗原（複数可）および／またはエピトープ（複数可）（例えば、CD4）の存在下においてECDIで処置してもよい。ECDI処置は、ECDI処置細胞に対する抗原（複数可）および／またはエピトープ（複数可）のカップリングを生じ得る。他のコンジュゲート、例えば、ヘキサメチレンジイソシアネート、プロピレングリコールジグリシジルエーテル（2つのエポキシ残基を含有する）、およびエピクロロヒドリンをまた使用して、細胞を処置して、抗原（複数可）および／またはエピトープ（複数可）をカップリングして、寛容化ワクチンのための細胞を作製してもよい。

【0339】

抗原カップリングされた細胞および／またはエピトープカップリングされた細胞（例えば、ECDI誘導性カップリング）を、ドナーの移植細胞、臓器、および／または組織の

投与の前、間、および／または後に投与して、レシピエント（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）における細胞、臓器および／または組織について寛容を誘導してもよい。いくつかの場合には、抗原カップリングされた細胞および／またはエピトープカップリングされた細胞を、0日目のドナーの細胞、臓器、および／または組織の移植に対して、－100日目、－90日目、－80日目、－70日目、－60日目、－50日目、－40日目、－30日目、－20日目、－15日目、－14日目、－13日目、－12日目、－11日目、－10日目、－9日目、－8日目、－7日目、－6日目、－5日目、－4日目、－3日目、－2日目または－1日目に投与してもよい。いくつかの場合には、抗原カップリングされた細胞および／またはエピトープカップリングされた細胞を、0日目のドナーの細胞、臓器、および／または組織の移植に対して－100から－50日目；－50から－40日目；－40から－30日目；－30から－20日目；－20から－10日目；－10から－5日目；－7から－1日目に、または約－100から－50日目；約－50から－40日目；約－40から－30日目；約－30から－20日目；約－20から－10日目；約－10から－5日目；約－7から－1日目に投与してもよい。例えば、抗原カップリングされた細胞および／またはエピトープカップリングされた細胞は、ドナーの細胞、臓器、および／または組織の移植の7日前（例えば、－7日目）に投与してもよい。いくつかの場合には、抗原カップリングされた細胞および／またはエピトープカップリングされた細胞を、ドナーの細胞、臓器、および／または組織の移植と同じ日（例えば、0日目）に投与してもよい。いくつかの場合には、抗原カップリングされた細胞および／またはエピトープカップリングされた細胞は、0日目のドナーの細胞、臓器、および／または組織の移植に対して、100日目、90日目、80日目、70日目、60日目、50日目、40日目、30日目、20日目、15日目、14日目、13日目、12日目、11日目、10日目、9日目、8日目、7日目、6日目、5日目、4日目、3日目、2日目または1日目に投与されてもよい。例えば、抗原カップリングされた細胞および／またはエピトープカップリングされた細胞は、0日目のドナーの細胞、臓器、および／または組織の移植に対して100から50日目；50から40日目；40から30日目；30から20日目；20から10日目；10から5日目；7から1日目に、または約100から50日目；約50から40日目；約40から30日目；約30から20日目；約20から10日目；約10から5日目；約7から1日目に投与されてもよい。例えば、抗原カップリングされた細胞および／またはエピトープカップリングされた細胞は、ドナーの細胞、臓器、および／または組織の移植の1日後（例えば、1日目）に投与されてもよい。

【0340】

ECDI処置細胞、抗原カップリングされた細胞、および／またはエピトープカップリングされた細胞は、レシピエントに対するドナーの細胞、臓器、および／または組織の移植術の前にレシピエントに投与されてもよい。ECDI処置細胞、抗原カップリングされた細胞、および／またはエピトープカップリングされた細胞は、レシピエントに対するドナーの細胞、臓器、および／または組織の移植術の前にレシピエントに同時投与されてもよい。ECDI処置細胞、抗原カップリングされた細胞、および／またはエピトープカップリングされた細胞は、レシピエントに対するドナーの細胞、臓器、および／または組織の移植術の移植後にレシピエントに投与されてもよい。移植術の前、間、および／または後の移植レシピエントに対するECDI処置細胞、抗原カップリングされた細胞、および／またはエピトープカップリングされた細胞の投与は、移植された細胞、臓器、および／または組織の寛容の増大を生じ得る。例えば、ECDI処置細胞、抗原カップリングされた細胞、および／またはエピトープカップリングされた細胞は、移植された細胞、臓器、および／または組織の初期の寛容、長期の寛容および／または総合的な許容を増大し得る。いくつかの場合には、移植レシピエントにECDI処置細胞（例えば、エピトープカップリングされた細胞）を投与することは、追加の免疫抑制も抗拒絶療法もなく、移植された材料の寛容を生じ得る。

【0341】

寛容化ワクチンは、細胞、臓器、および／または組織の拒絶を妨げるのに必要な免疫抑

10

20

30

40

50

制の用量または持続期間を減少し得る。寛容化ワクチンは、必要な免疫抑制の用量を、少なくともまたは少なくとも約5%低下し得る。例えば、寛容化ワクチンは、必要な免疫抑制の用量を、少なくともまたは少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%、例えば、少なくともまたは少なくとも約5~25%；25~50%；50~75%；75~85%；85~90%；90~95%；95~100%低下する。いくつかの場合には、移植レシピエントは、寛容化ワクチンの投与後に免疫抑制を必要としない場合がある。「低減する(reduce)」という用語、およびその文法上の等価物は、本明細書において使用する場合、1つまたは複数の野生型細胞、臓器、および／または組織が、レシピエント(例えば、ヒトまたは非ヒト動物)に移植された場合、免疫抑制の必要な用量と比較して少ない免疫抑制を使用することを指す場合がある。「低減する(reduce)」という用語はまた、1つまたは複数の野生型細胞、臓器、および／または組織が、レシピエント(例えば、ヒトまたは非ヒト動物)に移植された場合、免疫抑制の必要な用量と比較して少ない免疫抑制薬(複数可)または剤(複数可)を使用することを指す場合もある。

10

【0342】

レシピエント(例えば、ヒトまたは非ヒト動物)は、移植術後少なくともまたは少なくとも約1日、5日、10日、20日、30日、40日、50日、60日、70日、80日、90日、または100日、例えば、少なくともまたは少なくとも約1から5日；5から10日；10から20日；20から30日；30から60日；60~100日間の間、低減された用量の免疫抑制を必要とし得る。レシピエント(例えば、ヒトまたは非ヒト動物)は、移植術後少なくともまたは少なくとも約1ヵ月、2ヵ月、3ヵ月、4ヵ月、5ヵ月、6ヵ月、7ヵ月、8ヵ月、9ヵ月、10ヵ月、11ヵ月、または12ヵ月、例えば、移植術後少なくともまたは少なくとも約1から2ヵ月；2から3ヵ月；3から6ヵ月；6から9ヵ月；9から12ヵ月の間、低減された用量の免疫抑制を必要とし得る。レシピエント(例えば、ヒトまたは非ヒト動物)は、移植術後、少なくともまたは少なくとも約1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年、15年、20年、25年、または30年、例えば、移植術後少なくともまたは少なくとも約1から2年；2から3年；3から4年；4から5年；1から5年；5から10年；10から15年；15から20年；20から25年；25から30年の間、低減された用量の免疫抑制を必要とし得る。いくつかの場合には、レシピエント(例えば、ヒトまたは非ヒト動物)は、そのレシピエントの寿命まで低減された用量の免疫抑制を必要とし得る。

20

30

【0343】

レシピエント(例えば、ヒトまたは非ヒト動物)は、移植術後、少なくともまたは少なくとも約1日、5日、10日、20日、30日、40日、50日、60日、70日、80日、90日または100日、例えば、少なくともまたは少なくとも約1から5日；5から10日；10から20日；20から30日；30から60日；60から100日の間、免疫抑制を必要としない場合がある。レシピエント(例えば、ヒトまたは非ヒト動物)は、移植術後、少なくともまたは少なくとも約1ヵ月、2ヵ月、3ヵ月、4ヵ月、5ヵ月、6ヵ月、7ヵ月、8ヵ月、9ヵ月、10ヵ月、11ヵ月または12ヵ月、例えば、移植術後、少なくともまたは少なくとも約1から2ヵ月；2から3ヵ月；3から6ヵ月；6から9ヵ月；9から12ヵ月の間、低減された用量の免疫抑制を必要とし得る。レシピエント(例えば、ヒトまたは非ヒト動物)は、移植術後、少なくともまたは少なくとも約1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年、15年、20年、25年または30年、例えば、移植術後、少なくともまたは少なくとも約1から2年；2から3年；3から4年；4から5年；1から5年；5から10年；10から15年；15から20年；20から25年；25から30年の間、低減された用量の免疫抑制を必要とし得る。いくつかの場合には、レシピエント(例えば、ヒトまたは非ヒト動物)は、そのレシピエントの寿命まで免疫抑制を必要としない場合がある。

40

【0344】

50

本明細書に記載される免疫抑制とは、移植術の直前、後、および／または間に投与される免疫抑制を指す場合がある。本明細書に記載される免疫抑制とはまた、移植術後、少なくともまたは少なくとも約1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、20日、30日、40日、50日、60日、70日、80日、90日または100日（例えば、少なくともまたは少なくとも約1から5日；5から10日；10から20日；20から30日；30から60日；60から100日の間）、あるいは1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年、15年、20年、25年もしくは30年（例えば、少なくともまたは少なくとも約1から2年；2から3年；3から4年；4から5年；1から5年；5から10年；10から15年；15から20年；20から25年；25から30年の間）で投与された維持免疫抑制を指す場合がある。寛容化ワクチンは、維持免疫抑制を必要せずに、細胞、臓器、および／または組織の生存を増大し得る。

【0345】

免疫抑制を、免疫抑制療法で使用して、レシピエントにおける移植拒絶を抑制してもよい。免疫抑制療法は、レシピエント（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）における移植拒絶を抑制する任意の処置を含んでもよい。免疫抑制療法は、免疫抑制薬を投与することを含み得る。移植の前、間および／または後に使用され得る免疫抑制薬としては、限定するものではないが、MMF（ミコフェノール酸モフェチル（Cellcept））、ATG（抗胸腺細胞グロブリン）、抗CD154（CD40L）、アテムツズマブ（Campath）、抗CD20（リツキシマブ）、抗IL-6R抗体（トシリズマブ、Actemra）、抗IL-6抗体（サリルマブ、オロキズマブ）、CTLA4-Ig（アバタセプト／オレンシア）、ベラタセプト（LEA29Y）、シロリムス（Rapimune）、タクロリムス（Prograf）、ダクリズマブ（Zenapax）、バシリキシマブ（Simulect）、インフリキシマブ（Remicade）、シクロスポリン、デオキシスパガリン、可溶性補体受容体1、コブラ毒因子、コンプスタチン、抗C5抗体（エクリズマブ／Soliris）、メチルプレドニゾロン、FTY720、エベロリムス、抗CD154-Ab、レフルノミド、抗IL-2R-Ab、ラパマイシン、抗CXCR3抗体、抗ICOS抗体、抗OX40抗体、および抗CD122抗体、およびヒト抗CD154モノクローナル抗体が挙げられる。1つまたは1つより多い免疫抑制剤／薬と一緒に使用しても、または逐次使用してもよい。1つまたは1つより多い免疫抑制剤／薬を、誘導療法に使用してもよいし、または維持療法に使用してもよい。同じ薬物または異なる薬物を、誘導および維持の段階の間に使用してもよい。例えば、ダクリズマブ（Zenapax）を誘導療法に使用し、タクロリムス（Prograf）およびシロリムス（Rapimune）を維持療法に使用する。別の実施例では、ダクリズマブ（Zenapax）が誘導療法に使用され、低用量タクロリムス（Prograf）および低用量シロリムス（Rapimune）が維持療法に使用される。免疫抑制はまた、限定するものではないが、全身照射、胸腺照射、ならびに完全および／または部分的な脾臓摘出を含む非薬物レジメンを使用して達成してもよい。これらの技術はまた、1つまたは複数の免疫抑制薬と併用してもよい。

【0346】

抗体処置

劇症性、超急性、および／または急性の血管拒絶を回避する同種グラフトおよび異種グラフトの両方を、T細胞媒介性の拒絶に供する。CD4⁺およびCD8⁺Tリンパ球は拒絶に寄与する。これらのT細胞は、T細胞に対するドナー抗原提示細胞による提示に関与する免疫認識の直接経路を介して、または宿主抗原提示細胞による内部移行された可溶性ドナー抗原の提示に関与する間接的経路を介して活性化され得る。CD8⁺T細胞は、拒絶の主要な媒介因子である。B細胞は、抗原提示、サイトカイン産生および共刺激のような機構によって、活性化された抗ドナーCD4⁺T細胞の増殖、抗ドナーCD8⁺T細胞の生存、およびT細胞記憶生成を促進する。本明細書に開示される組成物および方法を使用して、ドナーから移植された細胞、組織または臓器に対するレシピエントの直接免疫応答、間接免疫応答、またはその両方を低減してもよい。本明細書に記載されるような処置

の方法は、E C D I 処置細胞（例えば、寛容化ワクチン）、および1つまたは複数の生物学的物質または化学的物質をヒトに提供するステップを含み得る。例えば、E C D I 処置細胞は、ブタ細胞、例えば、ブタの脾細胞であってもよい。

【0347】

1つまたは複数の生物学的物質または化学的物質は抗体であり得る。抗体は、抗CD40であっても、または抗IL-6Rであってもよい。抗CD40抗体は、抗CD40 Ab 2C10抗体、抗CD40 mAb ASKP1240（4D11）（例えば、Watanabeら、「ASKP1240, a fully human anti-CD40 monoclonal antibody, prolongs pancreatic islet allograft survival in nonhuman primates」、Am J Transplant. 13巻（8号）：1976～88頁（2013年）に記載のとおり）、または抗CD40 mAb CFZ533（Corodobaら、「A Novel, Blocking, Fc-Silent Anti-CD40 Monoclonal Antibody Prolongs Nonhuman Primate Renal Allograft Survival in the Absence of B Cell Depletion」、Am J Transplant. 15巻（11号）：2825～36頁（2015年）に記載のとおり）であってもよい。

【0348】

移植術（例えば、異種移植術）のためにレシピエント（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）を免疫寛容化するための本明細書に記載される方法は、レシピエント（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）に、E C D I 処置細胞、B細胞枯渇化抗体、拮抗性の抗CD40抗体、mTOR阻害剤、およびTNFアルファ阻害剤、およびIL-6阻害剤、またはそれらの任意の組合せからなる群から選択される2つまたはそれ超の生物学的物質または化学的物質を提供するステップを含み得る。レシピエント（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）における移植術生存を延長するための本明細書の方法は、レシピエント（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）に、E C D I 処置細胞、抗CD40 Ab 2C10抗体、sTNFR、抗IL-6R抗体、またはそれらの任意の組合せからなる群から選択される2つまたはそれ超の生物学的物質を投与するステップを含み得る。例えば、方法は、レシピエント（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）に、E C D I 処置細胞を提供するステップを含み得、ここでE C D I 処置細胞は、本明細書で開示される。方法は、レシピエント（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）に、B細胞枯渇化抗体、例えば、リツキシマブを提供するステップを含み得る。方法は、レシピエント（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）に拮抗性の抗CD40抗体、例えば、ヒト化2C10を提供するステップを含み得る。方法は、レシピエント（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）にmTOR阻害剤、例えば、ラパマイシンを提供するステップを含み得る。方法は、レシピエント（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）に、TNFアルファ阻害剤、例えば、sTNFRを提供するステップを含み得る。sTNFRはまた、トシリズマブまたはエタネルセプトであってもよい。方法は、レシピエント（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）に、IL-6阻害剤、例えば、抗IL-6R抗体を提供するステップを含み得る。いくつかの場合には、方法は、レシピエント（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）に、抗原提示細胞（APC）上の非冗長エピトープを標的化する抗体（例えば、モノクローナル抗体）を提供するステップを含み得る。いくつかの場合には、方法は、T細胞活性化、B細胞活性化、樹状細胞活性化、またはそれらの任意の組合せを阻害する医薬品を投与するステップを含み得る。

【0349】

本開示はまた、脾細胞；抗CD40 Ab 2C10抗体；sTNFR；および抗IL-6R抗体のうちの2つまたはそれ超を含むキットを提供し得る。例えば、キットは、脾細胞および抗CD40 Ab 2C10抗体を備えてもよい。キットは、脾細胞およびsTNFRを備えてもよい。キットは、脾細胞および抗IL-6R抗体を備えてもよい。キットは、抗CD40 Ab 2C10抗体およびsTNFRを備えてもよい。キットは、

抗CD40 Ab 2C10抗体および抗IL-6R抗体を備えてもよい。キットは、sTNFRおよび抗IL-6R抗体を備えてもよい。キットは、脾細胞、抗CD40 Ab 2C10抗体およびsTNFRを備えてもよい。キットは、脾細胞、抗CD40 Ab 2C10抗体および抗IL-6R抗体を備えてもよい。キットは、脾細胞、sTNFRおよび抗IL-6R抗体を備えてもよい。キットは、抗CD40 Ab 2C10抗体、sTNFRおよび抗IL-6R抗体を備えてもよい。キットは、脾細胞；抗CD40 Ab 2C10抗体；sTNFR；および抗IL-6R抗体を備えてもよい。キットは、さらにECDI固定用の試薬を備えてもよい。

【0350】

本明細書の方法は、ECDI処置細胞、例えば、ECDI処置脾細胞を含んでもよい。いくつかの場合には、方法は、レシピエント（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）にECDI処置脾細胞および抗CD40 Ab 2C10抗体を提供するステップを含み得る。いくつかの場合には、方法は、レシピエント（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）にECDI処置脾細胞およびsTNFRを提供するステップを含み得る。いくつかの場合には、方法は、レシピエント（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）に、ECDI処置脾細胞および抗IL-6R抗体を提供するステップを含み得る。いくつかの場合には、方法は、レシピエント（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）に抗CD40 Ab 2C10抗体およびsTNFRを提供するステップを含み得る。いくつかの場合には、方法は、レシピエント（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）に、抗CD40 Ab 2C10抗体および抗IL-6R抗体を提供するステップを含み得る。いくつかの場合には、方法は、レシピエント（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）に、ECDI処置脾細胞、抗CD40 Ab 2C10抗体、およびsTNFRを提供するステップを含み得る。いくつかの場合には、方法は、レシピエント（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）に、ECDI処置脾細胞、抗CD40 Ab 2C10抗体、および抗IL-6Rを提供するステップを含み得る。いくつかの場合には、方法は、レシピエント（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）に、ECDI処置脾細胞、sTNFR、および抗IL-6R抗体を提供するステップを含み得る。いくつかの場合には、方法は、レシピエント（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）に、ECDI処置脾細胞、抗CD40 Ab 2C10抗体、sTNFR、および抗IL-6R抗体を提供するステップを含み得る。いくつかの場合には、方法は、レシピエント（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）に、ECDI処置脾細胞、および抗原提示細胞（APC）上の非冗長エピトープを標的化する抗体（例えば、モノクローナル抗体）を提供するステップを含み得る。

【0351】

ドナー（例えば、寛容化ワクチン中の移植グラフトおよび／または細胞のためのドナー）は哺乳動物であり得る。同種グラフトのドナーは、限定するものではないが、多能性幹細胞を含む未改変のヒト細胞、組織、および／または臓器であってもよい。異種グラフトのドナーは、哺乳動物のような、非ヒト動物由来の任意の細胞、組織、および／または臓器であってもよい。いくつかの場合には、哺乳動物は、ブタであってもよい。

【0352】

本明細書の方法はさらに、疾患を有するレシピエント（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）を診断するステップを含み得る。例えば、疾患は、糖尿病であり、例としては限定するものではないが、1型、2型、妊娠性、外科的、嚢胞性線維症関連糖尿病、またはミトコンドリア糖尿病が挙げられる。いくつかの場合には、疾患は、遺伝性糖尿病であっても、またはある種の遺伝性糖尿病であってもよい。

【0353】

本明細書の方法は、ドナーの細胞、臓器、および／または組織の移植の前、後、および／または間にECDI処置細胞を投与して、レシピエントにおいてドナー特異的寛容を誘導するステップを含み得る。いくつかの場合には、ECDI処置細胞は、0日目のドナーの細胞、臓器、および／または組織の移植に対して、-100日目、-90日目、-80日目、-70日目、-60日目、-50日目、-40日目、-30日目、-20日目、-15日目、-14日目、-13日目、-12日目、-11日目、-10日目、-9日目、

10

20

30

40

50

- 8 日目、- 7 日目、- 6 日目、- 5 日目、- 4 日目、- 3 日目、- 2 日目もしくは- 1 日目に、または約- 1 0 0 日目、約- 9 0 日目、約- 8 0 日目、約- 7 0 日目、約- 6 0 日目、約- 5 0 日目、約- 4 0 日目、約- 3 0 日目、約- 2 0 日目、約- 1 5 日目、約- 1 4 日目、約- 1 3 日目、約- 1 2 日目、約- 1 1 日目、約- 1 0 日目、約- 9 日目、約- 8 日目、約- 7 日目、約- 6 日目、約- 5 日目、約- 4 日目、約- 3 日目、約- 2 日目もしくは約- 1 日目に投与され得る。いくつかの場合には、抗原カップリングされた細胞および／またはエピトープカップリングされた細胞は、0 日目のドナーの細胞、臓器、および／または組織の移植に対して- 1 0 0 から- 5 0 日目；- 5 0 から- 4 0 日目；- 4 0 から- 3 0 日目；- 3 0 から- 2 0 日目；- 2 0 から- 1 0 日目；- 1 0 から- 5 日目；- 7 から- 1 日目に、または約- 1 0 0 から- 5 0 日目；約- 5 0 から- 4 0 日目；約- 4 0 から- 3 0 日目；約- 3 0 から- 2 0 日目；約- 2 0 から- 1 0 日目；約- 1 0 から- 5 日目；約- 7 から- 1 日目に投与され得る。例えば、E C D I 処置細胞は、ドナーの細胞、臓器、および／または組織の移植の 7 日前（例えば、- 7 日目）に投与されてもよい。いくつかの場合には、E C D I 処置細胞は、ドナーの細胞、臓器、および／または組織の移植と同じ日（例えば、0 日目）に投与されてもよい。いくつかの場合には、E C D I 処置細胞は、0 日目のドナーの細胞、臓器、および／または組織の移植に対して、1 0 0 日目、9 0 日目、8 0 日目、7 0 日目、6 0 日目、5 0 日目、4 0 日目、3 0 日目、2 0 日目、1 5 日目、1 4 日目、1 3 日目、1 2 日目、1 1 日目、1 0 日目、9 日目、8 日目、7 日目、6 日目、5 日目、4 日目、3 日目、2 日目もしくは1 日目に、または約1 0 0 日目、約9 0 日目、約8 0 日目、約7 0 日目、約6 0 日目、約5 0 日目、約4 0 日目、約3 0 日目、約2 0 日目、約1 5 日目、約1 4 日目、約1 3 日目、約1 2 日目、約1 1 日目、約1 0 日目、約9 日目、約8 日目、約7 日目、約6 日目、約5 日目、約4 日目、約3 日目、約2 日目もしくは約1 日目に投与されてもよい。例えば、抗原カップリングされた細胞および／またはエピトープカップリングされた細胞は、0 日目のドナーの細胞、臓器、および／または組織の移植に対して、1 0 0 から5 0 日目；5 0 から4 0 日目；4 0 から3 0 日目；3 0 から2 0 日目；2 0 から1 0 日目；1 0 から5 日目；7 から1 日目に、または約1 0 0 ～5 0 日目；約5 0 から4 0 日目；約4 0 から3 0 日目；約3 0 から2 0 日目；約2 0 から1 0 日目；約1 0 から5 日目；約7 から1 日目に投与され得る。例えば、E C D I 処置細胞は、ドナーの細胞、臓器、および／または組織の移植の 1 日後（例えば、1 日目）に投与されてもよい。

【0 3 5 4】

本明細書の方法は、レシピエントの体重1 k g あたり少なくともまたは少なくとも約0 . 2 5 × 1 0 ⁹ 個の E C D I 処置細胞（例えば、ドナー脾細胞）を投与するステップを含み得る。例えば、レシピエントの体重1 k g あたり少なくともまたは少なくとも約1 × 1 0 ⁷、1 × 1 0 ⁸、0 . 2 5 × 1 0 ⁹、0 . 5 0 × 1 0 ⁹、0 . 7 5 × 1 0 ⁹、1 . 0 0 × 1 0 ⁹、1 . 2 5 × 1 0 ⁹、1 . 5 0 × 1 0 ⁹、1 . 7 5 × 1 0 ⁹ または2 × 1 0 ⁹ 個の E C D I 処置細胞（例えば、ドナー脾細胞）、E C D I 処置細胞を投与してもよい。E C D I 処置細胞はまた、脾臓の B 細胞であってもよい。本明細書の方法は、レシピエントの体重1 k g あたり1 × 1 0 ⁸ からまたは約1 × 1 0 ⁸ から2 × 1 0 ⁹、例えば、1 × 1 0 ⁸ から2 × 1 0 ⁸、1 × 1 0 ⁸ から3 × 1 0 ⁸、1 × 1 0 ⁸ から4 × 1 0 ⁸、1 × 1 0 ⁸ から5 × 1 0 ⁸、1 × 1 0 ⁸ から1 × 1 0 ⁹ 個までの E C D I 処置細胞（例えば、ドナー脾細胞）を投与するステップを含み得る。

【0 3 5 5】

ドナー脾細胞は、新鮮に単離されてもよい。あるいは、E C D I 処置細胞は、e x - v i v o で拡大増殖され得る。いくつかの場合には、ドナー脾細胞は、少なくともまたは少なくとも約1 0 %、例えば、2 5 % の C D 2 1 陽性 S L A クラス I I 陽性 B 細胞を含む。例えば、ドナー脾細胞は、少なくともまたは少なくとも約1 0 %、1 5 %、2 0 %、2 5 %、3 0 %、3 5 %、4 0 %、4 5 %、5 0 %、5 5 % または6 0 % の C D 2 1 陽性 S L A クラス I I 陽性 B 細胞（例えば、少なくともまたは少なくとも約1 0 から2 0；2 0 から3 0；3 0 から4 0；または4 0 から5 0 %）を含む。いくつかの場合には、脾臓の B

細胞は、少なくともまたは少なくとも約60%、例えば、90%のCD21陽性SLAクラスII陽性B細胞を含む。例えば、脾臓のB細胞は、少なくともまたは少なくとも約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%または95%のCD21陽性SLAクラスII陽性B細胞（例えば、少なくともまたは少なくとも約60から70；70から80；80から90；または90から95%）を含む。いくつかの場合には、ドナー脾細胞は、50%からまたは約50%から100%、例えば、60%からもしくは約60%から100%、または80%からもしくは約80%から100%までのCD21陽性SLAクラスII陽性B細胞を含む。

【0356】

ECDI処置細胞は、静脈内に与えられてもよい。ECDI処置細胞は、静脈内に注入される。いくつかの場合には、ECDI処置細胞は、レシピエントの体重1kgあたり少なくともまたは少なくとも約1ml、2ml、3ml、4ml、5ml、10ml、20ml、30ml、40mlまたは50ml、例えば、少なくともまたは少なくとも約1から2；2から3；3から4；4から5；1から5；5から10；10から20；20から30；30から40；または40から50の体積で静脈内に与えられてもよい。例えば、ECDI処置細胞は、レシピエントの体重1kgあたり7mlの体積で静脈内に与えられる。

