

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-502820
(P2024-502820A)

(43)公表日 令和6年1月23日(2024.1.23)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 1 0	4 B 0 6 5
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		Z N A 4 C 0 8 7
A 6 1 K	35/28 (2015.01)	A 6 1 K	35/28		
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全103頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-540486(P2023-540486)			(71)出願人	519312511
(86)(22)出願日	令和3年12月31日(2021.12.31)				ブイオーアール バイオフーマ インコ
(85)翻訳文提出日	令和5年8月30日(2023.8.30)				ーポレーテッド
(86)国際出願番号	PCT/US2021/065813				V O R B I O P H A R M A I N C .
(87)国際公開番号	WO2022/147347				アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0
(87)国際公開日	令和4年7月7日(2022.7.7)				2 1 4 0、ケンブリッジ、ケンブリッジ
(31)優先権主張番号	63/132,852				パーク ドライブ 1 0 0、スイート 4
(32)優先日	令和2年12月31日(2020.12.31)				0 0
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				1 0 0 C a m b r i d g e p a r k D
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA				r i v e , S u i t e 4 0 0 , C a m
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(				b r i d g e , M A 0 2 1 4 0 , U n
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A				i t e d S t a t e s o f A m e r
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR			(74)代理人	110003971
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,				弁理士法人葛和国際特許事務所
	最終頁に続く				最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C D 3 4 遺伝子改変のための組成物及び方法

(57)【要約】

本明細書中で提供されるのは、C D 3 4を標的化する標的化ドメインを含む g R N Aであって、それは、例えば、細胞中で改変を行うために使用され得る。また、本明細書中で提供されるのは、C D 3 4 遺伝子における改変（例、挿入又は欠失）を有する遺伝子操作された細胞の方法、及び、そのような遺伝子操作された細胞を、対象、例えば造血器悪性腫瘍を有する対象などに投与することを含む方法である。

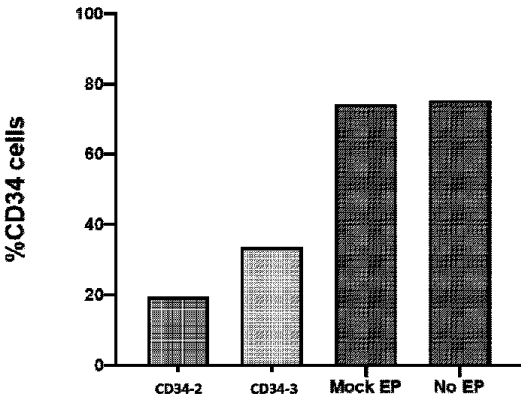


Figure 10B

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C D 3 4 をコードする改変遺伝子を含む、遺伝子操作された造血細胞、又はその子孫。

【請求項 2】

C D 3 4 をコードする改変遺伝子が、インデル変異を含む、請求項 1 に記載の造血細胞、又はその子孫。

【請求項 3】

C D 3 4 をコードする改変遺伝子が、エクソンがスキップされるように改変される、請求項 1 又は 2 に記載の造血細胞、又はその子孫。

【請求項 4】

C D 3 4 をコードする改変遺伝子のエクソン 1、エクソン 2、又はエクソン 3 が遺伝子操作されている、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の造血細胞、又はその子孫。

【請求項 5】

C D 3 4 をコードする改変遺伝子が、配列番号 1 1 ～ 1 5 のいずれか一つにより提供される標的化ドメインを含む g R N A に結合された場合に、R N A ガイドヌクレアーゼにより切断される部位の直ぐ近位に挿入又は欠失を含む、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の造血細胞又はその子孫。

【請求項 6】

C D 3 4 をコードする改変遺伝子が、非相同末端結合（N H E J）事象により生成される挿入又は欠失を含む、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の造血細胞、又はその子孫。

【請求項 7】

C D 3 4 をコードする改変遺伝子が、相同性指向性修復（H D R）事象により生成される挿入又は欠失を含む、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の造血細胞、又はその子孫。

【請求項 8】

C D 3 4 の発現が、C D 3 4 をコードする改変遺伝子を持たない野生型の対応細胞と比べて低下又は排除されている、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の造血細胞、又はその子孫。

【請求項 9】

C D 3 4 の発現が、C D 3 4 をコードする改変遺伝子を持たない野生型の対応細胞における C D 3 4 の発現レベルと比較して、2 5 % 未満、2 0 % 未満、1 0 % 未満、5 % 未満、2 % 未満、1 % 未満、0 . 1 % 未満、0 . 0 1 % 未満、又は 0 . 0 0 1 % 未満である、請求項 8 に記載の造血細胞、又はその子孫。

【請求項 1 0】

造血細胞、又はその子孫が、抗 C D 3 4 結合ドメインを含む薬剤への低下した結合又は無結合を有する、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の造血細胞、又はその子孫。

【請求項 1 1】

造血細胞、又はその子孫が、遺伝子操作されていない造血細胞の集団と比較して、正常に分化する能力を保持する、請求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の造血細胞、又はその子孫。

【請求項 1 2】

C D 3 4 をコードする改変遺伝子が、遺伝子操作された造血細胞、又はその子孫における C D 3 4 の機能の喪失をもたらす、請求項 1 ～ 1 1 のいずれか一項に記載の造血細胞、又はその子孫。

【請求項 1 3】

系統特異的な細胞表面抗原をコードする改変遺伝子をさらに含む、請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の造血細胞、又はその子孫。

【請求項 1 4】

系統特異的な細胞表面抗原が、C D 3 3、C D 1 2 3、C L L - 1、C D 1 9、C D 3 0、C D 5、C D 6、C D 7、C D 3 8、又は B C M A である、請求項 1 3 に記載の造血細胞、又はその子孫。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

造血細胞、又はその子孫が、系統特異的な細胞表面抗原を標的化する結合ドメインを含む薬剤への低下した結合又は無結合を有する、請求項 13 又は 14 に記載の造血細胞、又はその子孫。

【請求項 16】

それを必要とする対象に

請求項 1 ～ 15 のいずれか一項に記載の遺伝子操作された造血細胞、又はその子孫を投与することを含む、方法。

【請求項 17】

CD34 を標的化する少なくとも一つの薬剤の治療有効量を対象に投与することをさらに含み、薬剤が、CD34 に結合する抗原結合断片を含む、請求項 16 に記載の方法。

10

【請求項 18】

薬剤が、抗体－薬物複合体又はキメラ抗原受容体（CAR）を発現する免疫エフェクター細胞である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

対象が、CD34 を発現する細胞に関連付けられる疾患を有する、請求項 16 ～ 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

対象が、悪性細胞上での CD34 の発現に関連付けられる、又はそれにより特徴付けられる悪性腫瘍を有し、場合により、悪性細胞が癌幹細胞である、請求項 16 ～ 19 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 21】

対象が造血器悪性腫瘍を有する、請求項 16 ～ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

対象が自己免疫疾患を有する、請求項 16 ～ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

標的化ドメインを含む gRNA であって、標的化ドメインが、配列番号 11 ～ 15 となる群から選択される配列を含む、前記 gRNA。

【請求項 24】

gRNA が、第一の相補性ドメイン、連結ドメイン、第一の相補性ドメインと相補的である第二の相補性ドメイン、及び近位ドメインを含む、請求項 23 に記載の gRNA。

30

【請求項 25】

gRNA が単一ガイド RNA（sgRNA）である、請求項 23 又は 24 に記載の gRNA。

【請求項 26】

gRNA が、化学的に修飾された 1 以上のヌクレオチド残基を含む、請求項 23 ～ 25 のいずれか一項に記載の gRNA。

【請求項 27】

gRNA が、2' O-メチル部分を含む 1 以上のヌクレオチド残基を含む、請求項 23 ～ 26 のいずれか一項に記載の gRNA。

40

【請求項 28】

gRNA が、ホスホロチオエートを含む 1 以上のヌクレオチド残基を含む、請求項 23 ～ 27 のいずれか一項に記載の gRNA。

【請求項 29】

gRNA が、チオPACE 部分を含む 1 以上のヌクレオチド残基を含む、請求項 23 ～ 28 のいずれか一項に記載の gRNA。

【請求項 30】

遺伝子操作された細胞を産生する方法であって、

a. 細胞を提供すること、及び

b. 細胞を、(i) 請求項 23 ～ 29 のいずれかに記載の gRNA、及び (ii) g

50

RNAを結合するRNAガイドヌクレアーゼと接触させて、それにより、(i)のgRNAが(ii)のRNAガイドヌクレアーゼとリボ核タンパク質(RNP)複合体を形成及び／又は維持し、ならびにRNP複合体が、細胞のゲノム中の標的ドメインを結合するために適切な条件下で、RNP複合体を形成することを含む、方法。

【請求項31】

RNAガイドヌクレアーゼが、CRISPR/Casヌクレアーゼである、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

CRISPR/Casヌクレアーゼが、Cas9ヌクレアーゼである、請求項31に記載の方法。

【請求項33】

CRISPR/Casヌクレアーゼが、spCasヌクレアーゼである、請求項31に記載の方法。

【請求項34】

CRISPR/Casヌクレアーゼが、saCasヌクレアーゼである、請求項31に記載の方法。

【請求項35】

CRISPR/Casヌクレアーゼが、Cpf1ヌクレアーゼである、請求項31に記載の方法。

【請求項36】

接触させることが、(i)及び(ii)を、予め形成されたリボ核タンパク質(RNP)複合体の形態で細胞中に導入することを含む、請求項30～35のいずれか一項に記載の方法。

【請求項37】

接触させることが、(i)及び／又は(ii)を、(i)のgRNA及び／又は(ii)のRNAガイドヌクレアーゼをコードする核酸の形態で細胞中に導入することを含む、請求項30～36のいずれか一項に記載の方法。

【請求項38】

(i)のgRNA及び／又は(ii)のRNAガイドヌクレアーゼをコードする核酸が、RNA、好ましくはmRNA又はmRNA類似体である、請求項37に記載の方法。

【請求項39】

リボ核タンパク質複合体が、エレクトロポレーションを介して細胞中に導入される、請求項30～38のいずれか一項に記載の方法。

【請求項40】

細胞が、造血細胞である、請求項30～39のいずれか一項に記載の方法。

【請求項41】

細胞が、造血幹細胞である、請求項30～40のいずれか一項に記載の方法。

【請求項42】

細胞が、造血前駆細胞である、請求項30～41のいずれか一項に記載の方法。

【請求項43】

細胞が、免疫エフェクター細胞である、請求項30～39のいずれか一項に記載の方法。

【請求項44】

細胞が、リンパ球である、請求項30～39又は43のいずれか一項に記載の方法。

【請求項45】

細胞が、Tリンパ球である、請求項30～39、43、又は44のいずれか一項に記載の方法。

【請求項46】

細胞が、請求項30～45のいずれかに記載の方法により得られる、又は入手可能である、遺伝子操作された細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 47】

請求項 1～15 又は 46 のいずれか一項に記載の遺伝子操作された細胞を含む、細胞集団。

【請求項 48】

請求項 1～15 のいずれか一項に記載の遺伝子操作された造血細胞、又はその子孫、請求項 46 に記載の遺伝子操作された細胞、又は請求項 47 に記載の細胞集団を含む、医薬組成物。

【請求項 49】

CD34 をコードする遺伝子において改変を含む、遺伝子操作された造血幹細胞であって、遺伝子操作された造血幹細胞が、天然の CD34 タンパク質を発現せず、遺伝子操作された造血幹細胞が、CD34 を発現する天然の造血幹細胞と機能的に区別不可能である、遺伝子操作された造血幹細胞。

10

【請求項 50】

遺伝子操作された造血幹細胞が、1 以上の造血幹細胞マーカーを発現する、請求項 49 に記載の遺伝子操作された造血幹細胞。

【請求項 51】

遺伝子操作された造血幹細胞が、CD49c、CD71、CD90、CD117、CD135、CD201、CD228、CD243、CD292、CDw293、CD309、CD318、CD325、及び CD349 のうちの 1 以上を発現する、請求項 49 又は 50 のいずれか一項に記載の遺伝子操作された造血幹細胞。

20

【請求項 52】

遺伝子操作された造血幹細胞が、その細胞表面上に CD34 を発現しない、請求項 49～51 のいずれか一項に記載の遺伝子操作された造血幹細胞。

【請求項 53】

遺伝子操作された造血幹細胞が、その細胞表面上に抗 CD34 抗体により認識される CD34 エピトープを発現しない、請求項 49～52 のいずれか一項に記載の遺伝子操作された造血幹細胞。

【請求項 54】

遺伝子操作された造血幹細胞が、その細胞表面上に CD34 を発現しない、請求項 49～52 のいずれか一項に記載の遺伝子操作された造血幹細胞。

30

【請求項 55】

遺伝子操作された造血幹細胞が、その細胞表面上に CD34 を発現せず、CD49c、CD71、CD90、及び CD201 のうちの 1 以上を発現する、請求項 49～54 のいずれか一項に記載の遺伝子操作された造血幹細胞。

【請求項 56】

遺伝子操作された造血幹細胞が、その細胞表面上に CD34 を発現せず、CD49c、CD90、及び CD201 のうちの 1 以上を発現する、請求項 49～55 のいずれか一項に記載の遺伝子操作された造血幹細胞。

【請求項 57】

遺伝子操作された造血幹細胞が、分化造血細胞の特徴である系統特異的表面マーカーを発現しない (line)、請求項 49～56 のいずれか一項に記載の遺伝子操作された造血幹細胞。

40

【請求項 58】

遺伝子操作された造血幹細胞が、CD2、CD3、CD4、CD8、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD19、CD56、CD123、もしくは CD235a、又はそれらの任意の組み合わせを発現しない、請求項 49～57 のいずれか一項に記載の遺伝子操作された造血幹細胞。

【請求項 59】

遺伝子操作された造血幹細胞が、ヒトレシピエント中への長期生着が可能である、請求項 49～58 のいずれか一項に記載の遺伝子操作された造血幹細胞。

50

【請求項 60】

遺伝子操作された造血幹細胞が、生着後のヒトレシピエントにおいて造血系を再構成することが可能である、請求項 49～58 のいずれか一項に記載の遺伝子操作された造血幹細胞。

【請求項 61】

造血細胞、又はその子孫が、CD34 エピトープを欠く、又は改変 CD34 エピトープを有する、請求項 1～9 又は 10～15 のいずれか一項に記載の造血細胞、又はその子孫。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

関連出願

本出願によって、参照によりその全体において本明細書中に組み入れられる、2020 年 12 月 31 日に出願された米国仮出願第 63 / 132, 852 号の 35 U. S. C. 119 (e) に基づく利益を主張する。

【0002】

背景

対象に、疾患又は状態に関連付けられる抗原を標的化する免疫療法、例えば、抗癌 CAR-T 治療が投与される場合、この治療は、標的化されることが意図される病理学的細胞だけでなく、しかし、また、標的抗原を発現し得る非病理学的細胞を枯渇し得る。この「オンターゲット、オフ疾患」効果は、一部の CAR-T 治療薬、例えば、CD19 又は CD33 を標的化するものについて報告されている。標的抗原が、生存又は対象のために要求される細胞の表面上に、又はその枯渇が対象の健康に対して著しい損害である細胞の表面上に発現される場合、対象は、免疫療法を受けることができないであろう、又は、一度そのような治療が投与された場合に重度の副作用に直面するであろう。

20

【発明の概要】

【0003】

概要

本開示の態様では、それを必要とする対象において、特定の免疫療法アプローチ、例えば、特定の抗原を標的化するリンパ球エフェクター細胞、例えば CAR-T 細胞又は CAR-NK 細胞などを含む免疫療法の有害なオンターゲット、オフ疾患効果に対処する組成物、方法、戦略、及び治療モダリティが記載される。本開示は、部分的には、例えば、CD34 を標的化するリンパ球エフェクター細胞、例えば CAR-T 細胞又は CAR-NK 細胞などを含む免疫療法アプローチを使用して、対象において幹細胞（例、CD34 発現造血幹細胞（HSC））の集団を低下させる（例、枯渇させる）組成物、方法、戦略、及び治療モダリティに向けられる。一部の態様では、そのような組成物、方法、戦略、及び治療モダリティによって、CD34 を発現しない、低下したレベルの CD34 を発現する（例、野生型細胞に比べて）、又は CD34 を標的化する免疫療法剤により認識されない CD34 のバリエーション形態を発現する、遺伝子操作された細胞（例、遺伝子操作された幹細胞、例、HSC）で、細胞（例、造血細胞、造血幹細胞（HSC））の集団が置換又は補充される。理論により拘束されることを望まないが、CD34 を発現しない、低下したレベルの CD34 を発現する（例、野生型細胞と比べて）、又は CD34 を標的化する免疫療法剤により認識されない CD34 のバリエーション形態を発現する、遺伝子操作された細胞（例、遺伝子操作された幹細胞、例、HSC）は、CD34 を標的化する免疫療法アプローチによる殺傷を回避すると考えられており、このように、それを必要とする対象に健全な細胞集団（例、幹細胞集団）を提供して、標的化された（例、悪性）細胞集団を置換する。一部の実施形態では、例えば、CD34 を標的化するリンパ球エフェクター細胞、例えば CAR-T 細胞又は CAR-NK 細胞など、及び CD34 を発現しない、低下したレベルの CD34 を発現する（例、野生型細胞と比べて）、又は CD34 を標的化する免疫療法剤により認識されない CD34 のバリエーション形態を発現する、遺伝子操作された細胞

30

40

50

胞（例、遺伝子操作された幹細胞、例、HSC）を含む免疫療法アプローチが、それを必要とする対象に組み合わせにおいて投与される。

【0004】

したがって、本開示の態様は、CD34をコードする改変遺伝子を含む、遺伝子操作された造血細胞、又はその子孫を提供する。一部の実施形態では、CD34をコードする改変遺伝子は、インデル変異を含む。一部の実施形態では、CD34をコードする改変遺伝子は、エクソンがスキップされるように改変される。一部の実施形態では、CD34をコードする改変遺伝子のエクソン1、エクソン2、又はエクソン3は遺伝子操作されている。一部の実施形態では、CD34をコードする改変遺伝子は、配列番号11～15のいずれかにより提供される標的化ドメインを含むgRNAに結合された場合に、RNAガイドヌクレアーゼにより切断される部位の直ぐ近位に挿入又は欠失を含む。一部の実施形態では、CD34をコードする改変遺伝子は、非相同末端結合（NHEJ）事象により又は相同性指向性修復（HDR）事象により生成される挿入又は欠失を含む。

10

【0005】

一部の実施形態では、CD34をコードする遺伝子の改変によって、CD34の発現が変化する、及び／又は造血細胞もしくはその子孫の特性が変化する。一部の実施形態では、CD34の発現は、CD34をコードする改変遺伝子を持たない野生型の対応細胞と比べて低下又は排除される。一部の実施形態では、CD34の発現は、CD34をコードする改変遺伝子を持たない野生型対応細胞におけるCD34の発現レベルと比較して、25%未満、20%未満、10%未満、5%未満、2%未満、1%未満、0.1%未満、0.01%未満、又は0.001%未満である。一部の実施形態では、造血細胞、又はその子孫は、抗CD34結合ドメインを含む薬剤への低下した結合又は無結合を有する。一部の実施形態では、造血細胞、又はその子孫は、遺伝子操作されていない造血細胞の集団と比較して、正常に分化する能力を保持する。一部の実施形態では、CD34をコードする改変遺伝子は、遺伝子操作された造血細胞、又はその子孫におけるCD34の機能の喪失をもたらす。

20

【0006】

一部の実施形態では、遺伝子操作された造血細胞又はその子孫は、系統特異的な細胞表面抗原をコードする改変遺伝子をさらに含む。一部の実施形態では、系統特異的な細胞表面抗原は、リンパ球特異的な細胞表面抗原である。一部の実施形態では、系統特異的な細胞表面抗原は、骨髄特異的な細胞表面抗原である。一部の実施形態では、系統特異的な細胞表面抗原は、造血幹細胞特異的な細胞表面抗原である。一部の実施形態では、系統特異的な細胞表面抗原は、造血幹細胞又は前駆細胞特異的な細胞表面抗原である。一部の実施形態では、系統特異的な細胞表面抗原は、T細胞特異的な細胞表面抗原である。一部の実施形態では、系統特異的な細胞表面抗原は、B細胞特異的な細胞表面抗原である。一部の実施形態では、系統特異的な細胞表面抗原は、NK細胞特異的な細胞表面抗原である。一部の実施形態では、系統特異的な細胞表面抗原は、好塩基球特異的な細胞表面抗原である。一部の実施形態では、系統特異的な細胞表面抗原は、好酸球特異的な細胞表面抗原である。一部の実施形態では、系統特異的な細胞表面抗原は、好中球特異的な細胞表面抗原である。一部の実施形態では、系統特異的な細胞表面抗原は、単球特異的な細胞表面抗原である。一部の実施形態では、系統特異的な細胞表面抗原は、赤血球特異的な細胞表面抗原である。一部の実施形態では、系統特異的な細胞表面抗原は、CD33、CD123、CLL-1、CD19、CD30、CD5、CD6、CD7、CD38、又はBCMAである。一部の実施形態では、系統特異的な細胞表面抗原は、悪性細胞の表面上に発現される。一部の実施形態では、遺伝子操作された造血細胞、又はその子孫は、系統特異的な細胞表面抗原を標的化する結合ドメインを含む薬剤への低下した結合又は無結合を有する。一部の実施形態では、造血細胞、又はその子孫は、CD34エピトープを欠く、又は改変CD34エピトープを有する。

30

40

【0007】

本開示の態様は、表1及び表2中に記載される配列を含む標的化ドメインを含むガイド

50

RNA (gRNA)を提供する。一部の態様では、gRNAは標的化ドメインを含み、それにおいて、標的化ドメインは、配列番号1～15のいずれか一つの配列を含む。一部の実施形態では、gRNAは、第一の相補性ドメイン、連結ドメイン、第一の相補性ドメインに相補的である第二の相補性ドメイン、及び近位ドメインを含む。一部の実施形態では、gRNAは単一ガイドRNA (sgRNA)である。

【0008】

一部の実施形態では、gRNAは、化学的に修飾された1以上のヌクレオチド残基を含む。一部の実施形態では、gRNAは、2' O-メチル部分を含む1以上のヌクレオチド残基を含む。一部の実施形態では、gRNAは、ホスホロチオエートを含む1以上のヌクレオチド残基を含む。一部の実施形態では、gRNAは、チオPAC E部分を含む1以上のヌクレオチド残基を含む。

10

【0009】

本開示の態様は、遺伝子操作された細胞を産生する方法を提供し、以下を含む：細胞を提供すること、及び(i)本明細書中に記載されるgRNAのいずれか；ならびに(ii)gRNAに結合し、このように、(i)のgRNAが、(ii)のRNAガイドヌクレアーゼとRNP複合体を形成及び／又は維持し、リボ核タンパク質(RNP)複合体が細胞のゲノム中の標的ドメインに結合するために適切な条件下でRNP複合体を形成するRNAガイドヌクレアーゼと細胞を接触させること。一部の実施形態では、接触させることは、(i)及び(ii)を、予め形成されたリボ核タンパク質(RNP)複合体の形態において、細胞中に導入することを含む。一部の実施形態では、接触させることは、(i)及び／又は(ii)を、(i)のgRNA及び／又は(ii)のRNAガイドヌクレアーゼをコードする核酸の形態において、細胞中に導入することを含む。一部の実施形態では、(i)のgRNA及び／又は(ii)のRNAガイドヌクレアーゼをコードする核酸は、RNA、好ましくはmRNA又はmRNA類似体である。一部の実施形態では、リボ核タンパク質複合体は、エレクトロポレーションを介して細胞中に導入される。

20

【0010】

一部の実施形態では、RNAガイドヌクレアーゼは、CRISPR/Casヌクレアーゼである。一部の実施形態では、CRISPR/Casヌクレアーゼは、Cas9ヌクレアーゼである。一部の実施形態では、CRISPR/Casヌクレアーゼは、spCasヌクレアーゼである。一部の実施形態では、Casヌクレアーゼは、saCasヌクレアーゼである。一部の実施形態では、CRISPR/Casヌクレアーゼは、Cpf1ヌクレアーゼである。

30

【0011】

一部の実施形態では、細胞は造血細胞である。一部の実施形態では、細胞は造血幹細胞である。一部の実施形態では、細胞は造血前駆細胞である。一部の実施形態では、細胞は免疫エフェクター細胞である。一部の実施形態では、細胞はリンパ球である。一部の実施形態では、細胞はTリンパ球である。

【0012】

本開示の態様は、本明細書中に記載される方法のいずれかにより得られた、遺伝子操作された細胞を提供する。本開示の態様は、本明細書中に記載される、遺伝子操作された細胞を含む細胞集団を提供する。

40

【0013】

本開示の態様は、遺伝子操作された細胞を含む細胞集団を提供し、それにおいて、遺伝子操作された細胞は、表1及び表2のいずれかにおいて記載される標的化ドメインを含むgRNAに結合された場合にRNAガイドヌクレアーゼにより切断される部位の直ぐ近位の挿入又は欠失からなるゲノム改変を含む。一部の実施形態では、それにおいて、ゲノム改変は、非相同末端結合(NHEJ)事象により生成される挿入又は欠失である。一部の実施形態では、それにおいて、ゲノム改変は、相同性指向性修復(HDR)事象により生成される挿入又は欠失である。一部の実施形態では、ゲノム改変は、そのようなゲノム改変を持つ遺伝子操作された細胞におけるCD34の機能の喪失をもたらす。一部の実施形

50

態では、ゲノム改変は、CD34のゲノム改変を持たない同じ細胞型の野生型細胞におけるCD34の発現レベルと比較して、25%未満、20%未満、10%未満、5%未満、2%未満、1%未満、0.1%未満、0.01%未満、又は0.001%未満までのCD34の発現の低下をもたらす。一部の実施形態では、遺伝子操作された細胞は、造血幹細胞又は前駆細胞である。一部の実施形態では、遺伝子操作された細胞は、免疫エフェクター細胞である。一部の実施形態では、遺伝子操作された細胞は、Tリンパ球である。一部の実施形態では、免疫エフェクター細胞は、キメラ抗原受容体（CAR）を発現する。一部の実施形態では、CARは、CD34を標的化する。

【0014】

本開示の態様は、それを必要とする対象に、本明細書中に記載される、遺伝子操作された細胞のいずれか（例、本明細書中に記載される、遺伝子操作された造血細胞又はその子孫）、又は本明細書中に記載される細胞集団のいずれかを投与することを含む方法を提供する。一部の実施形態では、対象は、造血器悪性腫瘍を有する、又はそれと診断されている。一部の実施形態では、この方法は、CD34を標的化する薬剤の有効量を対象に投与することをさらに含み、それにおいて、薬剤は、CD34に結合する抗原結合断片を含む。一部の実施形態では、薬剤は、抗体-薬物複合体、又はキメラ抗原受容体（CAR）を発現する免疫エフェクター細胞である。一部の実施形態では、対象は、悪性細胞上のCD34の発現に関連付けられる、又はそれにより特徴付けられる悪性腫瘍を有する。一部の実施形態では、悪性細胞は癌幹細胞である。一部の実施形態では、対象は造血器悪性腫瘍を有する。一部の実施形態では、対象は自己免疫疾患を有する。

【0015】

本開示の態様によって、本明細書中に記載される、遺伝子操作された造血細胞（例、本明細書中に記載される、遺伝子操作されたHSC）を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態では、医薬組成物は、CD34を標的化する薬剤、例えば、CD34に結合する抗原結合断片、抗体-薬物複合体、又はキメラ抗原受容体（CAR）を発現する免疫エフェクター細胞の有効量をさらに含む。

【0016】

本開示の態様によって、CD34をコードする遺伝子中に改変を含む、遺伝子操作された造血幹細胞が提供される。一部の実施形態では、遺伝子操作された造血幹細胞は、天然のCD34タンパク質を発現しない。一部の実施形態では、遺伝子操作された造血幹細胞は、CD34を発現する天然の造血幹細胞から機能的に区別不能である。一部の実施形態では、遺伝子操作された造血幹細胞は、1以上の造血幹細胞マーカーを発現する。一部の実施形態では、遺伝子操作された造血幹細胞は、CD49c、CD71、CD90、CD117、CD135、CD201、CD228、CD243、CD292、CDw293、CD309、CD318、CD325、及びCD349のうちの1以上を発現する。一部の実施形態では、遺伝子操作された造血幹細胞は、その細胞表面上にCD34を発現しない。一部の実施形態では、遺伝子操作された造血幹細胞は、その細胞表面上に、抗CD34抗体により認識されるCD34エピトープを発現しない。一部の実施形態では、遺伝子操作された造血幹細胞は、その細胞表面上にCD34を発現しない。一部の実施形態では、遺伝子操作された造血幹細胞は、その細胞表面上にCD34を発現せず、CD71、CD90、CD201、及びCD49cのうちの1以上を発現する。一部の実施形態では、遺伝子操作された造血幹細胞は、その細胞表面上にCD34を発現せず、CD90、CD201、及びCD49cのうちの1以上を発現する。一部の実施形態では、遺伝子操作された造血幹細胞は、分化した造血細胞に特徴的な系統特異的表面マーカーを発現しない（line）。一部の実施形態では、遺伝子操作された造血幹細胞は、CD2、CD3、CD4、CD8、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD19、CD56、CD123、もしくはCD235a、又はそれらの任意の組み合わせを発現しない。一部の実施形態では、遺伝子操作された造血幹細胞は、ヒトレシピエント中への長期生着が可能である。一部の実施形態では、遺伝子操作された造血幹細胞は、生着後のヒトレシピエントにおいて造血系を再構成することが可能である。一部の実施形態では、遺伝子操作され

た造血幹細胞は、その細胞表面上にCD34を発現せず、CD90、CD201、及びCD49cを発現する。一部の実施形態では、遺伝子操作された造血幹細胞は、その細胞表面上にCD34を発現せず、CD90、CD201、及びCD49cのうちの1以上を発現し、CD2、CD3、CD4、CD8、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD19、CD45RA、CD56、CD123、及びCD235aについて陰性である。一部の実施形態では、遺伝子操作された造血幹細胞は、その細胞表面上にCD34を発現せず、CD90、CD201、及びCD49cを発現し、CD2、CD3、CD4、CD8、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD19、CD45RA、CD56、CD123、及びCD235aについて陰性である。

【0017】

上の要約は、非限定的な様式において、本明細書中に開示される技術の実施形態、利点、特徴、及び使用の一部を例証することを意味する。本明細書中に開示される技術の他の実施形態、利点、特徴、及び使用は、詳細な説明、図面、実施例、及び特許請求の範囲から明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】図1は、ヒトCD34の二つのスプライスバリエーションのコード領域（「CD34 CDS」）を示すCD34遺伝子の模式図である。CD34遺伝子内の例示的なCas9 gRNA標的配列の数及びそれらのそれぞれの結合部位が、パネルの下部分において短い矢印により示され、名付けられたgRNACD34-1からCD34-5内の位置が、パネルの中央における短い、暗い矢印により示されている。

【0019】

【図2A】図2A～2Cは、CD34遺伝子に対する、本明細書中に記載される例示的なガイドRNAの位置を示す模式図を提示する。図2Aは、CD34のエクソン1をコードする核酸配列に対する、本明細書中に記載される例示的なガイドRNAの位置を示す模式図である。

【図2B】図2Bは、CD34のエクソン2をコードする核酸配列に対する、本明細書中に記載される例示的なガイドRNAの位置を示す模式図である。

【図2C】図2Cは、CD34のエクソン3をコードする核酸配列に対する、本明細書中に記載される例示的なガイドRNAの位置を示す模式図である。

【0020】

【図3A】図3A～3Dは、CD34編集造血幹細胞の生存率及び編集効率を示す。図3Aは、実験のワークフローを示す模式図である。CD34+細胞を解凍し、Cas9タンパク質及び本明細書中に記載される例示的なCD34標的化gRNA、又はCD5を標的化する対照gRNA（「Ctrl」）でエレクトロポレーションし、シーケンシングによる細胞生存率及び編集効率の分析が続いた。

【図3B】図3Bは、示されたsgRNA条件でのエレクトロポレーション後24時間及び48時間に測定された平均細胞数を示す。

【図3C】図3Cは、示されたsgRNA条件でのエレクトロポレーション後24時間及び48時間に測定された細胞生存率を示す。

【図3D】図3Dは、シーケンシング分析により決定された、CD34遺伝子座の編集効率を示す。

【0021】

【図4】図4は、ガイドCD34-2として言及される例示的なCD34標的化gRNAで編集されたHSCについてのインデル（挿入／欠失）分布を示す。X軸は、インデルのサイズを示し、Y軸は、混合物中の特定のインデルのパーセンテージを示す。

【0022】

【図5A】図5A～5Cは、CD34編集ドナー造血幹細胞の生存及び編集効率を示す。図5Aは、実験のワークフローを示す模式図である。CD34+細胞を解凍し、Cas9タンパク質及び本明細書中に記載される例示的なCD34標的化gRNAでエレクトロポ

10

20

30

40

50

レーションし、シーケンシングによる細胞生存率及び編集効率の分析が続いた。

【図 5 B】図 5 B は、示された gRNA 条件でのエレクトロポレーション後 24 時間及び 96 時間に測定された平均細胞数を示す。

【図 5 C】図 5 C は、示された gRNA 条件でのエレクトロポレーション後 24 時間及び 96 時間に測定された細胞生存率を示す。

【0023】

【図 6 A】図 6 A 及び 6 B は、図 5 A 中に提示されるワークフローに従った、エレクトロポレーション後 96 時間での CD34 編集ドナー造血幹細胞における CD34 の発現のノックダウンを示す。図 6 A は、抗 CD34-PE 抗体を使用したフローサイトメトリー分析による、示された例示的な CD34 標的化 gRNA を使用して編集されたドナー造血幹細胞、偽編集細胞（「偽」）、及びエレクトロポレーションされなかった細胞（「EPなし」）における CD34 の発現を示すプロットを提示する。X 軸は、抗体染色（抗 CD34-PE テキサス）の強度を示し、Y 軸は、細胞の数に対応する。

10

【図 6 B】図 6 B は、フローサイトメトリー分析による抗 CD34-PE 抗体の相対強度に基づく、示される例示的な CD34 標的化 gRNA を使用して編集されたドナー造血幹細胞、偽編集細胞（「偽」）、及びエレクトロポレーションされなかった細胞（「EPなし」）における CD34 の発現を示すプロットを提示する。

【0024】

【図 7 A】図 7 A ～ 7 D は、エレクトロポレーション後 96 時間での CD34 編集ドナー造血幹細胞のフローサイトメトリー分析プロットを提示する。図 7 A は、細胞の未編集対照集団を示す。

20

【図 7 B】図 7 B は、例示的な CD34 標的化 gRNA ガイド CD34-2 を使用して編集されたドナー造血幹細胞を示す。

【図 7 C】図 7 C は、例示的な CD34 標的化 gRNA ガイド CD34-3 を使用して編集されたドナー造血幹細胞を示す。

【図 7 D】図 7 D は、例示的な CD34 標的化 gRNA ガイド CD34-5 を使用して編集されたドナー造血幹細胞を示す。X 軸は、抗 CD34 抗体（抗 CD34（PE テキサス））の結合に基づく CD34 の発現を示し、Y 軸は、生／死染色（L/D（APC Cy7））を示す。

【0025】

30

【図 8】図 8 は、HSC において CD34 を標的化する大規模編集実験のワークフローを示し、編集後 48 時間及び 168 時間に編集の効果を測定する模式図である。CD34+ 細胞を解凍し、Cas9 タンパク質及び本明細書中に記載される例示的な CD34 標的化 gRNA でエレクトロポレーションし、分析のための、エレクトロポレーション後の 48 時間及び 168 時間での細胞の収集が続いた。培地を 48 時間及び 120 時間の時点で変えた。

【0026】

【図 9 A】図 9 A 及び 9 B は、図 8 中に提示されるワークフローに従ったエレクトロポレーション後 48 時間での CD34 編集ドナー造血幹細胞における CD34 の発現のノックダウンを示す。図 9 A は、抗 CD34-PE 抗体を使用したフローサイトメトリー分析による、示された例示的な CD34 標的化 gRNA を使用して編集されたドナー造血幹細胞、偽編集細胞（「偽」）、及びエレクトロポレーションされなかった細胞（「EPなし」）における CD34 の発現を示すプロットを提示する。X 軸は、抗体染色（抗 CD34-PE テキサス）の強度を示し、Y 軸は、細胞の数に対応する。

40

【図 9 B】図 9 B は、フローサイトメトリー分析による、抗 CD34-PE 抗体の相対強度に基づく、示される例示的な CD34 標的化 gRNA を使用して編集されたドナー造血幹細胞、偽編集細胞（「偽」）、及びエレクトロポレーションされなかった細胞（「EPなし」）における CD34+ 細胞のパーセントを示すプロットを提示する。

【0027】

【図 10 A】図 10 A 及び 10 B は、図 8 中に提示されるワークフローに従ったエレクト

50

ロポレーション後168時間でのCD34編集ドナー造血幹細胞におけるCD34の発現のノックダウンを示す。図10Aは、抗CD34-PE抗体を使用したフローサイトメトリ分析による、示された例示的なCD34標的化gRNAを使用して編集されたドナー造血幹細胞、偽編集細胞（「偽」）、及びエレクトロポレーションされなかった細胞（「EPなし」）におけるCD34の発現を示すプロットを提示する。X軸は、抗体染色（抗CD34-PEテキサス）の強度を示し、Y軸は、細胞の数に対応する。

【図10B】図10Bは、フローサイトメトリ分析による、抗CD34-PE抗体の相対強度に基づく、示された例示的なCD34標的化gRNAを使用して編集されたドナー造血幹細胞、偽編集細胞（「偽」）、及びエレクトロポレーションされなかった細胞（「EPなし」）におけるCD34+細胞のパーセントを示すプロットを提示する。

10

【0028】

【図11A】図11A～11Qは、細胞系統分化及びコロニー遺伝子型決定のためのコロニー形成単位（CFU）アッセイを示すチャート、グラフ、及び表、ならびに例示的なガイドRNAについてのインデルサイズ、位置、及びアレル分析を示す編集頻度アッセイを提示する。CFU-GEMM：コロニー形成単位－顆粒球、赤血球、マクロファージ、巨核球；CFU-GM：コロニー形成単位－顆粒球、マクロファージ；CFU-E：コロニー形成単位－赤芽球；BFU-E：バースト形成単位－赤芽球。図11Aは、CD34編集HSCにおけるCFUアッセイのための実験アプローチの概要を提示する。

【図11B】図11B～11Cは、CD34編集HSCのCFUアッセイデータを提示し、それにおいて、二つの濃度の編集細胞を播種し、二つの例示的なCD34標的化ガイドRNA：CD34-2（また、本明細書中でガイド2、g2、又はsgCD34__2として言及される）又はCD34-3（また、本明細書中でガイド3、g3、又はsgCD34__3として言及される）のいずれかを含むCRISPR/Casシステムのいずれかを使用した編集後のCFU分析のために使用する。

20

【図11C】図11B～11Cは、CD34編集HSCのCFUアッセイデータを提示し、それにおいて、二つの濃度の編集細胞を播種し、二つの例示的なCD34標的化ガイドRNA：CD34-2（また、本明細書中でガイド2、g2、又はsgCD34__2として言及される）又はCD34-3（また、本明細書中でガイド3、g3、又はsgCD34__3として言及される）のいずれかを含むCRISPR/Casシステムのいずれかを使用した編集後のCFU分析のために使用する。

30

【図11D】図11D及び図11Eは、それぞれCD34-2及びCD34-3を使用して操作された様々なHSCバースト形成単位（BFU）及びコロニー形成単位（CFU）における編集効率データを提示する。

【図11E】図11D及び図11Eは、それぞれCD34-2及びCD34-3を使用して操作された様々なHSCバースト形成単位（BFU）及びコロニー形成単位（CFU）における編集効率データを提示する。

【図11F】図11F及び11Gは、それぞれCD34-2及びCD34-3編集HSCコロニーについての挿入／欠失（インデル）位置分布を提示する。

【図11G】図11F及び11Gは、それぞれCD34-2及びCD34-3編集HSCコロニーについての挿入／欠失（インデル）位置分布を提示する。

40

【図11H】図11H～11Kは、それぞれCD34-2又はCD34-3を使用したHSCのCD34編集のアレル分析を示す。

【図11I】図11H～11Kは、それぞれCD34-2又はCD34-3を使用したHSCのCD34編集のアレル分析を示す。

【図11J】図11H～11Kは、それぞれCD34-2又はCD34-3を使用したHSCのCD34編集のアレル分析を示す。

【図11K】図11H～11Kは、それぞれCD34-2又はCD34-3を使用したHSCのCD34編集のアレル分析を示す。

【図11L】図11L及び11Mは、それぞれヒートマップ形式におけるCD34-2及びCD34-3編集コロニーの分析サンプルにおけるインデル分布を示す。

50

【図 1 1 M】図 1 1 L 及び 1 1 M は、それぞれヒートマップ形式における C D 3 4 - 2 及び C D 3 4 - 3 編集コロニーの分析サンプルにおけるインデル分布を示す。

【図 1 1 N】図 1 1 N 及び 1 1 O は、それぞれ C D 3 4 - 2 及び C D 3 4 - 3 で編集された C D 3 4 編集 H S C についてのインデル分布の棒グラフ表示を示す。

【図 1 1 O】図 1 1 N 及び 1 1 O は、それぞれ C D 3 4 - 2 及び C D 3 4 - 3 で編集された C D 3 4 編集 H S C についてのインデル分布の棒グラフ表示を示す。

【図 1 1 P】図 1 1 P 及び 1 1 Q は、それぞれ図 1 1 N 及び 1 1 O 中に示される分布データに対応する、C D 3 4 - 2 及び C D 3 4 - 3 で編集された H S C における優占のインデル種の核酸配列変化、アミノ酸配列変化、頻度、及びタンパク質の結果を示す。

【図 1 1 Q】図 1 1 P 及び 1 1 Q は、それぞれ図 1 1 N 及び 1 1 O 中に示される分布データに対応する、C D 3 4 - 2 及び C D 3 4 - 3 で編集された H S C における優占のインデル種の核酸配列変化、アミノ酸配列変化、頻度、及びタンパク質の結果を示す。

10

【0 0 2 9】

【図 1 2 A】図 1 2 A ~ 1 2 W は、三つの異なるドナーからの H S C のサンプルにおける C D 3 4 編集時間経過データのグラフを示す。図 1 2 A ~ 1 2 C は、C D 3 4 H S C の三つのドナー集団（それぞれドナー 1、ドナー 2、及びドナー 3）についてのエレクトロポレーション後 0、2 4、4 8、1 2 0、1 6 8、及び 2 1 6 時間にわたる生存率データを示す。

【図 1 2 B】図 1 2 A ~ 1 2 C は、C D 3 4 H S C の三つのドナー集団（それぞれドナー 1、ドナー 2、及びドナー 3）についてのエレクトロポレーション後 0、2 4、4 8、1 2 0、1 6 8、及び 2 1 6 時間にわたる生存率データを示す。

20

【図 1 2 C】図 1 2 A ~ 1 2 C は、C D 3 4 H S C の三つのドナー集団（それぞれドナー 1、ドナー 2、及びドナー 3）についてのエレクトロポレーション後 0、2 4、4 8、1 2 0、1 6 8、及び 2 1 6 時間にわたる生存率データを示す。

【図 1 2 D】図 1 2 D ~ 1 2 I は、エレクトロポレーション後の様々な時点での H S C における編集効率の T I D E 分析を示し、エレクトロポレーションを受けなかった、又は対照（C T R L）g R N A でエレクトロポレーションされた対照ドナー H S C サンプルと比べて、インデルの優占種についての % インデルにより表される；図 1 2 D ~ 1 2 E は、ドナー 1 H S C の編集からのデータを示し、図 1 2 F ~ 1 2 G は、ドナー 2 H S C の編集からのデータを示し、及び図 1 2 H ~ 1 2 I は、ドナー 3 H S C の編集からのデータを示す。