【0357】

本明細書の方法は、免疫寛容化レシピエント（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）に1つまたは複数のドナー細胞を移植することによって疾患を処置することをさらに含み得る。

【0358】

方法は、NOD様受容体ファミリーCARDドメイン含有5（NLRC5）、抗原プロセッシング関連トランスポーター1（TAP1）、GGTA1、B4GALNT2、CMAH、C-X-Cモチーフケモカイン10（CXCL10）、MHCクラスIポリペプチド関連配列A（MICA）、MHCクラスIポリペプチド関連配列B（MICB）、またはクラスII主要組織適合遺伝子複合体トランスアクチベーター（CIITA）から選択される1つまたは複数の破壊された遺伝子を細胞（例えば、ECDI処置細胞）に提供するステップを含み得る。ECDI処置細胞は、同じドナー由来であってもよい。さらに、ECDI処置細胞は、さらに、ICP47、CD46、CD55、CD59、またはそれらの任意の組合せから選択される1つまたは複数の導入遺伝子を含んでもよい。いくつかの場合には、ドナー細胞は、脾臓細胞であってもよい。いくつかの場合には、1つまたは複数の破壊された遺伝子は、GGTA1を含まない。

【0359】

拮抗性の抗CD40モノクローナル抗体2C10は、他の免疫療法（sTNFR、抗IL-6R、mTOR阻害剤、抗CD20モノクローナル抗体を含むおよび含まない、ならびにCTLA4-Igを含むおよび含まない）と組み合わせて、およびドナーアポトーシス性細胞の静脈内注入の有無と組み合わせて与えてもよい。この処置は、霊長類、例えば、サルにおいて、顕著かつ前例のない脾臓同種グラフトおよびブタ脾臓異種グラフトの生存を容易にし得る。例えば、最も顕著なのは、外因性のインスリンの中断、および移植後21日目または約21日目の全免疫抑制にかかわらず、移植されたサルにおける優れた血糖制御の維持である。例としては、少なくともまたは少なくとも約200日間、4匹のサルのうち3匹での優れた脾臓同種グラフト機能の維持（2匹はドナーのアポトーシス性細胞の投与なしで1匹はあり）、および少なくともまたは少なくとも約100日間、1匹のサルのうち1匹での優れた脾臓異種グラフト機能の維持（ドナーアポトーシス性細胞の投与あり）が挙げられる。

【0360】

使用の他の方法は、i) 遺伝子改変されたグラフトの拒絶予防のための抗CD40モノクローナル抗体2C10または同様の抗体の一過性または低頻度の使用、ii) 炎症を標的化する他の免疫療法（例えば、補体阻害剤およびサイトカインおよびケモカイン阻害剤、例えば、IL-8阻害剤レパラキシン）と組み合わせた移植術における、抗CD40モ

10

20

30

40

50

ノクローナル抗体 2 C 1 0 または同様の抗体の一過性または低頻度の使用、ならびに機能的なヒト臍島ベータ細胞などの幹細胞由来細胞性グラフトの予防のための抗 C D 4 0 モノクローナル抗体 2 C 1 0 または同様の抗体の使用を含み得る。

【0361】

本明細書の方法は、ドナーの細胞、臓器、および／または組織の移植の前、後、および／または間にレシピエントに1つまたは複数の用量の抗 C D 4 0 抗体を投与してレシピエントにおいてドナー特異的な寛容を誘導するステップを含み得る。いくつかの場合には、第1の用量の抗 C D 4 0 抗体は、0日目のドナーの細胞、臓器、および／または組織の移植に対して、－100日目、－90日目、－80日目、－70日目、－60日目、－50日目、－40日目、－30日目、－20日目、－15日目、－14日目、－13日目、－12日目、－11日目、－10日目、－9日目、－8日目、－7日目、－6日目、－5日目、－4日目、－3日目、－2日目もしくは－1日目に、または約－100日目、約－90日目、約－80日目、約－70日目、約－60日目、約－50日目、約－40日目、約－30日目、約－20日目、約－15日目、約－14日目、約－13日目、約－12日目、約－11日目、約－10日目、約－9日目、約－8日目、約－7日目、約－6日目、約－5日目、約－4日目、約－3日目、約－2日目もしくは約－1日目に与えられてもよい。いくつかの場合には、第1の用量の抗 C D 4 0 抗体を、0日目のドナーの細胞、臓器、および／または組織の移植に対して、－100日から－50日目；－50日から－40日目；－40日から－30日目；－30日から－20日目；－20日から－10日目；－10日から－5日目；－7日から－1日目にまたは約－100日から－50日目；約－50日から－40日目；約－40日から－30日目；約－30日から－20日目；約－20日から－10日目；約－10日から－5日目；約－7日から－1日目に与えられてもよい。例えば、第1の用量の抗 C D 4 0 抗体は、ドナーの細胞、臓器、および／または組織の移植の8日前（例えば、－8日目）に与えられてもよい。

【0362】

異なる用量の抗 C D 4 0 抗体を、レシピエントに、ドナーの細胞、臓器、および／または組織の移植の前、後および／または間に与えて、レシピエントにおいてドナー特異的な寛容を誘導してもよい。いくつかの場合には、第1の用量の抗 C D 4 0 抗体は、レシピエントの体重1 kgあたり、少なくともまたは少なくとも約1 mg、5 mg、10 mg、20 mg、30 mg、40 mg、50 mg、60 mg、70 mg、80 mg、90 mg、100 mgまたは200 mgの抗 C D 4 0 抗体を含んでもよい。ある特定の場合には、第1の用量の抗 C D 4 0 抗体は、レシピエントの体重1 kgあたり少なくともまたは少なくとも約30 mg、40 mg、50 mg、60 mg、70 mgの抗 C D 4 0 抗体を含んでもよい。いくつかの場合には、第1の用量の抗 C D 4 0 抗体は、レシピエントの体重1 kgあたり1 mgからもしくは約1 mgから200 mg、例えば、20 mgからもしくは約20 mgから100 mg；30 mgからもしくは約30 mgから80 mg；30 mgからもしくは約30 mgから70 mg；40 mgからもしくは約40 mgから70 mg；40 mgからしくは約40 mgから60 mg；50 mgからしくは約50 mgから70 mg；または60 mgからしくは約60 mgから80 mgまでの抗 C D 4 0 抗体を含んでもよい。

【0363】

図6は、ブタ対カニクイザルの臍島異種移植術における移植拒絶予防についての例示的なプロトコールを実証する。0日目（移植術の日）に1 kgあたり25,000個の臍島等価物を移植されたカニクイザルについて、移植拒絶予防についてのプロトコールは、カニクイザルに対して、－7日目および1日目にE C D I 固定の、アポトーシス性ドナー臍細胞を投与すること、－8日目、－1日目、7日目、14日目にα-C D 4 0（例えば、2 C 1 0）50 mg/kgを投与すること、－10日目、－3日目、5日目、および12日目にα-C D 2 0 抗体（例えば、リツキシマブ）20 mg/kgを投与すること、ラパマイシン（標的トラフ15～25 ng/mL）を投与すること、s T N F R（－7日目および0日目に1 mg/kg、ならびに3日目、7日目、10日目、14日目、および21

日目に0.5 mg/kgを投与すること、ならびに－7日目、0日目、7日目、14日目および21日目にα-IL-6R抗体を投与することを含み得る。

【実施例】

【0364】

(実施例1：ブタでGGTA1、CMAH、NLRC5、B4GALNT2、および／またはC3遺伝子を破壊するためのガイドRNAを発現するプラスミドの生成)

遺伝子改変されたブタは、レシピエントにおいて低い免疫拒絶を誘導するか、もしくは免疫拒絶を誘導しない移植グラフト、および／または細胞を、レシピエントにおける免疫寛容化を増強する寛容化ワクチンとして提供する。このようなブタは、遺伝子改変されていない対応する動物と比較して、MHC分子（例えば、MHC I分子および／またはMHC II分子）を調節する任意の遺伝子の発現が低減されている。このような遺伝子の発現の低減は、MHC分子の発現および／または機能の低減を生じる。これらの遺伝子は、MHC I 特異的エンハンセオソームの成分、MHC I 結合性ペプチドのトランスポーター、ナチュラルキラー群2Dリガンド、CXCR3リガンド、C3、およびCIITAのうちの1つまたは複数である。さらに、またはあるいは、このようなブタは、ヒトでは発現されていない内因性遺伝子の低減されたタンパク質発現を含む（例えば、CMAH、GGTA1および／またはB4GALNT2）。例えば、このブタは、NLRC5、TAP1、C3、CXCL10、MICA、MICB、CIITA、CMAH、GGTA1および／またはB4GALNT2のうちの1つまたは複数の低減されたタンパク質発現を含む。いくつかの場合には、ブタは、NLRC5、C3、CXCL10、CMAH、GGTA1および／またはB4GALNT2の低減されたタンパク質発現を含む。

【0365】

この実施例は、CRISPR/Cas9システムを使用するブタにおける、GGTA1、CMAH、NLRC5、B4GALNT2、および／またはC3遺伝子を破壊するためのプラスミドを生成するための例示的な方法を示す。このプラスミドは、Cas9 DNA エンドヌクレアーゼおよびガイドRNAを同時に発現した、px330ベクターを使用して生成した。

【0366】

px330-U6-キメラ-BB-CBh-hSpCas9 (#42230) プラスミドは、細菌の穿刺培養形式でAddgeneから入手した。穿刺培養は、アンピシリンを含む事前に温めたLBアガープレート上にストリークして、37℃で一晩インキュベートした。翌日、単一のコロニーを選択して、アンピシリンを含む液体LB一晩培養物に接種した（ミニプレップに関して5 mL、またはマキシプレップについて80～100 mL）。ミニプレップは、製造業者の指示に従って、Qiagenキットを使用して行った。プラスミドは、ヌクレアーゼを含まない水中で溶出して、ストックを－20℃で保管した。GGTA1、CMAH、NLRC5、C3、およびB4GALNT2を標的化するために設計したオリゴヌクレオチドを表6に示す。オリゴヌクレオチドを、IDTによって合成した。図7A～図7E、図8A～図8E、図9A～図9E、図10A～図10E、および図11A～図11Eは、GGTA1（すなわち、px330/Gal2-1）（図7A～図7E）、CMAH（すなわち、px330/CM1F）（図8A～図8E）、NLRC5（すなわち、px330/NL1_第1）（図9A～図9E）、C3（すなわち、px330/C3-5）（図10A～図10E）、およびB4GALNT2（すなわち、px330/B41_第2）（図11A～図11E）を標的化するプラスミドをクローニングするためのクローニングストラテジーを示す。構築されたpx330プラスミドを、表7に示されるシークエンシングプライマーを使用してシークエンシングすることによって確認した。オリゴヌクレオチドを、ヌクレアーゼを含まない水を用いて100 μMで再懸濁して、－20℃の冷凍庫中に保管した。

【0367】

ベクター消化：px330ベクターを、5 μgのpx330ストック、5 μLの10×Fast Digest Reaction Buffer、35 μLのヌクレアーゼを含

まない水、および5 μ LのFast Digest Bbs I 酵素（切断部位：GAAGAC）を含有する反応溶液中で消化した。その反応溶液は、37℃で15分間インキュベートし、65℃で15分間熱不活性化した。ベクターを脱リン酸化するために、0.2 μ L（2 U；1 U／1 pmolのDNA末端）CIPを添加して、得られた混合物を、37℃で60分間インキュベートした。直線化したプラスミドを、Qiagen PCR Cleanupキットを使用して精製し、ヌクレアーゼを含まない水で溶出して、使用まで-20℃で保管した。

【0368】

オリゴヌクレオチドアニーリングおよびリン酸化：溶液は、1 μ Lの100 uMのフォワードオリゴヌクレオチド、1 μ Lの100 uMのリバースオリゴヌクレオチド、1 μ Lの10×T4 Ligase Buffer、6 μ Lのヌクレアーゼを含まない水、1 μ LのPolynucleotide Kinase（PNK）を混合することによって作製した。得られた溶液を、以下のプログラムで行うサーマルサイクラーでインキュベートした：37℃で30分間、95℃で5分間、1秒あたり0.1℃で25℃まで低下。

【0369】

ライゲーション反応：溶液は、希釈されたアニーリングされたオリゴヌクレオチド（1：250）と、ヌクレアーゼを含まない水、2 μ Lの希釈されたアニーリングされたオリゴヌクレオチド、100 ngの直線化され／脱リン酸化されたpx330ベクター、5 μ Lの10×T4 Ligase Buffer、ヌクレアーゼを含まない水（50 μ Lの最終体積を得るため）、および2.5 μ LのT4 DNAリガーゼを混合することによって作製した。その溶液を、室温で4時間インキュベートし、次いで、65℃で10分間熱不活性化した。

【0370】

形質転換：TOP10 E. coli バイアルを、形質転換の前15分間、氷上で-80℃の冷凍庫から解凍させた。2 μ Lのライゲーション反応生成物を、細胞に添加し、チューブを穏やかに軽く叩くことによって混合した。そのチューブを、氷上で5分間インキュベートして、42℃の水浴中で30秒間熱ショックを与え、熱ショック後、さらに2分間氷上に戻した。50 μ Lの形質転換された細胞をアンピシリンを含むLBアガープレート上にプレートして、ピペット先端部で広げた。そのプレートを、37℃で一晩インキュベートした。

【0371】

正確に挿入されたオリゴヌクレオチドについてのコロニーPCRスクリーニング：3×コロニーを、プレートから選択して、プレートの底に1～3と標識した。PCR反応のためのマスター混合物は、15 μ Lの10×Standard Taq Reaction Buffer、3 μ Lの10 mM dNTP mix、0.5 μ Lの100 uM px330-F1プライマー（表7中の配列番号125）、0.5 μ Lの100 uM px330-R1プライマー（表7中の配列番号126）、130 μ Lのヌクレアーゼを含まない水、および1 μ LのStandard Taq Polymeraseを混合することによって調製した。マスター混合物は、短時間ボルテックスし、次いで1～3と標識した3×PCRのチューブに50 μ Lを分注した。ピペット先端部を、アガープレート上のコロニー#1に軽く塗って、次いでPCRチューブ#1中でピペットで吸引・排出した。各々のコロニーについての繰り返しを、各々のコロニーについて新しい先端部を使用してスクリーニングした。チューブをサーマルサイクラー中に入れて、以下のプログラムを行った：95℃で5分間、95℃で30秒間、52℃で30秒間、68℃で30秒間、サイクルステップ2～4を30サイクル、68℃で5分間、使用まで4℃で保持。PCRクリーンアップは、Qiagen PCR Cleanup Kitを使用し、かつ製造業者のプロトコールに従って行った。生成物を、ヌクレアーゼを含まない水中で溶出した。

【0372】

シーケンシングのための試料調製：溶液は、120 ngのPCR生成物、6.4 pmolのpx330-F1プライマー（1 μ Lの6.4 μ Mストック）、および最終体積を

10

20

30

40

50

12 μ Lにする、ヌクレアーゼを含まない水を混合することによって作製された。配列データが得られた後、正確な配列挿入を特定した。正確な挿入を有するコロニーのグリセロールストックを調製した。#1～3としてコロニーPCRの間に標識したLBアガープレート上で、正確に挿入されたコロニーを、ピペット先端部で軽く塗ること、および培地のチューブ中に押し出すことによってアンピシリンを含む5 mLのLB培地中に接種した。液体培養物を、ODが、1.0～1.4の間に達するまで、増殖させた。500 μ Lの細菌培養物を、冷凍保存バイアル中の500 μ Lの無菌の50%グリセロールに添加して、 -80°C の冷凍庫に移すまで直ちにドライアイス上に置いた。

【表6】

表 6.GGTA1、CMAH、NLRC5、C3、およびB4GALNT2を標的化するガイドRNA構築

物を作製するための例示的なオリゴヌクレオチド

遺伝子	配列番号	フォワード配列(5'から3')	配列番号	リバース配列(5'から3')
C3	113	acaccgcaaggggatattcggttg	114	aaaacaaaccgaatatcccttgcg
B4GALNT2 (オプション1)	115	acaccgtgcttttggtcctgagcgtg	116	aaaacacgctcaggacaaaagcagc
B4GALNT2 (オプション2)	117	acaccgtcgatcctcaagatattgag	118	aaaactcaatatcttgaggatcgacg
GGTA1	119	acaccggggagagaagcagaggatgg	120	aaaaccatcctctgcttctctccccg
CMAH	121	acaccgtagaaaaggatgaagaaaag	122	aaaactttttctcatccttttctacg
NLRC5	123	acaccggcctcagacccacacagag	124	aaaactctgtgtgggtctgaggccg

【表7】

表 7.px330 プラスミドの例示的なシーケンシングプライマー

配列番号	フォワード配列(5'から3')	配列番号	リバース配列(5'から3')
125	gccttttgcctggccttttgcctc	126	cgggccatttaccgtaagtattgtaacg

【0373】

(実施例2：ブタにおけるRos26遺伝子座を標的化するガイドRNAを発現するプラスミドの生成)

MHC欠損のあるブタは、レシピエントにおいて低い免疫拒絶を誘導するか、または免疫拒絶を誘導しない移植グラフトを提供する。MHC機能を阻害する外因性タンパク質を、ブタで発現させてMHC欠損を生じる。このプロジェクトにさらにそう本発明者らの別の目的は、1つまたは複数のタンパク質の遍在性の発現を指向する遍在性プロモーターの制御下に1つまたは複数のタンパク質をコードする1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを挿入することである。この実施例によって、このような遍在性プロモーターRos26の1つを標的化するガイドRNAを発現するプラスミドの生成が示される。Ros26プロモーターは、Ros26遺伝子座での遺伝子の遍在性の発現を指向する。したがって、トランスジェニックブタは、Ros26遺伝子座で外因性タンパク質をコードする導入遺伝子を挿入することによって生成され、その結果、遺伝子生成物は、ブタの全ての細胞で発現される。Ros26を標的化するガイドRNAを発現するプラスミドを使用して、Ros26遺伝子座への導入遺伝子の挿入を容易にする。この実施例は、CRISPR/cas9システムを使用して、ブタでRos26遺伝子座を標的化するためのプラスミドを生成するための例示的な方法を示す。このプラスミドは、Cas9

DNAエンドヌクレアーゼおよびガイドRNAを同時に発現するために使用された、p x 330ベクターを使用して生成した。

【0374】

Rosa26のシーケンシング：

【0375】

ブタにおけるRosa26遺伝子座を標的化するガイドRNAを設計するために、ブタのRosa26をシーケンシングして、正確な配列情報を得た。

【0376】

プライマー設計：プライマーを生成するために利用されるRosa26参照配列は、Kongら、Rosa26 Locus Supports Tissue-Specific Promoter Driving Transgene Expression Specifically in Pig.、PLOS ONE、2014年；9巻（9号）：e107945頁、Liら、Rosa26-targeted swine models for stable gene over-expression and Cre-mediated lineage tracing.、Cell Research、2014年；24巻（4号）：501～504頁、およびLiら、Identification and cloning of the porcine ROSA26 promoter and its role in transgenesis.、Transplantation Technology、2014年：2巻（1号）からとった。次いで、参照配列は、ブタゲノムデータベース（NCBI）を検索することによって、およびEnsembl Genome Browserを使用することによって拡張した。ベースの配列を、4つの1218塩基対領域に分けて、プライマー設計を容易にした。プライマーは、Integrated DNA Technologies' PrimerQuest Toolを使用して設計し、次いで、StandardヌクレオチドBLASTを使用してSus scrofa参照ゲノム配列に対して検索して、特異性についてチェックした。プライマー長は、200～250塩基対に限定された。プライマーアニリング温度は、1000nMのプライマー濃度に関してNew England Tm Calculator、およびTaq DNA Polymerase Kitを使用して算出した。

【0377】

PCR：PCRは、Standard Taq Buffer（New England Biolabs）とともにTaq DNAポリメラーゼを使用して行った。PCRに使用したDNA鋳型は、クローニングしたブタから単離した細胞から抽出した。PCR条件は、以下の30サイクルであった：95℃、30秒；50℃、30秒、51℃30秒、52℃30秒、53℃30秒、54℃30秒、55℃30秒；および68℃で30秒間の伸長ステップ。PCR生成物は、QIAquick PCR Purification Kit（Qiagen）を使用して精製した。シーケンシングに使用するプライマーは、表8に列挙する。

10

20

30

【表 8 - 1】

表 8:Rosa26 をシーケンシングするための例示的な PCR プライマー

配列番号	プライマー名	配列(5'から 3'まで)
127	R26F008	tctgattggctgctgaagtc
128	R26F013	gtagecagecaagtcataaate
129	R26R013	gggagtattgctgaacctca
130	R26F014	tcttgactaccactgctgattg
131	R26R014	gttaggagccagtaatggagtt
132	R26F015	agtgtctctgtctccagtatct
133	R26R015	ttggtaaataagcaatcaactcagt
134	R26F016	ttctgtctcaagtcacactga
135	R26R016	caagcaatgacaacaacctgata
136	R26F017	ttgctttctctgatcccatag
137	R26R017	cagtgtctaatctagagcactacc
138	R26F018	cattctctgaagagctcagaat
139	R26R018	tccattgggctttgtctatactt
140	R26F019	gacaaaggaaattagcagagaacc
141	R26R019	aactgggtctttcccttgatatt
142	R26F020	ctggtctgcageatcaatate
143	R26R020	gcctctattaattgccttccc
144	R26F021	ccattcacttgcatecct
145	R26F005	cgggaagtcgggagcata
146	R26R005	gaggagaagcggccaate
147	R26F006	ctgtcttctctgtcactgatt
148	R26R006	gcgggagccacttccac
149	R26F008	tctgattggctgctgaagtc
150	R26R008	cgagagcaggtagagctagt
151	R26F010	ggagtgcgcgaataaccttta
152	R26R010	cctggactcatttccatctc
153	R26F011	gggtggagatgggaaatgag

10

20

30

40

【表 8 - 2】

154	R26F012	gtacaccaccaaagtatagca
155	R26R012	tggtggtggaacttatctgatt
156	R26F023	agggggtacacattctctga
157	R26R023	gacctctgggttcattggg
158	R26F024	caaagcccaatggaaccag
159	R26F025	gaaggggctttccaacagt
160	R26F026	gccaagacagggaaaacga
161	R26R026	tgacaactctggctcgtctg
162	R26F028	cagagagcctcggtaggta
163	R26R028	aatggctccgtccgtatcc
164	R26F029	gggaagtcgggagcatatcg
165	R26R029	cactcccaggtctgaactg
166	R26F030	atggcgtgttttggttgag
167	R26R030	ggagccaatttcactgacce
168	R26F031	gggagggtcagtgaagtgg
169	R26R031	gagggccgtaccaaagacc
170	R26F032	ggtcccaatgagcgaaacc
171	R26R032	gggtccgagagcaggtagag
172	R26F033	ccgcctgaaggacgagacta
173	R26R033	caggcggtccttaggaaaa
174	R26F034	gggagtgccgcaataccttt
175	R26R034	gaaattgggctcgtcctcgt
176	R26F035	cgaggacgagcccaattct
177	R26R035	agtgagggggcctaaggttt
178	R26F037	actaccactgcgattggacc
179	R26R037	aggagccagtaatggagtgt
180	R26F038	cacaactccattactggctcct
181	R26R038	ggagggtagcattccagagg
182	R26F021	ccattcacttgcatecct
183	R26R021	ttgcagatgattgcttcttc

10

20

30

40

【表 8－3】

184	R26F023	agggggtacacattctcctga
185	R26R023	gacctctgggttccattggg
186	R26F025	gaaggggctttcccaacagt
187	R26R025	gtggcgtatgccccagtatc

【0378】

シーケンシング解析：SnapGeneソフトウェアを使用して、DNA配列をアラインメントさせた。DNA配列の結果は、ミネソタ大学バイオゲノミクスセンター（University of Minnesota Biogenomics Center）から受け取った後、SnapGeneソフトウェアにアップロードして、解析のためにソフトウェアでアラインメントさせた。塩基対の置換、欠失および挿入は、クロマトグラムを参照することによって決定して、異なるプライマーを使用して増幅したDNA断片の配列を比較することによって確認した。全ての編集および確認を行った際、得られた新規のDNA親配列を、元の親のDNA配列をアラインメントさせた配列で置き換えることによって作製した（配列番号188、図12に示されるマップ）。Rosa26配列は、参照Rosa26配列とは異なった。例えば、塩基対の置換は、223、420、3927、4029、および4066位に、そして塩基対の欠失は、2692～2693位の間にあった。ヌクレオチド置換および欠失によって、この配列は固有のものになる（図12）。したがって、このシーケンシングデータによって、Rosa26遺伝子座を標的化するガイドRNAを設計するためのさらに正確な配列情報が得られた。

【0379】

Rosa26を標的化するガイドRNAを発現するプラスミドの生成

Rosa26を標的化するオリゴヌクレオチドを設計してIDTによって合成した。ガイドRNAの配列を表9に示す。Rosa26を標的化するガイドRNAを発現するpx330プラスミドを、実施例1に記載の方法を使用して生成した。図13A～図13Eは、Rosa26を標的化するプラスミド（すなわち、px330/Rosaエクソン1）をクローニングするためのクローニングストラテジーを示す（図13A～図13E）。この構築されたpx330プラスミドを、表7に示すシーケンシングプライマーを使用するシーケンシングによって確認した。

【表9】

表9.Rosa26を標的化するガイドRNA構築物を作製するための例示的なオリゴヌクレオ

チド

遺伝子	配列番号	フォワード配列(5'から3')	配列番号	リバース配列(5'から3')
Rosa26	189	acaccgcggggccgctagagaagg	190	aaaaccttctctaggcgccccggcg

【0380】

（実施例3：ブタ細胞中のRosa26遺伝子座におけるHLA-G1導入遺伝子の挿入）

導入遺伝子は、ブタが全ての細胞中で導入遺伝子が発現するようにブタのRosa26遺伝子座に挿入する。この実施例は、ブタ細胞（例えば、ブタ胎仔線維芽細胞）におけるRosa26遺伝子座へHLA-G1のcDNAを挿入するための例示的な方法を示す。得られた細胞を使用して、ブタでHLA-G1の遍在性の発現を指向する、Rosa26プロモーターによって制御されるHLA-G1を発現するブタを生成する。

【0381】

G G T A 1 または R o s a 2 6 に特異的な 1 0 0 0 b p の相同性アームを有する H L A - G 1 遺伝子構築物を作製して、P C R およびシーケンシングによって確認する。H L A - G 1 の c D N A 配列を表 2 に示し、H L A - G のゲノム配列を配列番号 1 9 1 に示す。H L A - G のゲノム配列および c D N A のマップを、図 1 4 A ~ 図 1 4 B に示す。細胞中の G G T A 1 および R o s a 2 6 の隣接領域をシーケンシングする。構築物による H L A - G 1 の発現を確認する。シーケンシングおよび発現の確認の後、遺伝子標的化構築物を、導入遺伝子とアセンブルして、体性ブタ細胞を改変するために使用される相同性ドメイン修復鋳型を作製する。C R I S P R / C a s 技術を使用して、G G T A 1 または R o s a 2 6 を、プラスミド発現のガイドRNAオリゴを用いて標的化して、効率的な遺伝子標的化および改変を可能にする。ガイドRNAによって作製される二本鎖DNAの切断を、導入遺伝子を組み込むDNA修復を誘導する 1 0 0 0 b p の相同性アームを有する H L A - G 1 遺伝子構築物の存在において作製する。決定されたオープンリーディングフレーム全体にわたる（イントロン領域を除く）プロモーター配列の 5 0 b p 内の挿入部位を、P A M 配列およびプロモーター強度の存在に基づいて試験して、追加の C a s 9 発現性プラスミドの存在下で導入遺伝子発現を駆動する。トランスジェニックおよびノックアウトの表現型は、フローサイトメトリー（例えば、サイトゾルおよび膜表面での導入遺伝子発現の検出）、ウエスタンブロッティング、およびDNA/RNAシーケンシングによって評価する。