30

【図 1 2 E】図 1 2 D ~ 1 2 I は、エレクトロポレーション後の様々な時点での H S C における編集効率の T I D E 分析を示し、エレクトロポレーションを受けなかった、又は対照（C T R L）g R N A でエレクトロポレーションされた対照ドナー H S C サンプルと比べて、インデルの優占種についての % インデルにより表される；図 1 2 D ~ 1 2 E は、ドナー 1 H S C の編集からのデータを示し、図 1 2 F ~ 1 2 G は、ドナー 2 H S C の編集からのデータを示し、及び図 1 2 H ~ 1 2 I は、ドナー 3 H S C の編集からのデータを示す。

【図 1 2 F】図 1 2 D ~ 1 2 I は、エレクトロポレーション後の様々な時点での H S C における編集効率の T I D E 分析を示し、エレクトロポレーションを受けなかった、又は対照（C T R L）g R N A でエレクトロポレーションされた対照ドナー H S C サンプルと比べて、インデルの優占種についての % インデルにより表される；図 1 2 D ~ 1 2 E は、ドナー 1 H S C の編集からのデータを示し、図 1 2 F ~ 1 2 G は、ドナー 2 H S C の編集からのデータを示し、及び図 1 2 H ~ 1 2 I は、ドナー 3 H S C の編集からのデータを示す。

40

【図 1 2 G】図 1 2 D ~ 1 2 I は、エレクトロポレーション後の様々な時点での H S C における編集効率の T I D E 分析を示し、エレクトロポレーションを受けなかった、又は対照（C T R L）g R N A でエレクトロポレーションされた対照ドナー H S C サンプルと比べて、インデルの優占種についての % インデルにより表される；図 1 2 D ~ 1 2 E は、ドナー 1 H S C の編集からのデータを示し、図 1 2 F ~ 1 2 G は、ドナー 2 H S C の編

50

集からのデータを示し、及び図 1 2 H～1 2 I は、ドナー 3 H S C の編集からのデータを示す。

【図 1 2 H】図 1 2 D～1 2 I は、エレクトロポレーション後の様々な時点での H S C における編集効率の T I D E 分析を示し、エレクトロポレーションを受けなかった、又は対照 (C T R L) g R N A でエレクトロポレーションされた対照ドナー H S C サンプルと比べて、インデルの優占種についての % インデルにより表される；図 1 2 D～1 2 E は、ドナー 1 H S C の編集からのデータを示し、図 1 2 F～1 2 G は、ドナー 2 H S C の編集からのデータを示し、及び図 1 2 H～1 2 I は、ドナー 3 H S C の編集からのデータを示す。

【図 1 2 I】図 1 2 D～1 2 I は、エレクトロポレーション後の様々な時点での H S C における編集効率の T I D E 分析を示し、エレクトロポレーションを受けなかった、又は対照 (C T R L) g R N A でエレクトロポレーションされた対照ドナー H S C サンプルと比べて、インデルの優占種についての % インデルにより表される；図 1 2 D～1 2 E は、ドナー 1 H S C の編集からのデータを示し、図 1 2 F～1 2 G は、ドナー 2 H S C の編集からのデータを示し、及び図 1 2 H～1 2 I は、ドナー 3 H S C の編集からのデータを示す。

【図 1 2 J】図 1 2 J～1 2 V は、示された時点での編集 H S C における C D 3 4 タンパク質の表面発現のフローサイトメトリー分析のグラフを示し；図 1 2 J～1 2 N は、ドナー 1 の H S C の編集からのデータを示し、図 1 2 O～1 2 S は、ドナー 2 の H S C の編集からのデータを示し、及び図 1 2 T～1 2 V は、ドナー 3 の H S C の編集からのデータを示す。

【図 1 2 K】図 1 2 J～1 2 V は、示された時点での編集 H S C における C D 3 4 タンパク質の表面発現のフローサイトメトリー分析のグラフを示し；図 1 2 J～1 2 N は、ドナー 1 の H S C の編集からのデータを示し、図 1 2 O～1 2 S は、ドナー 2 の H S C の編集からのデータを示し、及び図 1 2 T～1 2 V は、ドナー 3 の H S C の編集からのデータを示す。

【図 1 2 L】図 1 2 J～1 2 V は、示された時点での編集 H S C における C D 3 4 タンパク質の表面発現のフローサイトメトリー分析のグラフを示し；図 1 2 J～1 2 N は、ドナー 1 の H S C の編集からのデータを示し、図 1 2 O～1 2 S は、ドナー 2 の H S C の編集からのデータを示し、及び図 1 2 T～1 2 V は、ドナー 3 の H S C の編集からのデータを示す。

【図 1 2 M】図 1 2 J～1 2 V は、示された時点での編集 H S C における C D 3 4 タンパク質の表面発現のフローサイトメトリー分析のグラフを示し；図 1 2 J～1 2 N は、ドナー 1 の H S C の編集からのデータを示し、図 1 2 O～1 2 S は、ドナー 2 の H S C の編集からのデータを示し、及び図 1 2 T～1 2 V は、ドナー 3 の H S C の編集からのデータを示す。

【図 1 2 N】図 1 2 J～1 2 V は、示された時点での編集 H S C における C D 3 4 タンパク質の表面発現のフローサイトメトリー分析のグラフを示し；図 1 2 J～1 2 N は、ドナー 1 の H S C の編集からのデータを示し、図 1 2 O～1 2 S は、ドナー 2 の H S C の編集からのデータを示し、及び図 1 2 T～1 2 V は、ドナー 3 の H S C の編集からのデータを示す。

【図 1 2 O】図 1 2 J～1 2 V は、示された時点での編集 H S C における C D 3 4 タンパク質の表面発現のフローサイトメトリー分析のグラフを示し；図 1 2 J～1 2 N は、ドナー 1 の H S C の編集からのデータを示し、図 1 2 O～1 2 S は、ドナー 2 の H S C の編集からのデータを示し、及び図 1 2 T～1 2 V は、ドナー 3 の H S C の編集からのデータを示す。

【図 1 2 P】図 1 2 J～1 2 V は、示された時点での編集 H S C における C D 3 4 タンパク質の表面発現のフローサイトメトリー分析のグラフを示し；図 1 2 J～1 2 N は、ドナー 1 の H S C の編集からのデータを示し、図 1 2 O～1 2 S は、ドナー 2 の H S C の編集からのデータを示し、及び図 1 2 T～1 2 V は、ドナー 3 の H S C の編集からのデータを示す。

10

20

30

40

50

示す。

【図 1 2 Q】図 1 2 J ~ 1 2 V は、示された時点での編集 H S C における C D 3 4 タンパク質の表面発現のフローサイトメトリー分析のグラフを示し；図 1 2 J ~ 1 2 N は、ドナー 1 の H S C の編集からのデータを示し、図 1 2 O ~ 1 2 S は、ドナー 2 の H S C の編集からのデータを示し、及び図 1 2 T ~ 1 2 V は、ドナー 3 の H S C の編集からのデータを示す。

【図 1 2 R】図 1 2 J ~ 1 2 V は、示された時点での編集 H S C における C D 3 4 タンパク質の表面発現のフローサイトメトリー分析のグラフを示し；図 1 2 J ~ 1 2 N は、ドナー 1 の H S C の編集からのデータを示し、図 1 2 O ~ 1 2 S は、ドナー 2 の H S C の編集からのデータを示し、及び図 1 2 T ~ 1 2 V は、ドナー 3 の H S C の編集からのデータを示す。

10

【図 1 2 S】図 1 2 J ~ 1 2 V は、示された時点での編集 H S C における C D 3 4 タンパク質の表面発現のフローサイトメトリー分析のグラフを示し；図 1 2 J ~ 1 2 N は、ドナー 1 の H S C の編集からのデータを示し、図 1 2 O ~ 1 2 S は、ドナー 2 の H S C の編集からのデータを示し、及び図 1 2 T ~ 1 2 V は、ドナー 3 の H S C の編集からのデータを示す。

【図 1 2 T】図 1 2 J ~ 1 2 V は、示された時点での編集 H S C における C D 3 4 タンパク質の表面発現のフローサイトメトリー分析のグラフを示し；図 1 2 J ~ 1 2 N は、ドナー 1 の H S C の編集からのデータを示し、図 1 2 O ~ 1 2 S は、ドナー 2 の H S C の編集からのデータを示し、及び図 1 2 T ~ 1 2 V は、ドナー 3 の H S C の編集からのデータを示す。

20

【図 1 2 U】図 1 2 J ~ 1 2 V は、示された時点での編集 H S C における C D 3 4 タンパク質の表面発現のフローサイトメトリー分析のグラフを示し；図 1 2 J ~ 1 2 N は、ドナー 1 の H S C の編集からのデータを示し、図 1 2 O ~ 1 2 S は、ドナー 2 の H S C の編集からのデータを示し、及び図 1 2 T ~ 1 2 V は、ドナー 3 の H S C の編集からのデータを示す。

【図 1 2 V】図 1 2 J ~ 1 2 V は、示された時点での編集 H S C における C D 3 4 タンパク質の表面発現のフローサイトメトリー分析のグラフを示し；図 1 2 J ~ 1 2 N は、ドナー 1 の H S C の編集からのデータを示し、図 1 2 O ~ 1 2 S は、ドナー 2 の H S C の編集からのデータを示し、及び図 1 2 T ~ 1 2 V は、ドナー 3 の H S C の編集からのデータを示す。

30

【図 1 2 W】図 1 2 W は、例示的なガイド C D 3 4 - 2 又は C D 3 4 - 3 を使用して編集された二つのドナー H S C サンプル（ドナー 1 及びドナー 2）についての経時的な C D 3 4 + 細胞のパーセントを平均したグラフを示し；誤差バーは標準偏差を表す。

【0 0 3 0】

【図 1 3 A】図 1 3 A ~ 1 3 L は、C D 3 4 編集ヒト造血幹細胞（H S C）の骨髄系 *i n v i t r o* 分化（I V D）を評価するグラフを示す。図 1 3 A は、C D 3 4 編集 H S C の I V D パターンを特徴付けるために取られた実験アプローチを示す。

【図 1 3 B】図 1 3 B は、C D 3 4 - 2 又は C D 3 4 - 3 を使用し、I V D の前に編集されたドナードナー 2 H S C からのエレクトロポレーション後 4 8 時間に単離された P C R 増幅ゲノム D N A のゲル電気泳動分析を示す。

40

【図 1 3 C】図 1 3 C 及び 1 3 D は、それぞれエレクトロポレーション後 4 8 時間に及び I V D 前に C D 3 4 - 2 及び C D 3 4 - 3 を使用して編集されたドナードナー 2 H S C における % インデルの T I D E 分析を示す。

【図 1 3 D】図 1 3 C 及び 1 3 D は、それぞれエレクトロポレーション後 4 8 時間に及び I V D 前に C D 3 4 - 2 及び C D 3 4 - 3 を使用して編集されたドナードナー 2 H S C における % インデルの T I D E 分析を示す。

【図 1 3 E】図 1 3 E ~ 1 3 F は、生集団の C D 3 4 幾何平均蛍光強度（図 1 3 E）及び % C D 3 4 陽性細胞（図 1 3 F）において測定された、I V D 条件におけるエレクトロポレーション後の 0、2、又は 9 日の編集 H S C における C D 3 4 タンパク質の表面発現の

50

フローサイトメトリー分析を示す。

【図 1 3 F】図 1 3 E～1 3 F は、生集団の C D 3 4 幾何平均蛍光強度（図 1 3 E）及び % C D 3 4 陽性細胞（図 1 3 F）において測定された、I V D 条件におけるエレクトロポレーション後の 0、2、又は 9 日の編集 H S C における C D 3 4 タンパク質の表面発現のフローサイトメトリー分析を示す。

【図 1 3 G】図 1 3 G～1 3 I は、I V D 条件におけるエレクトロポレーション後 0、2、又は 9 日の編集 H S C における細胞分化マーカー（それぞれ単球マーカー C D 1 1 b、C D 1 4、顆粒球マーカー C D 1 5）の表面発現のフローサイトメトリー分析を示し、% 表面マーカー陽性細胞として表される。

【図 1 3 H】図 1 3 G～1 3 I は、I V D 条件におけるエレクトロポレーション後 0、2、又は 9 日の編集 H S C における細胞分化マーカー（それぞれ単球マーカー C D 1 1 b、C D 1 4、顆粒球マーカー C D 1 5）の表面発現のフローサイトメトリー分析を示し、% 表面マーカー陽性細胞として表される。

【図 1 3 I】図 1 3 G～1 3 I は、I V D 条件におけるエレクトロポレーション後 0、2、又は 9 日の編集 H S C における細胞分化マーカー（それぞれ単球マーカー C D 1 1 b、C D 1 4、顆粒球マーカー C D 1 5）の表面発現のフローサイトメトリー分析を示し、% 表面マーカー陽性細胞として表される。

【図 1 3 J】図 1 3 J～1 3 L は、I V D 条件におけるエレクトロポレーション後 0、2、又は 9 日の編集 H S C における細胞分化マーカーの表面発現のフローサイトメトリー分析を示し、表面マーカーの幾何平均蛍光強度として表される。

【図 1 3 K】図 1 3 J～1 3 L は、I V D 条件におけるエレクトロポレーション後 0、2、又は 9 日の編集 H S C における細胞分化マーカーの表面発現のフローサイトメトリー分析を示し、表面マーカーの幾何平均蛍光強度として表される。

【図 1 3 L】図 1 3 J～1 3 L は、I V D 条件におけるエレクトロポレーション後 0、2、又は 9 日の編集 H S C における細胞分化マーカーの表面発現のフローサイトメトリー分析を示し、表面マーカーの幾何平均蛍光強度として表される。

【0 0 3 1】

【図 1 4 A】図 1 4 A～1 4 B は、C D 3 4 編集マウスモデルの *in vivo* 特徴付けを示す。図 1 4 A は、N G S マウスモデルにおける C D 3 4 編集 H S C の *in vivo* 特徴付けのための実験アプローチを示す。異なる時点での読み出しは、例えば、得られた細胞の免疫表現型決定を含む。

【図 1 4 B】図 1 4 B は、マウスの血液及び骨髓中への編集細胞の生着後の、N G S マウスモデルにおける C D 3 4 編集 H S C を特徴付ける、例示的な観察を示す。

【発明を実施するための形態】

【0 0 3 2】

本開示の一部の態様は、治療用薬剤、例えば、免疫療法剤により標的化される抗原の発現において欠損している、遺伝子改変された細胞、例えば、造血細胞に関連する組成物、方法、戦略、及び治療モダリティを提供する。本明細書中で提供される遺伝子改変された細胞は、例えば、特定の免疫療法剤に関連付けられる、特定の望ましくない効果、例えば、任意のオンターゲット、オフ疾患の細胞傷害性を軽減又は回避するために有用である。

【0 0 3 3】

特定の免疫療法剤に関連付けられる、そのような望ましくない効果は、例えば、免疫療法の介入を必要とする対象内の健常な細胞が、免疫療法剤により標的化される抗原を発現する場合に生じ得る。例えば、対象は、特定の抗原の発現の上昇レベルに関連付けられる悪性腫瘍と診断され得るが、それは、典型的には、健常な細胞中では発現されないが、しかし、対象内の非悪性細胞のサブセットにおいて比較的低いレベルで発現され得る。あるいは又は加えて、対象は、特定の抗原、例えば C D 3 4 などを発現する細胞のアブレーションを必要とし得る。免疫療法剤、例えば、C A R-T 細胞治療薬又は抗原を標的化する治療用抗体もしくは抗体-薬物複合体（A D C）の対象への投与は、標的細胞の効率的な殺傷をもたらし得るが、しかし、また、対象において抗原を発現する非標的細胞のアブレ

ーションをもたらし得る。このオンターゲット、オフ疾患細胞傷害性は、重大な副作用をもたらし得るが、一部の場合では、免疫療法剤の使用を全く無効にする。

【0034】

本明細書中で提供される組成物、方法、戦略、及び治療モダリティは、特定の免疫療法剤のオンターゲット、オフ疾患細胞傷害性の問題に対処する。本明細書中で提供される組成物、方法、戦略、及び治療モダリティはまた、CD34を発現する細胞集団をアブレーションする従来の方法に対する代替法、例えば照射などを提供する。例えば、本開示の一部の態様は、免疫療法剤により標的化される抗原、又はその抗原の特定の形態の発現の欠如をもたらす、それらのゲノム中に改変を持つ遺伝子操作された細胞を提供する。そのような遺伝子操作された細胞、及びそれらの子孫は、免疫療法剤により標的化されず、このように、免疫療法剤によりもたらされる任意の細胞傷害性に供されない。そのような細胞は、抗原を標的化する免疫療法剤を受けている対象に、例えば、細胞治療剤により標的化されて殺傷されたであろう健常な細胞を置換するために、及び／又は細胞治療剤による標的化に耐性である細胞の集団を提供するために投与することができる。例えば、対象における健常な造血細胞が抗原を発現する場合、本明細書中で提供される、遺伝子操作された造血細胞、例えば、遺伝子操作された造血幹細胞又は前駆細胞が、抗原を発現しない対象に投与されてもよく、このように、細胞治療剤により標的化されない。そのような造血幹細胞又は前駆細胞は、対象において造血ニッチを再配置することができ、それらの子孫は、細胞療法剤により除去されたであろうものを含む、様々な造系統を再構成することができる。

10

20

【0035】

CD34は、典型的には、ヒト造血幹前駆細胞及び内皮細胞の表面上に発現されるO-及びN-グリカンを含む115kDaの膜貫通型糖タンパク質受容体である。CD34の機能は十分に特徴付けられていないが、しかし、Cd34の発現は、成長因子、例えばTGF- β 1及びTNF- α などにより及び酸素濃度により調節されると考えられる。CD34は、細胞接着、細胞形状を調節する、又は細胞遊走（例、T細胞遊走）において含まれることが報告されている。Tasev et al. Angiogenesis (2016) 19:325-338を参照のこと。一部の実施形態では、HSCはCD34を発現する。一部の実施形態では、CD34は、幹細胞又は前駆細胞（例、HSC）の検出及び／又は単離のための細胞表面マーカーとして使用される。ヒトCD34をコードする遺伝子は、8つのエクソンを含み、1番染色体上に位置付けられる。

30

【0036】

HSC上でのその発現に加えて、CD34発現はまた、一部の造血器悪性腫瘍に関連付けられている。

【0037】

正常で健常なHSCの両方での共有されたCD34の発現、ならびに悪性細胞上の発現抗原であることに起因して、CD34の治療的標的化は、健常な幹細胞及び／又は前駆細胞プールの枯渇をもたらし得る。

【0038】

本明細書中に記載されているのは、CD34をコードする遺伝子の遺伝子改変を特異的に方向づけるために開発されているgRNAである。また、本明細書中で提供されるのは、改変細胞がCD34特異的免疫療法により認識されないようにCD34において欠損している又はCD34の低下した発現を有する、遺伝子改変された細胞、例えば造血細胞、免疫細胞、リンパ球、及びそのような細胞の集団などを産生するためのそのようなgRNAの使用である。また、本明細書中で提供されるのは、特定の免疫療法剤のオンターゲット、オフ疾患細胞傷害性の問題に対処するために、そのような細胞、又はその組成物を対象に投与することを含む方法である。一部の実施例では、本明細書中に記載されるように、遺伝子改変された細胞は、CD34において欠損している、又はCD34の低下発現を有する造血細胞（例、HSC）であり、例えば、前駆細胞又は系統コミット細胞に発生することが可能である。あるいは又は加えて、一部の例では、本明細書中に記載されるよう

40

50

に、遺伝子改変細胞は、免疫細胞、例えばCD34において欠損している、又はCD34の低下発現を有し、従って、他のCD34特異的CAR T細胞によるフラトリサイド殺傷に耐性であるCD34特異的CAR T細胞などである。

【0039】

定義

抗体：本明細書中で使用されるように、用語「抗体」は、特定の標的抗原に対する特異的結合を付与するのに十分な標準イムノグロブリン配列エレメントを含むポリペプチドを指す。当技術分野において公知のように、自然において産生されるインタクトな抗体は、典型的には、二つの同一の重鎖ポリペプチド（各々が約50kD）及び、互いに会合し、一般に「Y字型」構造として言及されるものとなる二つの同一の軽鎖ポリペプチド（各約25kD）を含む、約150kDの四量体剤である。各重鎖は、少なくとも四つのドメイン（各々が約110アミノ酸長）ーアミノ末端可変（VH）ドメイン（Y構造の先端に位置する）を含み、三つの定常ドメインが続く：CH1、CH2、及びカルボキシ末端CH3（Yのステムの基部に位置付けられる）。短い領域は、「スイッチ」として公知であり、重鎖可変領域及び定常領域を接続する。この「ヒンジ」は、CH2及びCH3ドメインを、抗体の残り部分に接続する。このヒンジ領域中の二つのジスルフィド結合によって、インタクトな抗体において二つの重鎖ポリペプチドが互いに接続される。各軽鎖は、二つのドメインーアミノ末端可変（VL）ドメイン、それに続くカルボキシ末端定常（CL）ドメインを含み、互いに別の「スイッチ」により分離されている。インタクトな抗体四量体は、二つの重鎖ー軽鎖二量体を含み、それにおいて、重鎖及び軽鎖は、単一のジスルフィド結合により互いに連結されており；二つの他のジスルフィド結合は、重鎖ヒンジ領域を互いに接続し、二量体は互いに接続され、四量体が形成されるようにする。天然産生抗体がまた、典型的にはCH2ドメイン上で、典型的にはグリコシル化される。天然抗体中の各ドメインは、圧縮逆平行ベータバレル中に互いに対して充填された二つのベータシート（例、3、4、又は5本鎖シート）から形成される「イムノグロブリンフォールド」により特徴付けられる構造を有する。各可変ドメインは、「相補性決定領域」（CDR1、CDR2、及びCDR3）として公知の三つの超可変ループ及び四つのいくらか不変の「フレームワーク」領域（FR1、FR2、FR3、及びFR4）を含む。天然抗体が折り畳まれる場合、FR領域は、ドメインについての構造フレームワークを提供するベータシートを形成し、重鎖及び軽鎖の両方からのCDRループ領域は、三次元空間中に一緒にされて、それらが、Y構造の先端に位置する単一の超可変抗原結合部位を作るようになる。天然抗体のFc領域は、補体系の要素、及び、また、例えば、細胞傷害性を媒介するエフェクター細胞を含むエフェクター細胞上の受容体に結合する。Fc受容体についてのFc領域の親和性及び／又は他の結合特質は、グリコシル化又は他の改変を通じて調節され得る。一部の実施形態では、本発明に従って（例、CARの構成要素として）産生及び／又は利用される抗体は、修飾又は操作されたグリコシル化を伴うFcドメインを含む、グリコシル化Fcドメインを含む。一部の実施形態では、天然抗体中に見出されるような十分なイムノグロブリンドメイン配列を含む任意のポリペプチド又はポリペプチドの複合体は、そのようなポリペプチドが天然に産生される（例、抗原に反応する生物により生成される）、あるいは組換え工学、化学合成、又は他の人工システムもしくはは方法論により産生されるのかに関わらず、抗体として参照及び／又は使用され得る。一部の実施形態では、抗体はポリクローナルである。一部の実施形態では、抗体はモノクローナルである。一部の実施形態では、抗体は、マウス、ウサギ、霊長類、又はヒトの抗体に特徴的である定常領域配列を有する。一部の実施形態では、抗体配列エレメントは、当技術分野において公知であるように、ヒト化、霊長類化、キメラなどである。さらに、用語「抗体」は、本明細書中において使用される場合、適切な実施形態（他に記載されている又は文脈から明らかではない限り）において、代替的な提示において抗体の構造的及び機能的特徴を利用するための、当技術分野において公知の又は開発されている構築物又はフォーマットのいずれかを指すことができる。例えば、一部の実施形態では、本発明に従って利用される抗体は、限定されないが、インタクトなIgA、IgG、IgE、又はIgM抗体；二重又は

10

20

30

40

50

多特異的抗体（例、Z y b o d i e s（登録商標）など）；例えば、本明細書中で最も広い意味で使用され、限定されないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多特異的抗体（例、二重特異的抗体）、及び／又は抗体フラグメント（好ましくは、所望の抗原結合活性を示すフラグメント）を含む、様々な抗体構造を包含する抗体フラグメントから選択されるフォーマットである。本明細書中に記載される抗体は、イムノグロブリン、重鎖抗体、軽鎖抗体、L R R ベースの抗体、又は抗体様特性を伴う他のタンパク質足場、ならびに、例えば、F a b、F a b'、F a b' 2、F a b 2、F a b 3、F (a b') 2、F d、F v、F e b、s c F v、S M I P、単ドメイン抗体、一本鎖抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、マキシボディ、タンダブ、D V D、B i T e、T a n d A b、もしくは同様のもの、又はそれらの任意の組み合わせを含む、当技術分野において公知の他の免疫学的結合部分であり得る。抗体の異なるクラスのサブユニット構造及び三次元構成が、当技術分野において公知である。一部の実施形態では、抗体は、それが天然に産生された場合に有するであろう共有結合的修飾（例、グリカンの付着）を欠き得る。一部の実施形態では、抗体は、共有結合修飾（例、グリカン、ペイロード（例、検出可能な部分、治療用部分、触媒部分など）、又は他のペンダント基（例、ポリエチレングリコールなど）の付着）を含み得る。

10

【0040】

抗原結合断片：「抗原結合断片」は、抗体が結合する抗原に結合する抗体の部分を指す。抗体の抗原結合断片は、抗原に特異的に結合して複合体を形成する、任意の天然の、酵素的に入手可能な、合成的な、又は遺伝子操作されたポリペプチド又は糖タンパク質を含む。例示的な抗体断片は、限定されないが、F v、F a b、F a b'、F a b' - S H、F (a b') 2；ダイアボディ；単ドメイン抗体；直鎖抗体；一本鎖抗体分子（例、s c F v又はV H H又はV H又はV Lドメインのみ）；及び抗体フラグメントから形成される多特異性抗体を含む。一部の実施形態では、本明細書中に記載される抗体の抗原結合断片は、s c F vである。一部の実施形態では、本明細書中に記載される抗体の抗原結合断片は、V H Hドメインのみである。全抗体分子と同様に、抗原結合断片は、単一特異性又は多特異性（例、二重特異性）であり得る。抗体の多特異性抗原結合断片は、少なくとも二つの異なる可変ドメインを含んでもよく、それにおいて、各可変ドメインは、別々の抗原に又は同じ抗原の異なるエピトープに特異的に結合することが可能である。

20

【0041】

抗体重鎖：本明細書中で使用されるように、用語「抗体重鎖」は、それらの天然の立体構造における全ての抗体分子中に存在する二種類のポリペプチド鎖の大きい方を指す。

30

【0042】

抗体軽鎖：本明細書中で使用されるように、用語「抗体軽鎖」は、それらの天然の立体構造における全ての抗体分子中に存在する二種類のポリペプチド鎖の小さい方を指す。

【0043】

合成抗体：本明細書中で使用されるように、用語「合成抗体」は、組換えDNA技術を使用して生成される抗体、例えば、本明細書中に記載されるバクテリオファージにより発現される抗体などを指す。この用語はまた、抗体をコードするDNA分子の合成により生成され、そのDNA分子が抗体タンパク質を発現する抗体、又は抗体を特定するアミノ酸配列を意味し、それにおいて、DNA又はアミノ酸配列は、当技術分野において入手可能であり、周知である合成DNA又はアミノ酸配列技術を使用して得られている解釈されるべきである。

40

【0044】

抗原：本明細書中で使用されるように、用語「抗原」又は「A g」は、免疫応答を誘発することが可能である分子を指す。この免疫応答は、抗体産生、特定の免疫学的に能力のある細胞の活性化、又は両方を含み得る。当業者は、実質的に全てのタンパク質又はペプチドを含む、任意の巨大分子が抗原として役立ち得ることを理解するであろう。さらに、抗原は、組換えDNA又はゲノムDNAから由来し得る。当業者は、免疫応答を誘発するタンパク質をコードするヌクレオチド配列又は部分ヌクレオチド配列を含む任意のDNA

50

が、その用語が本明細書中で使用されるように、「抗原」をコードすることを理解するであろう。さらに、当業者は、抗原が、遺伝子の全長ヌクレオチド配列のみによりコードされる必要がないことを理解するであろう。本発明は、限定されないが、一つ以上の遺伝子の部分ヌクレオチド配列の使用を含み、これらのヌクレオチド配列が、所望の免疫応答を誘発するために様々な組み合わせにおいて配置されていることが容易に明らかである。さらに、当業者は、抗原が、遺伝子によりコードされる必要が全くないことを理解するであろう。抗原が、生成、合成されることができ、又は生物学的サンプルから由来し得ることは容易に明らかである。そのような生物学的サンプルは、限定されないが、組織サンプル、腫瘍サンプル、細胞又は生物学的液体を含み得る。

【0045】

自己：本明細書中で使用されるように、用語「自己」は、後に同じ個体中に再導入される、個体から由来する任意の材料を指す。

【0046】

同種：本明細書中で使用されるように、用語「同種」は、同じ種の異なる動物から由来する任意の材料（例、細胞の集団）を指す。

【0047】

過剰増殖性疾患：本明細書中で使用されるように、用語「過剰増殖性疾患」は、異常細胞の迅速で制御不能な成長により特徴付けられる疾患を指す。過剰増殖性疾患は、良性又は悪性疾患であり得る。悪性疾患は、典型的には、悪性細胞、例えば癌細胞などの存在により特徴付けられる。癌細胞は、局所的に、又は血流及びリンパ系を通じて、身体の一部に広がり得る。様々な癌の例は、限定されないが、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、皮膚癌、膵臓癌、結腸直腸癌、腎臓癌、肝臓癌、脳癌、リンパ腫、白血病、肺癌及び同様のものを含む。特定の実施形態では、過剰増殖性は、造血器悪性腫瘍、例えば骨髄性悪性腫瘍又はリンパ性悪性腫瘍などである。一部の実施形態では、造血器悪性腫瘍は急性骨髄性白血病である。一部の実施形態では、造血器悪性腫瘍は骨髄異形成症候群である。

【0048】

保存的配列改変：本明細書中で使用されるように、用語「保存的配列改変」は、アミノ酸配列を含む抗体の結合特性に著しく影響しない、又はそれを変化させないアミノ酸改変を指す。そのような保存的改変は、アミノ酸置換、付加、及び欠失を含む。改変は、当技術分野において公知の標準的な技術、例えば部位特異的変異誘発及びPCR媒介性変異誘発などにより、様々な実施形態と適合する抗体中に導入することができる。保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されるアミノ酸置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが、当技術分野において定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖（例、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖（例、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、ベータ分岐側鎖（例、スレオニン、バリン、イソロイシン）、及び芳香族側鎖（例、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を伴うアミノ酸を含む。このように、抗体のCDR領域内の1以上のアミノ酸残基を、同じ側鎖ファミリーからの他のアミノ酸残基で置換することができ、改変された抗体を、本明細書中に記載される機能的アッセイを使用して、抗原に結合する能力についてテストすることができる。

【0049】

共刺激リガンド：本明細書中で使用されるように、用語「共刺激性リガンド」は、免疫細胞（例、Tリンパ球）上の同族共刺激性分子に特異的に結合し、それにより、限定されないが、増殖、活性化、分化、及び同様のものを含む免疫細胞応答を媒介するシグナルを提供する抗原提示細胞（例、APC、樹状細胞、B細胞、及び同様のもの）上の分子を指す。共刺激性リガンドは、限定されないが、CD7、B7-1（CD80）、B7-2（CD86）、CD28、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、誘導性共

10

20

30

40

50

刺激性リガンド（ICOS-L）、細胞間接着分子（ICAM）、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、リンホトキシンベータ受容体、3/ TR6、ILT3、ILT4、HVEM、Tollリガンド受容体に結合するアゴニスト又は抗体、及びB7-H3と特異的に結合するリガンドを含み得る。共刺激性リガンドはまた、とりわけ、免疫細胞（例、Tリンパ球）上に存在する共刺激分子、限定されないが、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原1（LFA-1）、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、及びCD83と特異的に結合するリガンドと特異的に結合する抗体を包含する。

【0050】

細胞傷害性：本明細書中で使用されるように、用語「細胞傷害性の」又は「細胞傷害性」は、細胞を殺傷又は損傷させることを指す。一実施形態では、代謝的に増強された細胞の細胞傷害性が改善され、例えば、免疫細胞（例、Tリンパ球）の細胞溶解活性が増加される。

【0051】

有効量：本明細書中で使用されるように、本明細書中に記載される「有効量」は、個体において新生物性疾患、例えば、癌を予防又は治療するのに十分である用量を指す。治療的又は予防的使用のために有効な量は、例えば、治療されている疾患又は障害の段階及び重症度、患者の年齢、体重、及び一般的な健康状態、ならびに処方医師の判断に依存する。用量のサイズはまた、選択される活性剤、投与の方法、投与のタイミング及び頻度、特定の活性剤の投与に伴い得る任意の有害な副作用の存在、性質、及び範囲、ならびに望ましい生理学的効果により決定される。様々な疾患又は障害が、例えば、本明細書中に記載されるように、編集された造血幹細胞との時間的近接において、おそらくは、本開示の遺伝子操作された細胞（例、CAR細胞）を、投与の各々の又は様々なラウンドにおいて使用する、複数回の投与を含む長期治療を要求し得ることが、当業者により理解されるであろう。

【0052】

本発明の目的のために、本明細書中に記載されるCAR構築物を含む異種核酸を含む遺伝子操作された細胞の量又は用量が、合理的な時間枠にわたって、対象又は動物において治療的又は予防的応答をもたらすのに十分であるべきである。例えば、用量は、抗原に結合する、あるいは投与の時間から約2時間又はそれより長く、例えば、約12～約24時間又はそれ以上の期間において癌を検出、治療、又は予防するのに十分であるべきである。特定の実施形態では、期間はさらに長くなり得る。用量は、本開示の特定の遺伝子操作された細胞（例、CAR細胞）の有効性及び動物（例、ヒト）の状態、ならびに処置される動物（例、ヒト）の体重により決定される。

【0053】

エフェクター機能：本明細書中で使用されるように、「エフェクター機能」又は「エフェクター活性」は、免疫細胞の刺激への応答において免疫細胞により行われる特異的活性を指す。例えば、Tリンパ球のエフェクター機能は、抗原を認識し、抗原を発現する細胞を殺傷することを含む。

【0054】

内因性：本明細書中で使用されるように、「内因性」は、特定の生物、細胞、組織、又は系からの、又はその内部で産生される任意の材料を指す。

【0055】

外因性：本明細書中で使用されるように、用語「外因性」は、特定の生物、細胞、組織、もしくは系から導入される、又はその外側で産生される任意の材料を指す。

【0056】

増殖する：本明細書中で使用されるように、用語「増殖する」は、細胞、例えば、免疫細胞、例、Tリンパ球、Bリンパ球、NK細胞、及び／又は造血細胞の数における増加におけるように、数において増加することを指す。一実施形態では、*ex vivo*で増殖

10

20

30

40

50

された免疫細胞、例えば、Ｔリンパ球、Ｂリンパ球、ＮＫ細胞、及び／又は造血細胞は、培養中に最初に存在する数と比べて、数において増加する。別の実施形態では、*ex vivo*で増殖された免疫細胞、例えば、Ｔリンパ球、Ｂリンパ球、ＮＫ細胞、及び／又は造血細胞は、培養物中の他の細胞型と比べて、数において増加する。一部の実施形態では、増殖は*in vivo*で生じ得る。用語「*ex vivo*」は、本明細書中で使用されるように、生きた生物（例、ヒト）から除去され、生物の外側（例、培養ディッシュ、試験管、又はバイオリアクター中）で増やされた細胞を指す。

【００５７】

機能的部分：本明細書中で使用されるように、用語「機能的部分」は、ＣＡＲへの参照において使用される場合、本発明のＣＡＲ構築物の任意の部分又は断片を指し、その部分又は断片は、それが部分であるＣＡＲ構築物（親ＣＡＲ構築物）の生物学的活性を保持する。機能的部分は、例えば、標的細胞を認識する能力、あるいは癌を検出、治療、又は予防する能力を、親ＣＡＲ構築物と同様の程度、同じ程度、又はより高い程度まで保持するＣＡＲ構築物のそれらの部分を包含する。親ＣＡＲ構築物への参照において、機能的部分は、例えば、親ＣＡＲの約１０％、約２５％、約３０％、約５０％、約６８％、約８０％、約９０％、約９５％、又はそれ以上を含み得る。

【００５８】

機能的部分は、部分のアミノ末端もしくはカルボキシ末端に、又は両方の末端に追加のアミノ酸を含むことができ、それらの追加のアミノ酸は、親ＣＡＲ構築物のアミノ酸配列に見出されない。望ましくは、追加のアミノ酸は、機能的部分の生物学的機能、例えば、標的細胞を認識する、癌を検出する、癌を治療又は予防するなどに干渉しない。より望ましくは、追加のアミノ酸によって、親ＣＡＲ構築物の生物学的活性と比較して、生物学的活性が増強される。

【００５９】

機能的バリエーション：本明細書中で使用されるように、用語「機能的バリエーション」は、本明細書中で使用されるように、親ＣＡＲ構築物と実質的な又は有意な配列同一性又は類似性を有するＣＡＲ構築物、ポリペプチド、又はタンパク質を指し、その機能的バリエーションは、それがバリエーションである、そのＣＡＲの生物活性を保持する。機能的バリエーションは、例えば、標的細胞を認識する能力を、親ＣＡＲ構築物と類似の程度、同じ程度、又はより高い程度まで保持する、本明細書中に記載されるＣＡＲ構築物（親ＣＡＲ構築物）のそれらのバリエーションを包含する。親ＣＡＲ構築物への参照において、機能的バリエーションは、例えば、親ＣＡＲ構築物と、アミノ酸配列において少なくとも約３０％、約５０％、約７５％、約８０％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％又はそれ以上同一であり得る。機能的バリエーションは、例えば、少なくとも一つの保存的アミノ酸置換を伴う親ＣＡＲのアミノ酸配列を含み得る。あるいは又は加えて、機能的バリエーションは、少なくとも一つの非保存的アミノ酸置換を伴う親ＣＡＲ構築物のアミノ酸配列を含み得る。この場合では、非保存的アミノ酸置換は、機能的バリエーションの生物学的活性に干渉しない又はそれを阻害しないことが好ましい。非保存的アミノ酸置換によって、機能的バリエーションの生物学的活性が増強され得るが、機能的バリエーションの生物学的活性が、親ＣＡＲ構築物と比較して増加する。

【００６０】

ｇＲＮＡ：用語「ｇＲＮＡ」及び「ガイドＲＮＡ」は、全体を通して互換的に使用され、標的核酸へのｇＲＮＡ／Ｃａｓ９分子複合体の特異的標的化又はホーミングを促進する核酸を指す。ｇＲＮＡは、単分子（単一ＲＮＡ分子を有する）であることができ、時折、本明細書中ではｓｇＲＮＡ、又はモジュラー（一つ以上の、及び典型的には二つの別々のＲＮＡ分子を含む）として言及される。ｇＲＮＡは、宿主細胞のゲノム中の標的ドメインに結合し得る。ｇＲＮＡ（例、その標的化ドメイン）は、標的ドメインに対して部分的又は完全に相補的であり得る。ｇＲＮＡはまた、「足場配列」（例、ｔｒａｃｒＲＮＡ配列）を含んでもよく、それによって、ｇＲＮＡ配列に結合された標的ドメインにＣａｓ９分子が（例、ｇＲＮＡ配列の標的化ドメインにより）動員される。足場配列は、少なくとも

一つのステムループ構造を含んでもよく、エンドヌクレアーゼを動員する。例示的な足場配列は、例えば、Jinek, et al. I (2012) 337 (6096) : 816-821、Ran, et al. Nature Protocols (2013) 8 : 2281-2308、PCT公開WO2014/093694、及びPCT公開WO2013/176772において見いだすことができる。

【0061】

異種：本明細書中で使用されるように、用語「異種」は、生きた系、例えば、細胞において生じる現象を指し、それは、そのシステムにおいて自然に生じない。例えば、タンパク質がその細胞において自然に生じない（例、細胞がそのタンパク質を自然にコードしない）細胞におけるタンパク質の発現は、タンパク質の異種発現であり得る。一部の実施形態では、異種核酸は、キメラ抗原受容体構築物をコードする。

10

【0062】

免疫細胞：本明細書中で使用されるように、用語「免疫細胞」は、本明細書中で用語「免疫エフェクター細胞」と互換的に使用され、免疫応答、例えば、免疫反応の促進において含まれる細胞を指す。免疫細胞の例は、限定されないが、Tリンパ球、ナチュラルキラー（NK）細胞、マクロファージ、単球、樹状細胞、好中球、好酸球、マスト細胞、血小板、大顆粒リンパ球、ランゲルハンス細胞、又はBリンパ球を含む。免疫細胞（例、Tリンパ球、Bリンパ球、NK細胞）の供給源は、対象から得ることができる。

【0063】

免疫応答：本明細書中で使用されるように、用語「免疫応答」は、リンパ球が抗原分子を外來物として特定し、抗体の形成を誘導し、及び／又はリンパ球を活性化して抗原を除去する場合に生じる、抗原に対する細胞応答及び／又は全身応答を指す。

20

【0064】

核酸：本明細書中で使用されるように、用語「核酸」は、少なくとも三つのヌクレオチドのポリマーを指す。一部の実施形態では、核酸はDNAを含む。一部の実施形態では、核酸はRNAを含む。一部の実施形態では、核酸は一本鎖である。一部の実施形態では、核酸は二本鎖である。一部の実施形態では、核酸は、一本鎖部分及び二本鎖部分の両方を含む。一部の実施形態では、核酸は、1以上のホスホジエステル結合を含む骨格を含む。一部の実施形態では、核酸は、ホスホジエステル結合及び非ホスホジエステル結合の両方を含む骨格を含む。例えば、一部の実施形態では、核酸は、例えば、「ペプチド核酸」におけるように、1以上のホスホリボース又は5'-N-ホスホラミダイト連結ならびに／あるいは1以上のペプチド結合を含む骨格を含み得る。一部の実施形態では、核酸は、1以上、あるいは全ての天然残基（例、アデニン、シトシン、デオキシアデノシン、デオキシチジン、デオキシグアノシン、デオキシチミジン、グアニン、チミン、ウラシル）を含む。一部の実施形態では、核酸は、1以上、あるいは全ての非天然残基を含む。一部の実施形態では、非天然残基は、ヌクレオシド類似体（例、2-アミノアデノシン、2-チオチミジン、イノシン、ピロロピリミジン、3-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、C-5プロピニル-シチジン、C-5プロピニル-ウリジン、2-アミノアデノシン、C5-プロモウリジン、C5-フルオロウリジン、C5-ヨードウリジン、C5-プロピニル-ウリジン、C5-プロピニル-シチジン、C5-メチルシチジン、2-アミノアデノシン、7-デアザアデノシン、7-デアザグアノシン、8-オキソアデノシン、8-オキソグアノシン、O(6)-メチルグアニン、2-チオシチジン、メチル化塩基、挿入塩基、及びそれらの組み合わせ）を含む。一部の実施形態では、非天然残基は、天然残基におけるものと比較して、1以上の修飾糖（例、2'-フルオロリボース、リボース、2'-デオキシリボース、アラビノース、及びヘキソン）を含む。一部の実施形態では、核酸は、機能的な遺伝子産物、例えばRNA又はポリペプチドなどをコードするヌクレオチド配列を有する。一部の実施形態では、核酸は、1以上のイントロンを含むヌクレオチド配列を有する。一部の実施形態では、核酸は、天然供給源からの単離、酵素合成により（例、相補的テンプレートに基づく重合、例えば、in vivoもしくはin vitro、組換え細胞もしくは系における再生、又は化学合成により）調製され得る。一部

30

40

50

の実施形態では、核酸は、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000又はそれ以上の残基長である。