10

【0382】

（実施例4：2つのガイドRNAを同時に発現するプラスミドの生成）

20

2つのガイドRNAを同時に発現する代替的ベクター（例えば、p x 3 3 3）はまた、単一遺伝子の2つの領域を標的化するガイドRNAを発現するためにも使用する。C R I S P R / c a s 9 システムによって単一遺伝子の2つの領域を標的化することで、DNAと一緒に修復されるときに2つの切断部位の間の全体的な遺伝子の除去が生じる。2つの領域を標的化することは、2対立遺伝子ノックアウトを生じる機会を増大し、結果として、遺伝子中の1つの遺伝子座のみを標的化することに比べて、陰性の遺伝子型を有するブタを生成するのに優れたソート、より多くの2対立遺伝子欠失および全体的な機会の高さが生じる。

【0383】

p x 3 3 3 プラスミド構築で使用されるオリゴヌクレオチド対は、p x 3 3 0 プラスミドに使用されるオリゴヌクレオチドと比較して、高いG含量、低いA含量、および可能な限り多くのG G G G の四つ組を含有する。G G T A 1 標的は、ほぼG G T A 1 遺伝子全体にまたがり、これがこのゲノムから全体的な遺伝子を除去する。さらに、このストラテジーを用いて複数の部位を標的化することは、このプロジェクトにさらにそった本発明者らの別の目標である、導入遺伝子挿入の際に使用される。

30

【0384】

（実施例5：遺伝子改変されたブタを作製するためのブタ胎仔線維芽細胞の単離、培養およびトランスフェクション）

ある遺伝子を標的化するガイドRNAを発現する p x 3 3 0 プラスミドを使用して遺伝子改変されたブタを生成するために、p x 3 3 0 プラスミドを、ブタ胎仔線維芽細胞にトランスフェクトした。このトランスフェクトされた線維芽細胞は、1つまたは複数の標的遺伝子の破壊を生じるガイドRNAを発現する。得られた線維芽細胞を、例えば、体細胞核移入によって、遺伝子改変されたブタを作製するために使用した。この実施例によって、ブタ胎仔線維芽細胞の単離および培養、ならびに p x 3 3 0 プラスミドでの線維芽細胞のトランスフェクションが示される。

40

【0385】

細胞培養

【0386】

遺伝子改変されたブタの生成に使用した胎仔線維芽細胞株としては以下が挙げられた：K a r o l i n e F e t a l （臍島単離の後に高い臍島収量を示した雌性ブタドナーP

50

1101由来)、Marie Louise Fetal (臍島単離の後に高い臍島収量を示した雌性ブタドナーP1102由来)、Slaughterhouseブタ#41 (雄性;天然の臍臓において多数の臍島を示した(極めて高いジチゾン(DTZ)スコアで評価されたとおり))、Slaughterhouseブタ#53 (高いジチゾン(DTZ)スコアで評価されたとおり天然の臍臓において多数の臍島を示した)。

【0387】

これらのブタの各々からとった筋肉および皮膚の組織試料を、切開して培養して、線維芽細胞を増殖させた。次いで、この細胞を回収して、体細胞核移入(SCNT)に使用し、クローンを生成した。複数の胎仔(最大8)を30日目に回収した。胎仔を、別々に解剖して、150mmのディッシュにプレートして、胎仔線維芽細胞を成長させた。培養を通して、胎仔細胞株を、別々に保持し、各々のチューブまたは培養容器上に胎仔番号を標識した。コンフルエントになったとき、細胞を回収して、液体窒素凍結貯蔵のために10%のDMSOを含むFBS中で1mLあたり約百万個の細胞に凍結して戻した。

10

【0388】

培養培地調製物: 5mLのGlutamax、5mLのpen/strep、および25mLのHI-FBS(標準の5%FBS培地について;貯蔵細胞について10%FBSを使用する)を、DMEM、高グルコース、グルタミンなし、フェノールレッドなしの500mLのボトルに添加した。全ての胎仔線維芽細胞をスピンドウンするための遠心分離機設定は、4℃で0.4rcf(1600rpm)で5分であった。細胞を、水浴中で37℃まで急速に温めることによって液体窒素貯蔵から解凍させた。解凍した細胞を、十分にDMSOを希釈するのに十分な)約25mLの新鮮な、予め温めた培養培地に迅速に移した。次いで、細胞をスピンドウンして、上清を取り出し、細胞を、カウントまたはプレートのために1~5mLの新鮮な培養培地に再懸濁した。細胞は、予め温めた培地で3~4日ごとに培地交換して、TrypLE Express Dissociation Reagentを使用して90~100%コンフルエントのとき継代した。

20

【0389】

接着性の線維芽細胞の回収: 培地を細胞から吸引した。DPBSを添加して細胞を洗浄した。予め温めた(37℃)TrypLE Express試薬を細胞に添加した。最小量の試薬を使用して、細胞層を薄く覆った。細胞を、37℃で10分間インキュベートした。FBSを含有するある体積の培養培地を、TrypLE細胞懸濁物に添加して、酵素を中和した。細胞懸濁物をピペットで吸引・排出して、培養表面から全ての細胞を取り外した。その細胞懸濁物を、氷上の15または50mLの円錐管に移した。そのプレート/フラスコを、顕微鏡下でチェックして、全ての細胞を収集したことを確実にした。時に、培地洗浄で、後に残った細胞の収集を助けた。細胞をスピンドウンし、次いで新鮮な培養培地で再懸濁した(カウントのために1~5mLの間)。カウントする場合、1:5希釈の細胞懸濁物を、20μLの細胞懸濁物を80μLの0.2%のTrypan Blueに添加することによって調製した。懸濁物は、ピペットで吸引・排出することによってよく混合した。12~14μLの希釈物を、血球計数器に添加して、4コーナーをカウントした。数を平均した。例えば、各々のコーナーについて20、24、22、22のカウントで、平均22を得た。この数に希釈係数5を掛けて、 110×10^4 細胞/mLを得た。その数を、小数位を2つ左に動かすことによって 10^6 に補正した(1.10×10^6 細胞/mL)。最終的に、その数に、細胞の総数を得るためにどれくらい多くのmL数のもとの試料をとったかを掛けた。

30

40

【0390】

胎仔線維芽細胞のトランスフェクション

この実験は、胎仔線維芽細胞をトランスフェクトすることであった。このトランスフェクトされた胎仔線維芽細胞を使用して、体細胞核移入技術を使用して、遺伝子改変された動物を生成した。

【0391】

トランスフェクションに使用したGFPプラスミド(pSpCas9(BB)-2A-

50

GFP) は、それが GFP 発現領域を含有したこと以外は、p x 3 3 0 プラスミドの正確なコピーであった。

【0392】

GFPトランスフェクトの対照細胞：トランスフェクションは、Invitrogen の Neon Transfection System を使用して行った。キットは、10 μ L および 100 μ L の先端部サイズで供給された。実験前日または 2 日前に、細胞を、実験のサイズ、ならびに所望の細胞数および密度次第で適切な培養容器中にプレートした。トランスフェクションの日に約 80 % のコンフルエンスを達成した。

【0393】

実験の日に、Neon モジュールおよびピペットスタンドをバイオフィードにセットした。Neon 管を、ピペットスタンドに置いて、3 mL の緩衝液 E (Neon Kit) を Neon 管に添加した。そのモジュールを、オンにして、所望の設定まで調節した (胎仔ブタ線維芽細胞について：1300 V、30 ms、1 パルス)。細胞を、TrypLE を使用して回収して、カウントして実験の設定を決定した。必要量の細胞を、新しいチューブに移し、残りの細胞を再度プレートした。細胞を、カウント後にスピンドウンして、PBS 中で再懸濁して洗浄した。細胞をスピンドウンして、細胞の数および先端部のサイズについて表 10 に応じて緩衝液 R (Neon Kit) 中に再懸濁した。

【表 10】

表 10: 例示的な Neon(登録商標)プレートフォーマット、体積および推奨されるキット

フォーマット	細胞型	DNA (μg)	siRNA (nM)	Neon(登録商標)先端部	プレーティング培地の体積	細胞数	緩衝液 R または緩衝液 T
96 ウェル	接着	0.25-0.5	10-200	10 μL	100 μL	1-2 x 10 ⁴	10 μL/ウェル
	懸濁	0.5-1		10 μL		2-5 x 10 ⁴	10 μL/ウェル
48 ウェル	接着	0.25-1	10-200	10 μL	250 μL	2.5-5 x 10 ⁴	10 μL/ウェル
	懸濁	0.5-2		10 μL		5-12.5 x 10 ⁴	10 μL/ウェル
24 ウェル	接着	0.5-2	10-200	10 μL	500 μL	0.5-1 x 10 ⁵	10 μL/ウェル
	懸濁	0.5-3		10 μL		1-2.5 x 10 ⁵	10 μL/ウェル
12 ウェル	接着	0.5-3	10-200	10 μL	1 mL	1-2 x 10 ⁵	10 μL/ウェル
	懸濁	0.5-3		10 μL		2-5 x 10 ⁵	10 μL/ウェル
6 ウェル	接着	0.5-3 (10 μL) 5-30 (100 μL)	10-200	10 μL/100 μL	2 mL	2-4 x 10 ⁵	10 μL または 100 μL/ウェル
	懸濁	0.5-3 (10 μL) 5-30 (100 μL)		10 μL/100 μL		0.4-1 x 10 ⁶	10 μL または 100 μL/ウェル
60 mm	接着	5-30	10-200	100 μL	5 mL	0.5-1 x 10 ⁶	100 μL/ウェル
	懸濁	5-30		100 μL		1-2.5 x 10 ⁶	100 μL/ウェル
10 cm	接着	5-30	10-200	100 μL	10 mL	1-2 x 10 ⁶	100 μL/ウェル
	懸濁	5-30		100 μL		2-5 x 10 ⁶	100 μL/ウェル

【0394】

表 10 による DNA の適切な量を、細胞懸濁物に添加して、ピペットで吸引・排出することによって混合した。Neon 先端部を、このキットから Neon ピペットに適用して、細胞懸濁物の体積を Neon 先端部中に吸引した。そのピペットを、Neon 先端部が緩衝液 E に浸漬されるように、ピペットスタンド中の Neon 管に入れた。START を、「完了」メッセージが出現するまでモジュールインターフェース上で押圧した。そのピペットを、ピペットスタンドから取り出して、細胞懸濁物を、表 10 による適切なサイズのウェル中に抗生物質なしで、予め温めた、ある体積の培養培地中に排出した。

【0395】

上記のステップを、細胞懸濁物全体を使用するまで繰り返した。Neon 先端部を、2 回のトランスフェクションごとに交換し、Neon 管は 10 回のトランスフェクションごとに交換した。細胞を 37 °C で 24 時間インキュベートし、次いで培地を、抗生物質を含有する通常の培養培地と交換した。得られた細胞を約 5 日間培養して、Cas9 切断のた

めに、遺伝子ノックアウト後の表面タンパク質の完全なリサイクル、およびソーティングの前の適切な細胞分裂を可能にした。GFPプラスミドをトランスフェクトされた細胞を、図15に示した。

【0396】

(実施例6：RNAポリメラーゼを使用するpx330プラスミドによるガイドRNA生成の確証)

px330プラスミドがブタ胎仔線維芽細胞にトランスフェクトされた後、px330プラスミドによるガイドRNAの発現は、RNAポリメラーゼを使用して確証される。

【0397】

px330プラスミドによるガイドRNA生成は、RNAポリメラーゼによって正確に構築されたプラスミドの*in vitro*転写によって確証される。この実験は、標的領域のPCRを通じて導入されたプロモーターとT7 RNAポリメラーゼを使用する。T7 RNAポリメラーゼによるsgRNAの生成によって、プラスミドが転写されて、sgRNAが細胞に存在することが示される。反応生成物（例えば、sgRNA）のサイズのGel確証を使用して、RNAポリメラーゼによりsgRNA転写物を確認する。

【0398】

(実施例7：GGTA1遺伝子に対する蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション(FISH))

CRISPR/Cas9による遺伝子破壊は、細胞中のFISHを使用して確証された。この実施例は、蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション(FISH)を使用してGGTA1遺伝子を検出するための例示的な方法を示す。この方法を使用して、動物由来の細胞におけるGGTA1遺伝子の有無を確証した（例えば、GGTA1ノックアウトを含む動物）。

【0399】

FISHプローブの調製：GGTA1のDNAを、Invitrogen PureLinkキットを使用して、RP-44ブタBACクローン(RP44-324B21)から抽出した。DNAは、ニック翻訳反応(Nick Translation Kit-Abbott Molecular)によって、Orange-552 dUTP(Enzo Life Science)を使用して標識した。ニック翻訳された断片のサイズを、電気泳動によって、1%のTBEゲル上でチェックした。標識されたDNAを、COT-1 DNA、サケ精子DNA、酢酸ナトリウムおよび95%エタノール中に沈殿させ、次いで乾燥させて、50%のホルムアミドハイブリダイゼーション緩衝液中に再懸濁した。

【0400】

FISHプローブのハイブリダイゼーション：ブタ線維芽細胞(15AS27)由来のプローブ/ハイブリダイゼーション緩衝液混合物および細胞遺伝学的スライドを変性させた。プローブをスライドに加えて、加湿チャンバ内で、37℃で24時間スライドをハイブリダイズした。使用したプローブを配列番号192に示す。

【0401】

FISH検出、可視化および画像取り込み：ハイブリダイゼーション後、FISHスライドを、2×SSC溶液中で、72℃で15秒間洗浄して、DAPI染色で対比染色した。蛍光シグナルを、DAPIおよびFITCフィルターセットを備えるOlympus BX61顕微鏡ワークステーション(Applied Spectral Imaging、Vista、CA)で可視化した。FISH画像は、干渉計ベースのCCD冷却カメラ(ASI)およびFISHView ASIソフトウェアを使用して取り込んだ。FISH画像を図16に示す。

【0402】

(実施例8：Cas9/ガイドRNA媒介性GGTA1ノックアウトを有する細胞の表現型選択)

Cas9/ガイドRNAシステムによるGGTA1遺伝子の破壊を、GGTA1遺伝子

生成物を標識することによって確証した。GGTA1ノックアウトは、ノックアウト実験で表現型ソーティングについてのマーカーとして使用する。GGTA1遺伝子は、ブタ細胞の表面上で見出される糖タンパク質をコードし、ノックアウトされた場合、その糖タンパク質が細胞表面上に存在しないことをもたらした。GGTA1陰性細胞についてソーティングするために使用されるレクチンは、イソレクチンGS-IB₄ビオチン-XXコンジュゲートであって、これは、GGTA1遺伝子によって生じる糖タンパク質のような、末端アルファーD-ガラクトシル残基に選択的に結合した。

【0403】

ブタ胎仔線維芽細胞に、GGTA1を標的化するガイドRNAを発現するpx330プラスミド（実施例1で生成された）をトランスフェクトした。

10

【0404】

トランスフェクション後、陰性の細胞について選択するために、細胞を約5日間成長させて、それらの表面タンパク質をリサイクルした。次いで、細胞を回収して、IB₄レクチンで標識した。次いで、細胞を、細胞表面上のビオチンコンジュゲートされたレクチンと極めて緊密に結合したストレプトアビジンテールを有した2.8ミクロンの超磁性ビーズであった、DynaBeads Biotin-Binderでコーティングした。磁石中においた場合、表面にレクチン／ビーズが結合した「陽性」細胞は、チューブの側面に付着したが、「陰性」細胞は、いかなるビーズにも結合せず、容易な分離のために懸濁物中で浮遊したままであった。

【0405】

20

具体的には、細胞は、TrypLEプロトコルを使用してプレートから回収して、単一のチューブに収集した。細胞をスピンドウンして、1mLのソーティング培地（DMEM、補充なし）中に再懸濁してカウントした。細胞が一千萬個未満である場合、細胞をスピンドウンして、上清を廃棄した。別々のチューブでは、IB₄レクチン（1μg/μL）を、5μL～1mLのソーティング培地で希釈した（最終濃度5μg/mL）。細胞ペレットを、1mLの希釈レクチンで再懸濁した。細胞懸濁物を、約15～20分間、数分ごとに穏やかに振盪しながら、氷上でインキュベートした。

【0406】

ビオチンビーズを、インキュベーションの間に調製した。ビーズのボトルを、30秒間ボルテックスした。1Mの細胞あたり、20μLのビーズを、15mLの円錐管中で5mLのソーティング培地に添加した。チューブをボルテックスして、DynaMag-15磁石中に入れて、3分間静置させた。培地を取り出した。1mLの新鮮なソーティング培地を添加して、そのチューブをボルテックスして、ビーズを洗浄した。その洗浄したビーズは使用するまで氷上に置いた。

30

【0407】

細胞インキュベーション後、細胞懸濁物体積を、ソーティング培地を用いて15mLにして、レクチンを希釈した。細胞をスピンして、1mLの洗浄したビオチンビーズで再懸濁した。懸濁物を、振盪インキュベーター中で、125rpmで30分間、氷上でインキュベートした。細胞懸濁物を、振盪インキュベーターから取り出して、検査した。小さい凝集物が観察され得る。

40

【0408】

5mLのソーティング培地を、細胞懸濁物に添加し、そのチューブを、DynaMag-15中に3分間入れた。「陰性」細胞の第1の画分を収集して、新しい15mLの円錐管に移した。さらに5mLのソーティング培地を添加して、依然として磁石上にあった「陽性」チューブを洗浄した。磁石を数回反転して、細胞懸濁物を再度混合した。そのチューブを3分間静置して、細胞を分離した。次いで、第2の「陰性」画分を取り出して、第1の画分と組み合わせた。10mLのソーティング培地を「陽性」チューブに添加した。そのチューブを、磁石から取り出して、すぐ使えるまで氷浴中に入れた。

【0409】

「陰性」画分のチューブを、磁石上に置いて、二次的な分離を得て、第1のチューブか

50

ら超えていた場合がある、あらゆるビーズ結合した細胞を除去した。チューブを磁石上に3分間保持した。細胞を、磁石からピペッティングして除き、新しい15 mLの円錐管に移した。元の「陽性」チューブおよび二重ソーティングした「陰性」チューブを、バランスをとって、それらのチューブ中の細胞をスピンドダウンした。「陽性」ペレットは、濃い錆びた赤色に見えた。「陰性」ペレットは、可視ではないか、白く見えた。

【0410】

各々のペレットを、1 mLの新鮮な培養培地（10% FBS）中で再懸濁して、24 ウェルプレート上の別々のウェル中にプレートした。そのウェルを顕微鏡下で検査して、必要な場合、より多くのウェルに希釈した。細胞を、37 °Cで培養した。遺伝子改変された細胞、すなわち、未標識の細胞を、磁石で陰性選択した（図17A）。遺伝子改変されてい

10

【0411】

（実施例9：GGTA1/CMAH/NLR C5三重ノックアウトブタの作製）

この実施例は、三重ノックアウトブタを生成するための例示的な方法を示す。三重ノックアウトブタは、NLR C5、TAP1、C3、CXCL10、MICA、MICB、C11TA、CMAH、GGTA1および／またはB4GALNT2のうちの3つのタンパク質発現が低減され得る。このような三重ノックアウトブタの1つは、CRISPR/cas9システムを使用するGGTA1/CMAH/NLR C5三重ノックアウトブタであった。このブタは、移植術用の臍島を提供した。GGTA1/CMAH/NLR C5が破壊されたブタの臍島は、MHCクラスI欠損を有し、レシピエントに移植された場合、免疫拒絶の誘導が低いまたは全くない。

20

【0412】

胎仔線維芽細胞のトランスフェクション

実施例1で生成したGGTA1、CMAH、およびNLR C5を標的化するガイドRNAを発現するpx330プラスミドを、ブタ胎仔線維芽細胞中でトランスフェクトした。ブタ胎仔線維芽細胞を、5～10%の血清、グルタミンおよびペニシリン／ストレプトマイシンを含有するDMEM中で培養した。線維芽細胞に、製造業者の指示に従って、Lipofectamine 3000システム（Life Technologies、Grand Island、NY）を使用して、Cas9およびGGTA1、CMAHまたはNLR C5遺伝子を標的化するsgRNAを発現する2つまたは3つのプラスミドを同時にトランスフェクトした。

30

【0413】

GGTA1 KO細胞の対抗選択

トランスフェクションの4日後、トランスフェクトされた細胞を回収して、イソレクチンB4（IB4）-ビオチンで標識した。αGalを発現する細胞を、ビオチンコンジュゲートされたIB4で標識して、ストレプトアビジンコーティングしたDynabeads（Life Technologies）によって、磁場の中で枯渇させた。αGal欠損細胞を、上清から選択した。細胞を顕微鏡によって検査した。ソーティング後に結合したビーズを含有しないかまたはほとんど含有しない細胞を、陰性の細胞として特定した。

40

【0414】

CRISPR/Cas9標的化GGTA1、CMAHおよびNLR C5遺伝子のDNAシーケンシング解析

IB4対抗選択した細胞およびクローニングしたブタ胎仔由来のゲノムDNAを、Qiagen DNeasy Miniprep Kitを使用して抽出した。PCRは、表11に示されるような、GGTA1、CMAHおよびNLR C5特異的プライマー対を用いて行った。DNAポリメラーゼ、dNTPack（New England Biolabs）を使用して、GGTA1のPCR条件は、それらのプライマーについて理想的なアニーリング温度および融解温度に基づいた。PCR生成物は、1%アガロースゲル上で

50

分離し、Qiagen Gel Extraction Kitによって精製し、表7に示されるような特定のシーケンシングプライマーを用いるサンガー方法（DNA Sequencing Core Facility、University of Minnesota）によってシーケンシングした。図18A～図18Cは、PCR生成物の配列およびアガロースゲル画像を示す。

【表11】

表 11. 遺伝子改変された細胞および動物からゲノム DNA を増幅するための例示的な PCR

プライマー

遺伝子	配列番号	フォワード配列(5'から 3')	配列番号	リバース配列(5'から 3')
GGTA1	193	cttcgtgaaaccgctgtttatt	194	gactggaggacttctcttctt
CMAH	195	tgagttccttacgtggaatgtg	196	tcttcaggagatctgggtct
NLRC5	197	ctgctctgcaaacactcaga	198	tcagcagcagctacccca

10

【0415】

体細胞核移入（SCNT）

SCNTは、その全体が参照によって本明細書に援用される、Whitworthら、*Biology of Reproduction*、91巻（3号）：78、1～13頁、（2014年）に記載のとおり行った。SCNTは、*in vitro*で成熟した卵母細胞を使用して行った（DeSoto Biosciences Inc.、St. Seymour、TN）。卵丘細胞は、0.1%ヒアルロニダーゼ中でピペッティングすることによって、卵母細胞から取り除いた。正常な形態学および可視の極体を有する卵母細胞のみをSCNTのために選択した。卵母細胞を、5 μ g/mLのビスベンズイミドおよび7.5 μ g/mLのサイトカラシンBを含有する操作培地（Caを含まないNC SU-23、5% FBSを含む）中で15分間インキュベートした。卵母細胞を、第一極体および第二分裂中期板を除去することによって除核した。単一の細胞を、各々の除核された卵母細胞中に注入して、融合して、50 μ secの間、180Vの2つのDCパルス（BTX細胞エレクトロポレーター、Harvard Apparatus、Holliston、MA、USA）によって、280mMのマニトール、0.1mMのCaCl₂、および0.05mMのMgCl₂中で同時に活性化した。活性化された胚は、0.4%のウシ血清アルブミン（BSA）を含むNC SU-23培地中に戻して、38.5℃、5%CO₂で、1時間未満加湿雰囲気中で培養し、代理ブタに移入した。

20

30

【0416】

（実施例10：ICP47導入遺伝子を発現するNLRC5ノックアウト非ヒト動物の作製）

この実施例は、1つまたは複数の内因性遺伝子の発現が低減されており、その一方で1つまたは複数の導入遺伝子を発現する、遺伝子改変された非ヒト動物（例えば、ブタ）を生成するための例示的な方法を示す。このような遺伝子改変された非ヒト動物（例えば、ブタ）を生成することは、NLRC5、TAP1、C3、CXCL10、MICA、MICB、CIITA、CMAH、GGTA1および／またはB4GALNT2のうちの1つまたは複数の発現が低減されており、その一方で、1つまたは複数のICP47、CD46、CD55、CD59 HLA-E、HLA-G（例えば、HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4、HLA-G5、HLA-G6、またはHLA-G7）、L2、Spi9、ガレクチン-9 CD47、B2M、PD-L1、および／またはPD-L2を発現する。このような動物の1つは、NLRC5遺伝子を破壊されており、その一方で、ICP47をコードする導入遺伝子を過剰発現する。NLRC5破壊およびICP47発現は、MHC-1のアセンブリおよび機能を抑制する。したがって、遺伝子改変された非ヒト動物（例えば、ブタ）由来の細胞、組織、および／または臓器は、レシピ

40

50

エントに移植された場合、免疫拒絶の誘導が低いかまたは全くない。

【0417】

Rosa26プロモーターのクローニング

Rosa26プロモーター配列は、マウスRosa26プロモーター配列およびヒトRosa26プロモーター配列を参照として使用して、ゲノムデータベース（NCBI）を検索することによって得る。Rosa26の非ヒト動物のバージョンを得る。プライマーを設計して、鋳型として非ヒト動物の（例えば、家畜用のブタの）ゲノムDNAを使用してPCRによって潜在的なRosa26プロモーター（例えば、ブタRosa26プロモーター）を保有するDNA断片を増幅する。AscIおよびMluI部位を、それぞれ、フォワードプライマーおよびリバースプライマーの5'に追加する。Pwo Super Yield DNA Polymerase（Roche、Indianapolis、IN）を使用して、PCR条件は以下のとおりである：94℃、2分；94℃、15秒、55℃、30秒；72℃4分、15サイクル；94℃、15秒、55℃、30秒；72℃4分および5秒を、25サイクルに関して各サイクルに追加；ならびに最終の伸長ステップは72℃で8分間。PCR生成物を、引き続いて、pCR-XL-TOPOベクター（Invitrogen、Carlsbad、CA）中にクローニングして、pCR-XL-Rosa26を生成する。非ヒト動物のRosaプロモーター（例えば、ブタRosa26プロモーター）を、設計されたプライマーを使用してシーケンシングする。

【0418】

トランスジェニックベクターの構築

pEGFP-N1（Clontech、Palo Alto、CA）のCMVプロモーターおよびマルチクローニング部位（MCS）は、リンカーAseI-NruI-AscI-SalI-MluI-PvuI-BamHIによって置き換える。潜在的な非ヒト動物（例えば、ブタ）のRosa26プロモーターを含有する3.9kbの断片は、AscIおよびMluI消化によってpCR-XL-Rosa26から切り出して、AscI部位とMluI部位との間でプロモーターのないpEGFP-N1に挿入して、プラスミドpRosa26-EGFPを生じる。ヒトICP47のcDNAをクローニングして、プラスミド中のEGFPを置き換える。対照のベクターは、EcoRI部位でのマウスのMHCI H-2K^bプロモーターの下流へICP47のcDNAのクローニングによって構築して、プラスミドpH-2K^b-ICP47を得る。

【0419】

一過性のトランスフェクション

実施例1または実施例2の方法で作製したNLRC5ノックアウト非ヒト動物（例えば、ブタ）由来のNLRC5 KO胎仔線維芽細胞を得る。Rosa26、H-2K^b、およびCMVの間のプロモーター強度を比較するために、胎仔線維芽細胞に、製造業者の指示に従って、Neon（商標）Transfection System（Invitrogen、Carlsbad、CA）を使用することによって、pRosa26-ICP47、pH-2K^b-ICP47およびpEGFP-N1をトランスフェクトする。3×10⁵個の細胞を、それぞれ、1.5μgの各々のDNAと混合して、1300V、30ms、1パルスでエレクトロポレーションする。次いで、細胞を、37℃で、5%のCO₂および10%のO₂と培養する。48時間後、細胞を回収して、ICP47発現は、ウェスタンブロットおよび／またはフローサイトメトリーによって検査する。トランスフェクトされていない胎仔線維芽細胞を対照として使用する。

【0420】

EGFP安定細胞株の樹立

NLRC5 KO胎仔線維芽細胞を80～90%コンフルエンスで、トリプシンを用いて回収して、カルシウムおよびマグネシウムを含まないDPBS（Invitrogen、Carlsbad、CA）を用いて洗浄する。pRosa26-ICP47は、AscI消化によって直線化する。トランスフェクションは、Neon（商標）Transfection System（Invitrogen）を使用することによって行う。簡

潔に説明すると、 10^6 個の細胞を、 $120\ \mu\text{l}$ の R 緩衝液中に懸濁して、 $2\ \mu\text{g}$ の直線化された DNA を、添加する。細胞を、 $1300\ \text{V}$ 、 $30\ \text{ms}$ 、1 パルスでエレクトロポレーションして、抗生物質なしの培養培地中でコラーゲン I コーティングプレート (BD) 上にプレートする。48 時間後、培養培地を、 $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ の G418 (Invitrogen) を含有する選択培地で置き換える。10 日間の G418 選択後、ICP47 陽性細胞を、フローソーティングによって単離する。選択された細胞を、拡大増殖させて、第 2 のフローソーティングを行い、ICP47 陽性細胞を精製および富化する。

【0421】

体細胞核移入

SCNT は、*in vitro* の成熟した卵母細胞を使用して行う (DeSoto Biosciences Inc. St Seymour, TN. および Minitube of America, Mount Horeb, WI.)。卵丘細胞を、0.1% ヒアルロニダーゼ中でピペッティングすることによって、卵母細胞から取り除く。正常な形態学および可視の極体を有する卵母細胞のみを、クローニングのために選択する。 $5\ \text{mg}/\text{mL}$ ビスベンズイミドおよび $7.5\ \text{mg}/\text{mL}$ サイトカラシン B を含有する操作培地 (Ca を含まない NC SU-23、5% FBS を含む) 中で卵母細胞を 15 分間インキュベートする。このインキュベーション期間の後、卵母細胞を、第一極体および第二分裂中期板を除去することによって除核して、1 つの単一の細胞を各々の除核された卵母細胞に注入する。電気融合は、BTX 細胞エレクトロポレーター (Harvard Apparatus, Holliston, MA) で誘導する。カップルを、 $140\ \text{V}$ の 2 つの DC パルスに、 $50\ \text{ms}$ の間、 $280\ \text{mM}$ のマンニトール、 $0.001\ \text{mM}$ の CaCl_2 、および $0.05\ \text{mM}$ の MgCl_2 中で曝露した。1 時間後、再構築された卵母細胞を、 $120\ \text{V}$ の 2 つの DC パルスで $60\ \text{ms}$ の間、 $280\ \text{mM}$ のマンニトール、 $0.1\ \text{mM}$ の CaCl_2 、および $0.05\ \text{mM}$ の MgCl_2 中で活性化する。活性化後、卵母細胞を、0.4% のウシ血清アルブミン BSA を含む NC SU-23 培地中に戻して、 38.5°C 、5% CO_2 で、加湿雰囲気中で 1 時間未満、培養した後、レシピエントに移入する。レシピエントは、それらの発情期の最初の日に同期した非ヒト動物 (例えば、オクシデンタルブタ (*occidental pig*)) である。

【0422】

ICP47 トランスジェニック胎仔の遺伝子型決定

妊娠は、35 日目で終わり、胎仔を回収する。ゲノム DNA を、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を使用して抽出する。PCR プライマーを、ゲノム中の ICP47 cDNA 配列を検出するように設計する。 $20\ \mu\text{l}$ の反応混合物は、 $10\ \mu\text{l}$ の $2\times\text{Go-Taq Green Master Mix}$ (Promega, Madison, WI)、 $5\ \text{pmol}$ の各々のプライマー、および $50\ \text{ng}$ のゲノム DNA を含有した。PCR を行って、ICP47 挿入の有無を検出する。正常な細胞から抽出されるゲノム DNA を、陰性対照として使用する。

【0423】

(実施例 11: Cas9 およびガイド RNA をコードする RNA を注射することによる NLRC5 ノックアウト非ヒト動物の作製)

CRISPR/cas を使用する遺伝子を標的化する代替的なアプローチは、CRISPR/cas9 システムによる遺伝子を破壊するために細胞に、Cas9 およびガイド RNA をコードする RNA 分子 (例えば、単一のガイド RNA (sgRNA)) を直接注射することである。この実施例は、Cas9 をコードする RNA および単一のガイド RNA (sgRNA) を注射することによって、非ヒト動物 (例えば、ブタ) における NLRC5 を破壊するための例示的な方法を示す。

【0424】

NLRC 遺伝子を標的化する sgRNA を設計して合成する。Cas9 コードプラスミドを構築するために、Cas9 コード配列を合成し、次いで、Cas9 の *in vitro* 転写のための T7 プロモーターを保有する、pEASY-T1 ベクター中にクローニン

10

20

30

40

50

グする。SV40ポリアデニル化シグナルは、Cas9カセットの3'末端であり、かつ固有のHindIII制限部位は、直線化のためのSV40シグナルの外側である。T7プロモーター含有sgRNA足場をまた、順序付けて、プロモーターのないpUC19ベクター中にクローニングする。2つのBsaI制限部位を、スパーサー挿入に使用して、プラスミドは、in vitro転写のためにPsiIによって直線化する。ベクター構築を標的化するために、部位特異的20ntスパーサーを合成して、BsaI制限部位の間にT7-sgRNA足場中にクローニングする。

【0425】

Cas9 mRNAを調製するために、T7-Cas9発現プラスミドを、HindIIIによって直線化して、DNA Clean & Concentrator (商標) -5 (ZYMO Research) を使用して精製する。

10

【0426】

sgRNAを調製するために、sgRNAベクターを、PsiIを使用して直線化して、DNA Clean & Concentrator (商標) -5 (ZYMO Research) を使用して精製する。

【0427】

全ての直線化されたプラスミドは、製造業者の指示に従って、T7 High Yield RNA Synthesis Kit (NEB) によってin vitro転写する。Cas9 mRNAを合成するために、m7G(5')G RNA Cap Structure Analog (NEB) をさらに添加して、転写されたmRNAを安定化した。調製されたRNAを、MicroElute RNA Clean-Up Kit (Omega) を使用して精製して、DEPC水中に回収する。

20

【0428】

非ヒト動物、例えば、Bamaミニブタ由来の接合体を、受精の次に収集して、操作培地に移し、2~10plの125ng/μlのCas9 mRNAおよび12.5ng/μlのsgRNAの単一の細胞質マイクロインジェクションに供する。あるいは、非ヒト動物の受精した卵母細胞を収集する。Cas9およびsgRNAを、受精した卵母細胞に注入して、遺伝子改変された子孫を生成する。RNA注射後に、非ヒト動物（例えば、ブタ）胚の生存度を試験するために、in vitroで生成された単為生殖の胚を、予備実験に使用する。単為生殖の胚の調製のために、非ヒト動物（例えば、ブタ）卵巣を収集し、予め温めた生理食塩水で洗浄して、卵胞を吸引する。卵母細胞を、TL-HEPES中で洗浄した後に、成熟培地中で44時間培養する。成熟したMII卵母細胞は、穏やかにピペッティングすることによって、周囲の卵丘細胞を除去し、続いて、30マイクロ秒の間、1.2kV/cmの2つの直流パルス（1秒間隔）で電気活性化をする。活性化された卵母細胞を、TL-HEPES培地に移し、125ng/μlのCas9 mRNAおよび12.5ng/μlのsgRNAという単回の2~10plの細胞質注射に供する。接合体および活性化卵母細胞を、PZM3培地中で、胚盤胞段階まで、144時間、5%CO2下、39℃で培養する。

30

【0429】

Cas9 mRNAおよびガイドRNAは、非ヒト動物接合体（例えば、ブタ接合体）に同時注射される。Cas9 mRNA/ガイドRNAを注射された接合体、および水を注射された接合体のin vitroの発生効率を、非ヒト動物（例えば、ブタ）の早期胚発生に対するCas9 mRNA/ガイドRNAのマイクロインジェクション操作の効果を決定するために測定する。

40

【0430】

注射された胚を、代理の非ヒト動物（例えば、ブタ）に移入して、子孫（例えば、仔豚）を生成する。生存した胚を、発情期の日またはその1日後にレシピエント未経産ブタの卵管に、全身麻酔下での正中線開腹術後に移入する。妊娠は、約28日後に診断し、次いで超音波検査によって2週間隔で定期的にチェックする。全てのマイクロインジェクションされた子孫（例えば、仔豚）は、自然分娩によって分娩される。

50

【0431】

全部で76の注入された胚を、5つの独立実験で、5匹の代理母に移植する。NLRC5遺伝子の標的化部位中の挿入または欠失は、T7エンドヌクレアーゼI (T7EI) アッセイによって検出される。子孫 (例えば、仔豚) の遺伝子型は、各々の個々の子孫 (例えば、仔豚) の標的化部位を含有するPCR生成物のサンガーシーケンシングによって解析する。

【0432】

(実施例12：非ヒト霊長類におけるブタ膵島異種グラフトに応答する免疫細胞の特定)

この実施例は、細胞の異種移植術における免疫介入のために標的化免疫細胞を特定するための例示的な方法を示す。この目的を達成するために、エフェクターおよび調節性機能を有する循環中およびグラフトのTおよびBリンパ球サブセットの表現型を、ブタ膵島異種グラフト拒絶の予防のためのドナー抗原特異的免疫療法を伴ってまたは伴わずに、免疫抑制を受けている、カニクイザル (*cynomolgus macaque*) (CM) で試験した。

【0433】

門脈内ブタ膵島異種グラフトに対する細胞免疫は、糖尿病CMの4つのコホートでレトロスペクティブに解析した： α -CD40での誘導、ならびにCTLA4-Igおよびラパマイシンでの維持 (コホートA； $n=4$ ；グラフト機能77~333日)；CTLA4-Igでの誘導、ならびに α -CD40およびラパマイシンでの維持 (コホートB； $n=3$ ；安定なグラフト機能180日超)； α -CD40、 α -CD20、およびラパマイシンでの誘導、維持なし (コホートC； $n=2$ ；グラフト機能、32日および40日間)、ならびに α -CD40、 α -CD20、およびラパマイシンの援護のもとでアポトーシス性ドナー白血球の移植前後の注入による誘導、維持なし (コホートD； $n=3$ ；グラフト機能、81、100、および113日間)。屠殺時の循環中の免疫細胞サブセットおよび肝臓単核細胞 (LMNC) の頻度は、フローサイトメトリーによって決定した。LMNCはまた、ドナー抗原でのex-vivo刺激後にエフェクター分子で解析した。統計学的有意性は、ウェルチの補正を伴うかまたは伴わない、対のないt検定を使用して決定した。

【0434】

循環中の免疫細胞サブセットのベースライン頻度は、コホートの間で異なることはなかった。コホートA CM (移植後100日目まで) と比較して、コホートB CMは、以下を示した：i) ナイーブ (CD3-CD20+CD21+CD27-) 対、活性化されたメモリー (CD3-CD20+CD21+CD27+) および未熟 (CD3-CD19+CD27-IgM+) 対、成熟 (CD3-CD19+CD27+CD38+) 循環中のB細胞の比における有意な増大、ii) 循環中のBregs (CD19+CD24hiCD38hi)、Tregs (CD4+CD25+FoxP3+CD127)、およびナチュラルサブレッサー細胞 (NSC；CD122+CD8+) における有意な増大、ならびにiii) 匹敵する循環中の頻度のCD8+エフェクターメモリー (TEM) 細胞 (CD2hiCD28-CD8+)。コホートC CMは、移植後14日目、CD8+TEMの有意な拡大増殖を示したがコホートD CMは示さなかった。コホートC CMと比較して、移植後50±10日目では、コホートD CMは、TregsおよびNSCの循環中の頻度の有意な増大を示した。50日目まで、コホートDにおけるCD8+TEMの有意な拡大増殖もあった。推定される拒絶のために終結するCMでは、LMNCによって、CXCR3+CD4+およびCD8+T細胞およびCD20+B細胞 (α -CD20処置したコホートCおよびD CMに含まれる)；CD8+TEMの実質的な存在は、LMNCの間の優勢な表現型であることが示された。ドナー抗原でのex-vivo刺激の際、これらのCD8+TEMは、IFN- γ 、TNF- α 、およびパーフォリン (Perforin) の豊富な染色を示した。

【0435】

この結果は、ブタ対CM豚島異種移植術における細胞免疫に対する免疫療法の効果への洞察を提供し、B細胞およびCD8+TEMを、細胞の異種移植術における免疫介入のための標的として特定する。

【0436】

(実施例13：ブタ豚島でのSLAの抑制は、ブタ豚島に対するヒトCD8+T細胞応答を阻害した)

ブタ豚島(例えば、SLA)におけるMHCの抑制が、ヒトレシピエントにおけるT細胞活性化を阻害し得るか否かを決定するために、SLA抗体を使用して、ブタ豚島でMHCを抑制し、ブタ豚島に対するヒトT細胞の応答を検査した。

【0437】

ヒト末梢血単核細胞は、抗SLAクラスIブロッキング抗体を伴ってまたは伴わずに7日間、成体ブタ豚島とともに培養した。高度に精製されたヒトCD8+T細胞(hCD8)、ヒトCD4+T細胞(hCD4)、およびヒトナチュラルキラー細胞(hNK)の増殖を測定した。高度に精製されたヒトCD8+T細胞の増殖は阻害されたが、CD4+T細胞もNK細胞も阻害されなかった。ブタ豚島上のMHCクラスI分子の認識は、混合培養物中で7日後に抗SLAクラスIブロッキング抗体でブロックされた(図19A)。

【0438】

抗SLAクラスIブロッキング抗体の存在下または不在下で、7日間、高度に精製されたリンパ球を伴ってまたは伴わずに培養された成体のブタ豚島。培養された細胞の生存度は、アクリジンオレンジ(AO)およびヨウ化プロピジウム(PI)染色によって評価した。精製されたCD8+T細胞の細胞毒性は、抗SLA I抗体の存在下で阻害された(図19B)。有意な増殖にかかわらず、CD4+T細胞は、CD8+T細胞の細胞毒性と比較した場合、豚島に相対的に害を与えなかった(図19B)。

【0439】

(実施例14：ブタ豚島を移植されたサルでのECDI固定脾細胞によるT細胞活性化の抑制)

異種グラフトドナー由来のアポトーシス性脾細胞が、レシピエントによる異種グラフトの免疫拒絶を抑制し得るか否かを決定するために、ドナー由来のアポトーシス性脾細胞を、移植の前後にレシピエントに投与した。次いで、レシピエントのPBMCにおけるT細胞活性化を検査した。

【0440】

ブタ豚島を、糖尿病のサルに移植した。豚島ドナーから調製されたアポトーシス性脾細胞を、移植の1日前および7日後にサルに投与した。PBMCを、移植術前に、ならびに移植術の7、14、28、49、77、および91日後にサルから収集した。PBMCにおける直接および間接的なT細胞活性化を、ELISPOTによって検査した。ELISPOTの結果を、10⁶個のPBMCあたりスポット形成細胞(SFC)として示した(図20A)。141日目、豚島を、サルから収集して、CD8を、抗CD8抗体を使用して免疫組織化学によって検出した(図20B)。42匹の移植されていないサル由来のPBMCを、陰性対照(「対照(Control)」)として使用した。遺伝子改変されていないブタ豚島を移植された10匹のサル由来のPBMCを、陽性対照(「リジェクター(Rejector)」)として使用した。脾細胞の投与は、サルにおけるブタ豚島によって誘導されたT細胞活性化を有意に低減した。

【0441】

(実施例15：免疫抑制の維持なしで、サルにおいて同じドナー由来の免疫調節性ブタ豚島およびECDI固定脾細胞を移植することによる糖尿病の処置)

実施例14における、免疫細胞に対するECDI固定ドナー細胞の免疫抑制効果を試験することに加えて、この実施例での実験は、in vivoでの(サルでの)ECDI固定ドナー細胞の免疫抑制効果を検査した。その結果、ブタ由来のECDI固定脾細胞が、ブタ由来の豚島を移植されたサルにおける免疫拒絶を低減することが示された。

【0442】

糖尿病のサルは、ブタ膵島を移植された。サルは、移植術の7日前および1日後にECDI固定ドナー脾細胞を与えられた（静脈内注入による）。免疫抑制薬は、移植術の日から移植術後21日目にわたって与えた。小用量の外因性のインスリンを、移植術後21日目にわたって投与した。正常な血糖値を維持するために必要な外因性のインスリン（灰色のバーに示される）は、移植術の日に低下して、21日目に完全に停止した。血糖値（線で示される）は、移植術後直ちに正常になり、21日目のインスリンの中断にかかわらず正常のまま続いた。血糖値は、移植術後100日目にわたって外因性のインスリンなしで正常に維持された（図21A）。移植術後ピーク値を含む血液Cペプチドレベル、ランダムレベル、ならびに絶食およびグルコース刺激条件下のレベルを試験した（図21B）。

【0443】

サルの糖代謝を、静脈内グルコース負荷検査（IVGTT）によって検査した（図21Cおよび図21D）。IVGTTでは、外因性のグルコースを、サルに注射し、血糖値を注射後経時的に測定した。移植術後、28日目および90日目でIVGTTをサルで行った。ストレプトゾトシンを伴ってまたは伴わずに処置された移植されていないサルを対照として使用した。ストレプトゾトシンで処置した移植されていないサルを糖尿病の対照として使用した。血糖値（図21C）およびCペプチド（図21D）レベルを測定して、対照と比較した。

【0444】

（実施例16：ECDI固定細胞によるレシピエントの寛容化および移植）

移植ドナー由来の細胞を、ECDIで固定して、レシピエントにおける免疫拒絶を抑制するために使用する。この実施例は、ECDI固定の遺伝子改変された細胞で移植片レシピエントを寛容化するための例示的な方法を示す。移植術の必要なヒトレシピエントを、ECDI固定細胞で処置して、レシピエントを移植術に対して寛容化する。ECDI固定細胞は、遺伝子改変され、例えば、GGTA1およびCMAHはノックアウトされる。B4GALNT2はまた、ECDI固定細胞のいくつかではノックアウトされている。ECDI固定細胞の一部または全てはまた、ICP47、CD46、CD55、またはCD59である1つまたは複数の遺伝子も発現する。

【0445】

ECDI固定細胞は、移植術の約7日前、および再度、移植術の約1日後にレシピエントに与えられる。

【0446】

ある用量の拮抗性の抗CD40抗体はまた、移植術の約8日前、ならびに移植術の7および14日後にレシピエントに与えられる。その用量は、レシピエントの体重1kgあたり少なくとも約30mgの抗CD40抗体である。

【0447】

レシピエントは、移植片を受ける。移植片は、限定するものではないが、有蹄動物を含む非ヒト動物由来の細胞、組織、および／または臓器である。

【0448】

例えば、膵島細胞は、改変されていない有蹄動物から取り出して、糖尿病に罹患しているヒトレシピエントに移植する。レシピエントは、移植術前に適切に寛容化されたので、ヒトレシピエントは、移植片を拒絶しない。

【0449】

（実施例17：抗CD40抗体処置を受けているサルにおいてブタ膵島を移植することによる糖尿病の処置）

この実施例は、ブタ膵島を移植されたサルでの免疫拒絶に対する種々の時点で投与された抗CD40抗体の効果を比較した。

【0450】

対照の糖尿病のサルに、遺伝子改変されていないブタ膵島を移植した（図22A）。そのサルに、移植術の日に抗CD40抗体を与えた。正常な血糖値を維持するために必要な外因性のインスリン（灰色のバーで示される）は、移植の日に低下して、21日目に完全

10

20

30

40

50

に停止した。血糖値（線で示される）は、移植術後直ちに正常になり、両方のサルで21日目のインスリンの停止にかかわらず正常のまま続く。しかし、血糖値は、100日目の後に継続し、外因性のインスリンは、125日目の後に正常な血糖値を維持するために必要である。

【0451】

野生型ブタから収集されたブタ膵島を、糖尿病のサルに移植した。移植術後、サルに、移植術後14日目にわたって4回、抗CD40抗体処置を与えた（図22B）。正常な血糖値を維持するために必要な外因性のインスリン（灰色のバーで示される）は、移植の日に低下し、21日目に完全に停止した。血糖値（線で示される）は、移植術後直ちに正常になり、サルでは21日目にインスリンの停止にかかわらず正常なまま続く。血糖値は、移植術後、250日目で外因性のインスリンなしで正常なままであった（図22B）。 10

【0452】

（実施例18：抗体およびECDI固定脾細胞によるサル膵島を移植された糖尿病サルの免疫寛容化）

この実施例は、サル（ID#13CP7）における同種グラフトに対する免疫拒絶に対する抗CD40抗体および寛容化ワクチンの効果を比較した。この結果、抗CD40抗体および寛容化ワクチンの両方が、サル膵島を移植されたサルで免疫拒絶を有効に低下することが示された。

【0453】

糖尿病のサルにサル膵島を移植した。サルには、移植術の日から開始して抗CD40抗体およびラパマイシンを21日間与えた。このサルは、移植術の最大21日後まで外因性のインスリンを与えられた。21日目の後、サルは、朝（絶食）で正常な血糖値を有したが、午後は高い血糖値を有した（図23A）。図23Bは、同じレシピエント（ID#13CP7）における血清ブタCペプチドレベル（絶食された、ランダムおよび刺激された）を実証する。 20

【0454】

（実施例19： α -CD40抗体およびCTLA4-Igによる、ブタ膵島を移植された糖尿病サルの免疫寛容化）

この実施例の実験は、ブタ膵島細胞を移植されたサルで他の薬物によって誘導された免疫抑制を維持することに対する α -CD40抗体およびCTLA4-Igの効果を比較した。その結果によって、 α -CD40抗体が、膵島異種グラフトの生存の延長においてCTLA4-Igよりも能力が優れていることが示された（表12）。 30

【0455】

ストレプトゾトシン誘発性の糖尿病を有する2つの群のカニクイザル（MX-LISA-A（4匹のサル）およびMX-LISA-B（3匹のサル））に、遺伝子改変されていないブタ膵島を門脈内に移植した。MX-LISA-A群のサルに関しては、免疫抑制は、 α -CD25抗体、 α -CD40抗体、sTNFR、および α -IL-6R抗体によって誘導し、CTLA4-Igおよびラパマイシンによって維持した。MX-LISA-B群のサルに関しては、免疫抑制は、 α -CD25抗体、CTLA4-Ig、sTNFR、および α -IL-6R抗体によって誘導し、 α -CD40抗体およびラパマイシンによって維持した。より長い膵島異種グラフト生存は、免疫抑制がMX-LISA-A群と比較して α -CD40抗体によって維持された場合に（MX-LISA-B群）、達成された（表12）。 40

【表 1 2】

表 12. α -CD40 抗体および CTLA4-Ig によるブタ膵島を移植された糖尿病サルの免疫

群	n	ECDI 固定 ドナー脾 細胞	寛容化 免疫抑制		膵島異種グラ フト生存 (日数)
			誘導	維持	
MX- LISA-A	4	なし	α -CD25 + α -CD40 + sTNFR + α -IL-6R	CTLA4-Ig +ラパマイシン	77, 126, 135, 363
MX- LISA-B	3	なし	α -CD25 + CTLA4-Ig + sTNFR + α -IL-6R	α -CD40 +ラパマイシン	$\geq 364, \geq 365,$ ≥ 365

10

【0 4 5 6】

(実施例 2 0 : α -CD40 抗体および ECDI 固定ドナー脾細胞によるブタ膵島を移植された糖尿病サルの免疫寛容化)

この実施例は、ブタ膵島を移植されたサルでの免疫拒絶に対するアポトーシス性脾細胞の効果を検査した。この結果、アポトーシス性脾細胞は、膵島異種グラフト生存を延長したことが示された(表 1 3)。

20

【0 4 5 7】

ストレプトゾトシン誘発性の糖尿病を有する 2 つの群のカニクイザル(MX-ECDI 対照(2匹のサル)およびMX-ECDI-ワクチン(3匹のサル))に、遺伝子改変されていないブタ膵島を、門脈内に移植した。全てのサルに、 α -CD20 抗体、 α -CD40 抗体、sTNFR、 α -IL-6R 抗体、およびラパマイシンを、移植術の日から移植術後 21 日目まで与えた。MX-ECDI-ワクチン群のサルはまた、移植術の 7 日前および 1 日後、体重 1 kg あたり 0.25×10^9 個のアポトーシス性ドナー脾細胞を、移植前後に静脈内注入で与えられた。脾細胞は、GGTA1 ノックアウトブタから調製されたもの、および α Gal 複合糖質 GAS914 の援護のもとで注入されたものを、その全体が参照によって援用される、Katapodis ら、J Clin Invest、110 巻(12 号): 1869~187 頁(2002 年)に記載のとおり含む。延長された膵島異種グラフト生存は、一過性の免疫抑制の援護のもとでアポトーシス性ドナー脾細胞を与えられたサルで達成されたが(MX-ECDI ワクチン)、一過性の免疫抑制のみを与えられたレシピエントでは達成されなかった(MX-ECDI 対照)(表 1 3)。

30

【表 1 3】

表 13. α -CD40 抗体およびアポトーシス性ドナー脾細胞(spenocyte)によるブタ膵島を移植された糖尿病サルの免疫寛容化

群	n	ECDI 固定ドナ ー脾細胞	一過性の免疫抑制	膵島異種グラフト 生存(日数)
MX-ECDI- 対照	2	なし	α -CD40 + α -CD20 + sTNFR + α -IL-6R + Rapa 21 日目まで	32, 40
MX-ECDI- ワクチン	3	-7 日目および+1 日目に 0.25×10^9	α -CD40 + α -CD20 + sTNFR + α -IL-6R + Rapa 21 日目まで	81, 100, 113

40

【0 4 5 8】

(実施例 2 1 : ECDI 固定ドナー脾細胞および α -CD40 抗体による循環中の免疫

50

細胞レベルの抑制)