【0065】

一本鎖抗体：本明細書中で使用されるように、用語「一本鎖抗体」は、イムノグロブリン重鎖断片及び軽鎖断片が、操作されたアミノ酸のスパンを介してFv領域に連結される、組換えDNA技術により形成された抗体を指す。一本鎖抗体を生成する様々な方法が公知であり、米国特許第4,694,778号；Bird (1988) Science 242:423-442；Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883；Ward et al. (1989) Nature 334:544-548；Skerra et al. (1988) Science 242:1038-1041において記載されるものを含む。

【0066】

特異的に結合する：本明細書中で使用されるように、用語「特異的に結合する」は、抗原結合ドメイン、例えば抗体薬剤又はキメラ抗原受容体の一部などに関して、特定の抗原を認識するが、しかし、サンプル中の他の分子を実質的に認識又は結合しない抗原結合ドメイン又は抗体薬剤を指す。例えば、一つの種からの抗原に特異的に結合する抗原結合ドメイン又は抗体薬剤はまた、1以上の種からのその抗原に結合し得る。しかし、そのような種間反応性は、それ自体、特異的としての抗原結合ドメイン又は抗体薬剤の分類を変化させない。別の例では、抗原に特異的に結合する抗原結合ドメイン又は抗体薬剤はまた、抗原の異なるアレル形態に結合し得る。しかし、そのような交差反応性は、それ自体、特異的としての抗原結合ドメイン又は抗体薬剤の分類を変化させない。一部の例では、用語「特異的結合」又は「特異的に結合する」は、抗原結合ドメイン又は抗体薬剤、タンパク質、もしくはペプチドと第二の化学種との相互作用への参照において使用され得るが、相互作用が、化学種上の特定の構造（例、抗原決定基又はエピトープ）の存在に依存的である；例えば、抗原結合ドメイン又は抗体薬剤が、一般的に、タンパク質ではなく特定のタンパク質構造を認識し、結合することを意味する。抗原結合ドメイン又は抗体薬剤がエピトープ「A」について特異的である場合、標識された「A」及び抗原結合ドメイン又は抗体薬剤を含む反応における、エピトープA（又は遊離、非標識A）を含む分子の存在によって、抗体に結合された標識されたAの量が低下し得る。

【0067】

対象：本明細書中で使用されるように、用語「対象」は、生物、例えば、哺乳類（例、ヒト、非ヒト哺乳類、非ヒト霊長類、霊長類、実験動物、マウス、ラット、ハムスター、スナネズミ、ネコ、又はイヌ）を指す。一部の実施形態では、ヒト対象は、成人、青年、又は小児の対象である。一部の実施形態では、対象は、疾患、障害、又は状態、例えば、本明細書中で提供されるように治療され得る疾患、障害、又は状態、例えば、本明細書中に列挙された癌又は腫瘍を患っている。一部の実施形態では、対象は、疾患、障害、又は状態に対して感受性である；一部の実施形態では、感受性対象は、疾患、障害、又は状態を発生する増加リスク（参照対象又は集団において観察される平均リスクと比較して）の素因があり、ならびに／あるいはそれを示す。一部の実施形態では、対象は、疾患、障害、又は状態の1以上の症状を呈する。一部の実施形態では、対象は、疾患、障害、又は状態の特定の症状（例、疾患の臨床症状）又は特徴を呈さない。一部の実施形態では、対象は、疾患、障害、又は状態の任意の症状又は特徴を呈さない。一部の実施形態では、対象は患者である。一部の実施形態では、対象は、診断及び／又は治療が施される及び／又は施された個体である。

【0068】

標的：本明細書中で使用されるように、用語「標的」は、提供される方法、系、及び／又は組成物、例えば、治療を必要とする、あるいは、例えば、本明細書中に記載されるように、CARにより優先的に結合される、身体内の細胞、組織、器官、又は部位の対象である、身体内の細胞、組織、器官、又は部位を指す。

【0069】

治療的：本明細書中で使用されるように、用語「治療的」は、治療及び／又は予防を指す。治療的効果は、疾患状態の抑制、寛解、又は根絶により得られる。

【0070】

トランスフェクトされた：本明細書中で使用されるように、用語「トランスフェクトされた」又は「形質転換された」又は「形質導入された」は、外因性核酸が宿主細胞中に移動又は導入される過程を指す。「トランスフェクトされた」又は「形質転換された」又は「形質導入された」細胞は、外因性核酸でトランスフェクトされた、形質転換された、又は形質導入された細胞である。細胞は、初代対象細胞及びその子孫を含む。

【0071】

導入遺伝子：本明細書中で使用されるように、用語「導入遺伝子」は、細胞、例えば、核酸配列が自然には生じない細胞のゲノム中に含まれる外因性核酸配列を指す。一部の実施形態では、導入遺伝子は、遺伝子産物、例えば、CARをコードする核酸配列を含む、又はそれからなり得る。一部の実施形態では、導入遺伝子は、発現構築物、例えば、調節エレメント、例えば、プロモーターの制御下の遺伝子産物をコードする核酸配列を含む、又はそれからなり得る。

【0072】

治療する：本明細書中で使用されるように、用語「治療する」、「治療」、又は「治療している」は、疾患、障害、及び／又は状態の1以上の症状又は特徴の発生率及び／又は重症度における部分的又は完全な軽減、寛解、発症の遅延、阻害、予防、緩和、及び／又は低下を指す。一部の実施形態では、治療は、疾患、障害、及び／又は状態の兆候又は特徴を示さない対象に施され得る（例、予防的であり得る）。一部の実施形態では、治療は、例えば、疾患、障害、及び／又は状態に関連付けられる病理を発生するリスクを減少させる目的のために、疾患、障害、及び／又は状態の早期又は軽度の兆候又は特徴のみを示す対象に施され得る。一部の実施形態では、治療は、疾患、障害、又は状態の確立された、重度の、及び／又は後期兆候を示す対象に施され得る。一部の実施形態では、治療することは、CAR（例、Tリンパ球、Bリンパ球、NK細胞）を発現する遺伝子操作された細胞を含む免疫細胞を対象に投与すること、又は遺伝子操作された幹細胞を含む造血幹細胞移植片を対象に投与することを含み得る。

【0073】

腫瘍：本明細書中で使用されるように、用語「腫瘍」は、細胞又は組織の異常な成長を指す。一部の実施形態では、腫瘍は、前癌性（例、良性）、悪性、前転移性、転移性、及び／又は非転移性である細胞を含み得る。一部の実施形態では、腫瘍は、癌に関連付けられる又はその兆候である。一部の実施形態では、腫瘍は分散腫瘍又は液体腫瘍であり得る。一部の実施形態では、腫瘍は固形腫瘍であってもよい。

【0074】

遺伝子操作された細胞ならびに関連する組成物及び方法。

本開示の一部の態様は、CD34の発現の喪失をもたらすそれらのゲノム中の改変、又はCD34を標的化する免疫療法剤により認識されないCD34のバリエーション形態の発現を含む遺伝子操作された細胞を提供する。一部の実施形態では、細胞のゲノムにおける改変は、CD34をコードするゲノム配列における変異である。

【0075】

用語「変異」は、本明細書中で使用されるように、参照配列、例えば、そのような変異を有さない細胞の対応する配列、又は対応する野生型核酸配列と比較した、核酸配列中での変化（例、挿入、欠失、逆位、又は置換）を指す。本明細書中で提供される一部の実施形態では、CD34をコードする遺伝子中の変異は、変異を持つ細胞におけるCD34の

発現の喪失をもたらす。一部の実施形態では、CD34をコードする遺伝子中での変異は、CD34を標的化する免疫療法剤により結合されない、又は遺伝子によりコードされる非変異CD34形態よりも有意に低いレベルで結合される、CD34のバリエーション形態の発現をもたらす。一部の実施形態では、本明細書中で提供されるように、CD34遺伝子中にゲノム変異を持つ細胞は、CD34、例えば、抗CD34抗体又はキメラ抗原受容体(CAR)を標的化する免疫療法剤により結合されない、又は有意に低いレベルで結合される。

【0076】

本開示の一部の態様は、本明細書中に記載される、遺伝子操作された細胞、例えば、CD34の発現の喪失をもたらすそれらのゲノム中の改変、又はCD34を標的化する免疫療法剤により認識されないCD34のバリエーション型の発現を含む遺伝子操作された細胞を生成するための組成物及び方法を提供する。本明細書中で提供されるそのような組成物及び方法は、限定されないが、例えば、RNAガイドヌクレアーゼ、例えばCRISPR/Casヌクレアーゼなど、及び、そのようなRNAガイドヌクレアーゼに結合し、それらを細胞のゲノム内の適切な標的部位に標的化して、ゲノム改変をもたらす、CD34の発現の喪失、又はCD34を標的化する免疫療法剤により認識されないCD34のバリエーション形態の発現をもたらすことができる適切なRNAを使用することによる、遺伝子操作された細胞のための適切な戦略及びアプローチを含む。

【0077】

一部の実施形態では、本明細書中に記載される、遺伝子操作された細胞(例、遺伝子操作された造血細胞、例えば、例えば、遺伝子操作された造血幹細胞もしくは前駆細胞又は遺伝子操作された免疫エフェクター細胞など)は、ゲノム編集技術を介して生成され、それは、標的化された変化を導入することが可能な任意の技術を含み、また、細胞のゲノム中に「編集」として言及される。

【0078】

一つの例示的な適切なゲノム編集技術は、細胞のゲノム中に標的化された一本鎖又は二本鎖DNA切断を導入するためのRNAガイドヌクレアーゼ、例えば、CRISPR/Casヌクレアーゼの使用を含む「遺伝子編集」であり、それによって、細胞修復機構、例えば、例えば、非相同末端結合(NHEJ)、マイクロホモロジー媒介性末端結合(MMEJ)、また、時折、「代替NHEJ」又は「alt-NHEJ」として言及される)、あるいはヌクレアーゼ切断の部位で、又はそのすぐ近位で、典型的には、改変された核酸配列(例、ヌクレオチド又はヌクレオチド配列の挿入、欠失、反転、又は置換を介して)をもたらす相同性指向性修復(HDR)などが誘発される。Yeh et al. Nat. Cell Biol. (2019) 21:1468-1478; 例えば、Hsu et al. Cell (2014) 157:1262-1278; Jasin et al. DNA Repair (2016) 44:6-16; Sfeir et al. Trends Biochem. Sci. (2015) 40:701-714を参照のこと。

【0079】

別の例示的な、適切なゲノム編集技術は、「塩基編集」であり、それは、塩基編集、例えば、特定の核酸塩基、例えば、C又はAヌクレオチドのシトシン又はアデノシン核酸塩基を標的化して、脱アミノ化するデアミナーゼに融合されたヌクレアーゼ障害又は部分的ヌクレアーゼ障害RNAガイドCRISPR/Casタンパク質の使用を含み、それは、細胞のミスマッチ修復機構を介して、CからTヌクレオチドへの変化、又はAからGヌクレオチドへの変化をもたらす。例えば、Komor et al. Nature (2016) 533:420-424; Rees et al. Nat. Rev. Genet. (2018) 19(12):770-788; Anzalone et al. Nat. Biotechnol. (2020) 38:824-844を参照のこと;

【0080】

さらに別の例示的な、適切なゲノム編集技術は、「プライム編集」を含み、それは、操作された逆転写酵素(RT)ドメインに融合された触媒的障害又は部分的な触媒的障害R

10

20

30

40

50

NAガイドヌクレアーゼ、例えば、CRISPR/Casヌクレアーゼを使用した、特異的に標的化されたゲノム部位中への新たな遺伝情報、例えば、改変ヌクレオチド配列の導入を含む。Cas/RT融合体は、所望の編集をコードする核酸配列も含むガイドRNAによりゲノム内の標的部位に標的化され、RTのためのプライマーとしての役割を果たすことができる。例えば、Anzalone et al. Nature (2019) 576 (7785) : 149–157を参照のこと。

【0081】

ゲノム編集技術の使用は、典型的には、適切なRNAガイドヌクレアーゼの使用を特徴とし、それは、一部の実施形態では、例えば、塩基編集又はプライム編集のために、触媒的に障害され得る、又は部分的に触媒的に障害され得る。適切なRNAガイドヌクレアーゼの例は、CRISPR/Casヌクレアーゼを含む。例えば、一部の実施形態では、本明細書中で提供される、遺伝子操作された細胞の方法における使用のための適切なRNAガイドヌクレアーゼは、Cas9ヌクレアーゼ、例えば、spCas9又はsaCas9ヌクレアーゼである。別の例では、一部の実施形態では、本明細書中で提供される、遺伝子操作された細胞の方法における使用のための適切なRNAガイドヌクレアーゼは、Cas12ヌクレアーゼ、例えば、Cas12aヌクレアーゼである。例示的な、適切なCas12ヌクレアーゼの例は、限定されないが、AsCas12a、FnCas12a、他のCas12aオルソログ、及びCas12a誘導体、例えばMAD7システム(MAD7(商標)、Inscripta, Inc.)、又はAlt-R Cas12a(Cpf1)Ultraヌクレアーゼ(Alt-R(登録商標)Cas12a Ultra; Integrated DNA Technologies, Inc.)などを含む。例えば、Gillet et al. LIPSCOMB 2017. In United States: Inscripta Inc.; Price et al. Biotechnol. Bioeng. (2020) 117 (60) : 1805–1816を参照のこと；

【0082】

一部の実施形態では、本明細書中に記載される遺伝子操作された細胞(例、遺伝子操作された造血細胞、例えば、例えば、遺伝子操作された造血幹細胞もしくは前駆細胞、又は遺伝子操作された免疫エフェクター細胞)が、RNAガイドヌクレアーゼ、例えば、CRISPR/Casヌクレアーゼ、例えば、例えば、Cas9ヌクレアーゼ又はCas12aヌクレアーゼなどを、細胞のゲノム中の適切な標的部位に、RNAガイドヌクレアーゼが標的部位を結合して、細胞のゲノムDNAを切断するために適切な条件下で標的化することにより生成される。適切なRNAガイドヌクレアーゼを、適切なガイドRNA(gRNA)により、ゲノム内の特定の標的部位に標的化することができる。本開示の態様に従ったCRISPR/Casヌクレアーゼを標的化するための適切なgRNAが本明細書中に提供されており、例示的な、適切なgRNAが本明細書中の他の場所でより詳細に記載されている。

【0083】

一部の実施形態では、本明細書中に記載されるCD34 gRNAは、CRISPR/Casヌクレアーゼ、例えば、Cas9ヌクレアーゼと複合体化される。様々なCas9ヌクレアーゼが、本明細書中で提供されるgRNAとの使用のために適切であり、本開示の態様に従ったゲノム編集をもたらす、例えば、CD34遺伝子におけるゲノム改変を作製する。典型的には、Casヌクレアーゼ及びgRNAは、細胞のゲノム上の標的部位、例えば、CD34遺伝子内の標的部位を標的化する、Cas/gRNA複合体の形成のために適切な形態において及び条件下で提供される。一部の実施形態では、Cas/gRNA複合体を、CD34遺伝子中の所望の標的ドメインに標的化するための所望のPAM特異性を示すCasヌクレアーゼが使用される。適切な標的ドメイン、及び対応するgRNA標的化ドメイン配列が、本明細書中で提供される。

【0084】

一部の実施形態では、Cas/gRNA複合体は、例えば、in vitroで形成され、標的細胞は、例えば、細胞中へのCas/gRNA複合体の電圧ポレーション

10

20

30

40

50

を介して、C a s / g R N A 複合体と接触される。一部の実施形態では、細胞はC a s タンパク質及びg R N A と別々に接触し、C a s / g R N A 複合体が細胞内に形成される。一部の実施形態では、細胞は、核酸、例えば、C a s タンパク質をコードするD N A もしくはR N A と、及び／又はg R N A をコードする核酸、あるいはその両方と接触させる。
【0085】

一部の実施形態では、本明細書中で提供される、遺伝子操作された細胞は、適切なゲノム編集技術を使用して生成され、それにおいて、ゲノム編集技術は、C a s 9ヌクレアーゼの使用により特徴付けられる。一部の実施形態では、C a s 9分子は、ストレプトコッカス・ピオゲネス (S p C a s 9)、スタフィロコッカス・アウレウス (S a C a s 9)、又はストレプトコッカス・サーモフィラス (s t C a s 9) である、又はそれから由来する。追加の適切なC a s 9分子は、ナイセリア・メニンジティディス (N m C a s 9)、アシドボラックス・アベナエ、アクチノバチルス・プルウロニューモニエ、アクチノバチルス・サクシノゲネス、アクチノバチルス・スイス、アクチノマイセス属、シクリフィルス・デニトリフィカンス、アミノモナス・パウシボランス、バチルス・セレウス、バチルス・スミシ、バチルス・チューリングゲンシス、バクテロイデス属、ブラストピレルラ・マリーナ、ブラディリゾビウム属、ブレバチルス・ラテロスポラス、カンピロバクター・コリ、カンピロバクター・ジェジュニ (C j C a s 9)、カンピロバクター・ラリ、カンジダトウス・ブニセイスピリウム、クロストリジウム・セルロリティカム、クロストリジウム・パーFRINGENS、コリネバクテリウム・アコレンス、コリネバクテリウム・ジフテリア、コリネバクテリウム・マトルコティ、ディノロセオバクター・シバエ、ユーバクテリウム・ドリウム、ガンマ・プロテオバクテリア、グルコンアセトバクター・ジアゾトロフィカス、ヘモフィルス・パラインフルエンザ、ヘモフィルス・スプトラム、ヘリコバクター・カナデシス、ヘリコバクター・シナエディ、ヘリコバクター・ムステラ、イリオバクター・ポリトロパス、キングラ・キング、ラクトバチルス・クリスパタス、リステリア・イバノヴィ、リステリア・モノサイトゲネス、リステリア科細菌、メチロシステス属、メチロシナス・トリコスポリウム、モビルンカス・ムリエリス、ナイセリア・バシリフォルミス、ナイセリア・シネレア、ナイセリア・フラベセンス、ナイセリア・ラクタミカ、ナイセリア・メニンジティディス、ナイセリア属、ナイセリア・ワズワース、ニトロソモナス属、パルビバクルム・ラヴァメンティボランス、パスツレラ・ムルトシダ、ファスコラルクトバクテリウム・サクシナトウテンス、ラルストニア・シジギ、ロドシュードモナス・パルストリス、ロドブルム属、シモンシエラ・ムエレリ、スフィンゴモナス属、スポロラクトバチルス・ヴィネア、スタフィロコッカス・ルグドゥネンシス、ストレプトコッカス属、サブドリグラヌラム属、ティストレラ・モビリス、トレポネーマ属、又はフェルミネフォロバクター・エイセニアエのもの、又はそれらから由来するものを含む。一部の実施形態では、そのようなC a s 9ヌクレアーゼの触媒的に損なわれた、又は部分的に損なわれたバリエーションが使用され得る。追加の適切なC a s 9ヌクレアーゼ、及びヌクレアーゼバリエーションは、本開示に基づいて当業者に明らかであろう。本開示は、この点において限定されない。

【0086】

一部の実施形態では、C a sヌクレアーゼは天然C a s分子である。一部の実施形態では、C a sヌクレアーゼは、例えば、参照配列、例えば、最も類似した天然のC a s 9分子、又はP C T公開WO 2015 / 157070の表50の配列と、少なくとも一つのアミノ酸残基だけ異なる、操作された、変化された、又は改変されたC a s分子であり、それは、参照によりその全体において本明細書中に組み入れられる。

【0087】

一部の実施形態では、C a sヌクレアーゼのクラス2タイプVに属するC a sヌクレアーゼが使用される。クラス2タイプV C a sヌクレアーゼは、タイプV-A、タイプV-B、タイプV-C、及びタイプV-Uとしてさらに分類することができる。例えば、S t e l l a e t a l . N a t u r e S t r u c t u r a l & M o l e c u l a r B i o l o g y (2017)を参照のこと。一部の実施形態では、C a sヌクレアー

ぜは、タイプV-B Cas エンドヌクレアーゼ、例えばC2c1などである。例えば、Shmakov et al. Mol Cell (2015) 60:385-397を参照のこと。一部の実施形態では、本明細書中で提供されるゲノム編集の方法において使用されるCasヌクレアーゼは、タイプV-A Cas エンドヌクレアーゼ、例えばCpf1 (Cas12a) ヌクレアーゼなどである。例えば、Strohkendler et al. Mol. Cell (2018) 71:1-9を参照のこと。一部の実施形態では、本明細書中で提供されるゲノム編集の方法において使用されるCasヌクレアーゼは、プレボテラ属又はフランシセラ属、アシダミノコッカス属 (AsCpf1)、ラクノスピラ科細菌 (LpCpf1)、あるいはユウバクテリウム・レクターレから由来するCpf1ヌクレアーゼである。一部の実施形態では、CasヌクレアーゼはMAD7である。

10

【0088】

CRISPR/Casヌクレアーゼの天然バリエーション及び改変バリエーションの両方が、本開示の態様に従った使用のために適切である。例えば、dCas又はニックアーゼバリエーション、変化したPAM特異性を有するCasバリエーション、及び改善されたヌクレアーゼ活性を有するCasバリエーションは、本開示の一部の実施形態により包含される。

【0089】

一部の例示的な、非限定的な適切なCasヌクレアーゼの一部の特徴は、任意の特定の理論により拘束されることを望まないが、本明細書中により詳細に記載されている。

【0090】

天然Cas9ヌクレアーゼは、典型的には、二つのローブ：認識 (REC) ローブ及びヌクレアーゼ (NUC) ローブを含み；それらの各々が、例えば、PCT公開WO2015/157070において、例えば、その中の図9A~9B中に記載されているドメインをさらに含む（この出願は、参照によりその全体において本明細書中に組み入れられる）。

20

【0091】

RECローブは、アルギニンリッチブリッジヘリックス (BH)、REC1ドメイン、及びREC2ドメインを含む。RECローブは、Cas9特異的な機能ドメインであると思われる。BHドメインは、長いアルファヘリックス及びアルギニンリッチ領域であり、S. ピオゲネスCas9の配列のアミノ酸60~93を含む。REC1ドメインは、リピート：抗リピート二本鎖、例えば、gRNA又はtracrRNAの認識において含まれる。REC1ドメインは、S. ピオゲネスCas9の配列のアミノ酸94~179及び308~717に二つのREC1モチーフを含む。これら二つのREC1ドメインは、線形一次構造中のREC2ドメインにより分離されているが、三次構造中で組み立てられて、REC1ドメインを形成する。REC2ドメイン、又はその一部はまた、リピートの認識において役割を果たし得る：抗リピート二重鎖。REC2ドメインは、S. ピオゲネスCas9の配列のアミノ酸180~307を含む。

30

【0092】

NUCローブは、RuvCドメイン（また、本明細書中でRuvC様ドメインとして言及される）、HNHドメイン（また、本明細書中でHNH様ドメインとして言及される）、及びPAM相互作用 (PI) ドメインを含む。RuvCドメインは、レトロウイルスインテグラーゼスーパーファミリーメンバーと構造的類似性を共有し、単一鎖、例えば、標的核酸分子の非相補鎖を切断する。RuvCドメインは、S. ピオゲネスCas9の配列のそれぞれアミノ酸1~59、718~769、及び909~1098で、三つの分割されたRuvCモチーフ (RuvC I、RuvC II、及びRuvC III、それらは、しばしば、当技術分野においてRuvC Iドメイン、又はN末端RuvCドメイン、RuvC IIドメイン、及びRuvC IIIドメインとして一般に言及される) から構築される。REC1ドメインと同様に、三つのRuvCモチーフが、一次構造中の他のドメインにより直線的に分離されるが、しかし、三次構造中では、三つのRuvCモチーフが、RuvCドメインを構築及び形成する。HNHドメインは、HNHエンドヌクレアーゼと構造的類似性を共有し、単一鎖、例えば、標的核酸分子の相補鎖を切断する。HNHドメイ

40

50

ンは、RuvC II-IIIモチーフの間に存在し、S. ピオゲネスCas9の配列のアミノ酸775～908を含む。PIドメインは、標的核酸分子のPAMと相互作用し、S. ピオゲネスCas9の配列のアミノ酸1099～1368を含む。

【0093】

結晶構造が、天然の細菌Cas9ヌクレアーゼ（例、Jinek et al., Science, 343 (6176) : 1247997, 2014を参照のこと）について、及びガイドRNAを伴うS. ピオゲネスCas9（例、crRNA及びtracrRNAの合成融合体）（Nishimasu et al., Cell, 156 : 935-949, 2014；及びAnders et al., Nature, 2014, doi : 10.1038/nature13579）について決定されている。

10

【0094】

一部の実施形態では、本明細書中に記載されるCas9分子は、標的部位中での又はそれと直接近位での二本鎖DNA切断の導入をもたらすヌクレアーゼ活性を示す。一部の実施形態では、Cas9分子は、エンドヌクレアーゼの触媒残基の一つを不活化するように改変されている。一部の実施形態では、Cas9分子は、ニッカーゼであり、一本鎖切断を産生する。例えば、Dabrowska et al. Frontiers in Neuroscience (2018) 12 (75) を参照のこと。酵素のRuvC及びHNH触媒ドメインにおける1以上の変異が、Cas9効率を改善し得ることが示されている。例えば、Sarai et al. Currently Pharma. Biotechnology. (2017) 18 (13) を参照のこと。一部の実施形態では、Cas9分子は、第二のドメイン、例えば、DNA又はクロマチンを修飾するドメイン、例えば、デアミナーゼ又はデメチラーゼドメインに融合される。一部のそのような実施形態では、Cas9分子は、そのエンドヌクレアーゼ活性を排除するように改変される。

20

【0095】

一部の実施形態では、本明細書中に記載されるCasヌクレアーゼ又はCas/gRNA複合体は、相同性指向性修復（HDR）のためのテンプレートと一緒に投与される。一部の実施形態では、本明細書中に記載されるCasヌクレアーゼ又はCas/gRNA複合体は、HDRテンプレートを伴うことなく投与される。

【0096】

一部の実施形態では、酵素の特異性を増強する（例、オフターゲット効果を低下させ、強固なオンターゲット切断を維持する）ように改変されるCas9ヌクレアーゼが使用される。一部の実施形態では、Cas9分子は、増強された特異性Cas9バリエーション（例、eSPCas9）である。例えば、Slaymaker et al. Science (2016) 351 (6268) : 84-88を参照のこと。一部の実施形態では、Cas9分子は、高忠実度Cas9バリエーション（例、SpCas9-HF1）である。例えば、Kleinstiver et al. Nature (2016) 529 : 490-495を参照のこと。

30

【0097】

様々なCasヌクレアーゼが当技術分野において公知であり、様々な供給源から得られ得る、ならびに／あるいは酵素の1以上の活性又は特異性を調節するように操作／改変され得る。適切なCasヌクレアーゼ、例えば、適切なCas9ヌクレアーゼ、例えば、spCas9及びsaCas9などのPAM配列の優先度及び特異性が、当技術分野において公知である。一部の実施形態では、Casヌクレアーゼは、1以上のPAM配列を認識するように操作／改変されている。一部の実施形態では、Casヌクレアーゼは、Casヌクレアーゼが操作／改変を伴うことなく認識するPAM配列とは異なる1以上のPAM配列を認識するように操作／改変されている。一部の実施形態では、Casヌクレアーゼは、酵素のオフターゲット活性を低下させるように操作／改変されている。

40

【0098】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼ活性の特異性を変化させる（例、オフターゲット切断を低下させ、細胞中のエンドヌクレアーゼ活性又は寿命を減少させ、相同性指向

50

性組換えを増加させ、非相同末端結合を低下させる) ためにさらに改変される Cas ヌクレアーゼが使用される。例えば、Komor et al. Cell (2017) 168 : 20-36 を参照のこと。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼの PAM 認識又は優先度を変化させるように改変される Cas ヌクレアーゼが使用される。例えば、SpCas9 は、PAM 配列 NGG を認識するのに対し、1 以上の改変 (例、VQR SpCas9、EQR SpCas9、VRR SpCas9) を含む SpCas9 の一部のバリエーションは、バリエーション PAM 配列、例えば、NGA、NGAG、及び/又は NGCG を認識し得る。別の例として、SaCas9 は PAM 配列 NNGRRT を認識するのに対し、1 以上の改変 (例、KKH SaCas9) を含む SaCas9 の一部のバリエーションは、PAM 配列 NNRT を認識し得る。別の例では、FnCas9 は PAM 配列 NNG を認識するのに対し、1 以上の改変 (例、RHA FnCas9) を含む FnCas9 のバリエーションは、PAM 配列 YG を認識し得る。別の例では、置換変異 S542R 及び K607R を含む Cas12a ヌクレアーゼは、PAM 配列 TYCV を認識する。別の例では、置換変異 S542R、K607R、及び N552R を含む Cpf1 エンドヌクレアーゼは、PAM 配列 TATV を認識する。例えば、Gao et al. Nat. Biotechnol. (2017) 35 (8) : 789-792 を参照のこと。

10

【0099】

一部の実施形態では、塩基エディタを使用して、CD34 の発現の喪失、又は免疫療法により標的化されない CD34 バリエーションの発現をもたらすゲノム改変が作製される。塩基エディタは、典型的には、機能的ドメイン、例えば、デアミナーゼドメインに融合された、触媒的に不活性又は部分的に不活性な Cas ヌクレアーゼを含む。例えば、Eid et al. Biochem. J. (2018) 475 (11) : 1955-1964 ; Rees et al. Nature Reviews Genetics (2018) 19 : 770-788 を参照のこと。一部の実施形態では、触媒的に不活性な Cas ヌクレアーゼは、「dead Cas」又は「dCas」として言及される。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼは、アデニン塩基エディタ (ABE)、例えば、RNA アデニンデアミナーゼ TadA から進化した ABE に融合された dCas を含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼは、シチジンデアミナーゼ酵素 (例、APOBEC デアミナーゼ、pmCDA1、活性化誘導性シチジンデアミナーゼ (AID)) に融合された dCas を含む。一部の実施形態では、触媒的に不活性な Cas 分子は、低下活性を有し、例えば、ニックアーゼである。

20

30

【0100】

適切な塩基編集の例は、限定されないが、BE1、BE2、BE3、HF-BE3、BE4、BE4max、BE4-Gam、YE1-BE3、EE-BE3、YE2-BE3、YEE-CE3、VQR-BE3、VRR-BE3、SaBE3、SaBE4、SaBE4-Gam、Sa (KKH) -BE3、標的 AID、標的 AID-NG、xBE3、eA3A-BE3、BE-PLUS、TAM、CRISPR-X、ABE7.9、ABE7.10、ABE7.10*、xBE、ABESa、VQR-ABE、VRR-ABE、Sa (KKH) -ABE、及び CRISPR-SKIP を含む。塩基編集の追加の例は、例えば、米国公開第 2018/0312825 A1 号、米国公開第 2018/0312828 A1 号、及び PCT 公開 WO2018/165629 A1 において見出すことができ、それらは参照によりそれらの全体において本明細書中に組み入れられる。

40

【0101】

本開示の一部の態様は、CD34 の発現の喪失をもたらす細胞のゲノム中での改変、又は CD34 を標的化する免疫療法剤により認識されない CD34 のバリエーション形態の発現をもたらすために、例えば、本明細書中で提供される RNA ガイドヌクレアーゼを、細胞のゲノム中の適切な標的部位に標的化するために適切であるガイド RNA を提供する。

【0102】

用語「ガイド RNA」及び「gRNA」は、本明細書中では互換的に使用され、RNA ガイドヌクレアーゼにより結合され、標的核酸、例えば、細胞のゲノム内の標的部位への

50

RNAガイドヌクレアーゼの特異的な標的化又はホーミングを促進する核酸、典型的にはRNAを指す。gRNAは、典型的には、少なくとも二つのドメイン：時折、RNAガイドヌクレアーゼへの結合を媒介する「gRNA足場」又は「gRNA骨格」としても言及される「結合ドメイン」、及び標的部位へのgRNA結合RNAガイドヌクレアーゼの標的化を媒介する「標的化ドメイン」を含む。一部のgRNAは、追加のドメイン、例えば、相補性ドメイン、又はステムループドメインを含む。天然のgRNA結合ドメイン及びその操作されたバリエーションの構造及び配列は、当業者に周知である。一部の適切なgRNAは、単分子であり、単一の核酸配列を含む一方で、他の適切なgRNAは二つの配列（例、crRNA及びtracrRNA配列）を含む。

【0103】

一部の例示的な、適切なCas9 gRNA足場配列が本明細書中に提供されており、追加の適切なgRNA足場配列は、本開示に基づいて当業者に明らかであろう。そのような追加の適切な足場配列は、限定されないが、Jinek、et al. Science (2012) 337 (6096) : 816-821、Ran、et al. Nature Protocols (2013) 8 : 2281-2308、PCT公開WO2014/093694、及びPCT公開WO2013/176772において列挙されるものを含む。

【0104】

例えば、天然のspCas9 gRNAの結合ドメインは、典型的には、二つのRNA分子、crRNA（部分的な）及びtracrRNAを含む。crRNA配列及びtracrRNA配列の両方を含む単一RNA分子のみを含むspCas9 gRNAのバリエーションは、例えば、テトラループを介して、又はクリック化学タイプの共有結合を介して、互いに共有結合され、操作され、一般に「単一ガイドRNA」又は「sgRNA」として言及される。他のCasヌクレアーゼとの、例えば、Cas12aヌクレアーゼとの使用のための適切なgRNAは、典型的には、単一のRNA分子のみを含む。なぜなら、天然のCas12aガイドRNAは、単一のRNA分子を含むためである。適切なgRNAは、このように、単分子（単一RNA分子を有する）であってもよく、時折、本明細書中でsgRNA、又はモジュラー（一つ以上の、及び典型的には二つの別々のRNA分子を含む）として言及される。

【0105】

CD34遺伝子中の標的部位を標的化するために適切なgRNAは、多数のドメインを含み得る。一部の実施形態では、例えば、Cas9ヌクレアーゼが使用される一部の実施形態では、一分子sgRNAは、5'から3'まで以下を含み得る：

CD34遺伝子中の標的部位配列に対応する標的化ドメイン；

第一の相補性ドメイン；

連結ドメイン；

第二の相補性ドメイン（それは、第一の相補性ドメインに対して相補的である）；

近位ドメイン；及び

場合により、テールドメイン。

【0106】

これらのドメインの各々が、ここでより詳細に記載される。

【0107】

本明細書中で提供されるgRNAは、典型的には、細胞のゲノム中の標的部位に結合する標的化ドメインを含む。標的部位は、典型的には、PAM配列ならびに、PAM配列と同一の鎖上に、及びそれと直接的に隣接して標的ドメインを含む二本鎖DNA配列である。gRNAの標的化ドメインは、典型的には、標的ドメイン配列に対応するRNA配列を含み、それにおいて、それは、標的ドメインの配列に似ており、時折、1以上のミスマッチを伴うが、しかし、典型的にはDNA配列の代わりにRNAを含む。gRNAの標的化ドメインは、このように、標的ドメインの配列に対して相補的である二本鎖標的部位の配列と塩基対形成（完全又は部分的な相補性）し、このように、PAM配列を含む鎖に対し

て相補的な鎖を伴う。gRNAの標的化ドメインは、典型的には、PAM配列を含まないことが理解されよう。PAMの位置は、用いられるヌクレアーゼに依存して、標的ドメイン配列の5'又は3'であり得ることがさらに理解されよう。例えば、PAMは、典型的には、Cas9ヌクレアーゼについての標的ドメイン配列の3'、及びCas12aヌクレアーゼについての標的ドメイン配列の5'である。PAMの位置及び標的部位に結合するgRNAの機構の例証については、例えば、Vanegas et al., *Fungal Biol Biotechnol* 2019; 6: 6の図1を参照のこと。それは、参照により本明細書中に組み入れられる。RNAガイドヌクレアーゼを標的部位に標的化するgRNAの機構の追加の例証及び説明については、Fu Y et al., *Nat Biotechnol* 2014 (doi:10.1038/nbt.2808) 及びSternberg SH et al., *Nature* 2014 (doi:10.1038/nature13011) を参照のこと。両方が、参照により本明細書中に組み入れられる。

【 0 1 0 8 】

標的化ドメインは、標的ドメインの配列、即ち、PAM配列に直接的に隣接するDNA配列（例、Cas9ヌクレアーゼについてのPAM配列の5'、又はCas12aヌクレアーゼについてのPAM配列の3'）に対応するヌクレオチド配列を含み得る。標的化ドメイン配列は、典型的には、17～30の間のヌクレオチドを含み、標的ドメイン配列と完全に対応する（即ち、任意のミスマッチヌクレオチドを伴わない）、あるいは1以上の、しかし、典型的には4を上回らないミスマッチを含み得る。標的化ドメインは、RNA分子、gRNAの一部であるため、それは典型的にはリボヌクレオチドを含む一方で、DNA標的化ドメインは、デオキシリボヌクレオチドを含む。

【 0 1 0 9 】

22ヌクレオチド標的ドメイン、及びNGG PAM配列を含むCas9標的部位の、
ならびに標的ドメインに完全に対応する標的化ドメインを含むgRNA（及び、このよう
に、標的ドメイン及びPAMを含む鎖に相補的なDNA鎖と完全な相補性を伴う塩基対）
の例示的な例証が、以下に提供されている。上から下に、左から右に、配列は配列番号2
4～26に対応する：

【化 1】

[標的ドメイン] [PAM]

5' -N-G-G-3' (DNA)

3' -N-C-C-5' (DNA)

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

5' -N-[gRNA 足場] -3' (RNA)

[標的化ドメイン] [結合ドメイン]

【 0 1 1 0 】

22ヌクレオチド標的ドメイン、及びTTN PAM配列を含むCas12a標的部位の、ならびに標的ドメインに完全に対応する標的化ドメインを含むgRNA（このように、標的ドメイン及びPAMを含む鎖に相補的なDNA鎖と完全な相補性を伴う塩基対）の例示的な例証が、以下に提供されている。上から下に、左から右に、配列は配列番号27、28、及び26に対応する：

50

メインを含み、5'から3'方向において、5'サブドメイン、中央サブドメイン、及び3'サブドメインである。一部の実施形態では、5'サブドメインは、4～9、例えば、4、5、6、7、8、又は9ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、中央サブドメインは、1、2、又は3であり、例えば、1ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、3'サブドメインは、3～25、例えば、4～22、4～18、もしくは4～10、又は3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、もしくは25ヌクレオチド長である。第一の相補性ドメインは、天然の第一の相補性ドメインと相同性を共有することができ、又はそれから由来することができる。一実施形態では、それは、S. ピオゲネス、S. アウレウス、又はS. サーモフィラス、第一の相補性ドメインと少なくとも50%の相同性を有する。

10

【0114】

上記のドメインの配列及び配置は、PCT公開WO2015/157070においてより詳細に記載されており、その中のp. 88～112を含めて、参照によりその全体において本明細書中に組み入れられる。

【0115】

連結ドメインは、第一の相補性ドメインを、一分子gRNAの第二の相補性ドメインと連結する役割を果たし得る。連結ドメインは、第一及び第二の相補性ドメインを、共有結合的に又は非共有結合的に連結することができる。一部の実施形態では、連結は共有結合的である。一部の実施形態では、連結ドメインは、第一の相補性ドメインと第二の相補性ドメインの間に挿入された共有結合である、又はそれを含む。一部の実施形態では、連結ドメインは、1以上、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、連結ドメインは、少なくとも一つの非ヌクレオチド結合を含み、例えば、PCT公開WO2018/126176において開示されるとおりであり、その全内容が参照により本明細書中に組み入れられる。

20

【0116】

一部の実施形態では、第二の相補性ドメインは、少なくとも部分的に、第一の相補性ドメインと相補的であり、一実施形態では、少なくとも一部の生理学的条件下で、第二の相補性ドメインと十分な相補性を有し、二本鎖領域を形成する。一部の実施形態では、第二の相補性ドメインは、第一の相補性ドメインとの相補性を欠く配列、例えば、二本鎖領域からループアウトする配列を含み得る。一部の実施形態では、第二の相補性ドメインは、5～27ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、第二の相補性ドメインは、第一の相補性領域よりも長い。一実施形態では、相補性ドメインは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、第二の相補性ドメインは、3つのサブドメインを含み、それらは、5'から3'方向において、5'サブドメイン、中央サブドメイン、及び3'サブドメインである。一部の実施形態では、5'サブドメインは、3～25、例えば、4～22、4～18、もしくは4～10、又は3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、もしくは25ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、中央サブドメインは、1、2、3、4、又は5、例えば、3ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、3'サブドメインは、4～9、例えば、4、5、6、7、8、又は9ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、第一の相補性ドメインの5'サブドメイン及び3'サブドメインは、それぞれ、例えば、第二の相補性ドメインの3'サブドメイン及び5'サブドメインと、相補的、例えば、完全に相補的である。

30

40

【0117】

一部の実施形態では、近位ドメインは、5～20ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、近位ドメインは、天然の近位ドメインと相同性を共有することができる、又はそれから由来することができる。一実施形態では、それは、S. ピオゲネス、S. アウレウス、又はS. サーモフィルスからの近位ドメインと少なくとも50%の相同性を有する。

【0118】

50

広範囲のテールドメインは、gRNAにおける使用のために適切である。一部の実施形態では、テールドメインは、0（非存在）、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、テールドメインヌクレオチドは、天然のテールドメインの5'末端からの配列からである、又はそれと相同性を共有する。一部の実施形態では、テールドメインは、互いに相補的であり、少なくとも一部の生理学的条件下で、二本鎖領域を形成する配列を含む。一部の実施形態では、テールドメインは存在しない、又は1～50ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、テールドメインは、天然の近位テールドメインと相同性を共有することができる、又はそれから由来することができる。一部の実施形態では、テールドメインは、S.ピオゲネス、S.アウレウス、又はS.サーモフィラスからのテールドメインと少なくとも50%の相同性／同一性を有する。一部の実施形態では、テールドメインは、3'末端に、in vitro又はin vivo転写の方法に関連するヌクレオチドを含む。

10

【0119】

一部の実施形態では、本明細書中で提供されるgRNAは、以下を含む：

例えば、5'から3'に以下を含む第一の鎖：

標的化ドメイン（それは、CD34遺伝子中の標的ドメインに対応する）；及び

第一の相補性ドメイン；及び

例えば、5'から3'に以下を含む第二の鎖：

場合により、5'伸長ドメイン；

第二の相補性ドメイン；

近位ドメイン；及び

場合により、テールドメイン。

20

【0120】

一部の実施形態では、本明細書中で提供されるgRNAのいずれかは、化学的に修飾された1以上のヌクレオチドを含む。gRNAの化学修飾は以前に記載されており、適切な化学修飾は、gRNA機能のために有益であり、所与のgRNAの任意の望ましくない特徴、例えば、オフターゲット効果を計測可能に増加させない任意の修飾を含む。適切な化学修飾は、例えば、エンド又はエキソヌクレアーゼ触媒活性に対して感受性の低いgRNAを作製するものであり、限定されないが、ホスホロチオエート骨格修飾、2'-O-Me修飾（例、3'末端及び5'末端の一方又は両方）、2'-F修飾、二環式ヌクレオチド-cEtでのリボース糖の置換、3'チオPACE（MSP）修飾、又はそれらの任意の組み合わせを含む。追加の適切なgRNA改変が、本開示に基づいて当業者に明らかであり、そのような適切なgRNA改変は、限定されないが、例えば、Rahdar et al., PNAS (2015) 112 (51) E7110-E7117及びHendel et al., Nat Biotechnol. (2015) ; 33 (9) : 985-989において記載されるものを含み、それらの各々が、参照によりその全体において本明細書中に組み入れられる。

30

【0121】

例えば、本明細書中で提供されるgRNAは、1以上の2'-O修飾ヌクレオチド、例えば、2'-O-メチルヌクレオチドを含んでもよい。一部の実施形態では、gRNAは、2'-O修飾ヌクレオチド、例えば、2'-O-メチルヌクレオチドを、gRNAの5'末端を含む。一部の実施形態では、gRNAは、2'-O修飾ヌクレオチド、例えば、2'-O-メチルヌクレオチドを、gRNAの3'末端を含む。一部の実施形態では、gRNAは、2'-O修飾ヌクレオチド、例えば、2'-O-メチルヌクレオチドを、gRNAの5'及び3'末端の両方に含む。一部の実施形態では、gRNAは、2'-O修飾され、例えば、gRNAの5'末端のヌクレオチド、gRNAの5'末端からの第二のヌクレオチド、及びgRNAの5'末端からの第三のヌクレオチドで2'-O-メチル修飾される。一部の実施形態では、gRNAは、2'-O修飾され、例えば、gRNAの3'末端のヌクレオチド、gRNAの3'末端からの第二のヌクレオチド、及びgRNAの3'末端からの第三のヌクレオチドで2'-O-メチル修飾される。一部の実施形態では、gRNA

40

50

Aは、2'-O-修飾され、例えば、gRNAの5'末端のヌクレオチド、gRNAの5'末端からの第二のヌクレオチド、gRNAの5'末端からの第三のヌクレオチド、gRNAの3'末端のヌクレオチド、gRNAの3'末端からの第二のヌクレオチド、及びgRNAの3'末端からの第三のヌクレオチドで2'-O-メチル修飾される。一部の実施形態では、gRNAは、2'-O-修飾され、例えば、gRNAの3'末端からの第二のヌクレオチド、gRNAの3'末端からの第三のヌクレオチド、及びgRNAの3'末端からの第四のヌクレオチドで2'-O-メチル修飾される。一部の実施形態では、gRNAの3'末端のヌクレオチドは、化学的に修飾されていない。一部の実施形態では、gRNAの3'末端のヌクレオチドは、化学的に修飾された糖を有さない。一部の実施形態では、gRNAは、2'-O-修飾され、例えば、gRNAの5'末端のヌクレオチド、gRNAの5'末端からの第二のヌクレオチド、gRNAの5'末端からの第三のヌクレオチド、gRNAの3'末端からの第二のヌクレオチド、gRNAの3'末端からの第三のヌクレオチド、及びgRNAの3'末端からの第四のヌクレオチドで2'-O-メチル修飾される。一部の実施形態では、2'-O-メチルヌクレオチドは、隣接ヌクレオチドへのリン酸連結を含む。一部の実施形態では、2'-O-メチルヌクレオチドは、隣接ヌクレオチドへのホスホロチオエート連結を含む。一部の実施形態では、2'-O-メチルヌクレオチドは、隣接ヌクレオチドへのチオPACE連結を含む。

【0122】

一部の実施形態では、本明細書中で提供されるgRNAは、1以上の2'-O-修飾ヌクレオチド及び3'リン修飾ヌクレオチド、例えば、2'-O-メチル3'ホスホロチオエートヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、gRNAは、2'-O-修飾及び3'リン修飾、例えば、2'-O-メチル3'ホスホロチオエートヌクレオチドを、gRNAの5'末端を含む。一部の実施形態では、gRNAは、2'-O-修飾及び3'リン修飾、例えば、2'-O-メチル3'ホスホロチオエートヌクレオチドを、gRNAの3'末端を含む。一部の実施形態では、gRNAは、2'-O-修飾及び3'リン修飾、例えば、2'-O-メチル3'ホスホロチオエートヌクレオチドを、gRNAの5'末端及び3'末端を含む。一部の実施形態では、gRNAは、1以上の非架橋酸素原子が、硫黄原子で置換された骨格を含む。一部の実施形態では、gRNAは、2'-O-修飾及び3'リン修飾され、例えば、gRNAの5'末端のヌクレオチド、gRNAの5'末端からの第二のヌクレオチド、及びgRNAの5'末端からの第三のヌクレオチドで、2'-O-メチル3'ホスホロチオエート修飾される。一部の実施形態では、gRNAは、2'-O-修飾及び3'リン修飾され、例えば、gRNAの3'末端のヌクレオチド、gRNAの3'末端からの第二のヌクレオチド、及びgRNAの3'末端からの第三のヌクレオチドで、2'-O-メチル3'ホスホロチオエート修飾される。一部の実施形態では、gRNAは、2'-O-修飾及び3'リン修飾され、例えば、gRNAの5'末端のヌクレオチド、gRNAの5'末端からの第二のヌクレオチド、gRNAの5'末端からの第三のヌクレオチド、gRNAの3'末端のヌクレオチド、gRNAの3'末端からの第二のヌクレオチド、及びgRNAの3'末端からの第三のヌクレオチドで、2'-O-メチル3'ホスホロチオエート修飾される。一部の実施形態では、gRNAは、2'-O-修飾及び3'リン修飾され、例えば、gRNAの3'末端からの第二のヌクレオチド、gRNAの3'末端からの第三のヌクレオチド、及びgRNAの3'末端からの第四のヌクレオチドで、2'-O-メチル3'ホスホロチオエート修飾される。一部の実施形態では、gRNAの3'末端のヌクレオチドは、化学的に修飾されていない。一部の実施形態では、gRNAの3'末端のヌクレオチドは、化学的に修飾された糖を有さない。一部の実施形態では、gRNAは、2'-O-修飾及び3'リン修飾され、例えば、gRNAの5'末端のヌクレオチド、gRNAの5'末端からの第二のヌクレオチド、gRNAの5'末端からの第三のヌクレオチド、gRNAの3'末端からの第二のヌクレオチド、gRNAの3'末端からの第三のヌクレオチド、及びgRNAの3'末端からの第四のヌクレオチドで、2'-O-メチル3'ホスホロチオエート修飾される。

【0123】

一部の実施形態では、本明細書中で提供される gRNA は、1 以上の 2'-O-修飾及び 3'リン修飾、例えば、2'-O-メチル 3'チオ PACE ヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、gRNA は、2'-O-修飾及び 3'リン修飾、例えば、2'-O-メチル 3'チオ PACE ヌクレオチドを、gRNA の 5'末端に含む。一部の実施形態では、gRNA は、2'-O-修飾及び 3'リン修飾、例えば、2'-O-メチル 3'チオ PACE ヌクレオチドを、gRNA の 3'末端に含む。一部の実施形態では、gRNA は、2'-O-修飾及び 3'リン修飾、例えば、2'-O-メチル 3'チオ PACE ヌクレオチドを、gRNA の 5'末端及び 3'末端に含む。一部の実施形態では、gRNA は、1 以上の非架橋酸素原子が硫黄原子で置換され、1 以上の非架橋酸素原子が酢酸基で置換された骨格を含む。一部の実施形態では、gRNA は、2'-O-修飾及び 3'リン修飾され、例えば、gRNA の 5'末端のヌクレオチド、gRNA の 5'末端からの第二のヌクレオチド、及び gRNA の 5'末端からの第三のヌクレオチドで、2'-O-メチル 3'チオ PACE 修飾される。一部の実施形態では、gRNA は、2'-O-修飾及び 3'リン修飾され、例えば、gRNA の 3'末端のヌクレオチド、gRNA の 3'末端からの第二のヌクレオチド、及び gRNA の 3'末端からの第三のヌクレオチドで、2'-O-メチル 3'チオ PACE 修飾される。一部の実施形態では、gRNA は、2'-O-修飾及び 3'リン修飾され、例えば、gRNA の 5'末端のヌクレオチド、gRNA の 5'末端からの第二のヌクレオチド、gRNA の 5'末端からの第三のヌクレオチド、gRNA の 3'末端のヌクレオチド、gRNA の 3'末端からの第二のヌクレオチド、及び gRNA の 3'末端からの第三のヌクレオチドで、2'-O-メチル 3'チオ PACE 修飾される。一部の実施形態では、gRNA は、2'-O-修飾及び 3'リン修飾され、例えば、gRNA の 3'末端からの第二のヌクレオチド、gRNA の 3'末端からの第三のヌクレオチド、及び gRNA の 3'末端からの第四のヌクレオチドで、2'-O-メチル 3'チオ PACE 修飾される。一部の実施形態では、gRNA の 3'末端のヌクレオチドは、化学的に修飾されていない。一部の実施形態では、gRNA の 3'末端のヌクレオチドは、化学的に修飾された糖を有さない。一部の実施形態では、gRNA は、2'-O-修飾及び 3'リン修飾され、例えば、gRNA の 5'末端のヌクレオチド、gRNA の 5'末端からの第二のヌクレオチド、gRNA の 5'末端からの第三のヌクレオチド、gRNA の 3'末端からの第二のヌクレオチド、3'末端からの第三のヌクレオチド、及び gRNA の 3'末端からの第四のヌクレオチドで、2'-O-メチル 3'チオ PACE 修飾される。

10

20

30

【0124】

一部の実施形態では、本明細書中で提供される gRNA は、化学的に修飾された骨格を含む。一部の実施形態では、gRNA は、ホスホロチオエート連結を含む。一部の実施形態では、1 以上の非架橋酸素原子は、硫黄原子で置換されている。一部の実施形態では、gRNA の 5'末端のヌクレオチド、gRNA の 5'末端からの第二のヌクレオチド、及び gRNA の 5'末端からの第三のヌクレオチドは、各々が、ホスホロチオエート連結を含む。一部の実施形態では、gRNA の 3'末端のヌクレオチド、gRNA の 3'末端からの第二のヌクレオチド、及び gRNA の 3'末端からの第三のヌクレオチドは、各々が、ホスホロチオエート連結を含む。一部の実施形態では、gRNA の 5'末端のヌクレオチド、gRNA の 5'末端からの第二のヌクレオチド、gRNA の 5'末端からの第三のヌクレオチド、gRNA の 3'末端のヌクレオチド、gRNA の 3'末端からの第二のヌクレオチド、及び gRNA の 3'末端からの第三のヌクレオチドは、各々が、ホスホロチオエート連結を含む。一部の実施形態では、gRNA の 3'末端からの第二のヌクレオチド、gRNA の 3'末端からの第三のヌクレオチド、及び gRNA の 3'末端からの第四のヌクレオチドは、各々が、ホスホロチオエート連結を含む。一部の実施形態では、gRNA の 5'末端のヌクレオチド、gRNA の 5'末端からの第二のヌクレオチド、5'末端からの第三のヌクレオチド、gRNA の 3'末端からの第二のヌクレオチド、gRNA の 3'末端からの第三のヌクレオチド、及び gRNA の 3'末端からの第四のヌクレオチドは、各々が、ホスホロチオエート連結を含む。

40

【0125】

50

一部の実施形態では、本明細書中で提供される gRNA は、チオPAC E 連結を含む。
一部の実施形態では、gRNA は、1 以上の非架橋酸素原子が硫黄原子で置換され、1 以上の非架橋酸素原子が酢酸基で置換された骨格を含む。一部の実施形態では、gRNA の 5' 末端のヌクレオチド、gRNA の 5' 末端からの第二のヌクレオチド、及び gRNA の 5' 末端からの第三のヌクレオチドは、各々が、チオPAC E 連結を含む。一部の実施形態では、gRNA の 3' 末端のヌクレオチド、gRNA の 3' 末端からの第二のヌクレオチド、及び gRNA の 3' 末端からの第三のヌクレオチドは、各々が、チオPAC E 連結を含む。一部の実施形態では、gRNA の 5' 末端のヌクレオチド、gRNA の 5' 末端からの第二のヌクレオチド、gRNA の 5' 末端からの第三のヌクレオチド、gRNA の 3' 末端のヌクレオチド、gRNA の 3' 末端からの第二のヌクレオチド、及び gRNA の 3' 末端からの第三のヌクレオチドは、各々が、チオPAC E 連結を含む。一部の実施形態では、gRNA の 3' 末端からの第二のヌクレオチド、gRNA の 3' 末端からの第三のヌクレオチド、及び gRNA の 3' 末端からの第四のヌクレオチドは、各々が、チオPAC E 連結を含む。一部の実施形態では、gRNA の 5' 末端のヌクレオチド、gRNA の 5' 末端からの第二のヌクレオチド、5' 末端からの第三のヌクレオチド、gRNA の 3' 末端からの第二のヌクレオチド、gRNA の 3' 末端からの第三のヌクレオチド、及び gRNA の 3' 末端からの第四のヌクレオチドは、各々が、チオPAC E 連結を含む。

【0126】

一部の実施形態では、本明細書中に記載される gRNA は、1 以上の 2'-O-メチル-3'-ホスホロチオエートヌクレオチド、例えば、少なくとも 1、2、3、4、5、又は 6 つの 2'-O-メチル-3'-ホスホロチオエートヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、本明細書中に記載される gRNA は、修飾ヌクレオチド（例、2'-O-メチル-3'-ホスホロチオエートヌクレオチド）を、三つの末端位置の 1 以上及び 5' 末端に、ならびに／あるいは三つの末端位置の 1 以上及び 3' 末端に含む。一部の実施形態では、gRNA は、例えば、PCT 公開番号 WO 2017/214460、WO 2016/089433、及び WO 2016/164356 において記載されるように、1 以上の修飾ヌクレオチドを含み得るが、それらは参照によりそれらの全体において組み入れられる。

【0127】

本明細書中で提供される CD34 標的化 gRNA は、適切な任意の様式において細胞に送達され得る。例えば、RNA ガイドヌクレアーゼに結合された gRNA を含む RNP を含む、CRISPR/Cas システムの送達のための様々な適切な方法が記載されており、例示的な、適切な方法は、限定されないが、細胞中への RNP のエレクトロポレーション、細胞中への Cas ヌクレアーゼをコードする mRNA 及び gRNA のエレクトロポレーション、様々なタンパク質又は核酸トランスフェクション方法、及びウイルスベクター、例えば、例えば、レトロウイルス（例、レンチウイルス）ベクターなどを介したコード RNA 又は DNA の送達を含む。任意の適切な送達方法が、本開示により包含され、本開示は、この点において限定されない。

【0128】

本開示は、RNA ガイドヌクレアーゼをヒト CD34 に標的化するために有用である、多数の CD34 標的部位及び対応する gRNA を提供する。以下の表 1 は、本明細書中に記載される gRNA により結合され得る、ヒト内因性 CD34 遺伝子中の好ましい標的ドメインを例証する。表 1 中に示されるヒト CD34 の例示的な標的配列は、一部の実施形態では、Cas9 ヌクレアーゼ、例えば、SpCas9 との使用のためである。
表 1. ヒト CD34 の例示的な Cas9 標的部位配列が、そのような部位を標的化するのに有用な例示的な gRNA 標的化ドメイン配列と同様に提供される。各標的部位について、第一の配列は、DNA 標的ドメイン配列を表し、第二の配列は、その逆補体を表し、第三の配列は、それぞれの標的部位を標的化するために使用することができる gRNA の例示的な標的化ドメイン配列を表す。

【表 1】

gRNA名	標的ドメイン配列
CD34-1	CAAAGCGCGGTCCAGCCCCG (配列番号 1) CGGGGCTGGACCGCGCTTTG (配列番号 6) CAAAGCGCGGUCCAGCCCCG (配列番号 11)
CD34-2	CAAACUCAGCAAGCAAAGCG (配列番号 2) CGCTTTGCTTGCTGAGTTTG (配列番号 7) CAAACUCAGCAAGCAAAGCG (配列番号 12)
CD34-3	GTGCAGGCTGGTACTTCCAA (配列番号 3) TTGGAAGTACCAGCCTGCAC (配列番号 8) GUGCAGGCUGGUACUCCAA (配列番号 13)
CD34-4	CATTGCCATGTTGAGACACA (配列番号 4) TGTGTCTCAACATGGCAATG (配列番号 9) CAUUGCCAUGUUGAGACACA (配列番号 14)
CD34-5	ATAAACTGAGGTTATCACAG (配列番号 5) CTGTGATAACCTCAGTTTAT (配列番号 10) AUAAACUGAGGUUAUCACAG (配列番号 15)

【0129】

本開示は、RNAガイドヌクレアーゼをヒトCD34に標的化するために有用である、例示的なCD34標的化gRNAを提供する。以下の表2は、Cas9ヌクレアーゼをヒト内因性CD34遺伝子に標的化するgRNAにおける使用のための好ましい標的化ドメインを例証する。表2中に示されるヒトCD34の例示的な標的配列は、一部の実施形態では、Cas9ヌクレアーゼ、例えば、SpCas9との使用のためである。

表2．ヒトCD34に標的化されるgRNAの例示的なCas9標的化ドメイン配列が提供される。

10

20

30

40

50

【表 2】

gRNA名	標的ドメイン配列
CD34-1	CAAAGCGCGGUCCAGCCCCG (配列番号 11)
CD34-2	CAAACUCAGCAAGCAAAGCG (配列番号 12)
CD34-3	GUGCAGGCUGGUACUCCAA (配列番号 13)
CD34-4	CAUUGCCAUGUUGAGACACA (配列番号 14)
CD34-5	AUAAACUGAGGUUAUCACAG (配列番号 15)

【0130】

CD34の代表的なアミノ酸配列が、以下に示されるUniProtKB/Swiss-Prot登録番号P28906-2により提供される。

MLVRRGARAG PRMPRGWTAL CLLSLLPSGF MSLDNNGTAT PELPTQGTF
NVSTNVSQYE TTPSTLGST SLHPVSQHGN EATTNITETT VKFTSTSVIT
SVYGNTNSSV QSQTSVISTV FTTPANVSTP ETLKPSLSP GNVSDLSTTS
TSLATSPTKP YTSSSPILSD IKAEIKCSGI REVKLTQGIC LEQNKTS
SCAEFKKDRGEG LARVLCGEEQA DADAGAQVCS LLLAQSEVRP QCLLLVL
ANRTEISSKLQLM KKHQSDLKKL GILDFTEQDV ASHQSYSQKT LIALVT
SGALLAVLGITGYF LMNRRSWSPT GERLGEDPYY TENGSGGQGYSG
PGTSPGAQ GKASVNRGAQ ENG TGQATSR NGHSARQHVV ADTEL (配列番号16)

【0131】

CD34の代表的なDNA配列が、以下に示されるNCBI参照配列番号NM_001025109.2により提供される。

agtgtcttcc actcgggtgcg tctctctagg agccgcgcgg gaaggatgct ggtccgcagg
ggcgcgcgcg cagggcccag gatgccgcgg ggctggaccg cgctttgctt gctgagtttg
ctgccttctg gggtcatgag tcttgacaac aacggtagtg ctacccacaga gttacctacc
caggggaacat tttcaaagtgt ttctacaaat gtatcctacc aagaaactac aacacctagt
acccttgga gtagcagcct gcaccctgtg tctcaacatg gcaatgaggc cacaacaac
atcacagaaa cgacagtcaa attcacatct acctctgtga taacctcagt ttatggaaac
acaaactctt ctgtccagtc acagacctct gtaatcagca cagtgttcac caccacagcc
aacgtttcaa ctccagagac aaccttgaag cctagcctgt cacctggaaa tgtttcagac
ctttcaacca ctagcactag ccttgcaaca tctccacta aacctatac atcatcttct
cctatcctaa gtgacatcaa ggcagaaatc aaatgttcag gcatcagaga agtgaaattg
actcagggca tctgcctgga gcaaaataag acctccagct gtgcggaggt taagaaggac
aggggagagg gcctggcccg agtgctgtgt ggggaggagc aggctgatgc tgatgctggg
gccaggtat gctccctgct ccttgcccag tctgaggtga ggcctcagtg tctactgctg
gtcttgacca acagaacaga aatttccagc aaactccaac ttatgaaaaa gcaccaatct
gacctgaaaa agctgggggat cctagatttc actgagcaag atgttgcaag ccaccagagc
tattccaaa agacctgat tgcactggtc acctcgggag cctgtctggc tgtcttgggc
atcactggct atttctgat gaatcgccgc agctggagcc ccacaggaga aaggctgggc

gaagaccctt attacacgga aaacggtgga ggccagggct atagctcagg acctgggacc
tcccctgagg ctgagggaaa ggccagtgtg aaccgagggg ctgagggaaa cgggaccggc
caggccacct ccagaaacgg ccattcagca agacaacacg tgggtggctga taccgaattg
tgactcggct aggtggggca aggctgggca gtgtccgaga gagcaccctt ctctgcatct
gaccacgtgc taccctcatg ctggaggtga catctcttac gcccaccctt tcccactgc
acacacctca gaggtgttct ttggggccct acaccttgag gaggggcagg taaactctg
tcctttacac attcggctcc ctggagccag actctgggtct tctttgggta aacgtgtgac
gggggaaaagc caaggtcttg agaagctccc aggaacaatc gatggccttg cagcactcac
acaggacccc ctccccctac cccctcctct ctgccgcaat acaggaaccc ccaggggaaa
gatgagcttt tctaggctac aattttctcc caggaagctt tgatttttac cgtttcttcc
ctgtattttt tttctctact ttgaggaaac caaagtaacc ttttgacact gctctcttgt
aatgatatag ccagaaaaac gtgttgccct gaaccacttc cctcatctct cctccaagac
actgtggact tggtcaccag ctctccctt gttctctaag ttccactgag ctccatgtgc
cccctctacc atttgacagag tcctgcacag tttcttggtt ggagcctaga acaggcctcc
caagtttttag gacaaacagc tcagttctag tctctctggg gccacacaga aactcttttt
gggtctcttt tttctcctct ggatcaaagt aggcaggacc atgggaccag gtcttgagc
tgagcctctc acctgtactc ttccgaaaaa tcctcttctt ctgaggcttg atcctagcct
tatcctctga tctccatggc ttctcctcc ctctgccga ctctgggtt gagctgttgc
ctcagtcctc caacagatgc tttctgtct ctgcctcctt caccctgagc ccttctctg
ctctgcaccc ccatatggtc atagcccaga tcagctccta acccttatca ccagctgcct
cttctgtggg tgaccaggt cctgtttgc tgttgatttc tttccagagg ggttgagcag
ggatcctggt ttcaatgacg gttggaaata gaaatttcca gagaagagag tattgggtag
atatttttt tgaatacaaa gtgatgtgt taaatactgc aattaaagt atactgaaac
acatctgtta tgtgactctg tcttagctgg gtgtgtctgc atgcaagagt gacaccctcc
attagaccta gctagactgt gcagtgtgt ggtggggagg accagccagg gaagagggag
cacctcagca gacacaggca ccagccagga tgctaaggac ctttagccaa gtctgccaac
tattctctc catggggaga ggaaacatcc atttccagt gtagaaaggc agaccgaat
gtaccaggga gcttccaaat ggaggggtgt atgttgggtt cttaggagct gtacccttca
tgaacacctt tctgagaaga ggagcatgct gatcactgct gcaaaatatg caaaacaaag
ggaaggggca atgtcctgtg caccctttat tatcaggcca cccccctcc cagccccca
ggtcagagta gacacagtga aggactatgt ggggactgtt gttctagaga cctggcagcc
aactcaggga gggggctggt ttccaccctc aagattaaga cagcagccta attaaaaaa
aatctgttaa gcatgtacct cccccagct tccaaaacaa cccccaccc acccctacca
ggccatagga agttggggag ggagtgtgta ggagctccag gaaacactcc caagtgtgtc
gacagtggca gaggcagttg gggccaaaca aaggttgatt cttccattct tatctccata
aagccagacc tttcccttca gcactcctcc accccatct cttcttctt tttctccaac
tcctctaata ataggttctt ccctaggaca gaggggaggc gaaatgatga ggttcagagt
cttccctcaa aggcgatggc tgccttgagg gttggagcaa aggatgatga gcaaaagacg
atggtaatca gtagggaagt ccagccact tgcattctagt tgcacatctt gccttgagag
taatccagt aggtctgtc ccagctagga catcaagtag gaggggtggg ttccagggtt
agattcctag gaaatatggg aggagaggaa aaggcaactt ggatgcacct ccagcttcag
gcctagcaac ctgcaatgca tctcaccctg agtttgctgg aatgtgtatg tatgctttg
gaggaagggc tgtgtgtgta ttgcgggggtg ggggtggggca gctggttccc tctgacagct
ggacagcttg ccctgaagaa ttgcctgct ttctggaaaa atccaacttt cccaccgtgg
gcctgagcgt cctggtacag caatggcgcc acctgctggc ctattgagg tcctactgct
cagcctcagc tcaatgcct ccatgttggg cttctctccc tggctgccc accctctagt
ccaatttctc ttgtacacaa agctcatata actatagaac gtcactgttg aagagaactt
taaagataca tttaattaaa ctcccttatg gtatagttaa agacaaacta aggctcagag
aaggagggtg gcttgcccaa tcaccagaa ttccaaagtc ctgaatctgt agtttctct
tccatcata catctactc ttctgccgag tcctccgtgt tactccagtt ggatgtcatg

10

20

30

40

50

aagccagtgt ggcagtgtga agatagggtt gggacttcac ttctggagca ttcatcaac
ataagctatc ctaggccttg ccagccaagc aggtcctgga ggagccccag gacaaagatc
acaggaggcc atgagggttcg gcttcttcg cgcccacagt gagcccagga aaattagctg
taggggtatta cactgttgac tatggagagc atatctggaa ttatcttcag ccagattttc
atctgaatgg ataaatggga ataccatcta agtccagata aatagatcac ttccatctca
tcccttctag gtagattaat cccacacttc ctcttcacac aaaaccagta atagggtcatc
gattttgtgc aacaggatgc tgcttctctt cctaaagccc ccatcgaaga ggcttccagc
caccattcaa tcattcatca agtcttatga tgtgccagac actgcgcgaa atgtgccaga
acatctgtta tgtgccagac actgttcttg agactgggga tacagcaaac actcatgaag
cttataattc tagcagaaga ggacagtaaa caatgtcatc tcagtaagta tatacatgtg
ttttcaggat tgagagctat gaaaaacata aaatatattg agaataatgg ttggtatttt
acatatgggtg gttactttta gaaaaataac agtggagagc acagcttcac ttgaatgaag
tgagagaagca ggttgtatgc caagctggga gagattatcc cacacagggg aaaggacaag
tgcaaagccc tatgatgaaa agctgccaaag tgcagaaagc ctcatatggc aggggggcaag
atggccatga ggttgtgtca gtgagtgggg gtggggagag gcaggagggtc agactacatg
gggccttttt agttgtagat tgggaagcca ctggagggtt ttgagcagag aagtcatatc
atctgcttta tgttttaaaa ggatcatgct ggctgctgag tagagaatag aggttgaggg
ataagaaagt agaaggagac cgtagcaaga agaacgatca tggctgggag cagggtgatca
tattggcagt gatgagatca agcagaattc aaaaagtgggt ttcaaagtag aggtaacagg
acttgctcag tctatttatt tcttcaaata ataatcatat ttacaatgat agtagctaac
agtttttgag tgcttactgt atgaaaattg agatatgggtg ccaatattta aatagcatat
tttacttaac attcacagaa accctgtgaa gtaggttcta ttatctcaga aaaagaaact
gaaactcaga gaataacaag ggactgtgtt acgtgcacag tggcagaggc aaagatgaat
aggatgtgag tttatttgaa ccccaaattg ttaaatcttg gggataatac aacacacatt
taaacaaaga agcaagaaaa aaaatgcaca acagaaagtg agaaataaca cgaggaaaga
ctaatgaag tgctttgtat ctagatgtgg gcaggaccct ttccagctga gaagatctga
gactgggtca tgaacagggtg gtttctgagt gggtcctgta aaaatgaata cgattttgat
gatagtaatg agtaaggaca ttgagactg atagaagagt acatacaata tgtagtgatg
gggaaagata aggtactgtc aaaggacaat gtgttttctg gtatgacaga gaagtagaat
gtgttaaggg aagccgagta ccagaaagat ccgggtgtca cagtttgtgt aggggtgtta
aagctaaacc acagagtta atttatcca atagaagagg agccacagaa gagtttccat
ttattcatta atttattcat ttattcaaaa aatatttgag tgcttattat aagccaggta
ctatgccagg cacctgggat aagacatagt cccttctgtc aagtccttac attgggtgga
tgtggggaggg acagatgaca gaacaatatg cattgagtgt aagtgcctat gtataggaag
ctctgagtgg gaggggcatg gaagccgtgg aagaccatgg aaggcttccc aggagaagtg
acgtctggac tgatcctttg gtcaagcagg agttaagag gagaaaagga gagatatggg
tgttcccag agaggaagaa gccttgtccc aggagcaaag tgagggtgat tgttccagaa
atgtgagtga ttcttttaag gctcaagcaa agcatgtgat tcttctttat accttctatt
tctttgctga gtgtttctgt tcttttgtt caagcatgct gcaattgctc attaaagcat
gtttatgatg gctgtctgtt ttaaaattct tgtcagatgg ttcaacatc tttatcatct
caatgttggc atctgttaat ggttttttct caatcaaatt gagattttcc tggttcttgg
tattaccagt gattttaatt gcatctggaa atttgggatt tatgttgaaa gactggatct
tattgaaaga ttctgttttag caccctcct ttgataccac actggtgggt ccaggttccc
cattcagctg ttgacacctt cagggcagag aggtgggatg ggggtgaagg ggtacctcat
tattgctggc ccaggttaga agttcaggct tccagtaga tctctgctga taccacctg
gtgcatgtc attccttgag tccaaaagtc cctcccaatt ctgccttctt ctctctacat
atcgaggtct ccctatgtt gacttatata taatgtccag ggtttttaga gttagttaac
aggaggcata agaaaaagtg tgtccactcc atcttgtctg gaactggaag ttcaagtcga
atataagaga gaggagagga aattacaagc catgagactg gagagttagg caggttctac
accagctatt ctcaaagccc tcttactctc ttaaaaattt agaacttcaa agagcttttg

10

20

30

40

50

at tt t t g a a a g t t a c a t c t a t c a a t t a t t a c t g t t t c a a a a a t t a a a a a t t g a g a a a a t t t t
a t t t a t t a a t t g t t t t a a a a a t a a c a a t a a t t a t t c a a t t a c a t g a t a a t g t a a g t a a t g
c t t t t c t t a a t g a a a a a t a a t t a t a t t t t c c a a a c a a a a a a c a a t t a g g a a a a g a g t g t
c a t t g t t t t a g a c t t t g g t a a a t c t c t a t a t a t c t g g c t g a a g a g a a g a a t g c t g a t t c
t t t t t t t t t t t t t t t t t g a g a c g g a g t c t c g c t c t g t c a c c c a g g c t g g a g t g t a g
t g g t g t g a t c t c g g c t c a c t g c a a g c t c t g c c t c c g g g t t c a c g c c a t t c t c t g c c t c
a g c c t c c c a a g t a g c t g g g a c t a c a g g c a c c g c c a c c a c g c c g g c t a a t t t t t t t g t a
t t t t t a g t a g a g a t g g g g t t t c a c c g t g t t a g c c a g g c t g g t c t g a t c t c t g a c c t c a
t g a t c c a c c c a c c t c a g c c t c c c a a a g c g c t g g g a t t a c a g g t g t g a g a c a c c g c g c c c a
g c c c c c g a a t g c t g a t t c t t t a t c t g c t t c t g t a t t c a a t c t g t t g t g a t a t g a t g g g t
a g c c t c t g a a a c a c t c c a c t g t a t a c t t g t g a a g a a t g a a t g t g a a a a g g a a a t a g a
t t t g t a g t a t t a t t a t t c a a a t t g t t t t g a c c t c a g a g a c c a c t t g g a a a t g t t t t a g g g
a a c c c c c a g a g g a c c t t g g a t c a t g c t t t g a g a a c c g c g g c t c t a g a t a t g t t a c t a t t t
c a g t a g c a t c t a a g t a c a t g t g g c t g c t g a g c a c t t g t a a t g t g g c t a g t g c a a a t g a g a
g a c a g g a c t t c c a g c t a t a t g t a a t t t a a t a a a c t c a a t t a a a a a c t g g a a c c t c a t a
a a a t g t t t t g t t g t t g t t a a a c a t g a c c t t a t a g t t t t g g t a g g a a (配 列 番 号 1 7)
【 0 1 3 2 】

10

C D 3 4 のさらなる代表的なDNA配列は、以下に示されるNCBI参照配列番号NM
_ 0 0 1 7 7 3 . 3 により提供される。

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

20

30

40

50

cacctgctct cttgtaatga tatagccaga aaaacgtgtt gccttgaacc acttccctca
tctctcctcc aagacactgt ggacttggtc accagctcct cccttggttct ctaagttcca
ctgagctcca tgtgccccct ctaccatttg cagagtcctg cacagttttc tggctggagc
ctagaacagg cctcccaagt ttaggacaa acagctcagt tctagtctct ctggggccac
acagaaactc tttttgggct cctttttctc cctctggatc aaagtaggca ggaccatggg
accaggtctt ggagctgagc ctctcacctg tactcttccg aaaaatcctc ttcctctgag
gctggatcct agccttatcc tctgatctcc atggcttcct cctccctcct gccgactcct
gggttgagct gttgcctcag tcccccaaca gatgcttttc tgtctctgcc tccctcacc
tgagccccct ccttgctctg ccccccata tggcatagc ccagatcagc tcctaaccct
tatcaccagc tgcctcttct gtgggtgacc caggtccttg tttgctgttg atttctttcc
agaggggttg agcagggatc ctggtttcaa tgacgggttg aaatagaaat ttccagagaa
gagagtattg ggtagatatt ttttctgaat acaaagtgat gtgtttaaat actgcaatta
aagtgaact gaaacaca (配列番号 18)

10

【0133】

本開示の一部の態様は、CD34の発現の喪失をもたらすそれらのゲノム中の改変、又はCD34を標的化する免疫療法剤により認識されないCD34のバリエーション形態の発現を含む遺伝子操作された細胞を提供する。一部の実施形態では、細胞のゲノムにおける改変は、CD34をコードするゲノム配列における変異である。一部の実施形態では、改変は、ゲノム編集を介して、例えば、Casヌクレアーゼ及び、本明細書中で提供されるCD34標的部位を標的化する又は本明細書中で提供される標的化ドメイン配列を含むgRNAを使用してもたらされる。

20

【0134】

本明細書中で提供される組成物、方法、戦略、及び治療モダリティは、任意の細胞又は細胞型に適用され得る一方で、本発明の態様に従ったCD34遺伝子中のゲノム改変のために特に適切である、一部の例示的な細胞及び細胞型が、本明細書中により詳細に記載されている。当業者は、しかし、そのような例の提供は、一部の特定の実施形態を例証する目的のためであり、追加の適切な細胞及び細胞型が、本開示に基づいて当業者に明らかであろうが、それは、この点において限定されない。

【0135】

本開示の一部の態様は、CD34の発現の喪失をもたらすそれらのゲノム中の改変、又はCD34を標的化する免疫療法剤により認識されないCD34のバリエーション形態の発現を含む、遺伝子操作された造血細胞を提供する。一部の実施形態では、それらのゲノム中に改変を含む遺伝子操作された細胞は、例えば、同じ細胞型であるが、しかし、ゲノム改変を含まない造血細胞（例、HSC）と比較し、CD34の低下した細胞表面発現及び／又はCD34を標的化する免疫療法剤による低下した結合をもたらす。一部の実施形態では、造血細胞は造血幹細胞（HSC）である。一部の実施形態では、造血細胞は、造血前駆細胞（HPC）である。一部の実施形態では、造血細胞は造血幹細胞又は前駆細胞である。本明細書中で使用されるように、HSCは、自己再生が可能であり、造血系の全ての系統を生成及び／又は再構成することができる細胞を指す。一部の実施形態では、HSCは対象中に生着させることができ、それにおいて、HSCは増殖し、造血系の全ての系統を生成及び／又は再構成し得る。一部の実施形態では、HSCは、1以上の細胞表面マーカー、例えば、CD34を発現する。一部の実施形態では、本明細書中に記載される遺伝子操作された細胞（例、遺伝子操作されたHSC）は、HSCの同定又は単離に典型的に関連付けられる1以上の細胞表面マーカーを発現しない、低下量の細胞表面マーカーを発現する、あるいは、細胞表面マーカーを標的化する免疫療法剤により認識されないが、しかし、それにもかかわらず自己複製が可能であり、造血系の全ての系統を生成及び／又は再構成することができるバリエーション細胞表面マーカーを発現する。

30

40

【0136】

一部の実施形態では、CD34の発現の喪失をもたらすそれらのゲノム中での改変、又はCD34を標的化する免疫療法剤により認識されないCD34のバリエーション形態の発現

50

を含む造血細胞（例、HSC又はHPC）は、本明細書中に記載されるように、ヌクレアーゼ及び／又はヒトCD34を標的化するgRNAを使用して作製される。そのような細胞は、細胞をヌクレアーゼ及び／又はgRNAと接触させることにより作製することができる、あるいは細胞は、ヌクレアーゼ及び／又はgRNAと接触した細胞の娘細胞であることができることが理解されよう。一部の実施形態では、本明細書中に記載される細胞（例、遺伝子操作されたHSC又はHPC）は、HSC又はHPCのニッチに集合すること、及び／又は対象の造血系を再構成することが可能である。一部の実施形態では、本明細書中に記載される細胞（例、HSC又はHPC）は、ヒト対象において生着すること、骨髓系細胞を産生すること、及びリンパ系細胞を産生することの1以上（例、全て）が可能である。一部の好ましい実施形態では、本明細書中で提供される、遺伝子操作された造血細胞、又はその子孫は、好ましくは、同じ細胞型の造血細胞と比較して、任意の分化バイアスを伴わずに、全ての血液細胞系列中に分化することができるが、しかし、CD34の発現の喪失をもたらすゲノム改変、又はCD34を標的化する免疫療法剤により認識されないCD34のバリエーション形態の発現を含まない。

10

20

30

40

50

【0137】

一部の実施形態では、本明細書中で提供される、遺伝子操作された細胞は、一つのゲノム改変、例えば、CD34の発現の喪失をもたらすゲノム改変、又はCD34を標的化する免疫療法剤により認識されないCD34のバリエーション形態の発現のみを含む。本明細書中で提供される遺伝子編集方法は、標的遺伝子の一方又は両方のアレルにおいてゲノム改変をもたらす得ることが理解されよう。一部の実施形態では、所与の遺伝子座の両方のアレル中にゲノム改変を含む、遺伝子操作された細胞が好ましい。

【0138】

一部の実施形態では、本明細書中で提供される、遺伝子操作された細胞は、二つ以上のゲノム改変、例えば、CD34の発現の喪失をもたらすゲノム改変に加えて1以上のゲノム改変、又はCD34を標的化する免疫療法剤により認識されないCD34のバリエーション形態の発現を含む。

【0139】

一部の実施形態では、本明細書中で提供される、遺伝子操作された細胞は、CD34の発現の喪失をもたらすゲノム改変、又はCD34を標的化する免疫療法剤により認識されないCD34のバリエーション形態の発現を含み、キメラ抗原受容体をコードする発現構築物を、例えば、細胞のゲノム中に組み込まれたCARをコードする発現構築物の形態においてさらに含む。一部の実施形態では、CARは、CD34に結合する結合ドメイン、例えば、抗体断片を含む。

【0140】

本開示の一部の態様は、CD34の発現の喪失をもたらすそれらのゲノム中の改変、又はCD34を標的化する免疫療法剤により認識されないCD34のバリエーション形態の発現を含む、遺伝子操作された免疫エフェクター細胞を提供する。一部の実施形態では、免疫エフェクター細胞はリンパ球である。一部の実施形態では、免疫エフェクター細胞はTリンパ球である。一部の実施形態では、Tリンパ球はアルファ／ベータTリンパ球である。一部の実施形態では、Tリンパ球はガンマ／デルタTリンパ球である。一部の実施形態では、免疫エフェクター細胞はナチュラルキラーT（NK T）細胞である。一部の実施形態では、免疫エフェクター細胞はナチュラルキラー（NK）細胞である。一部の実施形態では、免疫エフェクター細胞は、内因性導入遺伝子、例えば、トランスジェニックタンパク質を発現しない。一部の実施形態では、免疫エフェクター細胞は、キメラ抗原受容体（CAR）を発現する。一部の実施形態では、免疫エフェクター細胞は、CD34を標的化するCARを発現する。一部の実施形態では、免疫エフェクター細胞は、CD34を標的化するCARを発現しない。

【0141】

一部の実施形態では、本明細書中で提供される、遺伝子操作された細胞は、CD34の発現の喪失をもたらすゲノム改変、又はCD34を標的化する免疫療法剤により認識され

ないCD34のバリエーション形態の発現を含み、外因性タンパク質をコードする発現構築物を含まない、例えば、CARをコードする発現構築物を含まない。

【0142】

一部の実施形態では、本明細書中で提供される、遺伝子操作された細胞は、実質的にCD34タンパク質を発現せず、例えば、適切な方法、例えば免疫染色方法などにより測定できるCD34タンパク質を発現しない。一部の実施形態では、本明細書中で提供される、遺伝子操作された細胞は、野生型CD34タンパク質を実質的に発現しないが、しかし、変異体CD34タンパク質バリエーション、例えば、CD34を標的化する免疫療法剤、例えば、CAR-T細胞治療剤、又は抗CD34抗体、抗体断片、もしくは抗体-薬物複合体(ADC)により認識されないバリエーションを発現する。

10

【0143】

一部の実施形態では、本明細書中で提供される、遺伝子操作された細胞は、造血細胞、例えば、造血幹細胞である。造血細胞は、典型的には、多能性、自己再生特性、及び／又は造血系の細胞を生成する能力により特徴付けられる。一部の実施形態では、造血幹細胞(HSC)は、骨髄系及びリンパ系前駆細胞の両方を生じることが可能であり、それらは、骨髄系細胞(例、単球、マクロファージ、好中球、好塩基球、樹状細胞、赤血球、血小板など)及びリンパ系細胞(例、T細胞、B細胞、NK細胞)をそれぞれさらに生じる。一部の実施形態では、HSCは、細胞表面マーカーCD34(例、CD34+)の発現により特徴付けられる。一部の実施形態では、CD34は、HSCの特定及び／又は単離のために使用することができる。一部の実施形態では、1以上の細胞表面マーカー、例えば、CD34の非存在は、細胞システムへのコミットメントに関連付けられる。一部の実施形態では、本明細書中に記載される遺伝子操作された細胞(例、遺伝子操作されたHSC)は、CD34を発現せず、低下したレベルでCD34を発現し、又はCD34バリエーション(例、CD34を標的化する免疫療法剤により認識されない)を発現する。一部のそのような実施形態では、例えば、遺伝子操作されたHSCが、CD34の発現の完全な喪失により特徴付けられる実施形態では、遺伝子操作された細胞は、CD34の発現によりHSCとして同定可能又は単離可能ではない。一部の実施形態では、遺伝子操作されたHSCは、CD34を発現せず、低下したレベルでCD34を発現する、又はCD34バリエーション(例、CD34を標的化する免疫療法剤により認識されない)を発現するが、しかし、それにもかかわらず、自己再生が可能なHSCである。

20

30

【0144】

一部の実施形態では、本明細書中に開示される遺伝子操作されたHSC、例えば、CD34を発現しない、低下したレベルでCD34を発現する、又はCD34バリエーションを発現するHSCは、CD34の発現によりHSCとして同定可能又は単離可能であるが、しかし、例えば、HSCの他の特徴により、HSCとして依然として同定することができる。例えば、一部の実施形態では、本明細書中に開示される遺伝子操作されたHSC、例えば、CD34を発現しない、低下したレベルでCD34を発現する、又はCD34バリエーションを発現するHSCは、そのCD34プロモーター活性の状態又はそのゲノム中でのCD34プロモーターのエピジェネティック状態により、例えば、内因性CD34プロモーターにより駆動される異種レポーター構築物を介して、又はCD34プロモーターのメチル化状態(又は他の適切なエピジェネティックプロモーター)を介して、HSCとして同定され得る。一部の実施形態では、本明細書中に開示される遺伝子操作されたHSC、例えば、CD34を発現しない、低下したレベルのCD34を発現する、又はCD34バリエーションを発現するHSCは、例えば、そのような発現プロファイルが、非編集HSCのものとは一致する、又は厳密に似ているという点で、他のHSCマーカーのその発現プロファイルにより、HSCとして同定され得る。一部の実施形態では、本明細書中に開示される遺伝子操作されたHSC、例えば、CD34を発現しない、低下したレベルでCD34を発現する、又はCD34バリエーションを発現するHSCは、レシピエント対象、例えば、それを必要とするヒト対象中に生着し、全ての造血細胞システムを再構成するその能力により、HSCとして同定され得る。