この実施例における実験は、移植術後の循環中の免疫細胞のレベルに対する、E C D I 固定細胞（寛容化ワクチン）および α -C D 4 0 抗体を検査した。循環中の免疫細胞のレベルは、移植拒絶の指標であった。この結果によって、E C D I 固定細胞（寛容化ワクチン）および α -C D 4 0 抗体の両方が、移植術後のレシピエントにおける循環中の免疫細胞のレベルを低下することが示された。

【0459】

ここで試験した循環中の免疫細胞は、C D 8 + C D 2 h i C D 2 8 - エフェクターメモリーT細胞、C D 4 + C D 2 5 h i F o x P 3 + C D 1 2 7 低制御性T細胞、およびC D 8 + C D 1 2 2 + ナチュラルサプレッサー細胞であった。

10

【0460】

C D 8 + C D 2 h i C D 2 8 - エフェクターメモリーT細胞

カニクイザルにブタ臍島を移植した。寛容化ワクチンはサルに与えなかった。循環中のC D 8 + C D 2 h i C D 2 8 - エフェクターメモリーT細胞のレベルは、フローサイトメトリーによって決定した（図24）。その結果、移植術を受けているサル（14GP04）における循環中のC D 8 + C D 2 h i C D 2 8 - エフェクターメモリーT細胞のレベルは、ベースラインの対照（13CP04）と比較して増大され、およびC D 8 + C D 2 h i C D 2 8 - エフェクターメモリーT細胞は、屠殺の時点で肝臓単核細胞中のC D 8 + T細胞区画内で高い存在率を有することが示される（図24）。

20

【0461】

実施例24のブタ臍島を移植された2つの群のカニクイザル（MX-E C D I - 対照およびMX-E C D I - ワクチン）における循環中のC D 8 + C D 2 h i C D 2 8 - エフェクターメモリーT細胞を、フローサイトメトリーによって測定した。MX-E C D I - ワクチン群のサルは、アポトーシス性ドナー脾細胞の移植前後の注入を寛容化ワクチンとして受けた。循環中のC D 8 + C D 2 h i C D 2 8 - エフェクターメモリーT細胞のレベルを、フローサイトメトリーによって決定した（図25）。フローサイトメトリーの結果によって、アポトーシス性ドナー脾細胞（MX-E C D I - ワクチン）の移植前後の注入は、カニクイザルにおける循環中のC D 8 + C D 2 h i C D 2 8 - エフェクターメモリーT細胞の移植後の増大を、アポトーシス性ドナー脾細胞とともに寛容化ワクチン接種を受けなかった対照のレシピエント（MX-E C D I - 対照）と比較して、少なくとも一時的に低下した。屠殺の時点（推定の拒絶後）、肝臓単核細胞中のC D 8 + T細胞区画内のC D 8 + C D 8 + C D 2 h i C D 2 8 - エフェクターメモリーT細胞の割合は、両方の群のレシピエントで比較的高かった（図25）。

30

【0462】

実施例28（MX-L I S A - AおよびMX-L I S A - B）および実施例29（MX-E C D I - 対照およびMX-E C D I - ワクチン）におけるブタ臍島を移植されたサルにおける循環中のC D 8 + C D 2 h i C D 2 8 - エフェクターメモリーT細胞を、移植術の日、移植術後の7日目、50日目および100日目にフローサイトメトリーによって測定した。ナイーブなサル由来の循環中のC D 8 + C D 2 h i C D 2 8 - エフェクターメモリーT細胞のレベルを対照として使用した。

40

【0463】

フローサイトメトリーの結果によって、アポトーシス性ドナー脾細胞の移植前後の注入は（MX-E C D I ワクチン）、カニクイザルにおける循環中のC D 8 + C D 2 h i C D 2 8 - エフェクターメモリーT細胞の移植後の増大を、アポトーシス性ドナー脾細胞とともに寛容化ワクチン接種を受けなかった対照のレシピエント（MX-E C D I - 対照）と比較して、少なくとも一時的に抑制することが示される。MX-E C D I - ワクチンレシピエントにおけるC D 8 + エフェクターメモリーT細胞の移植後の増大の抑制のレベルは、ブタ臍島異種移植術の後、さらに強力かつさらに長い免疫抑制を受けるレシピエントでの抑制と匹敵した（MX-L I S A - AおよびMX-L I S A - B群）（図26）。

【0464】

50

CD4+CD25hi FoxP3+CD127低制御性T細胞

この実施例での実験は、ECDI固定細胞（寛容化ワクチン）および α -CD40抗体を、移植術後の循環中のCD4+CD25hi FoxP3+CD127低制御性T細胞のレベルに対して検査した。循環中のCD4+CD25hi FoxP3+CD127低制御性T細胞のレベルは、移植拒絶の指標であった。

【0465】

ブタ膵島（MX-LISA-A、MX-LISA-B、MX-ECDI-対照、およびMX-ECDI-ワクチン）を移植されたサルでの循環中のCD4+CD25hi FoxP3+CD127低制御性T細胞を、移植術の日、移植術後の7日目、50日目および100日目にフローサイトメトリーによって測定した。ナイーブなサル由来の循環中のCD4+CD25hi FoxP3+CD127低制御性T細胞のレベルを、対照として使用した。

10

【0466】

フローサイトメトリーの結果によって、アポトーシス性ドナー脾細胞（MX-ECDI-ワクチン）の移植前後の注入は、アポトーシス性ドナー脾細胞（MX-ECDI-対照）を用いて寛容化ワクチン接種を受けなかった対照レシピエントと比較して、カニクイザルにおける循環中のCD4+CD25hi FoxP3+CD127低制御性T細胞の増大を促進した。MX-ECDI-ワクチンレシピエントにおけるこれらの制御性T細胞の移植後の増大は、ブタ膵島異種移植術後の抗CD40抗体およびラパマイシン（MX-LISA-B）での維持免疫抑制を受けるレシピエントでの増大と匹敵した（図27）。

20

【0467】

CD8+CD122+ナチュラルサプレッサー細胞

ブタ膵島（MX-LISA-A、MX-LISA-B、MX-ECDI-対照、およびMX-ECDI-ワクチン）を移植されたサルでの循環中のCD8+CD122+ナチュラルサプレッサー細胞は、移植術の日、移植術後の7日目、50日目、および100日目にフローサイトメトリーによって測定した。ナイーブサル由来の循環中のCD8+CD122+ナチュラルサプレッサー細胞のレベルを対照として使用した。

【0468】

フローサイトメトリーの結果は、ドナーアポトーシス性脾細胞（MX-ECDI-ワクチン）の移植前後の注入が、アポトーシス性ドナー脾細胞（MX-ECDI-対照）を用いた寛容化ワクチン接種を受けなかった対照のレシピエントおよびMX-LISA-Aレシピエントと比較してカニクイザルにおける循環中のCD8+CD122+ナチュラルサプレッサー細胞の増大を促進したことを示している。MX-ECDI-ワクチンレシピエントにおけるこれらの制御性T細胞の移植後の増大は、ブタ膵島異種移植術後の抗CD40抗体およびラパマイシン（MX-LISA-B）での維持免疫抑制を受けるレシピエントでの増大と匹敵している（図28）。

30

【0469】

（実施例22：ECDI固定細胞、リツキシマブ、抗CD40 Ab 2C10抗体、sTNFR、抗IL-6R抗体、およびラパマイシンによるサルでのブタ膵島異種グラフト生存の延長）

40

この実施例は、他の免疫抑制薬と組み合わせてECDI固定ドナー細胞を使用して免疫拒絶を抑制するための例示的な方法を示す。

【0470】

移植前後に、i) ECDI固定細胞に対する抗原送達、ii) ラパマイシン、リツキシマブ、sTNFR、および抗IL-6R抗体、ならびにiii) 抗CD40 Ab 2C10を含む、新規な三部からなるプロトコルの寛容原性の有効性を、サルにおける成体ブタ膵島の門脈内移植術の設定で試験する。

【0471】

ECDI固定ドナー脾細胞は、クローニングされたブタドナー由来の新鮮に調製されたサイトカイン動員化脾臓のB細胞から調製する。約 $0.25 \times 10^9 / \text{kg}$ のECDI固

50

定ドナー脾細胞を、－7日目（0日目の同じドナー脾島移植に対して）にIVを介してサルに投与する。ドナー脾臓は、脾臓摘出術を使用して、クローニングされたブタドナーから新鮮に得られる。ドナー脾臓B細胞を、*ex vivo*で拡大増殖して、+1日目にサルに対するIV注入を介して投与する。7日間培養された、クローニングされたブタドナー由来の、全てのリリース基準を満たす成体ブタ脾島生成物（25, 000脾島等価物/kg）を、門脈の静脈血管アクセスポートを介して0日目に門脈内に注入する。

【0472】

B細胞枯渇は、リツキシマブを用いて、－10日目に、すなわち、脾島移植術前に、およびまたECDI固定ドナー細胞の最初の注入の前にも開始する。4用量の20mg/kgを、IVを介して、－10日目、－3日目、+5日目、および+12日目にサルに投与する。サルに、ラパマイシンを、－7日目から移植後21日目まで、12～15ng/mlの標的トラフレベルで投与する。sTNFRは、－6日目から+10日目まで皮下に投与される。さらに、抗IL-6Rは、IVを介して－7日目、0日目、7日目、14日目および21日目に投与される。

10

【0473】

サルを、異種移植動物モデルでECDI固定ドナー細胞と一緒に薬学的に活性な薬剤を使用する有効性を決定するために試験する。3用量の50mg/kgの抗CD40 Ab 2C10を、－1日目、+7日目、および+14日目にIVを介してサルに投与するが、4用量の50mg/kg抗CD40 Ab 2C10を、異なるサルに、IVを介して、－8日目、－1日目、+7日目、および+14日目に投与する。

20

【0474】

グラフト機能、例としては、毎日の午前の血糖（AM BG）および午後の血糖（PM BG）、毎週のCペプチド、毎月のHbA1cおよび2ヵ月に1回のIVGTT（グルコースに応答する急性Cペプチドの決定、およびグルコース消失速度を伴う）の移植後モニタリングを測定する。首尾よい生着とは、大きく低下した（ベースラインの33%以下）または存在しない外因性のインスリンに対して、非絶食BG<200mg/dLの維持として規定される。主な有効性の転帰は、血糖値が200mg/dL以上である、3連続日（安定な低用量インスリンまたはインスリンの中断後）の最初のものとして規定される脾島グラフト不全までの日数である。

【0475】

30

移植後の脾島グラフト機能は、さらに、IVグルコース負荷試験（IVGTT）でさらに実証される。ある用量のグルコースを、IVによって摂取して、血中レベルを間隔をおいてチェックする。糖尿病誘導の前後にIVグルコースに対する血清ブタCペプチド応答（STZの前後）も測定する。+28日目のIVグルコースに対する応答は、誘導された糖尿病状態の逆転を示す。

【0476】

（実施例23：遺伝子改変された移植グラフトを移植して、ECDI固定ドナー細胞を投与することによる、レシピエントにおける免疫拒絶の低下）

この実施例は、ドナーから移植片を受け取るレシピエントにおける免疫拒絶の抑制のための例示的な方法であって、i) ECDI固定ドナー細胞を投与すること；およびii) 移植片をレシピエントにおける免疫拒絶の誘導が低いまたは全くないようにドナーを遺伝子改変することによる方法を示す。

40

【0477】

移植術の必要なヒトレシピエントを、ECDI固定細胞を用いてレシピエントを処置することによってグラフトに対して寛容化する。寛容化後、レシピエントは、移植片を受ける。移植片は、限定するものではないが、有蹄動物を含む非ヒト動物由来の細胞、組織、および／または臓器である。これらの非ヒト動物は、遺伝子改変された非ヒト動物である。遺伝子改変は、少なくともNLRC5/TAP1ノックアウトを含む。ノックアウトされる他の遺伝子は、表1および2に列挙する。過剰発現される遺伝子は、表3および表4に列挙する。

50

【0478】

例えば、糖尿病を有するヒトレシピエントに、ICP47を過剰発現する1つまたは複数のNLRC5/TAP1ノックアウト膵島細胞を移植する。移植された膵島細胞は、ヒトICP47に対して相同または同一なペプチドをコードする導入遺伝子を過剰発現する。膵島細胞は、ブタのような遺伝子改変された非ヒト動物由来である。

【0479】

移植術後、ヒトレシピエントは、内因性のインスリンレベルの増大があり、かつグルコース耐性が優れる。野生型膵島細胞を移植されたヒトレシピエントと比較した場合、ヒトICP47を過剰発現するNLRC5ノックアウト膵島細胞を移植されたヒトレシピエントは、移植拒絶が有意に低下しており、したがって、免疫抑制療法をほとんどまたは全く必要としない。

10

【0480】

(実施例24：レシピエントの慢性および全身性の免疫抑制の非存在下で、臨床設定における、ヒトレシピエントでのブタ膵島異種グラフトの拒絶の予防または生存の延長)

この実施例は、異種グラフトレシピエントの慢性および全身性の免疫抑制の非存在下における臨床設定におけるヒトレシピエントでのブタ膵島（ならびに／または他の細胞、組織、および臓器）異種グラフトの拒絶を予防するかまたは生存を延長するための例示的なアプローチを示す。このアプローチは、以下の3つの構成要素を含み、組み込む：i) α Gal、MHCクラスI、補体C3、およびCXCL10の欠損および／または低減された発現、ならびにトランスジェニック発現HLA-Gを有する、遺伝子操作されたブタ膵島；ii) α Gal、Neu5Gc、およびSda/CADの欠損／低減された発現、ならびにヒトCD47、ヒトPD-L1、ヒトPD-L2（遺伝子操作されたワクチン）を含むか含まないHLA-Gのトランスジェニック発現を有する遺伝子操作されたドナーアポトーシス性および非アポトーシス性単核細胞（例えば、脾細胞）；ならびにiii) 一過性の免疫抑制、例としては、拮抗性の抗CD40 mAb、抗CD20 mAb、ラパマイシンおよび一過性の抗炎症性療法、例としては、コンプスタチン（例えば、コンプスタチン誘導性APL-2）、抗IL-6受容体mAb、および可溶性TNF受容体の投与。

20

【0481】

ワクチンドナーブタであって、破壊されたGGTA1、CMAH、およびB4GalNT2、ならびにHLA-G（またはHLA-E）、ヒトCD47、ヒトPD-L1およびヒトPD-L2を発現する導入遺伝子を含むワクチンドナーブタを生成する。これらのワクチンドナーブタは、 α Gal-、Neu5Gc-、Sda/CAD-欠損、ならびにHLA-G、ヒトCD47、ヒトPD-L1、およびヒトPD-L2の発現を有する単核細胞（例えば、脾細胞）を提供する。いくつかの単核細胞（例えば、脾細胞）は、ECDI固定によってアポトーシス性にされる。アポトーシス性および非アポトーシス性単核細胞（例えば、脾細胞）を混合して寛容化ワクチンを作製する。グラフトドナーブタは、ワクチンドナーブタにおいてさらにNLRC5（またはTAP1-）、C3、およびCXCL10遺伝子を破壊することによって作製する。グラフトドナーブタは、ヒトレシピエントにおける移植のための細胞、組織または臓器（例えば、膵島）を提供する。ワクチンドナーブタおよびグラフトドナーブタの集団を、クローニングによって、例えば、体性核移入を使用して増やす。

30

40

【0482】

グラフトドナーブタ由来のグラフトを、レシピエントに移植する。ワクチンドナーブタによって提供される細胞由来の寛容化ワクチンを、ヒトレシピエントに、移植1日前および移植7日後に投与する。免疫抑制剤、例えば、 α -CD40抗体、 α -CD20抗体およびラパマイシン、ならびに／または抗炎症性剤、例えば、コンプスタチン、 α -IL-6R抗体、およびsTNFRを、移植前の時点から移植後21日目まで投与する。このアプローチは、レシピエントの慢性および全身性の免疫抑制の非存在下で、ヒトレシピエントにおけるブタ異種グラフト（例えば、ブタ膵島）の拒絶を予防するか、または生存を延

50

長する（図5）。

【0483】

（実施例25：GGTA1／NLRC5ノックアウトブタの生成および特徴付け）

この実施例は、ノックアウトブタを生成するための例示的な方法を示す。ノックアウトブタは、NLRC5、TAP1、C3、CXCL10、MICA、MICB、CIITA、CMAH、GGTA1および／またはB4GALNT2のうちの2つまたはそれ超のタンパク質発現が低減され得る。このようなノックアウトブタの1種は、CRISPR／Cas9システムを使用する、GGTA1／CMAH／NLRC5ノックアウトブタであった。このブタは、移植術のための臍島を提供した。GGTA1／CMAH／NLRC5が破壊されたブタ臍島は、MHCクラスI欠損を有し、レシピエントに移植された場合、免疫拒絶の誘導が低いかまたは全くない。

10

【0484】

胎仔線維芽細胞のトランスフェクション

実施例1で生成した、GGTA1、CMAH、およびNLRC5を標的化するガイドRNAを発現するpx330プラスミドを、ブタ胎仔線維芽細胞中でトランスフェクトした。ブタ胎仔線維芽細胞は、5～10%血清、グルタミンおよびペニシリン／ストレプトマイシンを含有するDMEM中で培養した。線維芽細胞に、製造業者の指示に従って、Lipofectamine3000システム（Life Technologies、Grand Island、NY）を使用して、Cas9およびGGTA1、CMAHまたはNLRC5遺伝子を標的化するsgRNAを発現する2つまたは3つのプラスミドを同時トランスフェクトした。

20

【0485】

GGTA1 KO細胞の対抗選択

トランスフェクション4日後、トランスフェクトされた細胞を、回収して、イソレクチンB4（IB4）-ビオチンで標識した。αGalを発現する細胞を、ビオチンコンジュゲートされたIB4で標識し、ストレプトアビジンコーティングしたDynabeads（Life Technologies）によって、磁場中で枯渇させた。αGal欠損細胞を、上清から選択した。細胞を、顕微鏡によって検査した。ソーティング後に、結合したビーズを含有しないかまたはほとんど含有しない細胞を、陰性の細胞として特定した。

30

【0486】

CRISPR／Cas9標的化GGTA1およびNLRC5遺伝子のDNAシーケンシング解析

IB4対抗選択した細胞およびクローニングしたブタ胎仔由来のゲノムDNAを、Qiagen DNeasy Miniprep Kitを使用して抽出した。PCRは、表11に示されるとおり、GGTA1およびNLRC5特異的なプライマー対で行った。DNAポリメラーゼ、dNTPack（New England Biolabs）を使用して、GGTA1のPCR条件は、それらのプライマーに理想的であるアニーリング温度および融解温度に基づいた。PCR生成物を、1%アガロースゲル上で分離し、Qiagen Gel Extraction Kitによって精製し、表7に示されるような特定のシーケンシングプライマーを用いるサンガー方法（DNA Sequencing Core Facility、University of Minnesota）によってシーケンシングした。

40

【0487】

体細胞核移入（SCNT）

SCNTを、Whitworthら、Biology of Reproduction、91巻（3号）：78、1～13頁、（2014年）に記載のとおり行った。SCNTは、in vitroで成熟した卵母細胞を使用して行った（DeSoto Biosciences Inc.、St. Seymour、TN）。卵丘細胞を、0.1%ヒアルロニダーゼ中で、ピペッティングすることによって、卵母細胞から取り出した。正常な

50

形態学および可視の極体を有する卵母細胞のみを、SCNTについて選択した。卵母細胞を、 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ のビスベンズイミドおよび $7.5\mu\text{g}/\text{mL}$ のサイトカラシンBを含有する操作培地（Caを含まないNCSSU-23、5%FBSを含む）中で15分間インキュベートした。卵母細胞を、第一極体および第二分裂中期板を除去することによって除核した。単一の細胞を、各々の除核された卵母細胞に注射して、融合して、180Vの2つのDCパルスによって、50 μsec の間（BTX細胞エレクトロポレーター、Harvard Apparatus、Holliston、MA、USA）、280mMのマニトール、0.1mMの CaCl_2 、および0.05mMの MgCl_2 中で同時に活性化した。活性化した胚を、0.4%のウシ血清アルブミン（BSA）を含むNCSSU-23培地中に戻して、38.5℃、5% CO_2 で、1時間未満、加湿雰囲気中で培養し、代理ブタ

10

【0488】

胚を使用する遺伝子改変されたブタの生成

代理ブタに移入するための胚を、胚移入培地を充填したペトリ皿に加えた。細胞凍結保存のための0.25mlの無菌のストローもまた使用した。胚の吸引は25～35℃で行った。

【0489】

胚の吸引は、この順序に従って行った：培地層—空気層—培地層—空気層—胚層—空気層—培地層—空気層—培地層。EOガスで滅菌したストローを使用する場合、その内部を、胚の吸引の前、胚移植術のための培地の吸引および分注を1～3回反復することによって洗浄した。吸引後、ストローの先端末端部を、プラスチックキャップによってシールした。吸引しシールしたストローを無菌で保持するために、プラスチックピペット（Falcon、2ml）を、ストローよりわずかに大きいサイズに切断し、その中に入れ、パラフィンフィルムでシールした。シールしたストローの温度は、携帯型のインキュベーターを使用して、使用の直前まで維持した。

20

【0490】

胚および発情期に同期させた代理母を準備した。胚の移入は、代理母の開腹術を通じて卵巣を露出することによって行う。麻酔後、腹部領域の正中線を切開して、子宮、卵巣、卵管、およびふさ（fimbriae）を露出させた。胚を吸引するストローを、携帯型のインキュベーターから無菌的に採取して、卵管の入り口に挿入した。挿入したストローを、膨大部—峡部の接合領域まで動かした。挿入手順後、ストローを、ハサミを使用して反対側で空気含有層で切断した。1ccのシリンジを切断末端に装着し、およそ0.3ccの空気を注射して胚および培地をストローから卵管中に遊離した。この時点で、0.2mlの黄色の先端部の5mmの先端末端部を切り離して、シリンジおよびストローを接続するために使用した。

30

【0491】

胚移入後、露出した子宮、卵巣、卵管、およびふさを腹腔に入れ、腹部筋膜を、吸収性の縫合材を使用して閉じた。次いで、手術部位をベタジンできれいにし、抗生物質および抗炎症薬および鎮痛薬を用いて処置した。胚を移植された代理母の妊娠試験を行い、続いて、首尾よく妊娠した非ヒト動物の分娩を誘導した。

40

【0492】

妊娠および胎仔

ブタ胎仔の2つの同腹仔（妊娠1の7匹および妊娠2の5匹）を得た。胎仔を、45日目（妊娠1）または43日目（妊娠2）で回収して、DNAおよび培養細胞単離のために処理した。組織の断片および細胞を、2日間培養培地中に平板培養して、胎仔細胞を、接着および増殖させた。野生型細胞（遺伝子改変されていない胎仔細胞）および妊娠1または2由来の胎仔細胞を、培養プレートから取り出して、alex fluor 488にコンジュゲートされたIB4レクチン、またはFITCにコンジュゲートされた抗ブタMHCクラスI抗体で標識した。フローサイトメトリー解析を行い、データは、図32A：妊娠1または図32B：妊娠2に示した。WT細胞のヒストグラムは、胎仔細胞の各々

50

の群の全体的強度における低下を強調するために、各々のパネルに含まれる。特に興味深いのは、ピーク強度の低下として示される妊娠1におけるアルファGalおよびMHCクラスI標識の低下である。妊娠2では、胎仔1および3は、WT胎仔細胞と比較して、アルファgal標識における大きな低下、およびMHCクラスI標識における有意な低下がある。

【0493】

胎仔の遺伝子型

胎仔細胞由来のDNAを、GGTA1 (Sus scrofa品種混合第1染色体、Scrofa10.2 NCBI参照配列: NC_010443.4と比較した) またはNLRC5 (コンセンサス配列) 標的領域のPCR増幅に供し、得られたアンプリコンを、1%のアガロースゲル上で分離した (図29A、図29B、図30A、および図30B)。アンプリコンをまた、各々の反応からのフォワードプライマーのみを使用してサンガーシーケンシングによって解析した。その結果は、GGTA1の標的部位の後で6ヌクレオチド短縮された妊娠1の胎仔1、2、4、5、6、および7として示される。胎仔3は、切断部位後で17ヌクレオチド短縮され、それに続いて2, 511 (668~3179) ヌクレオチド欠失、それに続いて単一塩基置換であった。標的遺伝子の両方のコピー由来の対立遺伝子を含有する単一のシーケンシング実験からの短縮、欠失および置換は、遺伝子改変が生じたことを示唆し得るだけで、各々の対立遺伝子について正確な配列は明らかにしない。この解析から、全ての7匹の胎仔は、単一の対立遺伝子改変を含有したと思われる。妊娠1由来の胎仔のNLRC5標的部位の配列解析では、一貫性のあるアラインメントを示すことはできず、サンガーシーケンシング反応および解析を複雑にするNLRC5対立遺伝子の間のシーケンシング反応における未知の複雑性または種々のDNA改変を示唆する。妊娠2の胎仔DNA試料1、3、4、および5は、GGTA1遺伝子標的部位由来の短縮された3ヌクレオチドであった。胎仔2は、サンガーシーケンシングで変動を有し、このことは、DNA変異の複雑な変動または試料の質が劣ることを示唆する。しかし、胎仔DNA鋳型の質は、上記のGGTA1遺伝子スクリーニング実験の生成に十分であった。NLRC5遺伝子アンプリコンは全て、NLRC5遺伝子切断部位下流の短縮された120ヌクレオチドであった。

【0494】

胎仔のDNA (野生型 (WT) 対照、および妊娠1由来の胎仔1~7由来) を、後肢の生検から単離して、標的遺伝子NLRC5およびGGTAを、PCRによって増幅した。PCR生成物を、1%アガロースゲル上で分離して、蛍光DNA染色によって可視化した。WTレーンにおけるアンプリコンのバンドは、未改変のDNA配列に相当する。アンプリコンのサイズの増減は、それぞれ、アンプリコン内の挿入または欠失を示唆した。1つの試料中の対立遺伝子の間のDNA改変の変動によって、バンドはより拡散されるようになる場合がある。DNA改変におけるわずかな変動は、1%アガロースゲルで分離可能であった。その結果を図31A~図31Bに示す。NLRC5ゲルにバンドがないこと (妊娠1の胎仔1、3、および4; 図31A底部) によって、標的領域に対する改変は、DNA増幅プライマーの結合を破壊したことが示唆された。GGTA1標的化実験における全てのバンドの存在によって、DNAの質は、NLRC5標的化PCR反応においてDNAアンプリコンを生成するのに十分であったことが示唆される。妊娠1の胎仔1、2、4、および5 (図31A、頂部) は、より大きいGGTA1アンプリコンを有し、このことは、標的化領域内の挿入を示唆している。妊娠1の胎仔3 (図31A、頂部) について、GGTA1アンプリコンは、WT対照よりも早く移動したが、このことは、標的化領域内の欠失を示唆している。妊娠1の胎仔6および7 (図31A、底部) に関して、NLRC5アンプリコンは、WTよりも早く移動し、これは標的領域内の欠失を示唆している。妊娠2の胎仔1~5 (図31B、頂部) GGTA1アンプリコンは、サイズによる解釈が困難で、WT対照と比較して拡散していた。胎仔1~5 (図31B、底部) NLRC5アンプリコンは、野生型対照と比較してサイズおよび密度が均一であった。