40

50

【0145】

一部の実施形態では、本明細書中に記載される、遺伝子操作された細胞の集団は、複数の遺伝子操作された造血幹細胞を含む。一部の実施形態では、本明細書中に記載される、遺伝子操作された細胞の集団は、複数の遺伝子操作された造血前駆細胞を含む。一部の実施形態では、本明細書中に記載される、遺伝子操作された細胞の集団は、複数の遺伝子操作された造血幹細胞及び複数の遺伝子操作された造血前駆細胞を含む。

【0146】

一部の実施形態では、遺伝子操作されたHSCは、対象、例えばヒト対象などから得られる。HSCを得る方法は、例えば、PCT出願番号US2016/057339において記載されており、それは、参照によりその全体において本明細書中に組み入れられる。一部の実施形態では、HSCは末梢血HSCである。一部の実施形態では、哺乳類の対象は、非ヒト霊長類、齧歯類（例、マウス又はラット）、ウシ、ブタ、ウマ、又は家畜動物である。一部の実施形態では、HSCは、ヒト対象、例えば造血器悪性腫瘍を有するヒト対象などから得られる。一部の実施形態では、HSCは、健常なドナーから得られる。一部の実施形態では、HSCは、キメラ受容体を発現する免疫細胞がその後に投与される対象から得られる。細胞が得られた同じ対象に投与されるHSCは、自己細胞として言及されるのに対し、細胞が投与される対象ではない対象から得られたHSCは、同種細胞として言及される。

【0147】

一部の実施形態では、遺伝子操作された細胞の集団は、細胞の異種集団、例えば、異なるCD34変異を含む遺伝子操作された細胞の異種集団である。一部の実施形態では、遺伝子操作された細胞の集団におけるCD34をコードする遺伝子の少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%のコピーが、本明細書中に記載されるゲノム編集アプローチにより、例えば、本明細書中で提供されるgRNAを使用したCRISPR/Casシステムにより影響される変異を含む。一例として、遺伝子操作された細胞の集団は、複数の異なるCD34変異を含むことができ、複数の各変異は、変異を有する細胞の集団におけるCD34のコピーのパーセントに寄与し得る。

【0148】

一部の実施形態では、遺伝子操作された造血細胞（例、HSC）上のCD34の発現は、天然の造血細胞（例、野生型の対応物）、例えば、天然のHSC上でのCD34の発現と比較される。一部の実施形態では、遺伝子操作は、天然造血細胞（例、野生型の対応物）上のCD34の発現と比較して、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%だけのCD34の発現レベルにおける低下をもたらす。例えば、一部の実施形態では、遺伝子操作された造血細胞は、天然の造血細胞（例、野生型の対応物）と比較して、20%未満、19%未満、18%未満、17%未満、16%未満、15%未満、14%未満、13%未満、12%未満、11%未満、10%未満、9%未満、8%未満、7%未満、6%未満、5%未満、4%未満、3%未満、2%未満、又は1%未満のCD34を発現する。

【0149】

一部の実施形態では、例えば、本明細書中に記載されるgRNA標的化CD34を使用した、本明細書中に記載される遺伝子操作は、天然造血細胞（例、野生型の対応物）上での野生型CD34のレベルの発現と比較して、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも91%であり、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%だけ野生型CD34の発現レベルにおける低下をもたらす。例えば、一部の実施形態では、遺伝子操作された

造血細胞は、天然の造血細胞（例、野生型の対応物）と比較して、20%未満、19%未満、18%未満、17%未満、16%未満、15%未満、14%未満、13%未満、12%未満、11%未満、10%未満、9%未満、8%未満、7%未満、6%未満、5%未満、4%未満、3%未満、2%未満、又は1%未満のCD34を発現する。

【0150】

一部の実施形態では、例えば、本明細書中に記載されるgRNA標的化CD34を使用した、本明細書中に記載される遺伝子工学は、適切な対照（例、細胞又は複数の細胞）と比較して、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも91%であり、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%だけの野生型系統特異的な細胞表面抗原（例、CD34）の発現レベルにおける低下をもたらす。一部の実施形態では、適切な対照は、同じ対象からの複数の非操作細胞において測定又は予測される野生型系統特異的な細胞表面抗原のレベルを含む。一部の実施形態では、適切な対照は、健常な対象からの複数の細胞において測定又は予測される野生型系統特異的な細胞表面抗原のレベルを含む。一部の実施形態では、適切な対照は、健常な個体（例、10、20、50、又は100個体）のプールからの細胞の集団において測定又は予測される野生型系統特異的な細胞表面抗原のレベルを含む。一部の実施形態では、適切な対照は、本明細書中に記載される治療、例えば、抗CD34治療を必要とする対象において測定又は予測される野生型系統特異的な細胞表面抗原のレベルを含み、例えば、それにおいて対象は癌を有し、それにおいて癌の細胞はCD34を発現する。

10

20

【0151】

一部の実施形態では、本明細書中に記載される、細胞を遺伝子操作させる方法は、野生型細胞、例えば、野生型造血幹細胞又は前駆細胞を提供する工程を含む。一部の実施形態では、野生型（wild-type）細胞は、CD34をコードする遺伝子の二つの機能的コピーを含む（例、発現する）未編集細胞である。一部の実施形態では、細胞は、配列番号113に従ったCD34遺伝子配列を含む。一部の実施形態では、細胞は、配列番号17又は18においてコードされるCD34タンパク質をコードするCD34遺伝子配列を含み、例えば、CD34遺伝子配列は、配列番号17又は18に対して、1以上のサイレント変異を含み得る。一部の実施形態では、本方法において使用される細胞は、天然細胞又は非操作細胞である。一部の実施形態では、野生型細胞はCD34を発現する、あるいはCD34を発現する細胞株と同程度の（又は90%～110%、80%～120%、70%～130%、60%～140%、もしくは50%～150%内の）レベルでCD34を発現する、より分化した細胞を生じる。

30

【0152】

一部の実施形態では、野生型細胞は、CD34に結合する抗体（例、抗CD34抗体）に結合する、あるいはCD34を発現する細胞株、例えば、L1236、L428、KM-H2、及びL591への抗体の結合と同程度の（又は90%～110%、80%～120%、70%～130%、60%～140%、もしくは50%～150%内の）レベルで、そのような抗体に結合する、より分化した細胞を生じる。抗体結合は、例えば、フローサイトメトリー又は免疫組織化学により測定されてもよい。

40

【0153】

一部の実施形態では、本明細書中で提供されるCD34編集細胞は、CD34編集造血幹細胞（HSC）である。一部の実施形態では、そのようなCD34編集造血幹細胞は、例えば、それらが、例えば、臨床状況におけるレシピエント中への長期生着、全ての造血系統中に分化すること、及び、例えば、造血幹細胞移植後にレシピエントの造血系を再構成することが可能であるという点で、非編集（例、天然）HSCと機能的に同等である。一部の実施形態では、本明細書中で提供されるCD34編集HSCは、CD34を除く、HSCに特徴的な細胞表面マーカーを発現する。造血幹細胞に関連付けられる、一部の適切な細胞表面マーカーが本明細書中に提供されており、造血幹細胞に関連付けられる、他

50

の適切な表面マーカーが、本開示に基づいて当業者に明らかであろう。適切なHSCマーカーは、例えば、BD Biosciences Human and Mouse CD Marker Handbookにおいて開示されているものを含み、www.bd.com/documents/bd-legacy/catalogue/biosciences/DS_Human-Mouse-CD-Maker-Biosciences_CT_DE.pdfでアクセス可能であり、2021年12月30日に最後にアクセスされている。追加の適切なHSCマーカーは、例えば、Tomellini et al., Cell Reports 2019 28 (4): 1063-1073 (PMID: 31340144 DOI: 10.1016/j.celrep.2019.06.084)において開示されているものを含み、それら各々の全内容が参照により本明細書中に組み入れられる。一部の例示的な、適切なHSCマーカーは、限定されないが、CD49c、CD71、CD90、CD117、CD135、CD243、CD292、CDw293、CD318、CD325、CD349、CD201、CD228、及びCD309を含む。一部の実施形態では、適切なHSC表面マーカーは、分化細胞について特徴的な表面マーカーの非存在を含む。例えば、一部の実施形態では、本明細書中で提供されるCD34編集HSC、例えば、非編集（例、天然の）HSCから機能的に区別不可能であるCD34編集HSCは、CD34について陰性であり（CD34-）、天然のHSC、例えば、適切なレシピエント中への長期生着が可能な天然のHSCに特徴的な、又はそれにより典型的に発現される1以上の表面マーカーを発現する。一部の実施形態では、本明細書中で提供されるようなCD34編集HSCは、CD34-であり、CD90を発現し（CD90+である）、例えば、任意の他の適切な方法を通じた免疫染色により決定される。一部の実施形態では、本明細書中で提供されるようなCD34編集HSCは、CD34について陰性であり（CD34-）、CD71+である。一部の実施形態では、本明細書中で提供されるようなCD34編集HSCは、CD34について陰性であり（CD34-）、CD117+である。一部の実施形態では、本明細書中で提供されるようなCD34編集HSCは、CD34について陰性であり（CD34-）、CD135+である。一部の実施形態では、本明細書中で提供されるようなCD34編集HSCは、CD34について陰性であり（CD34-）、CD243+である。一部の実施形態では、本明細書中で提供されるようなCD34編集HSCは、CD34について陰性であり（CD34-）、CD292+である。一部の実施形態では、本明細書中で提供されるようなCD34編集HSCは、CD34について陰性であり（CD34-）、CDw293+である。一部の実施形態では、本明細書中で提供されるようなCD34編集HSCは、CD34について陰性であり（CD34-）、CD318+である。一部の実施形態では、本明細書中で提供されるようなCD34編集HSCは、CD34について陰性であり（CD34-）、CD325+である。一部の実施形態では、本明細書中で提供されるようなCD34編集HSCは、CD34について陰性であり（CD34-）、CD349+である。一部の実施形態では、本明細書中で提供されるようなCD34編集HSCは、CD34について陰性であり（CD34-）、CD201+である。一部の実施形態では、本明細書中で提供されるようなCD34編集HSCは、CD34について陰性であり（CD34-）、CD228+である。一部の実施形態では、本明細書中で提供されるようなCD34編集HSCは、CD34について陰性であり（CD34-）、CD309+である。一部の実施形態では、本明細書中で提供されるようなCD34編集HSCは、CD34について陰性であり（CD34-）、CD71+である。一部の実施形態では、本明細書中で提供されるようなCD34編集HSCは、CD34について陰性であり（CD34-）、CD49c+である。一部の実施形態では、本明細書中で提供されるようなCD34編集HSCは、CD34について陰性であり（CD34-）、CD201+である。一部の実施形態では、本明細書中で提供されるようなCD34編集HSCは、CD34（CD34-）について陰性であり、分化造血細胞に関連付けられる任意の系統マーカーについて陰性である（lin-）。一部の実施形態では、系統マーカーは、CD2、CD3、CD4、CD8、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD19、CD56、CD123、も

10

20

30

40

50

しくはCD 2 3 5 a、又はこれらのマーカーの二つ以上の任意の組み合わせを含む。したがって、一部の実施形態では、本明細書中で提供されるようなCD 3 4 編集HSCは、CD 3 4について陰性であり(CD 3 4-)、CD 2、CD 3、CD 4、CD 8、CD 1 1 b、CD 1 4、CD 1 5、CD 1 6、CD 1 9、CD 5 6、CD 1 2 3、もしくはCD 2 3 5 a、又はこれらのマーカーの二つ以上の任意の組み合わせについて陰性である。一部の実施形態では、本明細書中で提供されるようなCD 3 4 編集HSCは、CD 3 4について陰性であり(CD 3 4-)、CD 4 5 RA-である。一部の実施形態では、本明細書中で提供されるようなCD 3 4 編集HSCは、上で提供される二つ以上の基準の組み合わせを満たす。例えば、一部の実施形態では、そのようなCD 3 4 編集HSCは、CD 3 4-、CD 9 0+、及びCD 7 1+である。一部の実施形態では、そのようなCD 3 4 編集HSCは、CD 3 4-、CD 9 0+、CD 7 1+、及びlin-である。一部の実施形態では、そのようなCD 3 4 編集HSCは、CD 3 4-、CD 9 0+、CD 4 5 RA-である。一部の実施形態では、そのようなCD 3 4 編集HSCは、CD 3 4-、CD 9 0+、CD 4 5 RA-、及びCD 2 0 1+である。一部の実施形態では、そのようなCD 3 4 編集HSCは、CD 3 4-、CD 9 0+、CD 4 5 RA-、及びCD 4 9 c+である；一部の実施形態では、そのようなCD 3 4 編集HSCは、CD 3 4-、CD 9 0+、CD 4 5 RA-、CD 2 0 1+、CD 4 9 c+、及びlin-である。一部の実施形態では、遺伝子操作された造血幹細胞は、その細胞表面上にCD 3 4を発現せず、CD 9 0、CD 2 0 1、及びCD 4 9 cを発現する。一部の実施形態では、遺伝子操作された造血幹細胞は、その細胞表面上にCD 3 4を発現せず、CD 9 0、CD 2 0 1、及びCD 4 9 cを発現し、CD 4 5 cを発現しない。一部の実施形態では、遺伝子操作された造血幹細胞は、その細胞表面上にCD 3 4を発現せず、CD 9 0、CD 2 0 1、及びCD 4 9 cのうちの1以上を発現し、CD 2、CD 3、CD 4、CD 8、CD 1 1 b、CD 1 4、CD 1 5、CD 1 6、CD 1 9、CD 4 5 RA-、CD 5 6、CD 1 2 3、及びCD 2 3 5 aについて陰性である。

10

20

30

40

50

【0 1 5 4】

一部の実施形態では、本明細書中で提供されるCD 3 4 編集HSCは、CD 3 4をコードする遺伝子における遺伝子編集を含み、それによって、CD 3 4 編集HSCの表面上で発現されるCD 3 4 遺伝子産物、例えば、CD 3 4 タンパク質をコードしない編集遺伝子がもたらされる、又はCD 3 4 標的化抗体により結合されることができない(例、CD 3 4 標的化抗体により結合されるエピトープ中に修飾を有する)CD 3 4 タンパク質をコードする編集遺伝子がもたらされる。一部の実施形態では、CD 3 4 遺伝子編集は、CD 3 4をコードする遺伝子における二本鎖切断のNHE J 媒介性修復から、例えば、RNA ガイドヌクレアーゼから起因するインデルを含み、それによって、次に、早期終結、及び、このように、CD 3 4によりコードされる遺伝子産物の切断、又は、そうでなければ、CD 3 4 編集HSCの表面上で発現されるCD 3 4 遺伝子産物、例えば、CD 3 4 タンパク質をコードしない編集CD 3 4 遺伝子がもたらされる、あるいはCD 3 4 標的化抗体により結合されることができない(例、CD 3 4 標的化抗体により結合されるエピトープ中に修飾を有する)CD 3 4 タンパク質をコードする編集遺伝子がもたらされる。一部の実施形態では、CD 3 4 遺伝子編集は、例えば、塩基編集もしくはプライム編集から、又はCD 3 4をコードする遺伝子における二本鎖切断のHDR 媒介性修復に起因する単一ヌクレオチド変化を含み、それによって、次に、早期終結、及び、このように、CD 3 4によりコードされる遺伝子産物の切断、又は、そうでなければ、CD 3 4 編集HSCの表面上で発現されるCD 3 4 遺伝子産物、例えば、CD 3 4 タンパク質をコードしない編集遺伝子がもたらされる、あるいはCD 3 4 標的化抗体により結合されることができない(例、CD 3 4 標的化抗体により結合されるエピトープ中に修飾を有する)CD 3 4 タンパク質をコードする編集遺伝子がもたらされる。一部の実施形態では、CD 3 4 遺伝子編集は、フレームシフト又はスプライスバリエーションをもたらす。一部の実施形態では、CD 3 4 遺伝子編集は、CD 3 4 抗体に結合されたエピトープの、全部もしくは一部における欠失、又

は改変をもたらす。一部の実施形態では、CD34編集HSCは、CD34標的化抗体、CD34結合抗体断片、又は他の免疫結合剤、例えば、CD34結合scFv、CD34結合CAR、又はCD34結合抗体－薬物複合体により認識されない。一部の実施形態では、CD34編集HSCは、CD34標的化免疫療法薬により、例えば、CD34標的化CAR-T細胞又はCD34標的化CAR-NK細胞により認識されない。

【0155】

二重gRNA組成物及びその使用

一部の実施形態では、本明細書中で提供されるgRNA（例、表1又は表2中に提供されるgRNA）は、例えば、ゲノム中の二つの部位にCRISPR/Casヌクレアーゼを標的化するために、第二のgRNAとの組み合わせにおいて使用することができる。例えば、一部の実施形態では、CD34及び系統特異的な細胞表面抗原、例えば、CD33、CD123、CLL-1、CD19、CD30、CD5、CD6、CD7、CD38、又はBCMAについて欠損している造血細胞を産生し、細胞が、二つの薬剤：抗CD34薬剤及び系統特異的な細胞表面抗原を標的化する薬剤に耐性であることが望まれ得る。一部の実施形態では、造血細胞は、CD34及びリンパ球特異的な細胞表面抗原又は骨髓特異的な細胞表面抗原について欠損している。一部の実施形態では、例えば、二つの切断を作製し、二つの切断部位間に欠失又は挿入を作るために、細胞を、CD34の異なる部位を標的化する二つの異なるgRNAと接触させることが望ましい。したがって、本開示は、gRNA及び関連するCRISPR系の様々な組み合わせ、ならびにgRNA及び関連するCRISPR系のそのような組み合わせを使用したゲノム編集方法により作られた細胞を提供する。一部の実施形態では、CD34 gRNAは、第二のgRNAとは異なるヌクレアーゼに結合する。例えば、一部の実施形態では、CD34 gRNAはCas9に結合してもよく、第二のgRNAはCas12aに結合してもよく、又はその逆であってもよい。

【0156】

一部の実施形態では、第一のgRNAは、本明細書中で提供されるCD34 gRNA（例、表1又は表2中に提供されるgRNA又はそのバリエーション）であり、第二のgRNAは、以下から選ばれる、系統特異的な細胞表面抗原を標的化する：BCMA、CD19、CD20、CD30、ROR1、B7H6、B7H3、CD23、CD33、CD38、C型レクチン様分子1、CS1、IL-5、L1-CAM、PSCA、PSMA、CD138、CD133、CD70、CD5、CD6、CD7、CD13、NKG2D、NKG2Dリガンド、CLEC12A、CD11、CD123、CD56、CD30、CD14、CD66b、CD41、CD61、CD62、CD235a、CD146、CD326、LMP2、CD22、CD52、CD10、CD3/TCR、CD79/BCR、及びCD26。

【0157】

一部の実施形態では、第一のgRNAは、本明細書中で提供されるCD34 gRNA（例、表1もしくは表2中に提供されるgRNA又はそのバリエーション）であり、第二のgRNAは、リンパ球特異的な細胞表面抗原（例、T細胞、B細胞、又はNK細胞特異的な細胞表面抗原）を標的化する。一部の実施形態では、リンパ球特異的な細胞表面抗原は、CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、又はCD56である。一部の実施形態では、第一のgRNAは、本明細書中で提供されるCD34 gRNA（例、表1もしくは表2中に提供されるgRNA又はそのバリエーション）であり、第二のgRNAは、骨髓特異的な細胞表面抗原（例、単球、マクロファージ、好中球、好塩基球、樹状細胞、赤血球、又は血小板特異的な細胞表面抗原）を標的化する。一部の実施形態では、骨髓特異的な細胞表面抗原は、CD11c、CD123、CD14、CD33、CD66b、CD41、CD61、CD62、又はCD235aである。追加のリンパ及び骨髓特異的な細胞表面抗原、ならびにそれらが関連付けられる細胞型は、例えば、BD Biosciences Human and Mouse CD Marker Handbookにおいて見出すことができ、www.bd.com/documents/bd-legacy/

catalogue/biosciences/DS_Human-Mouse-CD-Maker-Biosciences_CT_DE.pdfでアクセス可能であり、2021年12月30日に最後にアクセスされており、そのリストは、参照により本明細書中に組み入れられる。

【0158】

一部の実施形態では、第一のgRNAは、本明細書中で提供されるCD34 gRNA（例、表1もしくは表2中に提供されるgRNA又はそのバリエーション）であり、第二のgRNAは、新生物又は悪性の疾患又は障害、例えば、特定の型の癌、例えば、限定されないが、CD20、CD22（非ホジキンリンパ腫、B細胞リンパ腫、慢性リンパ性白血病（CLL））、CD52（B細胞CLL）、CD33（急性骨髄性白血病（AML））、CD10（gp100）（一般的な（プレB）急性リンパ性白血病及び悪性黒色腫）、CD3/T細胞受容体（TCR）（T細胞リンパ腫及び白血病）、CD79/B細胞受容体（BCR）（B細胞リンパ腫及び白血病）、CD26（上皮及びリンパ系悪性腫瘍）、ヒト白血球抗原（HLA）-DR、HLA-DP、及びHLA-DQ（リンパ系悪性腫瘍）、RCAS1（婦人科癌、胆管腺癌、及び膵臓の管腺癌）に関連付けられる系統特異的な細胞表面抗原ならびに前立腺特異的膜抗原を標的化する。

10

【0159】

一部の実施形態では、第一のgRNAは、本明細書中で提供されるCD34 gRNA（例、表1もしくは表2中に提供されるgRNA又はそのバリエーション）であり、第二のgRNAは、CD1a、CD1b、CD1c、CD1d、CD1e、CD2、CD3、CD3d、CD3e、CD3g、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8a、CD8b、CD9、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD11d、CDw12、CD13、CD14、CD15、CD16、CD16b、CD17、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD26、CD27、CD28、CD29、CD30、CD31、CD32a、CD32b、CD32c、CD35、CD36、CD37、CD38、CD39、CD40、CD41、CD42a、CD42b、CD42c、CD42d、CD43、CD44、CD45、CD45RA、CD45RB、CD45RC、CD45RO、CD46、CD47、CD48、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、CD50、CD51、CD52、CD53、CD54、CD55、CD56、CD57、CD58、CD59、CD60a、CD61、CD62E、CD62L、CD62P、CD63、CD64a、CD65、CD65s、CD66a、CD66b、CD66c、CD66F、CD68、CD69、CD70、CD71、CD72、CD73、CD74、CD75、CD75S、CD77、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85A、CD85C、CD85D、CD85E、CD85F、CD85G、CD85H、CD85I、CD85J、CD85K、CD86、CD87、CD88、CD89、CD90、CD91、CD92、CD93、CD94、CD95、CD96、CD97、CD98、CD99、CD99R、CD100、CD101、CD102、CD103、CD104、CD105、CD106、CD107a、CD107b、CD108、CD109、CD110、CD111、CD112、CD113、CD114、CD115、CD116、CD117、CD118、CD119、CD120a、CD120b、CD121a、CD121b、CD121a、CD121b、CD122、CD123、CD124、CD125、CD126、CD127、CD129、CD130、CD131、CD132、CD133、CD134、CD135、CD136、CD137、CD138、CD139、CD140a、CD140b、CD141、CD142、CD143、CD14、CDw145、CD146、CD147、CD148、CD150、CD152、CD152、CD153、CD154、CD155、CD156a、CD156b、CD156c、CD157、CD158b1、CD158b2、CD158d、CD158e1/e2、CD158f、CD158g、CD158h、CD158i、CD158j、CD158k、CD159a、CD159c、CD160、CD161、CD

20

30

40

50

163、CD164、CD165、CD166、CD167a、CD168、CD169、CD170、CD171、CD172a、CD172b、CD172g、CD173、CD174、CD175、CD175s、CD176、CD177、CD178、CD179a、CD179b、CD180、CD181、CD182、CD183、CD184、CD185、CD186、CD191、CD192、CD193、CD194、CD195、CD196、CD197、CDw198、CDw199、CD200、CD201、CD202b、CD203c、CD204、CD205、CD206、CD207、CD208、CD209、CD210a、CDw210b、CD212、CD213a1、CD213a2、CD215、CD217、CD218a、CD218b、CD220、CD221、CD222、CD223、CD224、CD225、CD226、CD227、CD228、CD229、CD230、CD231、CD232、CD233、CD234、CD235a、CD235b、CD236、CD236R、CD238、CD239、CD240、CD241、CD242、CD243、CD244、CD245、CD246、CD247、CD248、CD249、CD252、CD253、CD254、CD256、CD257、CD258、CD261、CD262、CD263、CD264、CD265、CD266、CD267、CD268、CD269、CD270、CD272、CD272、CD273、CD274、CD275、CD276、CD277、CD278、CD279、CD280、CD281、CD282、CD283、CD284、CD286、CD288、CD289、CD290、CD292、CDw293、CD294、CD295、CD296、CD297、CD298、CD299、CD300a、CD300c、CD300e、CD301、CD302、CD303、CD304、CD305、CD306、CD307a、CD307b、CD307c、CD307d、CD307e、CD309、CD312、CD314、CD315、CD316、CD317、CD318、CD319、CD320、CD321、CD322、CD324、CD325、CD326、CD327、CD328、CD329、CD331、CD332、CD333、CD334、CD335、CD336、CD337、CD338、CD339、CD340、CD344、CD349、CD350、CD351、CD352、CD353、CD354、CD355、CD357、CD358、CD359、CD360、CD361、CD362又はCD363から選ばれる系統特異的な細胞表面抗原を標的化する。

10

20

30

【0160】

一部の実施形態では、第二のgRNAは、WO2017/066760、WO2019/046285、WO/2018/160768、又はBorot et al. PNAS (2019) 116 (24) : 11978-11987において開示されるgRNAであるが、それらの各々が、参照によりその全体において本明細書中に組み入れられる。

【0161】

それを必要とする対象への投与の方法

本開示の一部の態様は、CD34の発現の喪失をもたらすそれらのゲノム中での改変、又はCD34を標的化する免疫療法剤により認識されないCD34のバリエーション形態の発現を含む、本明細書中に記載される遺伝子操作された細胞の有効数を、それを必要とする対象に投与することを含む方法を提供する。

40

【0162】

それを必要とする対象は、一部の実施形態では、CD34を標的化する免疫療法を受けている、又は受けようとしている対象である。それを必要とする対象は、一部の実施形態では、例えば、CD34発現細胞の有害な免疫活性により特徴付けられる、自己免疫疾患を有するか、又はそれと診断された対象である。それを必要とする対象は、一部の実施形態では、悪性細胞上のCD34の発現により特徴付けられる悪性腫瘍を有する、又はそれと診断された対象である。一部の実施形態では、そのような悪性腫瘍又は自己免疫疾患を有する対象は、CD34を標的化する免疫療法のための候補であり得るが、しかし、有害なオンターゲット、オフ疾患効果のリスクは、対象に対する、期待又は観察される利益を

50

上回り得る。一部のそのような実施形態では、本明細書中に記載される遺伝子操作された細胞の投与は、有害なオンターゲット、オフ疾患効果の改善をもたらす。なぜなら、本明細書中で提供される、遺伝子操作された細胞は、CD34を標的化する免疫療法剤により効率的に標的化されないためである。

【0163】

本明細書中に記載される細胞、組成物、及び方法が有用であり得る自己免疫疾患の例は、限定されないが、アカラシア、アジソン病、成人スチル病、無ガンマグロブリン血症、円形脱毛症、アミロイドーシス、強直性脊椎炎、抗GBM／抗TBM腎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性血管浮腫、自己免疫性自律神経失調症、自己免疫性脳脊髄炎、自己免疫性肝炎、内耳自己免疫疾患(AIED)、自己免疫性心筋炎、自己免疫性卵巣炎、自己免疫性精巣炎、自己免疫性脾炎、自己免疫性網膜症、自己免疫性蕁麻疹、軸索及び神経性ニューロパチー(AMAN)、バロ病、ベーチェット病、良性粘膜類天疱瘡、水疱性類天疱瘡、キャッスルマン病(CD)、セリアック病、シャーガス病、慢性炎症性脱髄性多発神経炎(CIDP)、慢性再発性多発性骨髄炎(CRMO)、チャグ・ストラウス症候群(CSS)又は好酸球性肉芽腫症(EGPA)、癰疽性類天疱瘡、コーガン症候群、寒冷凝集素症、先天性心ブロック、コクサッキー心筋炎、CREST症候群、クローン病、疱疹状皮膚炎、皮膚筋炎、デビック病(視神経脊髄炎)、円板状ループス、ドレスラー症候群、子宮内膜症、好酸球性食道炎(EOE)、好酸球性筋膜炎、結節性紅斑、本態性混合型クリオグロブリン血症、エバンス症候群、線維筋痛症、線維化性肺炎、巨細胞性動脈炎(側頭動脈炎)、巨細胞性心筋炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、多発血管性肉芽腫症、バセドウ病、ギランバレー症候群、橋本甲状腺炎、溶血性貧血、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病(HSP)、妊娠ヘルペス又は妊娠類天疱瘡(PG)、化膿性汗腺炎(HS)(逆座瘡)、低ガンマルグロブリン血症、IgA腎症、IgG4関連硬化性疾患、免疫性血小板減少性紫斑病(ITP)、封入体筋炎(IBM)、間質性膀胱炎(IC)、若年性関節炎、若年性糖尿病(1型糖尿病)、若年性筋炎(JM)、川崎病、ランバート・イートン症候群、白血球破碎性血管炎、扁平苔癬、硬化性苔癬、木質結膜炎、線状IgA疾患(LAD)、狼瘡、慢性ライム病、メニエール病、顕微鏡的多発血管炎(MPA)、混合性結合組織病(MCTD)、モーレン潰瘍、ミュシャ・ハーベルマン病、多巣性運動神経障害(MMN)又はMMNCB、多発性硬化症、重症筋無力症、筋炎、ナルコレプシー、新生児ループス、視神経脊髄炎、好中球減少症、眼粘膜類天疱瘡、視神経炎、回帰性リウマチ(PR)、PANDAS、腫瘍随伴性小脳変性症(PCD)、発作性夜間ヘモグロビン尿症(PNH)、パリー・ロンバーグ症候群、扁平部炎(末梢ブドウ膜炎)、パーソネイジ・ターナー症候群、天疱瘡、末梢神経障害、静脈周囲脳脊髄炎、悪性貧血(PA)、POEMS症候群、結節性多発性動脈炎、多腺症候群I、II、III型、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎、心筋梗塞後症候群、心膜切開後症候群、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、プロゲステロン皮膚炎、乾癬、乾癬性関節炎、純粋赤血球形成不全(P RCA)、壊疽性膿皮症、レイノー現象、反応性関節炎、反射性交感神経性ジストロフィー、再発性多発性軟骨炎、レストレスレッグス症候群(RLS)、後腹膜線維症、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、シュミット症候群、強膜炎、強皮症、シェーグレン症候群、精子及び精巣の自己免疫、スティッフパーソン症候群(SPS)、亜急性細菌性心内膜炎(SBE)、スーザック症候群、交感神経性眼炎(SO)、高安動脈炎、側頭動脈炎・巨細胞性動脈炎、血小板減少性紫斑病(TTP)、甲状腺眼疾患(TED)、トロサ・ハント症候群(THS)、横断性脊髄炎、1型糖尿病、潰瘍性大腸炎(UC)、未分化結合組織病(UCTD)、ぶどう膜炎、血管炎、白斑、又はフォークト・小柳・原田病を含む。

【0164】

一部の実施形態では、そのような悪性腫瘍又は自己免疫疾患を有する対象は、放射線治療についての、例えば、悪性細胞(例、CD34を発現する悪性細胞)をアブレーションするための候補である。一部の実施形態では、有害なオフターゲット効果(例、隣接又は周囲の細胞又は組織に対する)及びオンターゲットオフ疾患効果(例、非悪性CD34発

10

20

30

40

50

現細胞に対する）のリスクは、放射線治療について対象に対する、期待又は観察される利益を上回り得る。一部の実施形態では、放射線治療後での、本明細書中に記載される遺伝子操作された細胞（例、遺伝子操作された造血細胞、例、HSC）の投与は、有害なオンターゲット、オフ疾患効果の改善をもたらす。理論により拘束されることを望まないが、免疫療法アプローチの組み合わせは、CD34を標的化するリンパ球エフェクター細胞、例えばCAR-T細胞又はCAR-NK細胞など、ならびにCD34を発現しない、低下したレベルのCD34を発現する（例、野生型細胞と比べて）、又はCD34を標的化する免疫療法剤により認識されないCD34のバリエーション形態を発現する遺伝子操作された細胞（例、遺伝子操作された幹細胞、例、HSC）を含み、CD34発現悪性腫瘍又はCD34発現細胞の有害な免疫活性により特徴付けられる自己免疫疾患を有する対象のための、放射線治療に対する代替であると考えられる。CD34を標的化する免疫療法アプローチは、オフターゲット効果（例、隣接又は周囲の細胞又は組織に対する）のリスクを回避又は有意に減少させると考えられる。CD34を発現しない、低下したレベルのCD34を発現する（例、野生型細胞と比べて）、又はCD34を標的化する免疫療法剤により認識されないCD34のバリエーション形態を発現する、免疫療法耐性の遺伝子操作された細胞（例、遺伝子操作された幹細胞、例、HSC）を用いた枯渇幹細胞集団の補充によって、免疫療法的アプローチのオンターゲットオフ疾患効果が改善又は排除されることが考えられる。

10

【0165】

一部の実施形態では、悪性腫瘍は、血液悪性腫瘍、又は血液の癌である。一部の実施形態では、悪性腫瘍はリンパ性悪性腫瘍である。一般的に、リンパ系悪性腫瘍は、リンパ細胞、例えばT系列又はB系列のリンパ球などの不適当な産生、発生、及び／又は機能に関連付けられる。一部の実施形態では、悪性腫瘍は、細胞表面上でCD34を発現する細胞と特徴付けられる、又は関連付けられる。

20

【0166】

一部の実施形態では、悪性腫瘍は、異常Tリンパ球、例えばT系統癌など、例えば、T細胞白血病又はT細胞リンパ腫と関連付けられる。

【0167】

T細胞白血病及びT細胞リンパ腫の例は、限定されないが、T系統急性リンパ性白血病（T-ALL）、ホジキンリンパ腫、又は非ホジキンリンパ腫、急性リンパ性白血病（ALL）、慢性リンパ性白血病（CLL）、大顆粒リンパ球性白血病、成人T細胞白血病／リンパ腫（ATLL）、T細胞前リンパ球性白血病（T-PLL）、T細胞慢性リンパ性白血病、T前リンパ球性白血病、T細胞リンパ性白血病、他に特定されていない末梢性T細胞リンパ腫（PTCL-NOS）、腸疾患関連T細胞リンパ腫、B細胞性慢性リンパ性白血病、マンツル細胞リンパ腫、末梢性T細胞リンパ腫（PTCL）、未分化大細胞リンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、血管免疫芽球性リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、腸疾患型T細胞リンパ腫、肝脾ガンマデルタT細胞リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、又は有毛細胞白血病を含む。

30

【0168】

一部の実施形態では、悪性腫瘍は、異常Bリンパ球、例えばB系統癌など、例えば、B細胞白血病又はB細胞リンパ腫などと関連付けられる。一部の実施形態では、悪性腫瘍は、B系統急性リンパ芽球性白血病（B-ALL）又は慢性リンパ性白血病（B-CLL）、原発性縦隔B細胞リンパ腫である。

40

【0169】

一部の実施形態では、悪性腫瘍の細胞は、例えば、それらの表面上で、CD34を発現する。

【0170】

一部の実施形態では、悪性腫瘍は、CD34の発現により特徴付けられる細胞の集団を含む。一部の実施形態では、CD34の発現により特徴付けられる細胞の集団は、癌幹細胞である。理論により拘束されることを望まないが、癌幹細胞理論は、一部の悪性腫瘍に

50

については、癌幹細胞が、正常で健常な幹細胞と多くの特性を共有することを示唆している。一部の実施形態では、癌幹細胞は、例えば、その表面上で、CD34を発現する。一部の実施形態では、本明細書中に記載される免疫療法アプローチは、例えば、CD34を標的化するリンパ球エフェクター細胞、例えばCAR-T細胞又はCAR-NK細胞などを含み、悪性腫瘍の癌幹細胞を特異的に標的化する。一部の実施形態では、癌幹細胞を標的化する本明細書中に記載される免疫療法アプローチはまた、例えば、健常な幹細胞に対して有害なオンターゲットオフ疾患効果を有する。一部の実施形態では、CD34を発現しない、低下したレベルのCD34を発現する（例、野生型細胞と比べて）、又はCD34を標的化する免疫療法剤により認識されないバリエーション形態のCD34を発現する遺伝子操作された細胞（例、遺伝子操作された幹細胞、例、HSC）は、免疫療法アプローチにより標的化される非癌幹細胞（例、健常な幹細胞）を補充又は置換するために使用される。

10

【0171】

一部の実施形態では、悪性腫瘍は、移植片対宿主疾患である。

【0172】

また、本開示の範囲内には、再発性及び／又は難治性であると考えられる悪性腫瘍、例えば再発性又は難治性の血液悪性腫瘍などがある。それを必要とする対象は、一部の実施形態では、CD34を標的化する免疫エフェクター細胞治療、例えば、CAR-T細胞治療を受けている、又は受けるであろう対象であり、それにおいて、免疫エフェクター細胞は、CD34を標的化するCARを発現し、及び、それにおいて、免疫エフェクター細胞の少なくともサブセットはまた、それらの細胞表面上にCD34を発現し、又は治療を受けている対象における健常な幹細胞（例、HSC）は、それらの細胞表面上にCD34を発現する。本明細書中で使用されるように、用語「フラトリサイド」は、自己殺傷を指す。例えば、細胞の集団の細胞は、同じ集団の細胞を殺傷する、又はその殺傷を誘導する。一部の実施形態では、免疫エフェクター細胞治療の細胞は、免疫エフェクター細胞治療の他の細胞を殺傷する、又はその殺傷を誘導する。そのような実施形態では、フラトリサイドは、所望の臨床転帰、例えば、対象内でCD34を発現する悪性細胞のアブレーションが達成できる前に、免疫エフェクター細胞の一部又は全集団をアブレーションする。一部のそのような実施形態では、遺伝子操作された免疫エフェクター細胞を使用して、本明細書中で提供されるように、例えば、CD34を発現しない、又はCARにより認識されるCD34バリエーションを発現しない免疫エフェクター細胞が、免疫エフェクター細胞治療の基礎を形成する免疫エフェクター細胞として、そのようなフラトリサイド及び治療転帰に対する関連する負の影響を回避し得る。そのような実施形態では、遺伝子操作された免疫エフェクター細胞は、本明細書中で提供されるように、例えば、CD34を発現しない、又はCARにより認識されるCD34バリエーションを発現しない免疫エフェクター細胞は、また、CD34標的化CARを発現するようにさらに改変され得る。一部の実施形態では、免疫エフェクター細胞は、リンパ球、例えば、Tリンパ球、例えば、アルファ／ベータTリンパ球、ガンマ／デルタTリンパ球、又はナチュラルキラーT細胞などであってもよい。一部の実施形態では、免疫エフェクター細胞は、ナチュラルキラー（NK）細胞であってもよい。

20

30

40

【0173】

一部の実施形態では、免疫エフェクター細胞治療の細胞は、対象においてそれらの細胞表面上にCD34を発現する幹細胞（例、HSC）を殺傷する、又はその殺傷を誘導する。一部の実施形態では、本明細書中に記載される方法は、対象において標的幹細胞ニッチ（例、HSCニッチ）の枯渇をもたらす。一部の実施形態では、本明細書中に記載される方法は、対象における少なくとも一つの非標的幹細胞ニッチにおいて幹細胞のレベル又は生存率を変化させない、又は認識できるほどに変化させない。一部の実施形態では、本明細書中に記載される方法は、対象において特定の型の全ての幹細胞ニッチ（例、全てのHSCニッチ）を標的化する。一部の実施形態では、本明細書中に記載される方法は、対象において幹細胞ニッチ（例、HSCニッチ）の完全な枯渇をもたらす。本明細書中で使用

50

されるように、幹細胞ニッチは、未分化で自己再生可能な状態における幹細胞の集団を含む特定の微小環境を含む対象の解剖学的領域を指す。

【0174】

一部の実施形態では、CD34を発現しない、又はCD34を標的化する免疫療法剤により認識されないCD34のバリエーション形態を発現する遺伝子操作された幹細胞を対象に投与することによって、対象における幹細胞（例、HSC）の供給が補充される。一部の実施形態では、対象に、CD34を発現しない、又はCD34を標的化する免疫療法剤により認識されないCD34のバリエーション形態を発現する遺伝子操作された幹細胞を、CD34を標的化する免疫エフェクター細胞（例、本明細書中で提供される、遺伝子操作された免疫エフェクター細胞、例えば、CD34を発現しない、又はCARにより認識されるCD34バリエーションを発現しない免疫エフェクター細胞、それは、また、CD34標的化CARを発現するようにさらに修飾され得る）との組み合わせにおいて投与する。

10

【0175】

一部の実施形態では、本明細書中に記載される有効数の遺伝子操作された細胞が、CD34の発現の喪失、又はCD34を標的化する免疫療法剤により認識されないCD34のバリエーション形態の発現をもたらすそれらのゲノム中での修飾を含み、それを必要とする対象、例えば、CD34を標的化する免疫療法を受けている、又は受けるであろう対象に投与され、それにおいて、免疫療法は、例えば、CD34を発現する対象における健全な細胞に対する細胞傷害性の形態において、有害なオンターゲット、オフ疾患効果に関連付けられる、又は関連付けられるリスクがある。一部の実施形態では、有効数のそのような遺伝子操作された細胞は、抗CD34免疫療法剤との組み合わせにおいて対象に投与される。

20

【0176】

薬剤（例、CD34改変細胞及び抗CD34免疫療法剤）が組み合わせにおいて投与される場合、細胞及び薬剤は、同時に、又は異なる時間に、例えば、時間的な近接において投与され得ることが理解される。さらに、細胞及び薬剤は、混合されてもよく、又は別々の容量もしくは投与形態において混合されてもよい。例えば、一部の実施形態では、組み合わせにおける投与は、治療の同じ経過における、例えば、抗CD34免疫療法を用いて対象を治療する経過における投与を含み、対象に、有効数の遺伝子操作された、CD34改変細胞を、例えば、治療の前、中、又は後に、抗CD34免疫療法と同時に又は連続的に投与し得る。

30

【0177】

一部の実施形態では、本明細書中に記載されるようにCD34を標的化する免疫療法剤は、CD34に結合することが可能な抗原結合断片（例、一本鎖抗体）を含むキメラ抗原受容体を発現する免疫細胞である。免疫細胞は、例えば、T細胞（例、CD4+又はCD8+T細胞）又はNK細胞であり得る。

【0178】

キメラ抗原受容体（CAR）は、少なくとも細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、及び機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞質シグナル伝達ドメイン、例えば、刺激分子から由来するものを含む組換えポリペプチドを含み得る。一部の実施形態では、細胞質シグナル伝達ドメインは、少なくとも一つの共刺激分子、例えば4-1BB（即ち、CD137）、CD27、及び／又はCD28、又はそれらの分子の断片から由来する1以上の機能的シグナル伝達ドメインをさらに含む。CARの細胞外抗原結合ドメインは、CD34結合抗体断片を含み得る。抗体断片は、1以上のCDR、可変領域（又はその一部分）、定常領域（又はその一部分）、又は前述のいずれかの組み合わせを含み得る。

40

【0179】

キメラ抗原受容体（CAR）は、典型的には、抗原結合ドメイン、例えば、CARフレームワークに融合された抗体断片を含み、それは、ヒンジ領域（例、CD8又はCD28から）、膜貫通ドメイン（例、CD8又はCD28から）、1以上の共刺激ドメイン（例、CD28又は4-1BB）、及びシグナル伝達ドメイン（例、CD3ゼータから）を含

50

み得る。C A Rドメイン及び構成要素の例示的な配列は、例えば、P C T公開W O 2 0 1 9 / 1 7 8 3 8 2において、及び以下の表 3 中に提供される。

表 3：キメラ抗原受容体の例示的な成分

【表 3】

キメラ受容体成分	アミノ酸配列
抗原結合断片	例、scFv、軽鎖-リンカー-重鎖、単一ドメイン抗体、又はナノボディ
共刺激ドメイン	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP SPLFPGPSKPFWVLVVVGGLACYSLLVTV AFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPT RKHYQPYAPPRDFAAYRS (配列番号 19)
アルファ膜貫通ドメイン	IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC (配列番号 20)
膜貫通ドメイン	FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFII FWVRSKRSRLHSDYMNMTPRR PGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (配列番号 21)
4-1BB細胞内ドメイン	KRGRKKLLYIFKQPFMRVQTTQEEDGCS CRFPEEEEGGCEL (配列番号 22)
CD3 ζ 細胞質シグナル伝達ドメイン	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLG RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号 23)

10

20

30

【0180】

一部の実施形態では、それを必要とする対象に投与される、本明細書中で提供される、遺伝子操作された細胞、例、H S C、H P C、又は免疫エフェクター細胞の数は、 10^6 ~ 10^{11} の範囲内である。しかし、この例示的な範囲を下回る又は上回る量も、本開示の範囲内である。例えば、一部の実施形態では、それを必要とする対象に投与される、本明細書中で提供される、遺伝子操作された細胞、例えば、H S C、H P C、又は免疫エフェクター細胞の数は、約 10^6 、約 10^7 、約 10^8 、約 10^9 、約 10^{10} 、又は約 10^{11} である。一部の実施形態では、それを必要とする対象に投与される、本明細書中で提供される、遺伝子操作された細胞、例、H S C、H P C、又は免疫エフェクター細胞の数は、 10^6 ~ 10^9 の範囲内、 10^6 ~ 10^8 の範囲内、 10^7 ~ 10^9 の範囲内、約 10^7 ~ 10^{10} の範囲内、 10^8 ~ 10^{10} の範囲内、又は 10^9 ~ 10^{11} の範囲内である。

40

【0181】

一部の実施形態では、C D 3 4 を標的化する免疫療法剤は、抗体-薬物複合体 (A D C) である。A D C は、毒素又は薬物分子に複合体化された抗体又はその抗原結合断片を含

50

む分子であってもよい。対応する抗原への抗体又はその断片の結合によって、その細胞表面上に抗原を提示する細胞（例、標的細胞）への毒素又は薬物分子の送達が可能になり、それにより標的細胞の死をもたらす。

【0182】

例えば、キメラ抗原受容体の、そのようなキメラ受容体を発現するCAR-T細胞の免疫療法の生成のために、又は抗体-薬物複合体の生成のために使用することができる、CD34に結合する適切な抗体及び抗体断片は、当技術分野の当業者に明らかであろう。適切な抗CD34抗体の例は、限定されないが、EP373Y（Abcam（ウサギ、非複合体化））、クローンQBEnd-10（LifeSpan BioSciences（マウス））、クローンMEC14.7（LifeSpan BioSciences（ラット））、クローンSI16-01（抗体名 ET1606-11；HUABIO（ウサギ））、クローンHPCA1/2598R（biorbyt（ウサギ））、4C8及びヒト化h4C8、4H11、QBEnd-10のcQBEND/10又はhQBEND/10バリエーション、27H2、CIRMA-K4、DS554AB、10C304、9C5、B-C34、RM300、AC136を含む。

10

【0183】

ヒトCD34（mRNA NCBI参照配列：NM_001025109.1、タンパク質NCBI参照配列：NP_001020280.1）を結合することが可能な任意の適切な抗体及び抗原結合断片を、本明細書中に記載される組成物及び方法と併せて使用することができる。それらの細胞質テールの長さにおいて異なる（長い及び短い）、CD34の二つのアイソフォームがある。最近、長いアイソフォームを使用し、免疫原として使用することができる、CD34を発現する安定な細胞株が生成された（例、Adv. Pharm. Bull. 5:69-75, 2015を参照のこと）。CD34、例えばCD34の長いアイソフォームなどは、CD34を結合することが可能な抗体及びその抗原結合断片を同定し、癌及び自己免疫疾患の治療のための適切なCD34標的化免疫療法、例えば、CD34標的化CAR及びCAR-T細胞、又は抗体-薬物複合体を生成するために、ならびに造血幹細胞移植治療前の前治療剤としての使用のために、免疫原として使用することができる。

20

【0184】

一部の適切なCD34抗体、CD34結合抗体断片、及びCD34結合scFvが本明細書中に記載されており、追加の適切なCD34抗体、CD34結合抗体断片、及びCD34結合scFvが、本開示に基づいて当業者に明らかであろう。これらは、限定されないが、例えば、参照により本明細書中に組み入れられる米国特許第5,843,633号において記載されるように、ATCCアクセッション番号AC133.1及びHB 12346から産生及び放出されるCD34結合抗体を含む。

30

【0185】

本明細書中に記載される組成物及び方法と併せて使用され得る適切なCD34結合抗体及びCD34結合抗体フラグメント及びscFvはさらに、CD34抗体のヒト化バリエーション、CD34結合抗体断片、scFv、ならびに、例えば、競合的CD34結合アッセイにより評価されるように、本明細書中に記載されるものと同じCD34エピトープに特異的に結合する任意の抗体、抗体断片、及びscFvを含む。

40

【0186】

抗体-薬物複合体中での使用のために適合性のある毒素又は薬物は、当技術分野において公知であり、当技術分野の当業者には明らかであろう。例えば、Peters et al. Biosci. Rep. (2015) 35 (4): e00225; Beck et al. Nature Reviews Drug Discovery (2017) 16: 315-337; Marin-Acevedo et al. J. Hematol. Oncol. (2018) 11: 8; Elgundi et al. Advanced Drug Delivery Reviews (2017) 122: 2-19を参照のこと。

【0187】

50

一部の実施形態では、抗体－薬物複合体は、抗体及び薬物分子を付着させるリンカー（例、ペプチドリンカー、例えば切断可能なリンカーなど）をさらに含み得る。

【0188】

抗体－薬物複合体のための適切な毒素又は薬物の例は、限定されないが、ブレンツキシマブベドチン、グレンバツムマブベドチン／CDX-011、デパツキズマブマフオドチン／ABT-414、PSMA ADC、ポラツズマブベドチン／RG7596／DCDS4501A、デニンツズマブマホドチン／SGN-CD19A、AGS-16C3F、CDX-014、RG7841／DLYE5953A、RG7882／DMUC406A、RG7986／DCDS0780A、SGN-LIV1A、エンフォルツマブベドチン／ASG-22ME、AG-15ME、AGS67E、テリソツズマブベドチン／ABBV-399、ABBV-221、ABBV-085、GSK-2857916、ティソツマブベドチン／HuMax-TF-ADC、HuMax-AxL-ADC、ピナツズマブベドチン／RG7593／DCDT2980S、リファツズマブベドチン／RG7599／DNIB0600A、インデュサツマブベドチン／MLN-0264／TAK-264、バンドルツズマブベドチン／RG7450／DSTP3086S、ソフィツズマブベドチン／RG7458／DMUC5754A、RG7600／DMOT4039A、RG7336／DEDN6526A、ME1547、PF-06263507／ADC5T4、トラスツズマブエムタンシン／T-DM1、ミルベツキシマブソラフタンシン／IMGN853、コルツキシマブラヴタンシン／SAR3419、ナラツキシマブエムタンシン／IMGN529、インダツキシマブラヴタンシン／BT-062、アネツマブラヴタンシン／BAY94-9343、SAR408701、SAR428926、AMG224、PCA062、HKT288、LY3076226、SAR566658、ロルボツズマブメルタンシン／IMGN901、カンツズマブメルタンシン／SB-408075、カンツズマブラヴタンシン／IMGN242、ラブリツキシマブエムタンシン／IMGN289、IMGN388、ビバツズマブメルタンシン、AVE9633、BIIB015、MLN2704、AMG172、AMG595、LOP628、バダツキシマブタリリン／SGN-CD33A、SGN-CD70A、SGN-CD19B、SGN-CD123A、SGN-CD352A、ロバルピツズマブテシリン／SC16LD6.5、SC-002、SC-003、ADCT-301／HuMax-TAC-PBD、ADCT-402、MEDI3726／ADC-401、IMGN779、IMGN632、ゲムツズマブオゾガマイシン、イノツズマブオゾガマイシン／CMC-544、PF-06647263、CMD-193、CMB-401、トラスツズマブデュオカルマジン／SYD985、BMS-936561／MDX-1203、サシツズマブゴビテカン／IMMU-132、ラベツズマブゴビテカン／IMMU-130、DS-8201a、U3-1402、ミラツズマブドキシソルビシン／IMMU-110／hLL1-DOX、BMS-986148、RC48-ADC／ヘルツズマブvc-MMAE、PF-06647020、PF-06650808、PF-06664178／RN927C、ルパルツマブアマドチン／BAY1129980、アプルツマブイクサドチン／BAY1187982、ARX788、AGS62P1、XMT-1522、AbGn-107、MEDI4276、DSTA4637S／RG7861中に含まれる毒素及び薬物を含む。

【0189】

一部の実施形態では、細胞表面系統特異的タンパク質のエピトープへの抗体－薬物複合体の結合によって、抗体－薬物複合体の内部移行が誘導されて、薬物（又は毒素）が細胞内に放出され得る。一部の実施形態では、細胞表面系統特異的タンパク質のエピトープへの抗体－薬物複合体の結合によって、毒素又は薬物の内部移行が誘導されて、それによって、毒素又は薬物は、系統特異的タンパク質（標的細胞）を発現する細胞を殺傷することが可能になる。一部の実施形態では、細胞表面系統特異的タンパク質のエピトープへの抗体－薬物複合体の結合によって、毒素又は薬物の内部移行が誘導されて、それによって、毒素又は薬物は、系統特異的タンパク質（標的細胞）を発現する細胞の活性が調節され得

10

20

30

40

50

る。本明細書中に記載される抗体－薬物複合体において使用される毒素又は薬物の種類は、任意の特定の種類に限定されない。

【0190】

一般的な技術

本開示の実践は、他に示されない限り、分子生物学（組換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学、及び免疫学の従来的な技術を用いるが、それらは、当技術分野の技能の内である。そのような技術は、文献、例えばMolecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook, et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed. 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, ed., 1989) Academic Press; Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed. 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds. 1993-8) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel, et al. eds. 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis, et al., eds. 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C. A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practice approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds. Harwood Academic Publishers, 1995); DNA Cloning: A practical Approach, Volumes I and II (D. N. Glover ed. 1985); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1985); Transcription and Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds. (1984); Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed. (1986); Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, (1986); and B. Perbal, A practical Guide To Molecular Cloning (1984); F. M. Ausubel et al. (eds.) において十分に説明されている。

10

20

30

40

50

【0191】

さらなる詳述を伴うことなく、当業者は、上の記載に基づいて、本開示をその最も完全な程度まで利用することができると考えられる。以下の特定の実施形態は、従って、単に例示的として解釈されるべきであり、いかなる、任意の方法において、本開示の残り部分を限定するものではない。本明細書中で引用される全ての刊行物が、本明細書中で参照される目的又は主題のために参照により組み入れられる。

【0192】

本明細書中で言及される全ての刊行物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、参照によりその全体において組み入れられる。また、材料、方法、及び実施例は例示的のみであり、限定することを意図しない。他に定義されない場合、本明細書中で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野における当業者により一般に理解されているのと同じ意味を有する。本明細書中に記載されるものと類似又は同等の方法及び材料を、本発明の実践又はテストにおいて使用することができるが、適切な方法及び材料が本明細書中に記載されている。

10

【0193】

本開示は、以下の実施例によりさらに例証される。実施例は、例証的な目的のみのために提供される。それらは、本開示の範囲又は内容を任意の方法において限定しているとして解釈されるべきではない。

【実施例】

【0194】

実施例1：ヒト細胞におけるCD34の遺伝子編集
sgRNA構築物の設計

20

【0195】

表1及び2中に示される標的ドメイン及びgRNAは、標的領域に近接する、例えば、適用可能なヌクレアーゼ、例えば、Cas9についてのPAM配列のための手動検査により設計され、オンライン検索アルゴリズム（例、Benchlingアルゴリズム、Donench et al 2016、Hsu et al 2013）を用いてヒトゲノム中の潜在的なオフターゲット部位を最小化することにより、予測される特異性に従って優先順位付けされた。図1及び2A～2Cは、CD34遺伝子内の例示的なgRNAの位置を示す。全ての設計された合成sgRNAが、5'及び3'末端の両方の三つの末端位置で、化学的に修飾されたヌクレオチドを伴って産生された。修飾ヌクレオチドは、2'-O-メチル-3'-ホスホロチオエート（「ms」として省略される）を含み、ms-sgRNAをHPLC精製した。

30

【0196】

ヒトCD34+HSCの編集

【0197】

凍結CD34+HSCを、製造業者の指示に従って解凍した。HSCを編集するために、HSCを解凍し、図3A中に示すように、RNPでのエレクトロポレーション前の約48時間にわたり、StemSpan CC110カクテル（StemCell Technologies）を添加したStemSpan SFEM培地中で培養した。HSCをエレクトロポレーションするために、約 2×10^5 個の細胞をペレット化し、エレクトロポレーション溶液中に再懸濁し、RNPの形態において3µgのCas9及び3µgのgRNAと混合した。CD34+HSCを、標準的なエレクトロポレーション手順を使用してエレクトロポレーションした。実験条件を表4中に提供する。

40

【0198】

表4.

50

【表 4】

細胞の数	条件	Cas9	ガイド濃度
200K	偽エレクトロポレーション (偽)	0	0
200K	陽性対照	3ug	3ug
200K	Cas9+gRNA CD34-1	3ug	3ug
200K	Cas9+gRNA CD34-2	3ug	3ug
200K	Cas9+gRNA CD34-3	3ug	3ug
200K	Cas9+gRNA CD34-4	3ug	3ug
200K	Cas9+gRNA CD34-5	3ug	3ug
200K	Cas9+gRNA CD34-1	3ug	3ug
200K	Cas9+gRNA CD34-2	3ug	3ug
200K	Cas9+gRNA CD34-3	3ug	3ug
200K	Cas9+gRNA CD34-4	3ug	3ug
200K	Cas9+gRNA CD34-5	3ug	3ug
200K	エレクトロポレーションなし (EPなし)	0	0

10

20

30

40

【0199】
ゲノムDNA分析

【0200】
エレクトロポレーション後の約48時間に、細胞を、細胞数、生存率分析、精製、及びシーケンシングのために収集した。全てのゲノム分析について、DNAを細胞から収集し、標的領域に隣接するプライマーで増幅し、精製し、アレル改変頻度を、TIDE（分解によるインデルの追跡）を使用して分析した。分析を、偽トランスフェクトサンプルからの参照配列を使用して実施した。

【0201】

50

ヒトCD34+細胞をCas9タンパク質でエレクトロポレーションし、上に記載されるように、CD34標的化gRNAを示した。編集率を、TIDE分析により評価されたように、%インデルにより決定した。編集効率は、図3D及び図4中に示されるように、TIDE分析により決定された。

【0202】

フローサイトメトリー分析

【0203】

CD34 gRNA編集細胞はまた、例えば、フローサイトメトリー分析(FACS)により、CD34タンパク質の表面発現について評価されてもよい。生きているHSCは、抗CD34抗体を使用してCD34について染色され、Attune NxTフローサイトメーター(Life Technologies)上でのフローサイトメトリーにより分析される。CD34遺伝子が遺伝子改変された細胞は、FACSにより検出されたCD34発現における低下を示す。

10

【0204】

編集された細胞の生存率

【0205】

ex vivo編集後24時間及び48時間に、生存可能な編集CD34KO細胞及び対照細胞の平均細胞数及びパーセンテージを、フローサイトメトリー及び7AAD生存率染料を使用して定量化した。図3B及び3C中に示されるように、本明細書中に記載されるCD34 gRNAを使用して編集されたCD34KO細胞は、生存可能であったが、エレクトロポレーション及び遺伝子編集後の時間にわたり生存可能なままであり、CD5、偽編集細胞、及びエレクトロポレーションされなかった細胞を標的化するgRNAでの対照細胞編集において観察されるものと類似している。

20

【0206】

実施例2：大規模エレクトロポレーション－96時間の時点

凍結CD34+HSCを、製造業者の指示に従って解凍した。HSCを編集するために、~HSCを解凍し、図5A中に示すように、RNPでのエレクトロポレーション前の約48時間にわたり、StemSpan CC110カクテル(StemCell Technologies)を添加したStemSpan SFEM培地中で培養した。HSCをエレクトロポレーションするために、約 1×10^6 個の細胞をペレット化し、エレクトロポレーション溶液中に再懸濁し、15 µgのCas9及び15 µgのgRNAとRNPの形態において混合した。CD34+HSCを、標準的なエレクトロポレーション手順を使用してエレクトロポレーションした。実験条件を表5中に提供する。

30

【0207】

表5.

40

50

【表 5】

細胞の数	条件	Cas9	ガイド濃度
1M	Cas9+gRNA CD34-2	15ug	15ug
1M	Cas9+gRNA CD34-3	15ug	15ug
1M	Cas9+gRNA CD34-5	15ug	15ug
1M	偽エレクトロポレーション (偽)		
1M	エレクトロポレーションなし (EPなし)		

10

【0208】

20

エレクトロポレーション後24時間及び96時間に、細胞を、細胞数、生存率分析、精製、及びシーケンシング分析のために収集した。示されるCD34 gRNAを使用して編集された細胞の細胞数及び生存率は、図5B及び5C中に示されるように、偽編集細胞（偽）又はエレクトロポレーションされなかった細胞（EPなし）と同様のレベルの生存率を有することが見出された。

【0209】

CD34 gRNA編集細胞がまた、抗CD34抗体（抗CD34-PEテキサスレッド）を使用したフローサイトメトリー分析（FACS）により、CD34タンパク質の表面発現について評価された。CD34遺伝子が遺伝子改変された細胞は、FACSにより検出されたように、低下したCD34発現を有することが見出された。図6A、6B、及び7A～7Dを参照のこと。

30

【0210】

実施例3：大規模エレクトロポレーション－168時間の時点

凍結CD34+HSCを、製造業者の指示に従って解凍した。HSCを編集するために、～HSCを解凍し、図8中に示すように、RNPでのエレクトロポレーション前の約48時間にわたり、StemSpan CC110カクテル（StemCell Technologies）を添加したStemSpan SFEM培地中で培養した。HSCをエレクトロポレーションするために、約 1×10^6 個の細胞をペレット化し、エレクトロポレーション溶液中に再懸濁し、15 µgのCas9及び15 µgのgRNAとRNPの形態において混合し、次に標準的なエレクトロポレーション手順を使用してエレクトロポレーションした。実験条件が、表6中に提供されている。

40

【0211】

表6。

50

【表 6】

細胞の数	条件	Cas9	ガイド濃度
1M	Cas9+gRNA CD34-2	15ug	15ug
1M	Cas9+gRNA CD34-3	15ug	15ug
1M	偽エレクトロポレーション (偽)		
1M	エレクトロポレーションなし (EPなし)		

10

【0212】

20

エレクトロポレーション後24、48、120、144、及び168時間に、細胞を、細胞数、生存率分析、精製、及びシーケンシング分析のために収集した。示されるCD34 gRNAを使用して編集された細胞の細胞数及び生存率は、偽編集細胞（偽）又はエレクトロポレーションされなかった細胞（EPなし）と同様の生存率を有することが見出された。

【0213】

30

CD34 gRNA編集細胞がまた、抗CD34抗体（抗CD34-PEテキサスレッド）を使用したフローサイトメトリー分析（FACS）により、CD34タンパク質の表面発現について評価された。エレクトロポレーション後の48時間で、CD34遺伝子が遺伝子改変された細胞は、FACSにより検出されたように、低下したCD34発現をわずかに有することが見出された。図9A及び9Bを参照のこと。しかし、エレクトロポレーション後の168時間で、CD34遺伝子が遺伝子改変された細胞は、FACSにより検出されたように、低下したCD34発現を有することが見出された。図10A及び10Bを参照のこと。

【0214】

実施例4：CAR-T細胞傷害性アッセイ

表1又は2中に示されるgRNAを使用して産生された遺伝子改変細胞は、CD34-CAR T細胞による殺傷について評価されてもよい。

【0215】

40

CAR構築物及びレンチウイルス産生

【0216】

第二世代のCARは、CD34を標的化するように構築される。例示的なCAR構築物は、CD8αシグナルペプチド、CD8αヒンジ及び膜貫通領域、4-1BB共刺激性ドメイン、ならびにCD3ξシグナル伝達ドメインを使用した、細胞外scFv抗原結合ドメインからなる。抗CD34 scFv配列は、当技術分野において公知の任意の抗CD34抗体から得られ得る。標的についてのCAR cDNA配列は、pCDH-EF1α-MCS-T2A-GFP発現ベクターの複数のクローニング部位中にサブクローニングされ、レンチウイルスは、製造業者のプロトコル（System Biosciences）に従って生成される。レンチウイルスは、リポフェクタミン3000（ThermoFisher）を使用した293TN細胞（System Biosciences）の一

50

過性トランスフェクションにより生成することができる。例示的なCAR構築物は、抗CD34抗体の軽鎖及び重鎖を、CD8 α ヒンジドメイン、ICOS膜貫通ドメイン、ICOSシグナル伝達ドメイン、4-1BBシグナル伝達ドメイン、及びCD3 ξ シグナル伝達ドメインに、レンチウイルスプラスミドpHIIV-ZsGreen中にクローニングすることにより生成される。

【0217】

CAR形質導入及び増殖

【0218】

ヒト初代T細胞は、製造業者のプロトコル (Stem Cell Technologies) に従って、抗CD4及び抗CD8マイクロビーズを使用した磁気ビーズ分離により、Leuko Pak (Stem Cell Technologies) から単離される。精製CD4+及びCD8+ T細胞を1:1で混合し、抗CD3/CD28結合Dynabeads (Thermo Fisher) を使用して、1:1のビーズ対細胞比率で活性化させる。使用されるT細胞培養培地は、免疫細胞血清置換、L-グルタミン及びGlutaMAX (全てThermo Fisherから購入) 及び100IU/mLのIL-2 (PeproTech) を添加されたCTS Optimizer T細胞増殖培地である。T細胞形質導入は、ポリブレン (Sigma) の存在においてスピノキュレーションによる活性化後24時間を実施される。CAR-T細胞を、凍結保存前に9日間にわたり培養する。全ての実験の前に、T細胞を解凍し、37℃で4~6時間にわたり休ませる。

【0219】

フローサイトメトリーベースのCAR-T細胞傷害性アッセイ

【0220】

標的細胞の細胞傷害性は、陰性対照細胞の生存率に対して、標的細胞の生存率を比較することにより測定される。CD34細胞傷害性アッセイについては、CD34+細胞を標的細胞として使用してもよく、CD34において欠損している、又はCD34の低下発現を有するCD34+細胞を、実施例1~3において記載されるように生成してもよい。

【0221】

標的細胞及び陰性対照細胞は、それぞれ、製造業者の指示に従って、CellTrace Violet (CTV) 及びCFSE (Thermo Fisher) で染色される。染色後、標的細胞及び陰性対照細胞を1:1で混合する。

【0222】

抗CD34 CAR-T細胞は、エフェクターT細胞として使用される。非形質導入T細胞 (偽CAR-T) が対照として使用される。エフェクターT細胞を、標的細胞/陰性対照細胞混合物と、1:1のエフェクター対標的比率で、二通りに共培養する。エフェクターT細胞を伴わない標的細胞/陰性対照細胞混合物単独の群を、対照として含む。細胞を、フローサイトメトリー分析の前に、37℃で24時間にわたりインキュベートする。ヨウ化プロピジウム (Thermo Fisher) を生存染料として使用する。特異的な細胞溶解の算出のために、生陰性対照細胞に対する生標的細胞の分画 (標的分画と呼ばれる) が使用される。特異的な細胞溶解は、(エフェクター細胞を伴わない標的分画-エフェクター細胞を伴う標的分画) / (エフェクターを伴わない標的分画) $\times 100\%$ として算出される。

【0223】

実施例5: 操作されたHSCに対する抗CD34抗体薬物複合体の効果

表X中に示されるgRNAを使用して産生された遺伝子改変された細胞は、抗体-薬物複合体、例えば免疫毒素に対する抗CD34抗体などにより殺傷について評価されてもよい。

【0224】

動員された末梢血から由来する凍結CD34+HSPCを解凍し、Cas9及びsgRNAを含むリボ核タンパク質でのエレクトロポレーション前の72時間にわたり培養した

10

20

30

40

50

。サンプルは、以下の条件でエレクトロポレーションされる：

i . 偽 (C a s 9 のみ)、及び

i i . K O s g R N A (例えば、表 X 中に示される C D 3 4 g R N A のいずれか一つなど)。

細胞を 7 2 時間にわたり回復させ、ゲノム D N A を回収して分析する。C D 3 4 陽性細胞のパーセンテージをフローサイトメトリーにより評価し、C D 3 4 g R N A を用いた編集が、C D 3 4 発現のノックアウト又は低下させる際に有効であることを確認する。H S C 中での編集現象は、様々なインデル配列をもたらす。

【0225】

抗体－薬物複合体に対する、C D 3 4 欠失を有する細胞の感受性

10

【0226】

i n v i t r o 毒性を決定するために、細胞を、培養培地中で抗体－薬物複合体とインキュベートし、生存細胞の数を経時的に定量化する。C D 3 4 において欠損している、又は本明細書中に記載される C D 3 4 g R N A で生成された、低下した C D 3 4 発現を有する、操作された細胞は、全長 C D 3 4 (偽)を発現する細胞よりも、抗体－薬物複合体処理に対してより耐性である。

【0227】

(i i) C D 3 4 編集細胞の濃縮

【0228】

C D 3 4 改変細胞が、抗体－薬物複合体での処理後に濃縮されているか否かをアッセイするために、H S P C は、標準ヌクレアーゼ (例、C a s 9、C p f 1) 対 g R N A の比率の 5 0 % で編集される。細胞のバルク集団は、抗体－薬物複合体を用いた処理の前及び後に分析される。抗体－薬物複合体を用いた処理後、C D 3 4 編集細胞が濃縮され、C D 3 4 欠損細胞のパーセンテージが増加するようにする。

20

【0229】

(i i i) C D 3 4 編集 H S P C の i n v i t r o 分化

【0230】

細胞集団は、分化後の様々な日に、抗体－薬物複合体での治療の前及び後にリンパ球分化について評価される。本明細書中に記載される C D 3 4 g R N A を用いて生成された、操作された C D 3 4 ノックアウト細胞は、分化マーカーの増加発現を示し得るのに対し、全長 C D 3 4 (偽)を発現する細胞は分化しないことがある。

30

【0231】

実施例 6 : i n v i v o での C D 3 4 K O 細胞の持続性の評価。

動員された末梢血 C D 3 4 + H S C (m P B C D 3 4 + H S P C) における編集。

【0232】

g R N A (S y n t h e g o) は、実施例 1 ~ 3 において記載されるように設計された。m P B C D 3 4 + H S P C は、F r e d H u t c h i n s o n C a n c e r C e n t e r から購入され、製造業者の指示に従って解凍される。これらの細胞は次に、本明細書中に記載される C D 3 4 標的化 g R N A、ならびにヒトゲノム又はマウスゲノム中の任意の領域を標的化しないように設計された非 C D 3 4 標的化対照 g R N A (g C t r l) を使用して、実施例 1 ~ 3 において記載されるように、C R I S P R / C a s 9 を介して編集される。

40

【0233】

e x v i v o 編集後 4、2 4、及び 4 8 時間に、生存可能な、編集された C D 3 4 K O 細胞及び対照細胞のパーセンテージを、フローサイトメトリー及び 7 A A D 生存染料を使用して定量化する。本明細書中に記載される C D 3 4 g R N A を使用して編集された高レベルの C D 3 4 K O 細胞は、生存可能であり、エレクトロポレーション及び遺伝子編集後の時間にわたり生存可能なままであり得るが、非 C D 3 4 標的化対照 g R N A、g C t r l で編集された対照細胞中で観察されるものと同程度である。

【0234】

50

加えて、*ex vivo*編集後48時間に、インデル（挿入／欠失）により評価される編集パーセンテージを決定するために、実施例1～3において記載されるように、ゲノムDNAを細胞から収集し、標的領域に隣接するプライマーでPCR増幅し、精製し、TIDEにより分析する。

【0235】

TIDE分析後、本明細書中に記載されるCD34 gRNAを用いた編集後の長期HSC（LT-HSC）のパーセンテージを、フローサイトメトリーにより定量化する。特定されたCD34 gRNAを用いた編集後のLT-HSCのパーセンテージを評価する。このアッセイは、例えば、*in vivo*でのCD34 KO細胞の持続性の検討のために、マウス中への注射前に、編集細胞の凍結保存時に実施され得る。編集細胞を、1バイアル当たり1mLの培地容量中で、 5×10^6 細胞/mLでCS10培地（Stem Cell Technology）中で凍結保存する。

10

【0236】

*in vivo*でのCD34 KO mPB HSPCの生着効率及び持続性を検討する。

【0237】

6～8週齢である雌NSGマウス（JAX）を、2～7日間にわたり順化させる。順化後、マウスに、X線照射器による175cGy全身照射を使用して照射する。これを、検討の0日目とみなす。4～10時間に、照射後、マウスに、本明細書中に記載されるCD34 gRNAのいずれかの間に生成されたCD34 KO細胞、又はgCtrlで編集された対照細胞で生着させる。凍結保存細胞を解凍し、BioRad TC-20自動細胞カウンターを使用して計数する。生細胞の数を、解凍されたバイアル中で定量化し、それは、マウスにおける生着のための細胞の総数を調製するために使用する。マウスに、100μL容量中での 1×10^6 個の編集細胞の単回静脈内注射を与える。体重及び臨床観察所見を、4群中の各マウスについて週1回記録する。

20

【0238】

生着後8及び12週目に、50μLの血液を、フローサイトメトリーによる分析のために、後眼窩出血により各マウスから回収する。16週目に、生着後、マウスを殺し、血液、脾臓、及び骨髄を、フローサイトメトリーによる分析のために回収する。骨髄を、大腿骨及び脛骨から単離する。大腿骨からの骨髄も、オンターゲット編集分析のために使用する。フローサイトメトリーを、FACSCanto（商標）10カラー及びBD FACSDiva（商標）ソフトウェアを使用して実施する。細胞は一般的に、最初に7AAD生存率染料を使用して生存率により選別され（生／死分析）、次に生細胞は、ヒトCD45（hCD45）の発現によりゲーティングされるが、しかし、マウスCD45（mCD45）ではされない。hCD45+である細胞を次に、ヒトCD19（hCD19）（リンパ球細胞、具体的にはB細胞）の発現についてさらにゲーティングする。ヒトCD45（hCD45）を発現する細胞もゲーティングし、骨髄系列の様々な細胞マーカーの存在について分析する。

30

【0239】

いずれの編集細胞が生着されたかに関わらず、全てのマウスにわたり同程度である、分析マーカーの各々を発現する細胞の数は、マウスの血液中のCD34 gRNAで編集されたCD34 KO細胞の成功裏の生着を示す。

40

【0240】

生着後8、12、及び16週目に、hCD45+である有核血液細胞のパーセンテージが、対照gRNA（gCtrl）で編集された対照細胞、又はCD34 KO細胞を受けたマウス（ $n=15$ マウス／群）の群において定量化される。これは、hCD45+絶対細胞数をマウスCD45+（mCD45）絶対細胞数により割ることにより定量化される。

【0241】

血液中のhCD34+細胞のパーセンテージも、対照群及びCD34 KOマウス群における生着後の8週目に定量化する。CD34 KO細胞（本明細書中に記載されるCD34 gRNAのいずれかで編集された）で生着されたマウスは、8、12、及び16週目に対

50

照細胞で生着されたマウスと比較して、有意に低いレベルの h C D 3 4 + 細胞を有すると予測される。

【 0 2 4 2 】

次に、血液中の分化細胞、例えば C D 1 9 + リンパ系細胞、h C D 1 4 + 単球、及び h C D 1 1 b + 顆粒球／好中球などの特定の集団のパーセンテージを、C D 3 4 K O 細胞又は対照細胞で生着されたマウスにおける生着後 8、1 2、及び 1 6 週目に定量化する。血液中での h C D 1 9 + 細胞、h C D 1 4 + 細胞、及び h C D 1 1 b + 細胞のレベルは、対照と C D 3 4 K O 群の間で同等であり、これらの細胞のレベルは、生着後 8 ～ 1 6 週まで同等なままであった。血液中での h C D 1 9 +、h C D 1 4 +、及び h C D 1 1 b + 細胞の同程度のレベルは、ヒト骨髓細胞及びリンパ細胞集団の類似のレベルが、C D 3 4 K O 細胞を受けたマウス及び対照細胞を受けたマウスにおいて存在することを示す。

10

【 0 2 4 3 】

最後に、アンブリコン - s e q が、生着後 1 6 週目に単離された骨髓サンプル上で実施され、編集 C D 3 4 K O 細胞で生着されたマウスにおけるオンターゲット C D 3 4 編集を分析し得る。

【 0 2 4 4 】

生着動物の脾臓から得られた細胞サンプルを評価する。

【 0 2 4 5 】

生着後 1 6 週目に、h C D 4 5 + 細胞のパーセンテージ及び h C D 3 4 + 細胞のパーセンテージがまた、対照細胞又は C D 3 4 K O 細胞で生着されたマウスの脾臓において定量化される。マウス（対照細胞又は C D 3 4 K O 細胞で生着）の群間での h C D 4 5 + 細胞の同程度のレベル及び h C D 3 4 + 細胞の低下したレベルは、N S G マウスの脾臓における C D 3 4 K O H S C の長期持続性を示し得る。

20

【 0 2 4 6 】

加えて、生着後の 1 6 週目に、脾臓中の h C D 1 4 + 単球、h C D 1 1 b + 顆粒球／好中球、C D 1 9 + リンパ系細胞、及び h C D 3 + T 細胞のパーセンテージが定量化される。対照群と C D 3 4 K O 群の間での脾臓における h C D 1 4 + 細胞、h C D 1 1 b + 細胞、h C D 1 9 + 細胞、及び h C D 3 + の同程度のレベルは、編集 C D 3 4 K O 細胞が、N S G マウスの脾臓においてヒト造血細胞再構成を多系統化することが可能であることを示し得る。

30

【 0 2 4 7 】

血液及び骨髓好中球を評価する。

【 0 2 4 8 】

生着後 1 6 週目に、h C D 1 1 b + 細胞のパーセンテージが、対照細胞又は C D 3 4 K O 細胞で生着されたマウスの血液及び骨髓において定量化される。N S G マウスの血液及び骨髓の両方において対照細胞及び C D 3 4 K O 細胞で生着されたマウスにおいて観察された、C D 1 1 b + 好中球集団の同程度のレベルは、成功裏の生着及び分化を示す。

【 0 2 4 9 】

血液及び骨髓骨髓性 (bone marrow myeloid) 及びリンパ系前駆細胞を評価する。

【 0 2 5 0 】

また、1 6 週目に、血液中の h C D 1 2 3 + 細胞のパーセンテージ及び骨髓中の h C D 1 2 3 + 細胞のパーセンテージ、ならびに骨髓中の h C D 1 0 + 細胞のパーセンテージが、対照細胞又は C D 3 4 K O 細胞で生着されたマウスにおいて定量化される。対照群と C D 3 4 K O 群の間での骨髓前駆細胞及びリンパ系前駆細胞の同程度のレベルは、成功裏の生着及び発生を示し得る。

40

【 0 2 5 1 】

実施例 7 : C D 3 4 編集 H S C コロニー形成単位 (C F U) の遺伝子型分析。

本実施例によって、分化前の C F U 分析及びインデル分析による例示的 C D 3 4 編集の特徴付けが実証される。H S C を、例示的なガイド R N A : C D 3 4 - 2 又は C D 3 4 - 3 を使用して編集した。

50

【0252】

図11Aは、本実施例及び後の実施例におけるHSC編集のために用いられる実験アプローチを示す。簡単には、 2×10^6 個の凍結CD34⁺HSCを解凍し、StemSpan CC110カクテル (StemCell Technologies) が添加されたStemSpan SFEM培地中で、RNPでのエレクトロポレーション後約48時間にわたり培養した。約 2×10^5 個の細胞をペレット化し、エレクトロポレーション溶液中に再懸濁し、RNPの形態において3 μ gのCas9及び3 μ gのgRNAと混合した。CD34⁺HSCは、標準的なエレクトロポレーション手順を使用してエレクトロポレーションされた。 2×10^5 個の細胞が、編集用のサンプル (CD34-2及びCas9を含むRNPで、又はCD34-3及びCas9を含むRNPでエレクトロポレーションされた)、ならびに無エレクトロポレーション (EPなし) 対照、及び対照ガイド (ヒトゲノム中の任意の領域を標的化しないように設計されている対照ガイドRNAを含むRNP) でエレクトロポレーションされたサンプル中に含まれた。

10

【0253】

編集CD34 HSC CFUの評価

【0254】

CFUレベルは、偽処置を受けた編集HSC及びHSCにおいて類似していた (図11B~11C)。これらの結果は、CD34編集が細胞分化に影響しないことを示唆する。TIDE分析を使用して、CD34-2 (ガイド2) 及びCD34-3 (ガイド3) を使用して得られた個々のCD34編集BFU及びCFUにおける編集効率を決定した。適切な編集効率が、分析されたBFU及びCFUの大部分において観察された (図11D及び11E)。CD34編集HSCにおいて生成された編集の分析は、+1インデルが、CD34-2を使用して編集された細胞において優占種 (72%) であり、転写物の早期終結に導くフレームシフトをもたらした (図11F、11L、11N、及び11P)。CD34-2を使用して編集することにより産生されるインデルの優占種は、このように、切断タンパク質の産生に導く。CD34-3編集細胞は、-12インデルが優占種 (32%) であり、4アミノ酸の欠失をもたらし、-1インデル (24%) が続き、転写物の早期終結に導くフレームシフトをもたらした (図11G、11O、及び11Q)。

20

【0255】

BFU及びCFUをさらに分析して、編集が単一アレル又は両アレルかを決定した。ガイドCD34-2及びCD34-3を使用して得られたCD34編集BFU及びCFUにおいて生成された編集の分析は、高いパーセンテージの両アレル編集を示した (図11H~11K)。両アレル編集が、CFUとBFUの両方において調べられた二つのガイドについて観察された (図11J及び11K)。個々のコロニーにおけるインデル分析によって、ガイドCD34-2については優占の+1インデルならびにガイドCD34-3については優占の-12及び-1インデルSが確認された (図11L~11O)。両方のガイドについての優占のインデル種の分析によって、ガイドCD34-2についての+1インデルが、早期終結及び切断をもたらす一方で (図11N)、ガイドCD34-3についての優占の-12インデルが、CD34の細胞外ドメインにおける4アミノ酸の欠失をもたらし、このガイドについての次の最も頻度の高い-1インデルが、早期終結及び切断をもたらす (図11Q) ことが示された。

30

40

【0256】

CD34ノックアウト経時試験

【0257】

三つの異なるドナーHSCサンプル (ドナー1、ドナー2、及びドナー3) の生存率を、ガイドRNA CD34-2又はCD34-3を使用したCD34編集後に評価した。細胞を調製し、上に記載されるようにエレクトロポレーションした。ex vivo編集後24時間及び48時間に、生きたCD34編集細胞 (ガイドCD34-2及びCD34-3を使用) 及び対照細胞 (エレクトロポレーションされていない (EPなし) 又はCD34を標的化しない対照ガイド (sgCTRL) を使用してエレクトロポレーションされて

50

いない)の平均細胞数及びパーセンテージを定量化した。CD34編集細胞は生存可能であり、エレクトロポレーション及び遺伝子編集後の時間にわたり生存可能なままであったが、生存率における有意差は、対照gRNAでエレクトロポレーションされた対照細胞、及びエレクトロポレーションされなかった細胞と比較して、CD34編集細胞において観察されなかった(図12A~12C)。

【0258】

全てのゲノム分析について、DNAを細胞から収集し、標的領域に隣接するプライマーで増幅し、精製し、アレル改変頻度を、TIDE(分解によるインデルの追跡)を使用して分析した。参照として「EPなし」及び「sgCTRL」の両方のデータセットを使用した編集細胞のICE分析によって、インデル生成が48時間の時点で検出可能であり、CD34-2ガイド(図12D、12F、及び12H)又はCD34-3ガイド(図12E、12G、及び12I)のいずれかで編集された全ての三つの編集ドナーHSCサンプルにおいて216時間の時点で存在したままであることが示された。編集されたドナーHSCにおいて存在するインデルの優占種は、実施例の前述の部分において観察されたものに対応する。

【0259】

編集HSCにおける表面CD34発現における低下が、一部の例では、エレクトロポレーション後48時間という早期に、及び全てのドナーサンプル中では、エレクトロポレーション後120時間にフローサイトメトリーにより検出された(図12J~12V)。これらの結果によって、例示的なガイドCD34-2又はCD34-3のいずれか一つを使用した、HSCの三つのドナーサンプルにおけるCD34の成功裏の破損が確認される。異なる時点でのCD34+細胞のパーセントを、ガイドCD34-2又はCD34-3を使用して編集されたサンプルについて、ならびに「EPなし」及び「sgCTRL」対照サンプルについて、二つの異なるドナーと一緒に平均して算出した(図12W)。結果及び算出された標準偏差によって、ドナーにわたり、二つの例示的なガイドにより編集することにより、CD34+細胞の頻度が有意に低下し、CD34-2でのエレクトロポレーション後の216時間に検出可能なCD34発現を示さない約85%の細胞を伴う集団、及びCD34-3でのエレクトロポレーション後216時間に検出可能なCD34発現を示さない70%を上回る細胞を伴う細胞集団が産生されたことが示される。

【0260】

実施例8:CD34骨髓細胞の*in vitro*分化(IVD)。

本実施例によって、本明細書中で提供される例示的なガイドRNAを使用した編集後のCD34編集ヒトHSPCの*in vitro*分化能力の特徴付けが実証される。細胞集団を、顆粒球性及び単球性誘導培地条件において細胞を培養することにより達成された分化後の様々な日に、ガイドCD34-2又はCD34-3を使用してCD34のCRISPR/Cas9編集時に骨髓分化について評価した。続く実験アプローチを図13A中に示す。

【0261】

*in vitro*分化HSCにおける編集結果の評価

【0262】

エレクトロポレーション後48時間に、PCR増幅、続いてゲル電気泳動によって、IVD培地中で培養された細胞における編集されたゲノムDNAの存在が確認された(図13B)。エレクトロポレーション後48時間に編集HSCから収集されたDNAのTIDE分析によって、CD34-2処理細胞における+1位置に、ならびにCD34-3処理細胞における-1及び-12位置にインデル生成の編集効率を決定し、成功裏の編集結果を確認した(図13C及び13D)。CD34編集HSCから生じる分化細胞の免疫表現型分析によって、CD34編集が、EPなし及びgCTRL対照HSCと比較して、CD34編集細胞の分化能に影響しなかったことが実証された(図13E~13L)。分化マーカーの発現における有意差は、CD34編集細胞集団と対照細胞集団の間で観察されなかった。例えば、単球表面マーカーCD11bもしくはCD14又はCD15顆粒球マ-

10

20

30

40

50

カーの経時的な発現は、%表面マーカー陽性細胞として、又は幾何学的平均蛍光強度により評価され、対照細胞集団と比較して、CD34編集細胞集団において有意差はなかった。これらの結果によって、CD34編集が、骨髓系統中に分化する、又は分化バイアスを誘導するための編集HSCの分化能力を破壊しないことが実証される。

【0263】

実施例9：in vivoでのCD34編集マウスの特徴付け。

本実施例では、マウスモデルにおいて、in vivoでCD34編集HSCを特徴付けるin vivo実験が記載されている。例示的な実験セットアップを図14A中に示している。