【0495】

アルファGalおよびMHCクラス1フローサイトメトリー標識の表現型結果における変動を考慮すると、GGTA1およびNLRC5遺伝子における2対立遺伝子変異にかなりの変動がある。この観察は、アガロースゲル中のバンドのサイズの相違、短縮された遺伝子生成物、およびシーケンシングの困難、図29A～図29B、図30A～図30B、図31A～図31B、および図32A～図32Bによって支持される。個々の対立遺伝子のクローニングを、配列の改変を詳細に解読するために行う。しかし、胎仔の表現型、DNAシーケンシング、および機能的な解析によって、胎仔ブタにおける2対立遺伝子のGGTA1およびNLRC5遺伝子改変の作製が支持される。

【0496】

ヒト免疫細胞の増殖に対する遺伝子ノックアウトの影響

10

次に、妊娠1の胎仔3由来の細胞を用いて、同時培養アッセイを行って、ヒト免疫細胞の増殖に対するMHCクラスI発現の低下の影響を評価した。

【0497】

混合リンパ球反応（MLR）

同時培養は、平底の96ウェルプレートで行った。カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル（CFSE）で標識したヒトPBMC（ $2.5 \mu\text{M}/\text{ml}$ ）を、応答物として、 $0.3 \sim 0.9 \times 10^5$ 細胞/ウェルで使用した。野生型またはブタ線維芽細胞を、 $0.1 \sim 0.3 \times 10^5$ 細胞/ウェル（野生型ブタまたはGGTA1/NLRC5ノックアウト胎仔由来）を、刺激因子として、刺激因子-応答物の比が1:1、1:5および1:10として使用した。MLR同時培養を、全てのMLRアッセイで4日間行った。別の並行実験では、全てのPBMC細胞を、陽性対照としてフィトヘマグルチニン（PHA）（ $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）で刺激した。

20

【0498】

培養された細胞を洗浄して、抗CD3抗体、抗CD4抗体および抗CD8抗体で染色し、その後にホルムアルデヒド固定を続け、洗浄した。BD FACS Canto II フローサイトメーターを使用して、未改変のブタ線維芽細胞と比較したGGTA1/NLRC5ノックアウト胎仔由来の線維芽細胞に応答したCD8+およびCD4+T細胞の増殖能力を評価した。データを、FACS diva/Flow Joソフトウェア（Tristar, San Diego, CA, USA）を使用して解析し、パーセンテージCFSE dim/lowを、プレゲーティングしたCD8 T細胞およびCD4 T細胞で決定した。

30

【0499】

野生型およびGGTA1/NLRC5ノックアウト胎仔細胞に対するヒトCD8+細胞およびCD4+T細胞の増殖応答を、図33A～図33Bに示す。細胞を、増殖の評価の前にCD4+またはCD8+としてゲーティングした（図33A）。CD8 T細胞増殖は、野生型胎仔細胞と比較して、GGTA1/NLRC5ノックアウト線維芽細胞を有する胎仔細胞により処置刺激後に低下した。CD8+T細胞増殖におけるほぼ55%の低下が、ヒト応答物が、1:1の比でGGTA1/NLRC5ノックアウト胎仔細胞で処置された場合に観察された（図33B）。野生型胎仔細胞は、ヒトCD8+T細胞で17.2%の増殖を惹起したが、胎仔3（妊娠1）由来のGGTA1/NLRC5ノックアウト胎仔細胞は、7.6%の増殖しか誘導しなかった（図33B）。野生型胎仔細胞と比較して、1:5および1:10の比で、CD8+T細胞増殖応答に相違は観察されなかった（図33B）。野生型胎仔細胞と比較して、GGTA1/NLRC5ノックアウトに応答したCD4+T細胞増殖に変化は観察されなかった（図33B）。

40

【0500】

一部の実施形態を示し、記載してきたが、このような実施形態は、単なる例示で示される。多くの変動、変化および置き換えが、本発明から逸脱することなく、ここで当業者に思い浮かぶ。本明細書に記載される本発明の実施形態に対する種々の代替が、本発明を行うのに使用されることが理解されるべきである。

一実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

50

(項目 1)

1 つまたは複数の第 1 の遺伝子の低減されたタンパク質発現を有する遺伝子改変された動物であって、前記遺伝子改変された動物は、ローラシア獣上目のメンバーであり、または非ヒト霊長類であり、前記 1 つまたは複数の第 1 の遺伝子は、

a) 主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) I 特異的エンハンセオソームの成分、

b) MHC I 結合性ペプチドのトランスポーター、および／または

c) 補体成分 3 (C3)

を含み、

前記低減されたタンパク質発現は、遺伝子改変されていない対応する動物と比較したものである、遺伝子改変された動物。

10

(項目 2)

ローラシア獣上目のメンバーを含み、ローラシア獣上目の前記メンバーが有蹄動物である、項目 1 に記載の遺伝子改変された動物。

(項目 3)

前記有蹄動物がブタである、項目 2 に記載の遺伝子改変された動物。

(項目 4)

前記 1 つまたは複数の第 1 の遺伝子の前記タンパク質発現が、前記遺伝子改変された動物中には存在しない、項目 1 から 3 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物。

(項目 5)

タンパク質発現の前記低減が、前記 1 つまたは複数の第 1 の遺伝子の機能を不活性化する、項目 1 から 4 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物。

20

(項目 6)

2 つまたはそれ超の前記第 1 の遺伝子の低減されたタンパク質発現を有する、項目 1 から 5 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物。

(項目 7)

MHC I 特異的エンハンセオソームの成分の低減されたタンパク質発現を含み、MHC I 特異的エンハンセオソームの前記成分が NOD 様受容体ファミリー CARD ドメイン含有 5 (NLRC5) である、項目 1 から 6 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物。

(項目 8)

MHC I 結合性ペプチドのトランスポーターの低減されたタンパク質発現を含み、前記トランスポーターが抗原プロセッシング関連トランスポーター 1 (TAP1) である、項目 1 から 7 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物。

30

(項目 9)

C3 の低減されたタンパク質発現を含む、項目 1 から 8 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物。

(項目 10)

3 つまたはそれ超の前記第 1 の遺伝子の低減されたタンパク質発現を含む、項目 1 から 9 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物。

(項目 11)

1 つまたは複数の第 2 の遺伝子の低減されたタンパク質発現をさらに含み、前記 1 つまたは複数の第 2 の遺伝子は、

40

a) ナチュラルキラー (NK) 群 2 D リガンド、

b) ヒトでは発現されない内因性遺伝子、

c) CXCR3 ケモカイン受容体 (CXCR3) リガンド、および／または

d) MHC II トランスアクチベーター (CIITA)

を含み、

前記低減されたタンパク質発現は、遺伝子改変されていない対応する動物と比較したものである、項目 1 から 10 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物。

(項目 12)

50

前記1つまたは複数の第2の遺伝子の前記タンパク質発現が、前記遺伝子改変された動物中には存在しない、項目11に記載の遺伝子改変された動物。

(項目13)

タンパク質発現の前記低減が、前記1つまたは複数の第2の遺伝子の機能を不活性化する、項目11または12に記載の遺伝子改変された動物。

(項目14)

NK群2Dリガンドの低減されたタンパク質発現を含み、前記NK群2Dリガンドが、MHCクラスIポリペプチド関連配列A(MICA)またはMHCクラスIポリペプチド関連配列B(MICB)である、項目11から13のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物。

10

(項目15)

ヒトでは発現されない内因性遺伝子の低減されたタンパク質発現を含み、ヒトでは発現されない前記内因性遺伝子が、糖タンパク質ガラクトシルトランスフェラーゼアルファ1, 3(GGT A1)、推定シチジナーリン酸-N-アセチルノイラミン酸ヒドロキシラーゼ様タンパク質(CMAH)またはβ1, 4-N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ(B4GALNT2)である、項目11から14のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物。

(項目16)

CXCR3リガンドの低減されたタンパク質発現を含み、前記CXCR3リガンドが、C-X-Cモチーフモカイニン10(CXCL10)である、項目11から15のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物。

20

(項目17)

1つもしくは複数のタンパク質またはそれらの機能的断片をコードする1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドをさらに含み、前記1つまたは複数のタンパク質は、

a) MHC I形成サプレッサー、

b) 補体活性化のレギュレーター、

c) NK細胞に対する阻害性リガンド、

d) B7ファミリーメンバー、

e) CD47、

f) セリンプロテアーゼ阻害剤、および／または

g) ガレクチン

を含む、項目1から16のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物。

30

(項目18)

前記1つまたは複数のタンパク質がヒトタンパク質である、項目17に記載の遺伝子改変された動物。

(項目19)

MHC I形成サプレッサーをコードする1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含み、前記MHC I形成サプレッサーが感染細胞タンパク質47(ICP47)である、項目17または18に記載の遺伝子改変された動物。

(項目20)

40

補体活性化のレギュレーターをコードする1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含み、前記補体活性化のレギュレーターが、表面抗原分類46(CD46)、表面抗原分類55(CD55)または表面抗原分類59(CD59)である、項目17から19のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物。

(項目21)

NK細胞に対する阻害性リガンドをコードする1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含み、NK細胞に対する前記阻害性リガンドが、白血球抗原E(HLA-E)、ヒト白血球抗原G(HLA-G)またはβ-2-ミクログロブリン(B2M)である、項目17から20のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物。

(項目22)

50

H L A－Gをコードする1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含み、前記H L A－Gが、H L A－G 1、H L A－G 2、H L A－G 3、H L A－G 4、H L A－G 5、H L A－G 6またはH L A－G 7である、項目2 1に記載の遺伝子改変された動物。

(項目2 3)

前記H L A－GがH L A－G 1である、項目2 2に記載の遺伝子改変された動物。

(項目2 4)

B 7ファミリーメンバーをコードする1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含み、前記B 7ファミリーメンバーがプログラム死ーリガンドである、項目1 7から2 3のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物。

(項目2 5)

前記プログラム死ーリガンドが、プログラム死ーリガンド1 (P D－L 1) またはプログラム死ーリガンド2 (P D－L 2) である、項目2 4に記載の遺伝子改変された動物。

(項目2 6)

前記1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドが、P D－L 1およびP D－L 2の両方をコードする、項目2 5に記載の遺伝子改変された動物。

(項目2 7)

セリンプロテアーゼ阻害剤をコードする1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含み、前記セリンプロテアーゼ阻害剤がセリンプロテアーゼ阻害剤9 (S p i 9) である、項目1 7から2 6のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物。

(項目2 8)

ガレクチンをコードする1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含み、前記ガレクチンがガレクチン－9である、項目1 7から2 7のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物。

(項目2 9)

a) C 3の低減されたタンパク質発現；

b) C X C L 1 0、G G T A 1、C M A Hおよび／もしくはB 4 G A L N T 2の低減されたタンパク質発現；ならびに／または

c)

i) H L A－G 1、H L A－Eもしくはそれらの機能的断片、

i i) P D－L 1もしくはその機能的断片、

i i i) P D－L 2もしくはその機能的断片、および／または

i v) C D 4 7もしくはその機能的断片

をコードする1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチド

を含む、項目1 から2 8のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物。

(項目3 0)

前記1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドが、遍在性プロモーターに隣接して挿入される、項目1 7から2 9のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物。

(項目3 1)

前記遍在性プロモーターがR o s a 2 6プロモーターである、項目3 0に記載の遺伝子改変された動物。

(項目3 2)

前記1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドが、標的化遺伝子のプロモーターに隣接して、または前記標的化遺伝子内に挿入される、項目1 7から3 1のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物。

(項目3 3)

前記標的化遺伝子が、前記第1の遺伝子のうちの1つまたは前記第2の遺伝子のうちの1つである、項目3 2に記載の遺伝子改変された動物。

(項目3 4)

前記1つまたは複数の第1の遺伝子の前記タンパク質発現が、C R I S P R／c a s系を使用して低減される、項目1 から3 3のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物。

10

20

30

40

50

(項目 3 5)

前記 1 つまたは複数の第 2 の遺伝子の前記タンパク質発現が、C R I S P R / c a s 系を使用して低減される、項目 1 1 から 3 4 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物。

(項目 3 6)

a) N K 細胞に対する阻害性リガンドまたはその機能的断片をコードする外因性ポリヌクレオチド、および

b) 内因性遺伝子の低減されたタンパク質発現を含む、ローラシア獣上目のメンバーである、または非ヒト霊長類である、遺伝子改変された動物であって、

前記低減されたタンパク質発現は、遺伝子改変されていない対応する動物と比較したものである、遺伝子改変された動物。

(項目 3 7)

N K 細胞に対する前記阻害性リガンドが、H L A - E または H L A - G である、項目 3 6 に記載の遺伝子改変された動物。

(項目 3 8)

N K 細胞に対する前記阻害性リガンドが H L A - G であり、前記 H L A - G が、H L A - G 1、H L A - G 2、H L A - G 3、H L A - G 4、H L A - G 5、H L A - G 6 または H L A - G 7 である、項目 3 7 に記載の遺伝子改変された動物。

(項目 3 9)

前記 H L A - G が H L A - G 1 である、項目 3 8 に記載の遺伝子改変された動物。

(項目 4 0)

前記内因性遺伝子が、ヒトでは発現されない遺伝子である、項目 3 6 から 3 9 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物。

(項目 4 1)

前記内因性遺伝子が、G G T A 1、C M A H および / または B 4 G A L N T 2 である、項目 3 6 から 4 0 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物。

(項目 4 2)

a) P D - L 1 もしくはその機能的断片、
b) P D - L 2 もしくはその機能的断片、および / または
c) C D 4 7 もしくはその機能的断片
をコードする外因性ポリヌクレオチドをさらに含む、項目 3 6 から 4 1 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物。

(項目 4 3)

前記外因性ポリヌクレオチドが、遍在性プロモーターに隣接して挿入される、項目 3 6 から 4 2 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物。

(項目 4 4)

前記遍在性プロモーターが R o s a 2 6 プロモーターである、項目 4 3 に記載の遺伝子改変された動物。

(項目 4 5)

前記外因性ポリヌクレオチドが、前記内因性遺伝子のプロモーターに隣接して、または前記内因性遺伝子内に挿入される、項目 3 6 から 4 4 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物。

(項目 4 6)

前記内因性遺伝子の前記タンパク質発現が、C R I S P R / c a s 系を使用して低減される、項目 3 6 から 4 5 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物。

(項目 4 7)

項目 1 から 4 6 のいずれか一項に記載の 2 つまたはそれ超の動物を含む、遺伝子改変された動物の集団。

(項目 4 8)

少なくとも2つまたはそれ超の動物が、同一の表現型を有する、項目47に記載の遺伝子改変された動物の集団。

(項目49)

少なくとも2つまたはそれ超の動物が、同一の遺伝子型を有する、項目47または48に記載の遺伝子改変された動物の集団。

(項目50)

項目1から46のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物から単離された、脾臓または脾島。

(項目51)

項目1から46のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物から単離された、遺伝子改変された細胞、組織または臓器。

(項目52)

1つまたは複数の第1の遺伝子の低減されたタンパク質発現を含む、ローラシア獣上目のメンバーまたは非ヒト霊長類由来の遺伝子改変された細胞であって、前記1つまたは複数の第1の遺伝子は、

a) MHC I 特異的エンハンセオソームの成分、

b) MHC I 結合性ペプチドのトランスポーター、および／または

c) C3

を含み、

前記低減されたタンパク質発現は、遺伝子改変されていない対応する細胞と比較したものである、遺伝子改変された細胞。

(項目53)

MHC I 特異的エンハンセオソームの成分の低減されたタンパク質発現を含み、MHC I 特異的エンハンセオソームの前記成分がNLRC5である、項目52に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目54)

MHC I 結合性ペプチドのトランスポーターの低減されたタンパク質発現を含み、MHC I 結合性ペプチドの前記トランスポーターがTAP1である、項目52または53に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目55)

C3の低減されたタンパク質発現を含む、項目52から54のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目56)

1つまたは複数の第2の遺伝子の低減されたタンパク質発現をさらに含み、前記1つまたは複数の第2の遺伝子が、

a) NK群2Dリガンド、

b) ヒトでは発現されない内因性遺伝子、

c) CXCR3リガンド、および／または

d) CITA

を含み、

前記低減されたタンパク質発現は、遺伝子改変されていない対応する細胞と比較したものである、項目52から55のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目57)

NK群2Dリガンドの低減されたタンパク質発現を含み、前記NK群2Dリガンドが、MICAおよび／またはMICBである、項目56に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目58)

ヒトでは発現されない内因性遺伝子の低減されたタンパク質発現を含み、ヒトでは発現されない前記内因性遺伝子が、GATA1、CMAHおよび／またはB4GALNT2である、項目56または57に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目59)

10

20

30

40

50

C X C R 3 リガンドの低減されたタンパク質発現を含み、前記 C X C R 3 リガンドが C X C L 1 0 である、項目 5 6 から 5 8 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 6 0)

1 つもしくは複数のタンパク質またはそれらの機能的断片をコードする 1 つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドをさらに含み、前記 1 つもしくは複数のタンパク質またはそれらの機能的断片が、

a) M H C I 形成サプレッサー、

b) 補体活性化のレギュレーター、

c) N K 細胞に対する阻害性リガンド、

d) B 7 ファミリーメンバー、

e) C D 4 7、

f) セリンプロテアーゼ阻害剤、および／または

g) ガレクチン

を含む、項目 5 2 から 5 9 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 6 1)

前記 1 つもしくは複数のタンパク質またはそれらの機能的断片がヒトタンパク質である、項目 6 0 に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 6 2)

M H C I 形成サプレッサーをコードする 1 つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含み、前記 M H C I 形成サプレッサーが I C P 4 7 である、項目 6 0 または 6 1 に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 6 3)

補体活性化のレギュレーターをコードする 1 つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含み、前記補体活性化のレギュレーターが、C D 4 6、C D 5 5 および／または C D 5 9 である、項目 6 0 から 6 2 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 6 4)

N K 細胞に対する阻害性リガンドをコードする 1 つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含み、N K 細胞に対する前記阻害性リガンドが、H L A - E、H L A - G および／または B 2 M である、項目 6 0 から 6 3 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 6 5)

N K 細胞に対する前記阻害性リガンドが H L A - G であり、前記 H L A - G が、H L A - G 1、H L A - G 2、H L A - G 3、H L A - G 4、H L A - G 5、H L A - G 6 および／または H L A - G 7 である、項目 6 4 に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 6 6)

前記 H L A - G が H L A - G 1 である、項目 6 5 に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 6 7)

B 7 ファミリーメンバーをコードする 1 つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含み、前記 B 7 ファミリーメンバーがプログラム死ーリガンドである、項目 6 0 から 6 6 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 6 8)

前記プログラム死ーリガンドが、プログラム死ーリガンド 1 (P D - L 1) および／またはプログラム死ーリガンド 2 (P D - L 2) である、項目 6 7 に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 6 9)

前記プログラム死ーリガンドが、P D - L 1 および P D - L 2 の両方である、項目 6 8 に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 7 0)

セリンプロテアーゼ阻害剤をコードする 1 つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含み、前記セリンプロテアーゼ阻害剤がセリンプロテアーゼ阻害剤 9 (S p i 9) である、項目 6 0 から 6 9 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞。

10

20

30

40

50

(項目 7 1)

ガレクチンをコードする 1 つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドを含み、前記ガレクチンがガレクチン-9 である、項目 6 0 から 7 0 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 7 2)

a) C 3 の低減されたタンパク質発現；

b) C X C L 1 0、G G T A 1、C M A H および／もしくは B 4 G A L N T 2 の低減されたタンパク質発現；ならびに／または

c)

i) H L A - G 1、H L A - E もしくはそれらの機能的断片、

i i) P D - L 1 もしくはその機能的断片、

i i i) P D - L 2 もしくはその機能的断片、および／または

i v) C D 4 7 もしくはその機能的断片

をコードする外因性ポリヌクレオチド

を含む、項目 5 3 から 7 1 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 7 3)

前記 1 つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドが、遍在性プロモーターに隣接して挿入される、項目 6 0 から 7 2 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 7 4)

前記遍在性プロモーターが R o s a 2 6 プロモーターである、項目 7 3 に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 7 5)

前記 1 つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドが、標的化遺伝子のプロモーターに隣接して、または前記標的化遺伝子内に挿入される、項目 6 0 から 7 4 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 7 6)

前記標的化遺伝子が、前記第 1 の遺伝子のうちの 1 つまたは前記第 2 の遺伝子のうちの 1 つである、項目 7 5 に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 7 7)

前記 1 つまたは複数の第 1 の遺伝子の前記タンパク質発現が、C R I S P R／c a s 系を使用して低減される、項目 5 2 から 7 6 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞

(項目 7 8)

前記 1 つまたは複数の第 2 の遺伝子の前記タンパク質発現が、C R I S P R／c a s 系を使用して低減される、項目 5 6 から 7 7 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞

(項目 7 9)

a) N K 細胞に対する阻害性リガンドまたはその機能的断片をコードする外因性ポリヌクレオチド、および

b) 内因性遺伝子の低減されたタンパク質発現

を含む、ローラシア獣上目のメンバーまたは非ヒト霊長類由来の遺伝子改変された細胞であって、

前記低減されたタンパク質発現は、遺伝子改変されていない対応する細胞と比較したものである、遺伝子改変された細胞。

(項目 8 0)

N K 細胞に対する前記阻害性リガンドが、H L A - E または H L A - G である、項目 7 9 に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 8 1)

N K 細胞に対する前記阻害性リガンドが H L A - G であり、前記 H L A - G が、H L A - G 1、H L A - G 2、H L A - G 3、H L A - G 4、H L A - G 5、H L A - G 6 また

10

20

30

40

50

はH L A－G 7である、項目8 0に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目8 2)

前記H L A－GがH L A－G 1である、項目8 1に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目8 3)

前記内因性遺伝子が、ヒトでは発現されない、項目7 9から8 2のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目8 4)

前記内因性遺伝子が、G G T A 1、C M A Hおよび／またはB 4 G A L N T 2である、項目7 9から8 3のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目8 5)

a) P D－L 1もしくはその機能的断片、

b) P D－L 2もしくはその機能的断片、および／または

c) C D 4 7もしくはその機能的断片

をコードする外因性ポリヌクレオチドをさらに含む、項目7 9から8 4のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目8 6)

前記外因性ポリヌクレオチドが、遍在性プロモーターに隣接して挿入される、項目7 9から8 5のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目8 7)

前記遍在性プロモーターがR o s a 2 6プロモーターである、項目8 6に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目8 8)

前記外因性ポリヌクレオチドが、前記内因性遺伝子のプロモーターに隣接して、または前記内因性遺伝子内に挿入される、項目7 9から8 7のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目8 9)

前記内因性遺伝子の前記タンパク質発現が、C R I S P R／c a s系を使用して低減される、項目7 9から8 8のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目9 0)

脾、腎臓、眼、肝臓、小腸、肺または心臓細胞である、項目5 2から8 9のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目9 1)

脾島細胞である、項目5 2から8 9のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目9 2)

前記脾島細胞が脾β細胞である、項目9 1に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目9 3)

脾臓、肝臓、末梢血、リンパ節、胸腺または骨髓細胞である、項目5 2から9 2のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目9 4)

ブタ細胞である、項目5 2から9 3のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目9 5)

萌芽期組織、非ヒト胎仔動物、周産期非ヒト動物、新生仔非ヒト動物、離乳前非ヒト動物、若年成体非ヒト動物または成体非ヒト動物由来である、項目5 2から9 4のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目9 6)

項目5 1から9 5のいずれか一項に記載の細胞を含む注射可能な組成物を含む、対象において、移植された細胞、組織または臓器に対する寛容を生じさせることにおける使用に適切なワクチン。

(項目9 7)

項目5 1から9 6のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞を含む寛容化ワクチン

10

20

30

40

50

。

(項目 9 8)

前記遺伝子改変された細胞が、アポトーシス性細胞である、項目 9 6 または 9 7 に記載のワクチン。

(項目 9 9)

前記遺伝子改変された細胞が、固定された細胞である、項目 9 6 から 9 8 のいずれか一項に記載のワクチン。

(項目 1 0 0)

固定されていない細胞をさらに含む、項目 9 6 から 9 9 のいずれか一項に記載のワクチン。

(項目 1 0 1)

前記固定された細胞および前記固定されていない細胞が、遺伝的に同一である、項目 1 0 0 に記載のワクチン。

(項目 1 0 2)

前記固定された細胞が、化学物質によって固定され、および／または前記固定された細胞が、前記対象において免疫細胞のアレルギーを誘導する、項目 9 9 から 1 0 1 のいずれか一項に記載のワクチン。

(項目 1 0 3)

前記遺伝子改変された細胞が、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (E C D I) で固定された細胞である、項目 9 6 から 1 0 2 のいずれか一項に記載のワクチン。

(項目 1 0 4)

項目 5 2 から 9 5 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞を含む、組織または臓器。

(項目 1 0 5)

項目 5 2 から 9 5 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞を含む、脾臓または脾島。

(項目 1 0 6)

項目 5 2 から 9 5 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞および薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物。

(項目 1 0 7)

状態の処置を必要とする対象に移植して、前記対象において状態を処置することにおける使用のための、遺伝子改変された細胞、遺伝子改変された細胞を含む組織または臓器であって、前記対象は、ワクチンの使用によって、前記遺伝子改変された細胞、組織または臓器に対して寛容化される、遺伝子改変された細胞、組織または臓器。

(項目 1 0 8)

前記対象に、T細胞活性化、B細胞活性化および／または樹状細胞活性化を阻害する1つまたは複数の医薬品が投与される、項目 1 0 7 に記載の遺伝子改変された細胞、組織または臓器。

(項目 1 0 9)

状態の処置を必要とする対象において状態を処置するための方法であって、
a) 項目 5 1 から 9 5 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞または項目 1 0 4 から 1 0 8 のいずれか一項に記載の細胞、組織もしくは臓器を前記対象に移植するステップ；

b) 項目 9 6 から 1 0 3 のいずれか一項に記載のワクチンを前記対象に投与するステップ；および／あるいは

c) T細胞活性化、B細胞活性化および／または樹状細胞活性化を阻害する1つまたは複数の医薬品を前記対象に投与するステップを含む、方法。

(項目 1 1 0)

10

20

30

40

50

状態の処置を必要とする対象において状態を処置するための方法であって、

a) ワクチンを前記対象に投与するステップ；および

b) 遺伝子改変された細胞、遺伝子改変された細胞を含む組織または臓器を前記対象に移植するステップ

を含む、方法。

(項目 1 1 1)

T細胞活性化、B細胞活性化および／または樹状細胞活性化を阻害する1つまたは複数の医薬品を前記対象に投与するステップをさらに含む、項目 1 1 0 に記載の方法。

(項目 1 1 2)

移植される前記遺伝子改変された細胞が、項目 5 2 から 9 5 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞である、項目 1 1 0 もしくは 1 1 1 に記載の方法または項目 1 0 7 もしくは 1 0 8 に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 1 1 3)

前記ワクチンが、項目 9 6 から 1 0 3 のいずれか一項に記載のワクチンである、項目 1 1 0 から 1 1 2 のいずれか一項に記載の方法または項目 1 0 7 もしくは 1 0 8 に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 1 1 4)

前記ワクチンが、前記対象の体重 1 k g 当たり、0. 0 0 1 から 1. 0 までのエンドトキシン単位または約 0. 0 0 1 から 1. 0 までのエンドトキシン単位を含む、項目 1 1 0 から 1 1 3 のいずれか一項に記載の方法または項目 1 0 7 もしくは 1 0 8 に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 1 1 5)