【0264】

簡単には、ヒトCD34+HSCを、例示的なCD34標的化ガイドRNA (CD34-2及びCD34-3)、ならびに非CD34標的化対照gRNA (gCtrl)を使用して、本明細書中に記載されるCRISPR/Cas9を介して編集した。ex vivo編集後24及び48時間に、生きたCD34編集細胞及び対照細胞のパーセンテージを定量化し、適切な生存率(>80%)及び編集(>60%)レベルを、本明細書中の他の場所でより詳細に記載されるように確認した。編集細胞を、CS10培地 (Stem Cell Technology) 中で 5×10^6 細胞/mLで、バイアル当たり1mLの培地容量中に凍結保存した。

【0265】

凍結保存細胞を解凍し、BioRad TC-20自動細胞カウンターを使用して計数した。生細胞の数を、解凍したバイアル中で定量化し、マウスにおける生着のための細胞の総数を調製するために使用した。実験の0日目に、6~8週齢である雌NSGマウス (JAX) を、175cGy全身照射を使用して照射し、照射後の4~10時間に、マウスに、本明細書中に記載されるように生成されたCD34編集細胞又はgCtrlでエレクトロポレーションされた対照細胞で生着させた。マウスに、100µL容量中で 1×10^6 の編集細胞の単回静脈内注射を与えた。体重及び臨床観察所見を、3群中の各マウスについて週1回記録した。

【0266】

生着後8、9、及び12週目に、50µLの血液を、フローサイトメトリーによる分析のために、各マウスから後眼窩出血により回収する。16週目に、生着後、マウスを殺し、血液、脾臓、骨髓、及び胸腺を、フローサイトメトリーによる分析のために回収する。骨髓を、大腿骨及び脛骨から単離する。大腿骨からの骨髓も、オンターゲット編集分析のために使用する。フローサイトメトリーを、Beckman Coulter Cyt oFLEX LXソフトウェアを使用して実施する。細胞は、一般的に、最初に生存率について選別され (例、7AAD生存染料を使用する (生/死分析))、次に生細胞は、ヒトCD45 (hCD45) の発現によりゲーティングされるが、しかし、マウスCD45 (mCD45) はされない。hCD45+である細胞は次に、ヒトリンパ系細胞又は骨髓細胞表面マーカーの発現についてさらにゲーティングされ、ヒトHSCから由来する細胞による血液系の生着及び再増殖を実証する。例えば、ヒトCD45を発現する細胞は、リンパ系細胞、具体的にはB細胞を検出するために、又は他のリンパ系細胞マーカー、例えば、T細胞マーカーもしくはNK細胞マーカーの発現のために、CD19 (hCD19) の発現について分析される。ヒトCD45 (hCD45) を発現する細胞も、骨髓系統の様々な細胞マーカーの存在について分析する。

【0267】

生着後の8、12、及び16週目に、hCD45+である有核血液細胞のパーセンテージが、対照gRNA (gCtrl) で編集された対照細胞、又はCD34編集細胞を受けたマウスの群 (n=10マウス/群) において定量化される。この値は、hCD45+絶対細胞数をマウスCD45+ (mCD45) 絶対細胞数で割ることにより算出される。

【0268】

血液中のhCD34+細胞のパーセンテージがまた、ヒト及びマウス細胞キメリズムに

10

20

殺 30

40

50

ついでの評価として、対照及びCD34編集マウス群における生着後の8週目に定量化される。CD34編集細胞で生着されたマウス（例、本明細書中に記載されるCD34-2で編集）は、8、12、及び16週目に対照細胞で生着されたマウス（CD34編集されていない、例、エレクトロポレーションなし、又はCD34を標的化しない対照ガイドを使用して編集）と比較して、類似のレベルのhCD34+細胞を有する。

【0269】

次に、分化細胞の特定の集団のパーセンテージを分析する。例えば、CD19+リンパ系細胞、hCD14+単球、及びhCD11b+顆粒球／好中球のパーセンテージが、CD34編集細胞又は対照細胞で生着されたマウスにおける生着後の8、12、及び16週目に定量化される。血液中のhCD19+細胞、hCD14+細胞、及びhCD11b+細胞のレベルは、対照群とCD34編集群の間で同等であり、これらの細胞のレベルは、生着後8～16週目まで同等のままである。血液中のhCD19+、hCD14+、及びhCD11b+細胞の同程度のレベルが観察され、照射されたNSGマウスにおけるCD34編集HSCの成功裏の生着及び分化を示しており、類似のレベルのヒト骨髓細胞集団及びリンパ系細胞集団が、CD34編集細胞を受けるマウス及び対照細胞を受けるマウスにおいて存在することを実証している。

10

【0270】

CD34編集の存在及び頻度は、CD34編集細胞集団を受けたNSG動物における生着細胞において確認される。アンブリコン-seqが、生着後の16週目に単離された骨髓サンプルで実施され、編集されたCD34編集細胞で生着されたマウスにおけるCD34編集を分析する。骨髓におけるCD34編集細胞の存在が確認され、CD34編集細胞が成功裏に生着する能力を実証している。CD34編集HSCの存在は、骨髓由来細胞又は循環PBMC細胞の免疫表現型検査、ならびにCD34-、CD45RA-、CD49c+、CD90+、CD201+、及びlin-であるCD34編集細胞を同定することにより確認される。

20

【0271】

生着後の16週目に、hCD11b+細胞のパーセンテージを、対照細胞又はCD34編集細胞で生着されたマウスの血液及び骨髓において定量化する。対照細胞ならびにNSGマウスの血液及び骨髓の両方におけるCD34編集細胞で生着されたマウスにおいて観察されたCD11b+好中球集団の同程度のレベルは、成功裏の生着及び分化を示す。

30

【0272】

生着後の16週目に、hCD45+細胞のパーセンテージ及びhCD34+細胞のパーセンテージがまた、対照細胞又はCD34編集細胞で生着されたマウスの脾臓において定量化される。マウス（対照細胞又はCD34編集細胞で生着された）の群間でのhCD45+細胞の同程度のレベル及びhCD34+細胞の低下したレベルは、NSGマウスの脾臓におけるCD34編集HSCの長期持続性を示し得る。加えて、生着後の16週目に、脾臓中のhCD14+単球、hCD11b+顆粒球／好中球、CD19+リンパ系細胞、及びhCD3+T細胞のパーセンテージが定量化される。対照群とCD34編集群の間での脾臓におけるhCD14+細胞、hCD11b+細胞、hCD19+細胞、及びhCD3+の同程度のレベルは、CD34編集細胞が、NSGマウスの脾臓においてヒト造血細胞再構成を多系統化することが可能であることを示し得る。

40

【0273】

生着後の16週目に、hCD45+細胞のパーセンテージ及びhCD34+細胞のパーセンテージも、対照細胞又はCD34編集細胞で生着されたマウスの胸腺において定量化する。加えて、生着後の16週目に、胸腺中のCD3+細胞のパーセンテージ（hCD45+細胞のパーセントとして）を定量化する。対照群とCD34編集群の間での胸腺中のhCD3+の同程度のレベルは、CD34編集細胞が、NSGマウスの胸腺におけるヒト造血細胞の再構成を多系統化することが可能であることを示し得る。

【0274】

実施例10：造血障害を有する対象におけるCD34+HSCのアブレーション。

50

造血障害、例えば、悪性細胞（例えば、癌幹細胞）がCD34を発現する血液悪性腫瘍を有する対象は、CD34編集HSCを含む同種造血細胞移植（HCT）で、及び抗CD34免疫療法剤で、例えば、カリチアマイシン部分に複合体化されたCD34抗体で処置される。

【0275】

HCTについては、CD34編集造血幹細胞を含む細胞の集団を、本明細書中に記載される方法に従って、例えば、対象に対して8/8遺伝子座（HLA-A、-B、-C、DRB1）で一致したHLAの健常なドナーからHSCを得ること、及びガイドCD34-2又はCD34-3を使用してHSCを編集することにより得られる。

【0276】

HSCを、二つまでのアフエーシス処置におけるG-CSF／プレリキサの動員後にドナーから得られる。最低 10×10^6 個の生細胞/kg（ここで、kgはレシピエント対象の体重を指す）が、レシピエント対象への処理、編集、及びその後の投与のために、アフエーシスによりドナーから得られる。このアフエーシス産物から、少なくとも 3.0×10^6 個の生細胞/kg（レシピエント重量）は、最小限の操作を受け、例えば、レスキュー用量としての使用のために、バックアップ幹細胞供給源として役立つように凍結保存される。アフエーシス産物の残りは、HCT用のCD34編集集団の処理及び調製のために使用される。

【0277】

HCTについてのCD34編集HSC集団は、CD34+細胞用のアフエーシス産物を濃縮し、それに続くエレクトロポレーション及び、本明細書中に記載されるようにCD34ガイドCD34-2又はCD34-3を使用した、上に記載されるような、CD34gRNA/Cas9複合体での編集により調製される。

【0278】

CD34編集細胞を、その後、約48時間にわたり培養中に置く。収集時、培養期間が終了した後、細胞を洗浄し、最終製剤中に再懸濁し、凍結保存する。細胞生存率及び編集効率を、代表的なサンプルを使用して確認し、少なくとも70%の生細胞及び少なくとも45%のCD34編集効率を含むことが確認されたCD34編集HSC集団をHCTについて使用する。対象への投与のためのCD34編集細胞集団は、これらの生存率及び編集効率の基準を満たし、レシピエント対象の少なくとも 3×10^6 細胞/kg体重を含むCD34編集HSC集団を含み、好ましくは、レシピエント対象の少なくとも 4×10^6 細胞/kg、 5×10^6 細胞/kg、 6×10^6 細胞/kg、又は 7×10^6 細胞/kgを含む。

【0279】

対象は、CD34を発現する任意の悪性細胞を含む、対象の造血幹細胞をアブレーションするために、ルーチン的な臨床手順を使用して条件づけされる。条件づけレジメンの完了後、対象は、解凍されたCD34編集HSCを含むHCTを静脈内（IV）注入を介して受ける。HCTの日は処置レジメンの0日目である。

【0280】

対象は、対象においてCD34編集（CD34-、例えば、切断CD34又はエピトープ編集CD34）好中球について、絶対末梢好中球数（ANC）を測定することにより、28日目のCD34編集HSCの生着について評価される。対象は、対象が、HCT後の28日に、 $\geq 1000/dL$ CD33-ANCの絶対末梢CD34編集好中球数を示す場合、好中球の回復（また、成功裏のCD34編集好中球の生着と言及される）を示すとみなされる。

【0281】

対象が28日目に好中球の回復を示す場合、骨髓生検が、疾患状態及び造血回復を評価するために、60日目に対象から得られる。また、ドナーキメリズム及びCD34編集骨髓性造血のパーセントを、この時に末梢血から決定する。対象が、成功裏のCD34編集HSCの生着及びCD34編集造血を60日目に示す場合、対象に、その後、CD34抗

10

20

30

40

50

体－薬物複合体が投与される。CD34標的化免疫療法剤、例えば、抗CD34抗体－薬物複合体の投与は、好ましくは、60日目の骨髓生検の30日以内に開始される、即ち、好ましくは、90日目までに開始される。しかし、CD34標的化免疫療法剤の開始は、120日目まで遅延され得るが、対象の臨床状態が、例えば、HCT関連の併存疾患を含む併存疾患に照らして、対象において $\geq 1000 / dL$ CD33－ANCの達成を可能にするためにそのような遅延を必要とする場合である。CD34標的化免疫療法剤が、60日目の骨髓生検後の30日を上回って開始される場合、反復骨髓生検が、CD34標的化免疫療法剤を開始する前に完了される。

【0282】

CD34標的化免疫療法薬をその推奨用量で投与し、対象における全てのCD34発現造血細胞をアブレーションする。しかし、一部の対象は、より低い用量、例えば、処置関連の有害作用、例えば、用量制限毒性（DLT）の事象においては、又は個々の対象の健康状態、併存症、もしくは既往歴を考慮して投与されてもよい。

10

【0283】

あるいは、対象は、HCTの前に対象自身のCD34発現血液細胞をアブレーションするために、従来の条件づけレジメンに供されないが、しかし、対象のCD34発現細胞は、CD34標的化免疫療法剤、例えばCD34標的化抗体－薬物複合体又はCD34標的化CAR-T細胞集団などの投与により標的化される。そのようなシナリオでは、対象は、CD34編集HSCのHCT前に免疫療法薬のサイクルを、及びHCT後に免疫療法薬のサイクルを投与されてもよい。あるいは、対象に、HCTに続いて、1以上のサイクルにおいて免疫療法剤が投与されてもよく、このように、前HCT条件づけレジメンに完全に先立つ。

20

【0284】

免疫療法薬の投与後、対象を、悪性細胞の存在について評価する。悪性細胞、特にCD34発現悪性細胞の数における有意な低下、又はCD34発現悪性細胞の完全なアブレーションが、対象において観察される。また、CD34編集HSCの長期生着及びCD34編集HSCからの全ての細胞系統の再構成が、対象において観察される。

【0285】

等価物及び範囲

当業者は、本明細書中に記載される実施形態の多くの等価物を認識する、又はルーチン的な実験のみを使用して確認することができるであろう。本開示の範囲は、上の説明に限定されることを意図しておらず、しかし、むしろ、添付の特許請求の範囲において示されるとおりである。

30

【0286】

冠詞、例えば「a」、「an」、及び「the」などは、反対に示されない限り、又は文脈から他が明らかでない限り、一つ又は一つ以上のことを意味し得る。群の二つ以上のメンバーの間の「又は」を含む請求項又は説明は、反対に示される、又は文脈から他が明らかでない限り、一つ、一つ以上の、又は全ての群のメンバーが存在する場合、満たされ则认为られる。二つ以上の群のメンバー間に「又は」を含む群の開示は、群の正確に一つのメンバーが存在する実施形態、群の一つ以上のメンバーが存在する実施形態、及び群のメンバーの全てが存在する実施形態を提供する。簡潔さの目的のために、それらの実施形態は、本明細書中に個々に明記されていないが、しかし、これらの実施形態の各々が、本明細書中に提供されており、具体的に請求又は否認され得ることが理解されよう。

40

【0287】

本発明は、1以上の請求項あるいは説明の1以上の関連部分からの1以上の限定、要素、条項、又は説明用語が、別の請求項中に導入される、全てのバリエーション、組み合わせ、及び置換を包含することを理解すべきである。例えば、別の請求項に依存する請求項は、同じ基本請求項に依存する任意の他の請求項において見出される限定の1以上を含むように修正され得る。さらに、請求項が組成物を記載する場合、本明細書中に開示される作製又は使用の方法のいずれかに従って、あるいは、ある場合には、当技術分野

50

において公知の方法に従って、組成物を作製又は使用方法が、他に示されない限り、又は矛盾もしくは不一致が生じ得ることが当技術分野の当業者に明らかでない限り、含まれることを理解すべきである。

【0288】

要素が、例えば、マーカッシュグループ形式においてリストとして提示される場合には、要素のすべての可能な部分集団も開示されており、任意の要素又は要素の部分集団をグループから除外することができることを理解すべきである。また、用語「含む」は、オープンであることが意図され、追加の要素又は工程の包含を許すことに注意すべきである。一般的に、実施形態、産物、又は方法が、特定の要素、特徴、又は工程を含むとして言及される場合、そのような要素、特徴、又は工程からなる、又は本質的になる実施形態、産物、又は方法も提供されることを理解すべきである。簡潔さの目的のために、それらの実施形態は、本明細書中に個々に明記されていないが、しかし、これらの実施形態の各々が、本明細書中に提供されており、具体的に請求又は否認され得ることが理解されよう。

10

【0289】

範囲が与えられる場合、エンドポイントが含まれる。さらに、他に示されない限り、あるいは文脈及び／又は当業者の理解から明らかでない限り、範囲として表現される値は、文脈が明らかに他を指示しない限り、一部の実施形態では、範囲の下限の単位の10分の1まで、記載された範囲内の任意の特定の値を想定することができることを理解すべきである。簡潔さの目的のために、各範囲中の値は、本明細書中に個々に明記されていないが、しかし、これらの値の各々が、本明細書中に提供されており、具体的に請求又は否認され得ることが理解されよう。他に示されない限り、又は他に当業者の状況及び／又は理解から明らかではない限り、範囲として表現される値は、所与の範囲内の任意の部分範囲を想定することができ、それにおいて、部分範囲のエンドポイントは、範囲の下限の単位の10分の1と同じ精度まで表現される。

20

【0290】

また、本発明の任意の特定の実施形態が、請求項の任意の1以上から明示的に除外され得ることが理解されるべきである。範囲が与えられる場合、範囲内の任意の値は、請求項の任意の1以上から明示的に除外され得る。本明細書中に記載される組成物及び／又は方法の任意の実施形態、要素、特徴、適用、又は態様を、任意の1以上の特許請求から除外することができる。簡潔さの目的のために、1以上の要素、特徴、目的、又は態様が除外される実施形態の全てが、本明細書中に明示的に示されるわけではない。

30

40

50

【図面】
【図 1】

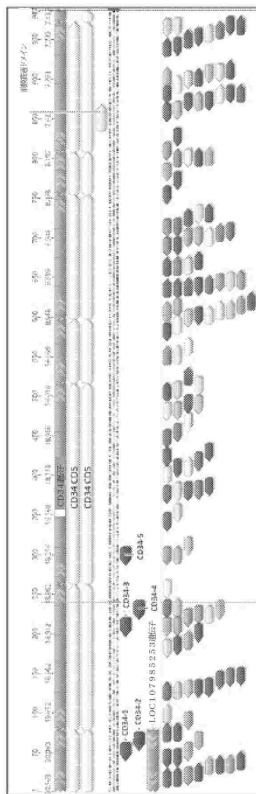


図 1

【図 2 B】

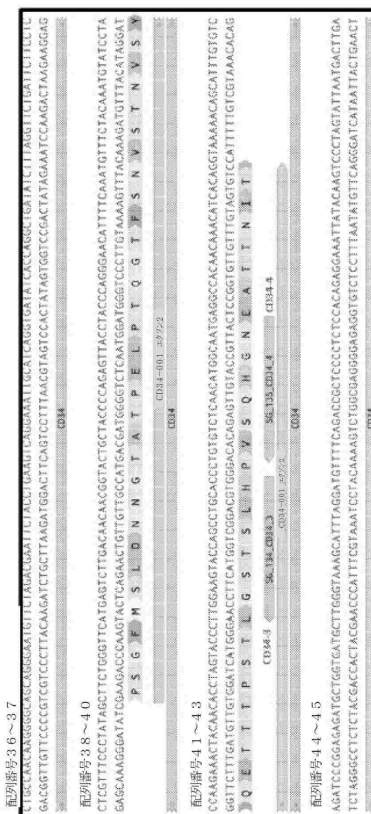


図 2 B

【図 2 A】

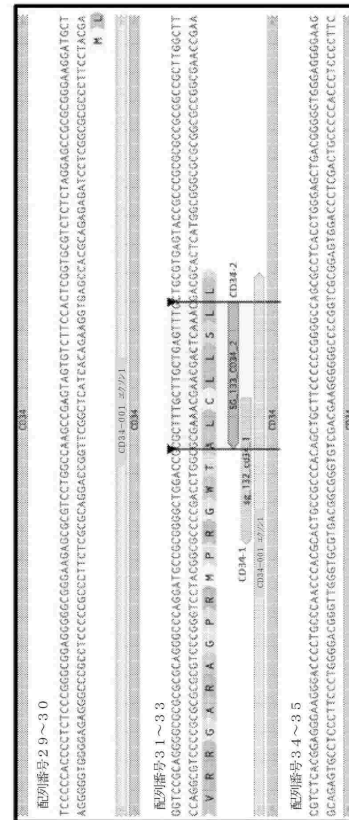


図 2 A

【図 2 C】



図 2 C

【図 3 A】

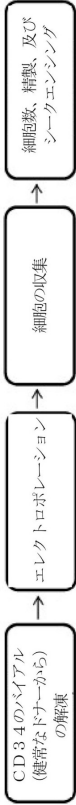


図 3 A

【図 3 B】

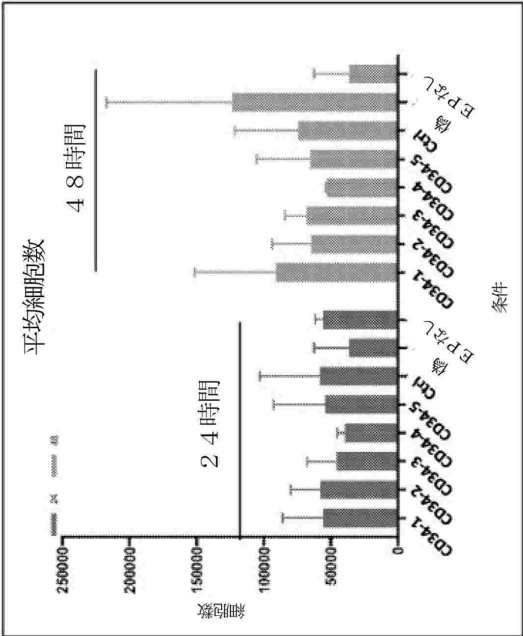


図 3 B

10

【図 3 C】

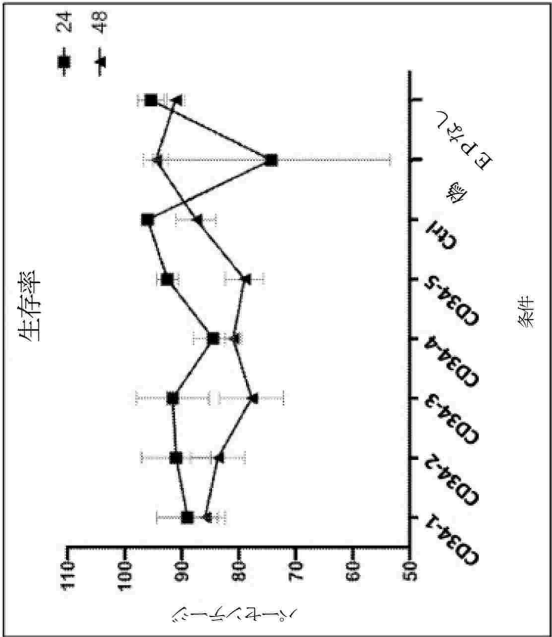


図 3 C

【図 3 D】

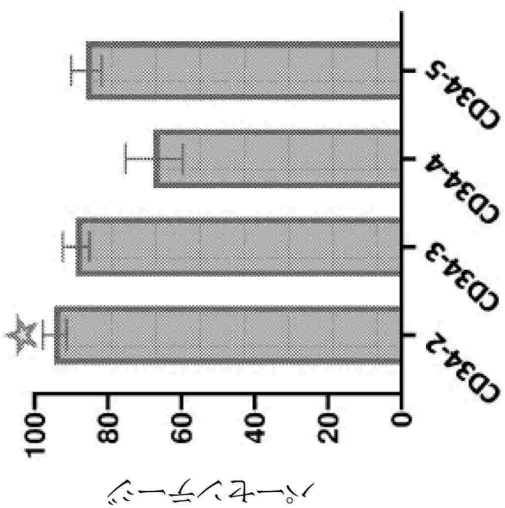


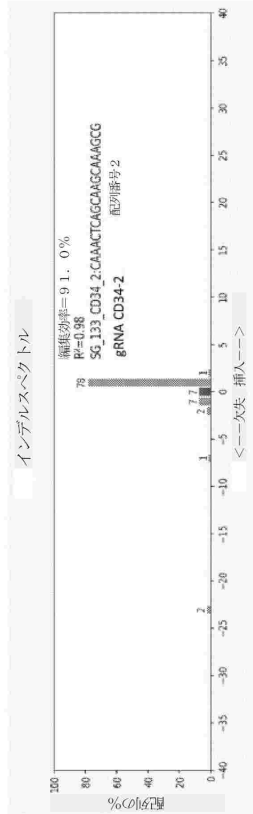
図 3 D

30

40

50

【図 4】



4. ☒ 4

【図 5 A】

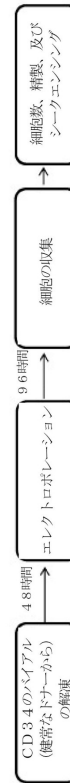
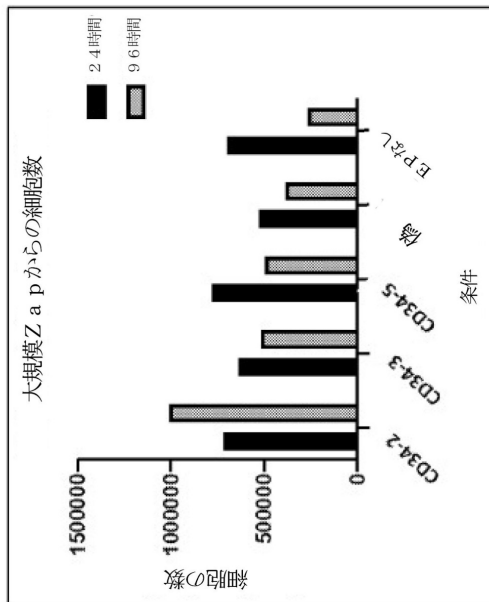