前記ワクチンが、1 μ l 当たり 1 からまたは約 1 から 1 0 までの凝集体を含む、項目 1 1 0 から 1 1 4 のいずれか一項に記載の方法または項目 1 0 7 もしくは 1 0 8 に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 1 1 6)

前記ワクチンが、前記移植の 7 日前および前記移植の 1 日後に投与される、項目 1 1 0 から 1 1 5 のいずれか一項に記載の方法または項目 1 0 7 もしくは 1 0 8 に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 1 1 7)

前記ワクチンが、前記対象の体重 1 k g 当たり、 1×10^8 からまたは約 1×10^8 から 4×10^8 までの脾細胞または脾臓 B 細胞を少なくとも含む、項目 1 1 0 から 1 1 6 のいずれか一項に記載の方法または項目 1 0 7 もしくは 1 0 8 に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 1 1 8)

前記脾細胞または脾臓 B 細胞が、8 0 % からまたは約 8 0 % から 1 0 0 % までの C D 2 1 陽性 S L A クラス I I 陽性 B 細胞を含む、項目 1 1 7 に記載の方法または遺伝子改変された細胞。

(項目 1 1 9)

前記ワクチンが静脈内で提供される、項目 1 1 0 から 1 1 8 のいずれか一項に記載の方法または項目 1 0 7 もしくは 1 0 8 に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 1 2 0)

前記移植された細胞、組織または臓器が、前記対象に移植された後少なくとも 7 日間にわたって機能的である、項目 1 1 0 から 1 1 9 のいずれか一項に記載の方法または項目 1 0 7 もしくは 1 0 8 に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 1 2 1)

前記移植するステップが異種移植するステップである、項目 1 0 9 から 1 2 0 のいずれか一項に記載の方法または項目 1 0 7 もしくは 1 0 8 に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 1 2 2)

前記医薬品が、第 1 の用量の抗 C D 4 0 抗体を含む、項目 1 1 0 から 1 2 1 のいずれか

10

20

30

40

50

一項に記載の方法または項目 1 0 7 もしくは 1 0 8 に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 1 2 3)

前記第 1 の用量が、前記移植の約 8 日前に前記対象に与えられる、項目 1 2 2 に記載の方法または遺伝子改変された細胞。

(項目 1 2 4)

前記第 1 の用量が、前記対象の体重 1 k g 当たり 3 0 m g からまたは約 3 0 m g から 7 0 m g までの抗 C D 4 0 抗体を含む、項目 1 2 3 に記載の方法または遺伝子改変された細胞。

(項目 1 2 5)

1 つまたは複数のさらなる免疫抑制剤を前記対象に投与するステップをさらに含む、項目 1 0 9 から 1 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 2 6)

前記対象に投与するための 1 つまたは複数のさらなる免疫抑制剤をさらに含む、項目 1 0 7 または 1 0 8 に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 1 2 7)

前記 1 つまたは複数のさらなる免疫抑制剤が、B 細胞枯渇化抗体、m T O R 阻害剤、T N F - アルファ阻害剤、I L - 6 阻害剤、補体 C 3 もしくは C 5 阻害剤、および／またはナイトロジェンマスタードアルキル化剤を含む、項目 1 2 5 に記載の方法または項目 1 2 6 に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 1 2 8)

前記さらなる免疫抑制剤のうちの 1 つが、ナイトロジェンマスタードアルキル化剤である、項目 1 2 7 に記載の方法または遺伝子改変された細胞。

(項目 1 2 9)

前記ナイトロジェンマスタードアルキル化剤のうちの 1 つが、シクロホスファミドである、項目 1 2 8 に記載の方法または遺伝子改変された細胞。

(項目 1 3 0)

前記シクロホスファミドが、前記ワクチンの前記投与の 2 日後または 3 日後に投与される、項目 1 2 9 に記載の方法または遺伝子改変された細胞。

(項目 1 3 1)

前記シクロホスファミドが、5 0 m g / k g / 日からまたは約 5 0 m g / k g / 日から 6 0 m g / k g / 日までの用量で投与される、項目 1 2 9 または 1 3 0 に記載の方法または遺伝子改変された細胞。

(項目 1 3 2)

前記対象がヒト対象である、項目 1 1 0 から 1 3 1 のいずれか一項に記載の方法または項目 1 0 7 もしくは 1 0 8 に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 1 3 3)

前記対象が非ヒト動物である、項目 1 1 0 から 1 3 1 のいずれか一項に記載の方法または項目 1 0 7 もしくは 1 0 8 に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 1 3 4)

前記非ヒト動物が、ネコまたはイヌである、項目 1 3 3 に記載の方法または遺伝子改変された細胞。

(項目 1 3 5)

前記状態が疾患である、項目 1 0 9 から 1 3 4 のいずれか一項に記載の方法または項目 1 0 7 もしくは 1 0 8 に記載の遺伝子改変された細胞。

(項目 1 3 6)

前記疾患が糖尿病である、項目 1 3 5 に記載の方法または遺伝子改変された細胞。

(項目 1 3 7)

前記糖尿病が、1 型糖尿病、2 型糖尿病、外科的糖尿病、嚢胞性線維症関連糖尿病および／またはミトコンドリア糖尿病である、項目 1 3 6 に記載の方法または遺伝子改変された細胞。

10

20

30

40

50

(項目 1 3 8)

グラフトに対してレシピエントを免疫寛容化するための方法であって、項目 9 6 から 1 0 3 のいずれか一項に記載のワクチンを前記レシピエントに提供するステップを含む、方法。

(項目 1 3 9)

状態の処置を必要とする対象において状態を処置するための方法であって、項目 5 2 から 9 5 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞を前記対象に移植するステップを含む、方法。

(項目 1 4 0)

状態の処置を必要とする対象に移植して、前記対象において状態を処置することにおける使用のための、項目 5 2 から 9 5 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞、または項目 5 2 から 9 5 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞を含む組織もしくは臓器であって、前記対象は、項目 9 6 から 1 0 3 のいずれか一項に記載のワクチンによって、前記遺伝子改変された細胞、組織または臓器に対して寛容化され、T細胞活性化、B細胞活性化および／または樹状細胞活性化を阻害する 1 つまたは複数の医薬品が、前記対象に投与される、遺伝子改変された細胞、または遺伝子改変された細胞を含む組織もしくは臓器。

10

(項目 1 4 1)

前記移植するステップが異種移植するステップである、項目 1 4 0 に記載の遺伝子改変された細胞。

20

(項目 1 4 2)

状態の処置を必要とする対象に投与して、前記対象において状態を処置することにおける使用のための、項目 5 2 から 9 5 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞、または項目 5 2 から 9 5 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された細胞を含む組織もしくは臓器。

(項目 1 4 3)

グラフトに対してレシピエントを免疫寛容化することにおける使用のための、項目 9 6 から 1 0 3 のいずれか一項に記載のワクチン。

(項目 1 4 4)

項目 1 から 4 6 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物を作製するための方法であって、

30

a) MHC I 特異的エンハンセオソームの成分、MHC I 結合性ペプチドのトランスポーターおよび／または C 3 のうちの 1 つまたは複数の低減された発現を有する細胞を取得するステップ；

b) 前記細胞から胚を生成するステップ；ならびに

c) 前記胚を、前記遺伝子改変された動物へと成長させるステップを含む、方法。

(項目 1 4 5)

前記細胞が接合体である、項目 1 4 4 に記載の方法。

(項目 1 4 6)

40

項目 1 から 4 6 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された動物を作製するための方法であって、

a) MHC I 特異的エンハンセオソームの成分、MHC I 結合性ペプチドのトランスポーターおよび／または C 3 のうちの 1 つまたは複数の低減された発現を有する第 1 の細胞を取得するステップ；

b) 前記第 1 の細胞の核を第 2 の細胞に移入して、胚を生成するステップ；ならびに

c) 前記胚を、前記遺伝子改変された動物へと成長させるステップを含む、方法。

(項目 1 4 7)

前記低減が、遺伝子編集によって実施される、項目 1 4 4 から 1 4 6 のいずれか一項に

50

記載の方法。

(項目 1 4 8)

前記遺伝子編集が、C R I S P R / c a s 系を使用して実施される、項目 1 4 7 に記載の方法。

【図 1】

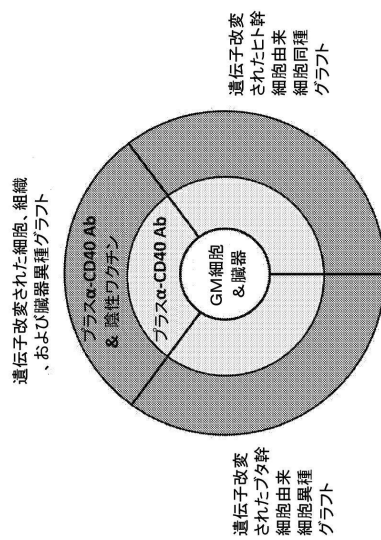


FIG. 1

【図 2】

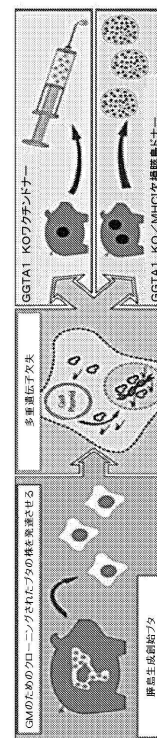


FIG. 2

【図 3】

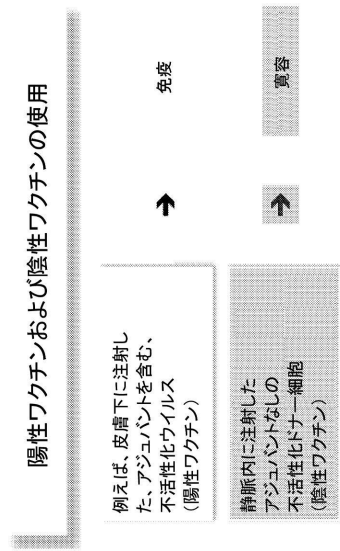


FIG. 3

【図 4】

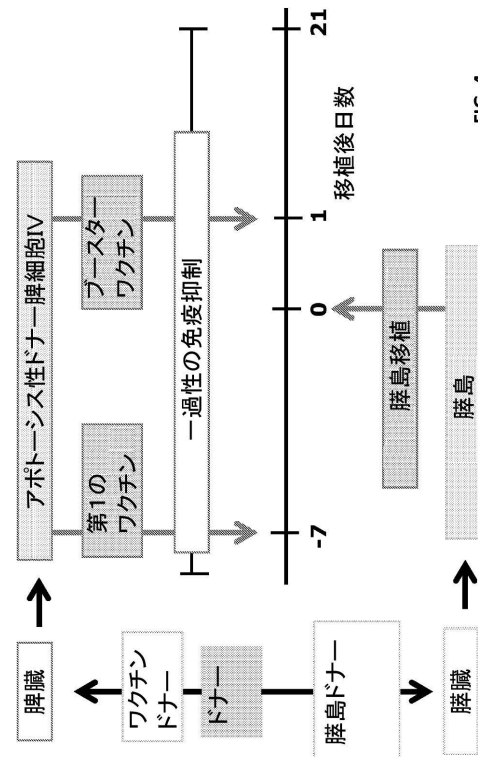


FIG. 4

【図 5】

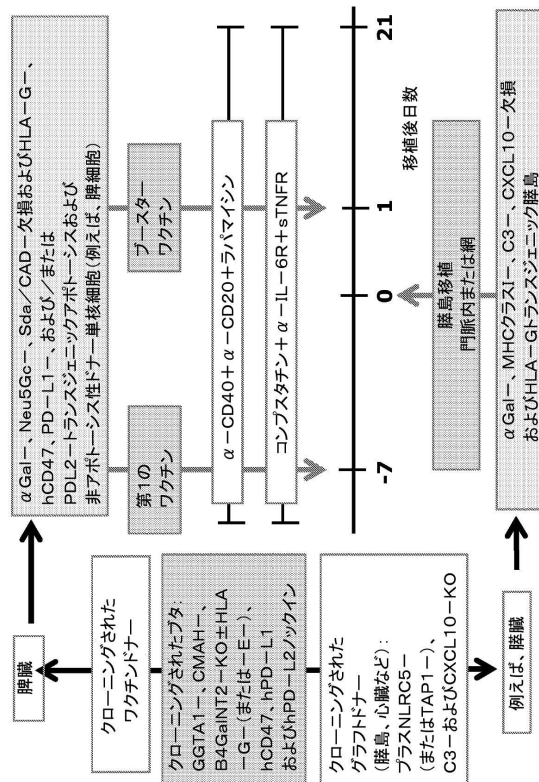


FIG. 5

【図 6】

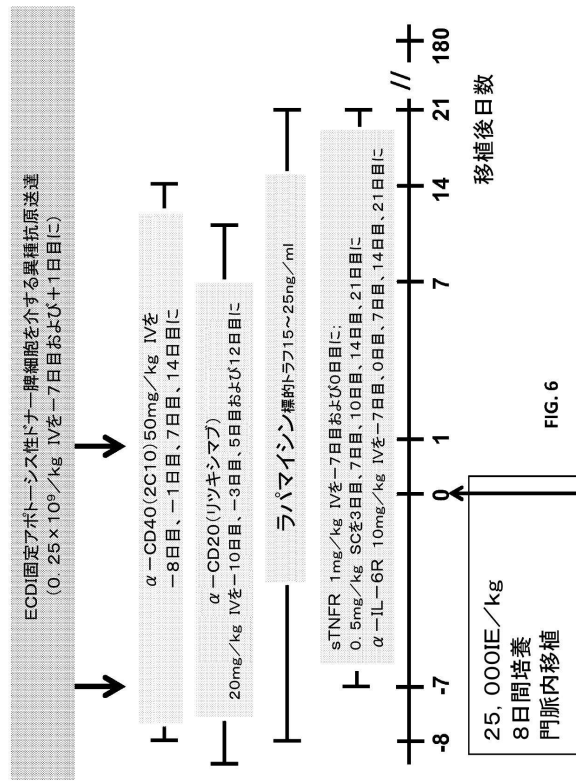
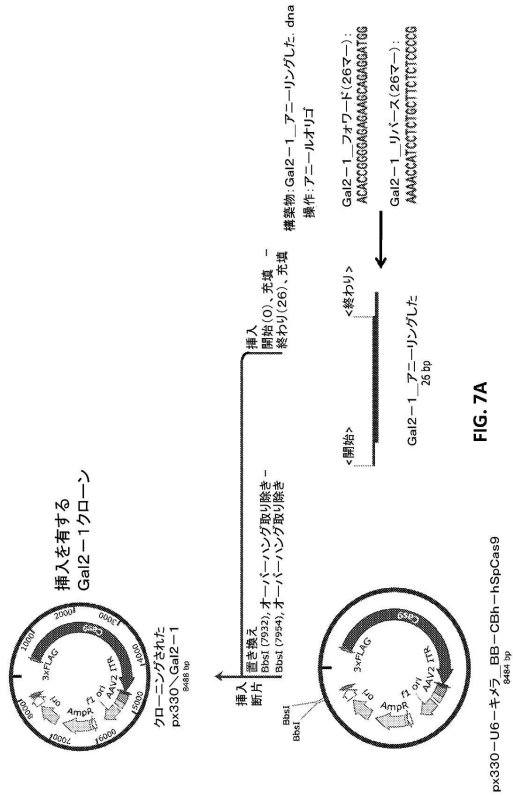
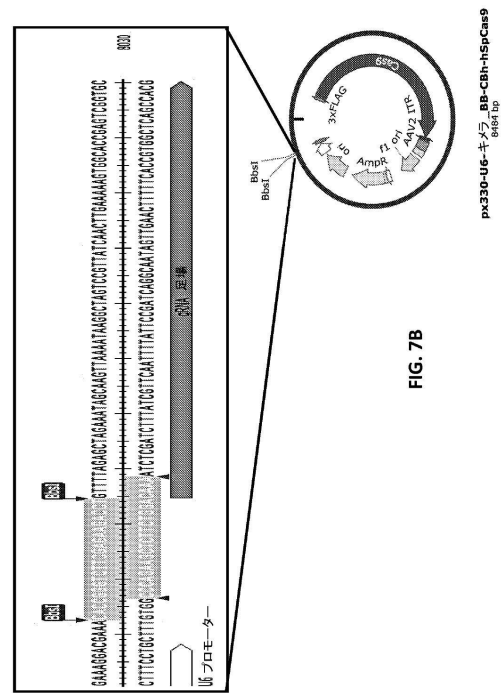


FIG. 6

【図 7 A】



【図 7 B】



【図 7 C】

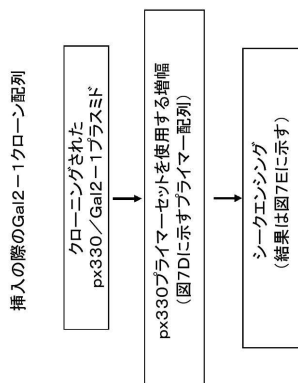


FIG. 7C

【图 7 D】

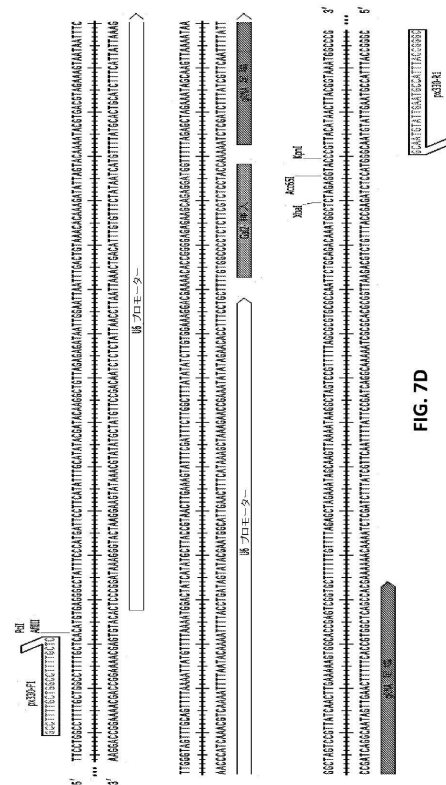
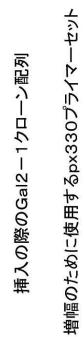


FIG. 7D

【図 7 E】

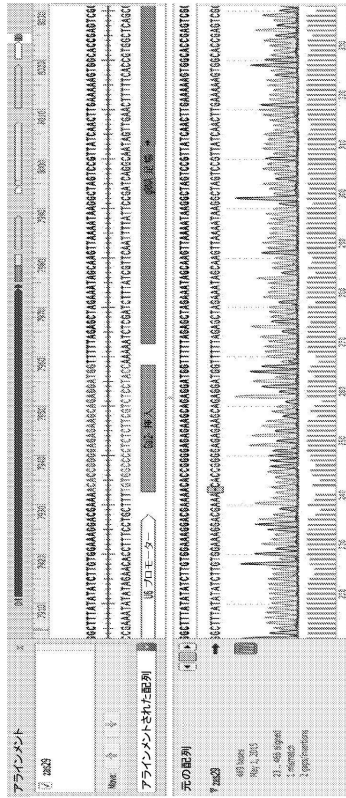
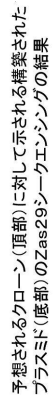


FIG. 7E

【図 8 A】

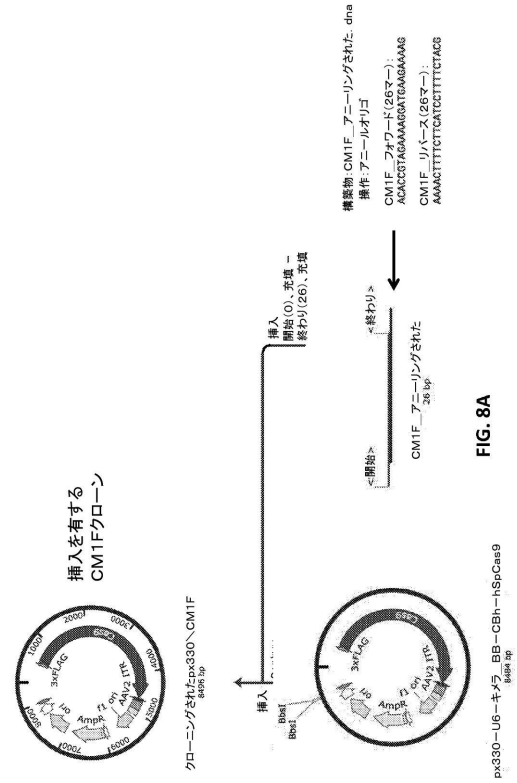


FIG. 8A

【図 8 B】

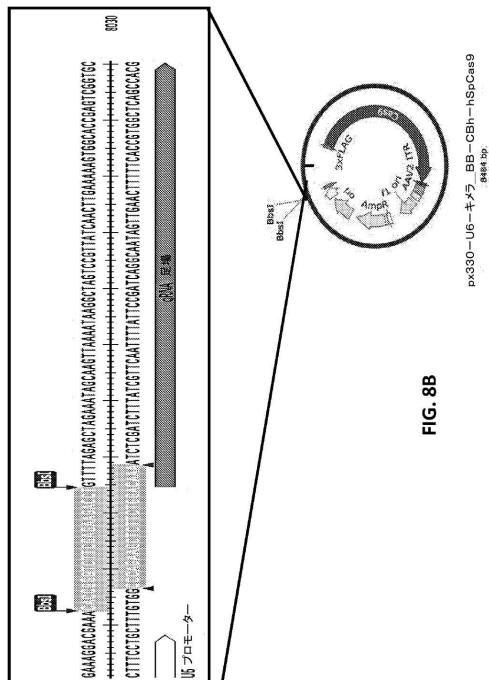


FIG. 8B

【図 8 C】

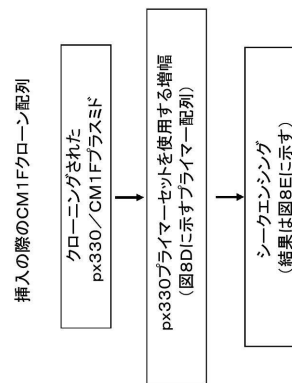
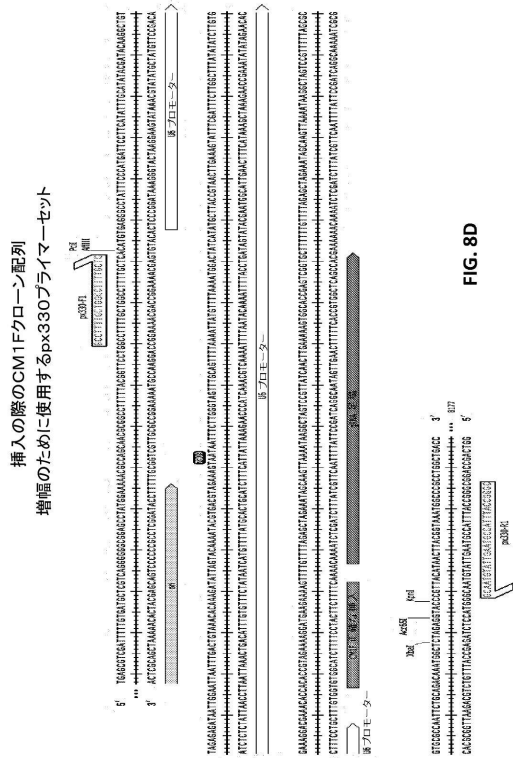


FIG. 8C

【図 8 D】



【図 8 E】

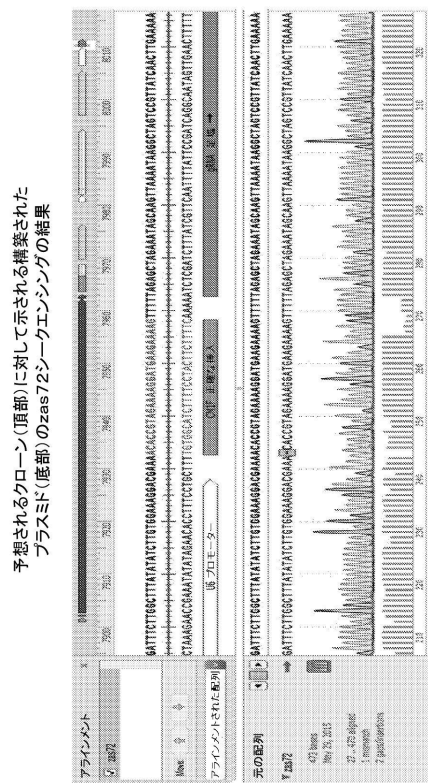
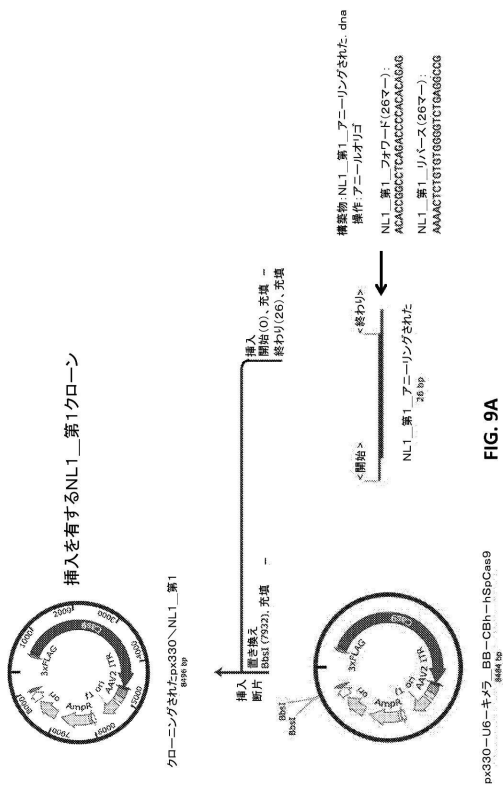
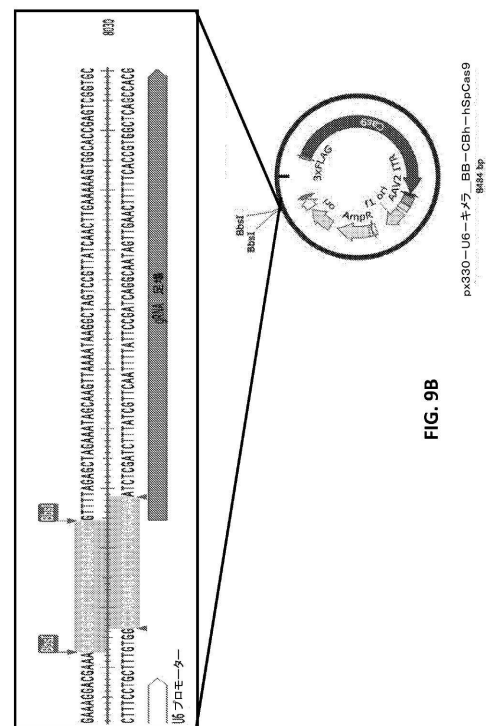