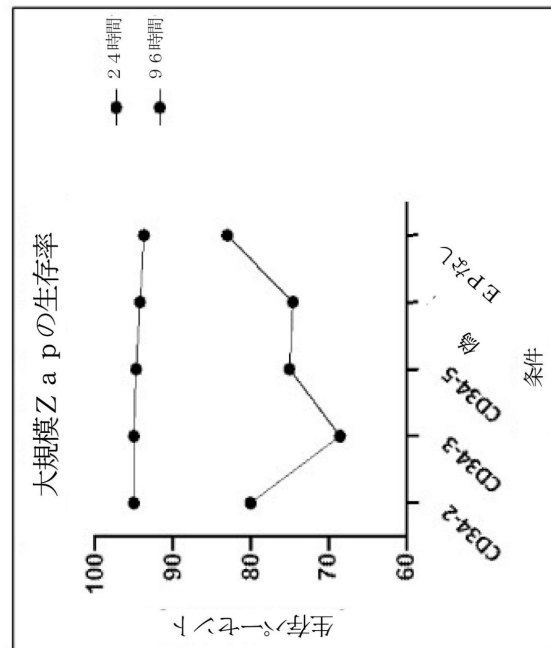
图 5 A

【図 5 B】

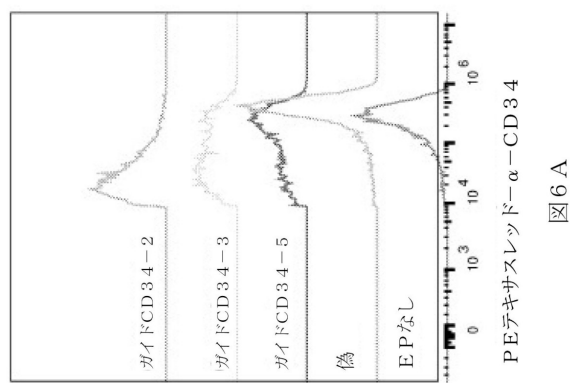


5 B

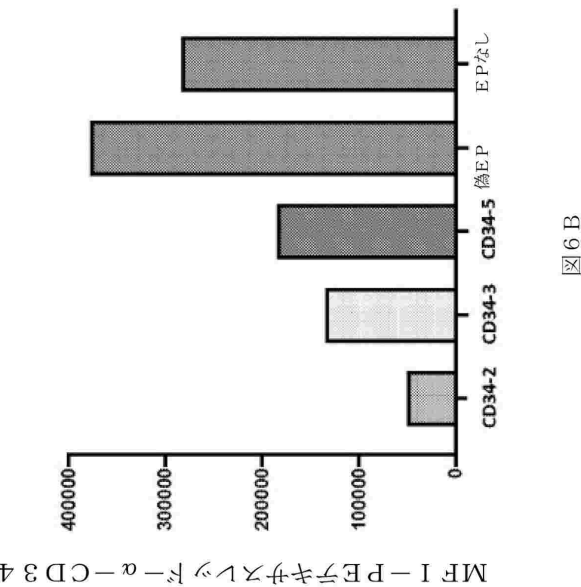
【図 5 C】

50 ☒

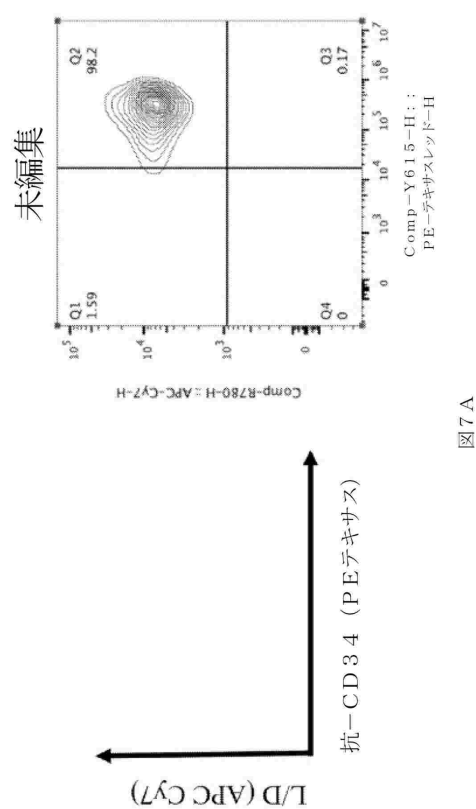
【図 6 A】



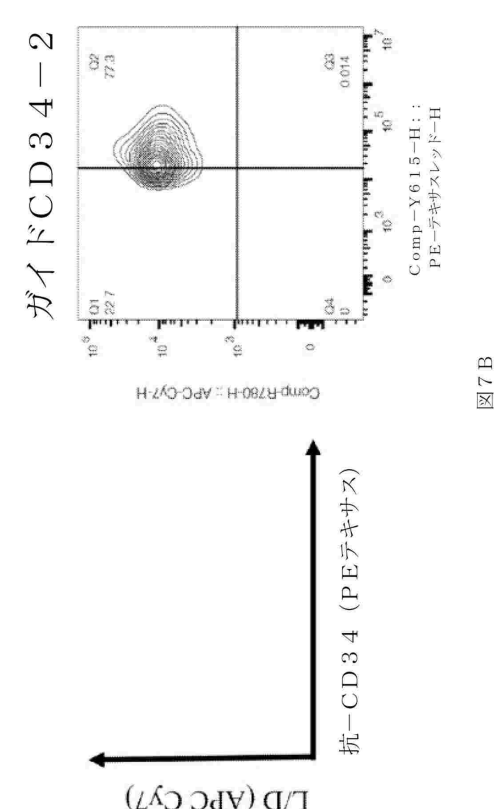
【図 6 B】



【図 7 A】



【図 7 B】



10

20

30

40

50

【図 7 C】

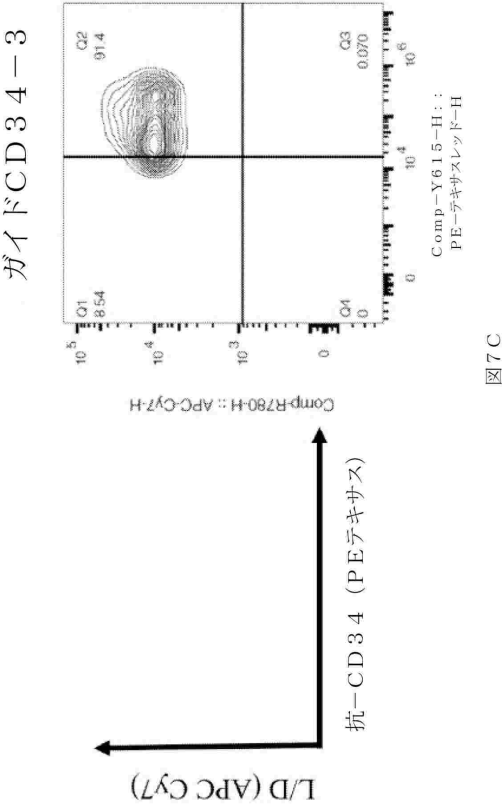


図 7 C

【図 7 D】

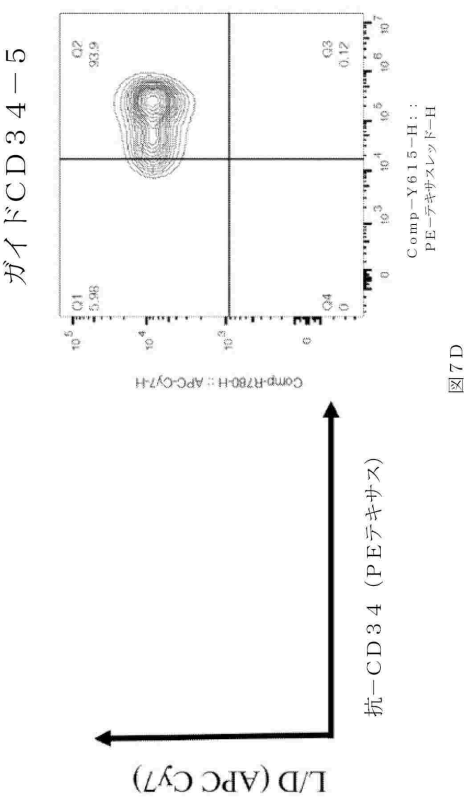


図 7 D

【図 8】

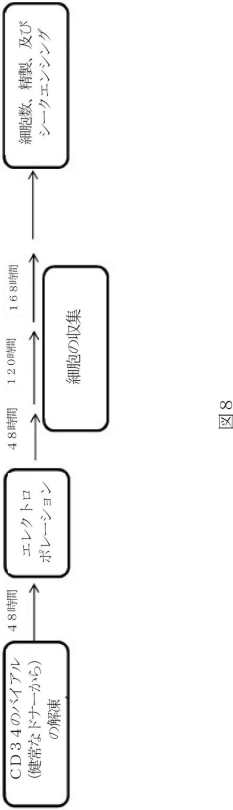


図 8

【図 9 A】

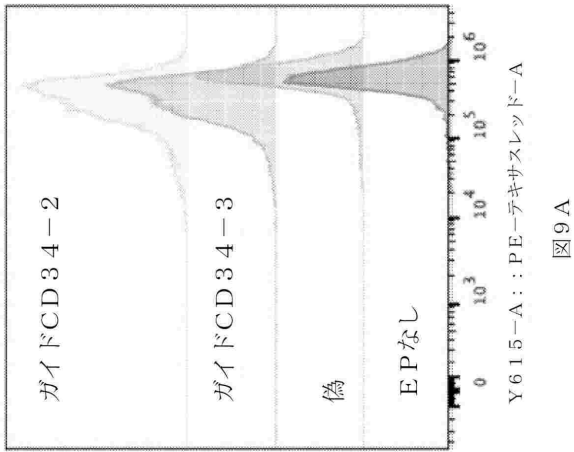


図 9 A

10

20

30

40

50

【図 9 B】

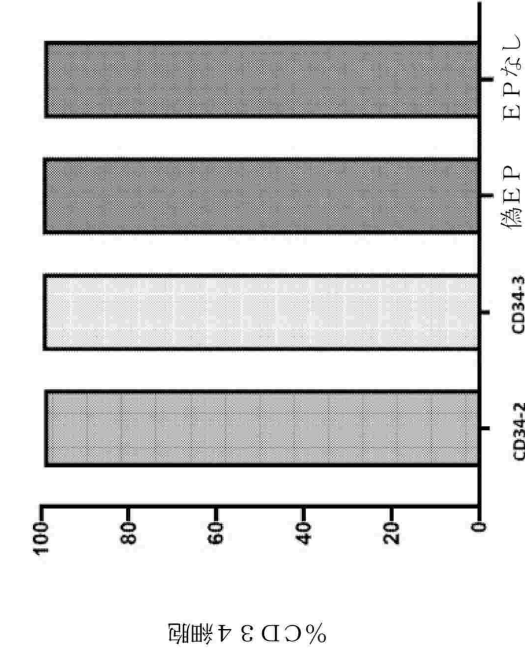


図 9 B

【図 10 A】

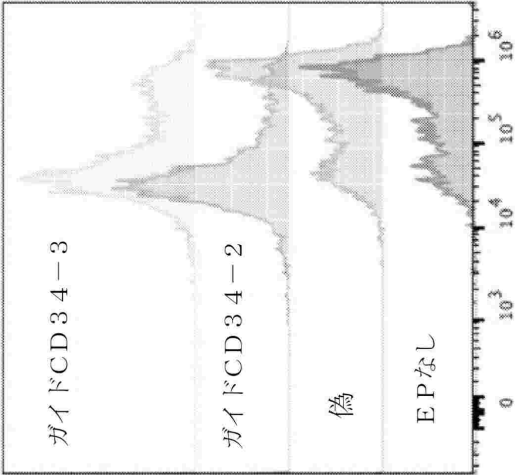


図 10 A

【図 10 B】

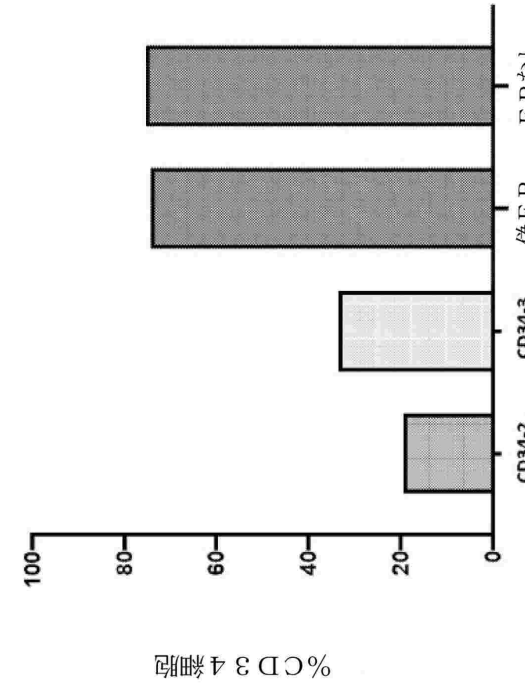


図 10 B

【図 11 A】

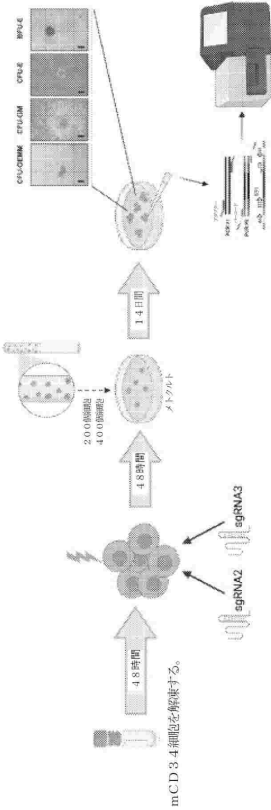


図 11 A

10

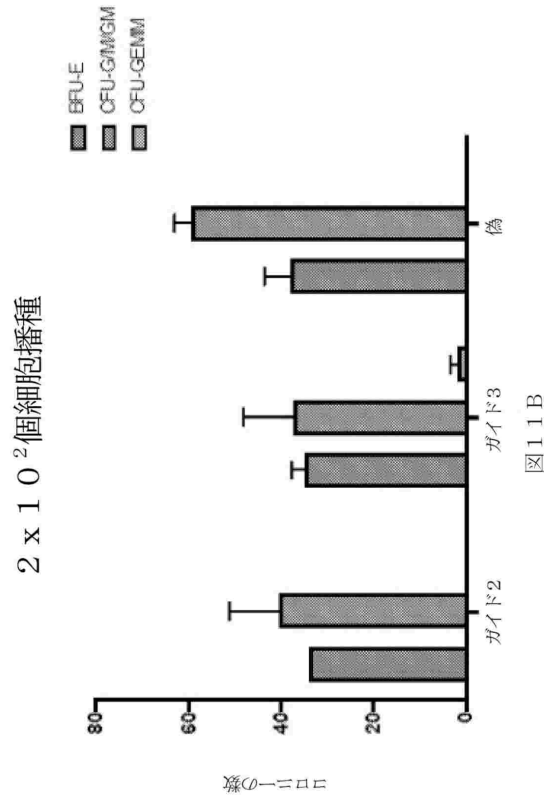
20

30

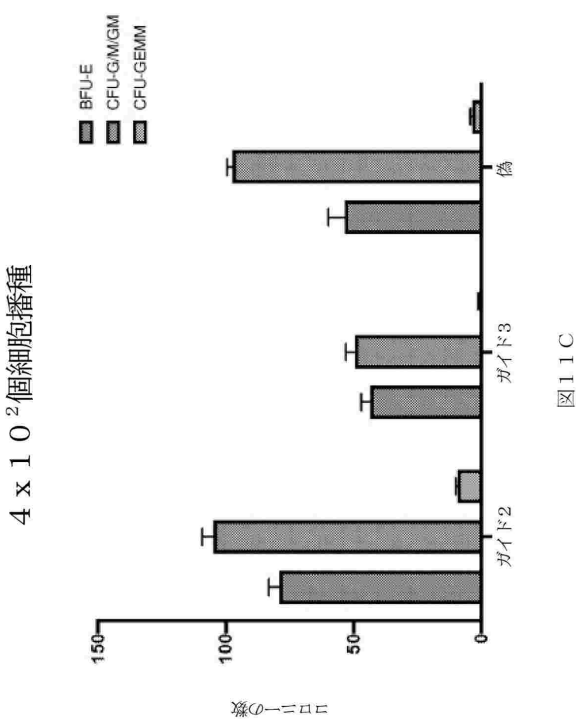
40

50

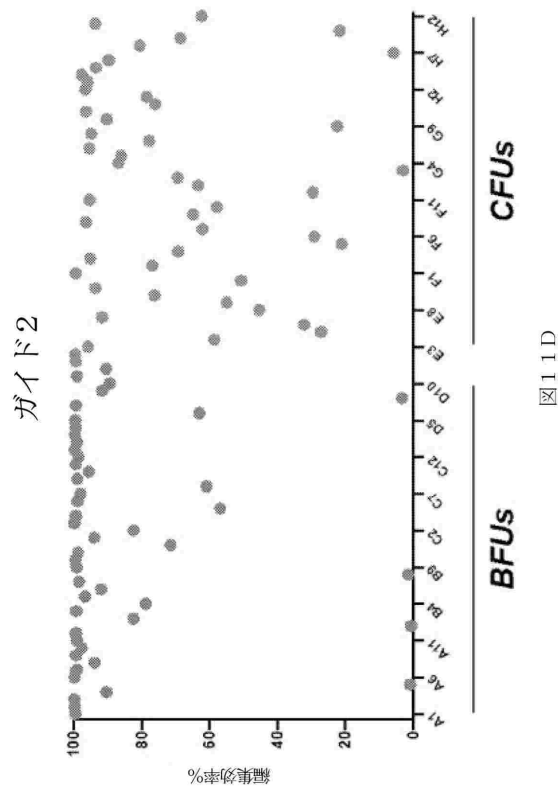
【図 1 1 B】



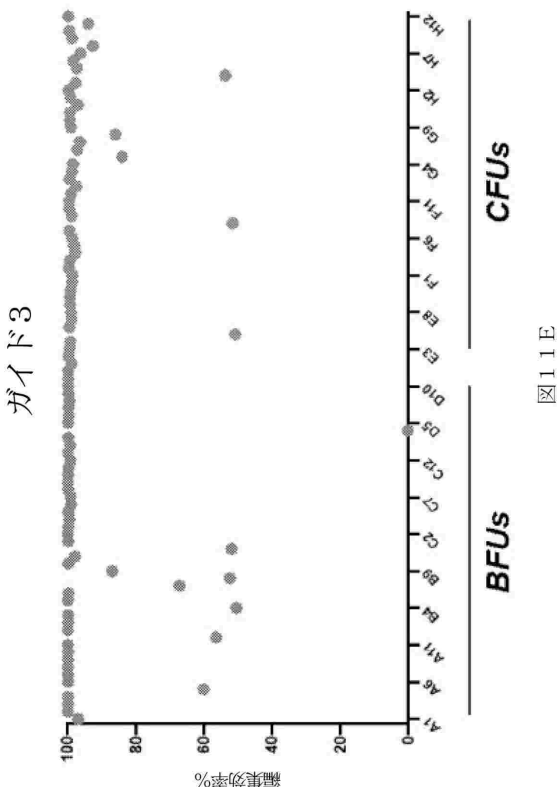
【図 1 1 C】



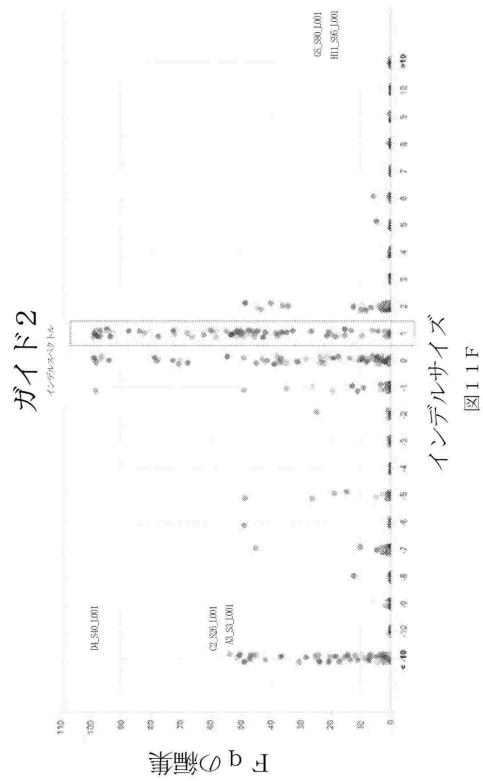
【図 1 1 D】



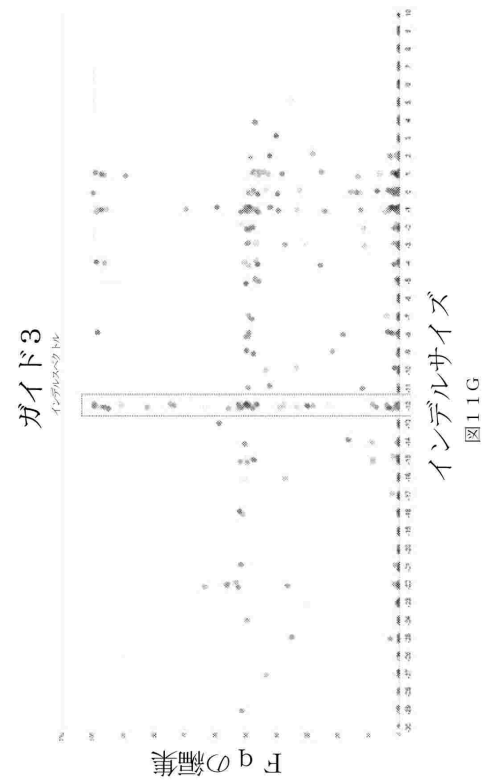
【図 1 1 E】



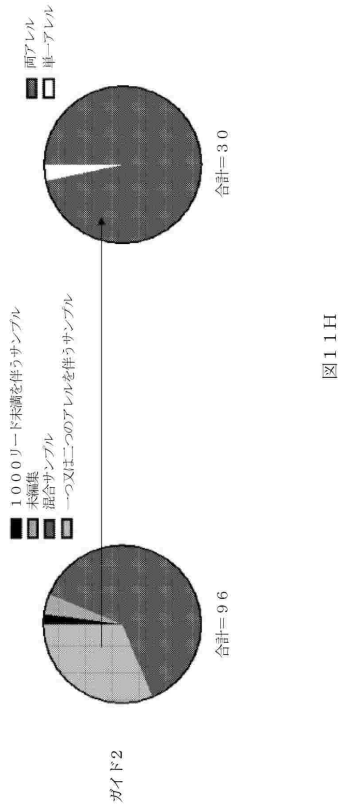
【図 1 1 F】



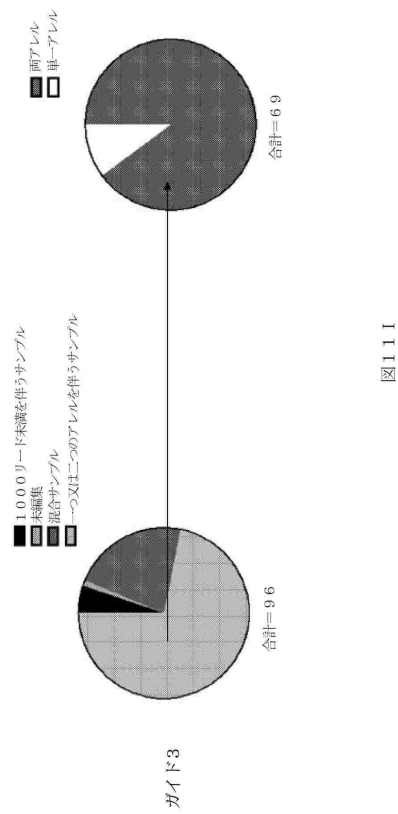
【図 1 1 G】



【図 1 1 H】



【図 1 1 I】



10

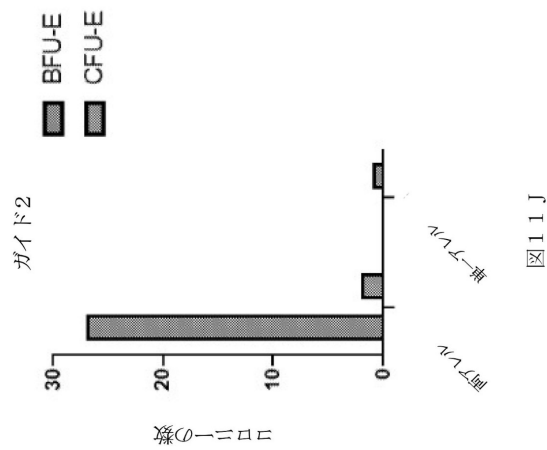
20

30

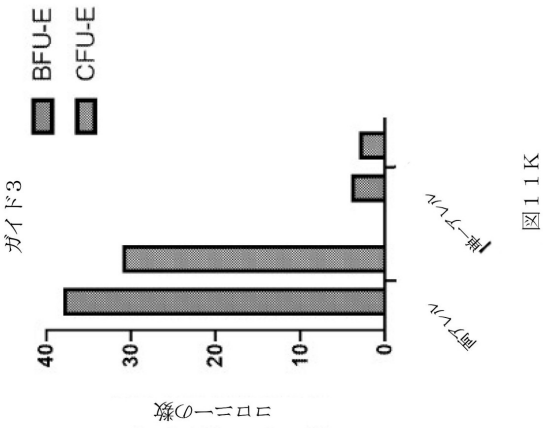
40

50

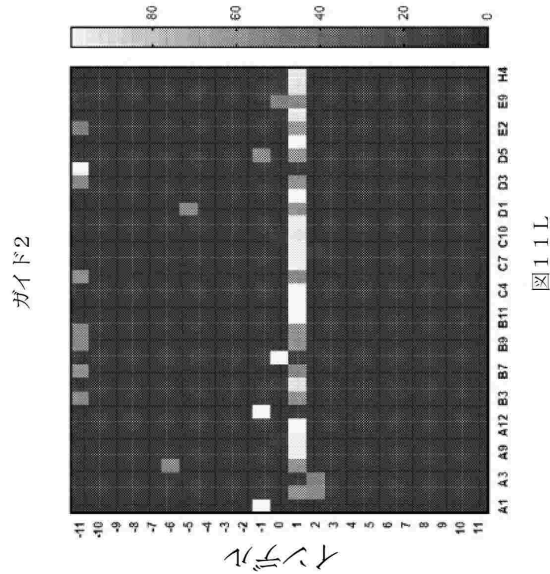
【図 1 1 J】



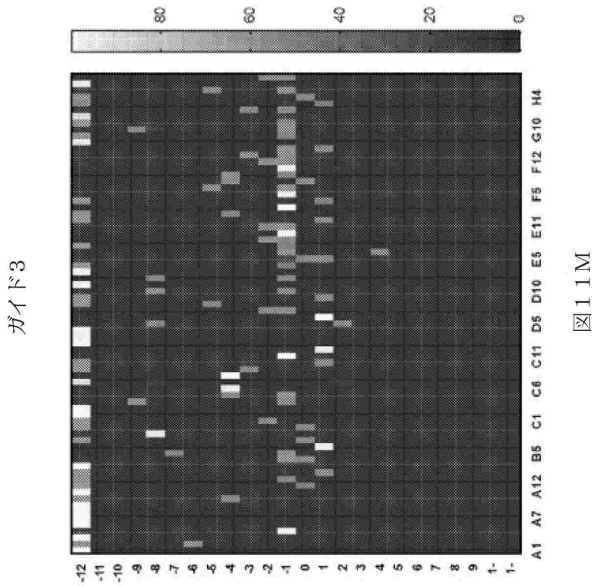
【図 1 1 K】



【図 1 1 L】



【図 1 1 M】



10

20

30

40

50

【図 1 1 N】

ガイド2

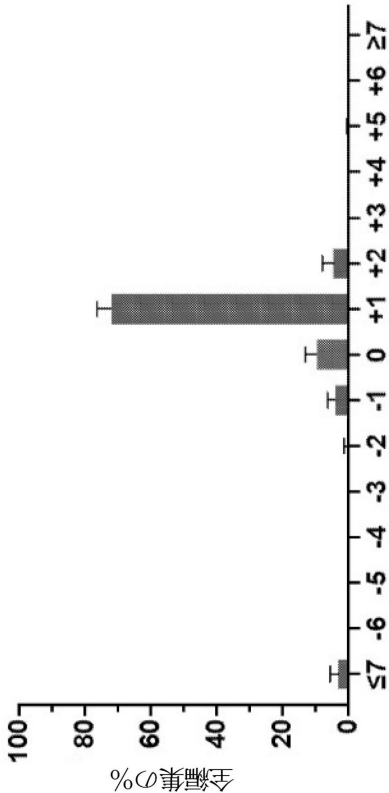


図 1 1 N

【図 1 1 O】

ガイド3

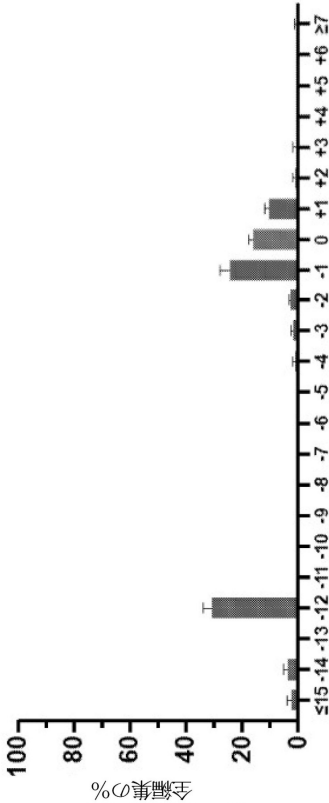


図 1 1 O

【図 1 1 P】

ガイド2

インデル	頻度%	DNA配列 (gRNA+PAM +/- 5 nt)	アミノ酸変化	結果	タンパク質
0	10 +/- 3	CAGAGTTCG-AAGCAAA	GGTGGTTCG		全長
+1	72 +/- 4	CAGAGTTCG-AAGCAAA	NGTGGTTCG	Cys38Leu	中間以降一切断

配列番号58-59

図 1 1 P

【図 1 1 Q】

ガイド3

インデル	頻度%	DNA配列 (gRNA+PAM +/- 5 nt)	アミノ酸変化	結果	タンパク質
0	15 +/- 1	GTGAGGCTGGTACTTC	CAGGGTACTA		全長
-1	24 +/- 3	GTGAGGCTGGTACTTC	GAGGGTACTA	Ps Ter20	中間以降一切断
-12	31 +/- 3	GTGAGGCTGGTACTTC	GAGGGTACTA	交差Pro79, Ser80, Thr81, Leu82 アレーナ/99%	全長

配列番号10-12

図 1 1 Q

10

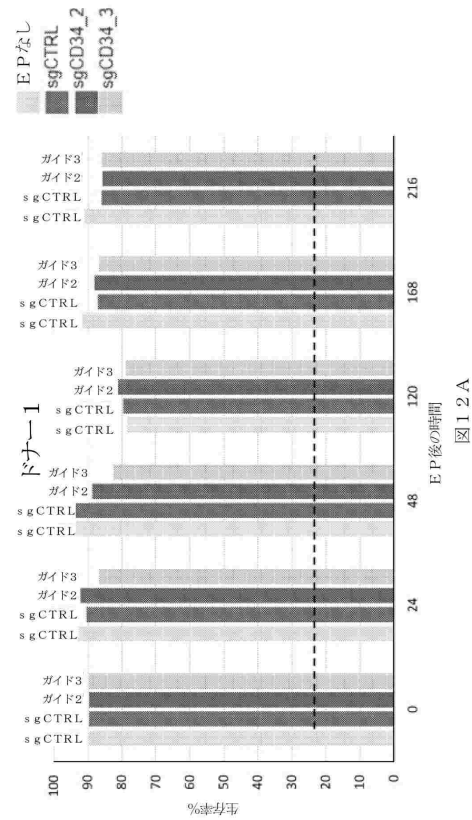
20

30

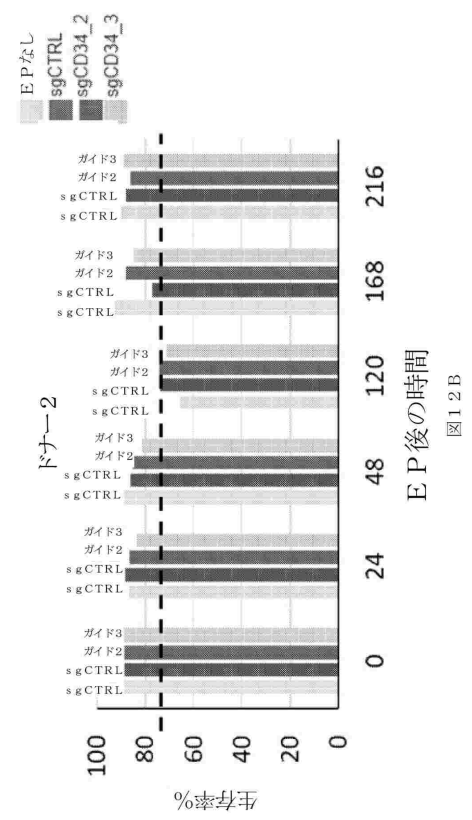
40

50

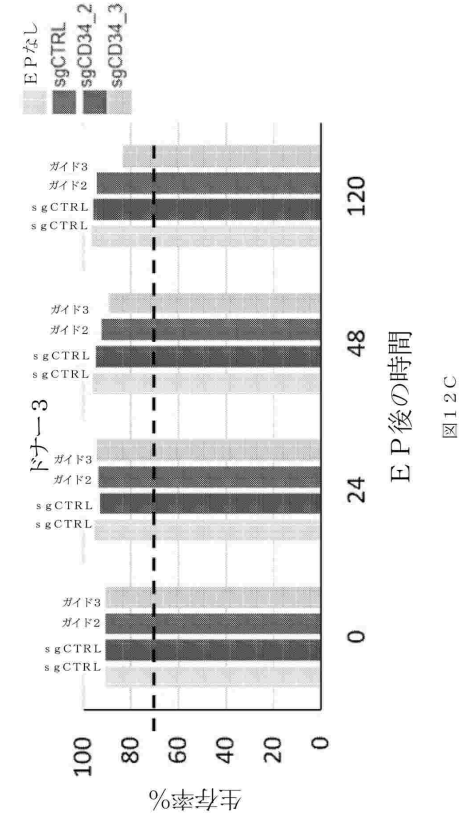
【図 1 2 A】



【図 1 2 B】



【図 1 2 C】



【図 1 2 D】



10

20

30

40

50

【図 1 2 E】

ドナー1 主要なインデル：-1, -1 2									
ガイド3	ガイド2	2日目	5日目	7日目	9日目				
	EPなし	77%	88%	78%	93%				
	CTRL	77%	88%	78%	93%				

図 1 2 E

【図 1 2 F】

ドナー2 主要なインデル：+1									
ガイド2	ガイド2	2日目	5日目	7日目	9日目				
	EPなし	72%	92%	93%	-				
	CTRL	72%	90%	91%	80%				

図 1 2 F

【図 1 2 G】

ドナー2 主要なインデル：-1, -1 2									
ガイド3	ガイド3	2日目	5日目	7日目	9日目				
	EPなし	74%	93%	92%	87%				
	CTRL	74%	93%	93%	88%				

図 1 2 G

【図 1 2 H】

ドナー3 主要なインデル：+1									
ガイド2	ガイド2	2日目	5日目						
	EPなし	-	-						
	CTRL	80%	80%						

図 1 2 H

10

20

30

40

50

【図 1 2 I】

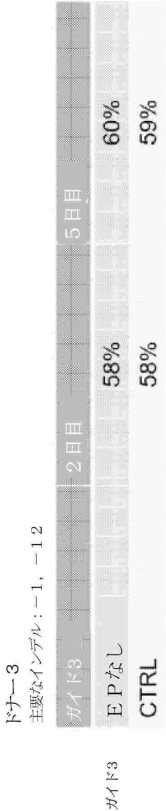
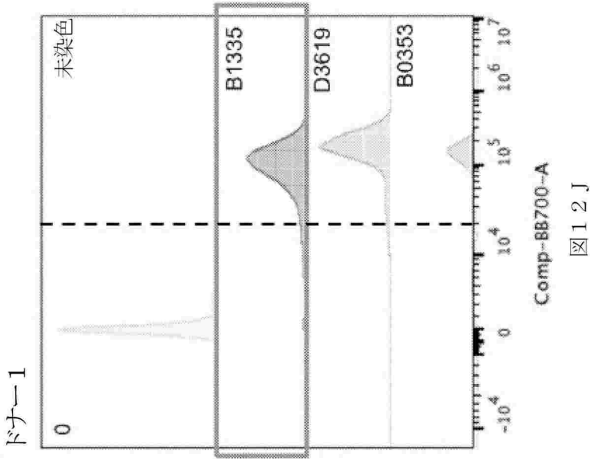
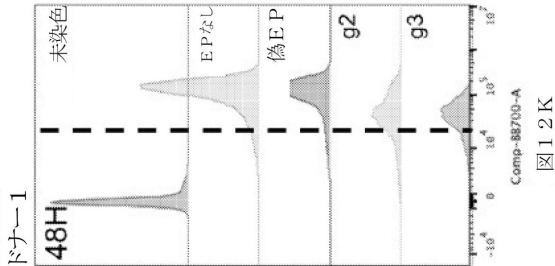


図 1 2 I

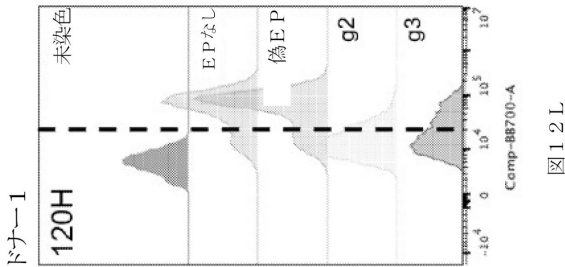
【図 1 2 J】



【図 1 2 K】



【図 1 2 L】



10

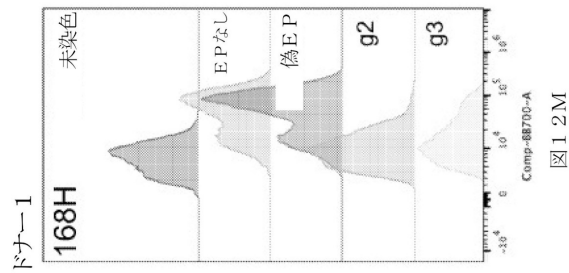
20

30

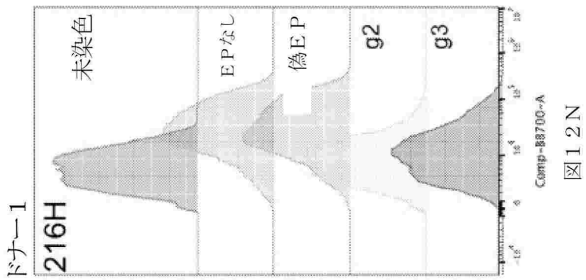
40

50

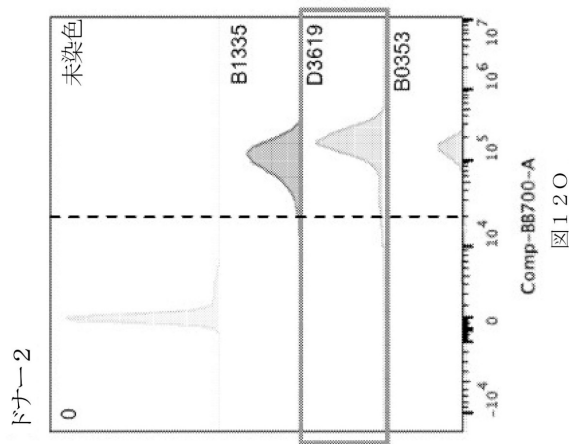
【図 1 2 M】



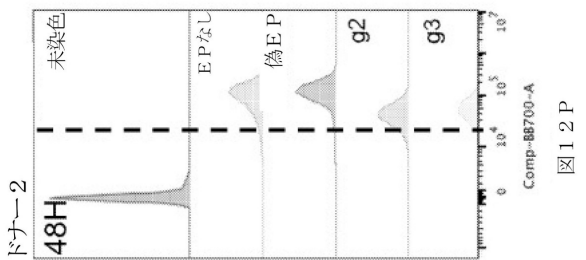
【図 1 2 N】



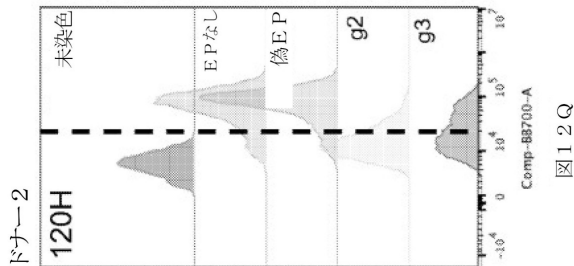
【図 1 2 O】



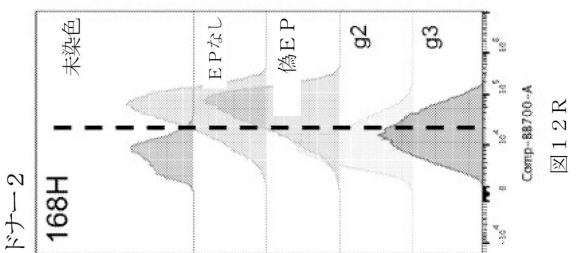
【図 1 2 P】



【図 1 2 Q】



【図 1 2 R】



10

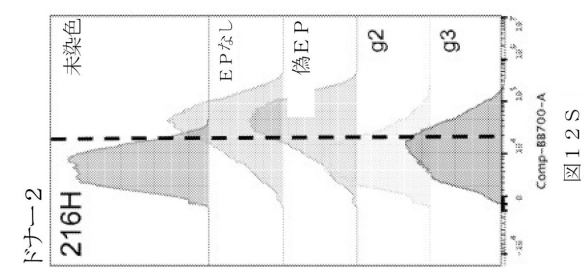
20

30

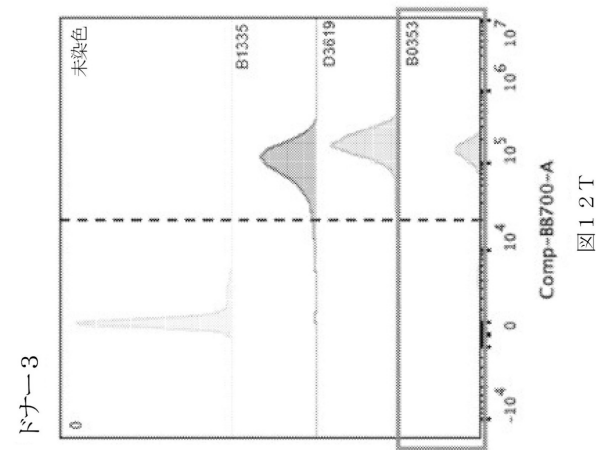
40

50

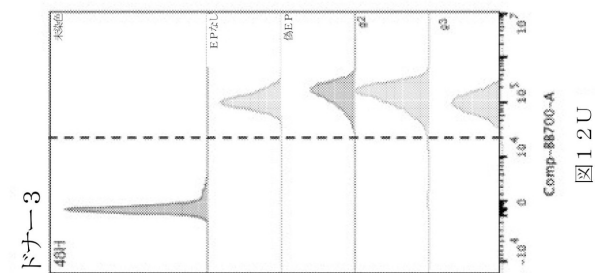
【図 1 2 S】



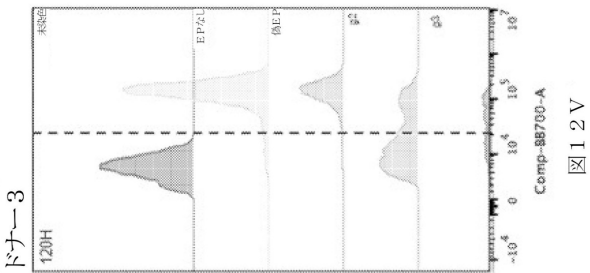
【図 1 2 T】



【図 1 2 U】



【図 1 2 V】



10

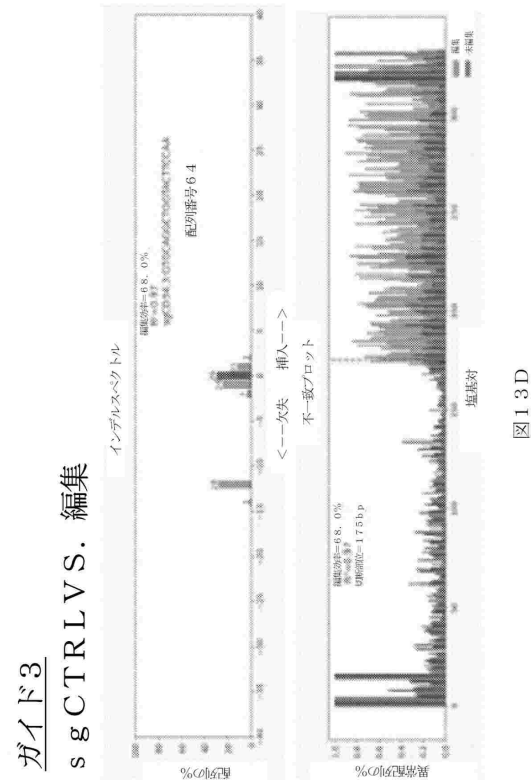
20

30

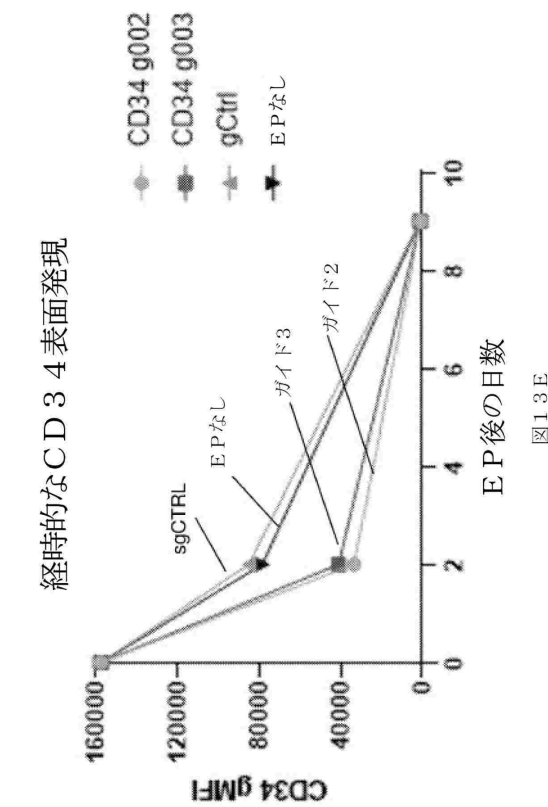
40

50

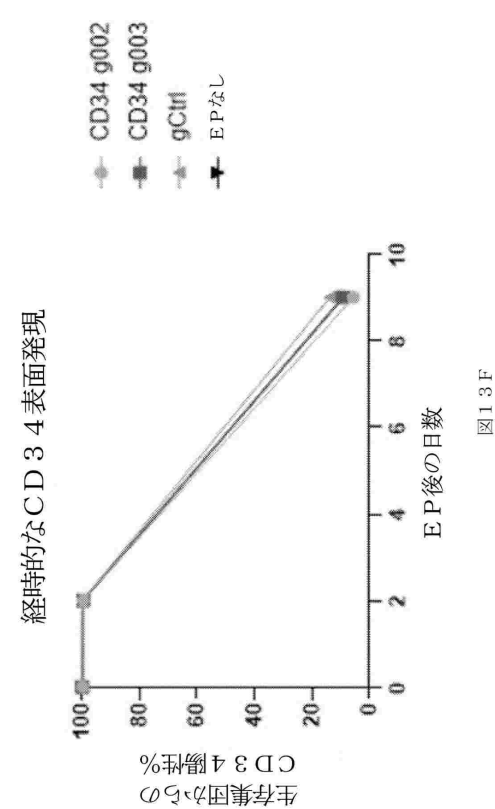
【図 1 3 D】



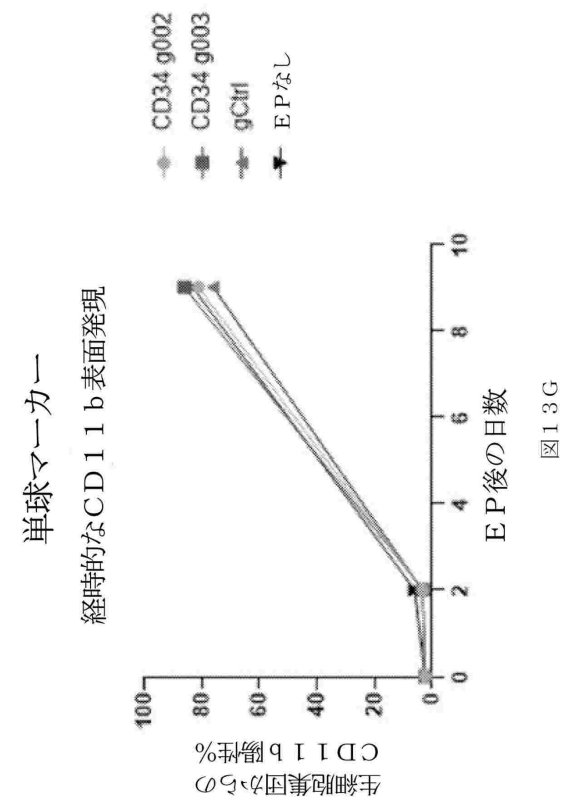
【図 1 3 E】



【図 1 3 F】



【図 1 3 G】



10

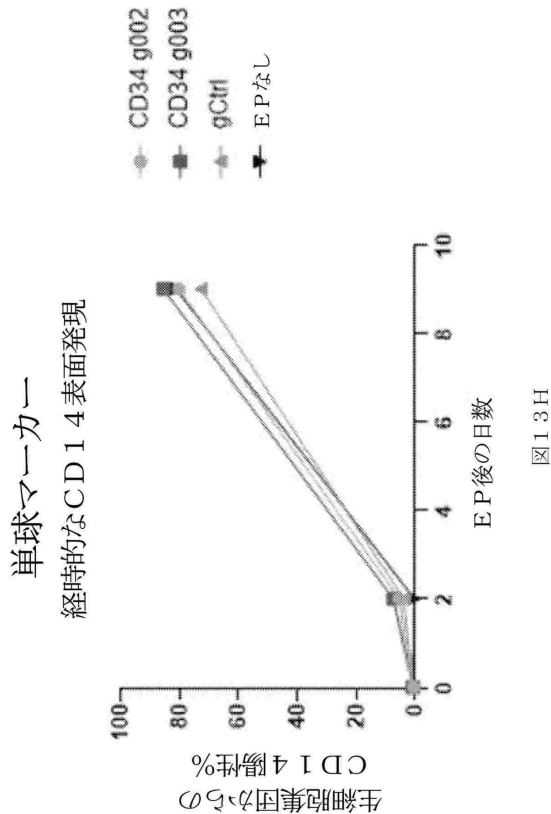
20

30

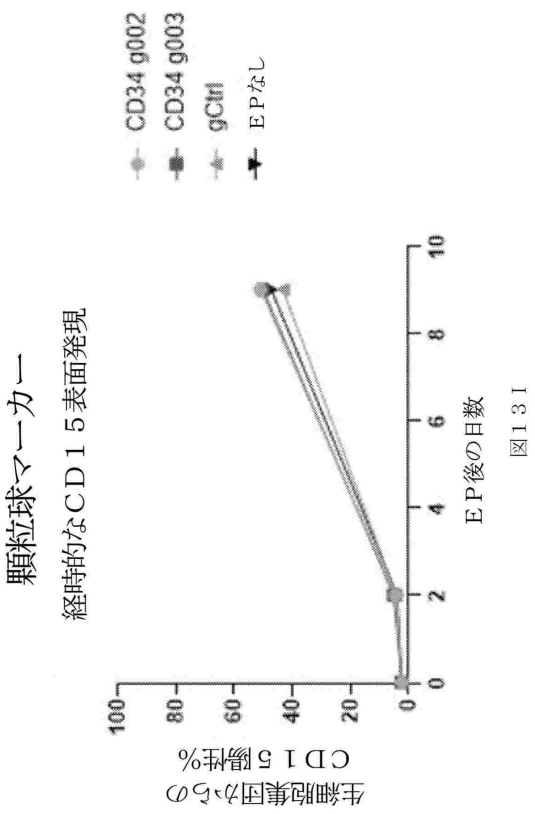
40

50

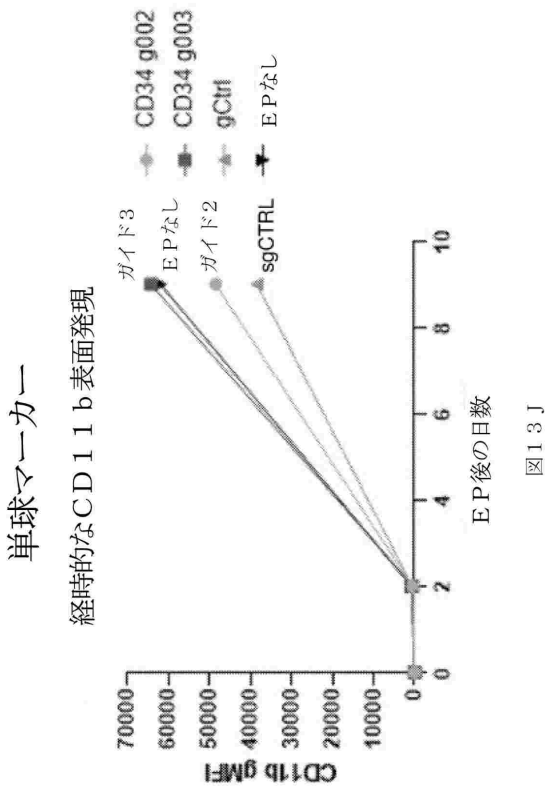
【図 1 3 H】



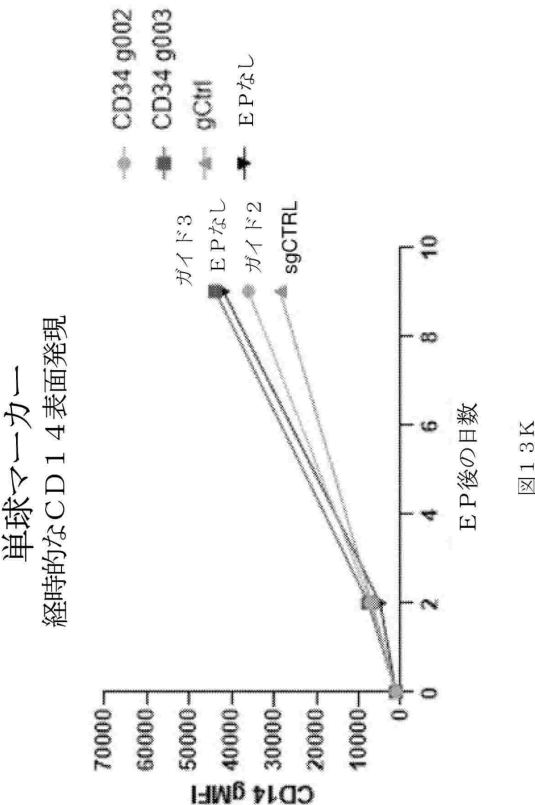
【図 1 3 I】



【図 1 3 J】



【図 1 3 K】



10

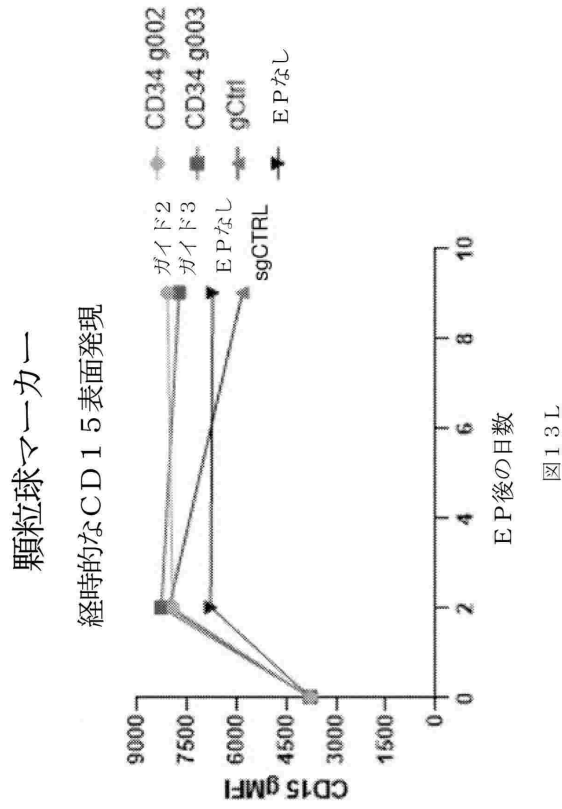
20

30

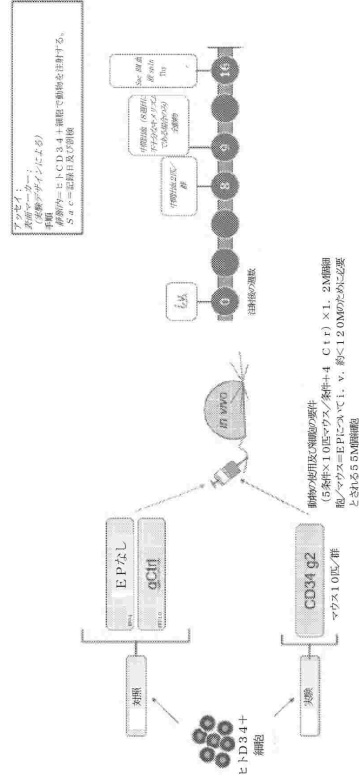
40

50

【 図 1 3 L 】



【図 14 A】



14A

【図 14 B】

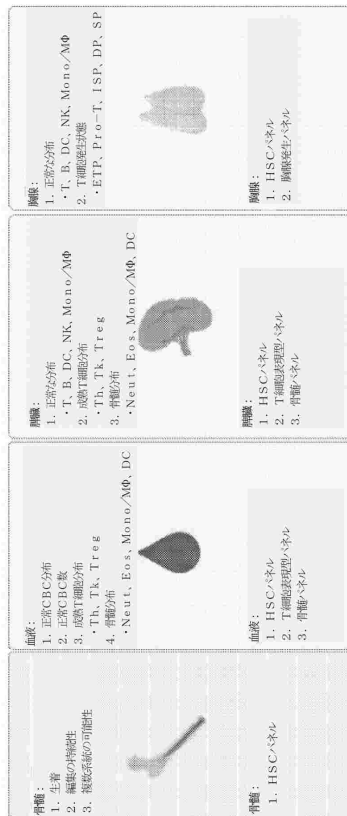


図 14B

【配列表】

2024502820000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/065813

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N5/0789
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Nielsen Julie S. ET AL: "Influence of host irradiation on long-term engraftment by CD34-deficient hematopoietic stem cells", Blood, Vol. 110, No. 3, 1 August 2007 (2007-08-01), XP55919592, Retrieved from the Internet: URL:https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0006497120495709?token=C86A73E32D5730ED4A5346939860F4754E9CF49AE858B1F8993B5C459A1CA22DC743275E15B30E3B259CB6B28F5758DC&originRegion=eu-west-1&originCreation=20220510110011 [retrieved on 2022-05-10] *Whole document, in particular: Figure 1* ----- -/--	1-22, 47-61

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 May 2022

Date of mailing of the international search report

25/05/2022

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bulcao de Melo B., T

4

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2021/065813

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DINA B. ABUSAMRA ET AL: "Not just a marker: CD34 on human hematopoietic stem/progenitor cells dominates vascular selectin binding along with CD44", BLOOD ADVANCES, vol. 1, no. 27, 26 December 2017 (2017-12-26), pages 2799-2816, XP055471082, ISSN: 2473-9529, DOI: 10.1182/bloodadvances.2017004317 *Whole document, in particular: Abstract and Introduction* -----	1-22, 47-61
X	WO 2019/113149 A1 (CRISPR THERAPEUTICS AG [CH]; VERTEX PHARMA [US]) 13 June 2019 (2019-06-13) *Whole document, in particular: Summary; page 17, line 30-page 27, line 14; page 57, line 8-page 60, line 11; page 69, lines 29-34 and claims* -----	23-46
X	WO 2019/200167 A1 (ROCKET PHARMACEUTICALS LTD [US] ET AL.) 17 October 2019 (2019-10-17) *Whole document, in particular: Summary; paragraphs [0094]-[0098] and claims* -----	23-46

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/065813

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: 10
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished. 20
3. Additional comments:

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/065813

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019113149 A1	13-06-2019	AU 2018378479 A1	18-06-2020
		BR 112020011255 A2	24-11-2020
		CA 3084955 A1	13-06-2019
		CN 111629747 A	04-09-2020
		EP 3720473 A1	14-10-2020
		JP 2021505587 A	18-02-2021
		KR 20200106159 A	11-09-2020
		MA 51107 A	14-10-2020
		SG 11202005147W A	29-06-2020
		US 2020384033 A1	10-12-2020
		WO 2019113149 A1	13-06-2019
WO 2019200167 A1	17-10-2019	AU 2019252662 A1	24-09-2020
		BR 112020020841 A2	19-01-2021
		CA 3093708 A1	17-10-2019
		CN 112153973 A	29-12-2020
		EP 3773636 A1	17-02-2021
		JP 2021521180 A	26-08-2021
		KR 20210003738 A	12-01-2021
		RU 2020129103 A	03-03-2022
		SG 11202008400S A	29-09-2020
		US 2021154237 A1	27-05-2021
		WO 2019200167 A1	17-10-2019

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02
C 1 2 N	5/078	(2010.01)	C 1 2 N	5/078
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	C 1 2 N	15/12
C 1 2 N	5/0783	(2010.01)	C 1 2 N	5/0783

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 パイク, エリザベス

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 0、ケンブリッジ、ケンブリッジパーク ドライブ
1 0 0、スイート 4 0 0

(72)発明者 ファリャ, アレハンドラ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 0、ケンブリッジ、ケンブリッジパーク ドライブ
1 0 0、スイート 4 0 0

(72)発明者 チャクラボーティ, ティルタ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 0、ケンブリッジ、ケンブリッジパーク ドライブ
1 0 0、スイート 4 0 0

F ターム (参考) 4B065 AA94X AB01 AC14 BA02 BA03 CA24 CA25 CA44

4C087 AA01 AA02 BB44 BB65 CA04 NA14 ZB07 ZB21 ZB26 ZB27