FIG. 8E

【図 9 A】



【図 9 B】



【図 9 C】

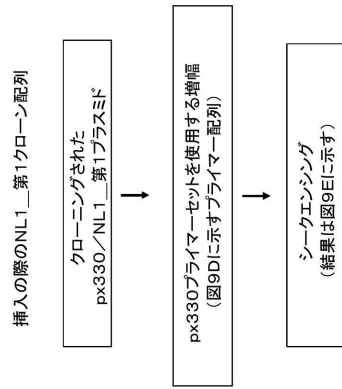


FIG. 9C

【图 9 D】

挿入の際のNL1_第1クローン配列
増幅のために使用するpx330プライマーセット

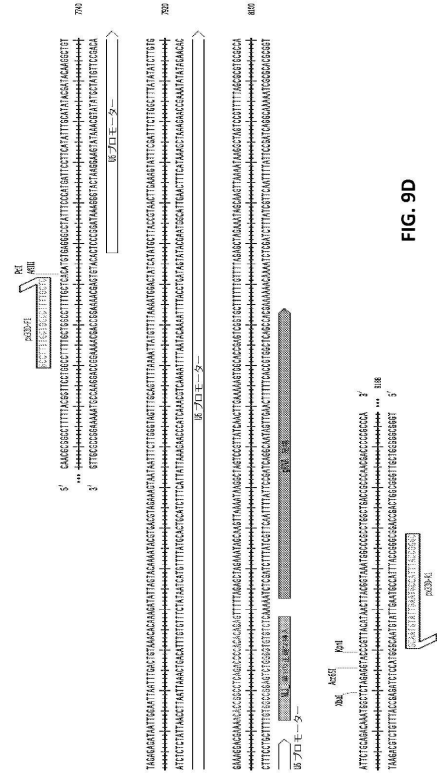


FIG. 9D

【図 9 E】

予想されるクローン(頂部)に対して示される構築された
プラスミド(底部)のzas40シーケンシングの結果

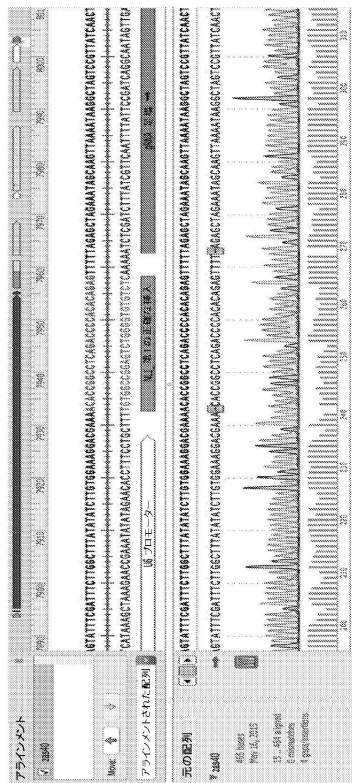
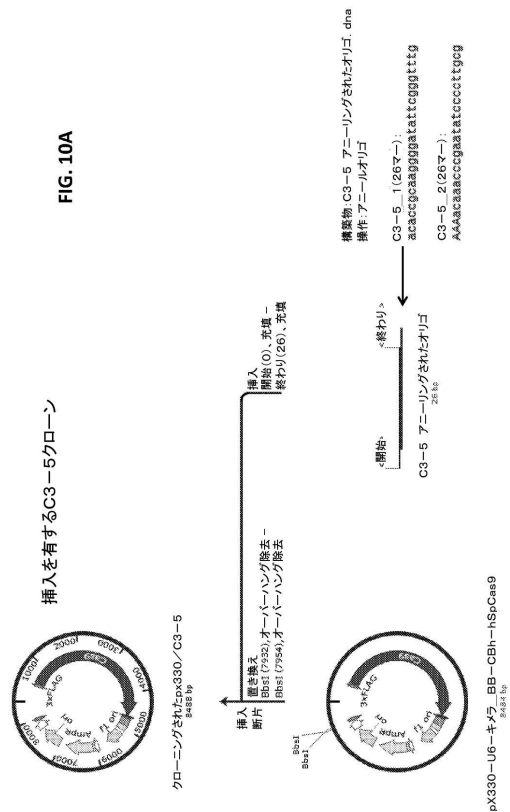


FIG. 9E

【図 10 A】

挿入を有するC3-5クローン



【図 1 1 E】

予想されるクローン(頂部)に対して示される構築されたプラスミド(底部)のKVM1_F01_005シーケンシングの結果

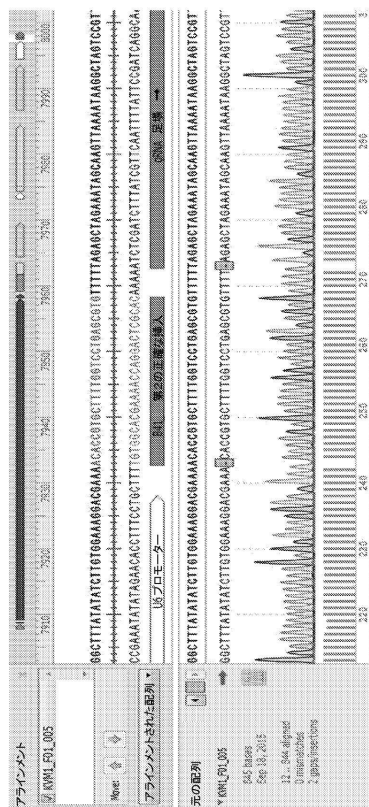
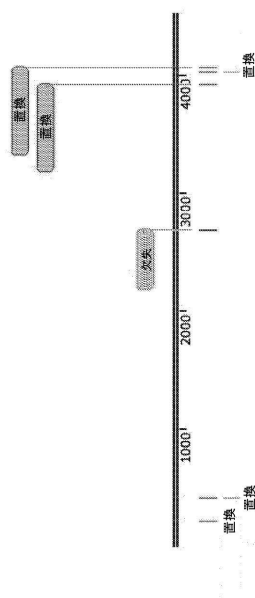


FIG. 11E

【図 12】

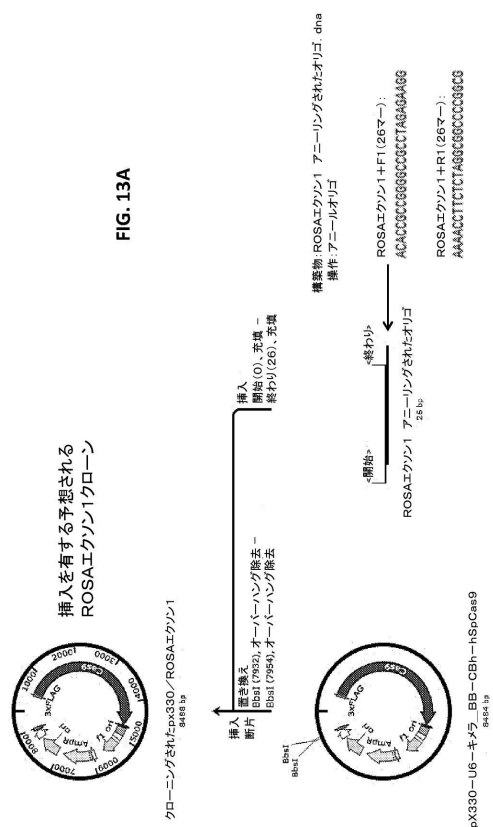


4524 bp

FIG. 12

【図 1 3 A】

FIG. 13A



【図 1 3 B】

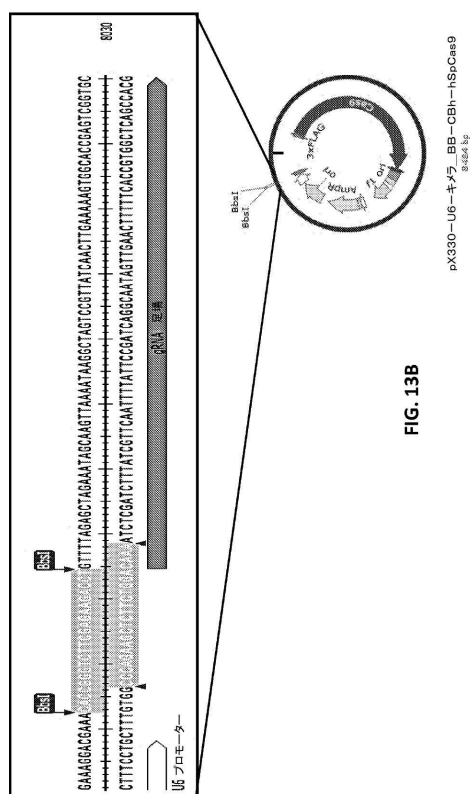
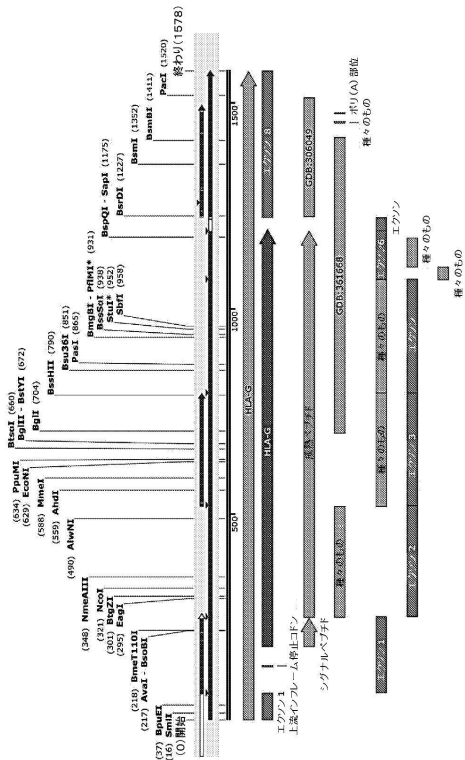
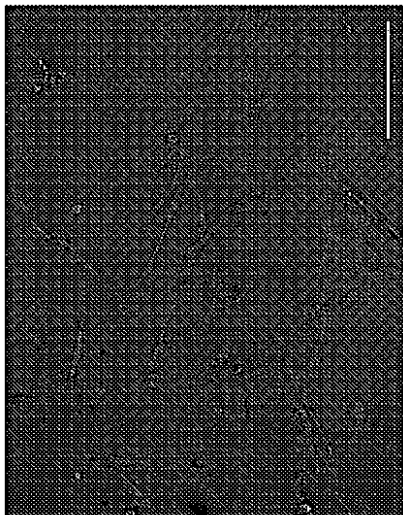


FIG. 13B

【図 1 4 B】



【図 1 7 A】



A

【図 1 5】

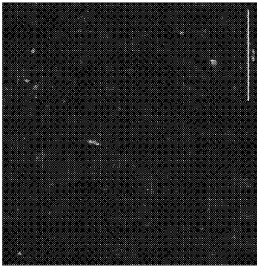


FIG. 15

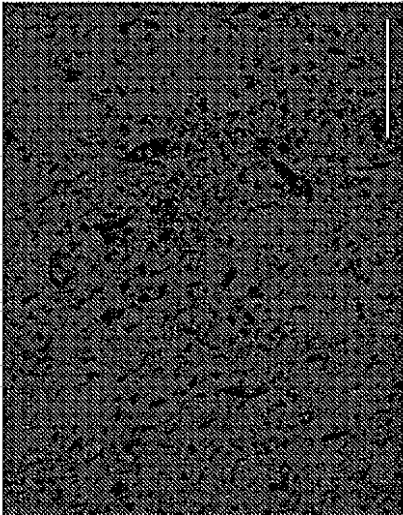
【図 1 6】



FIG. 16

FIG. 14B

【図 1 7 B】



B

【図 20】

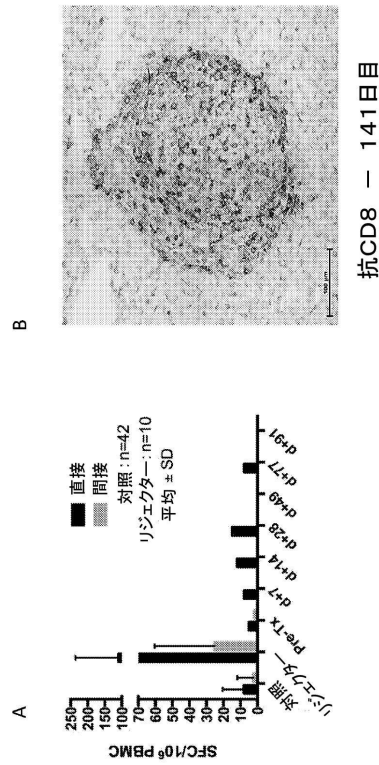


FIG. 20

【図 21 A B】

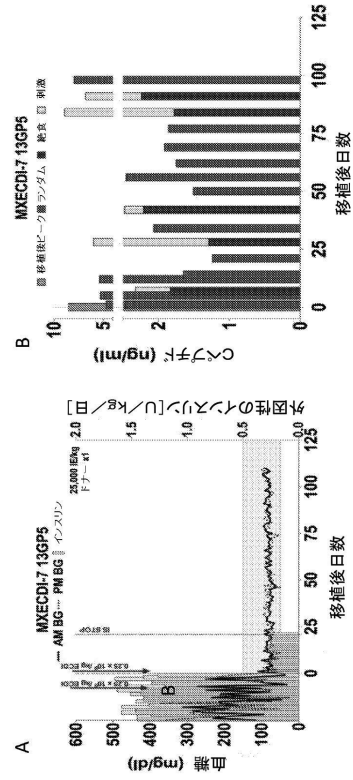


FIG. 21

【図 21 C D】

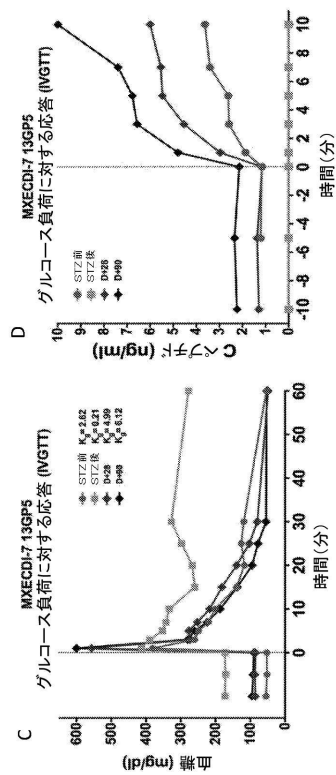


FIG. 21 (続き)

【図 22】

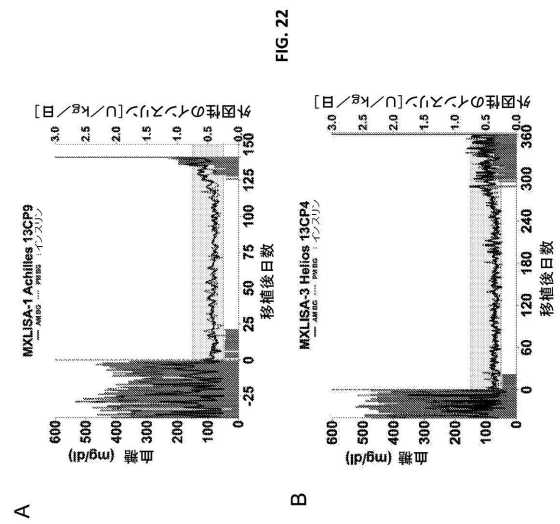


FIG. 22

【図 27】

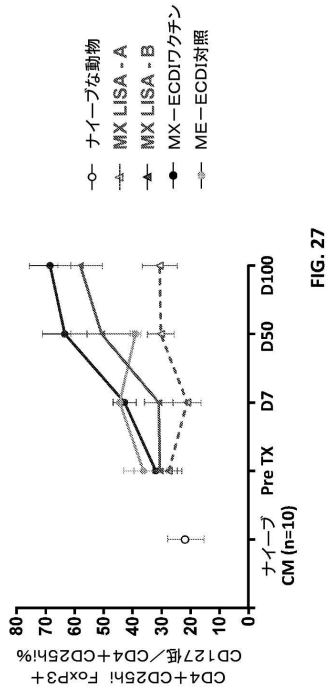


FIG. 27

【図 28】

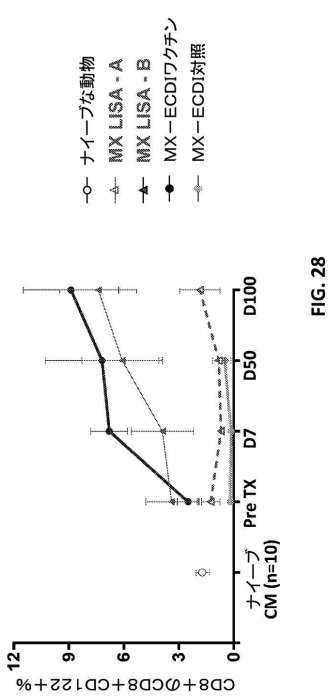


FIG. 28

【図 29 A】

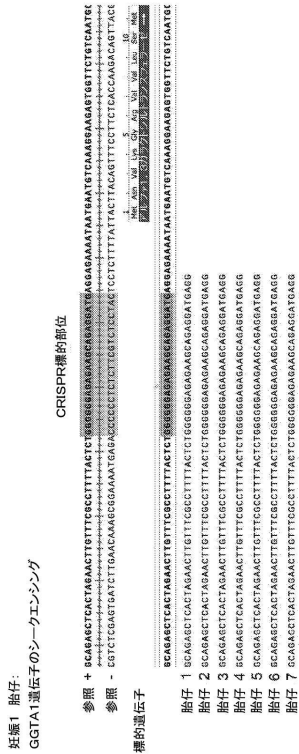


FIG. 29A

【図 29 B】

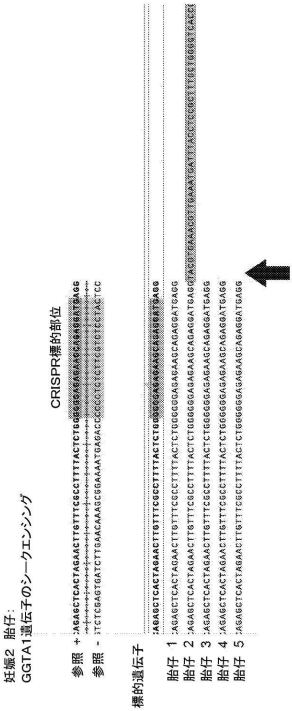
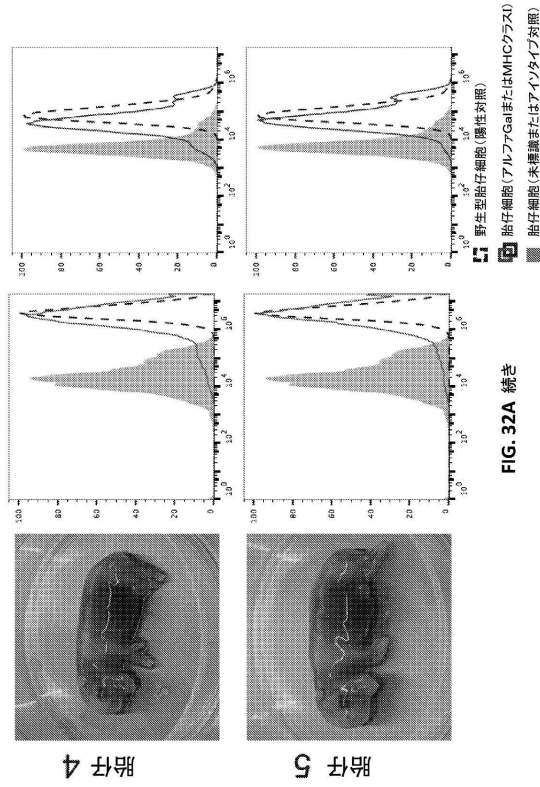
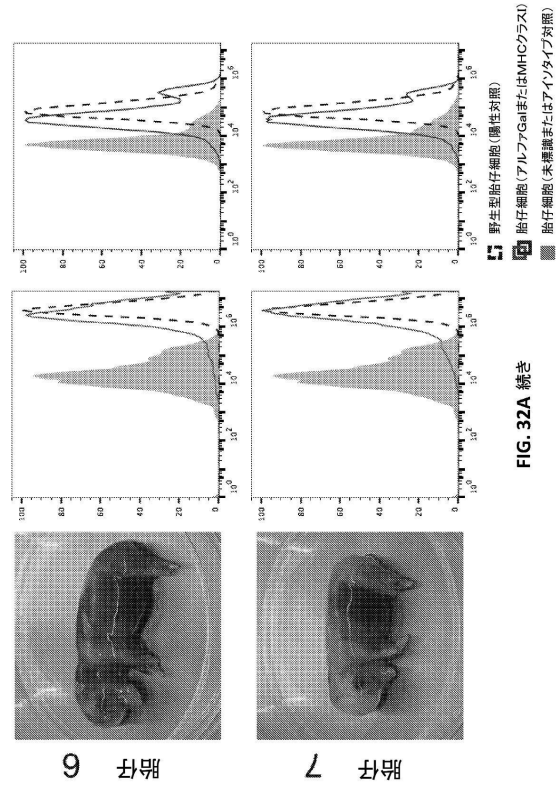


FIG. 29B

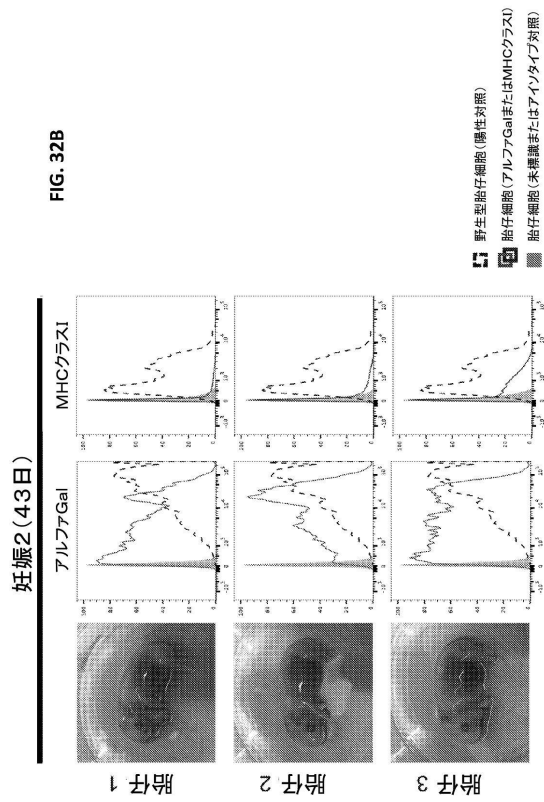
【図 3 2 A - 2】



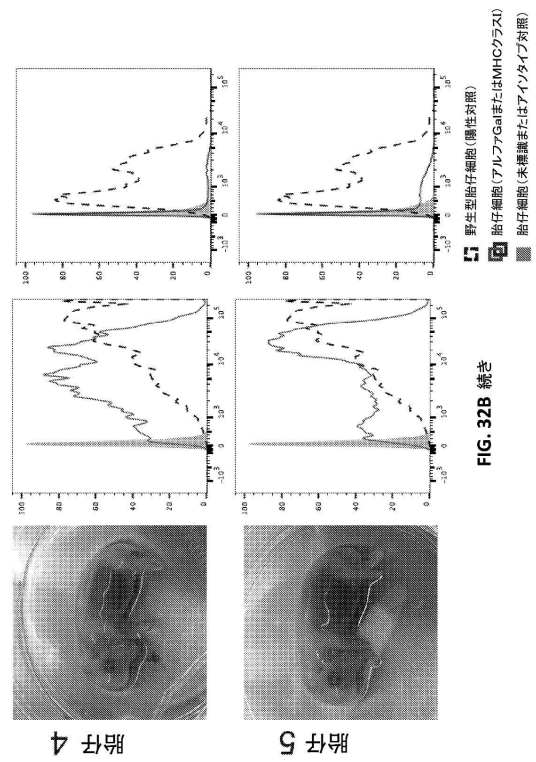
【図 3 2 A - 3】



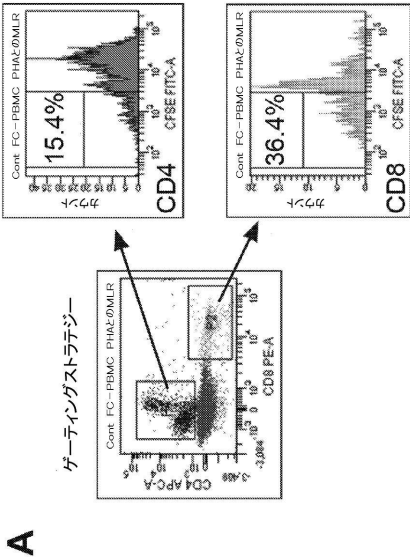
【図 3 2 B - 1】



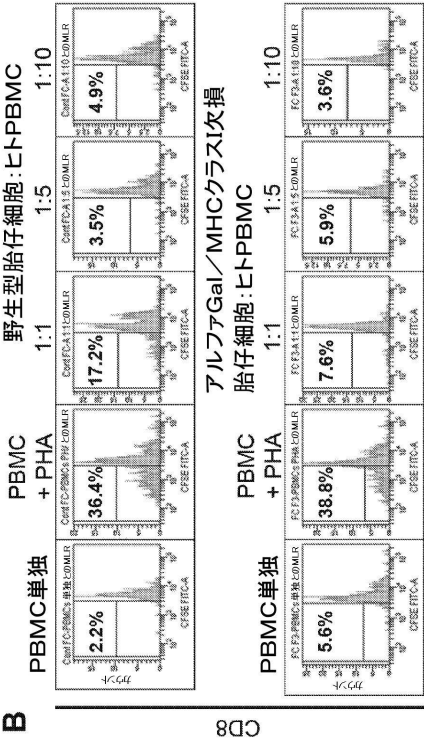
【図 3 2 B - 2】



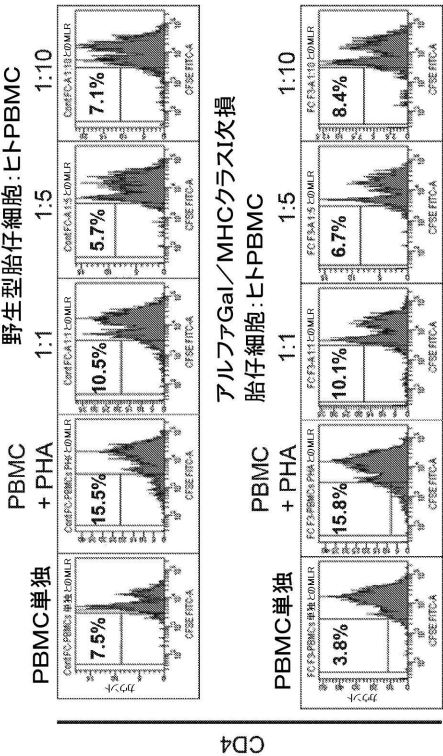
【図 3 3 A】



【図 3 3 B - 1】



【図 3 3 B - 2】



【配列表】

0006830437000001.app

フロントページの続き

前置審査

(72)発明者 ブラク, クリストファー
アメリカ合衆国 ミネソタ 55345, ミネトンカ, ラーチウッド ドライブ 3575

審査官 小金井 悟

(56)参考文献 特表2013-501528 (JP, A)
Transpl. Immunol., 2003年, Vol.11, No.2, p.147-153
J. Immunol., 1999年12月 1日, Vol.163, No.11, p.6301-6305
Transplantation, 2002年 5月27日, Vol.73, No.10, p.1582-1589
Clin. Exp. Immunol., 2001年10月, Vol.126, No.1, p.165-172
J. Immunol., 2012年 4月15日, Vol.188, No.8, p.3820-3828
Rev. Diabet. Stud., 2012年, Vol.9, No.4, p.319-327

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90
A01K 67/027
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)